

**Universität Ulm**

**Abteilung Innere Medizin I – Sektion Endokrinologie**

Leiter: Prof. Dr. B. O. Böhm

**T-Zell-Immunität gegen Präproinsulin,  
Glutamatdecarboxylase 65 und  
Protein-Tyrosin-Phosphatase-2 in  
humanem Diabetes mellitus Typ 1**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

**Julia Christina Plomin**

Friedrichshafen

2005

Amtierender Dekan:

Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1.Berichterstatter:

Prof. Dr. Bernhard O. Böhm

2.Berichterstatter:

Prof. Dr. Peter Kern

Tag der Promotion:

24.11.2005

*für meine Oma Gisela*

# Inhaltsverzeichnis

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

## ABBILDUNGEN

## TABELLEN

<b>I. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Allgemeines</b> .....	<b>1</b>
1.1 Autoimmunerkrankungen.....	1
1.2 T-Zell vermittelte Immunantwort.....	1
1.3 MHC-Komplex.....	2
<b>2. Typ 1 Diabetes (T1D)</b> .....	<b>4</b>
2.1 Ätiologie und Pathogenese .....	4
2.2 Genetische Einflussfaktoren .....	5
2.3 Exogene Faktoren.....	6
2.4 Autoantigene und Autoantikörper .....	6
2.5 Drei wesentliche Antigene.....	8
2.5.1 Präproinsulin (PP-Ins) .....	8
2.5.2 Protein-Tyrosin-Phosphatase-2 (IA-2).....	9
2.5.3 Glutamatdecarboxylase 65 (GAD65).....	10
2.6 Zytokine.....	12
<b>3. Problemstellung</b> .....	<b>13</b>
<b>II. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>15</b>
<b>1. Probanden</b> .....	<b>15</b>
1.1 Kontrollpersonen .....	15
1.2 Hochrisikopersonen (Ab+ Individuen).....	15
1.3 Patienten mit Typ 1 Diabetes .....	17
<b>2. Material</b> .....	<b>19</b>
2.1 für die Lymphozytenseparation.....	19
2.2 für die Zellisolierung .....	19
2.3 für den T-Zell-Stimulationstest .....	19
2.4 für den Sandwich-ELISA .....	22
<b>3. Methoden</b> .....	<b>23</b>
3.1 Separation von PBMC durch Dichtegradzentrifugation.....	23
3.2 Isolierung von CD45RO+ und CD45RA+ T-Zellen mittels MACS Micro-Beads ...	24
3.3 T-Zell-Stimulationstest.....	24
3.4 Enzyme-Linked-Immuno Sorbent-Assay (ELISA).....	25
<b>4. Statistik</b> .....	<b>26</b>

---

4.1 SAS .....	26
4.2 SPSS .....	27
4.3 Microsoft Excel .....	27
<b>III. ERGEBNISSE .....</b>	<b>28</b>
<b>1. Probanden .....</b>	<b>28</b>
1.1 Charakteristika der Probanden.....	28
1.2 Antikörperstatus .....	28
<b>2. Zytokinantworten auf PP-Ins, IA-2 und GAD65 .....</b>	<b>29</b>
2.1 Periphere Blutlymphozyten (PBMC) .....	29
2.1.1 Kontrollpersonen .....	29
2.1.2 Antikörperpositive Personen (AB+).....	31
2.1.3 Patienten (T1D) .....	33
2.2 CD45RO+ T-Zellen (Memory-Zellen).....	36
2.2.1 Kontrollpersonen .....	36
2.2.2 Antikörperpositive Personen (AB+).....	38
2.2.3 Patienten (T1D) .....	40
2.3 CD45RA+ T-Zellen (Naiv/resting-Zellen).....	42
2.3.1 Kontrollpersonen .....	42
2.3.2 Antikörperpositive Personen (AB+).....	44
2.3.3 Patienten (T1D) .....	46
<b>IV. DISKUSSION.....</b>	<b>48</b>
<b>1. Diskussion der Methodik .....</b>	<b>48</b>
1.1 Auswahl der Probanden.....	48
1.2 Test auf drei Antigene: PP-Ins, IA-2 und GAD65 .....	49
1.3 Statistische Auswertung .....	50
<b>2. Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
2.1 Zytokinantworten der peripheren Blutlymphozyten (PBMC).....	50
2.2 Zytokinantworten von CD45RO+ (memory) und CD45RA+ (naiv/resting) T-Zellen .....	54
2.3 Prävention und Therapiemöglichkeiten.....	58
<b>3. Schlußfolgerungen.....</b>	<b>60</b>
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>62</b>
<b>VI. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>64</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>73</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>74</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

aa	Aminosäure (aminoacid)
AB+	Autoantikörperpositive Personen = Hochrisikopersonen
Abb	Abbildung
APCs	antigen presenting cells =antigenpräsentierende Zellen
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
CD4+	cluster of differentiation, spezifisch für T-Helferzellen
CD8+	cluster of differentiation, spezifisch für zytotoxische T-Zellen
CD45RA+	CD4+Helferzellpopulation mit dem Oberflächenmarker RA (naiv/resting)
CD45RO+	CD4+Helferzellpopulation mit dem Oberflächenmarker RO (memory)
cpm	counts per minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked-Immunsorbent-Assey
GABA	Gammaaminobuttersäure
GAD	Glutamatdecarboxylase
GADA	Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase
h	Stunde
HLA	human leukocyte antigen
IAA	insulin autoantibodies (Insulinautoantikörper)
IA-2A	Antikörper gegen Protein-Tyrosin-Phosphatase-2
ICA	islet cell autoantibodies (zytoplasmatische Inselzellautoantikörper)
IDDM	insulin dependent diabetes mellitus
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IL-	Interleukin
Ins	Insulin
MG	Molekulargewicht
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter

## Abkürzungsverzeichnis

---

n	Anzahl
NK	natürliche Killerzellen
NOD-Maus	non-obese-diabetic-Maus
PBMC	periphere Blutlymphozyten
pg	Picogramm
PHA	Phytohämagglutinin
PNPP	P-Nitrophenylphosphatin
PP-Ins	Präproinsulin
P-Ins	Proinsulin
rpm	rounds per minute
Tab	Tabelle
T1D	Typ 1 Diabetes mellitus bzw. Patienten mit T1D
Th	T-Helferzellen
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TT	Tetanustoxin
v	versus

## **Abbildungen**

- Abb. 01:** Antigenaufnahme und Präsentation durch Antigen-Präsentierende-Zellen (APCs)
- Abb. 02:** Aufbau des Präproinsulinmolekül
- Abb. 03:** Aufbau der Protein-Tyrosin-Phosphatase-2
- Abb. 04:** Aufbau der Glutamatdecarboxylase 65
- Abb. 05:** Vergleich der Zytokinantworten auf PP-Ins, IA-2 und GAD65 in PBMC von Kontrollpersonen
- Abb. 06:** Vergleich der Zytokinantworten auf PP-Ins, IA-2 und GAD65 in PBMC von antikörperpositiven (AB+) Personen
- Abb. 07:** Vergleich der Zytokinantworten auf PP-Ins, IA-2 und GAD65 in PBMC von Patienten (T1D)
- Abb. 08:** Vergleich der Zytokinantworten auf PP-Ins, IA-2 und GAD65 in CD45RO+ T-Zellen von Kontrollpersonen
- Abb. 09:** Vergleich der Zytokinantworten auf PP-Ins, IA-2 und GAD65 in CD45RO+ T-Zellen von antikörperpositiven (AB+) Personen
- Abb. 10:** Vergleich der Zytokinantworten auf PP-Ins, IA-2 und GAD65 in CD45RO+ T-Zellen von Patienten (T1D)
- Abb. 11:** Vergleich der Zytokinantworten auf PP-Ins, IA-2 und GAD65 in CD45RA+ T-Zellen von Kontrollpersonen
- Abb. 12:** Vergleich der Zytokinantworten auf PP-Ins, IA-2 und GAD65 in CD45RA+ T-Zellen von antikörperpositiven (AB+) Personen
- Abb. 13:** Vergleich der Zytokinantworten auf PP-Ins, IA-2 und GAD65 in CD45RA+ T-Zellen von Patienten (T1D)



**Abb. 14:** Vergleich der IFN $\gamma$ -Antworten (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) auf GAD65 in PBMC, CD45RO+ und CD45RA+ T-Zellen in Kontrollpersonen, AB+ Individuen und Patienten (T1D)

## Tabellen

- Tab. 01:** Charakteristika der untersuchten Kontrollpersonen: Alter, Teilnahme an den einzelnen Untersuchungen, HLA-Typisierung und Antikörperstatus
- Tab. 02:** Charakteristika der untersuchten Hochrisikopersonen: Alter, Teilnahme an den einzelnen Untersuchungen, HLA-Typisierung und Antikörperstatus
- Tab. 03:** Charakteristika der untersuchten Typ1 Diabetiker: Alter, Teilnahme an den einzelnen Untersuchungen, HLA-Typisierung, Antikörperstatus und Krankheitsdauer
- Tab. 04:** GAD65-Peptide und ihre Aminosäuresequenzen
- Tab. 05:** PP-Ins-Peptide und ihre Aminosäuresequenzen
- Tab. 06:** IA-2-Peptide und ihre Aminosäuresequenzen
- Tab. 07:** Anzahl positiver Autoantikörper bei AB+ Individuen und bei Typ 1 Diabetikern in allen drei Studien

# **I. EINLEITUNG**

## **1. Allgemeines**

### **1.1 Autoimmunerkrankungen**

Autoimmunerkrankungen sind Krankheiten, deren Ursache eine fehlgeleitete Reaktion des körpereigenen Immunsystems auf körpereigene Strukturen ist. Hierbei äußert sich die Reaktion sowohl auf zellulärer wie auch auf humoraler Ebene. Man unterscheidet dabei organspezifische Erkrankungen wie z. B. beim Typ 1 Diabetes von generalisierten systemischen Verläufen wie beim systemischen Lupus erythematodes.

Eine entscheidende Rolle spielt neben dem Verlauf der Erkrankung auch deren Pathogenese. Unterschieden werden hierbei primär durch spezifische Antikörper hervorgerufene Erkrankungen von Krankheiten, die durch lymphozytäre Zerstörungsinfiltration entstehen (z. B. Diabetes mellitus Typ 1) (SCHERBAUM et al. 1986).

### **1.2 T-Zell vermittelte Immunantwort**

T-Zellen spielen eine Schlüsselrolle in der spezifischen zellulären Immunabwehr. Die Unterscheidung zwischen „fremdem“ und „körpereigenem“ Antigen erfolgt im Thymus durch Positiv- oder Negativ- Selektion (GARZA et al. 2000).

T-Zellen können anhand ihrer Oberflächenproteine (CD= cluster of differentiation) in zwei Haupt-Subklassen eingeteilt werden: zytotoxische T-Zellen (CD8+) und T-Helferzellen (CD4+). CD8+ Lymphozyten erkennen Antigene mittels der MHC-Klasse I, wohingegen die Antigenerkennung bei den CD4+ Zellen über MHC-Klasse II erfolgt.

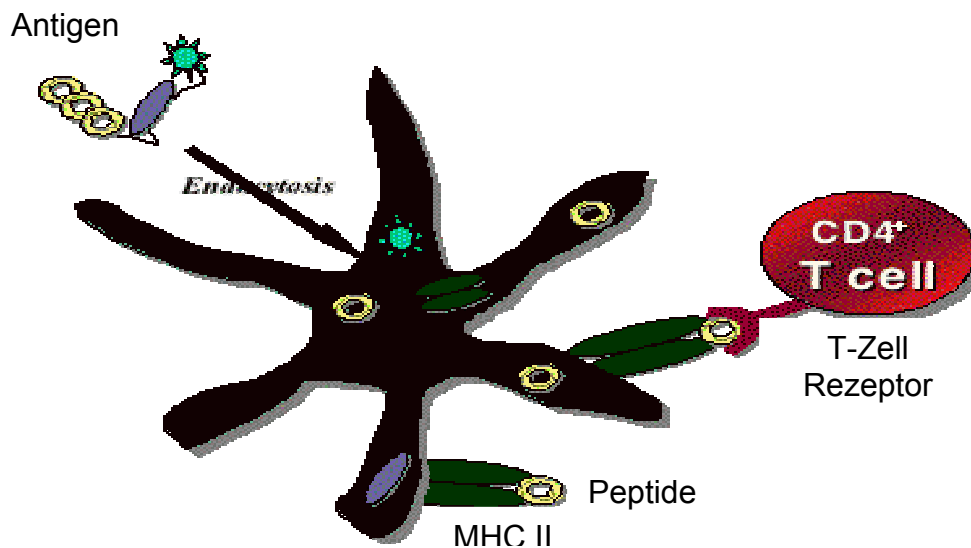
Eine weitere Unterteilung erfolgt nach der CD45 Isoform-Expression, wobei der Zelloberflächenmarker CD45 ein Glykoprotein darstellt, das für die Reifung und

Aktivierung der T-Zellen eine entscheidende Rolle spielt. Es werden hier CD45RA<sup>+</sup> (naiv/resting) T-Zellen von CD45RO<sup>+</sup> (memory) T-Zellen unterschieden (SALLUSTO et al. 1999). CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen sind ungeformte (naive) Zellen, die nicht auf wiederholte Antigene reagieren und haben eine sogenannte regulatorische Funktion. CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen dahingegen sind in vivo geprimt und stellen somit eine durch Antigenkontakt aktivierte Population dar (RUFER et al. 2001). Im Verlauf der Immunpathogenese werden die CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert und exprimieren auf ihrer Oberfläche sowohl CD45RA<sup>+</sup> als auch CD45RO<sup>+</sup> (CD45RA<sup>+</sup>RO<sup>+</sup> T-Zellen). Im weiteren Verlauf verlieren sie dann den Marker CD45RA<sup>+</sup> und werden jetzt als CD45RO<sup>+</sup> T- Zellen (memory-Zellen) bezeichnet (PETERSEN et al. 1999). Memory-Zellen sind vorwiegend in peripheren Geweben zu finden und reagieren sehr stark auf Antigenstimuli. Für den korrekten Ablauf der Immunreaktion sind sowohl die memory-Funktion als auch das regulatorische Verhalten der naiven T-Zellen unabdingbar.

Weiterhin können CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Bezug auf die Immunregulation in mehrere funktionell verschiedene Subgruppen eingeteilt werden: Th1-, Th2- und T-regulatorische (Treg) Zellen. Hierbei erfolgt die Klassifikation anhand typischer Zytokinmuster. Es wird dabei angenommen, dass das jeweilige Verhältnis von Th1- zu Th2- zu Treg-Zytokinantworten eine entscheidende Rolle bei der Entstehung eines insulinabhängigen Diabetes spielt (ABBAS et al. 1996).

### **1.3 MHC-Komplex**

Makrophagen tragen an ihrer Zelloberfläche MHC-Moleküle (=major histocompatibility complex) und präsentieren als sogenannte APCs (=Antigen-Präsentierende-Zellen) den T-Lymphozyten Peptide, welche dann vom spezifischen T-Zell-Rezeptor erkannt werden können. CD4<sup>+</sup> Zellen werden hierbei von MHC-Klasse II Molekülen aktiviert, während CD8<sup>+</sup> Zellen Peptide erkennen, die mit MHC-Klasse I Molekülen in Zusammenhang stehen (MURRAY et al. 1989, ENGELHARD 1994) ( siehe Abb. 01).



### Antigen präsentierende Zelle (APC)

**Abb. 01.** Antigenaufnahme und Präsentation durch Antigen-Präsentierende-Zellen (APCs) (verändert nach EISENBARTH 2004)

Der MHC-Komplex wird beim Menschen als HLA-Komplex (=human leukozyte antigen) bezeichnet und ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 lokalisiert. Die HLA-Moleküle sind durch einen hohen Polymorphismus gekennzeichnet und unterscheiden sich in den verschiedenen Individuen in ihren Aminosäuresequenzen (WONG und WEN 2003, DURINOVIC-BELLO 1997). Aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Unterschiede sind sie in zwei Klassen eingeteilt:

- Klasse I: HLA-A, HLA-B, HLA-C
- Klasse II: HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR

Eine deutliche Assoziation mit Typ 1 Diabetes zeigen die Gene HLA-DRB1\*0401, DQB1\*0302, DQA1\*0501 und DRB1\*0301, DQB1\*0201 (WEN et al. 2000). Im spezifischen Immunprozess erkennen die T-Zellen kurze lineare Epitope von prozessierten Antigenen, die in peptidbindende Gruben ihrer HLA-Allele passen. Die HLA-Klasse II-Allele, auch aus den oben genannten HLA-

Hochrisikomerkmale, binden bevorzugt Peptide, die 12-18 Aminosäuren lang sind (RAMMENSEE et al. 1995).

Es wird angenommen, dass die HLA-Moleküle, offenbar aufgrund der jeweils besonderen Peptidbindungseigenschaften, zelluläre Immunprozesse in besonderem Maße zu steuern vermögen.

## **2. Typ 1 Diabetes (T1D)**

### **2.1 Ätiologie und Pathogenese**

Mit einer Prävalenz von 0,4% ist der Typ 1 Diabetes (T1D) in Deutschland die am häufigsten auftretende poligene Autoimmunerkrankung, deren klinischer Manifestation zahlreiche, immunmedierte Prozesse vorausgehen.

Die Inzidenz des T1D schwankt von 0,1/100.000 pro Jahr in China und Venezuela bis zu 36/100.000 pro Jahr in Sardinien und Finnland (KARVONEN et al. 2000).

Über Jahre hinweg führt die Inflammation und Zerstörung der Insulin produzierenden Beta-Zellen im Pankreas (=chronische Insulinitis), welche erst außerhalb (Peri-Insulinitis) und anschließend in den endokrinen Inseln des Pankreas zu finden ist, zum kompletten Ausfall der Beta-Zellfunktion (GAGNERAULT et al. 2002).

Die klinischen Symptome des Insulinmangels wie Hyperglykämien treten erst auf, wenn mehr als 80-90% der Beta-Zellen zerstört sind (FOULIS et al. 1986).

Der Krankheit geht eine sogenannte prädiabetische Phase voraus, die durch das Auftreten von Autoantikörpern gegen Strukturen im Pankreas gekennzeichnet ist. Diese Phase unterliegt starken individuellen Schwankungen, kann Jahre überdauern und muss nicht unmittelbar zur klinischen Manifestation des T1D führen (TARN et al. 1988). Es wurde festgestellt, dass sich bei einem juvenilen T1D die Autoimmunität meist bereits vor dem zweiten Lebensjahr entwickelt (HUMMEL et al. 2004).

Hat sich die Krankheit manifestiert, treten typische Symptome auf wie Durst, Polyurie, Gewichtsabnahme, Müdigkeit und Wundheilungsstörungen. Eine akute Hyperglykämie kann über das hyperglykämische Koma bis hin zum Tod führen.

## 2.2 Genetische Einflussfaktoren

Der Typ 1 Diabetes (T1D) folgt nicht den klassischen Vererbungsregeln, sondern tritt in 80-90% der Fälle spontan auf (GALE 2001). Dennoch unterliegen Verwandte von Diabetikern einem höheren Erkrankungsrisiko. Zwillingsforschungen und epidemiologische Studien sprechen für eine HLA-assoziierte genetische Veranlagung mit schwacher Penetranz. Bei Zwillingen von Erkrankten liegt die Prävalenz bei 6%, auch ist die Prävalenz bei nahen Verwandten erhöht, während nur 0,4% der Normalbevölkerung erkranken (GORSUCH et al. 1982, KARVONEN et al. 1993, ALTOBELLI et al. 1998).

Das hereditäre Risiko an T1D zu erkranken, wird von circa 20 verschiedenen genetischen Markern (IDDM 1-20) bestimmt, wobei der Hauptteil des Risikos von IDDM1 (=HLA-Haplotyp) und IDDM2 (=VNTR-Region) ausgeht (TABOR et al. 2002). Insgesamt sind die beiden Merkmale für circa 50% des genetischen Risikos verantwortlich, wobei circa 42% des Risikos auf die HLA-Merkmale und 8% des Risikos auf die VNTR-Region entfallen (EERLIGH et al. 2003).

Ein besonders hohes Risiko an T1D zu erkranken, tragen dabei Individuen mit den **HLA-Merkmalen** DRB1\*03-DQA1\*0501-DQB1\*0201/DRB1\*0401-DQA1\*0301-DQB1\*0302. Bei Individuen, die dieses Merkmal tragen, kann bis zum Lebensalter von 15 Jahren in 5% der Fälle mit einem T1D gerechnet werden (LAMBERT et al. 2004). Im Gegensatz dazu gibt es auch protektive HLA-Allele, die vor einer T1D-Erkrankung schützen wie HLA- DQA1\*0103 und HLA-DQB1\*0601 (WEN et al. 2000).

Die **VNTR**-Region ist auf Chromosom 11 lokalisiert und entspricht dem IDDM2-Lokus (ANJOS und POLYCHRONAKOS 2004). Es existieren drei Klassen des VNTR-Gens, die sich durch ihre Anzahl an Wiederholungen von bestimmten Basenpaaren unterscheiden. VNTR-Klasse I besteht aus 30-60 sich wiederholenden Basenpaaren, während VNTR-Klasse III aus 120 Basenpaaren besteht. Individuen, die homozygot für das Merkmal I/I sind, werden in einem Kollektiv von gesunden Personen zu circa 50-60% gefunden, wohingegen 75-80% der T1D Patienten homozygot für dieses Merkmal sind (ANJOS und POLYCHRONAKOS 2004). Daraus lässt sich erkennen, dass VNTR I/I ein genetisches Risiko für eine T1D Erkrankung darstellt. Der VNTR-Klasse III wird im Gegensatz dazu ein protektiver Effekt in Verbindung mit T1D nachgesagt. Dieser

Effekt wird bereits wirksam, sobald die Person ein VNTR III-Allel trägt (BENETT et al. 1996).

Mit einer kombinierten Untersuchung von IDDM1 und IDDM2 im Kindesalter können also Kinder mit einem erhöhten T1D Erkrankungsrisiko ermittelt werden (WALTER et al. 2003).

### **2.3 Exogene Faktoren**

Der Typ 1 Diabetes ist eine komplexe Erkrankung, die auf dem Zusammenspiel vieler verschiedener Einflussfaktoren basiert. Hierbei spielt nicht nur die Genetik eine Rolle, sondern auch verschiedene exogene Bedingungen. Offenbar führen sich ändernde Umweltbedingungen bei entsprechend prädisponierten Personen immer häufiger zum Ausbruch der Erkrankung. Dies könnte die weltweit stetig steigende Inzidenz des Typ 1 Diabetes erklären.

Über die möglichen Triggerereignisse, die den Autoimmunprozess starten und die chronische Beta-Zellzerstörung vorantreiben, kann momentan nur spekuliert werden. In Frage kommen könnten Virusinfektionen wie Röteln, Masern, Mumps und die Infektion mit dem Coxsackievirus (HUMMEL et al. 2000, JUN und YOON 2001). Eine weitere Rolle in Zusammenhang mit der Entwicklung des Typ 1 Diabetes könnte auch die Säuglingsernährung spielen (KIMPIMAKI et al. 2001, ZIEGLER et al. 2003).

Bekannt ist jedoch, dass sogenannte unspezifische „Gefahr-Signale“ die Autoreaktivität von T-Zellen auslösen können (sog. „danger hypothesis“, MATZINGER 1994, ZINKERNAGEL 1996). Diese Signale sind bis heute nicht definitiv bestimmt. Als potentielle Gefahren-Signale gelten dabei Hitzeschockproteine, Nucleotide, Sauerstoffradikale und Interferone (GALLUCCI und MATZINGER 2001).

### **2.4 Autoantigene und Autoantikörper**

Offt bereits einige Jahre bevor klinische Symptome erkennbar werden, können Autoantikörper gegen Inselzell-Antigene im Serum des Typ 1 Diabetikers



nachgewiesen werden (GORSUCH et al. 1981). Bei diesen Individuen führt eine Störung im Immunsystem dazu, dass Antikörper gegen eigene Strukturen gebildet werden (ZIEGLER et al. 2000). Diese Autoantikörper sind ein Charakteristikum für das Stadium der aktiven Beta-Zellzerstörung im Pankreas.

Aus diesem Grund können einige der bisher entdeckten und mit Diabetes Typ 1 assoziierten Autoantikörper in der Diabetesdiagnostik eingesetzt werden. Ein sich entwickelnder Typ 1 Diabetes kann bei erstgradig Verwandten von Typ 1 Diabetikern sicher vorhergesagt werden durch die Kombination aus Autoantikörpermessungen und Stoffwechselprüfungen (HIEN und BÖHM 2005). Insbesondere überwacht werden dabei die Autoantikörperproduktion von ICA (zytoplasmatische Inselzell-Autoantikörper), IAA (Insulin-Autoantikörper), GADA (Glutamatdecarboxylase-Autoantikörper) und IA-2A (Protein-Tyrosin-Phosphatase-2-Autoantikörper). Individuen, die auf mehrere Autoantikörper gleichzeitig positiv getestet sind oder die besonders hohe Autoantikörpertiter aufweisen, sind sehr viel stärker gefährdet an Typ 1 Diabetes zu erkranken als Personen, die für einen oder keinen Autoantikörper positiv getestet wurden (STREBELOW et al. 1999, SCHLOSSER et al. 2003, BARKER et al. 2004) Diese Personen erkranken zu bis zu 80% innerhalb der nächsten fünf Jahre an T1D, wohingegen Personen, die nur auf einen Autoantikörper positiv getestet sind, innerhalb der selben Zeitspanne nur zu 3% erkranken (BONIFACIO et al. 1990). Die Entwicklung multipler Autoantikörper fand am schnellsten statt im Kindesalter von Individuen, die bereits vor dem 2. Lebensjahr für einen Autoantikörper positiv getestet wurden (HUMMEL et al. 2004).

**ICA** richten sich gegen zytoplasmatische Antigene der Beta-Zellen des endokrinen Pankreas und sind bei 85% der neumanifestierten Typ 1 Diabetiker zu finden, während sie nur in 1,7% der Normalbevölkerung auftreten. In an Typ 1 Diabetes erkrankten Personen sind die Antikörper meist nach der Manifestation nicht mehr nachweisbar, d.h. die ICA-Produktion ist rückläufig (LENDRUM et al. 1976).

**IAA** treten zu 60-100% in Seren von neu manifestierten Typ 1 Diabetikern auf, sie werden aber nur bei 3-7% der gesunden Verwandten und bei 0,5% der Normalbevölkerung gefunden (BINGLEY et al. 1997).

In Seren von europäischen Typ 1 Diabetikern sind in 50-80% der Fälle Autoantikörper gegen die Glutamatdecarboxylase (**GADA**) gerichtet (HAGOPIAN et al. 1995), während die Prävalenz von GADA in Seren von asiatischen Patienten

sehr viel geringer ist. In Taiwan beträgt sie beispielsweise nur 47,1% (CHANG et al. 2004). Diese Autoantikörper sind insbesondere bei Patienten mit einem spätmanifesten Typ 1 Diabetes (sog. „LADA“-Diabetes) stark positiv.

**IA-2A** treten bei Normalpersonen in einem Bereich von 0-2,5%, bei erstgradig Verwandten von Erkrankten zu 1,5-5,3% und bei kürzlich manifestierten Typ 1 Diabetikern zu 55-75% im Serum auf (BONIFACIO et al. 1990).

Antikörper können bereits viele Jahre vor einer klinischen T1D-Manifestation auftreten und bleiben oft auch noch viele Jahre nach der T1D-Diagnose im Serum nachweisbar (ATKINSON et al. 1993). Ein Problem bei den Tests auf Autoantikörper ergibt sich daraus, dass die Autoantikörper zeitlich nicht nach dem gleichen Muster auftreten. IA-2A findet man oft schon bei einem Lebensalter von zwei Monaten, während GADA meist erst zu einem späteren Zeitpunkt im Leben auftreten (HOLMBERG et al. 2003).

Um ein individuelles Diabetesrisiko sicher zu entdecken, sind wiederholte Antikörperuntersuchungen bei Risikopersonen während der Kindheit notwendig (COLMAN et al. 2002).

## **2.5 Drei wesentliche Antigene**

Im Verlauf der T1D-Erkrankung werden Autoantikörper und spezifische T-Zellen gebildet, die gegen drei Hauptautoantigene der Beta-Zellen, Präproinsulin (PP-Ins), Glutamatdecarboxylase 65 (GAD65) und Protein-Tyrosin-Phosphatase-2 (IA-2) gerichtet sind. Die T-Zell-Reaktivitäten gegen die drei Autoantigene sind sowohl bei Probanden mit autoimmuner Beta-Zellzerstörung, als auch bei gesunden Kontrollpersonen zu finden.

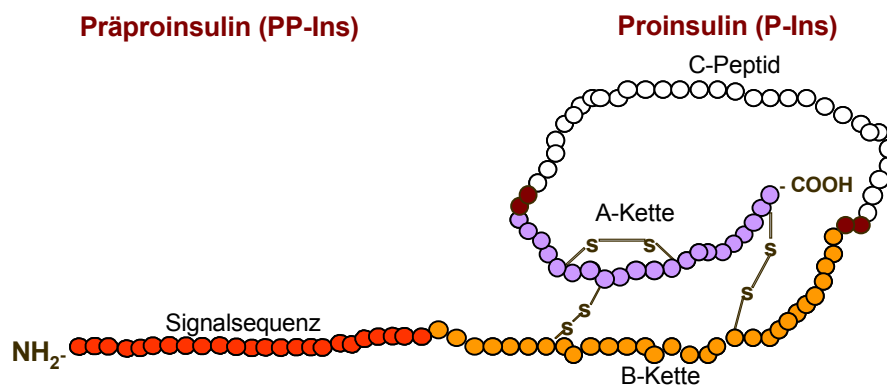
### **2.5.1 Präproinsulin (PP-Ins)**

Insulin und seine Prohormone Präproinsulin (PP-Ins) und Proinsulin (P-Ins) nehmen als Autoantigene im T1D eine Sonderstellung ein, da sie die einzigen betazellspezifischen Autoantigene sind. Sie werden direkt ins Pfortadersystem

sezerniert und besitzen ein hohes Expressionsniveau in den pankreatischen Beta-Zellen.

PP-Ins ist die biologisch unwirksame Vorstufe des Hormons Insulin. Es umfasst 107 aa und wird in den endokrinen Beta-Zellen des Pankreas gebildet. Es besteht aus einer Signalsequenz (21 aa), einer B-Kette (30 aa), dem C-Peptid (35 aa) und der A-Kette (21 aa). Nachdem die Signalsequenz abgespalten wurde, entsteht Proinsulin (86 aa) als Zwischenprodukt. Aus diesem werden dann zu gleichen Teilen C-Peptid und Insulin (51 aa) freigesetzt (siehe auch Abb. 02).

In dieser Arbeit wurden 21 überlappende Peptide verwendet, um alle Teile des PP-Ins-Moleküls abzudecken.



**Abb. 02.** Aufbau des Präproinsulinmolekül

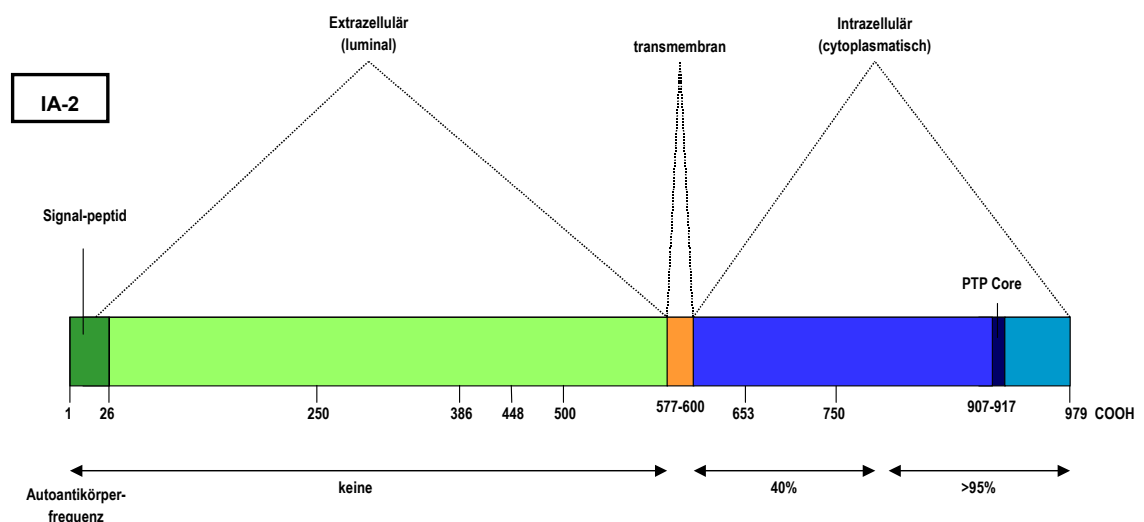
### 2.5.2 Protein-Tyrosin-Phosphatase-2 (IA-2)

Die Protein-Tyrosin-Phosphatase-2 (IA-2) ist Teil der Familie der Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP), zeigt jedoch sowohl in Menschen als auch in Tieren selbst keine enzymatische Reaktivität (LAN et al. 1994). IA-2 ist im menschlichen Genom auf dem Chromosom 7q36 lokalisiert und seine cDNA codiert für ein transmembranäres Protein von 979 aa Länge mit einem Molekulargewicht von 106 kDa. Es besitzt eine extrazelluläre (aa 1-576) und eine intrazelluläre (aa 600-

979) Domäne, die durch eine Transmembrandomäne (aa 577-599) verbunden sind (siehe auch Abb. 03).

Man findet IA-2 in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas und in großen Teilen des zentralen Nervensystems, wo es vorwiegend in neuroendokrinen Zellen exprimiert wird. Desweiteren spielt das Molekül auch eine Rolle als Marker bei neuroendokrinen Tumoren (XIE et al. 1996).

Es ist bekannt, dass Seren von T1D Patienten nur mit Teilen der intrazellulären Domäne reagierten, nicht aber mit der extrazellulären Domäne (LESLIE et al. 1999). Besonders die Region der aa 751-770 des IA-2-Moleküls wird von HLA-DR4 präsentiert (PEAKMAN et al. 1999).



**Abb. 03.** Protein-Tyrosin-Phosphatase-2 (verändert nach LESLIE et al. 1999 )

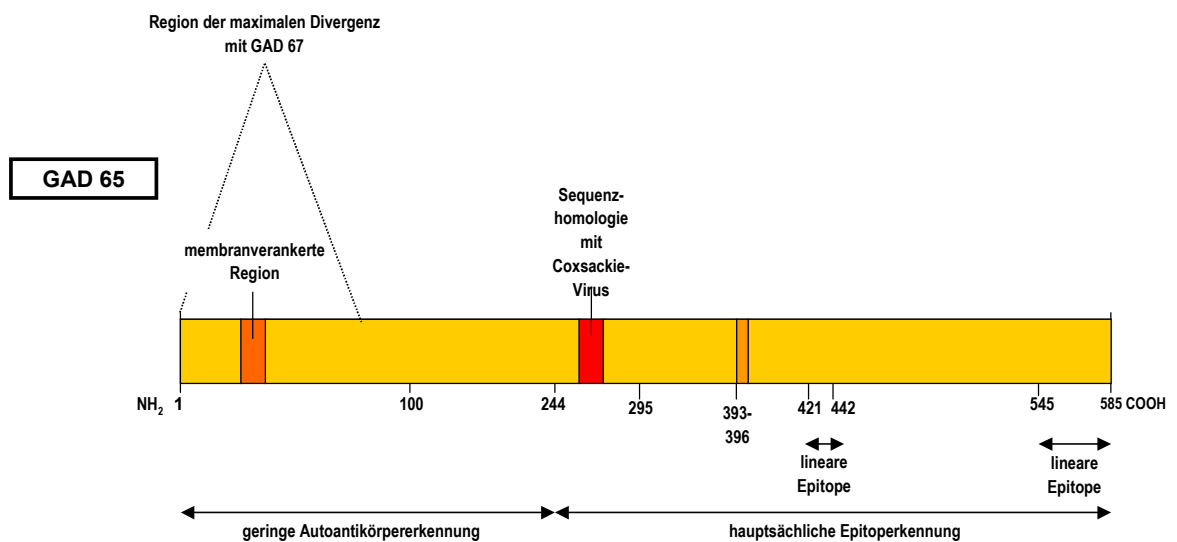
### 2.5.3 Glutamatdecarboxylase 65 (GAD65)

Das Enzym Glutamatdecarboxylase (GAD) kommt beim Menschen sowohl in neuronalen Geweben als auch in den endokrinen Beta-Zellen des Pankreas vor. Es tritt in zwei Isoformen auf, GAD65 und GAD67. GAD65 hat ein Molekulargewicht von 65 kDa, eine Länge von 585 aa und wird von Genen auf

Chromosom 3 codiert (siehe auch Abb. 04). GAD67 besitzt ein Molekulargewicht von 67 kDa, ist 593 aa lang und wird von Genen codiert, die auf Chromosom 10 liegen. Beide Isoformen sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 65% identisch und unterscheiden sich hauptsächlich in ihren jeweils ersten 100 aa (KARLSEN et al. 1991, BLU et al. 1992). Beide GAD-Isoformen werden als lösliche Moleküle im Zytoplasma synthetisiert. GAD67 bleibt löslich und GAD65 wird posttranslational modifiziert und an die Membranen von synaptischen Vesikeln gebunden (BLU et al. 1992). GAD65 findet man vorwiegend in den Beta-Zellen des Pankreas, wohingegen GAD67 vor allem in neuronalen Geweben lokalisiert ist.

GAD ist Teil des „GABA-Netzwerks“ und katalysiert die Bildung von  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) aus Glutaminsäure. Wegen seines Vorkommens in neuronalen Geweben wird GAD mit der gestörten Funktion peripherer Nerven beim Typ 1 Diabetes in Verbindung gebracht (HOELDTKE et al. 2000).

Den Hauptangriffspunkt bei der Autoimmunreaktion des Typ 1 Diabetikers gegen das Antigen GAD65 bilden mittlere (aa 245-449) und C-terminale (aa 450-585) Regionen des Moleküls (ENDL et al. 1997).



**Abb. 04.** Glutamatdecarboxylase 65 (verändert nach LESLIE et al. 1999)

## 2.6 Zytokine

Zytokine sind Stoffe, die zur Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen dienen. Zur Familie der Zytokine zählen Wachstumsfaktoren, Interleukine, Lymphokine und Monokine. Die Zytokine werden vor allem von aktivierten T-Lymphozyten, aber auch von Makrophagen und natürlichen Killerzellen sezerniert. Aufgrund ihrer Zytokinproduktion können die CD4<sup>+</sup> T-Zellen in verschiedene Subgruppen eingeteilt werden: Th1-, Th2- und T-regulatorische (Treg) Zellen. **Th1-Zellen** produzieren vor allem Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), Tumornekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interleukin-2 (IL-2) (MOSMANN und SAD 1996). Ihre Immunantworten gehen in zelluläre Richtung. **Th2-Zellen** dahingegen induzieren humorale Immunantworten (MOSMANN und COFFMAN 1989) und sezernieren vorwiegend IL-4 und IL-5. Die **Treg-Zellen** produzieren u. a. immunregulatorische Zytokine wie IL-10 und TGF $\beta$  (RONCAROLO et al. 2000). Desweiteren wird der regulatorische Effekt dieser Treg-Zellen auch durch direkte Zellkontakte vermittelt.

TNF $\alpha$  wird vor allem von Makrophagen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen produziert (VASALLI 1992). Es wirkt toxisch auf pankreatische Beta-Zellen durch Aktivierung von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Mastzellen und natürlichen Killerzellen. Auch hemmt TNF $\alpha$  die Insulinsekretion der Beta-Zellen in vitro (RABINOVITCH 1993). Das Zytokin IFN $\gamma$  aktiviert Makrophagen, neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen. Es fördert die Zelldifferenzierung, wobei die Bildung von Th1-Zellen vorangetrieben und die Entstehung von Th2-Zellen gehemmt wird.

Das proinflammatorische IL-2 ist einer der bedeutendsten Wachstumsfaktoren und kann Apoptose induzieren (THEZE et al. 1996). Das antiinflammatorisch wirkende IL-4 fördert humorale Immunantworten, spielt eine Rolle bei der Differenzierung von Vorläuferzellen in Th2-Zellen und hemmt die Produktion von Th1-Zytokinen durch Antigen-Präsentierende-Zellen (APCs) (SEDER und PAUL 1994, ABBAS et al. 1996). Das Th2-Zytokin IL-5 ist zusammen mit IL-2 und IL-4 am Wachstum und an der Differenzierung von B-Zellen beteiligt. Das immunregulatorische IL-10 aktiviert die humorale Immunantwort und ist in der Lage, das Th1-Zytokin TNF $\alpha$  und andere Zytokine und Chemokine zu hemmen (FIORENTINO et al. 1991).

### **3. Problemstellung**

Beim autoimmunen Typ 1 Diabetes (T1D) werden Autoantikörper und spezifische T-Zellen gebildet, die gegen drei Hauptautoantigene der Beta-Zellen, Präproinsulin (PP-Ins), Glutamatdecarboxylase 65 (GAD65) und Protein-Tyrosin-Phosphatase-2 (IA-2) gerichtet sind. Insulin und seine Prohormone PP-Ins und Proinsulin (P-Ins) nehmen als Autoantigene im T1D eine Sonderstellung ein, da sie die einzigen betazellspezifischen Antigene sind. Die anderen zwei Autoantigene, IA-2 und GAD65, werden im Laufe des Autoimmunprozesses auf pankreatischen Beta-Zellen hochreguliert, jedoch sind sie auch auf anderen neuronalen und neuroendokrinen Geweben im Körper vorhanden. Die T-Zell-Reaktivitäten gegen die drei Autoantigene sind sowohl bei Probanden mit autoimmuner Beta-Zellzerstörung, als auch bei gesunden Kontrollpersonen zu finden. Der funktionelle Phänotyp der T-Zell-Antwort gegen jedes einzelne Autoantigen und dessen mögliche Wechselwirkung im T1D-Autoimmunprozess ist bisher noch nicht näher untersucht worden und es ist auch noch nicht gelungen, das „krankheitsauslösende“ Beta-Zell-Autoantigen zu definieren.

#### **Ziele dieser Arbeit sind:**

- die Untersuchung der Rolle jedes einzelnen Autoantigens (PP-Ins, GAD65 und IA-2) in der T1D-Beta-Zellzerstörung in Probanden mit einem hohen genetisch bedingten T1D-Risiko;
- die Bestimmung des spezifischen Zytokinphänotyps der T-Zell-Antwort (Th1 v. Th2 v. Treg) gegen alle drei Autoantigene gleichzeitig;
- die Feststellung der Unterschiede in den T-Zell-Antworten zwischen den drei Autoantigenen in Probanden mit autoimmuner Beta-Zellzerstörung (Ab+ Individuen und T1D Patienten) und in, mit diesen im HLA-Haplotyp übereinstimmenden, gesunden Kontrollpersonen;
- die Bestimmung des Zytokinphänotyps von verschiedenen T-Zell-Populationen;
- die Analyse der Funktion von CD45RO+ (memory) und CD45RA+ (naiv/resting) T-Zellen, ausgehend von den Ergebnissen der peripheren Blutlymphozyten (PBMC);

- die Entdeckung möglicher Hinweise über die Rolle der Autoantigene und über deren mögliche Wechselwirkung bei Initiation und Ablauf des T1D-Autoimmunprozesses.

Durch diese Untersuchungen erhofft man sich neue Erkenntnisse über die Pathogenese des T1D, die zu einer möglichen Anwendung in einer klinischen T1D-Intervention führen könnten.



## II. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Probanden

#### 1.1 Kontrollpersonen

Die Kontrollgruppen der drei Studien (GAD65-, IA-2- und PP-Ins-Studie) bestehen aus gesunden Personen mit dem T1D-assoziierten HLA-Haplotyp DRB1\*04, DQB1\*03. Die Titer für die vier getesteten Autoantikörper weisen Werte unter den Cut offs auf. Die Kontrollgruppe dient zum Vergleich gegenüber der Hochrisikogruppe, die sich durch positive Autoantikörpertiter auszeichnet, und gegenüber Patienten mit bereits manifestem Typ1 Diabetes .

GAD65-Studie: 13 Probanden

IA-2-Studie:13 Probanden

PP-Ins-Studie: 11 Probanden

Die genauen Autoantikörpertiter, Altersangaben, sowie die HLA-Typisierung gehen aus Tabelle 01 hervor.

#### 1.2 Hochrisikopersonen (Ab+ Individuen)

Die Gruppe der Autoantikörper-positiven Personen (Hochrisikogruppe) stammt aus der Karlsburger „Schulkinder-Studie“. Ziel der Studie war es, anhand von Antikörpern, das Erkrankungsrisiko an Typ 1 Diabetes bestimmen zu können. Es wurde die Menge und Häufigkeit der vier wichtigsten Autoantikörper (ICA, IAA, GADA, IA-2A) bei 9419 Schulkindern bestimmt (STREBELOW et al. 1999). In dieser Arbeit waren alle getesteten AB+ Individuen für mindestens einen Autoantikörper positiv und wiesen die T1D-assoziierten HLA-Allele DRB1\*04, DQB1\*03 auf.

GAD65-Studie: 11 Probanden

IA-2-Studie: 10 Probanden

PP-Ins-Studie: 11 Probanden

Es besteht vor allem dann ein erhöhtes Risiko, an Typ 1 Diabetes zu erkranken (über 80% innerhalb von fünf Jahren), wenn mehr als ein Antikörper positiv getestet ist. Genauere Angaben zu den einzelnen Testpersonen können Tabelle 02 entnommen werden.

**Tab. 01.** Charakteristika der untersuchten Kontrollpersonen: Alter, Teilnahme an den einzelnen Untersuchungen, HLA-Typisierung und Antikörperstatus

Kontrollpersonen												
No.	Alter (Jahre)	GAD65	IA-2	PP-Ins	HLA		(Auto)antikörper				Referenz Kürzel bzw. Abnahme-Nr.	
					DRB1*	DQB1*	ICA (JDFU)	IAA/IA ( $\mu$ U/l)	GADA (KU/l)	IA2A (KU/l)		
								20	204,6	3,9	1,85	
1	29	592A	592A	246A	0404, 0701	0302, 02	0	64,25	0,61	0,41	246A	
2	20	399A	399A	399A	0401, 0301	0302, 0201	0	62,99	0,34	0,35	399A	
3	28	426A		77A	0404, 1001	0302, 0501	0	33,46	0,62	0,63	426A	
4	42	476A		233A	0401, 0301	0302, 02	0	213,8	0,93	0,27	476A	
5	30	596A		245A	04, 0407	0302, 0301	0	26,29	0,51	0,48	245A	
6	20		400A	400A	0401, 0401	0302, 0302	0	0	0	0	400A	
7	4		315A	308A	0401, 0101	0302, 0501	0	0	0,86	0,31	379A	
8	31	412A	412A		0402, 1501	0302, 0602	0	56,78	1,02	0,33	412A	
9	25	588A	588A		0401, 1501	0302, 0602	0	0	0,15	0,27	690A	
10	23	306A			0401, 0101	0301, 0501	0	0	0,36	0,37	306A	
11	38	329A			0401, 0301	0302, 02	0	0	0,15	0,33	329A	
12	36	330A			0401, 1303	0301, 0603	0	0	0,15	1,76	735A	
13	41	349A			0401, 0801	0302, 04	0	0	0,47	0,55	349A	
14	50	408A			04, 12		0	130,4	0,15	1,8	408A	
15	25	427A			04, -	03, 03	0	41,88	0,15	1,13	427A	
16	46		147A		0401, 1501	0302, 0602	0	0	0,38	0,47	147A	
17	15		EKD2		04, 08	0302, 0402	0	18	0	0	1	
18	19		EKD7		04, 07	0302, 0201	0	27	0	0	1	
19	13		EKD24		02, 11(5)	0302, 0301	0	36	0	0	1	
20	18		EKD49		04, 07	0302, 0201	0	71	1	0	1	
21	31		214A		0401, 0101	0302, 0501	0	10,2	0,15	0,36	214A	
22	47		285A		0401, 0101	0302, 0301	0	0	0,15	1,05	285A	
23	15			EKD48	0401, 0408	0302, 0301	0	0	0	0	1	
24	16			EKD14	0404, 04	0301, 0301	0	13,53	1,47	0,27	1	
25	20			EKD6	0404, 17(3)	0302, 0201	0	129	0	0	1	
26	23			318A	0401, 1302	0302, 0604	0	50,05	0,24	0,27	318A	

Cut off

**Tab. 02.** Charakteristika der untersuchten Hochrisikopersonen: Alter, Teilnahme an den einzelnen Untersuchungen, HLA-Typisierung und Antikörperstatus

<b>Ab+Individuen</b>												
No.	Alter (Jahre)	GAD65	IA-2	PP-Ins	HLA		(Auto)antikörper				Referenz Kürzel bzw. Abnahme-Nr.	
					DRB1*	DQB1*	ICA (JDFU)	IAA/IA ( $\mu$ U/l)	GADA (KU/l)	IA2A (KU/l)		
							20	204,6	3,9	1,85		Cut off
27	12	EKD29	EKD29	EKD29	0401, 0701	0302, 0201	0	251,9	3,07	0,27	2	
28	17	EKD18	EKD18	EKD18	04, 08	0302, 0402	80	56,69	10,99	114,92	1	
29	18	EKD46	EKD46	EKD46	04, 13	0302, 0603	40	33,61	86,88	119,3	2	
30	9	EKD66		EKD66	04, -	0302, -	40	417,6	12,3	10,73	2	
31	20	EKD26		EKD26	0404, 07	0302, 0201	0	11,89	3,91	0,27	1	
32	24	431A		431A	0404, 0801	0302, 0602	0	0	10,42	9,12	431A	
33	12		EKD39	EKD39	0401, 0701	0302, 0201	320	1074	39	3328	1	
34	14		EKD19	EKD19	0401, -	0302, 0301	0	32	31	0	1	
35	15		EKD35	EKD35	0402, 13(6)	0302, 0603	0	54	11	5	1	
36	18		EKD27		0401, 0404	0302, 0301	80	12	33	60,12	1	
37	31	633A	633A		0401, 0401	0302, 0302	32	662,61	220,4	163,1	633A	
38	15	EKD50	EKD50		0404, 11(5)	0302, 0502	0	36,0	56,5	0	1	
39	22	EKD6			0404, 17(3)	0302, 0201	0	183,5	0	0	1	
40	22	EKD60			0401, 15(2)	0301, 0601	0	14	135	0	1	
41	19	EKD62			0401, 0404	0302, 0302	0	0	39,77	1,07	2	
42	15		EKD17		0403, 07	0302, 0303	80	45	0	0	1	
43	10			EKD38	0401, 0301	0302, 0201	80	479	64	22	2	
44	14			EKD9	0401, 17(3)	0302, 0201	0	209	37	0	2	

### 1.3 Patienten mit Typ 1 Diabetes

Die Gruppe der Patienten umfasst Individuen mit den HLA-Haplotypen DRB1\*04, DQB1\*03, deren T1D-Manifestation meist nicht länger als ein Jahr zurückliegt. Daher sind die Autoantikörper teilweise noch erhöht, was sich aber im weiteren klinischen Verlauf der Erkrankung ändert, da die akute immunologische Reaktion abklingt.

GAD65-Studie: 12 Probanden

IA-2- Studie: 14 Probanden

PP-Ins-Studie: 13 Probanden

(für genaue Angaben siehe Tabelle 03)

**Tab. 03.** Charakteristika der untersuchten Typ1 Diabetiker: Alter, Teilnahme an den einzelnen Untersuchungen, HLA-Typisierung, Antikörperstatus und Krankheitsdauer

Patienten												
No.	Alter (Jahre)	GAD65	IA-2	PP-Ins	T1D (months)	HLA		(Auto)antikörper				Referenz Kürzel bzw. Abnahme-Nr.
						DRB1*	DQB1*	ICA (JDFU)	IAA/IA (µU/l)	GADA (KU/l)	IA2A (KU/l)	
								20	204,6	3,9	1,85	
45	58	681A		69A	31	0401, 1302	0302, 0604	1280	1249	79,35	153,7	75A
46	20		153A	153A	10	0401, 0405	0302, 03	0	14021	50	3	153A
47	17		148A		11	0401, 0301	0302, 02	1280	2732	88,8	553,4	148A
48	4		307A	378A	3	0404, 1001	0302, 0501	0	23123	4	30	378A
49	34		105A	105A	12	0401, 0301	0302, 02	80	4048	87	550	105A
50	17	EKD52	EKD52		20	04, 04	0302, 0302	40	645,1	26,44	38,61	1
51	18	113A	113A		27	0402, 0405	0302, 0302	0	26958	3,5	2,12	113A
52	29	D.F.			1	0401, 0404	0302, 0302	80	328,3	55,87	12,79	Dees, F.
53	37	59A			8	0401, 1501	0301, 0602	160	1373	88,99	4,42	59A
54	28	355A			1	0401, 0901	0302, 0303	160	68,7	17,96	560	355A
55	29	595A			22	0401, 0401	0302, 0301	160	5332	41	60	814A
56	19	603A			1	0401, 1101	0302, 0301	0	489,5	19,11	257	603A
57	24	609A			54	0404, 0101	0302, 0501	40	3806	0,9	3,7	609A
58	40	704A			1	0401, 0402	0302, -	0	251,5	45,58	517,9	704A
59	41	708A			1	0401, 0301	02, 0302	0	2955	35,53	21,01	789A
60	24	717A			47	0401, 1201	0302 0301	0	197,5	9,48	4,11	717A
61	25		192A		1	0401, 0301	0302, 02	80	2732	56	0,41	192A
62	26		K.M.		?	0401, 0301	0302, 02	640	177	96	18	Krebs M.
63	14		288A	288A	?	0401, 0301	0302, 02	640	172	55	58	288A
64	24		L.E.		1	0401, 0404	0302, 0302	160	205	3	165	L. E.
65	21		154A		?	0401, 0801	0302, 04	640	5892	67	71	154A
66	7		353A		1	0401, 0701	0302, 02	0	194	12	443	353A
67	41		S.J.		?	0401, 0101	0302, 0501	0	134	1,5	1	Schmider J.
68	29		118A	118A	11	0401, 0301	0302, 02	320	12389	126	1,48	118A
69	10			218A	2	04, 1302		80	11663	8	4	218A
70	14			291A	14	0401, 0301		0	8,15	1,12	0,46	291A
71	22			268A	1	0401, 0801	0302, 0301	0	63,07	110	19	268A
72	24			96A	8	0402, 0101	0501, 0301	320	11553	177	979	196A
73	27			217A	3	0401, 0401	0302, 0301	160	5332	41	60	376A
74	31			76A	1	0401, 0701		0	58,8	4,51	0,44	89A
75	45			85A	60	0401, 0101	0301, 0501	0	23434	0	0	85A

Cut off

## **2. Material**

### **2.1 für die Lymphozytenseparation**

- heparinisiertes Blut
- RPMI-Medium (Gibco, Karlsruhe)
- Ficoll (Amersham Pharmacia Biotec AB, Schweden)
- 1 Vol. 10%-tige DMSO-Lösung (Sigma, USA) + 1 Vol. IMDM-Stammlösung (zum Einfrieren)
- 1 Vol. 100%-tiges Humanserum + 4 Vol. IMDM-Stammlösung (zum Auftauen)
- Zentrifuge, Neubauerzählkammer, Trypanblau, Lichtmikroskop

### **2.2 für die Zellisolierung**

- 20-30 Millionen Lymphozyten eines Probanden
- IMDM-Stammlösung: IMDM-Medium + 5 ml Penicillin mit Streptomycin (Gibco, Karlsruhe) + 5 ml Natriumpyruvat
- IMDM-Arbeitslösung: 100 ml IMDM-Stammlösung + 10,5 ml 100%-tiges Humanserum + 139 ml IMDM-Stammlösung = ca. 250 ml
- CD4+ T-Zell-Isolationskit (Miltenyi Biotec, CA, USA)
- LS-Säulen (Miltenyi Biotec, CA, USA) mit Stempel

### **2.3 für den T-Zell-Stimulationstest**

- IMDM-Arbeitslösung
- 96-well-Rundboden-Zellkulturplatten (Falcon, Deutschland)
- GAD65 und seine überlappenden Peptide (Dr. Endl, Roche; siehe Tabelle 04), IA-2 und seine überlappenden Peptide (Dr. Kalbacher, Forschungszentrum der Universität Tübingen; siehe Tabelle 06), PP-Ins und seine 21 überlappenden Peptide (Dr. Kalbacher; siehe Tabelle 05)
- Kontrollantigene: Tetanustoxid (TT), Phytohämagglutinin (PHA)

- Negativkontrolle: Zellen in reinem Medium (Iscove's Mod. DMEM Glutamax) ohne weitere Zusätze
- Bestrahlung mit 40 Gy pro Minute für die APCs
- Brutschrank mit 37 °C und 6% CO<sub>2</sub>

**Tab. 04.** GAD65-Peptide und ihre Aminosäuresequenzen

aa	Peptid	Sequenz
1-15	1	MASPGSGFWSFGSED
6-25	2	GFWSFGSEDGSGDSENPGT
16-35	3	GSGDSENPGTARAWCQVAQK
26-45	4	ARAWCQVAQKFTGGIGNKLC
36-55	5	FTGGIGNKLCALLYGDAEKP
46-65	6	ALLYGDAEKPAESGGSQPPR
56-75	7	AESGGSQPPRAAARKAACAC
66-85	8	AAARKAACACDQKPCSCSKV
76-95	9	DQKPCSCSKVDVNYAFLHAT
86-105	10	DQKPCSCSKVDLLPACDGER
96-115	11	DLLPACDGERPTLAFLQDVM
106-125	12	PTLAFLQDVMNILLQYVVK
116-135	13	NILLQYVVKSFDRSTKVIDF
126-145	14	KVIDFYVVKSHYPNELLQEY
136-155	15	HYPNELLQEYNWELADQPQN
146-165	16	NWELADQPQNLEILMHCDQT
156-175	17	LEILMHCDQTTLKYAIKTGH
166-185	18	TTLKYAIKTGHPRYFFNQLSTG
176-195	19	PRYFFNQLSTGLDMVGLAADW
186-205	20	LDMVGLAADWLTSTANTMMF
196-215	21	LTSTANTNMFTYEIAPVFL
206-225	22	TYEIAPVFLLEYVTLKKMA
216-235	23	LEYVTLKKMAEIGWPGGSG
226-245	24	EIGWPGGSGEDGIFSPGGAI
236-255	25	DGIFSPGGAISNMYAMMIAR
246-265	26	SNMYAMMIARFKMFPEVKEK
256-275	27	FKMFPEVKEKGMAALPRLIA
266-285	28	GMAALPRLIAFTSEHSHFSL
276-295	29	FTSEHSHFSLKKGAAALGI
288-305	30	KKGAAALGITDSVILIKCD
296-315	31	TDSVILIKCDERGMIPSDL
306-325	32	ERGMIPSDLERRILEAKQK
316-335	33	ERRILEAKQKGFVPFLVSAT
326-345	34	GFVPFLVSATAGTTVYGAFD
336-355	35	AGTTVYGAFDPLLAVADICK
346-365	36	PLLAVADICKKYKIWMHVDA
356-375	37	KYKIWMHVDAAWGGGLLMSR
366-385	38	AWGGGLLMSRKHKWLKSGVE
376-395	39	KHKWLKSGVERANSVTWNP
386-405	40	RANSVTWNPMMGVPLQCS

396-415	41	KMMGVPLQCSALLVREEGLM
406-425	42	ALLVREEGLMQNCNQMHASV
416-435	43	QNCNQMHASVLFQQDKHYDL
426-445	44	LFQQDKHYDSYDTGDKALQ
436-455	45	SYDTGDKALQCGRHVDVFKL
446-465	46	CGRHVDVFKLWLMWRAKGTT
456-475	47	WLMWRAKGTTGFEAHVDKCL
466-485	48	GFEAHVDKCLELAELYNII
476-495	49	ELAELYNIIKNREGYEMVF
486-505	50	KNREGYEMVFDGKPQHTNVC
496-515	51	DGKPQHTNVCFWYIPPSLRT
506-525	52	FWYIPPSLRTLEDNEERMSR
516-535	53	LEDNEERMSRLSKVAPVIKA
526-545	54	LSKVAPVIKARMMMEYGTTMV
536-555	55	RMMEYGTTMVSQPLGDKVN
546-565	56	SYQPLGDKVNFFRMVISNPA
556-575	57	FFRMVISNPAATHQDIDFLI
566-585	58	ATHQDIDFLIEEIERLQDL

**Tab. 05.** PP-Ins-Peptide und ihre Aminosäuresequenzen

		aa	Sequenz	Länge aa
1	PP1-16	1-16	MALWMRLLPLLALLAL	16
2	PP5-20	5-20	MRLLPLLALLALWGPDP	16
3	PP9-24	9-24	PLLALLALWGPDPAAA	16
4	PP13-B4	13-28	LLALWGPDPAAAFVNQ	16
5	PP17-B8	17-32	WGPDPAAAFVNQHLCG	16
6	PP21-B12	21-36	PAAAFVNQHLCGSHLV	16
7	B1-16	25-40	FVNQHLCGSHLVEALY	16
8	B6-22	30-46	LCGSHLVEALYLVCGER	17
9	B11-27	35-51	LVEALYLVCGERGFFYT	17
10	B16-32	40-56	YLVCGERGFFYTPKTRR	17
11	B20-C4	44-60	GERGFFYTPKTRREAED	17
12	B25-C9	49-65	FYTPKTRREAEDLQVGQ	17
13	B30-C14	54-70	TRREAEDLQVGQVELGG	17
14	C3-C19	59-75	EDLQVGQVELGGPGAG	17
15	C8-C24	64-80	GQVELGGPGAGSLQPL	17
16	C13-C29	69-85	GGPGAGSLQPLALEGS	17
17	C18-A1	74-90	AGSLQPLALEGSLQKRG	17
18	C23-A6	79-95	PLALEGSLQKRGIVEQC	17
19	C28-A11	84-100	GSLQKRGIVEQCCTSIC	17
20	A1-17	90-106	GIVEQCCTSICSLYQLE	17
21	A6-21	94-110	QCCTSICSLYQLENYCN	17

**Tab. 06.** IA-2-Peptide und ihre Aminosäuresequenzen

Peptide	Sequenz	aa
IA-2		601 - 979
P1	RQHARQQDKERLAALGPE	601 - 618
P3	AALGPEGAHGDTTFEYQD	613 - 630
P5	TFEYQDLCRQHMATKSLF	625 - 642
P7	ATKSLFNRAEGPPEPSRV	637 - 654
P9	PEPSRVSSVSSQFSDAAQ	649 - 666
P11	FSDAAQASPSHSSTPSW	661 - 678
P13	SSTPSWCEEPAQANMDIS	673 - 690
P15	ANMDISTGHMILAYMEDH	685 - 702
P17	AYMEDHLRNRDRLAKEWQ	697 - 714
P19	DRLAKEWQALCAYQAEPN	709 - 726
P21	YQAEPNTCATAQGEGNIK	721 - 738
P23	GEGNIKKNRHPDFLPYDH	733 - 750
P25	FLPYDHARIKLVKVESSPS	745 - 762
P27	VESSPSRSDYINASPIIE	757 - 774
P29	ASPIIEHDPMPAYIATQ	769 - 786
P31	AYIATQGPLSHTIADFWQ	781 - 798
P35	CTVIVMLTPLVEDGVKQC	805 - 822
P37	DGVKQCDRYWPDEGASLY	817 - 834
P39	EGASLYHVYEVNLVSEHI	829 - 846
P41	LVSEHIWCEDFLVRSFYL	841 - 858
P43	VRSFYLKNVQTQETRILT	853 - 870
P45	ETRILTQFHFLSWPAEGT	865 - 882
P47	WPAEGTPASTRPLLDLFR	877 - 894
P49	LLDFRRKVNKCVRGRSCP	889 - 906
P51	RGRSCPIIVHCSDGAGRT	901 - 918
P53	DGAGRTGTYLIDMVLNR	913 - 930
P55	DMVLNRMAKGVKEIDIAA	925 - 942
P57	EIDIAATLEHVRDQRPGL	937 - 954
P59	DQRPGLVRSKQFQEFALT	949 - 966
P61	FEFALTAVAEVNAIKALPQ	961 - 979
P62	ALTAVAEVNAIKALPQ	964 - 979

## 2.4 für den Sandwich-ELISA

- 96-well-Flachboden-Microtestplatten (Falcon, Deutschland)
- PBS-Tween-Waschpuffer: 8 g NaCl; 1,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2 g KCl; 0,5ml Tween 20; 1l bidestilliertes Wasser



- PBS, 3%-tige BSA (Blocklösung): 30 g BSA V (Albumin Bovine); 1l PBS (1%); 500µl Tween 20
- Coat-Antikörper (Pharmingen, San Diego, CA, USA)
- Streptavidin-alkalische Phosphatase (Strep-AP; Dianova, Hamburg)
- P-Nitrophenylphosphatin (PNPP; Fluka, Neu-Ulm)
- Diethanolamin-Puffer (pH 9,8 für PNPP): 105,7 g (97ml) Diethanolamin; 0,8 g MgCl x 6H<sub>2</sub>O; 0,2 g NaN<sub>3</sub> über Nacht gerührt bis die Lösung klar ist
- EDTA (pH 8,0-Stopplösung): 186,1 g EDTA; 1l bidestilliertes Wasser
- Kühlraum mit 4 °C zur Inkubation über Nacht; Photometer (Spectra Max 250, MWG-Biotec, Molecular Devices, München); feuchte Kammer zur Inkubation bei Raumtemperatur

### **3. Methoden**

#### **3.1 Separation von PBMC durch Dichtegradientenzentrifugation**

Mononukleäre Zellen können aufgrund ihres spezifischen Gewichts von den Erythrozyten getrennt werden. Dafür wurde heparinisieretes Blut im Verhältnis 1:1 mit dem RPMI-Medium verdünnt. Je 15 ml Ficoll wurden mit 30 ml des verdünnten Blutes überschichtet. Nach 20-minütiger Zentrifugation ohne Bremse wurden die Lymphozyten über dem Ficoll abgenommen, mit RPMI-Medium auf das Doppelte verdünnt und 5 Minuten zentrifugiert. Nach einem zweiten Waschschrift mit RPMI-Medium und erneuter 5-minütiger Zentrifugation wurden die Zellen gezählt, aliquotiert (max. 15 Mio. Zellen pro Röhrchen) und in flüssigem Stickstoff (-196 °C) bis zum Gebrauch eingefroren.

### **3.2 Isolierung von CD45RO<sup>+</sup> und CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen mittels MACS Micro-Beads**

Um aus der Gesamtmenge der PBMCs die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Subfraktionen, CD45RO<sup>+</sup> und CD45RA<sup>+</sup> zu isolieren, wurden mit Hilfe eines CD4<sup>+</sup> T-Zell-Isolationskit B-Zellen, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen, Monozyten, Granulozyten, zytotoxische CD8-Zellen, Thrombozyten und Erythrozyten-Vorläuferzellen mit indirekt Hapten-modifizierten CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36 und CD56 Antikörpern und magnetischen Partikeln markiert. Durch anschließendes Durchlaufen der Zellen durch eine LS-Säule im magnetischen Feld, wurden alle nicht CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Säule zurückgehalten, während die nicht markierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen als Mischfraktion von CD45RA<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen herausgespült wurden. Im nächsten Schritt wurden die CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen magnetisch markiert und beim Durchlaufen der LS-Säule zurückgehalten. So erhielt man zunächst die CD45RO<sup>+</sup>-Fraktion. Die CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Hilfe eines Stempels und durch zweimaliges Spülen mit DMEM-Medium aus der Säule gedrückt. Beide Zellsubpopulationen wurden gezählt und auf 3000-12000 Zellen pro ml eingestellt.

### **3.3 T-Zell-Stimulationstest**

Um die Proliferation der T-Zellen beurteilen zu können, wurden zur Vorbereitung 96-well-Rundboden-Microtestplatten mit den Peptiden (jeweils GAD65 und seine überlappenden Peptide (siehe Tabelle 04), IA-2 und seine überlappenden Peptide (siehe Tabelle 06), PP-Ins und seine überlappenden Peptide (siehe Tabelle 05)) belegt. Den verschiedenen Stimuli wurde die Negativkontrolle gegenübergestellt, um die spontan auftretende Proliferation im Medium ohne Antigen später von den übrigen Experimentellwerten abziehen zu können. Bis zum Ansatz eines T-Zell-Stimulationstests wurden die vorbereiteten Platten bei -80 °C gelagert. Beim Ansatz eines Tests wurden die aufgetauten Platten mit den Kontrollantigenen, TT und PHA vervollständigt. Bevor die verschiedenen Zellpopulationen aufgetragen

wurden, kamen in jedes well 100/μl der mit 40 Gy bestrahlten peripheren Blutlymphozyten als Antigen-Präsentierende-Zellen (APCs). Im Anschluss daran wurden, nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten auf Eis, 150 μl CD45RO+ bzw. CD45RA+ T-Zellen in jedes well dazugegeben. Insgesamt lag pro well ein Gesamtvolumen von 300 μl vor. Die Platten wurden 5 Tage lang bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 6% inkubiert. Als Kulturmedium wurde das IMDM-Medium verwendet. Am fünften Tag wurden die Überstände aus allen wells zur späteren Zytokinbestimmung mittels ELISA abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren.

### **3.4 Enzyme-Linked-Immuno Sorbent-Assay (ELISA)**

Der ELISA dient dazu, die Menge der sezernierten Zytokine TNFα, IFNγ, IL-2, IL-4, IL-5 und IL-10 zu messen. Die Negativkontrolle lieferte den Backgroundwert für die Zytokinbestimmung. Für den ELISA wurden erst Mikrottestplatten über zwei Stunden bei Raumtemperatur mit den entsprechenden Coat-Antikörpern belegt. Dann wurden diese Antikörper mit 3% BSA (Bovines Serum Antigen) geblockt, wobei die freien Proteine abgesättigt wurden. Auf diese Platten wurden dann die Proben zu je 40 μl pro well aufgetragen. Als Standard wurde von jedem Zytokin jeweils eine Platte mit einer Verdünnungsreihe belegt. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 4 °C, während der die Proben an die Antikörper binden sollten, wurde der zweite, biotinillierte Antikörper aufgebracht. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde Streptavidin-alkalische Phosphatase zugefügt, welche nach einer Stunde an das Biotin gebunden war. PNPP verursachte dann, je nach Konzentration des sezernierten Zytokins, eine mehr oder weniger starke Gelbfärbung, indem es das Phosphat der Streptavidin-alkalischen Phosphatase abspaltete. Die Einwirkzeit des PNPP betrug 15 Minuten, wonach die Reaktion mit EDTA abgestoppt wurde. Die Extinktionsmessung fand bei 405/490 nm im Photometer statt.

## **4. Statistik**

### **4.1 SAS**

Die Modellberechnungen wurden mit Hilfe der Statistiksoftware SAS Version 8.2 (Prozedur PROC MIXED) unter dem Betriebssystem Windows durchgeführt.

Die modellbasierte Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe eines (sog. gemischten) linearen Modells, das die Verbundenheitsstruktur der Daten berücksichtigt (z. B. pro Testperson Werte mehrerer Peptide).

Um die Voraussetzung der Normalverteilung der Daten weitestgehend zu gewährleisten, wurde als abhängige Variable (y-Variable) des Modells der Logarithmus der Zielgrößen (Reaktivität) betrachtet. Diese Transformation berücksichtigte allerdings nur positive Werte der gemessenen Zielgrößen, da der Logarithmus von Null nicht definiert ist.

Pro Zell-Zytokin-Kombination wurde ein eigenes Modell gerechnet. Als Einflussvariablen wurden jeweils die Gruppe (Kontrollpersonen, Autoantikörperpositive Personen und Typ 1 Diabetiker), das Antigen (PP-Ins, IA-2 und GAD65) und die Wechselwirkung dieser zwei Variablen geprüft.

Das Modell ermöglichte einerseits die Aussage, welche der Einflussgrößen aus statistischer Sicht signifikant sind, andererseits wurden die modellbasierten Mittelwerte der Zielgrößen, z. B. der verschiedenen Gruppen, mit 95% Konfidenzintervall berechnet.

Den statistischen Tests lag in allen Fällen ein zweiseitiges Signifikanzniveau  $\alpha=5\%$  zu Grunde. Signifikante Werte wurden mit diesem Modell bestimmt. Dabei wurden drei Stufen festgelegt: p-Werte kleiner als 0,05 wurden als niedrig signifikant eingestuft, p-Werte kleiner als 0,005 als signifikant und p-Werte kleiner als 0,0005 als hoch signifikant.

Für multiples Testen wurde aufgrund des explorativen Charakters der statistischen Tests nicht korrigiert.

## **4.2 SPSS**

Zur Datenaufbereitung für den oben genannten statistischen Test und für die Darstellung der Boxplots wurde das Statistikprogramm SPSS 12.0 für Windows 2000 (Chicago, Illinois – USA) verwendet. Auch wurden signifikante Mengenunterschiede im Falle des Lebensalters, des Geschlechts und der Autoantikörpertiter der Probanden mit dem Mann-Whitney U-Test (nicht parametrischer Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben) aus SPSS 12.0 errechnet.

## **4.3 Microsoft Excel**

Um aus Rohwerten Summen zu addieren, wurden Formeln aus dem Microsoft Office Excel-Programm 2000 benutzt.

## III. ERGEBNISSE

### 1. Probanden

#### 1.1 Charakteristika der Probanden

**Geschlecht:** Die untersuchten Individuen unterschieden sich nicht signifikant.

**HLA-Status:** Die Individuen wurden nach HLA-Haplotyp DRB1\*04, DQB1\*03 (siehe Tabellen 01, 02, 03 im Material- und Methodenteil) ausgewählt und unterschieden sich somit in diesem Merkmal nicht signifikant.

**Alter:** Die AB+ Individuen waren signifikant jünger als die Patienten und die Kontrollpersonen ( $p < 0,0005$ ).

#### 1.2 Antikörperstatus

**Kontrollpersonen:** Alle Kontrollpersonen wiesen für die vier getesteten Antikörper Werte unter den Cut offs auf und sind somit Autoantikörper-negativ getestet.

**AB+ Individuen:** Die Autoantikörperverteilung kann Tabelle 07 entnommen werden.

**T1D-Patienten:** Die Verteilung der Autoantikörper geht aus Tabelle 07 hervor.

**Tab. 07.** Anzahl positiver Autoantikörper bei AB+ Individuen und bei Typ 1 Diabetikern in allen drei Studien

positiver Antikörper	GAD65		IA-2		PP-Ins	
	AB+(n=11)	T1D(n=12)	AB+(n=10)	T1D(n=14)	AB+(n=11)	T1D(n=13)
ICA	4	7	6	9	5	7
IAA	3	10	3	10	5	9
GADA	9	10	8	11	10	11
IA2A	5	12	6	11	7	9

ICA: Inselzell-Autoantikörper; IAA: Insulin-Autoantikörper; GADA: Glutamat-Decarboxylase-Autoantikörper  
IA2A: Protein-Tyrosin-Phosphatase-Autoantikörper; AB+: Antikörperpositive Individuen; T1D: Typ 1 Diabetiker

**Autoantikörpertiter:** Die Titer von ICA, IAA, GADA und IA-2A lagen bei den AB+ Individuen und den Patienten wesentlich höher als bei den Kontrollpersonen ( $p < 0,0005$ ). Bei ICA und IAA ergaben sich für die Patienten auch signifikant höhere Werte als für die Hochrisikopersonen ( $p < 0,0005$ ). Bei GADA zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Hochrisikopersonen.

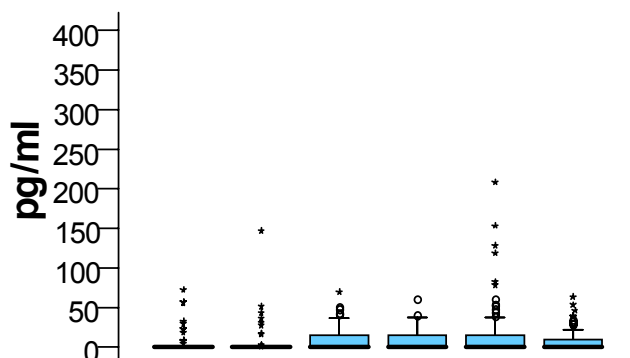
## 2. Zytokinantworten auf PP-Ins, IA-2 und GAD65

### 2.1 Periphere Blutlymphozyten (PBMC)

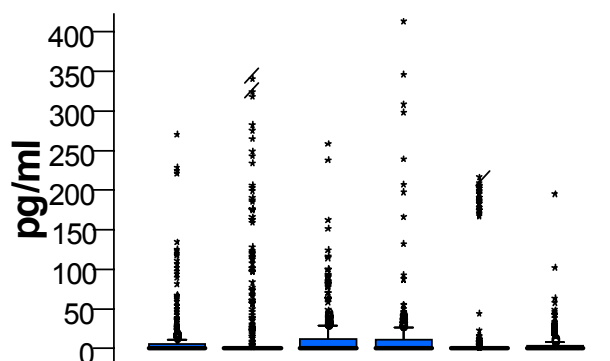
#### 2.1.1 Kontrollpersonen

Die nachfolgende Darstellung (Abb. 05) zeigt einen Vergleich der Zytokinantworten auf die Peptide von PP-Ins, IA-2 und GAD65 in den peripheren Blutlymphozyten von Kontrollpersonen.

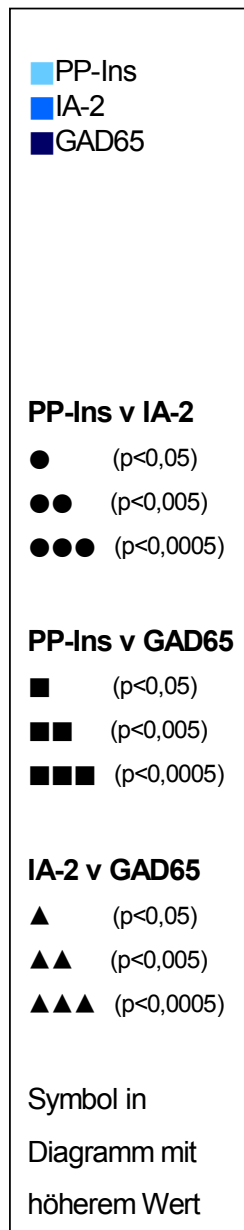
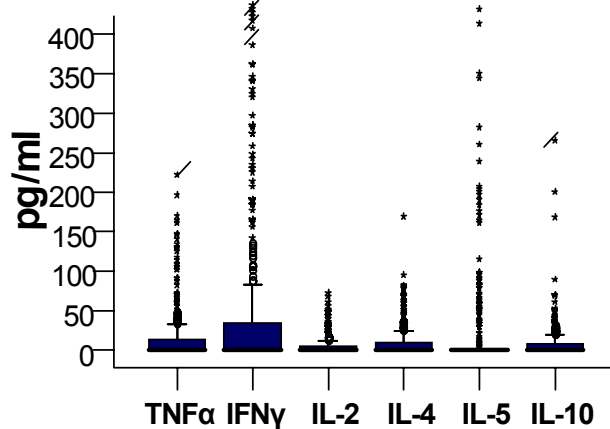
## PP-Ins



## IA-2



## GAD65



**Abb. 05.** Vergleich der Zytokinantworten auf Präproinsulin (PP-Ins; n=11), Protein-Tyrosin-Phosphatase-2 (IA-2; n=13) und Glutamat-Decarboxylase 65 (GAD65; n=13) in peripheren Blutlymphozyten (PBMC) von Kontrollpersonen.



Als Reaktion auf **PP-Ins** wurden Werte gemessen für TNF $\alpha$  von 0 - 85 pg/ml (Mittelwert 4,26  $\pm$  Standardabweichung 14,50 pg/ml), für IFN $\gamma$  von 0 - 150 pg/ml (6,06  $\pm$  23,95 pg/ml), für IL-2 von 0 - 149 pg/ml (9,90  $\pm$  19,61 pg/ml), für IL-4 von 0 - 60 pg/ml (8,35  $\pm$  12,59 pg/ml), für IL-5 von 0 - 333 pg/ml (17,68  $\pm$  40,85 pg/ml) und für IL-10 von 0 - 63 pg/ml (4,64  $\pm$  9,72 pg/ml).

Beim Test auf **IA-2** ergaben sich Werte für TNF $\alpha$  von 0 - 228 pg/ml (11,42  $\pm$  31,41 pg/ml), für IFN $\gamma$  von 0 - 592 pg/ml (29,54  $\pm$  80,91 pg/ml), für IL-2 von 0 - 1330 pg/ml (16,98  $\pm$  80,45 pg/ml), für IL-4 von 0 - 413 pg/ml (13,9  $\pm$  45,94 pg/ml), für IL-5 von 0 - 2864 pg/ml (28,56  $\pm$  169,40 pg/ml) und für IL-10 von 0 - 747 pg/ml (7,84  $\pm$  44,54 pg/ml).

Die auf **GAD65** gemessenen Zytokinantworten lagen für TNF $\alpha$  bei 0 - 971 pg/ml (25,04  $\pm$  63,60 pg/ml), für IFN $\gamma$  bei 0 - 2679 pg/ml (52,54  $\pm$  173,95 pg/ml), für IL-2 bei 0 - 152 pg/ml (5,37  $\pm$  13,06 pg/ml), für IL-4 bei 0 - 169 pg/ml (10,89  $\pm$  20,58 pg/ml), für IL-5 bei 0 - 1249 pg/ml (17,85  $\pm$  90,98 pg/ml) und für IL-10 bei 0 - 513 pg/ml (9,39  $\pm$  34,17 pg/ml).

Daraus wurden folgende Unterschiede ersichtlich:

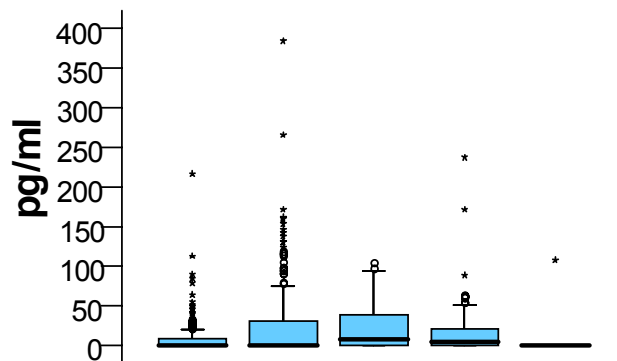
**IL-2:** Die Zytokinantwort auf IA-2 war wesentlich stärker als die Zytokinantwort auf GAD65 ( $p < 0,0005$ ). Die Antworten auf GAD65 und auf PP-Ins unterschieden sich statistisch nicht signifikant.

**IL-10:** Die Antwort auf IA-2 dominierte über die Antwort auf PP-Ins. Die Reaktionen auf GAD65 und auf PP-Ins zeigten keine wesentlichen Unterschiede. Für TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-4 und IL-5 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Antigenen.

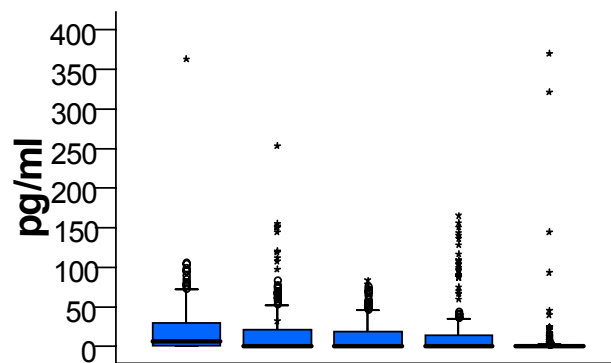
### 2.1.2 Antikörperpositive Personen (AB+)

Im Folgenden ist der Vergleich der Zytokinsekretion in den peripheren Blutlymphozyten von Antikörper-positiven Personen dargestellt (siehe Abb. 06).

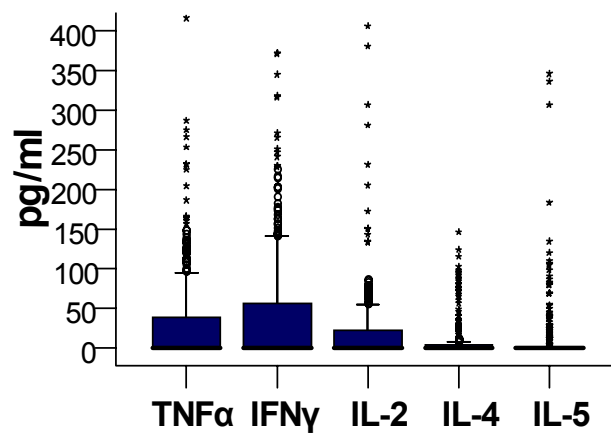
### PP-Ins



### IA-2



### GAD65



**PP-Ins v IA-2**

- (p<0,05)
- (p<0,005)
- (p<0,0005)

**PP-Ins v GAD65**

- (p<0,05)
- (p<0,005)
- (p<0,0005)

**IA-2 v GAD65**

- ▲ (p<0,05)
- ▲▲ (p<0,005)
- ▲▲▲ (p<0,0005)

Symbol in Diagramm mit höherem Wert

**Abb. 06.** Vergleich der Zytokinantworten auf Präproinsulin (PP-Ins; n=11), Protein-Tyrosin-Phosphatase-2 (IA-2; n=10) und Glutamat-Decarboxylase 65 (GAD65; n=11) in peripheren Blutlymphozyten (PBMC) von antikörperpositiven (AB+) Personen.

Als Reaktion auf **PP-Ins** reichte die Zytokinsekretion bei TNF $\alpha$  von 0 - 216 pg/ml (Mittelwert 7,82  $\pm$  Standardabweichung 20,96 pg/ml), bei IFN $\gamma$  von 0 - 171pg/ml (20,04  $\pm$  38,01 pg/ml), bei IL-2 von 0 - 104 pg/ml (19,41  $\pm$  26,69 pg/ml), bei IL-4 von 0 - 237 pg/ml (13,75  $\pm$  25,53 pg/ml) und bei IL-5 von 0 - 45 pg/ml (0,52  $\pm$  3,86 pg/ml). Für IL-10 konnte keine Zytokinsekretion gemessen werden.

Die Höhe der Zytokinsekretion auf **IA-2** lag für TNF $\alpha$  bei 0 - 106 pg/ml (17,65  $\pm$  24,01 pg/ml), für IFN $\gamma$  bei 0 - 155 pg/ml (17,46  $\pm$  32,11 pg/ml), für IL-2 bei 0 - 83 pg/ml (11,58  $\pm$  18,32 pg/ml), für IL-4 bei 0 - 165 pg/ml (14,99  $\pm$  32,79 pg/ml) und für IL-5 bei 0 - 24 pg/ml (2,25  $\pm$  4,84 pg/ml). Für IL-10 konnten keine Werte bestimmt werden.

Beim Test auf **GAD65** ergaben sich Werte für TNF $\alpha$  von 0 - 2253 pg/ml (41,21  $\pm$  162,67 pg/ml), für IFN $\gamma$  von 0 - 6718 pg/ml (92,28  $\pm$  416,56 pg/ml), für IL-2 von 0 - 2011 pg/ml (25,38  $\pm$  110,94 pg/ml), für IL-4 von 0 - 146 pg/ml (7,97  $\pm$  21,48 pg/ml) und für IL-5 von 0 - 6877 pg/ml (81,41  $\pm$  606,79 pg/ml). Die Sekretion von IL-10 wurde nicht bestimmt.

Aus diesen Daten wurde folgendes ersichtlich:

**TNF $\alpha$ :** Für GAD65 ergaben sich höhere Werte als für PP-Ins und IA-2 ( $p < 0,005$ ). Die Sekretion auf PP-Ins und IA-2 unterschied sich jedoch nicht signifikant.

**IFN $\gamma$ :** Auf GAD65 wurden die höchsten Werte gemessen. Die Antwort auf GAD65 dominierte über die Antwort auf PP-Ins ( $p < 0,005$ ) und über die Antwort auf IA-2 ( $p < 0,0005$ ). Die Sekretion auf PP-Ins war signifikant höher als diese auf IA-2 ( $p < 0,05$ ). Folglich war die Sekretion von IFN $\gamma$  auf IA-2 am geringsten.

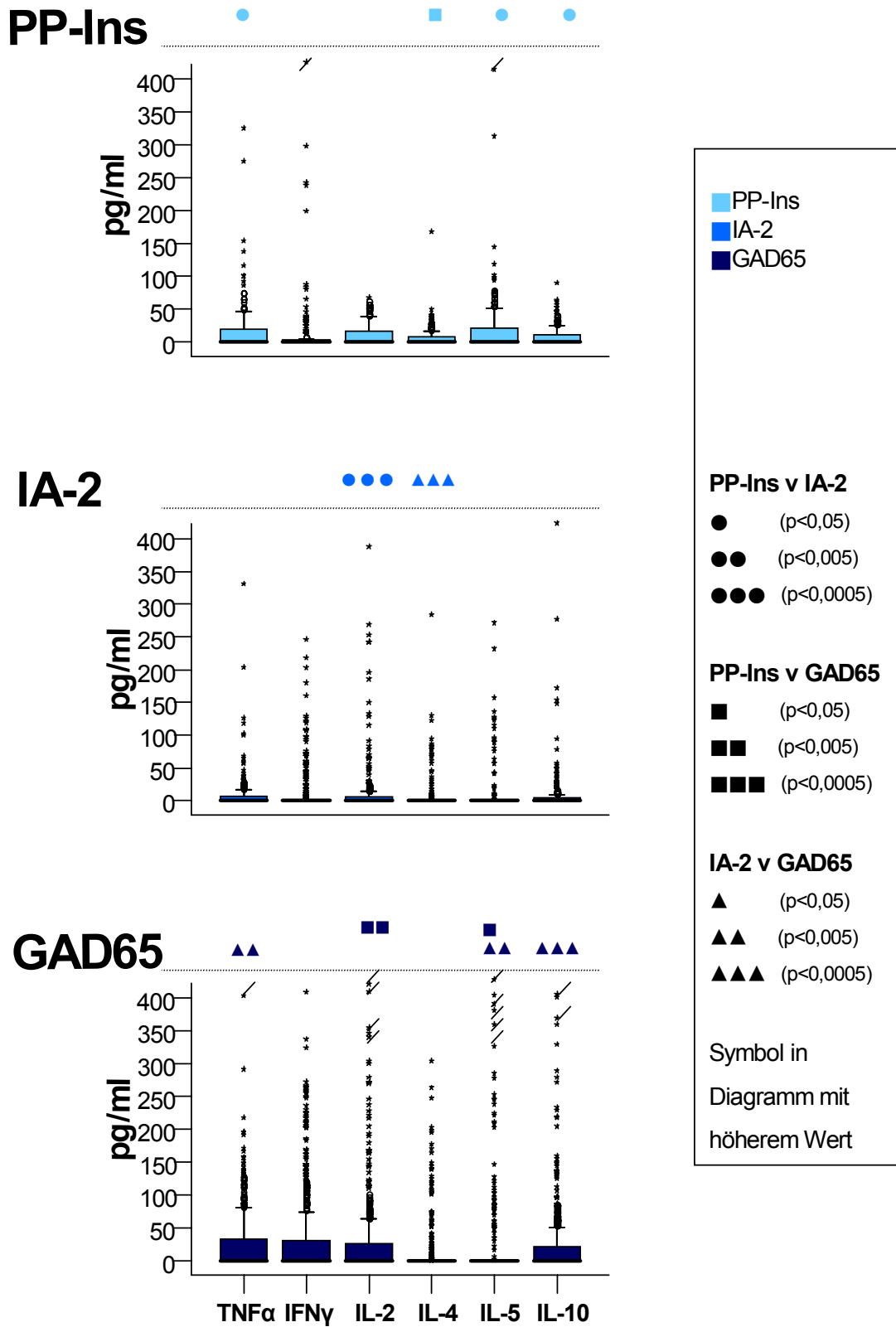
**IL-2:** Die Werte auf GAD65 dominierten über die Werte auf PP-Ins ( $p < 0,05$ ) und auf IA-2 ( $p < 0,0005$ ). Für IA-2 ergaben sich niedrigere Werte als für PP-Ins ( $p < 0,05$ ). Somit war die Antwort auf IA-2 am schwächsten.

**IL-4:** Es ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede.

**IL-5:** Die Antwort auf GAD65 zeigte höhere Werte wie diese auf IA-2 ( $p < 0,005$ ). Zwischen GAD65 und PP-Ins zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

### 2.1.3 Patienten (T1D)

Nachfolgend in Abb. 07 sind die Boxplots der Zytokinantworten auf PP-Ins, IA-2 und GAD65 in peripheren Blutlymphozyten von Patienten (T1D) dargestellt.



**Abb. 07.** Vergleich der Zytokinantworten auf Präproinsulin (PP-Ins; n=13), Protein-Tyrosin-Phosphatase-2 (IA-2; n=14) und Glutamat-Decarboxylase 65 (GAD65; n=12) in peripheren Blutlymphozyten (PBMC) von Patienten (T1D).

Als Reaktion auf **PP-Ins** wurden Werte gemessen für TNF $\alpha$  von 0 - 275 pg/ml (Mittelwert 12,67  $\pm$  Standardabweichung 28,57 pg/ml), für IFN $\gamma$  von 0 - 1502 pg/ml (47,13  $\pm$  194,90 pg/ml), für IL-2 von 0 - 219 pg/ml (11,34  $\pm$  23,88 pg/ml), für IL-4 von 0 - 49 pg/ml (5,67  $\pm$  11,42 pg/ml), für IL-5 von 0 - 1222 pg/ml (26,31  $\pm$  100,39 pg/ml) und für IL-10 von 0 - 89 pg/ml (7,33  $\pm$  14,67 pg/ml).

Die Höhe der Zytokinsekretion auf **IA-2** lag für TNF $\alpha$  bei 0 - 126 pg/ml (5,98  $\pm$  14,74 pg/ml), für IFN $\gamma$  bei 0 - 246 pg/ml (14,87  $\pm$  33,01 pg/ml), für IL-2 bei 0 - 388 pg/ml (10,68  $\pm$  36,02 pg/ml), für IL-4 bei 0 - 869 pg/ml (9,51  $\pm$  48,44 pg/ml), für IL-5 bei 0 - 232 pg/ml (4,26  $\pm$  21,38 pg/ml) und für IL-10 bei 0 - 172 pg/ml (6,27  $\pm$  18,47 pg/ml).

Beim Test auf **GAD65** ergaben sich Werte für TNF $\alpha$  von 0 - 4198 pg/ml (41,81  $\pm$  229,89 pg/ml), für IFN $\gamma$  von 0 - 409 pg/ml (27,84  $\pm$  58,85 pg/ml), für IL-2 von 0 - 886 pg/ml (31,14  $\pm$  86,21 pg/ml), für IL-4 von 0 - 304 pg/ml (9,81  $\pm$  32,86 pg/ml), für IL-5 von 0 - 1356 pg/ml (28,9  $\pm$  119,20 pg/ml) und für IL-10 von 0 - 1124 pg/ml (32,28  $\pm$  101,28 pg/ml).

Daraus resultierten die nachstehenden Unterschiede:

**TNF $\alpha$ :** Die Antwort auf IA-2 fiel geringer aus als diese auf PP-Ins ( $p < 0,05$ ) und auf GAD65 ( $p < 0,005$ ). Die Werte auf PP-Ins und GAD65 unterschieden sich nicht signifikant.

**IFN $\gamma$ :** Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den drei Antigenen.

**IL-2:** Die Antwort auf PP-Ins fiel am geringsten aus und unterschied sich von den Antworten auf IA-2 ( $p < 0,0005$ ) und auf GAD65 ( $p < 0,005$ ).

**IL-4:** Die Zytokinsekretion auf IA-2 war höher als diese auf GAD65 ( $p < 0,0005$ ). Auf PP-Ins ergaben sich höhere Werte als auf GAD65 ( $p < 0,05$ ). Folglich war die Zytokinsekretion von IL-4 auf GAD65 am geringsten.

**IL-5:** Auf GAD65 ergaben sich höhere Werte als auf IA-2 ( $p < 0,005$ ) und PP-Ins ( $p < 0,05$ ). Die Sekretion auf PP-Ins dominierte über die Sekretion auf IA-2 ( $p < 0,05$ ).

Somit waren die Werte für IA-2 am niedrigsten.

**IL-10:** Auf GAD65 wurden höhere Werte erreicht als auf IA-2 ( $p < 0,0005$ ). Auch die Antwort auf PP-Ins dominierte über diese auf IA-2 ( $p < 0,05$ ). Die Sekretionen auf GAD65 und auf PP-Ins unterschieden sich nicht signifikant.

## 2.2 CD45RO+ T-Zellen (Memory-Zellen)

### 2.2.1 Kontrollpersonen

Im folgenden Teil wird die Zytokinantwort auf die drei Antigene in memory-Zellen von Kontrollpersonen beschrieben und in Abb. 08 dargestellt. Als Reaktion auf **PP-Ins** wurden Werte gemessen für TNF $\alpha$  von 0 - 128 pg/ml (Mittelwert 11,61  $\pm$  Standardabweichung 25,41 pg/ml), für IFN $\gamma$  von 0 - 1749 pg/ml (124,36  $\pm$  248,19 pg/ml), für IL-2 von 0 - 254 pg/ml (42,97  $\pm$  71,88 pg/ml), für IL-4 von 0 - 335 pg/ml (20,37  $\pm$  37,47 pg/ml), für IL-5 von 0 - 594 pg/ml (27,68  $\pm$  72,97 pg/ml) und für IL-10 von 0 - 57 pg/ml (12,45  $\pm$  16,03 pg/ml). Als Antwort auf **IA-2** wurden Werte ermittelt für TNF $\alpha$  von 0 - 146 pg/ml (16,60  $\pm$  32,98 pg/ml), für IFN $\gamma$  von 0 - 4409 pg/ml (52,31  $\pm$  273,85 pg/ml), für IL-2 von 0 - 465 pg/ml (19,32  $\pm$  73,89 pg/ml), für IL-4 von 0 - 585 pg/ml (29,63  $\pm$  66,49 pg/ml), für IL-5 von 0 - 279 pg/ml (1,83  $\pm$  16,68 pg/ml) und für IL-10 von 0 - 458 pg/ml (6,29  $\pm$  29,25 pg/ml). Die Höhe der Zytokinsekretion auf **GAD65** lag für TNF $\alpha$  bei 0 - 8492 pg/ml (42,44  $\pm$  329,10 pg/ml), für IFN $\gamma$  bei 0 - 6622 (61,71  $\pm$  277,24 pg/ml), für IL-2 bei 0 - 179 pg/ml (6,03  $\pm$  15,61 pg/ml), für IL-4 bei 0-221 pg/ml (12,78  $\pm$  32,01 pg/ml), für IL-5 bei 0 - 1963 pg/ml (28,40  $\pm$  115,90 pg/ml) und für IL-10 bei 0 - 316 pg/ml (18,01  $\pm$  33,00 pg/ml).

**TNF $\alpha$ :** Die Zytokinsekretion auf IA-2 lag niedriger als diese auf PP-Ins ( $p < 0,05$ ) und auf GAD65 ( $p < 0,05$ ). Zwischen PP-Ins und GAD65 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

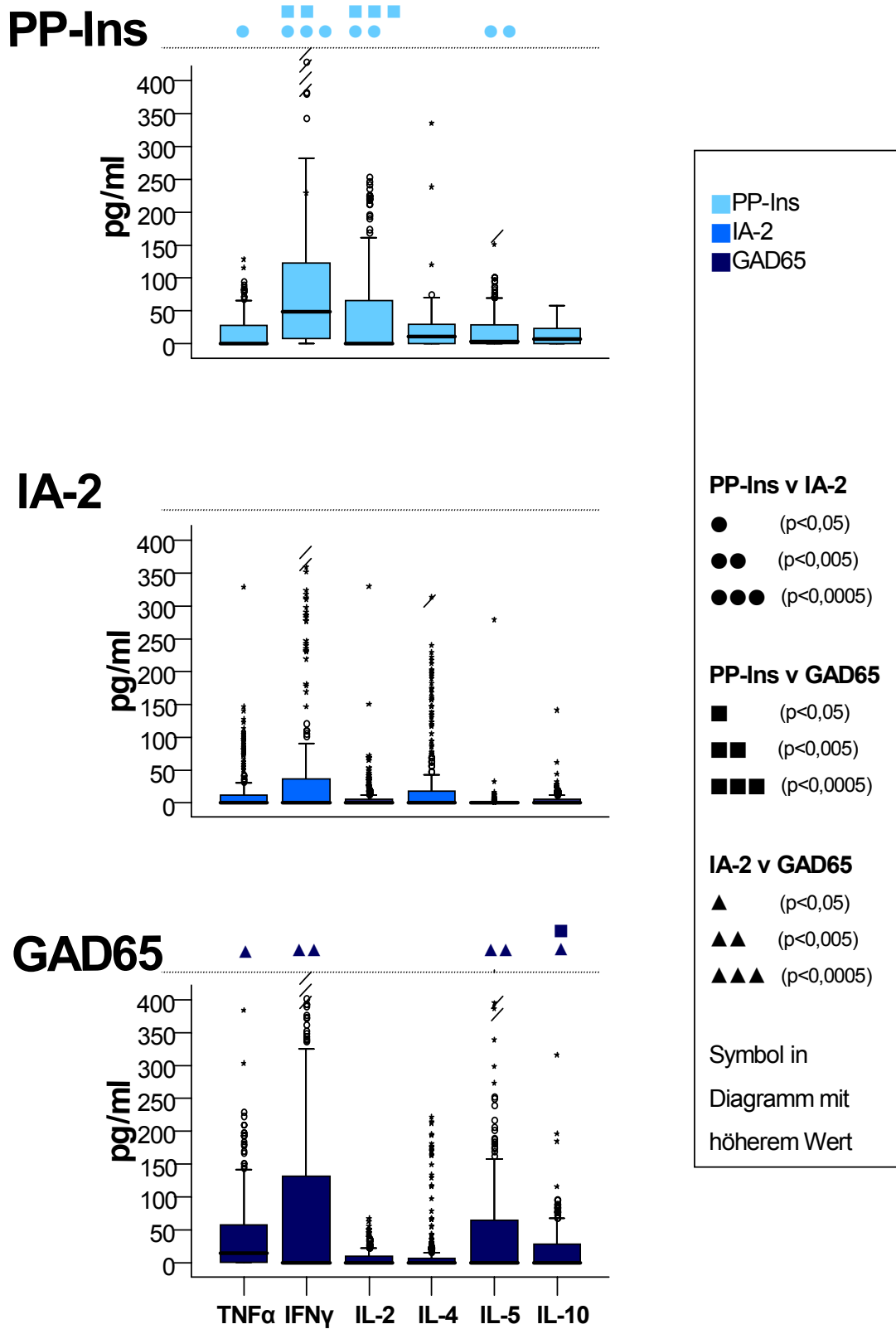
**IFN $\gamma$ :** Die Antwort auf PP-Ins dominierte über die Antwort auf IA-2 ( $p < 0,005$ ) und auf GAD65 ( $p < 0,0005$ ). Die Antwort auf GAD65 lag höher als diese auf IA-2 ( $p < 0,005$ ). Somit ergab sich die schwächste Antwort auf IA-2.

**IL-2:** Die stärkste Reaktion folgte auf PP-Ins. Dessen Antwort lag höher als diese auf IA-2 ( $p < 0,0005$ ) und auf GAD65 ( $p < 0,005$ ). Die Antworten auf GAD65 und IA-2 unterschieden sich nicht wesentlich.

**IL-4:** Es wurden keine Unterschiede gemessen.

**IL-5:** PP-Ins und GAD65 zeigten gleich starke Antworten und überwogen die Antwort auf IA-2 ( $p < 0,005$ ).

**IL-10:** Die Reaktion auf GAD65 dominierte über diese auf PP-Ins und IA-2 ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 08.** Vergleich der Zytokinantworten auf Präproinsulin (PP-Ins; n=11), Protein-Tyrosin-Phosphatase-2 (IA-2; n=13) und Glutamat-Decarboxylase 65 (GAD65; n=13) in CD45RO+ T-Zellen von Kontrollpersonen.

### 2.2.2 Antikörperpositive Personen (AB+)

Die auf **PP-Ins** gemessenen Zytokinantworten lagen für TNF $\alpha$  bei 0 - 12 pg/ml (Mittelwert 0,07  $\pm$  Standardabweichung 0,85 pg/ml), für IFN $\gamma$  bei 0 - 219 pg/ml (8,06  $\pm$  27,41 pg/ml), für IL-2 bei 0 - 117 pg/ml (14,79  $\pm$  22,87 pg/ml), für IL-4 bei 0 - 102 pg/ml (21,24  $\pm$  28,65 pg/ml), für IL-5 bei 0 - 204 pg/ml (1,09  $\pm$  13,44 pg/ml) und für IL-10 bei 0 - 470 pg/ml (6,78  $\pm$  33,02 pg/ml).

Als Reaktion auf **IA-2** wurden Werte gemessen für TNF $\alpha$  von 0 - 224 pg/ml (34,55  $\pm$  55,38 pg/ml), für IFN $\gamma$  von 0 - 472 pg/ml (32,60  $\pm$  87,01 pg/ml), für IL-2 von 0 - 239 pg/ml (835,71  $\pm$  57,73 pg/ml), für IL-4 von 0 - 246 pg/ml (41,36  $\pm$  54,91 pg/ml), für IL-5 von 0 - 287 pg/ml (10,99  $\pm$  26,34 pg/ml) und für IL-10 von 0 - 55 pg/ml (7,50  $\pm$  12,80 pg/ml).

Die Höhe der Zytokinsekretion auf **GAD65** lag für TNF $\alpha$  bei 0 - 2131 pg/ml (25,82  $\pm$  146,93 pg/ml), für IFN $\gamma$  bei 0 - 2264 pg/ml (65,39  $\pm$  175,73 pg/ml), für IL-2 bei 0 - 2084 pg/ml (13,84  $\pm$  117,93 pg/ml), für IL-4 bei 0 - 379 pg/ml (8,03  $\pm$  24,27 pg/ml), für IL-5 bei 0 - 5851 pg/ml (31,62  $\pm$  337,29 pg/ml) und für IL-10 bei 0 - 437 pg/ml (13,36  $\pm$  32,71 pg/ml).

Es resultierten nachfolgende Unterschiede:

**TNF $\alpha$ :** Es zeigten sich keine Signifikanzen.

**IFN $\gamma$ :** Die Sekretion auf GAD lag höher als die Sekretion auf IA-2 ( $p < 0,0005$ ).

**IL-2:** Auf Stimulation mit PP-Ins wurden die höchsten Werte erzielt. Sie lagen höher als diese auf IA-2 und auf GAD65 ( $p < 0,05$ ).

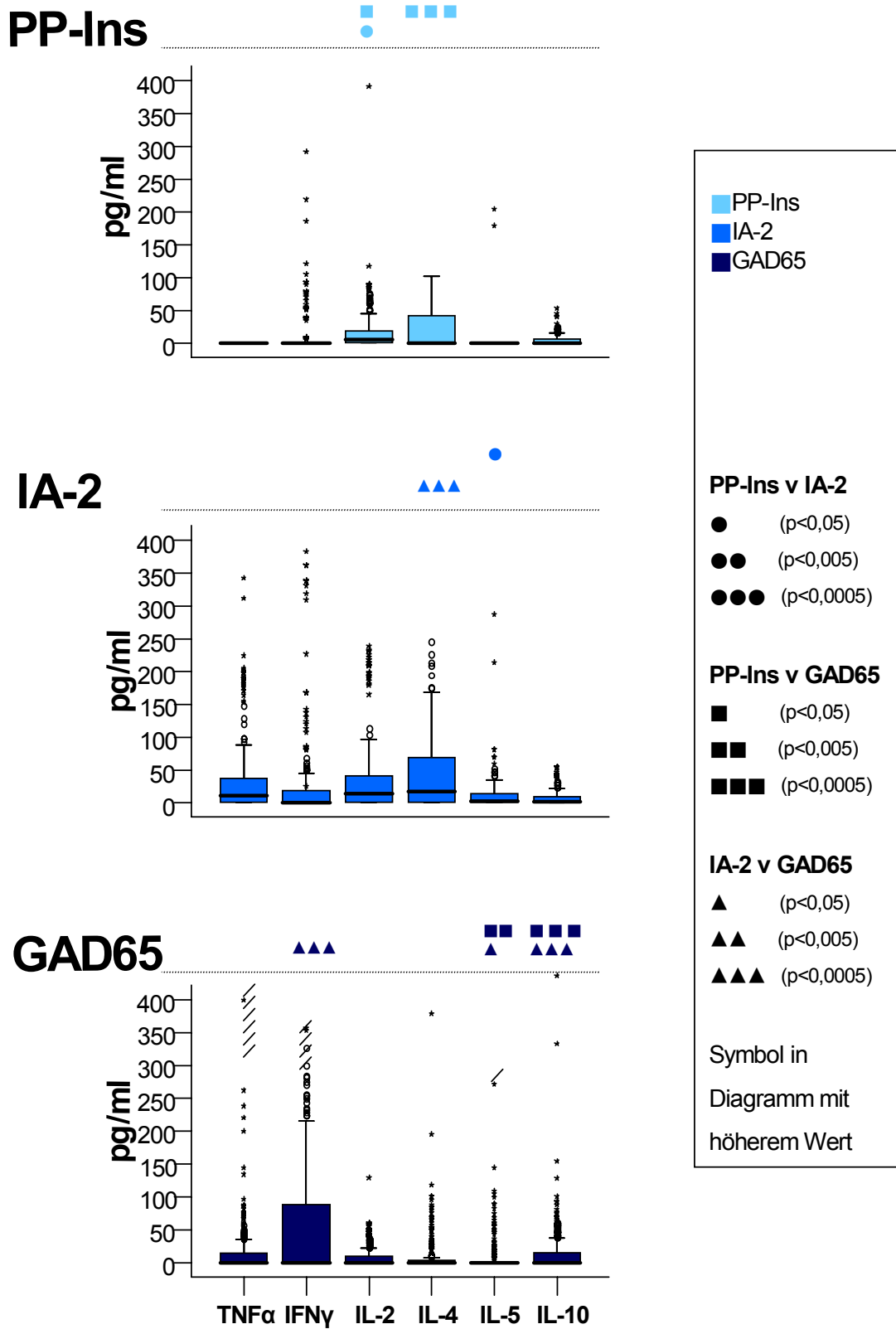
**IL-4:** Die Antwort auf GAD65 wurde von den Antworten auf PP-Ins und IA-2 dominiert ( $p < 0,0005$ ) und war somit am geringsten. Die Werte auf PP-Ins und IA-2 unterschieden sich nicht signifikant.

**IL-5:** Die Zytokinsekretion auf GAD65 war am höchsten, gefolgt von der Sekretion auf IA-2. Die Antwort auf PP-Ins erreichte die niedrigsten Sekretionswerte.

**IL-10:** Die Reaktion auf GAD65 zeigte die höchsten Werte. Sie lagen höher als die Werte auf PP-Ins und IA-2 ( $p < 0,0005$ ). Die Sekretion auf Stimulation mit PP-Ins unterschied sich nicht signifikant von der Sekretion auf IA-2.

Die graphische Darstellung dieser Ergebnisse kann Abb. 09 entnommen werden.





**Abb. 09.** Vergleich der Zytokinantworten auf Präproinsulin (PP-Ins; n=11), Protein-Tyrosin-Phosphatase-2 (IA-2; n=10) und Glutamat-Decarboxylase 65 (GAD65; n=11) in CD45RO+ T-Zellen von antikörperpositiven (AB+) Personen.

### 2.2.3 Patienten (T1D)

Die auf **PP-Ins** gemessenen Zytokinantworten lagen für TNF $\alpha$  bei 0 - 129 pg/ml (Mittelwert 6,14  $\pm$  Standardabweichung 15,47 pg/ml), für IFN $\gamma$  bei 0 - 477 pg/ml (20,11  $\pm$  47,67 pg/ml), für IL-2 bei 0 - 118 pg/ml (16,67  $\pm$  22,57 pg/ml), für IL-4 bei 0 - 195 pg/ml (18,70  $\pm$  24,77 pg/ml), für IL-5 bei 0 - 583 pg/ml (17,44  $\pm$  69,76 pg/ml) und für IL-10 bei 0 - 55 pg/ml (6,53  $\pm$  8,55 pg/ml).

Als Antwort auf **IA-2** wurden Werte gemessen für TNF $\alpha$  von 0 - 1312 pg/ml (11,75  $\pm$  71,12 pg/ml), für IFN $\gamma$  von 0 - 1329 pg/ml (12,95  $\pm$  73,79 pg/ml), für IL-2 von 0 - 139 pg/ml (8,81  $\pm$  20,64 pg/ml), für IL-4 von 0 - 319 pg/ml (16,09  $\pm$  46,40 pg/ml), für IL-5 von 0 - 197 pg/ml (8,00  $\pm$  29,01 pg/ml) und für IL-10 von 0 - 119 pg/ml (8,62  $\pm$  17,57 pg/ml).

Beim Test auf **GAD65** wurden Werte erreicht für TNF $\alpha$  von 0 - 386 pg/ml (34,70  $\pm$  64,62 pg/ml), für IFN $\gamma$  von 0 - 3531 pg/ml (65,95  $\pm$  215,83 pg/ml), für IL-2 von 0 - 2629 pg/ml (21,84  $\pm$  120,38 pg/ml), für IL-4 0 - 230 pg/ml (14,22  $\pm$  39,77 pg/ml), für IL-5 von 0 - 1453 pg/ml (25,50  $\pm$  120,32 pg/ml) und für IL-10 von 0 - 732 pg/ml (23,87  $\pm$  65,69 pg/ml).

Es konnten folgende Unterschiede festgestellt werden:

**TNF $\alpha$ :** Die Reaktion auf GAD65 war stärker als die Reaktion auf IA-2 ( $p < 0,05$ ).

**IFN $\gamma$ :** Die Zytokinsekretion auf GAD65 dominierte über diese auf PP-Ins und auf IA-2. Zwischen PP-Ins und IA-2 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

**IL-2:** Die Antwort auf GAD65 zeigte höhere Werte als diese auf PP-Ins ( $p < 0,05$ ).

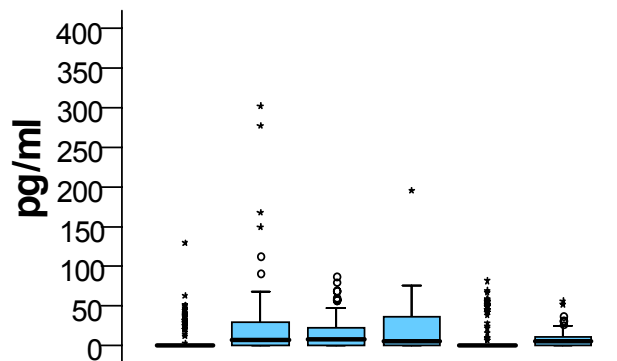
**IL-4:** Auf GAD65 wurde die niedrigste Sekretion gemessen. Zwischen PP-Ins und IA-2 zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede.

**IL-5:** Es ergaben sich keine Signifikanzen.

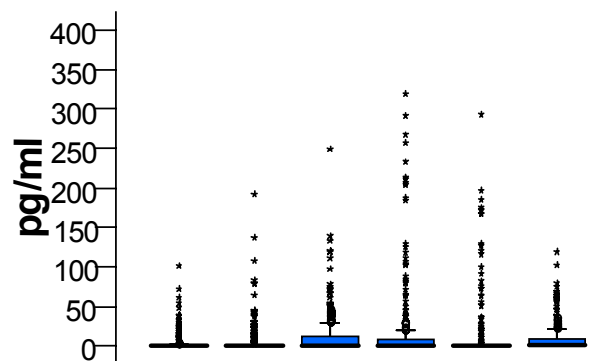
**IL-10:** Die Zytokinsekretion auf GAD65 war am stärksten ausgeprägt, gefolgt von dieser auf IA-2. Auf PP-Ins wurden die niedrigsten Werte gemessen.

Die Boxplots zu dieser Beschreibung sind in Abb. 10 dargestellt.

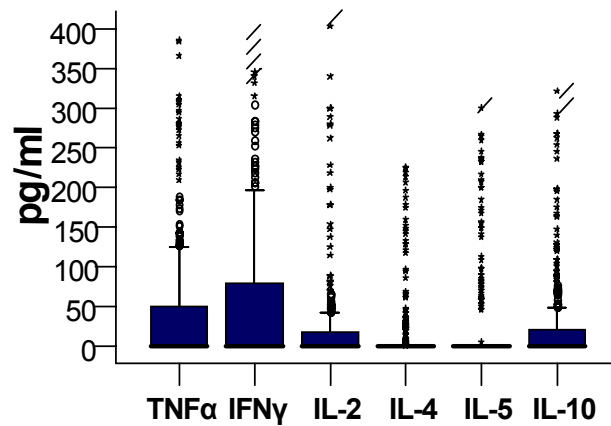
### PP-Ins



### IA-2



### GAD65



**PP-Ins v IA-2**

- (p<0,05)
- (p<0,005)
- (p<0,0005)

**PP-Ins v GAD65**

- (p<0,05)
- (p<0,005)
- (p<0,0005)

**IA-2 v GAD65**

- ▲ (p<0,05)
- ▲▲ (p<0,005)
- ▲▲▲ (p<0,0005)

Symbol in Diagramm mit höherem Wert

**Abb. 10.** Vergleich der Zytokinantworten auf Präproinsulin (PP-Ins; n=13), Protein-Tyrosin-Phosphatase-2 (IA-2; n=14) und Glutamat-Decarboxylase 65 (GAD65; n=12) in CD45RO+ T-Zellen von Patienten (T1D).

## 2.3 CD45RA+ T-Zellen (Naiv/resting-Zellen)

### 2.3.1 Kontrollpersonen

Der Test auf **PP-Ins** zeigte für TNF $\alpha$  Werte von 0 - 597 pg/ml (Mittelwert 13,21  $\pm$  Standardabweichung 53,74 pg/ml), für IFN $\gamma$  von 0 - 953 pg/ml (14,57  $\pm$  88,21 pg/ml), für IL-2 von 0 - 382 pg/ml (74,93  $\pm$  118,63 pg/ml), für IL-4 von 0 - 323 pg/ml (31,52  $\pm$  73,13 pg/ml), für IL-5 von 0 - 46 pg/ml (5,12  $\pm$  8,64 pg/ml) und für IL-10 von 0 - 43 pg/ml (6,13  $\pm$  9,19 pg/ml).

Als Zytokinantwort auf **IA-2** wurden Werte gemessen für TNF $\alpha$  von 0 - 2289 pg/ml (13,74  $\pm$  120,25 pg/ml), für IFN $\gamma$  von 0 - 1052 pg/ml (41,40  $\pm$  102,85 pg/ml), für IL-2 von 0 - 341 pg/ml (12,81  $\pm$  49,43 pg/ml), für IL-4 von 0 - 2771 pg/ml (14,96  $\pm$  145,52 pg/ml), für IL-5 von 0 - 388 pg/ml (13,77  $\pm$  48,96 pg/ml) und für IL-10 von 0 - 40 pg/ml (3,06  $\pm$  7,42 pg/ml).

Als Reaktion auf **GAD65** wurden Werte ermittelt für TNF $\alpha$  von 0 - 8282 pg/ml (88,22  $\pm$  341,34 pg/ml), für IFN $\gamma$  von 0 - 2944 pg/ml (42,51  $\pm$  171,94 pg/ml), für IL-2 von 0 - 180 pg/ml (10,40  $\pm$  23,64 pg/ml), für IL-4 von 0 - 239 pg/ml (9,22  $\pm$  21,27 pg/ml), für IL-5 von 0 - 224 pg/ml (8,89  $\pm$  28,09 pg/ml) und für IL-10 von 0 - 199 pg/ml (17,16  $\pm$  29,94 pg/ml). Diese Ergebnisse sind in Abb. 11 ersichtlich.

Es ergaben sich folgende Diskrepanzen:

**TNF $\alpha$ :** Die Zytokinsekretion auf GAD65 überwog die Sekretion auf IA-2 ( $p < 0,0005$ ).

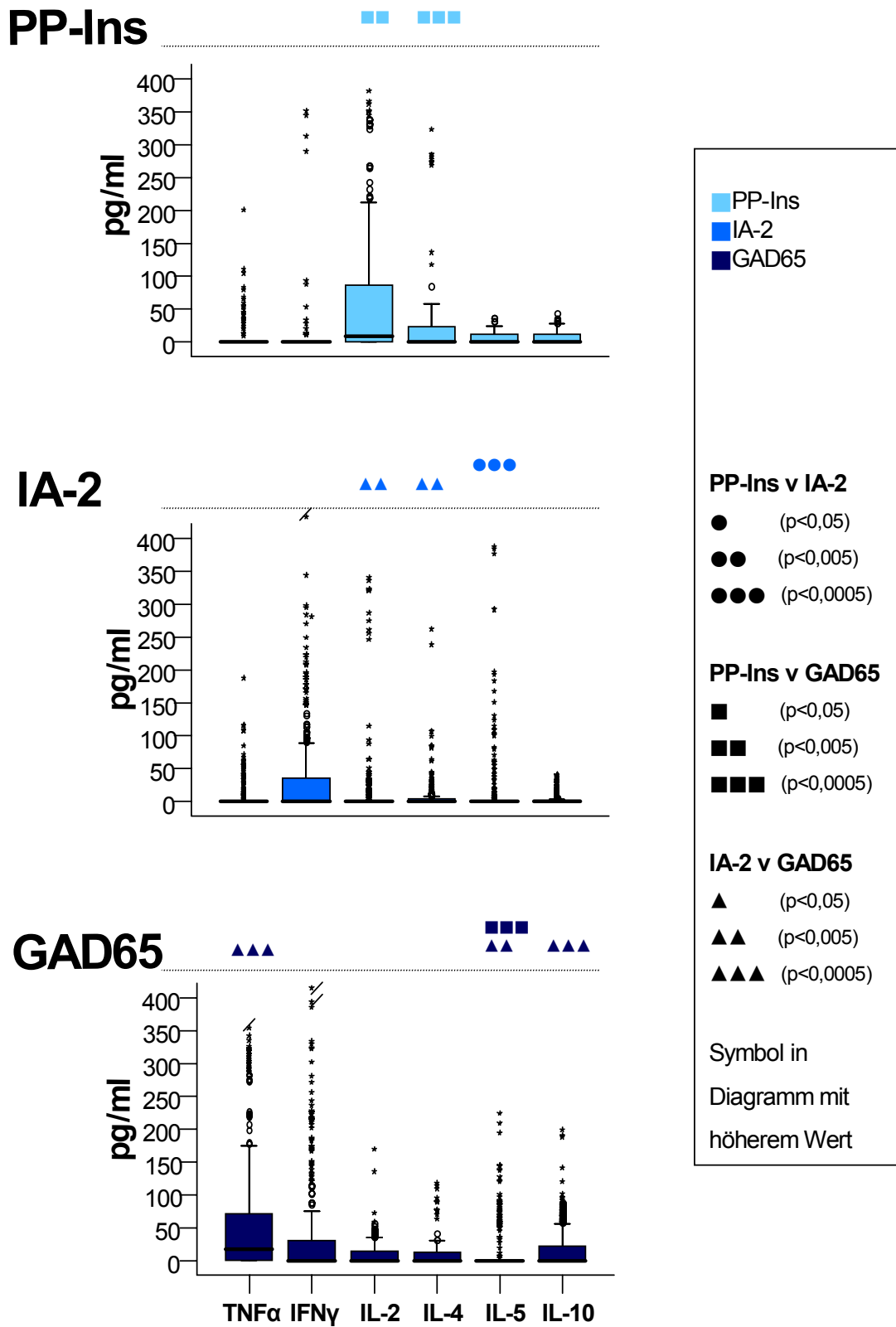
**IFN $\gamma$ :** Es konnten keine Signifikanzen ermittelt werden.

**IL-2:** Die Reaktion auf GAD65 war wesentlich niedriger als die Reaktionen auf PP-Ins ( $p < 0,005$ ) und auf IA-2 ( $p < 0,005$ ). Die Werte auf PP-Ins und IA-2 zeigten keine Unterschiede.

**IL-4:** Die Zytokinantwort auf GAD65 zeigte die niedrigsten Werte. Zwischen PP-Ins und IA-2 wurden keine Unterschiede gefunden.

**IL-5:** Die Reaktion auf GAD65 war am stärksten ausgeprägt, gefolgt von der Reaktion auf IA-2. Die geringsten Werte ergaben sich auf Stimulation mit PP-Ins.

**IL-10:** Die Antwort auf GAD65 überwog diese auf IA-2.



**Abb. 11.** Vergleich der Zytokinantworten auf Präproinsulin (PP-Ins; n=11), Protein-Tyrosin-Phosphatase-2 (IA-2; n=13) und Glutamat-Decarboxylase 65 (GAD65; n=13) in CD45RA+ T-Zellen von Kontrollpersonen.

### 2.3.2 Antikörperpositive Personen (AB+)

Die auf **PP-Ins** gemessenen Zytokinantworten zeigten Werte für TNF $\alpha$  von 0 pg/ml (Mittelwert  $0 \pm$  Standardabweichung 0 pg/ml), für IFN $\gamma$  von 0 - 205 pg/ml ( $6,45 \pm 26,61$  pg/ml), für IL-2 von 0 - 85 pg/ml ( $8,97 \pm 14,83$  pg/ml), für IL-4 von 0 - 41 pg/ml ( $3,30 \pm 8,90$  pg/ml), für IL-5 von 0 - 1107 pg/ml ( $14,21 \pm 117,23$  pg/ml) und für IL-10 von 0 - 82 pg/ml ( $5,12 \pm 11,51$  pg/ml).

Als Antwort auf **IA-2** wurden Werte ermittelt für TNF $\alpha$  von 0 - 120 pg/ml ( $14,49 \pm 25,34$  pg/ml), für IFN $\gamma$  von 0 - 267 pg/ml ( $25,25 \pm 47,58$  pg/ml), für IL-2 von 0 - 394 pg/ml ( $7,61 \pm 26,37$  pg/ml), für IL-4 von 0 - 119 pg/ml ( $10,08 \pm 17,88$  pg/ml), für IL-5 von 0 - 354 pg/ml ( $17,35 \pm 46,73$  pg/ml) und für IL-10 von 0 - 41 pg/ml ( $4,19 \pm 7,28$  pg/ml).

Die Höhe der Zytokinsekretion auf **GAD65** liegt für TNF $\alpha$  bei 0 - 2532 pg/ml ( $22,98 \pm 106,86$  pg/ml), für IFN $\gamma$  bei 0 - 1599 pg/ml ( $41,98 \pm 99,12$  pg/ml), für IL-2 bei 0 - 726 pg/ml ( $17,23 \pm 52,16$  pg/ml), für IL-4 bei 0 - 119 pg/ml ( $5,87 \pm 12,28$  pg/ml), für IL-5 bei 0 - 198 pg/ml ( $5,06 \pm 17,63$  pg/ml) und für IL-10 bei 0 - 666 pg/ml ( $18,27 \pm 49,78$  pg/ml).

Daraus wurde nachstehendes ersichtlich:

**IL-5:** Die Zytokinsekretion auf PP-Ins überwog diese auf IA-2 ( $p < 0,005$ ) und diese auf GAD65 ( $p < 0,05$ ) und wies somit die geringsten Werte auf.

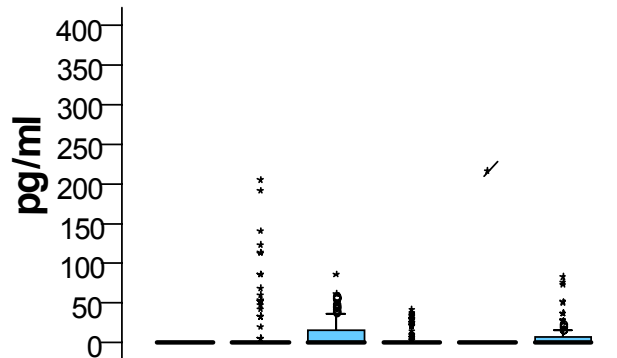
**IL-10:** Die stärkste Antwort wurde auf GAD65 hervorgerufen. Diese Antwort dominierte über die Reaktionen auf PP-Ins ( $p < 0,005$ ) und auf IA-2 ( $p < 0,05$ ).

Die Antworten auf PP-Ins und auf IA-2 unterschieden sich nicht statistisch signifikant.

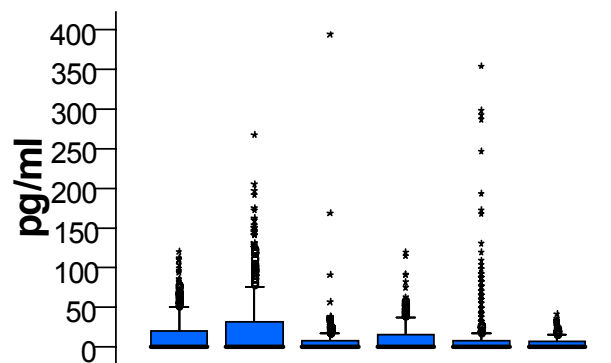
Die Zytokinsekretionen von TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-2 und IL-4 zeigten keine Signifikanzen bei der Stimulation durch PP-Ins, IA-2 und GAD65.

Die Graphiken zu oben genannten Ergebnissen sind in Abb. 12 dargestellt.

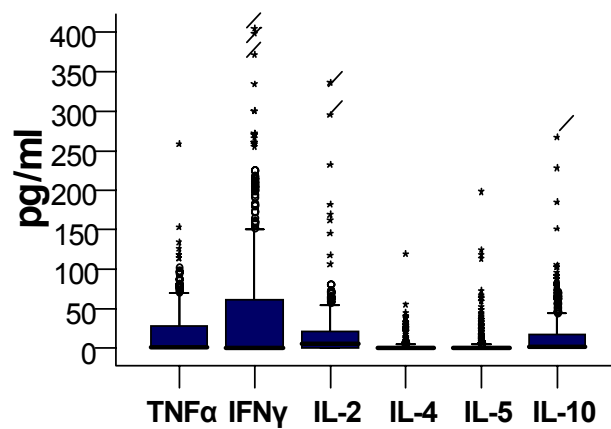
## PP-Ins



## IA-2



## GAD65



**PP-Ins**

- PP-Ins
- IA-2
- GAD65

**PP-Ins v IA-2**

- (p<0,05)
- (p<0,005)
- (p<0,0005)

**PP-Ins v GAD65**

- (p<0,05)
- (p<0,005)
- (p<0,0005)

**IA-2 v GAD65**

- ▲ (p<0,05)
- ▲▲ (p<0,005)
- ▲▲▲ (p<0,0005)

Symbol in  
Diagramm mit  
höherem Wert

**Abb. 12.** Vergleich der Zytokinantworten auf Präproinsulin (PP-Ins; n=11), Protein-Tyrosin-Phosphatase-2 (IA-2; n=10) und Glutamat-Decarboxylase 65 (GAD65; n=11) in CD45RA+ T-Zellen von antikörperpositiven (AB+) Personen.

### 2.3.3 Patienten (T1D)

Die auf **PP-Ins** gemessenen Zytokinantworten lagen für TNF $\alpha$  bei 0 - 218 pg/ml (Mittelwert 11,12  $\pm$  Standardabweichung 29,03 pg/ml), für IFN $\gamma$  bei 0 - 235 pg/ml (15,66  $\pm$  30,19 pg/ml), für IL-2 bei 0 - 131 pg/ml (18,84  $\pm$  19,77 pg/ml), für IL-4 bei 0 - 75 pg/ml (17,61  $\pm$  19,64 pg/ml), für IL-5 bei 0 - 1943 pg/ml (38,00  $\pm$  190,51 pg/ml) und für IL-10 bei 0 - 34 pg/ml (5,47  $\pm$  7,35 pg/ml).

Der Test auf **IA-2** ergab Werte für TNF $\alpha$  von 0 - 159 pg/ml (8,26  $\pm$  21,73 pg/ml), für IFN $\gamma$  von 0 - 368 pg/ml (25,96  $\pm$  55,04 pg/ml), für IL-2 von 0 - 96 pg/ml (5,19  $\pm$  12,67 pg/ml), für IL-4 von 0 - 1191 pg/ml (16,62  $\pm$  71,83 pg/ml), für IL-5 von 0 - 494 pg/ml (7,14  $\pm$  34,74 pg/ml) und für IL-10 von 0 - 61 pg/ml (3,55  $\pm$  7,43 pg/ml).

Als Reaktion auf **GAD65** wurden Werte gemessen für TNF $\alpha$  von 0 - 774 pg/ml (25,91  $\pm$  48,86 pg/ml), für IFN $\gamma$  von 0 - 4520 pg/ml (90,61  $\pm$  363,27 pg/ml), für IL-2 von 0 - 584 pg/ml (9,09  $\pm$  38,92 pg/ml), für IL-4 von 0 - 279 pg/ml (13,37  $\pm$  38,36 pg/ml), für IL-5 von 0 - 1222 pg/ml (12,71  $\pm$  75,41 pg/ml), und für IL-10 von 0 - 930 pg/ml (27,40  $\pm$  76,48 pg/ml).

Hieraus resultierten folgende Unterschiede:

**IFN $\gamma$ :** Die Sekretion auf GAD65 ergab die höchsten Werte ( $p < 0,05$ ). Die Antworten auf PP-Ins und IA-2 unterschieden sich nicht wesentlich.

**IL-4:** Die Reaktion auf GAD65 fiel am schwächsten aus und wurde von den Reaktionen auf PP-Ins und IA-2 dominiert ( $p < 0,0005$ ). Die Sekretion auf PP-Ins unterschied sich nicht signifikant von der Sekretion auf IA-2.

**IL-5:** Die Antwort auf PP-Ins lag höher als diese auf IA-2.

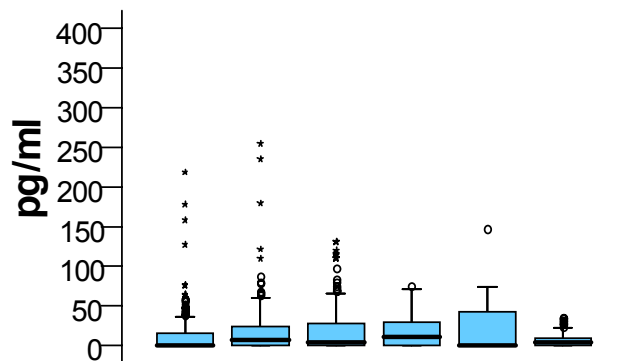
**IL-10:** Die Zytokinsekretion auf GAD65 erreichte die höchsten Werte und überwog die Zytokinsekretion auf PP-Ins und IA-2 ( $p < 0,0005$ ). Zwischen PP-Ins und IA-2 gab es keine Unterschiede.

Die Antworten von TNF $\alpha$  und IL-2 zeigten keine Signifikanzen.

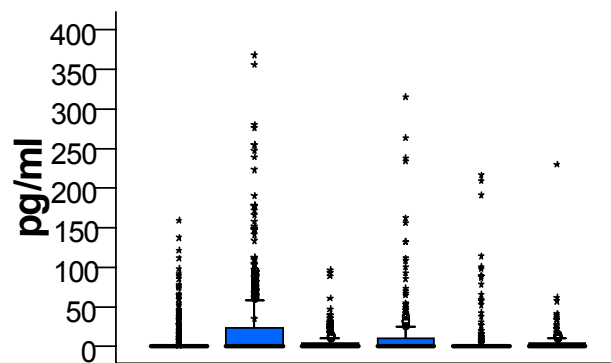
Diese Ergebnisse sind in den Boxplots aus Abb. 13 dargestellt.



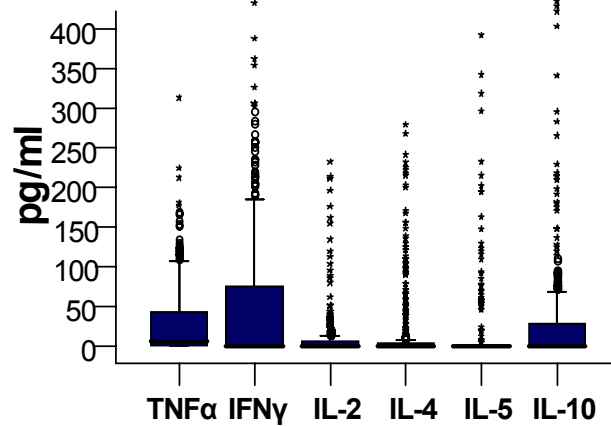
### PP-Ins



### IA-2



### GAD65



**PP-Ins v IA-2**

- (p<0,05)
- (p<0,005)
- (p<0,0005)

**PP-Ins v GAD65**

- (p<0,05)
- (p<0,005)
- (p<0,0005)

**IA-2 v GAD65**

- ▲ (p<0,05)
- ▲▲ (p<0,005)
- ▲▲▲ (p<0,0005)

Symbol in Diagramm mit höherem Wert

**Abb. 13.** Vergleich der Zytokinantworten auf Präproinsulin (PP-Ins; n=13), Protein-Tyrosin-Phosphatase-2 (IA-2; n=14) und Glutamat-Decarboxylase 65 (GAD65; n=12) in CD45RA+ T-Zellen von Patienten (T1D).

## IV. DISKUSSION

### 1. Diskussion der Methodik

#### 1.1 Auswahl der Probanden

Der Typ 1 Diabetes mellitus (T1D) ist eine Autoimmunerkrankung, die klinisch in **drei Stadien** verläuft. Auf eine klinisch unauffällige Phase (gesund) folgt eine Zeit, in der bereits Autoantikörper im Blut nachgewiesen werden können, aber noch nicht über 80% der Beta-Zellen zerstört sind, d. h. der T1D sich noch nicht manifestiert hat. Auf diese sogenannte prädiabetische Phase folgt dann die eigentliche T1D Erkrankung. Es wurde versucht, in dieser Studie Personengruppen zu untersuchen, die alle diese Stadien möglichst repräsentieren können. Es wurden somit in dieser Arbeit drei verschiedene Personengruppen untersucht: Kontrollpersonen, Hochrisikopersonen (AB+) und Patienten (T1D).

Die Probanden wiesen das **Geschlecht** betreffend eine gleichmäßige Verteilung auf, um ein möglichst vom Geschlecht unabhängiges Ergebnis zu erzielen.

Um eine annähernd gleiche genetische Ausgangssituation zu gewährleisten, wurden alle Individuen nach dem **HLA-Haplotyp** DRB1\*0401, DQB1\*0302 ausgewählt. Dieser Haplotyp gilt als T1D-assoziiert, wird als Hochrisiko-Haplotyp bezeichnet (DAVIES et al. 1994) und ist für ungefähr 50% des genetischen Erkrankungsrisikos verantwortlich. Weitere 15% des genetischen Risikos gehen von der VNTR- (=variable-number tandem-repeat) Region und dem Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 (=CTLA-4) aus (ANJOS und POLYCHRONAKOS 2004). Diese Auswahl des HLA-Haplotyps berücksichtigt somit den wichtigsten mit Diabetes Typ 1 assoziierten Genlocus, es existieren jedoch noch circa 19 weitere genetische Marker (IDDM 1-20) (COX et al. 2001, TABOR et al. 2002).

Kritisch zu bewerten ist, dass die Gruppe der Autoantikörper-positiven Individuen (**AB+**) in sich nicht homogen ist. Diese Personen weisen eine unterschiedliche Anzahl von Autoantikörpern auf mit unterschiedlich hohen Titern. Ein Problem bei den Tests auf Autoantikörper ergibt sich daraus, dass die Autoantikörper zeitlich nicht nach dem gleichen Muster auftreten. IA-2A findet man oft schon bei einem Lebensalter von zwei Monaten, während GADA meist erst zu einem späteren Zeitpunkt im Leben auftreten (HOLMBERG et al. 2003).

Es ist also nicht genau geklärt, zu welchem Zeitpunkt der prädiabetischen Phase die Person untersucht wurde und ob genau diese Person später an T1D erkranken wird (BINGLEY et al. 1993).

## 1.2 Test auf drei Antigene: PP-Ins, IA-2 und GAD65

In der vorliegenden Arbeit wurden Zytokinantworten auf drei verschiedene Antigene untersucht: Präproinsulin (PP-Ins), Protein-Tyrosin-Phosphatase-2 (IA-2) und Glutamatdecarboxylase 65 (GAD65), da diese drei Antigene in der Pathogenese des T1D eine wesentliche Rolle spielen. Der genaue Wirkungsmechanismus ist jedoch bislang noch ungeklärt.

Bekannt ist, dass Insulin und seine Prohormone Präproinsulin (**PP-Ins**) und Proinsulin (P-Ins) als Autoantigene im T1D eine Sonderstellung einnehmen, da sie die einzigen betazellspezifischen Autoantigene sind. Sie werden direkt ins Pfortadersystem sezerniert und besitzen ein hohes Expressionsniveau in den pankreatischen Beta-Zellen.

**IA-2** findet man im Gegensatz dazu in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas und in großen Teilen des zentralen Nervensystems, wo es vorwiegend in neuroendokrinen Zellen exprimiert wird. Desweiteren spielt das Molekül eine Rolle als Marker bei neuroendokrinen Tumoren (XIE et al. 1996).

Die Glutamatdecarboxylase 65 (**GAD65**) kommt beim Menschen sowohl in neuronalen Geweben als auch in den endokrinen Beta-Zellen des Pankreas vor.

In dieser Untersuchung wurde die Zytokinsekretion auf aufgereinigte Peptide der drei Moleküle getestet, um Verzerrungen durch „unreines Material“ zu verhindern,

wie es beim Test auf ganze Moleküle wahrscheinlich zu erwarten gewesen wäre (PEAKMAN et al. 2001).

### **1.3 Statistische Auswertung**

Die modellbasierte Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe eines (sog. gemischten) linearen Modells, das die **Verbundenheitsstruktur** der Daten berücksichtigt.

Um die Voraussetzung der **Normalverteilung** der Daten weitestgehend zu gewährleisten, wurde als abhängige Variable (y-Variable) des Modells der Logarithmus der Zielgrößen (Reaktivität) betrachtet. Dennoch konnte die Normalverteilung aufgrund der komplexen Datenstruktur nicht vollständig erreicht werden.

Desweiteren berücksichtigte diese **Transformation** nur positive Werte der gemessenen Zielgrößen, da der Logarithmus von Null nicht definiert ist. Dadurch wurde die Fallzahl geringfügig reduziert und damit auch die Aussagekraft der Untersuchung. Die Auswirkungen sind jedoch aufgrund der großen Fallzahl als verschwindend gering einzustufen.

## **2. Diskussion der Ergebnisse**

### **2.1 Zytokinantworten der peripheren Blutlymphozyten (PBMC)**

Die peripheren Blutlymphozyten (PBMC) stellen eine heterogene Zellgruppe dar, die aus T-Zellen (CD4+ und CD8+), B-Zellen, natürlichen Killerzellen, Monozyten und Makrophagen besteht. Jede dieser Zell-Subpopulationen hat eine spezifische Aufgabe, aber alle besitzen die Fähigkeit, auf einen Stimulus mit einer Zytokinsekretion zu antworten.

Hier wurden die PBMC von Kontrollpersonen, AB+ Individuen und Patienten (T1D) mit den Peptiden der drei Antigene PP-Ins, IA-2 und GAD65 stimuliert und die Zytokinantworten daraufhin untersucht. Hierbei wurde die Zytokinsekretion von sechs Zytokinen (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5 und IL-10) gemessen, wobei diese Zytokine in eine proinflammatorische Gruppe (=Th1-Zytokine: TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-2), eine Th2- Gruppe (Th2-Zytokine: IL-4, IL-5) und in eine immunoregulatorische Gruppe (Treg-Zytokin IL-10) eingeteilt werden können (MOSMANN und SAD 1996, RONCAROLO et al. 2000).

**TNF $\alpha$**  wirkt toxisch auf pankreatische Beta-Zellen und hemmt die Insulinsekretion dieser Zellen in vitro (RABINOVITCH 1993). Bei Versuchen in der NOD-Maus konnte das Tier vor einer T1D Erkrankung geschützt werden durch neonatale Injektion von monoklonalen anti-TNF $\alpha$  Antikörpern (YANG et al. 1994). Dies unterstreicht die Wichtigkeit von TNF $\alpha$  in der Pathogenese des T1D.

Das Zytokin **IFN $\gamma$**  aktiviert Makrophagen. Es wird dabei die Bildung von Th1-Zellen gefördert und die Entstehung von Th2-Zellen gehemmt. Die Bedeutung von IFN $\gamma$  für den Verlauf einer T1D Erkrankung wird nicht zuletzt dadurch unterstrichen, dass in einer Studie die Entstehung eines T1D in der NOD-Maus verhindert werden konnte, weil die Expression des IFN $\gamma$ -Rezeptors blockiert wurde (WANG et al. 1997).

Das proinflammatorische **IL-2** ist einer der bedeutendsten Wachstumsfaktoren und kann Apoptose induzieren.

Das antiinflammatorisch wirkende **IL-4** spielt eine Rolle bei der Differenzierung von Vorläuferzellen in Th2-Zellen und hemmt die Produktion von Th1-Zytokinen durch Antigen-Präsentierende-Zellen (APCs) (ABBAS et al. 1996). Die Rolle von IL-4 in der Pathogenese des T1D wird jedoch kontrovers diskutiert. Es existieren Studien, in denen die lokale Expression von IL-4 in den Beta-Zellen von NOD-Mäusen die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen unterband und somit eine spontane T1D Erkrankung des Tieres verhindert werden konnte (FOX et al. 1997). Im Gegensatz dazu steht eine Untersuchung, in der die totale Abwesenheit von IL-4 weder zu einer beschleunigten noch zu einer höheren Prävalenz der T1D Erkrankung führte (WANG et al. 1998). Die Rolle von IL-4 bleibt also in Bezug auf T1D noch ungeklärt.

**IL-5** stimuliert mit IL-4 synergistisch die Differenzierung und das Wachstum von B-Zellen.

Das immunregulatorische **IL-10** aktiviert die humorale Immunantwort und ist in der Lage, das Th1-Zytokin TNF $\alpha$  und andere Zytokine und Chemokine zu hemmen (FIORENTINO et al. 1991). In einer NOD-Maus Untersuchung wurden die Tiere mit IL-10 geimpft, worauf ein abschwächender Effekt auf die Insulinitis resultierte (PENNLIN et al. 1994).

Alle Zytokine insgesamt betrachtet, wird angenommen, dass das jeweilige Verhältnis von Th1- zu Th2 zu Treg-Zytokinantworten eine große Rolle bei der Entstehung eines insulinabhängigen Diabetes spielt (ABBAS et al. 1996).

Betrachtet man zunächst die Zytokinantworten der **Kontrollpersonen**, so fällt auf, dass sich die Sekretionen auf Stimulation mit PP-Ins, IA-2 und GAD65 bei den Th2-Zytokinen IL-4 und IL-5 nicht unterscheiden. Bei dem regulatorischen Zytokin IL-10 zeigte sich auf IA-2 die höchste Antwort, während sich GAD65 und PP-Ins gleichmäßig auf niedrigerem Niveau befanden. Die Gruppe der Th1-Zytokine verhielt sich nicht einheitlich. Bei TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  zeigten sich keine Unterschiede zwischen den drei Antigenen, jedoch war die IL-2-Antwort auf IA-2 am stärksten. Es kann also festgestellt werden, dass sich auf Stimulation mit IA-2 sowohl bei den Th2-Zytokinen als auch bei einem der Th1-Zytokine höhere Werte ergeben als beim Test auf PP-Ins und GAD65. PP-Ins und GAD65 unterscheiden sich in den PBMC der Kontrollpersonen nicht signifikant. Auffallend ist auch, dass sich die Zytokinsekretion auf alle drei Antigene insgesamt auf einem niedrigen Niveau bewegt.

Die Zytokinsekretion in den PBMC der **AB+ Individuen** ist bei den Th1-Zytokinen einheitlich auf GAD65 am höchsten. Auf GAD65 zeigte sich also die stärkste proinflammatorische Antwort. Die Sekretion auf Stimulation mit PP-Ins und IA-2 wies im Vergleich statistisch viel geringere Unterschiede auf als der Vergleich der beiden Antigene mit GAD65. Es kann also festgestellt werden, dass sich die Antworten auf PP-Ins und IA-2 gleichförmig niedrig verhalten und sich von GAD65 unterscheiden, auf das vor allem bei den proinflammatorischen Zytokinen eine wesentlich höhere Antwort erreicht wird. In den mit GAD65 stimulierten PBMC von AB+ Individuen wird eine Dominanz der Th1-Zytokinsekretion über die Th2-Zytokinsekretion sichtbar, was sich bei Stimulation mit PP-Ins und IA-2 nicht zeigt.

Unterschiede in den Reaktionsmustern auf Stimulation mit GAD65 und PP-Ins wurden bereits in NOD-Maus-Studien nachgewiesen. Dort wurden die Tiere mit DNA-Plasmiden von PP-Ins und GAD65 geimpft. Die mit PP-Ins behandelten Mäuse entwickelten eine T1D Erkrankung, während die mit GAD65 behandelten Tiere nicht an T1D erkrankten (WEAVER et al. 2001, KARGES et al. 2002).

Dieser Trend ist bei den **Patienten** nicht erkennbar. Hier dominierte die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine auf GAD65 nicht über die Sekretion dieser auf PP-Ins und IA-2.

In einer in Skandinavien durchgeführten Studie wurde ähnliches sichtbar. Hier wurden PBMC von neu manifestierten Kindern mit Insulin und GAD65 stimuliert. Es wurde zwar auf beide Stimuli eine geringfügig erhöhte Sekretion von IFN $\gamma$  gemessen, diese Sekretionen zeigten jedoch in ihrer Höhe keine signifikanten Unterschiede (KARLSSON et al. 2004).

Die Zytokinantworten in der vorliegenden Studie fielen insgesamt heterogen aus. Es lässt sich bei diesen Patienten auf keines der drei Antigene eine erhöhte Th1-Zytokinsekretion im Vergleich zu einer Th2-Zytokinsekretion erkennen.

Das Verhältnis von Th1- zu den Th2-Zytokinen in der Pathogenese des Diabetes Typ 1 wird kontrovers diskutiert. In einigen bisher durchgeführten Untersuchungen wurde ein zu Gunsten der Th1-Zytokinsekretion verschobenes Gleichgewicht bei T1D Patienten festgestellt. Es wurde schlussgefolgert, dass eine Th1-Antwort mit Diabetes assoziiert ist und eine Th2-Antwort protektiv wirkt. Dies wurde sowohl in Studien mit NOD-Mäusen (TIAN et al. 1998, SCHLOOT et al. 2002) als auch in humanen Untersuchungen festgestellt (ARIF et al. 2004). In einer Studie mit T-Zellen von Prä-/Diabetikern ergab eine T-Zell-Stimulation mit Phytohämagglutinin (PHA) eine erhöhte Sekretion von IFN $\gamma$ , TNF $\beta$  und IL-2 und somit eine proinflammatorische Zytokinantwort (KARLSSON et al. 2000). Durch dieses Ungleichgewicht zugunsten der Th1-Zytokine könnten inflammatorische Prozesse beschleunigt werden, welche schließlich zur Zerstörung der Beta-Zellen führen könnten.

Andere Untersuchungen wiederum ergaben keine strikte Trennung zwischen protektiven (Th2) und proinflammatorischen (Th1) Zytokinantworten. Hier zeigte die Th1-Zytokinsekretion keine Assoziation mit Diabetes Typ 1 (DURINOVIC-BELLO et al. 2002, HANIFI-MOGHADDAM et al. 2003).

In der vorliegenden Untersuchung konnte in den PBMC der Patienten auf keines der drei getesteten Antigene eine klare Th1-Antwort gemessen werden. Dies stützt die Annahme, dass eine klare Abgrenzung von Th1 (diabetesassoziiert) und Th2 (protektiv) nicht möglich ist.

## **2.2 Zytokinantworten von CD45RO+ (memory) und CD45RA+ (naiv/resting) T-Zellen**

Zusätzlich zu den peripheren Blutlymphozyten (PBMC) wurden in dieser Arbeit die CD45RO+ (memory) und die CD45RA+ (naiv/resting) T-Zellen untersucht.

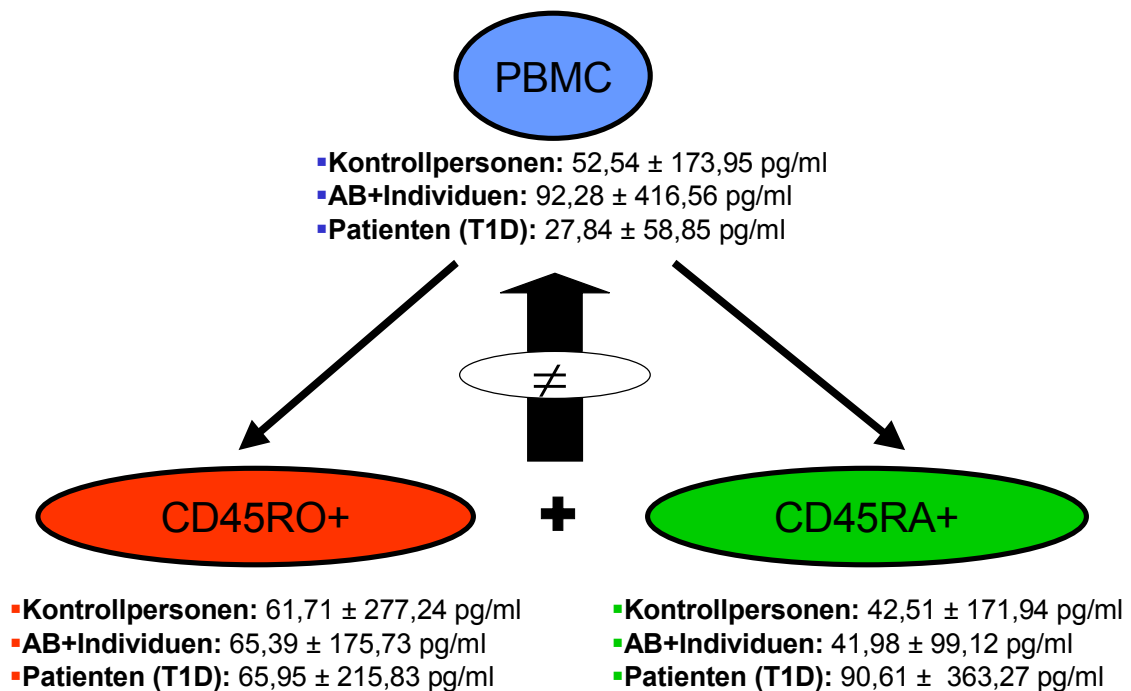
Die CD45RO+ und die CD45RA+ T-Zellen bilden zusammen mit B-Zellen, natürlichen Killerzellen, Monozyten und Makrophagen die peripheren Blutlymphozyten.

Die beiden T-Zell-Subpopulationen wurden aus den PBMC isoliert und ebenfalls mit den drei Antigenen PP-Ins, IA-2 und GAD65 stimuliert. Es wurde deutlich, dass es nicht möglich ist, die durch die Parzellierung ermittelten Zytokinwerte der beiden T-Zell-Subpopulationen einfach zu addieren, um so das Ergebnis der PBMC zu erreichen. Die Antwort in den PBMC ergibt sich also nicht direkt aus den Antworten der CD45RO+ und der CD45RA+ T-Zellen, sondern sie entsteht vielmehr durch komplexe Interaktionen zwischen den einzelnen Zellsubpopulationen.

Dieses Phänomen wird in Abbildung 14 nochmals anhand der IFN $\gamma$ -Sekretion beispielhaft veranschaulicht.

**CD45RO+ T-Zellen** sind vorwiegend in peripheren Geweben zu finden und reagieren sehr stark auf Antigenstimuli. Sie sind in vivo geprimt, das heißt sie haben das körpereigene Antigen bereits während der Reifung des Immunsystems gesehen und eine Toleranz dagegen entwickelt. Sie stellen somit eine durch Antigenkontakt aktivierte Population dar (RUFER et al. 2001). Im Körper des Typ 1 Diabetikers findet vermutlich keine oder nur eine zu geringe Toleranzinduktion statt.





**Abb. 14.** Vergleich der IFN $\gamma$ -Antworten (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) auf GAD65 in PBMC, CD45RO $^+$  und CD45RA $^+$  T-Zellen in Kontrollpersonen, AB+ Individuen und Patienten (T1D)

**CD45RA $^+$  T-Zellen** sind ungeformte (naive) Zellen, die eine sogenannte regulatorische Funktion haben. Sie haben die Aufgabe, eine humorale Immunabwehr zu aktivieren und die Th1-Zellen zu regulieren.

Im Verlauf der Immunpathogenese werden die CD45RA $^+$  T-Zellen aktiviert und exprimieren auf ihrer Oberfläche sowohl CD45RA $^+$  als auch CD45RO $^+$  (CD45RA $^+$ RO $^+$  T-Zellen). Im weiteren Verlauf verlieren sie dann den Marker CD45RA $^+$  und werden jetzt als CD45RO $^+$  T-Zellen (Memory-Zellen) bezeichnet (PETERSEN et al. 1999). Für den korrekten Ablauf der Immunreaktion sind sowohl die Memory-Funktion als auch das regulatorische Verhalten der naiven T-Zellen unabdingbar.

Befasst man sich zunächst mit der Zytokinantwort der **CD45RO $^+$  T-Zellen** von den **Kontrollpersonen**, so wird erkennbar, dass in der Antwort auf PP-Ins die proinflammatorischen Zytokine, vor allem IFN $\gamma$  und IL-2 wesentlich höhere Werte

erreichen als in den Antworten auf GAD65 und IA-2. Dagegen dominieren bei dem Th2-Zytokin IL-5 und bei dem regulatorisch wirkenden IL-10 die Antworten auf GAD65 über die Antworten auf PP-Ins und IA-2. Dies lässt darauf schließen, dass GAD65 bei den Kontrollpersonen eine eher regulatorische Antwort hervorruft, während PP-Ins eine inflammatorische Antwort generiert. Bei dieser Aussage muss jedoch bedacht werden, dass die hier getesteten Kontrollpersonen nach einem Hochrisiko-HLA-Haplotyp ausgesucht wurden. Es könnte also auch möglich sein, dass andere gesunde Individuen, die nicht diesen Haplotyp zeigen, nicht mit einer proinflammatorischen Antwort auf Stimulation mit PP-Ins reagiert hätten.

Bei den CD45RO+ T-Zellen der **AB+ Individuen** konnten auf Stimulation mit GAD65 für IL-5 und IL-10 wesentlich höhere Werte gemessen werden als auf Stimulation mit PP-Ins und IA-2. Dieses Ergebnis unterscheidet sich sehr von den in den PBMC von AB+ Individuen gemessenen Zytokinantworten. In den PBMC unterschieden sich die auf GAD65 gemessenen Werte von den Werten auf PP-Ins und IA-2 vor allem bei den proinflammatorischen Zytokinen TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  und IL-2. Das lässt darauf schließen, dass die Th1-Zytokine auf GAD65 nicht von den CD45RO+ T-Zellen gebildet wurden, sondern von anderen Subpopulationen der PBMC.

Die Memory-Zellen der **T1D Patienten** reagierten auf GAD65 mit einer weitaus höheren IFN $\gamma$ -Antwort als auf PP-Ins und IA-2. Diese Ergebnis unterscheidet sich von den in den PBMC gemessenen Zytokinantworten. IFN $\gamma$  wird auf Stimulus mit GAD65 also vorwiegend von den CD45RO+ T-Zellen sezerniert. Wie auch in den PBMC ergab sich auf GAD65 eine höhere IL-10-Produktion als auf PP-Ins und IA-2. Die Sekretion der anderen Zytokine auf Stimulation mit den Peptiden der drei verschiedenen Antigene zeigte sich, wie auch bei den PBMC, insgesamt heterogen. Auch hier lässt sich auf keinen der Stimuli eine erhöhte Th1-Zytokinsekretion im Vergleich zu einer Th2-Zytokinsekretion erkennen. Es ergaben sich bis auf die Sekretion von IFN $\gamma$  und IL-10 keine auffallenden Unterschiede zwischen PP-Ins, IA-2 und GAD65.

Im nachfolgenden Teil wird das Verhalten der **CD45RA+ T-Zellen** betrachtet.

Bei den **Kontrollpersonen** zeigten sich auf GAD65 signifikant höhere Antworten von IL-5 und IL-10 als auf PP-Ins und IA-2. Die Dominanz von den proinflammatorischen Zytokinen nach Stimulation mit PP-Ins zeigt sich hier im Gegensatz zu den CD45RO+ T-Zellen nicht. Daher kann man davon ausgehen, dass bei den gesunden Kontrollpersonen die Th1-Zytokine auf PP-Ins vorwiegend von den memory-Zellen und die Th2- bzw. Treg-Zytokine auf GAD65 vor allem von naiv/resting T-Zellen sezerniert werden. Es wird also einmal mehr deutlich, dass sich die Zytokinantworten auf PP-Ins und GAD65 deutlich voneinander unterscheiden. Dies stützt Thesen, die nach Untersuchungen mit NOD-Mäusen aufgestellt wurden und ein gegensätzliches Verhalten von GAD65 und PP-Ins postulieren. Es wurde herausgefunden, dass ein GAD65 spezifischer T-Zell-Klon die Maus vor autoimmunem Diabetes schützen kann und dass bestimmte Peptide im GAD65-Molekül protektive Wirkung haben und nicht pathogen sind (TISCH et al. 2001, TARBELL et al. 2002). Auf eine Impfung mit PP-Ins reagierten NOD-Mäuse dagegen mit Entwicklung eines spontanen T1D (WEAVER et al. 2001).

Die Untersuchungen der CD45RA+ T-Zellen der **AB+ Individuen** ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Antigenen bei den proinflammatorischen Th1-Zytokinen TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  und IL-2. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen in den PBMC. Dort wurde nach Stimulation mit GAD65 eine wesentlich höhere Antwort aller Th1-Zytokine gemessen im Vergleich zur Zytokinsekretion nach Stimulation mit PP-Ins und IA-2. Es kann daraus geschlossen werden, dass die proinflammatorische Antwort auf GAD65 vorwiegend nicht von den CD45RA+ T-Zellen, sondern von anderen in den PBMC vorkommenden Zellarten ausgelöst wird. Auch wird erkennbar, dass die Unterschiede in den Zytokinantworten auf die drei Antigene in den CD45RA+ T-Zellen nicht besonders deutlich werden. Die Diskrepanzen sind in den PBMC und in den CD45RO+ T-Zellen weitaus besser sichtbar. Ähnliches wurde bereits in anderen Studien sichtbar (DURINOVIC-BELLO et al. 2004).

Betrachtet man die Zytokinantwort der **Patienten**, so fällt auf, dass die Sekretion des regulatorischen IL-10 nach Stimulation mit GAD65 sowohl in den memory- als auch in den naiv/resting-T-Zellen und den PBMC höher ist als nach Stimulation mit

PP-Ins und IA-2. Interessant ist hierbei die Tatsache, dass in Patienten offensichtlich nur auf GAD65 eine regulatorische Immunantwort durch die Sekretion von IL-10 stattfindet, während diese Regulation auf Stimulation mit PP-Ins und IA-2 unterbleibt. Diese Tatsache ist ein weiteres Indiz dafür, dass das Antigen GAD65 in der Pathogenese eine andere Rolle spielt als die beiden anderen Antigene PP-Ins und IA-2.

In Bezug auf die Sekretion der anderen Zytokine außer IL-10 ergab sich bei den CD45RA+ T-Zellen genau wie auch bei den memory-Zellen als auch den PBMC ein heterogenes Bild. Gravierende Unterschiede zwischen den Antworten auf die drei Antigene konnten nicht festgestellt werden, genauso wenig konnte eine ausschließliche Th1-Zytokinsekretion festgestellt werden.

### 2.3 Prävention und Therapiemöglichkeiten

Das Hauptziel der T1D Forschung ist es, die Menschheit vor dieser Erkrankung zu schützen (Prävention). Jede vollständige Krankheitsprävention ist auf **drei Säulen** aufgebaut. Erstens müssen Hochrisikopersonen identifiziert werden, zweitens muss man Kenntnis über die Ätiologie der Krankheit erlangt haben und drittens sollte ein gutes Verständnis über die Pathogenese der Erkrankung vorhanden sein (ROSENBLOOM et al. 2000). Diese drei Bedingungen sind im Falle des Typ 1 Diabetes (T1D) noch nicht erfüllt. Eine vollständige Prävention vor dieser Erkrankung ist also zu diesem Zeitpunkt leider noch nicht möglich.

Deshalb werden zur Zeit zwei Strategien verfolgt, um die Krankheit in den Griff zu bekommen. Zum einen eine immunmodulierende bzw. immunsuppressive Therapie nach Manifestation des T1D mit dem Ziel der Aufrechterhaltung der Restfunktion der Beta-Zellen und des Schutzes der Patienten vor Folgeschäden. Zum anderen eine Intervention in der prädiabetischen Phase bereits vor Manifestation der Erkrankung zur Verhinderung einer T1D Erkrankung.

Um bereits in der prädiabetischen Phase eingreifen zu können, ist es notwendig, Hochrisikopersonen aus der Bevölkerung herauszufiltern. Dies geschieht im wesentlichen auf zwei Arten: durch die Ermittlung der Autoantikörpertiter und durch die Bestimmung von genetischen Markern (HLA-Haplotyp, VNTR-Allele).

Problematisch ist hierbei, dass diese Tests nicht mit einer 100%igen Sensitivität und Spezifität arbeiten und so nicht alle Risikopersonen erfasst werden können (BECKER et al. 1999).

Es wurden bereits zahlreiche Versuche unternommen, die Manifestation der Erkrankung hinauszuzögern. Viele Tests wurden dabei an **NOD-Mäusen** durchgeführt, da humane Studien dem Einverständnis der Patienten bedürfen, was nur sehr selten zu erlangen ist (SCHATZ et al. 1994). Diese Art der Untersuchung ist eine gute Alternative zu humanen Studien, dennoch können die Ergebnisse nicht ohne weiteres auf Menschen übertragen werden. Bei Tests in NOD-Mäusen schnitten einige potentiell therapeutisch wirksame Methoden gut ab. So konnte die Manifestation der Erkrankung durch Antigentherapie im Sinne einer **oralen Insulingabe** hinausgezögert werden (ZHANG et al. 1991). Auch mit **GAD65-Impfungen** konnte die Erkrankung der NOD-Maus verhindert werden (KARGES et al. 2002). Eine andere Studie in NOD-Mäusen zeigte, dass mit **1,25-Dihydroxyvitamin D3** die T1D Erkrankung verhindert werden konnte, wenn das Vitamin bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt eingesetzt wurde (GYSEMANS et al. 2005). Desweiteren wurde durch die Verabreichung des Antioxidans **Nicotinamid** im Mausmodell die Erkrankung erfolgreich hinausgezögert (GALE 1996, KOLB und BURKHART 1999). In einer humanen Studie jedoch konnte diese Wirkung des Nicotinamids nicht bestätigt werden (GALE 2004).

Es werden momentan also einige vielversprechende Therapieversuche unternommen, jedoch ist man noch weit davon entfernt, die Krankheit kontrollieren zu können. Dies liegt auch mit daran, dass der Erfolg einer eventuellen Therapiemöglichkeit nicht direkt nach der Intervention messbar ist. Sogar durch die offensichtlich erfolgreiche Intervention mit Cyclosporin A wurden die in der prädiabetischen Phase erfolgreich als prognostische Marker eingesetzten Autoantikörpertiter von ICA, GADA, IA-2A und IAA nicht beeinflusst. Sie scheinen also im Hinblick auf die Bewertung eventuell geeigneter Therapiemaßnahmen nicht geeignet zu sein. Eventuell könnte in Zukunft ein neuer prognostischer Marker, die **T-Zellreaktivität**, die Beurteilung einer therapeutischen Intervention wesentlich vereinfachen. Anhand bestimmter Zytokinmuster könnten dabei erfolgreiche von nicht vielversprechenden Therapiemaßnahmen unterschieden werden. In der vorliegenden Studie wird deutlich, dass gesunde Personen andere

Zytokinmuster aufweisen als AB+ Individuen und Typ 1 Diabetiker, doch sind zur genauen Ermittlung eines allgemein gültigen Zytokinmusters noch weitere Untersuchungen notwendig.

### **3. Schlußfolgerungen**

Es wird kontrovers diskutiert, ob die Verschiebung des Zytokingleichgewichts (**Th1 v. Th2**) zu den Th1-Zytokinen hin eine wesentliche Rolle bei der Manifestation eines T1D spielt.

In der vorliegenden Arbeit konnte insbesondere bei der Gruppe der Patienten (T1D) kein klares Zytokinmuster erkannt werden, das eine besonders hohe Sekretion auf Seiten der Th1-Zytokine aufweist. Dies stützt die bisherigen Untersuchungen, die eine strikte Trennung in Th1 (diabetesassoziiert) und Th2 (protektiv) nicht bestätigen konnten. Interessant ist dabei auch die Tatsache, dass so eine Einteilung in keiner der drei untersuchten Zellpopulationen der Patienten aufgetreten ist (PBMC, CD45RO+, CD45RA+).

Im Vergleich der drei **Autoantigene** PP-Ins, IA-2 und GAD65 konnte festgestellt werden, dass sich die Zytokinantworten auf GAD65 auffallend oft anders darstellten als die Zytokinantworten auf PP-Ins und IA-2. Dies wurde deutlich in den Untersuchungen aller drei Personengruppen (Kontrollpersonen, AB+ Individuen, T1D Patienten).

In den CD45RO+ und den CD45RA+ T-Zellen, nicht jedoch in den PBMC, von Kontrollpersonen konnte auf Stimulation mit GAD65 eine signifikant höhere Sekretion von IL-5 und IL-10 festgestellt werden als bei der Stimulation dieser Zellen mit PP-Ins und IA-2. Dies deutet darauf hin, dass immunregulatorische Zytokine vor allem auf GAD65 ausgeschüttet werden, während auf Stimulation mit PP-Ins und IA-2 bei den Kontrollpersonen keine verstärkte Produktion der regulatorischen Zytokine gemessen werden konnte.

In den PBMC der AB+ Individuen dominierte die Sekretion aller proinflammatorischen Zytokine (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-2) nach Stimulation mit GAD65

über die Zytokinantwort auf PP-Ins und IA-2. Die Sekretion auf PP-Ins und IA-2 blieb dort im Gegensatz zur Antwort auf GAD65 auf einem sehr niedrigen Niveau. Bei den Patienten konnte in allen drei getesteten Zellarten auf Stimulation mit GAD65 eine erhöhte Produktion des regulatorischen IL-10 gemessen werden, die auf Stimulation mit PP-Ins und IA-2 nicht festgestellt werden konnte.

Beim Vergleich der einzelnen **Zellarten** konnten ebenfalls Unterschiede festgestellt werden. Interessant ist der Aspekt, dass bei den CD45RA+ T-Zellen insgesamt die Unterschiede in den Zytokinantworten auf die drei Antigene nicht besonders deutlich wurden. Die Diskrepanzen sind in den PBMC und in den CD45RO+ T-Zellen weitaus besser sichtbar. Bei den Kontrollpersonen konnte nur in den CD45RO+ T-Zellen auf Stimulation mit PP-Ins eine wesentlich erhöhte Antwort der proinflammatorischen Zytokine gemessen werden. Bei dem Th2-Zytokin IL-5 und bei dem regulatorisch wirkenden IL-10 dominierten in den CD45RO+ und in den CD45RA+ T-Zellen die Antworten auf GAD65 über die Antworten auf PP-Ins und IA-2. Daher kann man darauf schließen, dass in den CD4+ T-Zellen GAD65 bei den Kontrollpersonen eine eher regulatorische Antwort hervorruft. PP-Ins generiert eine inflammatorische Antwort nur in den memory-Zellen der Kontrollpersonen, nicht jedoch in den PBMC und den naiv/resting-Zellen.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Der Typ 1 Diabetes (T1D) ist eine poligene Autoimmunerkrankung, die durch autoreaktive T-Helferzellen (Th-Zellen) hervorgerufen wird. Dabei kommt es zur Inflammation und Zerstörung der Insulin produzierenden Beta-Zellen im Pankreas (Insulinitis). Autoantikörper und spezifische T-Zellen werden gebildet, die gegen die drei Hauptautoantigene der Beta-Zellen, Präproinsulin (PP-Ins), Glutamat-decarboxylase 65 (GAD65) und Protein-Tyrosin-Phosphatase-2 (IA-2) gerichtet sind. Insulin und seine Prohormone PP-Ins und Proinsulin (P-Ins) nehmen als Autoantigene im T1D eine Sonderstellung ein, da sie die einzigen betazellspezifischen Antigene sind. Die anderen zwei Autoantigene, GAD65 und IA-2, werden im Laufe des Autoimmunprozesses auf pankreatischen Beta-Zellen hochreguliert, jedoch sind sie auch auf anderen neuronalen und neuroendokrinen Geweben im Körper vorhanden. Die T-Zell-Reaktivitäten gegen die drei Autoantigene sind sowohl bei Probanden mit autoimmuner Beta-Zellzerstörung, als auch bei gesunden Kontrollpersonen zu finden.

In dieser Arbeit wurden die Probanden (Kontrollpersonen, AB+ Individuen, T1D Patienten) nach dem HLA-Haplotyp DRB1\*0401, DQB1\*0302 ausgewählt. Dieser Haplotyp gilt als diabetesassoziiert, wird als Hochrisiko-Haplotyp bezeichnet. Aus den Seren der Probanden wurden periphere Blutlymphozyten (PBMC) separiert und nachfolgend aus diesen PBMC die CD45RO+ (memory) und die CD45RA+ (naiv/resting) T- Zellen isoliert. Die so gewonnenen drei Zellfraktionen wurden jeweils mit Peptiden der drei Autoantigene PP-Ins, IA-2 und GAD65 stimuliert. Anschließend erfolgte die Zytokinmessung aus den Überständen mittels ELISA. Hierbei wurde die Zytokinsekretion von sechs Zytokinen (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5 und IL-10) gemessen, wobei diese Zytokine in eine proinflammatorische Gruppe (=Th1-Zytokine: TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-2), eine Th2-Gruppe (IL-4, IL-5) und in eine immunoregulatorische Gruppe (IL-10) eingeteilt werden können. Diese gemessenen Zytokinantworten wurden daraufhin statistisch miteinander verglichen.

Es stellte sich heraus, dass bei keinem der drei Antigene und bei keiner der untersuchten Zellarten der T1D Patienten eine strikte Trennung in Th1 (diabetesassoziiert) und Th2 (protektiv) sichtbar wurde.



Im Vergleich der drei Autoantigene PP-Ins, IA-2 und GAD65 konnte festgestellt werden, dass sich die Zytokinantworten auf GAD65 auffallend oft anders darstellten als die Zytokinantworten auf PP-Ins und IA-2. Dies wurde deutlich in den Untersuchungen aller drei Personengruppen (Kontrollpersonen, AB+ Individuen, T1D Patienten). Interessant ist hierbei vor allem, dass bei den Patienten in allen drei getesteten Zellarten auf Stimulation mit GAD65 eine erhöhte Produktion des regulatorischen IL-10 gemessen wurde, die auf Stimulation mit PP-Ins und IA-2 nicht festgestellt werden konnte.

Beim Vergleich der einzelnen Zellarten konnten ebenfalls Unterschiede festgestellt werden. Auffallend ist insbesondere, dass bei den CD45RA+ T-Zellen insgesamt die Unterschiede in den Zytokinantworten auf die drei Antigene nicht besonders deutlich wurden. Die Diskrepanzen sind in den PBMC und in den CD45RO+ T-Zellen weitaus besser sichtbar.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Zytokinantworten auf GAD65 und PP-Ins in vielen Punkten wesentlich unterscheiden. Es erscheint wahrscheinlich, dass die beiden Autoantigene in der Pathogenese des T1D unterschiedliche Rollen spielen. Das Autoantigen IA-2 verhält sich ähnlich wie PP-Ins. Es können zwischen den Sekretionen auf GAD65 und IA-2 viel größere Unterschiede festgestellt werden als zwischen IA-2 und PP-Ins.

Die vorliegende Arbeit unterstreicht die Wichtigkeit der drei Autoantigene PP-Ins, IA-2 und GAD65 für das Verständnis der multifaktoriellen Pathogenese des T1D. Dennoch bedarf es in Zukunft noch weiterführender Untersuchungen, um ein detaillierteres Verständnis über die Rolle der Autoantigene und der Zytokinmuster zu erlangen.

## **VI. Literaturverzeichnis**

1. Abbas, A. K., Murphy, K. M., Sher, A.: Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793 (1996).
2. Altobelli, E., Chiarelli, F., Valenti, M., Verrotti, A., Blasetti, A., Di Orio, F.: Family history and risk of insulin-dependent diabetes mellitus: a population-based case-control study. *Acta Diabetol* 35, 57-60 (1998).
3. Anjos, S., Polychronakos, C.: Mechanisms of genetic susceptibility to type 1 diabetes: beyond HLA. *Molecular Genetics and Metabolism* 81, 187-195 (2004).
4. Arif, S., Tree, T. I., Astill, T. P., Tremble, J. M., Bishop, A. J., Dayan, C. M., Roep, B. O., Peakman, M.: Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. *J. Clin. Invest.* 113, 451-463 (2004).
5. Atkinson, M. A., Kaufman, D. L., Newman, D., Tobin, A. J., MacLaren, N. K.: Islet cell cytoplasmatic autoantibody reactivity to glutamat decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 91, 350-356 (1993).
6. Barker, J. M., Barriga, K. J., Yu, L., Miao, D., Erlich, H. A., Norris, J. M., Eisenbarth, G. S., Rewers, M.: Prediction of Autoantibody Positivity and Progression to Type 1 Diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *J Clin Endocrinol Metab* 89, 3896-3902 (2004).
7. Becker, D. J., LaPorte, R. E., Libman, I., Pietropaolo, M., Dosch, H.-M.: Prevention of type 1 diabetes: is now the time? *J Clin Endocrinol Metab* 85, 498-506 (1999).
8. Benett, S. T., Wilson, A. J., Cucca, F., Nerup, J., Pociot, F., McKinney, P. A., Barnett, A. H., Bain, S. C., Todd, J. A.: IDDM2-VNTR-encoded Susceptibility to Type 1 Diabetes: Dominant Protection and Parental Transmission of Alleles of the Insulin Gene-linked Minisatellite Locus. *Journal of Autoimmunity* 9, 415-421 (1996).
9. Bingley, P.J., Bonifacio, E., Gale, E. A.: Can we really predict IDDM?. *Diabetes* 42, 213-220 (1993).
10. Bingley, P. J., Bonifacio, E., Williams, A. J., Genovese, S., Bottazzo, G. F., Gale, E. A.: Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes* 46, 1701-1710 (1997).

11. Blu, D.-F., Erlander, M. G., Hitz, B. C.: Two human glutamate decarboxylases, 65-kD GAD and 67-kD GAD, are each encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 2115-2119 (1992).
12. Bonifacio, E., Bingley, P. J., Shattock, M., Dean, B. M., Dunger, D., Gale, E. A., Bottazzo, G. F.: Quantification of islet-cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 335, 147-149 (1990).
13. Chang, Y.-H., Shiau, M.-Y., Tsai, S.-T., Lan, M. S. : Autoantibodies against IA-2 , GAD, and topoisomerase II in type 1 diabetic patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320, 802-809 (2004).
14. Colman, P. G., McNair, P. D., Gellert, S., Kewming, K., Schmidli, R. S., Steele, C. E., Harrison, L. C.: Development of autoantibodies to islet antigens during childhood: implications for preclinical type 1 diabetes screening. *Pediatr Diabetes* 3, 144-148 (2002).
15. Cox, N. J., Wapelhorst, B., Morrison, V. A.: Seven regions of the genome show evidence of linkage to type 1 diabetes in a consensus analysis of 767 multiplex families. *Am J Hum Genet* 69, 820-830 (2001).
16. Davies, J. L., Kawaguchi, Y., Bennett, S. T., Copeman, J. B., Cordell, H. J., Pritchard, L. E., Reed, P. W., Gough, S. C. L., Jenkins, S. C., Palmer, S. M., Balfour, K. M., Rowe, B., Farall, M., Barnett, A. H., Bain, S. C., Todd, J. A.: A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* 371, 130-136 (1994).
17. Durinovic-Bello, I.: Autoimmune Diabetes: The role of T cells, MHC Molecules and Autoantigens. *Autoimmunity* 27, 159-177 (1997).
18. Durinovic-Bello, I., Riedl, M., Rosinger, S. Maisel, N., Kalbacher, H., Deeg, M., Schreckling H. J., Schlosser M., Ziegler, M., Kuehnl, P., Boehm, B. O.: 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).
19. Durinovic-Bello, I., Schlosser, M., Riedl, M., Maisel, N., Rosinger, S., Kalbacher, H., Deeg, M., Ziegler, M., Elliott, J., Roep, B. O., Karges, W., Boehm, B. O.: Pro- and anti-inflammatory cytokine production by autoimmune T cells against preproinsulin in HLA-DRB1\*04, DQ8 Type 1 diabetes. *Diabetologia* 47, 439-450 (2004).
20. Eerligh, P., Koeleman, B. P. C., Dudbridge, F., Bruining, G. J., Roep, B. O., Giphart, M. J.: Functional genetic polymorphisms in cytokines and metabolic

- genes as additional genetic markers for susceptibility to develop type 1 diabetes. *Genes and Immunity* 5, 36-40 (2003).
21. Eisenbarth S. C.: Primer Immunology and Autoimmunity. In: Eisenbarth, G. S. (Hrsg.): *Type 1 Diabetes: Molecular, Cellular, and Clinical Immunology*. (S. 2-4, 2004).
22. Endl, J., Otto, H., Jung, G., Dreisbusch, B., Donie, F., Stahl, P., Elbracht, R., Schmitz, G., Meinel, E., Hummel, M.: Identification of naturally processed T cell epitopes from glutamic acid decarboxylase presented in the context of HLA-DR alleles by lymphocytes of recent onset IDDM patients. *J Clin Invest* 99, 2405-2415 (1997).
23. Engelhard, V. H.: Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annual Review of Immunology* 12, 181-207 (1994).
24. Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T. R., Howard, M., Moore, K. W., O'Garra, A. O.: IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146, 3444-3451 (1991).
25. Foulis, A. K., Liddle, C. N., Farquharson, M. A., Richmond, J. A., Weir, R. S.: The histopathology of the pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia* 29, 267-274 (1986).
26. Fox, C. J., Danska, J. S.: IL-4 expression at the onset of islet inflammation predicts nondestructive insulinitis in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 158, 2414-2415 (1997).
27. Gagnerault, M.C., Luan, J. J., Lotton, C., Lepault, F.: Pancreatic Lymph Nodes Are Required for Priming of  $\beta$  Cell Reactive T Cells in NOD Mice. *J Exp Med* 196, 369-377 (2002).
28. Gale, E. A.: Theory and practice of nicotinamide trials in pre-type 1 diabetes. *J Pediatr Endocrinol Metab* 9, 375-379 (1996).
29. Gale, E. A.: The discovery of type 1 diabetes. *Diabetes* 50, 217-226 (2001).
30. Gale, E. A.: European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT): a randomised controlled trial of intervention before the onset of type 1 diabetes. *Lancet* 363, 925-931 (2004).
31. Galucci, S., Matzinger, P.: Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 13, 114-119 (2001).

32. Garza, K. M., Chan, V. S., Ohashi, P. S.: T cell tolerance and autoimmunity. *Rev Immunogenet* 2, 2-17 (2000).
33. Gorsuch, A. N., Spencer, K. M., Lister, J., McNally, J. M., Dean, B. M., Bottazzo, G. F., Cudworth, A. G.: Evidence for a long prediabetic period in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Lancet* 2, 1363-1365 (1981).
34. Gorsuch, A. N., Spencer, K. M., Lister, J., Wolf, E., Bottazzo, G. F., Cudworth, A. G.: Can future type I diabetes be predicted? A study in families of affected children. *Diabetes* 31, 862-866 (1982).
35. Gyseman, C. A., Cardozo, A. K., Giulietti, A., Hulshagen, L., Bouillon, R., Eizirik, D. L., Mathieu, C.: 1,25- Dihydroxyvitamin D3 modulates expression of chemokines and cytokines in pancreatic islets: implications for prevention of diabetes in NOD mice. *Endocrinology*, Jan 2005 (Publikation in Vorbereitung).
36. Hagopian, W. A., Sanjeevi, C. B., Kockum, I., Landin-Olssen, M., Karlsen, A. E., Sundkvist, G., Dahlquist, G., Palmer, J., Lernmark, A.: Glutamate decarboxylase-, insulin-, and islet cell- antibodies and HLA typing to detect diabetes in a general population-based study of Swedish children. *J Clin Invest* 95, 1505-1511 (1995).
37. Hanifi-Moghaddam, P., Schloot, N. C., Kappler, S., Seißler, J., Kolb, H.: An Association of Autoantibody Status and Serum Cytokine Levels in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 52, 1137-1142 (2003).
38. Hien, P., Böhm, B.: *Diabetes-Handbuch*, 4. Aufl. Springer Verlag 2005.
39. Hoeldtke, R. D., Bryner, K. D., Hobbs, G. R., Horvath, G. G., Riggs, J. E., Christie, I., Ganser, G., Marcinova, S. M., Lernmark, A.: Antibodies to glutamic acid decarboxylase and peripheral nerve function in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 297-308 (2000).
40. Holmberg, H., Vaarala, O., Falth-Magnusson, K., Ludvigsson, J.: Induction of diabetes-related autoantibodies below cutoff for "positivity" in young nondiabetic children. *Ann N Y Acad Sci* 1005, 269-274 (2003).
41. Hummel, M., Schenker, M., Fuchtenbusch, M., Ziegler, A.-G.: No Major Association of Breast-Feeding, Vaccinations, and Childhood Viral Diseases With Early Islet Autoimmunity in the German BABYDIAB Study. *Diabetes Care* 23, 969-974 (2000).
42. Hummel, M., Bonifacio, E., Schmid, S., Walter, M., Knopff, A., Ziegler, A. G.: Brief communication: early appearance of islet autoantibodies predicts

- childhood type 1 diabetes in offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med* 140, 164 (2004).
43. Jun, H. S., Yoon, J. W.: The role of viruses in type 1 diabetes: two distinct cellular and molecular pathogenic mechanisms of virus-induced diabetes in animals. *Diabetologia* 44, 271-285 (2001).
44. Karges, W., Pechhold, K., Al Dahouk, S., Riegger, I., Rief, M., Wissmann, A., Schirmbeck, R., Barth, C., Boehm, B. O.: Induction of Autoimmune Diabetes Through Insulin (but Not GAD65) DNA Vaccination in Nonobese Diabetic and in RIP-B7.1 Mice. *Diabetes* 51, 3237-3244 (2002).
45. Karlsen, A. E., Hagopian, W. A., Petersen, J. S.: Cloning and primary structure of a human islet isoform of glutamic acid decarboxylase from chromosome 10. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 8337-8341 (1991).
46. Karlsson, M.G., Lawesson, S.S., Ludvigsson, J.: Th1-like dominance in high-risk first-degree relatives of type I diabetic patients. *Diabetologia* 43, 742-749 (2000).
47. Karlsson, F. M. G., Ernerudh, J., Ludvigsson, J.: Cytokine profile in children during the first three months after the diagnosis of type 1 diabetes. *Scand J Immunol* 59, 517-526 (2004).
48. Karvonen, M., Tuomilehto, J., Libman, I., LaPorte, R., WHO DIAMOND project group: A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 36, 883-892 (1993).
49. Karvonen, M., Viik-Kajander, M., Moltchanova, E., Libman, I., LaPorte, R., Tuomilehto, J.: Incidence of childhood type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Care* 23, 1516-1526 (2000).
50. Kimpimaki, T., Erkkola, M., Korhonen, S., Kupila, A., Virtanen, S. M., Ilonen, J., Simell, O., Knip, M.: Short-term exclusive breastfeeding predisposes young children with increased genetic risk of type 1 diabetes to progressive beta-cell autoimmunity. *Diabetologia* 44, 63-69 (2001)
51. Kolb, H., Burkhart, V.: Nicotinamide in type 1 diabetes: mechanism of action revisited. *Diabetes Care* 22, B16-B20 (1999).
52. Lambert, A. P., Gillespie, K. M., Thomson, G., Cordell, H. J., Todd, A. J., Gale, E. A. M., Bingley, P. J.: Absolute Risk of Childhood-Onset Type 1 Diabetes

- Defined by Human Leukocyte Antigen Class II Genotype: A Population-Based Study in the United Kingdom. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 4037-4043 (2004).
53. Lan, M. S., Lu, J., Goto, Y., Notkins, A. L. : Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma. *DNA and Cell Biology* 13, 505-514 (1994).
54. Lendrum, R., Walker, G., Cudworth, A. G., Theophanides, C., Pyke, D. A., Bloom, A., Gamble, D. R.: Islet-cell antibodies in diabetes mellitus. *Lancet* 2, 1273-1276 (1976).
55. Leslie, R. D. G., Atkinson, M. A., Notkins, A. L.: Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 42, 3-14 (1999).
56. Matzinger P.: Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12, 991-1045 (1994).
57. Mosmann, T.R., Sad, S.: The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17, 138-146 (1996).
58. Mosmann, T.R., Coffman, R.L.: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-173 (1989).
59. Murray, J. S., Madri, J., Tite, J., Carding, S. R., Bottomly, K.: MHC control of CD4+ T cell subset activation. *J Exp Med* 170, 2135-2140 (1989).
60. Peakman, M., Stevens, E. J., Lohmann, T., Narendran, P., Dromei, J., Alexander, A., Tomlinson, A. J., Trucco, M., Gorga, J. C., Chicz, R. M.: Natural processed and presented epitopes of the islet cell autoantigen IA-2 identified by mass spectrometric analysis of peptides eluted from antigen presenting cells bearing HLA-DR4. *J Clin Invest* 104, 1449-1457 (1999).
61. Peakman, M., Tree, T. I., Endl, J., van Endert, P., Atkinson, M. A., Roep, B. O.: Characterization of Preparations of GAD65, Proinsulin, and the Islet Tyrosine Phosphatase IA-2 for Use in Detection of Autoreactive T-Cells in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 50, 1749-1754 (2001).
62. Pennline, K. J., Roquegaffney, E., Monahan, M.: Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mouse. *Clin Immunol Immunopathol* 71, 169-175 (1994).
63. Petersen, L.D., van der Keur, M., de Vries, R.R., Roep, B.O.: Autoreactive and immunoregulatory T-cell subsets in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 42, 443-449 (1999).

64. Rabinovitch A.: Roles of cytokines in IDDM pathogenesis and islet beta-cell destruction. *Diabetes Rev* 1, 215-240 (1993).
65. Rammensee, H. C., Friede, T., Stevanovic, S.: MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41, 178-228 (1995).
66. Roncarolo, M. G., Levings, K. M.: The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 12, 676-683 (2000).
67. Rosenbloom, A. L., Schatz, D. A., Krischer, J. P., Skyler, J. S., Becker, D. J., LaPorte, R. E., Libman, I., Pietropaolo, M., Dosch, H.-M., Finberg, L., Muir, A., Tamborlane, W. V., Grey, M., Silverstein, J. H., Malone, J. I.: THERAPEUTIC CONTROVERSY: Prevention and Treatment of Diabetes in Children. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 494-522 (2000).
68. Rufer, N., Helg, C., Chapuis, B., Roosnek, E.: Human memory T cells: lessons from stem cell transplantation. *Trends Immunol* 22, 136-141 (2001).
69. Sallusto, F., Lenig, D., Nurbury-Glaser, M., Wegmann, D. R.: Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-712 (1999).
70. Schatz, D., Krischer, J., Horne, G.: 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).
71. Scherbaum, W. A., Youniou, W., Tater, D., Jouquan, J., Pujol-Borell, R., Bercovici, J. P., Bottazzo, G. F.: Polyendocrinopathies autoimmunes Hypotheses pathogeniques. *Annales D'Endocrinologie Paris* 47, 420-428 (1986).
72. Schloot, N. C., Hanifi-Moghaddam P., Goebel, C., Shatavi, S. V., Flohe, S., Kolb, H., Rothe, H.: Serum IFN-gamma and IL-10 levels are associated with disease progression in non-obese diabetic mice. *Diabetes Metab Res Rev* 18, 64-70 (2002).
73. Schlosser, M., Wassmuth, R., Strebelow, M., Rjasanowski, I., Ziegler, M.: Multiple and high-titer single autoantibodies in schoolchildren reflecting the genetic predisposition for type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1005, 98-108 (2003).
74. Seder, R. A., Paul, W. E.: Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 12, 635-673 (1994).



75. Strebelow, M., Schlosser, M., Ziegler, B., Rjasanowski, I., Ziegler, M.: Karlsburg Type I diabetes risk study of general population: frequencies and interactions of the four major Type I diabetes-associated autoantibodies studied in 9419 schoolchildren. *Diabetologia* 42, 661-670 (1999).
76. Tabor, H.K., Risch, N.J., Myers, R.M.: Opinion: candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet* 3, 391-397 (2002).
77. Tarbell, K. V., Lee, M., Ranheim, E., Chao, C. C., Sanna, M., Kim, S. K., Dickie, P., Teyton, L., Davies, M., McDevitt, H.: CD4(+) T cells from glutamic acid decarboxylase (GAD)65-specific T cell receptor transgenic mice are not diabetogenic and can delay diabetes transfer. *J Exp Med* 196, 481-492 (2002).
78. Tarn, A. C., Thomas, J. M., Dean, B. M., Ingram, D., Schwarz, G., Bottazzo, G. F., Gale, E. A.: Predicting insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1, 845-850 (1988).
79. Theze, J., Alzari, P. M., Bertoglio, J.: Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. *Immunol Today* 17, 481-486 (1996).
80. Tian, J., Chau, C., Kaufman, D. L.: Insulin selectively primes Th2 responses and induces regulatory tolerance to insulin in pre-diabetic mice. *Diabetologia* 41, 237-240 (1998).
81. Tisch, R., Wang, B., Atkinson, M. A., Serreze, D. V., Randall, F.: A Glutamic Acid Decarboxylase 65-Specific Th2 Cell Clone Immunoregulates Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *J Immunol* 166, 6925-6936 (2001).
82. Vasalli, P.: The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 10, 411-412 (1992).
83. Walter, M., Albert, E., Conrad, M., Keller, E., Hummel, M., Ferber, K., Barratt, B. J., Todd, J. A., Ziegler, A.-G., Bonifacio, E.: IDDM2/insulin VNTR modifies risk conferred by IDDM1/HLA for development of Type 1 diabetes and associated autoimmunity. *Diabetologia* 46, 712-720 (2003).
84. Wang, B., Andre, I., Gonzalez, A., Katz, J. D., Aguet, M., Benoist, C., Mathis, D.: Interferon- $\gamma$  impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 13844-13849 (1997).

85. Wang, B., Gonzalez, A., Höglund, P., Katz, J. D., Benoist, C., Mathis, D.: Interleukin-4 Deficiency Does Not Exacerbate Disease in NOD Mice. *Diabetes* 47, 1207-1211 (1998).
86. Weaver, D. J., Jr., Liu, B., Tisch, R.: Plasmid dnas encoding insulin and glutamic acid decarboxylase 65 have distinct effects on the progression of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 167, 586-592 (2001).
87. Wen, L., Wong, F.S., Tang, J., Chen, N.Y., Altieri, M., David, C. S., 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).
88. Wong, F. S., Wen, L.: The study of HLA class II and autoimmune diabetes. *Curr Mol Med* 3, 1-15 (2003).
89. Xie, H., Notkins, A. L., Lan, M. S.: IA-2, a transmembrane protein tyrosine phosphatase, is expressed in human lung cancer cell lines with neuroendocrine phenotype. *Cancer Res* 56, 2742-2744 (1996).
90. Zhang, I., Davidson, L., Eisenbarth, G.: Suppression of diabetes in non-obese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 10252-10256 (1991).
91. Ziegler, A.G.: Was ist und wie entsteht ein Typ1-Diabetes?. *Diabetes heute*, 15-18 (2000)
92. Ziegler, A. G., Schmid, S., Huber, D., Hummel, M., Bonifacio, E.: Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes- associated autoantibodies. *JAMA* 290, 1771-1772 (2003).
93. Zinkernagel, R. M.: Immunology taught by viruses. *Science* 271, 173-178 (1996).

## **Danksagung**

Meinen herzlichen Dank spreche ich vor allem Herrn Professor Dr. med. B. O. Böhm, Leiter der Sektion Endokrinologie, Abteilung Innere Medizin I der Universität Ulm, für seine Unterstützung bei dieser Arbeit in jeglicher Hinsicht aus.

Herrn Dr. Endl danke ich für die Überlassung der GAD65-Peptide, Herrn Dr. Kalbacher für die Überlassung der IA-2- und PP-Ins-Peptide und die Resynthesierungen, Herrn Dr. Schlosser für die Bestimmungen der Antikörpertiter; Cornelia, Martina und Aniela für Ihre wertvollen Vorarbeiten, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Christina Ring, Abteilung Biometrie und Medizinische Dokumentation der Universität Ulm, für Ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

An dieser Stelle möchte ich auch Silvia, Jutta und insbesondere Tina Jooß für Ihre Hilfsbereitschaft und für die hilfreichen Ratschläge danken.

Auch Rainer danke ich ganz herzlich für seine großartige Hilfe bei der Beantwortung der computertechnischen Fragen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und Tobias, die mich mit Ihrem grenzenlosen Optimismus immer wieder unterstützt haben und ohne die ich nicht so weit gekommen wäre.

## Lebenslauf

- Name:** Julia Christina Plomin
- Geboren am:** 17. Mai 1980
- Geburtsort:** Friedrichshafen am Bodensee
- Schulbildung:** 1986 - 1990 Grundschule Fischbach  
1990 - 1997 Karl-Maybach Gymnasium Friedrichshafen  
1997 - 1999 Graf- Zeppelin-Gymnasium Friedrichshafen
- Studium:** WS 1999/2000 - SS 2000 Studium der  
Rechtswissenschaften an der Universität Konstanz  
WS 2000/2001 - SS 2003 Studium der Zahnmedizin an der  
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau  
Seit WS 2003 Studium der Zahnmedizin an der Universität  
Ulm
- Abschlüsse:** 1999 Abitur ( Französisch, Geschichte, Mathematik,  
Religion)  
September 2001: Naturwissenschaftliche Vorprüfung  
April 2003: Zahnärztliche Vorprüfung  
Staatsexamen voraussichtlich im Dezember 2005