

**LYMPHOPROLIFERATION UND ANTIGENSPEZIFITÄT VON
LYMPHOZYTEN FRISCH MANIFESTIERTER TYP I
DIABETIKER GEGEN DIE PROTEINE BOVINES SERUM
ALBUMIN UND β -CASEIN SOWIE INSULIN**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
im Fachbereich Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Vorgelegt von Stephan Quinkenstein
aus Köln

Gießen, 2002

**LYMPHOPROLIFERATION UND ANTIGENSPEZIFITÄT VON
LYMPHOZYTEN FRISCH MANIFESTIERTER TYP I DIABETIKER GEGEN
DIE PROTEINE BOVINES SERUM ALBUMIN UND β -CASEIN SOWIE
INSULIN**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
im Fachbereich Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Stephan Quinkenstein
aus Köln

Gießen, 2002

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik III und Poliklinik
des Universitätsklinikums Gießen

Leiter :
Prof. Dr. R.G. Bretzel

Gutachter : Prof. em. Dr. Drs. h. c. Konrad Federlin

Gutachter : Prof. Dr. H. Pralle

Datum der Disputation : 01.07.2003

Inhaltsverzeichnis

- 1 Einführung
- 1.1 Definition und Unterteilung des Diabetes mellitus
- 1.2 Ätiologie des Typ I Diabetes mellitus
 - 1.2.1 Vererbung des Typ I Diabetes mellitus
 - 1.2.2 Umwelteinflüsse
 - 1.2.2.1 Geographische Einflüsse
 - 1.2.2.2 Jahreszeitliche Einflüsse
 - 1.2.2.3 Virale Einflüsse
 - 1.2.2.4 Ernährung als Einflußfaktor
 - 1.2.2.5 Lebensgewohnheiten als Einflußfaktor
- 1.3 Pathogenese des Typ I Diabetes mellitus
 - 1.3.1 Histologie der Langerhans´schen Inseln beim Typ I Diabetes
 - 1.3.2 Untersuchungen zur Insulitis
 - 1.3.3 Auto – Antikörper und Typ I Diabetes mellitus
 - 1.3.4 Lymphozyten und Typ I Diabetes mellitus
- 1.4 Ziel der Arbeit
- 2 Material
 - 2.1 Humane Lymphozyten und autologe Seren
 - 2.2 Geräte
 - 2.3 Reagenzien

- 2.4 Lösungen und Medien
 - 2.4.1 Gewinnung peripherer, humaner Lymphozyten
 - 2.4.2 Auszählung und Überprüfung der Vitalität der Lymphozyten
 - 2.4.3 T- Zelllinien- Bildung und Lymphozytenproliferationstest :
Herstellung der Antigen- und Lektin- Lösungen
- 3 Methoden
 - 3.1 Isolierung humaner, peripherer Lymphozyten
 - 3.2 Auszählung und Überprüfung der Vitalität der Lymphozyten
 - 3.3 Gewinnung von Humanserum
 - 3.4 Herstellung eines Serumpools
 - 3.5 Die gemischte Lymphozytenkultur zur Überprüfung des gesammelten Serums auf Zytotoxizität
 - 3.6 Kryokonservierung von Lymphozyten
 - 3.7 Auftauvorgang der Lymphozyten nach der Kryokonservierung
 - 3.8 Bildung antigenspezifischer T-Zelllinien
 - 3.9 Test auf antigenspezifische Proliferation von T-Zelllinien
- 4 Ergebnisse
 - 4.1 Altersverteilung der Gruppen
 - 4.2 Geschlechtsverteilung der Gruppen
 - 4.3 Inselzell- Antikörper- Bestimmung
 - 4.4 Lymphozytenzahlen
 - 4.5 Kultivierung der isolierten Lymphozyten
 - 4.6 Zellwachstum

- 4.7 Die gemischte Lymphozytenkultur
- 4.7.1 Ergebnisse der Lymphozytentransformationsteste zur Gewinnung eines humanen Serumpools
- 4.8 Ergebnisse der Untersuchung einer spezifischen Proliferation auf Tetanol
- 4.8.1 Proliferative Antwort auf Tetanol 1% als Antigen, dargestellt in counts per minute (cpm)
- 4.8.2 Statistische Auswertung der cpm
- 4.8.3 Vergleich der Proliferationsindizes auf Tetanol als spezifisches Antigen
- 4.8.4 Statistische Auswertung der Proliferationsindizes
- 4.8.5 Prozentuale Auswertung der positiven Proliferationsindizes
- 4.8.6 Proliferative Antwort der Zelllinien in Abhängigkeit des ICA-Titers
- 4.9 Ergebnisse der Untersuchung einer spezifischen Proliferation auf Bovines Serum Albumin (BSA) in einer Konzentration von 100µg/ml
- 4.9.1 Proliferative Antwort auf BSA 100 µg/ml als Antigen, dargestellt in counts per minute (cpm)
- 4.9.2 Statistische Auswertung der cpm
- 4.9.3 Vergleich der Proliferationsindizes auf BSA 100 µg/ml als spezifisches Antigen
- 4.9.4 Statistische Auswertung der Proliferationsindizes
- 4.9.5 Prozentuale Auswertung der positiven Proliferationsindizes
- 4.9.6 Proliferative Antwort der Zelllinien in Abhängigkeit des ICA- Titers
- 4.10 Ergebnisse der Untersuchung einer spezifischen Proliferation auf Bovines Serum Albumin (BSA) in einer Konzentration von 25 µg/ml

- 4.10.1 Proliferative Antwort auf BSA 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ als Antigen, dargestellt in counts per minute (cpm)
- 4.10.2 Statistische Auswertung der cpm
- 4.10.3 Vergleich der Proliferationsindizes auf BSA 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ als spezifisches Antigen
- 4.10.4 Statistische Auswertung der Proliferationsindizes
- 4.10.5 Prozentuale Auswertung der positiven Proliferationsindizes
- 4.10.6 Proliferative Antwort der Zelllinien in Abhängigkeit des ICA- Titers
- 4.10.7 Vergleich der Proliferationsantworten auf die Antigenkonzentrationen BSA 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und BSA 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 4.11 Ergebnisse der Untersuchung einer spezifischen Proliferation auf Casein in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 4.11.1 Proliferative Antwort auf Casein 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ als Antigen, dargestellt in counts per minute (cpm)
- 4.11.2 Statistische Auswertung der cpm
- 4.11.3 Vergleich der Proliferationsindizes auf Casein 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ als spezifisches Antigen
- 4.11.4 Statistische Auswertung der Proliferationsindizes
- 4.11.5 Prozentuale Auswertung der positiven Proliferationsindizes
- 4.11.6 Proliferative Antwort der Zelllinien in Abhängigkeit des ICA- Titers
- 4.12 Ergebnisse der Untersuchung einer spezifischen Proliferation Casein in einer Konzentration von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 4.12.1 Proliferative Antwort auf Casein 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ als Antigen, dargestellt in counts per minute (cpm)
- 4.12.2 Statistische Auswertung der cpm

- 4.12.3 Vergleich der Proliferationsindizes auf Casein 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ als spezifisches Antigen
- 4.12.4 Statistische Auswertung der Proliferationsindizes
- 4.12.5 Prozentuale Auswertung der positiven Proliferationsindizes
- 4.12.6 Proliferative Antwort der Zelllinien in Abhängigkeit des ICA-Titers
- 4.12.7 Vergleich der Proliferationsantworten auf die Antigenkonzentrationen Casein 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und Casein 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 4.13 Ergebnisse der Untersuchung einer spezifischen Proliferation auf Insulin in einer Konzentration von 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 4.13.1 Proliferative Antwort auf Insulin 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ als Antigen, dargestellt in counts per minute (cpm)
- 4.13.2 Statistische Auswertung der cpm
- 4.13.3 Vergleich der Proliferationsindizes auf Insulin 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ als spezifisches Antigen
- 4.13.4 Statistische Auswertung der Proliferationsindizes
- 4.13.5 Prozentuale Auswertung der positiven Proliferationsindizes
- 4.13.6 Proliferative Antwort der Zelllinien in Abhängigkeit des ICA- Titers
- 4.14 Ergebnisse der Untersuchung einer spezifischen Proliferation auf Insulin in einer Konzentration von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 4.14.1 Proliferative Antwort auf Insulin 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ als Antigen, dargestellt in counts per minute (cpm);
- 4.14.2 Statistische Auswertung der cpm
- 4.14.3 Vergleich der Proliferationsindizes auf Insulin 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ als spezifisches Antigen
- 4.14.4 Statistische Auswertung der Proliferationsindizes

- 4.14.5 Prozentuale Auswertung der positiven Proliferationsindizes
- 4.14.6 Proliferative Antwort der Zelllinien in Abhängigkeit des ICA-Titers
- 4.14.7 Vergleich der Proliferationsantworten auf die Antigenkonzentrationen
Insulin 250 µg/ml und Insulin 25 µg/ml
- 5 Diskussion
 - 5.1 Auswahl der Testpersonen
 - 5.2 Alter der Testpersonen
 - 5.3 Geschlechtsverteilung in der Gruppen
 - 5.4 Antikörper- Bestimmungen
 - 5.5 Periphere mononukleäre Zellen des Blutes
 - 5.6 Antigen spezifische T-Zellreaktivität
 - 5.7 Lyphozytenproliferationstest
 - 5.8 Spezifische T-Zellproliferation auf Tetanol
 - 5.9 Spezifische T-Zellproliferation auf Bovines Serum Albumin
 - 5.10 Spezifische T-Zellproliferation auf Casein
 - 5.11 Spezifische T-Zellproliferation auf Insulin
- 6 Zusammenfassung
- 7 Literatur
- 8 Abkürzungsverzeichnis

1 EINFÜHRUNG

1.1 DEFINITION UND UNTERTEILUNG DES DIABETES MELLITUS

Der Diabetes mellitus zeichnet sich aus durch einen relativen oder absoluten Insulinmangel.

Insulin wird in den β - Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas gebildet. Es reguliert die Verteilung und Aufnahme der mit der Nahrung zugeführten Glucose in die Energiedepots. Bei Insulinmangel fehlt die zelluläre Aufnahme der Glucose und ihre Speicherung in der Leber, die Speicherung von Fettsäuren im Fettgewebe und die Aufnahme und Speicherung von Aminosäuren in Proteinen.

Die Symptome dieser Stoffwechsellentgleisung sind Müdigkeit und Schwächegefühl, Gewichtsabnahme, Polyurie und Polydypsie sowie Ketoazidose bis hin zum ketoazidotischen Koma.

Man unterscheidet den primären oder idiopathischen Diabetes mellitus von dem Sekundären; letzterer tritt als Folge anderer Erkrankungen, z.B. bei Funktionsausfall des Pankreas, auf.

Der idiopathische Diabetes mellitus wird unterteilt in den insulinabhängigen Typ I sowie den primär nicht-insulinabhängigen Typ II. In mehr als 80% der Fälle liegt der Typ II vor, seine Prävalenz beträgt in Mitteleuropa etwa 4% (Siegenthaler et al., 1992). Als Ursachen für die Glucoseintoleranz des Typ II Diabetes, dessen Inzidenz mit dem Alter steigt, werden eine Störung der Regulation der Insulinsekretion der β -Zelle, und weiterhin, vor allem bei übergewichtigen Patienten, eine periphere Insulinresistenz beobachtet. Zwillingsuntersuchungen lassen auf eine genetische Prädisposition für den Typ II Diabetes schließen, da in 90% der Fälle beide Geschwister an Typ II Diabetes erkranken, wobei diese Disposition nicht HLA assoziiert ist (Claasen et al., 1993).

Die Therapie des Diabetes mellitus Typ II besteht in erster Linie aus dem Versuch der diätetischen Blutzuckerregulation, an zweiter Stelle steht die medikamentöse Therapie mit Sulfonylharnstoffen, Biguaniden sowie resorptionsverzögernden Substanzen. Bei Versagen dieser Maßnahmen kann auch die Gabe von Insulin notwendig werden.

Der Typ I Diabetes manifestiert sich vornehmlich im jugendlichen Alter, wobei die Geschlechter zu gleichen Teilen betroffen sind. In zunehmendem Maße wird er jedoch auch bei älteren Patienten diagnostiziert. Seine Prävalenz beträgt in Mitteleuropa etwa 0,3% (Claasen et al., 1993). 1998 gab es in Deutschland nach Schätzungen des Statistischen Bundesamtes 190000 – 260000 Typ 1 Diabetiker.

Pathogenetisch beobachtet man den immun-medierten Untergang der insulinproduzierenden β -Zellen in den Langerhans Inseln des Pankreas, der zum totalen Insulinmangel führt.

Die Standardtherapie besteht in der lebenslangen Substitution einer individuellen Tagesdosis von Insulin nach verschiedenen Therapiekonzepten.

Die Lebenserwartung von Typ I Diabetikern ist trotz optimaler Stoffwechseleinstellung um etwa ein Drittel gegenüber Normalpersonen verkürzt (WHO Report, 1985). Bestimmend für die Prognose ist das Ausmaß der durch Mikroangiopathie hervorgerufenen diabetischen Nephropathie, die bereits nach 10 Jahren durch Proteinurie und Hypertonie klinisch manifest werden kann.

Die Pathogenese der Mikroangiopathie ist noch nicht bis ins Detail geklärt; es scheint aber durch die erhöhten Blutzuckerspiegel zu nicht-enzymatischen Glykosilierungsreaktionen an den Gefäßwänden sowie zu Strukturproteinveränderungen und zu Vernetzungsstörungen an den kollagenen Grundstrukturen zu kommen. Diese Veränderungen führen zu einer Verdickung der Basalmembran und einer vermehrten kapillären Durchlässigkeit. Die diabetische Nephropathie verläuft in mehreren Stadien, die Jahre bis Jahrzehnte andauern können, ehe es zur klinischen Manifestation mit Proteinurie, Hypertonie und Verminderung der glomerulären Filtrationsrate kommt. Die Progression des

Prozesses zur terminalen Niereninsuffizienz läßt sich jetzt durch optimale Blutzucker- und Blutdruckeinstellung nur noch verzögern, jedoch nicht verhindern ! So ist die diabetische Nephropathie die häufigste Todesursache von Typ 1 Diabetikern !

Weitere Manifestationen der Mikroangiopathie sind die diabetische Retinopathie, die schließlich zur Erblindung führt (häufigste Erblindungsursache!), sowie die diabetische Polyneuropathie des peripheren als auch des autonomen Nervensystems mit zahlreichen Manifestationen wie distal peripheren Parästhesien („burning feet“), Areflexie, Kardioneuropathie mit Herzrhythmusstörungen, Gastroparese, Ösophagusmotilitätsstörungen, Impotenz und Blasenentleerungsstörungen .

Eine weitere Komplikation des Diabetes mellitus stellt die Makroangiopathie dar, die weitgehend der Arteriosklerose des Nichtdiabetikers entspricht, die aber früher auftritt und schneller und schwerer verläuft. Die Manifestationen der Makroangiopathie sind die Koronare Herzerkrankung, die cerebrale Gefäßsklerose sowie die periphere arterielle Verschlusskrankheit mit erhöhtem Risiko für Herzinfarkt, cerebralen Insult sowie peripheren Gefäßverschluss.

Nicht außer Acht zu lassen sind auch die direkten Folgen der Insulinpflicht, die zwar zunächst den Tod verhindert, aber doch eine Einschränkung der Lebensqualität bedeutet, selbst bei der intensivierten Therapie oder der Substitution durch Pumpensysteme. Desweiteren kann die Erkrankung schließlich auch zum Verlust des Arbeitsplatzes führen.

Ein weiterer Aspekt, der die Wichtigkeit weiterer Forschung mit dem Ziel der Prävention des Typ 1 Diabetes unterstreicht, sind die sozioökonomischen Auswirkungen. So schätzte die American Diabetes Association (ADA) 1997 die direkt und indirekt durch Diabetes hervorgerufenen Kosten in den USA auf 98,2 Mrd. US-Dollar !

Neuere Therapieansätze sind die Pankreastransplantation (Robertson et al., 1991) sowie die Transplantation von Inselzellen, wobei letzteres die geeignetere Option zu sein scheint. Die Idee, das nicht mehr funktionsfähige Gewebe durch

funktionierendes zu ersetzen ist schon über 100 Jahre alt. Williams implantiert 1893 Teile eines Schafpancreas in das Subcutangewebe eines Patienten. Ernst zunehmende Erfolge in der allogenen Transplantation von Inseln gibt es jedoch erst seit etwa 20 Jahren. Lacy gelingt es 1967 erstmals, intakte Inseln aus Rattenpancreata zu isolieren, 1972 beschreibt Ballinger die gelungene Transplantation von intakten Inseln im Rattenmodell. Es folgen weitere gelungene Experimente an verschiedenen Spezies (Mirkovitch, 1976; Lorenz, 1976), bis sich 1977 auch erste Erfolge beim Menschen abzeichnen (Najarian).

Bis zum 31.12. 2000 registriert das International Islet Transplantation Registry an der Medizinischen Klinik III und Poliklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen 493 Erwachsene, die Inseln im allogenen Modell transplantiert bekamen. Von diesen sind zum Zeitpunkt der Untersuchung 66 (entsprechend 13 %) für mindestens 1 Monat insulinunabhängig nach Transplantation. Erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang die enormen Fortschritte innerhalb von 15 Jahren. Noch in dem Zeitraum von 1985-1989 erreichen von 28 Transplantierten Typ 1 Diabetikern oder Pankreatektomierten 7 % Insulinunabhängigkeit nach einer Inseltransplantation, zwischen 1990-1993 16%, von 1994 – 1997 sind es 15 %, und 1998 – 1999 schon 19 %. In der letztgenannten Gruppe weisen 95 % der Personen C-Peptid Level von $\geq 0,5$ ng/ml als Zeichen funktionierender Inseln auf (vor Transplantation waren alle C-Peptid negativ), d.h. in 95 % der Fälle war die allogene Inseltransplantation erfolgreich !

Für eine erfolgreiche Transplantation müssen mehrere Voraussetzungen erfüllt werden. So sollte die Zeit der Lagerung des Spenderorganes möglichst kurz sein, schon ab einer Lagerzeit des Spenderorgans von über 12 Stunden läßt sich keine Insulinunabhängigkeit bei den Empfängern erreichen (Hering, 1993). Weiterhin existiert sowohl im Tiermodell (Mellert, 1999) als auch beim Menschen eine Mindestmasse an zu transplantierten Inseln oder Inselequivalenten, bei deren Unterschreitung keine Insulinunabhängigkeit erreichbar scheint. So sollten Typ I Diabetiker mindestens 6000 Inselequivalente pro Kilogramm Körpergewicht transplantiert bekommen (ITR Newsletter, 2001), neuere Untersuchungen zeigen

eine fast gesicherte Insulinunabhängigkeit nach 9000 Inselequivalenten (Ryan, 2001).

Da es sich bei der Inseltransplantation in der Regel um allogene Transplantationen handelt, die häufig auch simultan mit der Transplantation anderer Organe durchgeführt wird, muß eine adäquate Immunsuppression durchgeführt werden.

Diese zu erfüllenden Voraussetzungen repräsentieren zugleich die Schwierigkeiten der allogenen Inseltransplantation. Zunächst ist die Anzahl von humanen Pancreata limitiert, vorhandene Spenderorgane müssen möglichst schnell bearbeitet werden. Hinsichtlich der Isolation von Inseln aus Pancreasgewebe sind in der letzten Dekade große Fortschritte erzielt worden, so daß die erforderlichen Inselequivalente für eine Transplantation heute in der Regel aus einem Spenderorgan gewonnen werden können. Versuche, β -Zellen zu klonen und in Kultur zu züchten, sind bisher nicht ausreichend erfolgreich (Oberholzer, 2001).

Einigkeit herrscht heute darüber, daß die Transplantation der Inseln in die Leber über die Injektion in die V. porta erfolgen sollte, andere Methoden wie die intraperitoneale Implantation sind verlassen worden.

Problematisch bleiben die Möglichkeit der wiederauftretenden Autoimmunität sowie die Alloimmunität. Ein progredientes Versagen der implantierten Inseln korreliert signifikant mit der Wiederauftreten von ICA – und/oder GAD-Antikörpern unter Standardimmunsuppression (Jäger, 1997). Die Alloimmunität ist durch die Immunsuppression relativ gut beherrschbar, jedoch sind gerade Immunsuppressiva wie Steroide und Calcineurin-Inhibitoren diabetogen, und nicht immer kann die Masse der transplantierten Inseln diese diabetogenen Effekte ausgleichen. Ein Versuch, die Immunität auszuschließen ist die Mikroverkapselung der zu transplantierenden Inseln in Kapseln aus Polysacchariden und Aminosäuren. Sun gelingt es so bei spontan diabetisch werdenden Affen den Blutglukosespiegel zu regulieren (Sun, 1996). Nachteilig an dieser Methode erscheint bisher die Notwendigkeit der peritonealen Implantation der Mikro kapseln, einhergehend mit schlechterer vaskulärer Versorgung und damit Ernährung als dies bei Implantation in die Leber der Fall wäre. Aufgrund der Größe der Mikro kapseln erscheint die

portale Injektion der benötigten Inselequivalente im humanen Modell zur Zeit noch nicht möglich.

Ein Durchbruch in der Transplantation von Inseln scheint einer Arbeitsgruppe um Shapiro im Jahr 2000 gelungen zu sein. Sieben Diabetikern mit diabetischer Nephropathie im Endstadium erreichen durch Inseltransplantation alleine oder simultan mit einer Nierentransplantation in Kombination mit einer steroidfreien Immunsuppression Insulinunabhängigkeit ! Diese Ergebnisse werden später von der selben Arbeitsgruppe bestätigt (Ryan, 2001).

Bei der NOD Maus gelingt es durch eine Kombination von Sirolimus und Interleukin 2 sowohl den spontanen Diabetes als auch den recurrenten Diabetes nach Inseltransplantation zu verhindern (Rabinovitch, 2002).

Insgesamt ist die allogene Inseltransplantation eine etablierte Therapiemöglichkeit des Typ I Diabetes, durch die sich in einer wachsenden Prozentzahl Insulinunabhängigkeit sowie deutlich bessere Blutzuckereinstellung erreichen läßt. In mehreren europäischen Ländern sowie in den USA existieren Netzwerke von Zentren, die sich mit der Optimierung der Recourcenausschöpfung sowie der Therapien nach Transplantation befassen. Trotzdem besteht noch ein großes Mißverhältnis zwischen Transplantationsbedürftigen und Transplantierten Patienten (in der Schweiz 1000 : 1; Oberholzer, 2001).

1.2 ÄTIOLOGIE DES DIABETES MELLITUS TYP 1

1.2.1 VERERBUNG DES DIABETES MELLITUS TYP I

Die Ätiologie des Diabetes mellitus Typ I ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. Einigkeit herrscht jedoch in der Ansicht, daß es sich um eine multifaktorielle Erkrankung mit genetischer Prädisposition handelt (Eisenbarth, 1986; Federlin, 1991; Roep et al., 1992). Hinweise darauf liefern Familienstudien, die in 20% der Fälle eine positive Familienanamnese aufzeigen (Palmer et al., 1991), sowie eine deutlich erhöhte Inzidenz bei Geschwistern von Typ 1 Diabetikern (Cudworth et al., 1982).

Zur genaueren Evaluierung der genetischen Prädisposition können Untersuchungen am HLA-System (human leucocyte antigen system) herangezogen werden. Das HLA-System ist ein autosomal kodominant vererbtes System von Gewebsantigenen, die sich auf den Zellen fast aller Gewebe, besonders gut auf Leukozyten, nachweisen lassen. Sie werden kodiert durch den HLA-Genkomplex (den sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplex oder Major Histocompatibility Complex, MHC). Für diesen Genkomplex besteht ein ausgeprägter Polymorphismus, sodaß eine große Anzahl verschiedener HLA-Phänotypen existiert. Im HLA-Genkomplex werden bislang vier Hauptregionen (HLA-A,-B,-C und -D) unterschieden. Die Allele der A-, B- und C- Region kodieren Antigene, die sich auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen, an Retikulozyten und an reifen Erythrozyten nachweisen lassen. Sie werden als Klasse I Antigene bzw. als MHC-Moleküle der Klasse I bezeichnet. Mit Hilfe der MHC I Moleküle sind die Zellen in der Lage, Fremdproteine zu präsentieren, wodurch zytotoxische T- Lymphozyten aktiviert werden, die dann die betreffende Zelle lysieren.

Die Gene der HLA-D Region codieren ebenfalls Gewebsantigene, die sich von den biochemisch untereinander sehr ähnlichen ABC-Genprodukten unterscheiden und ihnen deshalb als Klasse II Antigen gegenübergestellt werden. Im Gegensatz zu den Klasse I Antigenen finden sie sich vornehmlich an B-Lymphozyten sowie an Subpopulationen von Monozyten und Makrophagen und an Endothelzellen. Man

unterscheidet HLA-DR, -DP und -DQ-Antigene, kodiert von Allelen auf verschiedenen, synonym bezeichneten Subregionen des HLA-D-Komplexes. Durch Präsentation von Antigenen in Verbindung mit MHC II Molekülen werden T-Helfer-Lymphozyten aktiviert, die ihrerseits B-Lymphozyten zur Produktion von spezifischen Antikörpern anregen und T-Lymphozyten zu zytotoxischen T-Lymphozyten und T-Suppressor-Zellen aktivieren.

Die ersten Untersuchungen, die einen möglichen Zusammenhang zwischen HLA-System und Typ I Diabetes evaluieren, ergeben eine positive Assoziation von HLA-B15, HLA-B8 und -B15 mit dem Typ I Diabetes (Singal et al., 1973; Nerup et al., 1974). Von größerer Bedeutung für die genetische Prädisposition ist jedoch der HLA-D Locus (Thomsen et al., 1975). So weisen 90% der an Typ 1 Diabetes erkrankten Personen die HLA-Merkmale DR3 und / oder DR4 auf - gegenüber 45-55% der Gesunden. Weiterhin beobachtet man einen hohen Anteil an HLA-DR3/4 heterozygoten Patienten (Bertrams et al., 1984; Palmer et al., 1991; Svejgaard, 1975, Svejgaard et al., 1983).

Die Genanalysen an Typ I Diabetikern und Gesunden ergaben jedoch auch Hinweise dafür, daß es neben den genannten risikobehafteten Genen auch solche gibt, die protektiv wirken. Todd und Kollegen postulierten 1987, daß die Anwesenheit der Aminosäure Asparaginsäure an Position 57 der HLA-DQ β -Kette assoziiert sei mit einer Resistenz gegen Typ 1 Diabetes. Dahingegen wurden in der Typ I Diabetes Population vermehrt DQ β -Allele mit Serin, Valin oder Arginin an Position 57 gefunden (Todd et al., 1987, Morel et al., 1988).

Einigkeit herrscht in der Ansicht, daß nicht die Erkrankung an sich, sondern nur die Disposition zur Entwicklung eines Typ I Diabetes vererbt wird. Diese Schlußfolgerung stützt sich auf folgende Untersuchungsergebnisse, die zeigen, daß das HLA-System alleine nicht für die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes verantwortlich sein kann :

Erstens : Die Assoziation zwischen Typ I Diabetes und den HLA-Merkmalen DR3 und DR4 sind weltweit nicht konstant. In Süd-Indien besteht z.B. ein gehäuftes Vorkommen an HLA-DR3 und DR4 positiven Individuen, jedoch kein erhöhtes Risiko für den Typ I Diabetes bei diesen Personen (Serjeatson, 1987). In Japan und China dagegen ist die Diabetes-Inzidenz u.a. mit dem HLA-Merkmal DRw9 assoziiert (Chan et al., 1985; Bertrams, 1984).

Zweitens : Die relativ hohe Frequenz von HLA- DR3 (24 %) und DR4 (26 %) in der Gesamtbevölkerung führt zu 3% homozygoten Individuen, die alle einen Typ I Diabetes entwickeln müßten. Es erkrankten jedoch nur 0,3% der Bevölkerung (Roep, 1992).

Drittens : Die Konkordanzrate für HLA-identische Geschwister (10-20%) ist signifikant niedriger als die für Zwillinge (36 %) (Barnett et al., 1981; McLaren et al, 1992).

Eine mögliche Schlußfolgerung ist, daß nicht die als risikobehaftet bezeichneten Gene selbst, sondern die eng mit ihnen gekoppelt vererbten Gene, die nicht mit dem HLA-System assoziiert sind, für den Ausbruch der Erkrankung verantwortlich sind. Derzeit ist für mehr als 15 Gene eine Assoziation mit Diabetes mellitus Typ I beschrieben (Pugliese, 1999). In der Diskussion stehen das Insulingen (Bell et al, 1984), Gene von Komplementfaktoren sowie Gene auf Chromosom 11 (Eisenbarth, 1986).

1.2.2 UMWELTEINFLÜSSE

Wird nun nicht die Erkrankung an sich, sondern nur die Disposition zur Entwicklung eines Typ I Diabetes vererbt, müssen andere Einflüsse eine Rolle spielen. Folgende Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß Umweltfaktoren eine Rolle spielen.

Erstens ist Inzidenz des insulinpflichtigen Diabetes mellitus in verschiedenen Ländern unterschiedlich (La Porte 1985, Diabetes Epidemiology Research International Group 1988).

Zweitens zeichnet sich in den vergangenen Jahren in vielen Ländern eine Zunahme der Häufigkeit der Erkrankung ab (Dahlquist et al., 1985; Rewers et al., 1987; Steward– Brown et al., 1983; Green et al., 1983).

Drittens ist bemerkenswert, daß sich bei Immigranten die Inzidenz der des Einwanderungslandes nähert (Roep 1992, Boitard et al., 1994).

Die Registratur der Typ I Diabetiker in unterschiedlichen Ländern der Welt ermöglicht die Untersuchung der verschiedensten Einflüsse der Umweltfaktoren auf die Inzidenz der Erkrankung. Allerdings werden nicht in allen Ländern der Welt; v.a. nicht in Afrika, Südamerika, Asien und Süd-und Osteuropa, Daten über das Auftreten des juvenilen Diabetes erhoben (Diabetes Epidemiology Research International Group 1988).

1.2.2.1 GEOGRAPHISCHE EINFLÜSSE

Epidemiologische Studien zeigen unterschiedliche Inzidenzraten in verschiedenen Ländern. So gibt es z.B. in Finnland deutlich mehr Typ I Diabetiker als in Japan. Auch innerhalb Europas zeigen sich unterschiedlich hohe Raten mit einem Gipfel in Finnland und einem niedrigsten Wert in Frankreich. Dabei scheint ein Nord-Süd-Gefälle zu bestehen, was auch innerhalb einzelner Länder, z.B. Schweden (Dahlquist et al., 1985), Norwegen (Joner et al., 1981) und Finnland (Reunanen et al., 1982), nachweisbar ist. Als Ursache für dieses Nord-Süd-Gefälle wird die herrschende Jahresdurchschnittstemperatur diskutiert (Diabetes Epidemiology Research International Group 1988). Hinweisgebend dafür sind Versuche von Williams, der die Inzidenz von Diabetes im Tiermodell durch eine Erhöhung der Umgebungstemperatur senken konnte (Williams et al., 1990). Andere Erklärungsansätze könnten unterschiedliche Ernährungsweisen oder von der Geographie abhängige virale Einflüsse sein.

1.2.2.2 JAHRESZEITLICHE EINFLÜSSE

Neben unterschiedlichen geographischen Inzidenzraten fallen in epidemiologischen Studien auch jahreszeitliche Abhängigkeiten der klinischen Manifestation des Typ I Diabetes auf. Das Colorado IDDM Registry beobachtet z.B. einen Gipfel des Ausbruchs der Erkrankung im Winter (Hamman et al., 1990). Adams und Gamble berichten von einer Häufung der Manifestationen im Zeitraum zwischen spätem Sommer und frühem Frühling (Adams, 1926, Gamble et al., 1969). Auch Huff beschreibt jahreszeitliche Schwankungen mit einer erhöhten Erkrankungsrate von Januar bis April (Huff et al., 1974).

Die Ursache für diese saisonalen Schwankungen des Ausbruchs der Erkrankung könnten Infektionskrankheiten sein, die zu bestimmten Jahreszeiten vermehrt auftreten.

1.2.2.3 VIRALE EINFLÜSSE

Unterschiedliche Studien zeigen einen zeitlichen Zusammenhang zwischen verschiedenen Virusinfektionen und der Diabetesmanifestation.

Blom beobachtet eine erhöhte Anzahl an durchgemachten Infektionen in dem Jahr vor der klinischen Manifestation des Diabetes bei Kindern (Blom et al., 1991). Viele respiratorische Virusinfektionen zeigen einen Gipfel im Winter äquivalent zur Manifestation des Diabetes (Huff et al., 1974).

Einige Case-Reports berichten über das Auftreten einer Diabetes-Erkrankung nach einer Mumps-Infektion (Hinden 1962, Mc Crae 1963, Block et al., 1973).

Weiterhin zeigt sich eine erhöhte Prävalenz des insulinpflichtigen Diabetes bei Kindern mit kongenitaler Röteln-Infektion (Menser et al., 1978; Ginsberg-Fellner et al., 1980). Bei der Abklärung dieser Befunde kann Menser am Kaninchenmodell zeigen, daß die Nachkömmlinge von mit Röteln infizierten Kaninchen niedrigere Spiegel an Insulin im Serum haben als die nicht infizierte Kontrollpopulation (Menser et al., 1978).

Besondere Beachtung findet auch das Coxsackie-B-Virus, insbesondere der Subtyp Coxsackie-B4. Es finden sich höhere Titer von Antikörpern gegen dieses Virus bei Kindern mit frischer Manifestation des Typ I Diabetes im Vergleich zu Patienten mit bereits längerer Krankengeschichte und gesunden Kontrollpersonen (Gamble et al., 1969; Huff et al., 1974). Andere Autoren berichten über die Induktion eines diabetes-ähnlichen Zustands im Tiermodell durch Infektion mit dem Coxsackie-B4 Virus selbst (Coleman et al., 1973; Yoon et al., 1986; Szopa et al., 1985; 1986). Yoon isoliert Coxsackie-B4 Viren aus dem Pankreas von frisch manifestierten Typ I Diabetikern. Eine Injektion dieser Viren führt bei Versuchstieren zu Diabetes (Yoon et al., 1978; 1979).

Neuere Studien belegen den engen Zusammenhang zwischen einer Infektion mit Coxsackie Viren – vornehmlich vom Typ B4 – oder mit Coxsackie-ähnlichen Enteroviren (Vreugdenhil et al., 1998). So findet sich im peripheren Blut frisch manifestierter Diabetiker signifikant häufiger Genom der o.g. Viren als in dem von gesunden Kontrollpersonen (Andreolotti et al., 1997; 1998). Weiterhin existieren

homologe Sequenzen zwischen dem Coxsackie-B Virus-Protein 2C und der Glutaminsäuredecarboxylase (GAD65) der β -Zelle, sowie zwischen GAD65 und Coxsackie-ähnlichen Enteroviren. Der Arbeitsgruppe um Atkinson gelang es aus dem peripheren Blut von frisch manifestierten Typ I Diabetikern und von ICA-positiven Verwandten mononukleäre Zellen zu isolieren, die sowohl auf das Protein 2C als auch auf eine Aminosäuresequenz von GAD65 (247-279) spezifisches Wachstum zeigten (1994).

Insgesamt ist die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ I deutlich assoziiert mit einer Infektion durch Coxsackie B Viren, ungeklärt ist jedoch weiterhin die Rolle dieser Infektion in der Pathogenese des Typ I Diabetes. Zum einen besteht die Möglichkeit, daß es durch die Virusinfektion zu einer direkten Aktivierung immunkompetenter Zellen kommt, die sich aufgrund der homologen, eindeutig als antigene Strukturen identifizierten, Aminosäuresequenzen gegen eben solche Epitope auf der β -Zelle richten könnten. Zum anderen kann eine direkt toxische Wirkung der Viren auf die

β -Zelle nicht ausgeschlossen werden, die zur Zerstörung und damit zur Freisetzung antigener Bestandteile aus der β -Zelle führt, und die Aktivierung immunkompetenter Zellen zur Folge hat (Horwitz et al.,1998).

1.2.2.4 ERNÄHRUNG ALS EINFLUßFAKTOR

In verschiedenen Studien zeigt sich eine positive Korrelation der Inzidenz des Typ I Diabetes mit der frühen Ernährung mit Kuhmilchprodukten bei kurzzeitiger oder ausgebliebener Stillzeit (Dahlquist et al., 1991; Borch-Johnsen et al., 1984; Virtanen 1991; Virtanen et al., 1993; Dahl-Jorgensen et al., 1991; Kostabra et al., 1993).

Dies könnte bedingt sein durch die fehlende Übertragung von immunkompetenten Stoffen mit der Muttermilch auf das Kind, so z.B. sekretorische IgA-Antikörper, Makrophagen, Lymphozyten und andere infektionsabwehrende Faktoren wie Neuraminsäure, Lysozym, Lactoferrin und Interferon. Es ist denkbar, daß das Neugeborene durch diese fehlende passive Immunisierung nicht ausreichend gegen Infektionskrankheiten geschützt ist, die in der Pathogenese des Diabetes mellitus von Bedeutung sein können.

Aber nicht nur der schützende Effekt der Muttermilch kann als Erklärungsansatz für die Abhängigkeit der Inzidenz des insulinpflichtigen Diabetes von der Stillfrequenz herangezogen werden. Denn durch die frühe Zufuhr von Kuhmilchprodukten ist die Zufuhr eines den Diabetes auslösenden Agens denkbar. In der Diskussion stehen v.a. das Rinder Serum Albumin (Bovines Serum Albumin, BSA) und Casein.

Bovines Serum Albumin (BSA)

Es existieren viele Hinweise für eine Beteiligung von BSA an der Pathogenese des Typ1 Diabetes. Im Tiermodell kann bei BB-Ratten (Biobreding; ein Inzuchtstamm, der einen spontanen Diabetes entwickelt) durch die frühe Zufuhr von Kuhmilchprodukten die Inzidenz des Diabetes erhöht, und durch kuhmilchfreie Ernährung gesenkt werden (Danemann et al., 1987; Elliott et al., 1984; Scott et al., 1988). Neuere Untersuchungen zeigen aber auch gegensätzliche Ergebnisse. So finden Paxson et al. 1997 keinen Unterschied in der Diabetesinzidenz bei NOD-Mäusen, die entweder kuhmilchfrei oder kuhmilchfrei mit geringem Anteil BSA bzw. bovinem IgG ernährt wurden; als Kontrolle dienten mit einer Standardernährung für Nager aufgezogene Tiere.

Auf humoraler Ebene lassen sich sowohl in prädiabetischen BB-Ratten als auch in NOD-Mäusen (Non Obese Diabetic; entwickelt mit 12 Wochen spontan einen Diabetes; Makino, 1980) anti-BSA-Antikörper nachweisen (Beppu et al.,1987; Glerum et al.,1989). Auch beim Menschen finden sich anti-BSA-Antikörper. In einer Studie an frisch manifestierten Typ I Diabetikern, ihren gesunden Geschwistern sowie gesunden Kontrollpersonen können Saukkonen et al. 1994 deutlich erhöhte anti-BSA-Antikörper der Klassen IgG und IgA bei den frisch manifestierten Diabetikern nachweisen . Geschwister, die in der Folgezeit einen Diabetes entwickeln, weisen ebenfalls deutlich erhöhte anti-BSA-Antikörpertiter auf. In einer Regressionsanalyse erweisen sich anti-BSA-Antikörper jedoch nicht als Risikofaktor für die Entwicklung eines Typ I Diabetes (Saukkonen et al., 1995). Kohno et al. berichten 2002 als Ausdruck einer kompromittierten oralen Toleranz von Typ I Diabetikern über erhöhte Titer von anti-BSA-IgA sowie Gesamt-IgA in Kombination mit einem deutlich erhöhtem Verhältnis von Interleukin-2 zu Interleukin-4. Diese orale Intoleranz könnte mit der Pathogenese des Typ I Diabetes in Zusammenhang stehen.

Bovines Serum Albumin unterscheidet sich in einer Sequenz von 17 Aminosäuren (Position 152 – 168) von Ratten-, Mäuse- und Humanalbumin. Diese Aminosäuresequenz, genannt ABBOS, konnte als das antigene Epitop von BSA

identifiziert werden, da ein Großteil von anti-BSA-Antikörpern der Klasse IgG spezifisch mit ABBOS reagiert (Karjalainen et al.,1992). Diese anti-ABBOS-Antikörper zeigten sich kreuzreaktiv mit p69, einem durch γ -Interferon auf der β -Zelle des Pancreas induzierbarem Antigen (Glerum et al.,1989; Martin et al.,1991; Karjalainen et al.,1992). Dies ist ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Immunisierung gegen Kuhmilchproteine und der Zerstörung der β -Zellen. Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist auch, daß es mit zunehmender Krankheitsdauer zu einem Abfall der anti-BSA-Antikörper kommt, und nach 2 Jahren Krankheitsdauer sogar zu einer Normalisierung; ein Verlauf, den man in dieser Form auch bei den ICA-Antikörpern beobachtet. Die Exposition von ABBOS im frühen Kleinkindalter könnte einen Immunprozeß auslösen, welcher später durch die Expression endogener Antigene wie p69 getriggert bzw. aufrecht erhalten wird.

Welche Rolle insgesamt die anti-BSA-Antikörper in der zellvermittelten Zerstörung der β -Zellen spielen bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Rolle der zellulären Immunantwort ist ebenso Gegenstand vieler Studien. Vaarala et al. finden eine erhöhte Proliferation von PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) frisch manifestierter Typ I Diabetiker gegen β -Lactoglobulin gegenüber Gesunden, jedoch keine Unterschiede in der Proliferation gegen BSA oder α -Casein. Bestätigende Ergebnisse in Bezug auf zelluläre Reaktivität gegen BSA liefern Cavallo (1996) und Lohmann (1997). Karlsson et al. kultivieren PBMC frisch manifestierter Typ I Diabetiker sowie gesunder Kontrollpersonen mit ABBOS sowie BSA. Dies führt in beiden Gruppen zu einer Th1 und Th2 ähnlichen Immunantwort, gemessen an erhöhten Spiegeln von Interferon- γ sowie Interleukin-4 messenger RNA. Die Schlußfolgerung daraus ist, daß Kuhmilchproteine zwar immunogene Eigenschaften haben, in der Pathogenese des Typ I Diabetes aber keine Rolle spielen (Karlsson et al.,2000/2001).

Casein

In Kuhmilch findet sich neben BSA noch ein weiteres potenzielles Antigen, das Casein, welches einen Anteil von 80 % des Gesamtproteins der Kuhmilch ausmacht (gegenüber 25 % in Muttermilch). Casein besteht aus vier verschiedenen Fraktionen (α , β , γ , und κ), wovon das β -Casein 35 % ausmacht.

Casein steht in der Diskussion an der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ I beteiligt zu sein, seit bekannt ist, daß eine proteinfreie Diät die Entwicklung des Diabetes bei NOD-Mäusen verhindert, wohingegen die alleinige Ernährung mit Casein als Proteinquelle die Diabetes-Entwicklung fördert (Reddy et al.,1995; Elliott et al.,1988). Dabei scheint das intakte Casein als Fremdprotein erforderlich zu sein, um den Immunprozeß zu triggern, da die Verfütterung von hydrolysiertem Casein oder einzelner Aminosäuren die Entwicklung des Diabetes in der NOD-Maus verhindert (Elliott et al.,1988; Coleman et al.,1990; Hermitte et al.,1995; Karges et al., 1997). Gleiche Ergebnisse konnte Scott 1997 für die BB-Ratte berichten.

Nachgewiesen ist der Zusammenhang zwischen der Inzidenz des Typ I Diabetes beim Menschen und dem Konsum von β -Casein : in einer Studie wurden die Inzidenzen des Typ I Diabetes in 10 Ländern mit dem jeweiligen Kuhmilchkonsum korreliert. Positive Korrelationen ergeben sich dabei für die β -Casein Variante A1, sowie noch deutlicher für β -Casein A1+B; für die Gesamtproteinzufuhr war keine Korrelation nachweisbar. Für ein Stoffwechselprodukt von β -Casein, β -Casomorphin, ist ein immunsuppressiver Effekt zumindest in vitro nachgewiesen (Elliott et al., 1999).

Beim Menschen besitzt β -Casein antigene Potenz. Wasmuth et al. gelang 1995 der Nachweis von Antikörpern gegen β -Casein bei frisch manifestierten Typ I Diabetikern. Weiterhin lassen sich auch bei Geschwistern von Typ I Diabetikern erhöhte Titer gegen β -Casein A1 nachweisen; positive Titer finden sich auch bei Eltern von Typ I Diabetikern sowie gesunden Kontrollpersonen, bei diesen jedoch gegen β -Casein A2 gerichtet, was im Sinne einer verminderten oralen

Immuntoleranz bei Typ 1 Diabetikern sowie ihren Geschwistern gedeutet wird (Padberg et al., 1999). Analog zu anderen Studien liegt eine inverse Korrelation zwischen Alter der Personen aller Gruppen sowie dem Vorhandensein von Antikörpern gegen β -Casein vor. Für eine Immunisierung gegen β -Casein scheint es erforderlich, das Agens direkt aufzunehmen. Mit Flaschennahrung ernährte gesunde Säuglinge weisen signifikant häufiger Antikörper gegen Casein auf als gesunde Gestillte, auch wenn die stillende Mutter Kuhmilchprotein zu sich nimmt (Monetini et al., 2001).

Analog zu den Ergebnissen von BSA existieren auch in β -Casein Sequenzen, die von der β -Zelle des Pancreas exprimiert werden, nämlich p69 und Carboxypeptidase (Becker et al., 1995), die beide als Autoantigene an der Entwicklung des Diabetes mellitus Typ I beteiligt scheinen (Atkinson et al., 1994).

Wiederum analog zu den Ergebnissen von BSA findet sich auch bei bovinem β -Casein eine Aminosäuresequenz, die sich von humanem β -Casein unterscheidet (Position 63 – 76), und identisch ist mit einer Sequenz des für die β -Zelle spezifischen Glucose-Transporters GLUT-2. Gegen eben dieses GLUT-2 weisen frisch manifestierte Typ I Diabetiker Antikörper auf (Inman et al., 1993).

Bei Betrachtung der zellulären Immunantwort gegen β -Casein sind die Ergebnisse uneinheitlich. Cavallo et al. berichten über spezifische Proliferation von T-Lymphozyten von Typ 1 Diabetikern auf β -Casein als Antigen (1996). Bestätigende Ergebnisse berichtete eine Arbeitsgruppe um Ellis, jedoch finden sich hier auch bei Autoantikörper negativen Verwandten, von denen nur wenige einen Diabetes entwickelten, fast identische Reaktionen der T-Lymphozyten; möglicherweise Ausdruck einer genetisch determinierten kompromittierten oralen Toleranz gegen Nahrungsmittelbestandteile (Ellis et al., 1998). Andere Untersuchungen erbrachten keine Unterschiede hinsichtlich der zellulären Immunantwort von Typ 1 Diabetikern und gesunden Kontrollpersonen gegen β -Casein; ebensowenig korrelieren die Ergebnisse von humoraler und zellulärer Immunität (Sarugeri et al., 1999; Crino et al., 2001).

Die Ergebnisse zeigen, daß β -Casein sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunabwehr spezifisch zu stimulieren vermag, die Rolle in der Pathogenese des Typ1 Diabetes ist jedoch noch nicht geklärt.

Auch für das β -Casein ist also eine frühkindliche Immunisierung mit Triggerung oder Fortführung des Immunprozesses zu einem späteren Zeitpunkt denkbar.

Andere Nahrungsbestandteile

Als weitere bedeutende Faktoren der Ernährung für die Ätiologie des Typ I Diabetes werden ein hoher Gehalt an Nitraten, Nitriten bzw. Nitrosaminen vermutet (Dahlquist et al., 1991).

Dabei wird nicht nur über die orale Zufuhr dieser Stoffe bei den Kindern selbst, sondern auch bei den Müttern, nämlich zum Zeitpunkt der Konzeption, als Ursache für die Entwicklung eines Typ I Diabetes bei den Kindern spekuliert. (Helgason et al. 1981).

1.2.2.5 LEBENSGEWONNHEITEN ALS EINFLUßFAKTOR

Hägglöf berichtet über psychologischen Stress und psychisch belastende Ereignisse als Risikofaktor für die Entwicklung eines Typ I Diabetes (Hägglöf et al., 1991).

Nach Dahlquist sind die Mütter diabetischer Kinder zum Zeitpunkt der Konzeption im Vergleich zu Kontrollpersonen häufiger über 40 Jahre alt (Dahlquist et al., 1991).

Mütter der an juvenilem Diabetes erkrankten Kinder sollen häufiger einen niedrigeren Bildungsstand aufweisen als Mütter nicht-diabetischer Kinder (Blom et al., 1989; Virtanen 1991). Dabei stellt Virtanen einen Zusammenhang zwischen Bildungsstand der Mutter, sozialer Schichtzugehörigkeit und Stillzeit her : Je höher der Bildungsstand der Mutter, um so länger sei die Stillzeit.

1.3 PATHOGENESE DES TYP I DIABETES MELLITUS

1.3.1 HISTOLOGIE DER LANGERHANS'SCHEN INSELN BEIM DIABETES MELLITUS TYP I

1965 untersucht Gepts Pankreasgewebe von verstorbenen Typ I Diabetikern. Bei kurz nach der Diagnosestellung Verstorbenen beobachtet er peri- und intrainsuläre inflammatorische Infiltrate sowie eine Reduktion der β -Zellen. Bei Patienten mit längerer Krankheitsdauer dagegen sind die Infiltrate nicht mehr und kaum noch β -Zellen nachweisbar (Gepts, 1965).

Die Infiltrate im Bereich der Langerhans'schen Inseln bei Typ I Diabetikern, man spricht von Insulitis, findet auch Foulis, der 1986 ebenfalls Pankreasgewebe von insulinpflichtigen Diabetikern untersucht. Auch seine Ergebnisse zeigen, daß mit zunehmender Dauer der Insulitis sowohl die Infiltrate als auch die

β -Zellen abnehmen. Dieser Befund legt nahe, daß die β -Zell Destruktion von dem Insulitis-Prozess verursacht wird (Foulis et al., 1986).

1.3.2 **UNTERSUCHUNGEN ZUR INSULITIS**

Es wird heute davon ausgegangen, daß es sich beim Diabetes mellitus Typ I um eine chronische, immun-medierte Erkrankung handelt. Die entzündliche Infiltration der Langerhans'schen Inseln wird bereits in der prädiabetischen Phase beobachtet, und ist mit dem Auftreten von Inselzellautoantikörpern assoziiert.

Im Tiermodell der NOD-Maus läßt sich die Insulitis nachweisen. Dabei unterscheidet man die benigne Peri-Insulitis von der destruirenden Intra-Insulitis. Die Peri-Insulitis ist dabei von T-Helfer 2 Zytokinen dominiert, während bei der Intra-Insulitis T-Helfer 1 Zytokine nachgewiesen werden (Botazzo et al.,1985). Analog zu den Untersuchungen von Gepts und Foulis entdeckt Boitard 1985 im Pankreas eines kurz nach der Manifestation eines Diabetes mellitus Typ I verstorbenen 12-jährigen Mädchens Insulitis-Infiltrate im Bereich der Langerhans'schen Inseln.

Weitere Erkenntnisse über das Entstehen der Insulitis liefern Untersuchungen über die qualitative Zusammensetzung der zellulären Komponente der Insulitis. Im zellulären Infiltrat lassen sich in Abhängigkeit vom Stadium der Insulitis Makrophagen, B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen sowie T-Lymphozyten nachweisen. Zu Beginn der Insulitis dominieren CD4 positive T-Helfer-Lymphozyten das Bild, wahrscheinlich geht dem eine Dominanz von Makrophagen voraus. Mit Beginn der Zerstörung der β -Zellen überwiegen CD8 positive zytotoxische / Suppressor-T- Lymphozyten (Roep, 1991).

Desweiteren werden bei histologischen Untersuchungen von Pankreasgewebe verstorbener Typ I Diabetiker Immunglobuline vom Typ IgG nachgewiesen. Diese ummanteln die Inseln, teilweise sind sie aber auch im Zytoplasma der β -Zellen nachweisbar.

Diese Penetration der Immunglobuline in lebende β -Zellen und die HLA-DR-Expression der in den Infiltraten nachgewiesenen T-Lymphozyten kann als spezifische Immunreaktion im Sinne einer antikörperabhängigen,

komplementvermittelten Zytotoxizität, die zur Destruktion der β -Zellen führt, interpretiert werden (Botazzo et al. 1985).

Kontrovers diskutiert werden bis heute Arbeiten, die eine aberrante Expression von MHC-II-Molekülen aus der Gruppe der HLA-DR-Moleküle beschreiben (Botazzo et al.,1985; Foulis et al.,1986; Hanafusa et al.,1990). Diese antigen-präsentierenden Moleküle, die von der D-Region des HLA-Systems kodiert werden, finden sich normalerweise nur auf B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen. Die aberrante Expression dieser Moleküle soll sich in den o.g. Arbeiten ausschließlich auf die β -Zellen beschränken, und könnte in genetisch suszeptiblen Personen durch z.B. virale Infektionen und konsekutive Produktion von Zytokinen wie TNF (Tumor Nekrose Faktor) und Interferonen ausgelöst werden (Pujol-Borell beschreibt dafür 1987 ein in vitro Modell).

Insgesamt ist die Frage nach dem Auslöser für die Initiierung der Insulitis bis heute nicht geklärt.

1.3.3 AUTO-ANTIKÖRPER UND DIABETES MELLITUS TYP I

Die Erkenntnis, daß es sich beim juvenilen Diabetes mellitus um eine (Auto)-Immunerkrankung handeln könnte, gründet sich auf die Entdeckung von Antikörpern gegen Bestandteile der endokrinen Zellen des Pankreas durch Botazzo im Jahr 1974. Seitdem sind eine Vielzahl weiterer Antikörper identifiziert worden, die eine Rolle in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ I spielen könnten.

Inselzell-Antikörper (islet cell antibodies, ICA)

1974 gelingt Botazzo mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz die Entdeckung der Inselzell-Antikörper (Botazzo et al., 1974).

Die Bestimmung der ICA-Antikörper erfolgt durch eine indirekte Immunfluoreszenz auf unfixiertem, frisch gefrorenem Pankreas der Blutgruppe Null. Durch die Juvenile Diabetes Foundation International (JDF) wurde diese Nachweismethode weiter entwickelt und es ist heute durch Standardisierung und Einführung der sogenannten JDF- Standardeinheiten auch eine Quantifizierung der Antikörper im Serum möglich (Gleichmann et al. 1987).

Die ersten Patienten bei denen sich ICA-Antikörper nachweisen lassen, leiden unter einer Polyendokrinopathie, dem sogenannten Schmidt-Syndrom; die Inselzell-Antikörper persistieren über mehrere Jahre (Botazzo et al. 1974). Bei Typ I Diabetikern hingegen zeigt sich eine hohe Prävalenz der Inselzell- Antikörpern zum Zeitpunkt der Diagnose. Sie kann mit 60-90% angegeben werden (Lendrum et al., 1975; Kolb et al., 1988; Bruining et al.,1989).

Innerhalb des ersten Jahres nach der Diagnosestellung sinkt die Prävalenz auf 20-50%, um danach langsamer weiter zu sinken (Mustonen, 1984), bis schließlich die Inselzell- Antikörper ganz aus dem Serum der Diabetiker verschwinden (Lendrum et al. 1976).

Weltweit durchgeführte Familienstudien weisen eine erhöhte Prävalenz von Inselzell-Antikörpern bei Verwandten ersten Grades von Typ I Diabetikern im Vergleich zur Prävalenz in der Normalbevölkerung - 0,3-3% - nach (Seißler et al.,

1990). Als Beispiel sei die prospektive Familienstudie der Medizinischen Klinik III und Poliklinik der Universität Gießen in Verbindung mit der Diabetesklinik Bad Oeynhausen angeführt, in der 5,5% der Geschwister und 2,5% der Elternteile von Typ I Diabetikern ICA positiv waren. Im intravenösen Glucosetoleranztest zeigen die ICA positiven Geschwister und Eltern zu 50 % bzw. zu 30% eine verminderte Insulinsekretion (Becker et al., 1989).

Gorsuch berichtet über Verwandte von Typ I Diabetikern mit normaler Glucose-Toleranz und positivem ICA-Titer, die später einen zunächst latenten und dann manifesten Diabetes entwickelten (Gorsuch et al., 1981).

Bestätigende Ergebnisse erbringt die Barts-Windsor-Middlesex-Studie : Verwandte ersten Grades, bei denen ICA-Antikörper nachweisbar sind, entwickelten häufiger einen manifesten Diabetes mellitus als ICA-negative Verwandte (Spencer et al., 1984; Tarn et al., 1988).

Die Familienstudien zeigen, daß die Inselzell-Antikörper bereits vor der klinischen Manifestation des Diabetes nachweisbar sind. Im Verlauf der Erkrankung beobachtet man sinkende Antiköpertiter. Dieser Verlauf entspricht dem zeitlichen Verlauf der Destruktion der β -Zellen. Mit dem Zugrundegehen aller β -Zellen im Verlauf der Erkrankung verschwinden auch die Inselzell- Antikörper. Dies erklärt auch die unterschiedlich lange Persistenz dieser Antkörper beim insulinpflichtigen Diabetes im Vergleich zur Polyendokrinopathie, bei der der Prozeß der β -Zell Destruktion sehr viel langsamer fortschreitet (Botazzo 1984).

Derzeit wird nicht davon ausgegangen, daß die Inselzell-Antikörper eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ I einnehmen, was im Rahmen folgender Beobachtungen begründet wird :

1. Die Inselzell-Antikörper richten sich, wie Botazzo 1978 zeigt, gegen alle Zelltypen der Pankreasinseln (Botazzo et al., 1978). Beim Typ I Diabetes gehen zunächst nur die β -Zellen zugrunde (später kommt es auch zum Untergang der α -Zellen; die Ursache ist noch unklar).

2. In allen Familienstudien können Verwandte 1. Grades mit positivem ICA- Titer nachgewiesen werden, die später keinen Typ I Diabetes entwickeln (Becker et al., 1989; Gorsuch et al., 1981; Spencer et al., 1984; Tarn et al. 1988).
3. Es gibt Fälle der klinischen Manifestation eines insulinpflichtigen Diabetes mellitus ohne Nachweis von Inselzell-Antikörpern (Lendrum et al., 1975; Kolb et al., 1988; Bruining et al., 1989).
4. Die Durchführung einer Plasmapherese kann bei ICA-positiven Menschen die Manifestation des Typ I Diabetes nicht verhindern (Harrison et al., 1990).
5. Eine durch Cyclosporin-A Therapie erzielte Remission des Diabetes ist nicht begleitet von dem Verschwinden der ICA-Antikörper aus dem Serum (Mandrup - Poulsen et al., 1990).
6. Die Übertragung eines Diabetes mellitus gelingt im Tiermodell bisher nur durch Zelltransfer, nicht aber durch die Übertragung antikörperpositiver Seren.

Aufgrund dieser Widersprüche geht man heute davon aus, daß es sich bei dem Auftreten der Inselzell-Antikörper im Rahmen des Typ I Diabetes um Sekundärphänomene der β -Zell Destruktion handelt.

Weiterhin beweisen mehrere Studien an Verwandten von Typ I Diabetikern, daß durch ein alleiniges Screening dieser „Risikopersonen“ fast 20 % derer die in der Zukunft auch einen Typ I Diabetes entwickeln, nicht erkannt würden (Jaeger et al; 1999).

Inselzelloberflächenantikörper (islet cell surface antibodies, ICSA)

1978 entdeckt Lernmark mit Hilfe kultivierter Inselzellen der Ratte Antikörper, die sich gegen ein Inselzelloberflächenantigen richten (Lernmark et al., 1978). 1982 werden diese Antikörper durch Pujol-Borell über Kultivierung humaner Inselzellen dargestellt (Pujol-Borell et al., 1982).

Die ICSA finden sich bei 30-50% der ICA-positiven Diabetiker (Lernmark et al., 1978). Sie weisen unterschiedliche Spezifitäten für Alpha-, Beta-, Delta- und PP-Zellen der Pankreasinseln auf (Van de Winkel et al., 1982).

Insulin-Autoantikörper (IAA)

1983 beschreibt Palmer Patienten mit frisch manifestiertem Diabetes mellitus Typ I, bei denen Insulin-Antikörper im Serum auftreten noch bevor eine Insulin-Therapie begonnen hat (Palmer et al., 1983). Es muß sich somit um Auto-Antikörper gegen das körpereigene Insulin handeln.

Man kann die Insulin-Autoantikörper über einen Radioimmunoassay (Srikanta et al., 1986) oder über einen Enzyme-linked-Immunoabsorbent-Assay (Dean et al., 1986) nachweisen. In Abhängigkeit zur verwendeten Nachweismethode schwanken die Angaben zur Prävalenz (Atkinson et al., 1986; Dean et al., 1986).

Wie auch die Inselzell-Antikörper sind die Insulin-Autoantikörper in der prädiabetischen Phase nachweisbar und zeigen eine Abnahme des Titers nach der klinischen Manifestation des Diabetes mellitus (McEvoy et al., 1986). Es sind allerdings die einzigen Autoantikörper, deren Titerhöhe mit der Progression der Erkrankung korreliert (Eisenbarth, 1992) !

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß bei Autoantikörperbestimmungen im Kindesalter die IAA die ersten zu messenden Antikörper sind.

Neueste Erkenntnisse aus der Multicenterstudie BABYDIAB lassen sogar den Schluß zu, daß Insulin das entscheidende Autoantigen bei der Entwicklung des Typ I Diabetes ist, da die IAA in der Mehrzahl der Fälle die ersten nachzuweisenden Antikörper sind (Ziegler et al., 2001).

Autoantikörper gegen GAD (Glutamic Acid Decarboxylase)

Baekkeskov berichtet 1982 über den Nachweis eines Antikörpers, der sich gegen ein Membranprotein der β -Zelle richtet (Baekkeskov et al., 1982). Von diesem Protein kannte man lange nur das Molekulargewicht von 64 kilo- Dalton (kD). Man sprach daher von dem 64kD-Antikörper.

Seit 1990 weiß man, daß es sich bei dem Protein um Glutaminsäuredecarboxylase handelt (Baekkeskov et al., 1990). Dieses Enzym, das für die Biosynthese des inhibitorisch wirkenden Neurotransmitters Gamma-Aminobuttersäure (GABA) verantwortlich ist, kann mit hoher Aktivität in den β -Zellen des Pankreas und in bestimmten Zellen des Zentralen Nervensystems nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt der klinischen Manifestation sind sie bei Typ I Diabetikern in 80-90% der Fälle nachweisbar.

Antikörper gegen Tyrosinphosphatase IA-2

Ähnlich den Antikörpern gegen GAD kannte man von den IA-2 Antikörpern jahrelang nur das Molekulargewicht von 37 bzw. 40 kDa, bis in der Mitte der 90er Jahre mehrere Arbeitsgruppen das Enzym Tyrosinphosphatase IA-2 als das Antigen identifizieren (Passini et al.,1995; Hawkes et al.,1996).

Die größte Sicherheit hinsichtlich der Prediktion eines Typ I Diabetes bei gefährdeten Personen hat die Bestimmung der drei letztgenannten Antikörper IAA, GADA und IA-2A (Bingley et al; 1994). In der Babydiab-Studie entwickeln die Kinder von Typ I Diabetikern zu 100% einen klinisch manifesten Typ I Diabetes, wenn im Alter von 2 Jahren mindestens zwei Antikörper vorhanden sind (IAA, GADA oder IA-2A); ist hingegen im Alter von 2 Jahren keiner dieser Antikörper nachzuweisen, ist das Erkrankungsrisiko nahezu 0 % (Ziegler et al; 2001).

In der Giessen-Bad Oeynhausen Family Studie an 882 Verwandten 1.Grades von frisch manifestierten Typ I Diabetikern wird eine 2-Stufen Testung angewandt : zunächst werden die Verwandten getestet auf Antikörper gegen GAD und IA-2,

bei positiven Befunden wird zusätzlich nach ICA bzw. IAA gesucht. Durch diese Kombination lassen sich 94 % der zukünftigen Typ I Diabetiker identifizieren, gegenüber nur 81 % bei alleinigem Screening für ICA. Weiterhin steigt das Risiko zur Entwicklung eines Typ I Diabetes mit der Anzahl der vorhandenen Antikörper (Jaeger et al.; 1999).

Betätigende Ergebnisse liefern Verge et al, in deren Studie das Risiko einen Typ I Diabetes zu entwickeln bei Vorliegen aller 3 Antikörper (IAA, GAD, IA-2) 100% für die nächsten 5 Jahre beträgt, unabhängig vom ICA Status (Verge et al.;1996).

1.3.4 DIE ROLLE DER LYMPHOZYTEN

Die histologischen Befunde der Langerhans'schen Inseln zum Zeitpunkt der Insulitis bei Typ I Diabetikern legen den Schluß nahe, daß es sich bei der Zerstörung der β -Zelle um einen sequentiellen Prozeß handelt, der durch die Interaktion immunkompetenter Zellen und β -Zellen zustande kommt. Zu dieser Fragestellung gibt es eine Vielzahl von Untersuchungen. Von besonderer Bedeutung sind hier bisher Tiermodelle, in denen sich die Rolle einzelner Lymphozytenpopulationen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachten lassen.

Als besonders geeignet erweisen sich NOD-Mäuse sowie BB-Ratten. Die NOD-Maus, 1980 von Makino etabliert, entwickelt im Alter von etwa 12 Wochen spontan einen insulinpflichtigen Diabetes mellitus, mit deutlicher Präferenz der weiblichen Tiere (Makino et al. 1980). Wie beim Menschen beobachtet man bei der Maus genetisch bedingte Auffälligkeiten der MHC Moleküle der Klasse II (Bell et al., 1989), sowie eine dem Ausbruch der Erkrankung vorausgehende Insulitis (Miyazaki, 1985). Die BB-Ratte entwickelt einen Typ I Diabetes aufgrund einer genetisch bedingten Polyautoimmunität einhergehend mit einer T-Zelllymphopenie (Pickup et al. 1991).

Sowohl bei BB-Ratten als auch bei NOD-Mäusen läßt sich durch neonatale Thymektomie die Entwicklung des Diabetes verhindern (Ogawa, 1985; Like, 1982). Denselben Effekt hat eine *in vivo* Behandlung von BB-Ratten mit monoklonalen Antikörpern gegen T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (Like, 1986).

Weitere Beweise für die zentrale Rolle der T-Lymphozyten in der Pathogenese liefern Transferversuche mit NOD-Mäusen und BB-Ratten. Bendelac transferiert 1987 Milzzellen von diabetischen weiblichen NOD-Mäusen in neugeborene NOD-Mäuse beiderlei Geschlechts, und kann so das vorzeitige Auftreten eines insulinpflichtigen Diabetes mellitus auslösen. Dies gelingt nicht, wenn die Empfänger älter als drei Wochen oder die Spender nicht-diabetisch sind. Weiterhin wird deutlich, daß für einen erfolgreichen Diabetes-Transfer CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten erforderlich sind, da Transferversuche mit jeweils nur einer Subpopulation mißlingen (Bendelac et al. 1987). Es gibt jedoch auch Berichte über

die Auslösung eines Diabetes durch isolierten Transfer von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Lymphozyten

Hinweise für die spezifischen Aufgaben der T-Lymphozytensubpopulationen liefert die Klonung von T-Lymphozyten, die aus der Insulitis frisch diabetischer NOD-Mäuse isoliert wurden.

Nagata und Yoon etablieren 1992 sechs CD4⁺ und drei CD8⁺ T-Zellklone aus der Insulitis von akut diabetischen NOD-Mäusen. Die CD4⁺ Zellklone zeigen *in vivo* wohl proliferative, jedoch keinerlei lytische Aktivität gegenüber den Inselzellen. Nur eine enge Anlagerung an die Inselzellen ist elektronmikroskopisch zu beobachten. Demgegenüber zeigen alle CD8⁺ Zellklone pseudopodiaartige Vorwölbungen selektiv in die β -Zellen, und zerstören sie letztendlich in einem MHC I abhängigen Prozeß.

Daher liegt nahe, daß beide T-Zellpopulationen interagieren müssen, um die Zerstörung der β -Zellen zu erreichen. Dabei muß eine zeitliche Abfolge vorliegen, denn es gelingt nicht, trotz nachgewiesener lymphozytärer Infiltration, CD8⁺ T-Zellklone aus NOD-Mäusen zu isolieren, die jünger als zehn Wochen sind, wohl aber CD4⁺ T-Zellklone (Nagata und Yoon et al. 1992).

Andere Autoren berichten über CD4⁺ T-Zellklone, die protektive Eigenschaften aufweisen. Durch Injektion dieser Klone in NOD-Mäuse vor der Diabetes-Manifestation läßt sich die spontane Entwicklung des Diabetes verhindern. Auch kommt es nicht zum Auftreten einer Insulitis (Reich, 1989; Boitard, 1989).

Im Gegensatz dazu generiert Pankewycz aus der frühen Insulitis von noch nicht diabetischen NOD-Mäusen einen CD8⁺ T-Zellklon mit protektiven Eigenschaften, und einen CD4⁺ Klon, der bei Transfer in noch nicht-diabetische NOD-Mäuse den Ausbruch des Diabetes beschleunigt (Pankewycz et al. 1991).

Die Ergebnisse zeigen, daß in den Inseln frisch diabetischer NOD-Mäuse sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Lymphozyten existieren.

Der Ausbruch des Diabetes scheint dabei abhängig zu sein von den Interaktionen zwischen diesen Populationen und dem Ungleichgewicht zwischen potentiell zytotoxischen und immunoregulatorischen T-Lymphozyten in den Infiltraten der Langerhans'schen Inseln.

Eine wichtige Rolle im Zusammenspiel der verschiedenen Zellpopulationen der Insulitis scheinen die Makrophagen zu spielen, die bei der BB-Ratte die ersten um die Inseln akkumulierenden Zellen sind (Voorbij et al.,1989). Ihre Rolle könnte in der Aufbereitung und Präsentation von Antigenen liegen, oder auch in einer direkten Zerstörung von β -Zellen durch Freisetzung von Zytokinen und Radikalen. Der Ausbruch des Diabetes in NOD-Mäusen kann durch Behandlung mit selektiv für Makrophagen toxischen Silicia Partikeln verhindert werden (Lee et al.,1988). Durch Blockade der die Adhäsion der Makrophagen vermittelnden Rezeptoren mittels Antikörpern wird auch der Transfer von Diabetes in NOD- Mäuse verhindert (Hutchings, 1990).

1.4 ZIEL DER ARBEIT

Der Diabetes mellitus Typ I beruht auf einer immun-medierten Destruktion der Insulin produzierenden β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas. An dieser Zerstörung sind T-Lymphozyten maßgeblich beteiligt. Die Strukturen der β -Zellen, die für die Lymphozyten als Ziel-Antigen wirken und damit den Autoimmunprozess auslösen, sind bislang nicht bekannt.

Ziel dieser Arbeit war der Nachweis von T-Lymphozyten, die spezifisch auf in der Nahrung vorhandene bzw. körpereigene Antigene reagieren, sowie die Bildung antigenspezifischer T-Zelllinien. Weiterhin war Gegenstand der Untersuchung, ob sich in dieser Hinsicht Patienten mit Diabetes mellitus Typ I von Verwandten 1.Grades und von gesunden Kontrollpersonen unterscheiden.

Dazu wurden periphere Lymphozyten frisch manifestierter Typ I Diabetiker, und Lymphozyten von mit Typ I Diabetikern Verwandten 1. Grades isoliert und untersucht. Als Vergleich dienten Lymphozyten gesunder Kontrollpersonen.

Die hier untersuchten Antigene waren die in der Nahrung vorkommenden Proteine Bovines Serum Albumin (BSA) sowie β -Casein, für die eine Assoziation mit der Entstehung des Typ I Diabetes seit langem bekannt ist. Weiterhin wurde die Reaktivität der Lymphozyten auf ein weiteres, körpereigenes Antigen untersucht, das Insulin, welches zumindest bei der Ausbildung der humoralen Autoimmunität eine zentrale Rolle in der Entstehung des Typ I Diabetes einnimmt.

Als Kontrollantigen diente Tetanol, das durch regelhafte Impfung in der Bevölkerung ein bekanntes Antigen darstellt.

Für diese Arbeit war es nötig, sowohl theoretisch als auch praktisch viele sehr diffizile immunologische Arbeitstechniken zu erlernen und zu beherrschen, sowie einen eigenen Versuchsaufbau zu generieren (s.a. Kapitel 3). Die Grundlagen für diese Arbeit erlernte ich in den Niederlanden bei Dr. Bart Otto Roep am Department für Immunohematology und Bluttransfusion der Universität Leiden.

2 MATERIAL

2.1 HUMANE LYMPHOZYTEN UND AUTOLOGE SEREN

Die Lymphozyten und Seren von insgesamt 41 Diabetikern, Verwandten 1. Grades und gesunden Kontrollpersonen wurden verwendet.

Tabelle 1: Typ I Diabetiker und Verwandte 1. Grades

FALL – NR.	GESCHLECHT	ALTER [a]	ICA – TITER [JDF – Units]	DIABETES
Verwandte 1. Grades				
1	männlich	21	negativ	nein
2	männlich	24	negativ	nein
3	männlich	54	negativ	nein
4	männlich	26	negativ	nein
5	weiblich	43	negativ	nein
6	weiblich	53	grenzwertig	nein
7	weiblich	28	positiv	nein
Frisch manifestierte Typ I Diabetiker				
8	weiblich	53	positiv	ja
9	männlich	34	positiv	ja
10	weiblich	43	positiv	ja
11	männlich	24	positiv	ja
12	männlich	14	positiv	ja
13	männlich	21	positiv	ja
14	weiblich	27	positiv	ja
15	männlich	21	positiv	ja
16	weiblich	19	positiv	ja
17	männlich	22	positiv	ja
18	männlich	25	grenzwertig	ja
19	weiblich	37	grenzwertig	ja
20	männlich	28	negativ	ja
21	männlich	25	negativ	ja
22	männlich	39	negativ	ja
23	männlich	44	negativ	ja
24	weiblich	35	negativ	ja

Tabelle 2 : Kontrollpersonen

FALL – NR.	GESCHLECHT	ALTER [a]	ICA – TITER [JDF – Units]	DIABETES
Kontrollpersonen				
25	weiblich	26	negativ	nein
26	männlich	24	negativ	nein
27	weiblich	27	negativ	nein
28	weiblich	25	negativ	nein
29	weiblich	30	negativ	nein
30	männlich	26	negativ	nein
31	weiblich	24	negativ	nein
32	männlich	25	negativ	nein
33	weiblich	25	negativ	nein
34	weiblich	28	negativ	nein
35	männlich	27	negativ	nein
36	männlich	56	negativ	nein
37	weiblich	53	negativ	nein
38	weiblich	22	negativ	nein
39	weiblich	26	negativ	nein
40	männlich	28	negativ	nein
41	männlich	28	negativ	nein

Alle getesteten Personen waren kaukasischen Ursprungs. Die Typ I Diabetiker wurden an der Medizinischen Klinik III und Poliklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen betreut. Es wurden 17 frisch manifestierte Typ I Diabetiker untersucht, wobei die Blutentnahme innerhalb der ersten zwei Wochen nach Manifestation erfolgte.

Weiterhin wurden sieben Verwandte 1.Grades von Typ I Diabetikern untersucht. Die 17 Kontrollpersonen stammten alle aus dem Umfeld von Gießen. Sie wiesen keinen Typ I Diabetiker in der Familie auf, und hatten zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Zeichen einer Infektion.

Die ICA-Titerbestimmungen erfolgten im Immunologischen Labor der Medizinischen Klinik III und Poliklinik der Universität Gießen durch eine indirekte Immunfluoreszenz auf unfixiertem, frisch gefrorenem Pankreas der Blutgruppe Null. Die Titer sind angegeben in JDF-Units.

Alle untersuchten Personen waren mit der Blutentnahme und der Verwendung ihrer Zellen im Rahmen einer Dissertation einverstanden.

2.2 GERÄTE

Instrumente und Verbrauchsartikel waren autoklavierbar bzw. lagen in steriler Form vor, soweit sie für Zellkulturen verwendet wurden.

Autoklav, Fa. Webeco

Bechergläser, Fa. Braun

Brutschrank, Typ B 5060 EC - CO₂, Fa. Heraeus

Bunsenbrenner Touch-o-Matic

Eppendorfhütchen, Fa. Eppendorf

Filteraufsätze :

- Filteraufsätze für Einmalspritzen, Porengröße 0,45 µm, Fa. Schleicher & Schnell
- Bottle Top Filter, Porengröße 0,45 µm, Fa. Falcon

Gamma - Counter MR 252, Fa. Kontron

Gefrierschränke :

- handelsüblicher Tiefgefrierschrank (- 20 °C), Fa. Bosch
- -80°C - Gefrierschrank, Fa. Bosch

Glaskolben und Rührstab (Potter), Fa. Braun

Kanülen, 18G, 21G, Fa. Braun

Kühlschrank, handelsüblicher Kühlschrank, 4°C, Fa. Bosch

Kulturgefäße :

- Gewebekulturplatte 24 - Loch, mit Deckel, Fa. Costar
- Gewebekulturplatte 96 - Loch, U - Form, mit Deckel, Fa. Costar

Mikropipettierhilfe, Fa. Hirschmann

Mikroskope :

- Invertmikroskop, Fa. Olympus
- Lichtmikroskop, Fa. Leitz

Neubauer - Zählkammer, Fa. Neubauer

Pipetten (einzeln steril verpackt) :

- Auslaufpipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, Fa. Sarstedt
- Transferpipetten (Pasteurpipetten), 3,5 ml, Fa. Sarstedt
- Eppendorfpipetten, variabel 10 - 100 μ l, 100 - 1000 μ l, Fa. Eppendorf

Pipettenspitzen :

- gelb, autoklavierbar, Aufnahmevolumen 1-100 μ l, Fa. Sarstedt
- blau, autoklavierbar, Aufnahmevolumen 101-1000 μ l, Fa. Sarstedt
- Combitips, 0,5 ml, 1,25 ml, 2,5 ml, Fa. Eppendorf

Pipettierhilfe Pipettus Standard, Fa. Hirsch

Röhrchen mit Schraubverschluß :

- 50 ml, Fa. Greiner
- 12 ml, Fa. Greiner
- Kryo - Röhrchen 1,0 ml, 4,5 ml, Fa. Nunc

Schüttler, Fa. Braun

Spritzen :handelsübliche sterile Einmalspritzen, Fa. Braun :

- 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml Volumina

Sterilwerkbank Microflow, Fa. Stolco

Ultraschall - Homogenisator, Fa. Sartorius

Vortexer Reax 2000, Fa. Heidolph

Waage (digitale Feinwaage), Fa. Sartorius

Wasserbad, Fa. Kottermann

Zentrifugen :

- Kühlzentrifuge J - 6B, Fa. Beckmann

2.3 REAGENZIEN

Reagenzien und Lösungen lagen in steriler Form vor, soweit sie für Zellkulturen verwendet wurden.

Aqua ad iniectionabile 1000 ml, Fa. Braun

Analytic Aquasafe 300 plus, Fa. Zinsser

Äthanol 80 %ig, Fa. Hoechst

Bovines Serumalbumin, Fa. Sigma

β - Casein, Fa. Sigma

Dimethylsulfoxid DMSO, Fa. Biochrom KG

EDTA, Fa. Serva

Eosin, Fa. Merck

Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert, auf Viren und Mykoplasmen untersucht, Fa. Gibco

Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) 10 x, ohne NaHCO_3

Fa. Gibco

Hepes, Solution 1M, Fa. Gibco

Humaninsulin : Normalinsulin, 40 Einheiten / ml, Fa. Lilly

Kochsalzlösung, isoton, Fa. Braun

Lymphocult T - LF, lektinfrei, Fa. Biotest

Lymphoprep, 1,077 Dichte, Fa. Nycomed

Natriumhydrogencarbonat, Fa. Gibco

PBS, Phosphat-Puffer-Konzentrat pH $7,4 \pm 0,1$,

Biologische Arbeitsgemeinschaft GmbH in Lich

Phytohämagglutinin L, lymphozytenstimulierend, Fa. Biochrom

Tetanol, Tetanus - Adsorbat - Impfstoff, 75 IE / 0,5 ml, Behring

[6 - 3 H] Thymidin, Amersham

Vetren 200 (200 IE Heparin - Natrium), Promonta

Zellkulturmedium : Iscove's Modifiziertes Dulbecco's Medium, Gibco

2.4 LÖSUNGEN UND MEDIEN

Die Lösungen und Zellkulturmedien sind nach Versuchsansätzen geordnet.

2.4.1 GEWINNUNG PERIPHERER, HUMANER LYMPHOZYTEN

Hank`s Lösung :

900 ml Aqua ad injectabile werden mit 100 ml Hanks Balanced Salt Solution (HBSS, 10fach) vermischt. Die Lösung kann im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

Zellkulturmedium : Iscove´s Modifiziertes Dulbecco´s Medium

Das Pulvermedium IMDM wird bei Raumtemperatur vorsichtig in 950 ml Aqua ad injectabile gelöst. Es werden 3,024 g Natriumbicarbonat hinzugefügt. Anschließend wird das Medium über Bottle Top Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert und steril in autoklavierte 100 ml Glasflaschen überführt. Das Medium wird bei 4 ° C gelagert.

Zur Kultivierung der Lymphozyten wird dem Medium 10% gepooltes und hitzeinaktiviertes Humanserum zugefügt.

2.4.2 AUSZÄHLUNG UND ÜBERPRÜFUNG DER VITALITÄT DER GEWONNEN LYMPHOZYTEN

Eosin-Lösung :

1 g Eosin-Trockenpulver werden in 99 ml Aqua dest. gelöst.

2.4.3 T-ZELLININENGENERATION UND LYMPHOZYTENPROLIFERATIONSTEST; HERSTELLUNG DER ANTIGEN- UND LEKTIN-LÖSUNGEN

Bovines Serum Albumin-Lösungen

Es werden 8 mg bovines Serumalbumin (BSA)- Trockenpulver abgewogen und in 8 ml komplettem Medium (IMDM mit 10% Humanserum) gelöst. Diese Lösung wird durch einen Mikroporenfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm gefiltert, um eine sterile Lösung zu erhalten.

Diese Stammlösung der Konzentration 1 mg BSA pro ml Lösung wird mit komplettem IMDM auf Konzentrationen von 100 µg/ml, 25 µg/ml, 20 µg/ml und 5 µg/ml verdünnt. Die Lösungen werden in Volumina von 0,5 ml, 2 ml und 4 ml in Einfrierampullen portioniert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

Die Konzentrationskontrolle wurde durchgeführt im Institut für Klinische Chemie der Justus-Liebig Universität Gießen (Leiter Prof. Dr. Dr. Katz) mittels der Proteinbestimmungsmethode nach Lowry.

Casein-Lösungen

Es werden 50 mg β-Casein-Trockenpulver abgewogen und in 1 ml 1M Natronlauge gelöst. Dazu werden 9 ml IMDM gegeben. Diese Lösung wird durch einen Mikroporefilter (Porengröße 0,2 µm) gefiltert.

Diese Stammlösung der Konzentration 5 mg Casein pro ml Lösung wird mit komplettem IMDM auf Konzentrationen von 100 µg/ml, 25 µg/ml, 20 µg/ml und 5 µg/ml verdünnt. Die Lösungen werden in Volumina von 0,5 ml, 2 ml und 4 ml in Einfrierampullen portioniert und bis zum Verbrauch bei -20°C gelagert.

Die Konzentrationskontrolle wurde durchgeführt im Institut für Klinische Chemie der Justus-Liebig Universität Gießen (Leiter Prof. Dr. Dr. Katz) mittels der Proteinbestimmungsmethode nach Lowry.

Insulin-Lösungen

Verwendet wird humanes Normal-Insulin der Firma Lilly der Konzentration 40 Einheiten pro ml, entsprechend 1,4 mg Insulin pro ml.

Das Insulin wird mit komplettem IMDM verdünnt bis Konzentrationen von 250 µg/ml und 25 µg/ml erreicht sind. Diese Konzentrationen werden, portioniert in Einfrierampullen, bei -20°C eingefroren.

Tetanol-Lösungen

Als Stammlösung wird handelsüblicher Tetanol-Impfstoff der Firma Behring verwendet. Diese Lösung, entsprechend 100% Tetanol, wird mit komplettem Medium auf Konzentrationen von 1% und 1,5% Tetanol verdünnt, und in Portionen von 0,5 ml, 2 ml und 4 ml in Einfrierampullen portioniert. Die Einfrierampullen werden bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

Phytohämagglutinin (PHA)- Lösung

Es wird das PHA-Trockenpulver (1,2 mg) in 5 ml Aqua destilata gelöst. Diese Stammlösung mit 240 µg PHA pro ml Lösung wird mit komplettem Medium auf eine Konzentration von 2 µg PHA pro ml Lösung verdünnt, und in Volumina von 0,5 ml, 2 ml und 4 ml in Einfrierampullen portioniert. Die Einfrierampullen werden bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

3 METHODEN

3.1 ISOLIERUNG HUMANER, PERIPHERER LYMPHOZYTEN

Die Isolierung der mononukleären Zellen aus Vollblut erfolgt nach der Methode von Boyum (Boyum,1976).

Durch Punktion einer peripheren Vene werden 20 ml Vollblut steril gewonnen. Zur Hemmung der Blutgerinnung wird das Blut mit 1 ml Vetren (100 I.E. Heparin) versetzt.

Das heparinisierte Vollblut wird im Verhältnis 1:1 mit Hank's Lösung in einem sterilen Zentrifugenröhrchen vermischt.

Jeweils 20 ml dieses Blut-Hank's Gemisches werden vorsichtig auf 20 ml Lymphoprep in zwei weiteren Zentrifugenröhrchen aufgeschichtet, wobei eine Durchmischung der beiden Phasen vermieden wird.

Im Anschluß daran wird bei 1000 x g ohne Bremse für 30 Minuten zentrifugiert.

Aufgrund der unterschiedlichen Dichte beider Phasen kommt es durch die Zentrifugation zur Anreicherung der Lymphozyten in der Interphase, die in Form einer weißen Scheibe zwischen Trennlösung und Plasma liegt.

Im Bodensatz befinden sich Erythrozyten und Granulozyten.

Die Lymphozyten werden mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt.

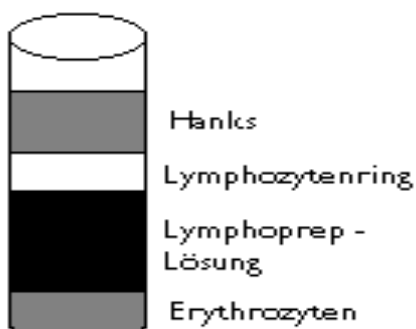


Abb.1:

Schichten der Blutkomponenten nach Dichtegradientenzentrifugation

Da die Lymphozyten-Lösung noch Gradienten- und Thrombozyten-Beimengung enthält, erfolgen zur weiteren Reinigung zwei Waschvorgänge in Hank`s Lösung bei 400 x g bzw. 300 x g für jeweils 10 Minuten.

Die Lymphozyten befinden sich anschließend als Pellet am Boden, die Thrombozyten und das Lymphoprep im Überstand, der verworfen wird.

Das lymphozytenreiche Pellet wird in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und mittels Vortexer vermischt. Anschließend wird die Zell-Konzentration durch Auszählung in der Neubauer-Kammer bestimmt.

3.2 AUSZÄHLUNG UND ÜBERPRÜFUNG DER VITALITÄT DER GEWONNENEN LYMPHOZYTEN

Der gut durchmischten Lymphozytensuspension werden steril 20 µl entnommen und mit 40 µl Eosin-Lösung versetzt, sodaß eine 3-fache Verdünnung entsteht. Nach gründlicher Durchmischung wird mit dieser Lösung eine Neubauer-Zählkammer gefüllt. Die vier Felder mit einem Gesamtvolumen von 0,4 µl werden meanderförmig unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

Die Anzahl der gezählten Zellen entspricht der Zellzahl in 0,4 µl Zell-Eosin-Lösung. Durch Multiplikation mit dem Faktor 2,5 erhält man die Zellzahl in 1 µl Zell-Eosin-Lösung. Durch Multiplikation mit dem Faktor 1000 erreicht man eine Umrechnung auf 1 ml.

Die errechnete Zahl wird mit dem Faktor 3, entsprechend der Verdünnung mit Eosin-Lösung, und mit dem Faktor 10, entsprechend der Resuspension der Lymphozyten in 10 ml Kulturmedium, multipliziert.

Der errechnete Wert entspricht der Anzahl der isolierten Lymphozyten.

Mit Hilfe der Eosin-Lösung kann weiterhin die Vitalität der isolierten Lymphozyten überprüft werden. Der Farbstoff Eosin durchdringt nur defekte Zellmembranen. Dagegen kann er die intakte Zellmembran nicht passieren. Avitale Zellen färben sich daher rot an. Weiterverarbeitet werden nur Zellsuspensionen mit mindestens 98% vitalen Zellen.

3.3 GEWINNUNG VON HUMANSERUM

Mittels Venenpunktion werden von dem jeweiligem Spender 100 ml humanes Vollblut gewonnen, das nach 15 min, nach Ablauf der vollständigen Gerinnung, bei 2500 x g für 10 Minuten zentrifugiert wird.

Nach der Zentrifugation haben sich die korpuskulären Bestandteile des Blutes als Bodensatz abgesetzt, während man das Serum als den Überstand sammeln kann.

3.4 HERSTELLUNG EINES SERUMPOOLS

Als Spender werden männliche Personen im Alter von 20 bis 40 Jahren mit den folgenden Voraussetzungen ausgewählt :

- keine Bluttransfusionen in der Eigenanamnese
- keine Organtransplantation in der Eigenanamnese
- keine aktuell bestehenden Infektionen
- keine Erkrankung an Typ I Diabetes
- keine Erkrankung an Typ I Diabetes bei Verwandten 1.Grades
- kein nachweisbarer ICA-Titer

Von neun Spendern wird Humanserum auf die oben beschriebene Art gewonnen.

Von dem Serum eines jeden Spenders wird eine Probe zur Bestimmung von ICA-Antikörpern abgenommen. Nur ICA-negatives Serum wird weiter verwendet.

Das Serum wird zur Inaktivierung von Komplement für 30 Minuten in ein Wasserbad mit 56°C Temperatur gegeben.

Von jeweils 3 Spendern werden Serumproben miteinander vermischt, und mittels einer gemischten Lymphozytenkultur auf Zytotoxizität untersucht. Im Anschluß daran können die unbedenklichen Seren vollständig miteinander vermischt, in Einfrierampullen portioniert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert werden.

Alle geschilderten Arbeitsschritte werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.5 DIE GEMISCHTE LYMPHOZYTENKULTUR ZUR ÜBERPRÜFUNG DES GESAMMELTEN SERUMS AUF ZYTOTOXIZITÄT

In der gemischten Lymphozytenkultur werden Lymphozyten mit allogenen Lymphozyten als Stimulus kultiviert. Dabei werden die zur Stimulation verwendeten Zellen durch Bestrahlung reaktionsunfähig gemacht. Infolge von Differenzen zwischen den HLA-Antigenen kommt es zu einer Proliferation der unbestrahlten Lymphozyten.

Diese gemischte Lymphozytenkultur wird in 3 verschiedenen Ansätzen durchgeführt :

- a) in reinem Kulturmedium
- b) in Kulturmedium mit Zusatz von fetalem Kälberserum
- c) in Kulturmedium mit Zusatz von dreifach gepooltem Humanserum.

Durch den Vergleich der Proliferationen der Lymphozyten in den verschiedenen Medien kann der Einfluß des Serums auf das Wachstum der Lymphozyten überprüft werden. Ein zytotoxisches Serum kann so identifiziert werden.

Zur Durchführung werden von drei zufällig ausgewählten Spendern Lymphozyten isoliert und auf eine Zellzahl von 2×10^6 / ml eingestellt. Jeweils die Hälfte der Zellen eines jeden Spenders wird mit 30 Gray bestrahlt (Kobalt-60-Quelle), sie dienen als Stimulatorzellen. Die nicht bestrahlten Zellen dienen als

Responderzellen.

Es werden jeweils 1×10^5 Responder-Zellen eines Spenders in 50 µl Medium ohne Serum-Zusatz mit Stimulator-Zellen eines anderen Spenders in gleicher Weise kokultiviert.

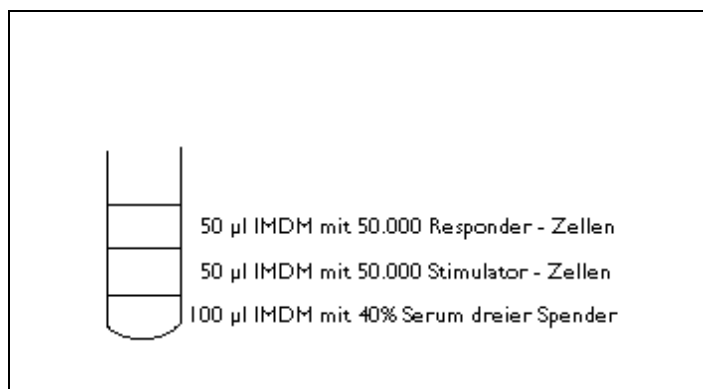


Abb.2: Ansatz der gemischten Lymphozytenkultur

Dem Ansatz werden 100 µl Medium zugegeben, in dem das gepoolte Humanserum enthalten ist. Die Endkonzentration des Serums beträgt 20%.

In gleicher Weise erfolgen Ansätze unter Verwendung von fetalem Kälberserum (ebenfalls in einer Endkonzentration von 20%) sowie auch ohne Zusatz von Serum.

Zur Kontrolle der Effektivität der Bestrahlung werden Stimulatorzellen aller Spender ohne Zusatz von Responderzellen miteinander kultiviert.

Die Kultivierung erfolgt in einer 96-Loch Platte, jeweils in Triplets.

Die Ansätze werden im Brutschrank bei 37°C , 95% Luft- 5% CO₂- Gemisch für fünf Tage kultiviert.

Sechzehn Stunden vor Ablauf der Kulturzeit werden die Ansätze mit 1 µCi 3H-Thymidin pro Loch markiert.

Die Zellen werden nach Ablauf der Kulturzeit mit einem halbautomatischen Zellerntegerät geerntet, und die Proben in einem Flüssig-Szintillations-Counter gemessen. Die dabei von den Zellen inkorporierte Radioaktivität, gemessen in counts per minute (cpm), stellt die Größe für die Proliferationsaktivität der Zellen dar.

Zeigen sich bei dem Vergleich der Ergebnisse keine relevanten Unterschiede zwischen dem Ansatz mit Humanserum im Vergleich zu dem mit fetalem Kälberserum, kann ein zytotoxischer Einfluß des getesteten Humanserums ausgeschlossen werden. Das Humanserum steht damit für die Herstellung eines Serum-Pools zur Verfügung.

Alle Schritte werden unter Beachtung der Sterilität durchgeführt.

3.6 KRYOKONSERVIERUNG VON LYMPHOZYTEN IN EINEM DIMETHYLSUFOXID-HALTIGEN MEDIUM

Nach der Isolation der Lymphozyten werden diese resuspendiert in IMDM-Medium mit 30% gepooltem und hitzeinaktiviertem Humanserum unter Einstellung einer Zellzahl von 10×10^6 / ml. Diese Zellsuspension wird für 30 Minuten auf Eis gekühlt.

Nach Ablauf der Kühlung wird zu der Zellsuspension in gleichem Volumen das Dimethylsulfoxid-Medium (IMDM mit 20% Dimethylsulfoxid (DMSO) und 30% gepooltem Humanserum) bei 4°C Tropfen für Tropfen hinzugefügt. Dafür werden auf Eis jeweils 500 µl Zellsuspension in die Einfrierampullen überführt und tröpfchenweise 500 µl des DMSO-Mediums hinzugegeben.

Dementsprechend erhält man in den Einfrierampullen ein Volumen von 1 ml mit 5×10^6 Zellen in einem Medium mit 10% DMSO und 30% Humanserum. Es erfolgt die sofortige Lagerung bei -70°C.

Am vierten Tag erfolgt die Umlagerung der Ampullen in flüssigen Stickstoff.

3.7 AUFTAUVORGANG DER LYMPHOZYTEN NACH DER KRYOKONSERVIERUNG

Die Einfrierampullen werden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und unter fließendem Wasser mit einer Temperatur von ungefähr 37°C bewegt, bis fast das gesamte Eis geschmolzen ist.

Die Zellsuspension wird anschließend sofort in 10 ml IMDM mit 30% gepooltem, hitzeinaktiviertem Humanserum überführt und für 10 Minuten bei 800 x g zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das Pellet in erneut 10 ml Medium gleicher Zusammensetzung wie oben resuspendiert. Nach vollständiger Resuspension der Zellen im Medium wird eine Probe der Zellsuspension zur

Bestimmung der Zellzahl entnommen. Anschließend erfolgt eine zweite Zentrifugation für 10 Minuten bei 800 x g.

Nach dieser Zentrifugation stehen die Zellen, die im Pellet enthalten sind, zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

3.8 BILDUNG ANTIGENSPEZIFISCHER T- ZELLINIEN

Nach der Isolation von Lymphozyten aus dem peripheren Blut des Probanden werden diese unter Einstellung einer Zellzahl von 1×10^6 / ml in IMDM mit 10% gepooltem und hitzeinaktiviertem Humanserum resuspendiert.

In einer 24-Loch-Platte werden pro Vertiefung 1×10^6 dieser Zellen in 1 ml komplettem IMDM kokultiviert mit jeweils einem der in der folgenden Tabelle angegebene Antigene.

Tabelle 3: Zur Bildung von Zelllinien verwendete Antigene

Antigen	Konzentration pro Vertiefung
Bovines Serum Albumin	100 µg
	25 µg
β-Casein	100 µg
	25 µg
Humaninsulin	250 µg
	25 µg

Alle Antigene sind jeweils in 1 ml komplettem Medium gelöst. Als Positiv-Kontrolle wird Tetanol eingesetzt. Dabei werden 1×10^6 Lymphozyten in 1 ml

komplettem IMDM mit 1 ml 1%-igem Tetanol kokultiviert, sodaß das Tetanol in einer Endkonzentration von 0,5% pro Vertiefung der 24-Loch-Platte vorliegt.

Als Negativ-Kontrolle dient ein Ansatz von 1×10^6 Lymphozyten in komplettem Medium ohne Antigenzusatz.

Die Ansätze erfolgen jeweils in Dupletts.

Die Kultivierung erfolgt in einem Brutschrank bei 37°C in einem Gemisch aus 95% Luft sowie 5% CO₂.

Am 4. Tag wird aus jeder Vertiefung vorsichtig von der Oberfläche her jeweils 1 ml Kulturmedium entnommen und ersetzt durch 1 ml komplettes IMDM, angereichert mit 40% Lymphocult-T als Quelle für Interleukin-2.

Das Zellwachstum wird weiterhin täglich unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und jeden zweiten Tag wird erneut jeweils 1 ml Medium ersetzt durch komplettes IMDM, angereichert mit 20% Lymphocult-T.

Bei Vollwachsen der Vertiefungen bzw. bei Umschlag des Farbindikators des IMDM als Zeichen für ein Anfallen von zu vielen sauren Stoffwechselprodukten, wird der Inhalt einer Vertiefung auf zwei Vertiefungen aufgeteilt, und wie oben geschildert weiterbehandelt.

Auf diese Weise werden die Zellen 5-7 mal mit Interleukin-2 kultiviert.

Hierdurch werden, ausgehend von den peripheren Lymphozyten der Testpersonen und der gesunden Kontrollpersonen, Zelllinien auf die verschiedenen o.g. Antigene gebildet.

Sie werden gesammelt und stehen jetzt für den Test auf antigenspezifische Proliferation zur Verfügung.

3.9 TEST AUF ANTIGENSPEZIFISCHE PROLIFERATION VON T-ZELLINIEN

Aus den peripheren Lymphozyten der Testpersonen und der gesunden Kontrollpersonen sind Zelllinien auf die für die Pathogenese des Typ I Diabetes möglicherweise relevanten Antigene gebildet worden.

Es werden nun die Zellen jeder Zelllinie erneut mit dem jeweiligem Antigen stimuliert. Dadurch soll getestet werden, ob eine antigenspezifische Proliferation erfolgt. Im Vergleich dazu werden die Zellen der Zelllinien mit dem Lektin Phytohämagglutinin (PHA) kokultiviert, um diese unspezifische Proliferation als Positiv-Kontrolle benutzen zu können. Ziel ist es, Unterschiede zwischen Test- und Kontrollpersonen zu untersuchen.

Der Ansatz erfolgt jeweils in Triplets in komplettem Medium (IMDM mit 10% Humanserum), in 96-Loch-Platten mit runden Vertiefungen.

Zunächst werden die Zellen jeder Zelllinie gesammelt und nach Auszählung auf eine Konzentration von 2×10^5 Zellen pro ml in komplettem IMDM eingestellt. Davon werden jeweils 50 μ l in die 96-Loch-Platte pipettiert, so daß 1×10^4 Zellen pro Vertiefung vorliegen.

Als antigen-präsentierende Zellen werden autologe bestrahlte Lymphozyten hinzugefügt. Durch die Bestrahlung haben sie die Fähigkeit verloren, zu proliferieren, können aber ihre Funktion als antigen-präsentierende Zellen noch wahrnehmen.

Dafür werden die zuvor eingefrorenen Lymphozyten der Test- und Kontrollpersonen aufgetaut, auf eine Zellzahl von 1×10^6 / ml eingestellt und mit 40 Gray (Kobalt-60-Quelle) bestrahlt. Anschließend werden sie mit einer Konzentration von 5×10^4 in 50 μ l komplettem IMDM der Kultur zugefügt.

Zuletzt wird der Kultur das jeweilige Antigen, gelöst in 50 µl komplettem Medium, dazugegeben.

Neben der Positivkontrolle mit PHA fungieren als Negativkontrollen Ansätze ohne Antigenzusatz sowie ohne bestrahlte Lymphozyten.

Der Ansatz ist im folgenden nochmals tabellarisch dargestellt.

Tabelle 4 : Ansatz des Lymphozytenproliferationsassays

T - Zellen einer Linie	T - Zellen einer Linie	T - Zellen einer Linie	T - Zellen einer Linie
+	+	+	
bestrahlte PBMC	bestrahlte PBMC	bestrahlte PBMC	
+	+		
spezifisches Antigen	PHA		

Zur Kontrolle der Effektivität der Bestrahlung werden die bestrahlten PBMC der verschiedenen Test - bzw. Kontrollpersonen miteinander kultiviert.

Auf diese Weise wird jede gebildete Zelllinie einzeln ausgetestet.

Dabei werden die spezifischen Antigene in den in der Tabelle dargestellten Konzentrationen eingesetzt.

Tabelle 5 : Verwendete Konzentrationen der Antigene im Lymphozytenproliferationstest

Zell - Linie, gebildet auf	Antigen-Konzentration im Test auf antigenspezifische Proliferation. Angaben jeweils pro Vertiefung, gelöst in 50 µl komplettem IMDM
Bovines Serum Albumin 100 µg/ml	Bovines Serum Albumin 1 µg/ml
Bovines Serum Albumin 25 µg/ml	Bovines Serum Albumin 0,25 µg/ml
β-Casein 100 µg / ml	β-Casein 1 µg
β-Casein 25 µg / ml	β-Casein 0,25 µg
Insulin 250 µg / ml	Insulin 25 µg
Insulin - 25 µg / ml	Insulin 0,25 µg
Tetanol 0,5 % Endkonzentration	Tetanol 0,5 % Endkonzentration
Medium	kein Zusatz

Die Inkubation der Kulturen erfolgt in einem Brutschrank bei 37°C in einem 95% Luft, 5% CO₂ - Gemisch für drei Tage.

Sechzehn Stunden vor Ablauf der Kultivierungsdauer werden zu allen Vertiefungen 1 µCi 3-H-Tymidin in 50 µl komplettem IMDM zugefügt.

Die Zellen werden nach Ablauf der Kultivierungsdauer mit einem halbautomatischen Zellertegerät geerntet, und die Proben in einem Flüssig-Szintillations-Counter gemessen.

Die dabei von den Zellen inkorporierte Radioaktivität, gemessen in counts per minute (cpm), stellt die Größe für die Proliferationsaktivität der Zellen dar.

Weiterhin wird zum Ausschluß des Medieeinflusses der Proliferationsindex (PI) gebildet. Dieser ist der Wert der 3H-Thymidin-Inkorporation in Anwesenheit des Antigens dividiert durch die Inkorporation in Abwesenheit des Antigens.

4 ERGEBNISSE

Die Einteilung der untersuchten Personen erfolgte in frisch manifestierte Diabetiker (n = 17), Verwandte 1. Grades (n = 7) und gesunde Kontrollpersonen (n = 17) wie in Kapitel 2 beschrieben.

4.1 ALTERSVERTEILUNG DER GRUPPEN

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht wurden 17 frisch manifestierte Typ I Diabetiker untersucht, wobei die Blutentnahme innerhalb der ersten zwei Wochen nach Manifestation bzw. Insulingabe erfolgte. Das Durchschnittsalter der Diabetiker betrug 30,6 Jahre (Standardabweichung $\pm 10,5$ Jahre).

Weiterhin wurden sieben Verwandte 1. Grades von Typ I Diabetikern untersucht. Ihr Durchschnittsalter betrug 35,6 Jahre (Standardabweichung $\pm 14,1$ Jahre).

Als Kontrollpersonen dienten Nicht-Diabetiker ohne Typ I Diabetiker in der Familienanamnese. Ihr Durchschnittsalter betrug 29,4 Jahre (Standardabweichung 9,6 Jahre).

Die o. g. Gruppen wurden mittels einfacher Varianzanalyse hinsichtlich der Altersverteilung untersucht. Die Altersverteilung der Gruppen war nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,45$).

4.2 GESCHLECHTSVERTEILUNG DER GRUPPEN

Die Verteilung der Geschlechter in den untersuchten Gruppen entsprach der Zufallsverteilung, wie mit dem Chi^2 -Test für Kontingenztafeln nachgewiesen werden konnte ($p = 0,38$).

Tabelle 6 : Kontingenztabelle der Geschlechtsverteilung in den einzelnen Gruppen

	männlich	weiblich	Summe
Manifeste Typ I Diabetiker	11 64,7	6 35,3	17 41,5
Kontrollpersonen	7 41,2	10 58,8	17 41,5
Verwandte 1. Grades	4 57,1	3 42,9	7 17,1
Summe	22 53,7	19 46,3	41 100

4.3 INSELZELL-ANTIKÖRPER-BESTIMMUNG

Von den 17 frisch manifestierten Typ I Diabetikern wiesen 10 Personen (58,8%) erhöhte ICA-Titer auf, deren Höhe zwischen 10 und 160 JDF Units lagen. Zwei Personen (11,7%) hatten mit 5 JDF-Units einen grenzwertigen Titer und bei 5 Personen (29,4%) waren keine Inselzell-Antikörper bestimmbar.

Bei den 7 Verwandten 1. Grades ergaben die ICA-Titerbestimmungen folgende Verteilung : eine Person (14,3%) hatte mit 40 JDF-Units einen positiven ICA-Titer. Bei einer Person (14,3%) bestand ein mit 5 JDF-Units grenzwertiger Titer und bei fünf Personen (71,4%) konnten keine Inselzell-Antikörper nachgewiesen werden.

Alle Kontrollpersonen waren ICA negativ.

4.4 LYMPHOZYTENZAHLEN

Aus dem peripheren Venenblut der o.g. Gruppen wurden die Lymphozyten isoliert, ausgezählt und verglichen in Bezug auf ihre Zellzahl aus 20 ml Venenblut.

Die mittleren Anzahlen frisch isolierter peripherer mononukleärer Zellen bezogen auf 20 ml Venenblut wurden mittels Kruskal-Willis 1-Way Test verglichen. Die Anzahl der PBMC zwischen den untersuchten Gruppen waren nicht signifikant ($p = 0,99$).

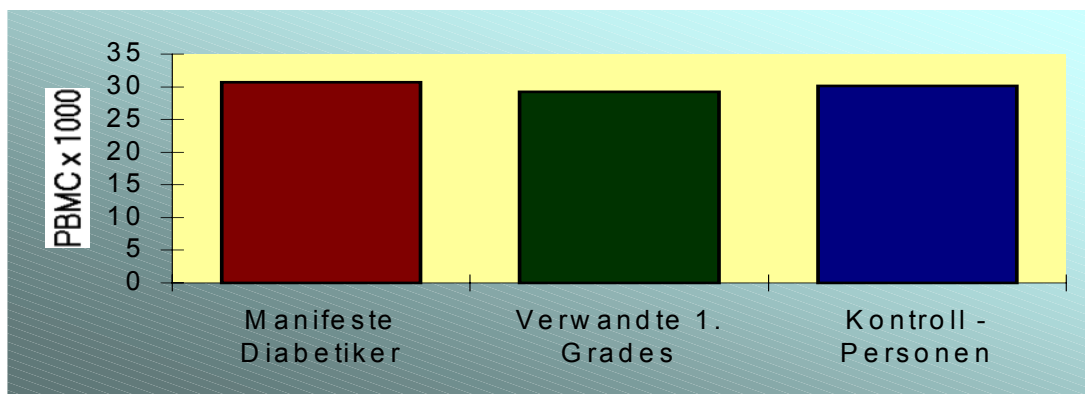


Abb. 3 Mittlere Anzahlen frisch isolierter peripherer mononukleärer Zellen der verschiedenen Gruppen

Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ergaben sich beim Vergleich der Zellzahlen von Frauen und Männern insgesamt, sowie innerhalb der einzelnen Gruppen. Auch altersspezifische Unterschiede waren nicht nachzuweisen.

Die Gruppe der Diabetiker wurde anhand der ICA-Titer in 3 Gruppen unterteilt : ICA-Titer < 10 JDF-Units ($n = 7$), ICA-Titer ≥ 10 ($n = 5$) und ICA-Titer negativ ($n = 5$).

Aus dem peripheren Blut der Gruppe mit ICA-Titern < 10 JDF-Units ließen sich im Mittel $25,14 \times 10^6$ periphere mononukleäre Zellen ($SD \pm 11,6 \times 10^6$) pro 20 ml isolieren, in der Gruppe mit ICA-Titern ≥ 10 waren es im Mittel $32,32 \times 10^6$

Zellen ($SD \pm 5,74 \times 10^6$) sowie $34,14 \times 10^6$ Zellen ($SD \pm 16,6$) für die ICA-negativen Diabetiker. Im Kruskal-Wallis-1-Way Test für mehrere Stichproben erreichten die Unterschiede kein Signifikanzniveau ($p = 0,4$).

4.5 KULTIVIERUNG DER ISOLIERTEN LYMPHOZYTEN

Nach der Isolation von Lymphozyten aus dem peripheren Blut der Probanden nach der Methode von Boyum (Boyum, 1976) wurden diese unter Einstellung einer Zellzahl von $1 \times 10^6 / \text{ml}$ in IMDM kultiviert. Die Kultivierung erfolgt in einem Brutschrank bei 37°C in einem 95%- Luft- 5%- CO_2 - Gemisch.

Zur Optimierung der Kulturbedingungen wurde das Kulturmedium mit 10% Serum (komplettes IMDM) ergänzt. Zum Ausschluß von xenogenen Interaktionen wurde dabei Humanserum statt z.B. fetalem Kälberserum verwendet. Um spezifische Interaktionen des Humanserums etwa eines Spenders auszuschließen, wurde ein Serumpool aus Serum von männlichen Spendern im Alter von 20 bis 40 Jahren gebildet. Frauen wurden als Spender wegen möglicher hormoneller zyklischer Einflüsse ausgeschlossen. Da der zytotoxische Einfluß von Seren diabetischer Patienten bekannt ist (Lernmark et al., 1978), durften die Spender weder an Diabetes erkrankt, mit Typ I Diabetikern verwandt, noch ICA-positiv sein.

Weiterhin wurden Spender ausgeschlossen, wenn sich in der Eigenanamnese eine Bluttransfusion oder Organtransplantation eruieren ließen. Auch eine aktuelle Infektion führte zum Ausschluß. Zur Inaktivierung von Komplement wurde eine Hitzeinaktivierung des Serums durchgeführt. Um zytotoxische Einflüsse des Serums auszuschließen, wurde eine gemischte Lymphozytenkultur durchgeführt.

4.6 ZELLWACHSTUM

Das Zellwachstum wurde täglich unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Dabei wurde auf Zelldichte, Zellform und Ausbildung von Zellausläufern geachtet. Bei Vollwachsen der Vertiefungen bzw. bei Umschlag des Farbindikators des IMDM als Zeichen für ein Anfallen von zu vielen sauren Stoffwechselprodukten, wird der Inhalt einer Vertiefung auf zwei Vertiefungen aufgeteilt.

4.7 DIE GEMISCHTE LYMPHOZYTENKULTUR

(LYMPHOZYTENTRANSFORMATIONSTEST; LTT)

Die gemischte Lymphozytenkultur wurde durchgeführt im Rahmen des Poolings von humanem Serum, zum Ausschluß toxischer oder proliferationsfördernder Einflüsse des gepoolten humanen Serums. Die Gewinnung und das Arbeiten mit humanem Serum diente der Vermeidung der Verwendung von fetalem Kälber Serum, das an sich ja schon ein potenzielles Antigen darstellt.

Kultiviert man Lymphozyten zweier genetisch unterschiedlicher Individuen für fünf bis sechs Tage, unterliegen diese Zellen einer blastischen Transformation, wobei sie an Größe zunehmen, eine einfachere Gestalt annehmen und die Produktion von DNA beginnen (Brain et al., 1964). Das Ausmaß dieser Transformation kann gemessen werden, indem man, einige Stunden bevor die Zellen geerntet werden, radioaktiv markiertes Thymidin zur Kultur hinzufügt, und dann die von den Zellen durch Einbau des ³H-Thymidin in DNA inkorporierte Radioaktivität bestimmt.

Diese gemischte Lymphozytenkultur kann in einen „Ein-Weg-LTT“ umgewandelt werden, indem die Lymphozyten eines Individuums vor Ansetzen der Kultur durch Bestrahlung reaktionsunfähig gemacht werden.

Durch Serumzugabe können nun Alloantikörper oder andere Serumfaktoren in vitro erfaßt werden.

Der „Ein- Weg- LTT“ wurde durchgeführt, um zytotoxische Einflüsse des Serumpools auszuschließen. Dafür wurden Zellkulturen mit Lymphozyten von drei

zufällig ausgewählten Spendern angesetzt, wobei jeweils die Hälfte der Zellen jedes Spenders bestrahlt wurde.

Das gesammelte Serum wurde den Kulturen zugegeben. Als Kontrollen wurden gemischte Lymphozytenkulturen mit Zusatz von fetalem Kälberserum und ohne Serum-Zusatz durchgeführt.

Hinsichtlich der Spender der Lymphozyten für die MLC wurde darauf geachtet, daß es sich nicht um diabetische bzw. ICA-positive Personen handelt, da ein verändertes Verhalten der Lymphozyten diabetischer Personen in einer gemischten Lymphozytenkultur bekannt ist. Dies wurde sowohl von Knospe als auch Räsänen untersucht, die dadurch eine Aussage über Aktivierung, Proliferation und Interaktionen der Lymphozyten von Diabetikern gewinnen wollten. Beide zeigten eine reduzierte Aktivität der Lymphozyten frisch manifestierter Typ I Diabetiker im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (Knospe et al., 1990; Räsänen et al., 1988).

Anhand der Messungen des Thymidin-uptakes der Lymphozytenkulturen unter Zusatz von Serum aus dem Serum-Pool im Vergleich zu den Kulturen unter Zusatz von fetalem Kälberserum bzw. ohne Serum-Zusatz konnten zytotoxische Einflüsse des gesammelten Humanserums ausgeschlossen werden.

4.7.1 ERGEBNISSE DER LYMPHOZYTENTRANSFORMATIONSTESTE ZUR GEWINNUNG EINES HUMANEN SERUMPOOLS

Tabelle 7 : Ergebnis Lymphozytentransformationstest Serumpool 11/92
Ergebnis in cpm

		A*	B*	C*
A	ohne Serum	82	2.140	1.580
	FCS	1.824	27.031	17.416
	Serumpool 1	199	36.092	17.919
	Serumpool 2	346	33.083	21.012
	Serumpool 3	162	40.100	14.050
B	ohne Serum	2.446	278	1.415
	FCS	17.661	5.266	13.549
	Serumpool 1	23.840	236	22.999
	Serumpool 2	31.952	232	15.940
	Serumpool 3	35.511	270	6.694
C	Ohne Serum	1.836	1.356	426
	FCS	16.476	12.079	993
	Serumpool 1	17.480	23.986	265
	Serumpool 2	21.318	25.509	279
	Serumpool 3	18.504	18.261	288

A : Spender A unbestrahlte Zellen
B : Spender B unbestrahlte Zellen
C : Spender C unbestrahlte Zellen

A* : Spender A bestrahlte Zellen
B* : Spender B bestrahlte Zellen
C* : Spender C bestrahlte Zellen

Serumpool 1 : Serum der Spender 1 – 3
Serumpool 2 : Serum der Spender 4 – 6
Serumpool 3 : Serum der Spender 7 – 9
FCS : Fetales Kälberserum

LTT Serumpool 11/92

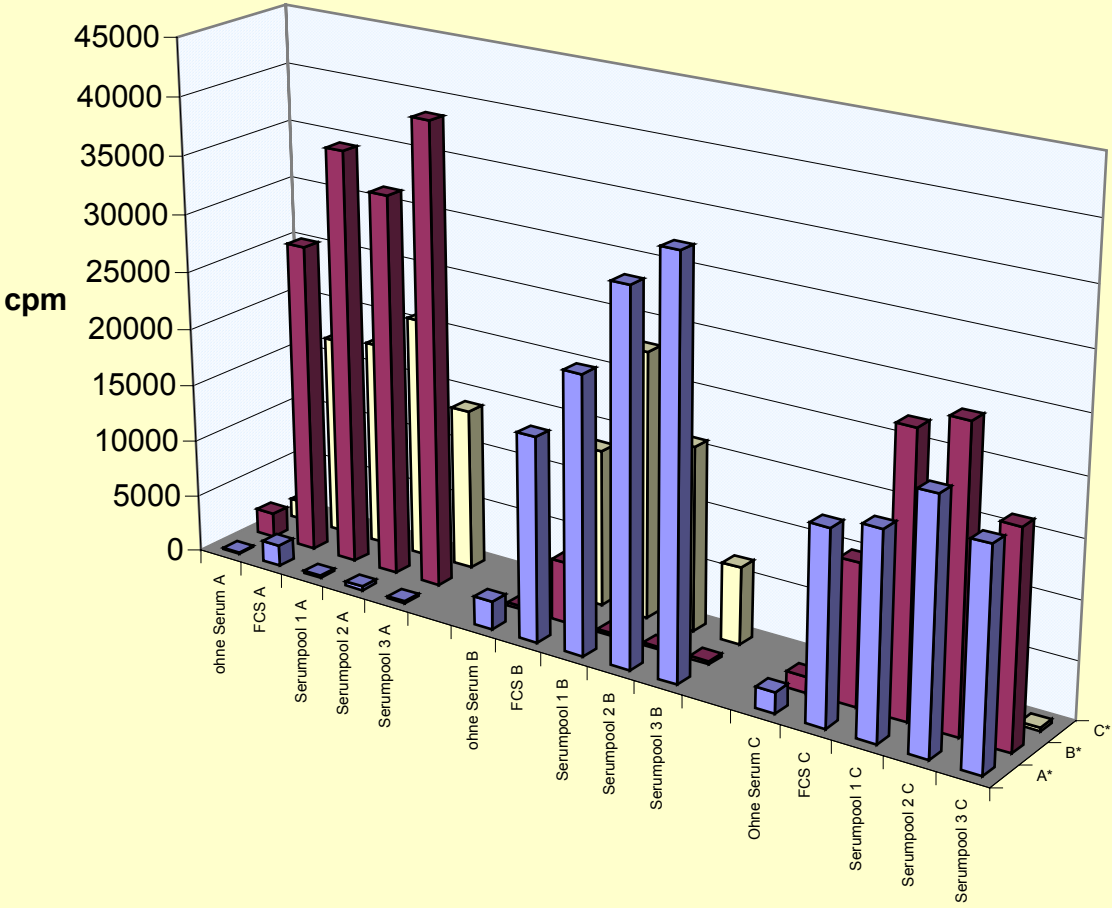


Abb.4: Lymphozytentransformationstest Serumpool 11/92

Tabelle 8 : Ergebnis Lymphozytentransformationstest Serumpool 3/94,
Ergebnis in cpm

		A*	B*
A	ohne Serum	5.390	5.113
	Serumpool 1	3.958	37.310
	Serumpool 2	4.050	37.698
	Serumpool 3	3.820	33.816
B			
	ohne Serum	960	2.362
	Serumpool 1	45.662	784
	Serumpool 2	40.010	1.272
	Serumpool 3	44.420	485

Tabelle 9 : Ergebnis Lymphozytentransformationstest Serumpool 2/95,
Ergebnis in cpm

		A*	B*	C*
A	ohne Serum	82	2.141	1.581
	Serumpool 1	199	35.092	17.920
	Serumpool 2	346	33.084	21.012
	Serumpool 3	162	40.100	14.051
B				
	ohne Serum	2.446	278	1.415
	Serumpool 1	23.841	236	22.999
	Serumpool 2	31.952	232	15.941
	Serumpool 3	23.511	270	6.695
C				
	ohne Serum	1.836	1.356	426
	Serumpool 1	17.480	23.986	266
	Serumpool 2	21.319	25.509	279
	Serumpool 3	18.504	1.8261	288

Tabelle 10 : Ergebnis Lymphozytentransformationstest Serumpool 11/95,
Ergebnis in cpm

		A*	B*	C*
A	ohne Serum	264	268	339
	Serumpool 1	356	4.912	4.873
B	ohne Serum	283	100	257
	Serumpool 1	2.457	253	3.580
C	ohne Serum	426	278	93
	Serumpool 1	2.701	3.998	318

Bei der Interpretation der Ergebnisse wird deutlich, daß der Versuchsaufbau effektiv ist, da Responder- und Effektorzellen verschiedener Testpersonen miteinander reagieren, während dies bei Zellen eines Individuums nicht der Fall ist. Weiterhin zeigen die Ergebnisse in den Tabellen 7 –10, daß durch den Zusatz von fetalem Kälber Serum (FCS) die Wachstumsfähigkeit der Zellen deutlich verbessert wird gegenüber keinem Zusatz von Serum. Die Kultivierung derselben Zellen mit humanem Serum der verschiedenen Serumpole verbesserte die Wachstumsfähigkeit der Zellen nochmals. Es läßt sich weder eine wachstumshemmende, noch proliferationsstimulierende Wirkung der getesteten humanen Serumpole nachweisen.

4.8 ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG EINER SPEZIFISCHEN PROLIFERATION AUF TETANOL 1% ALS SPEZIFISCHES ANTIGEN

Tetanol wurde als Kontrollantigen benutzt, mit der Vorstellung, daß es durch Impfungen gegen Wundstarrkrampf ein bekanntes Antigen darstellt, und sich somit bei allen Personen tetanolspezifische Zelllinien generieren lassen müßten.

Nach Bildung von Zelllinien wurde im Lymphozytentransformationstest die antigenspezifische proliferative Antwort der Tetanol-Zelllinien auf Tetanol unter Zuhilfenahme der ³H-Thymidin Inkorporation gemessen. Als Negativ-Kontrolle wurde die proliferative Antwort der Tetanol-Zelllinie auf Medium, als Positiv-Kontrolle die Antwort auf Phytohämagglutinin (PHA) als unspezifisches Lektin untersucht.

4.8.1 PROLIFERATIVE ANTWORT AUF TETANOL 1% ALS SPEZIFISCHES ANTIGEN, DARGESTELLT IN CPM; MEDIUM UND PHA ALS KONTROLLEN

Die Darstellung der Ergebnisse folgt in tabellarischer sowie graphischer Form.

Tabelle 11 : Proliferative Antwort der Tetanol-Zelllinien der Typ I Diabetiker im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm (Mittelwerte \pm Standardabweichung)					
		Tetanol		Medium		PHA	
1	Diabetiker	14.097	\pm 743	145	\pm 121	24.380	\pm 2.350
2	Diabetiker	77	\pm 12	264	\pm 88	5.759	\pm 438
3	Diabetiker	30.546	\pm 2.146	12.952	\pm 2.514	55.407	\pm 9.171
4	Diabetiker	257	\pm 86	613	\pm 283	26.639	\pm 7.002
5	Diabetiker	2.587	\pm 1.034	764	\pm 415	23.973	\pm 2.283
6	Diabetiker	676	\pm 885	1.097	\pm 282	381	\pm 121
7	Diabetiker	8.687	\pm 2.333	344	\pm 92	26.718	\pm 1.155
8	Diabetiker	56.750	\pm 12.235	19.831	\pm 1.274	62.171	\pm 13.036
9	Diabetiker	43.870	\pm 10.062	3.435	\pm 447	53.221	\pm 562
10	Diabetiker	8.394	\pm 841	24.142	\pm 6.306	35.356	\pm 4.107
11	Diabetiker	24.508	\pm 5.007	38.871	\pm 1.054	43.658	\pm 1.704
12	Diabetiker	14.513	\pm 407	8.126	\pm 1.694	6.223	\pm 1.242
13	Diabetiker	770	\pm 173	884	\pm 142	2.190	\pm 518
14	Diabetiker	8.959	\pm 1.170	8.294	\pm 2.024	7.318	\pm 1.217
15	Diabetiker	9.772	\pm 3.391	831	\pm 164	7.075	\pm 1.092
16	Diabetiker	2.079	\pm 1.326	1.283	\pm 342	8.569	\pm 785

Tabelle 12: Proliferative Antwort der Tetanol-Zelllinien der Verwandten 1. Grades im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm (Mittelwerte \pm Standardabweichung)					
		Tetanol		Medium		PHA	
1	Verwandte	64	\pm 18	251	\pm 219	18.279	\pm 454
2	Verwandte	7.731	\pm 2.078	2.818	\pm 962	7.348	\pm 638
3	Verwandte	2.298	\pm 307	105	\pm 71	7.388	\pm 536
4	Verwandte	2.467	\pm 1.523	1.003	\pm 63	8.594	\pm 1.374
5	Verwandte	10.313	\pm 3.184	1.651	\pm 527	5.796	\pm 1.472
6	Verwandte	26.402	\pm 63	20.654	\pm 1.314	47.839	\pm 7.445
7	Verwandte	11.652	\pm 1.269	127	\pm 40	23.164	\pm 6.920

Tabelle 13: Proliferative Antwort der Tetanol-Zelllinien der Kontrollpersonen im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm (Mittelwerte \pm Standardabweichung)					
		Tetanol		Medium		PHA	
1	Kontrolle	5.604	\pm 722	1.974	\pm 1.079	24.682	\pm 1.547
2	Kontrolle	59	\pm 21	141	\pm 65	15.927	\pm 400
3	Kontrolle	64	\pm 18	251	\pm 219	18.279	\pm 454
4	Kontrolle	134	\pm 89	87	\pm 39	3.238	\pm 405
5	Kontrolle	9.079	\pm 1.976	224	\pm 61	31.133	\pm 3.882
6	Kontrolle	13.335	\pm 7.448	1.890	\pm 738	30.038	\pm 1.698
7	Kontrolle	14.745	\pm 2.193	1.802	\pm 378	29.338	\pm 2.739
8	Kontrolle	1.639	\pm 1.054	264	\pm 140	21.691	\pm 1.770
9	Kontrolle	6.395	\pm 1.013	6.689	\pm 268	58.177	\pm 1.881
10	Kontrolle	30.338	\pm 1.857	3.582	\pm 794	54.006	\pm 4.204
11	Kontrolle	326	\pm 103	379	\pm 55	7.835	\pm 1.511
12	Kontrolle	450	\pm 460	154	\pm 12	1.787	\pm 345
13	Kontrolle	352	\pm 110	311	\pm 99	2.174	\pm 945
14	Kontrolle	980	\pm 1.059	125	\pm 10	489	\pm 191
15	Kontrolle	294	\pm 121	190	\pm 33	528	\pm 85
16	Kontrolle	5.515	\pm 824	2.628	\pm 667	2.772	\pm 655
17	Kontrolle	5.475	\pm 1.810	2.426	\pm 1.449	3.868	\pm 2.995

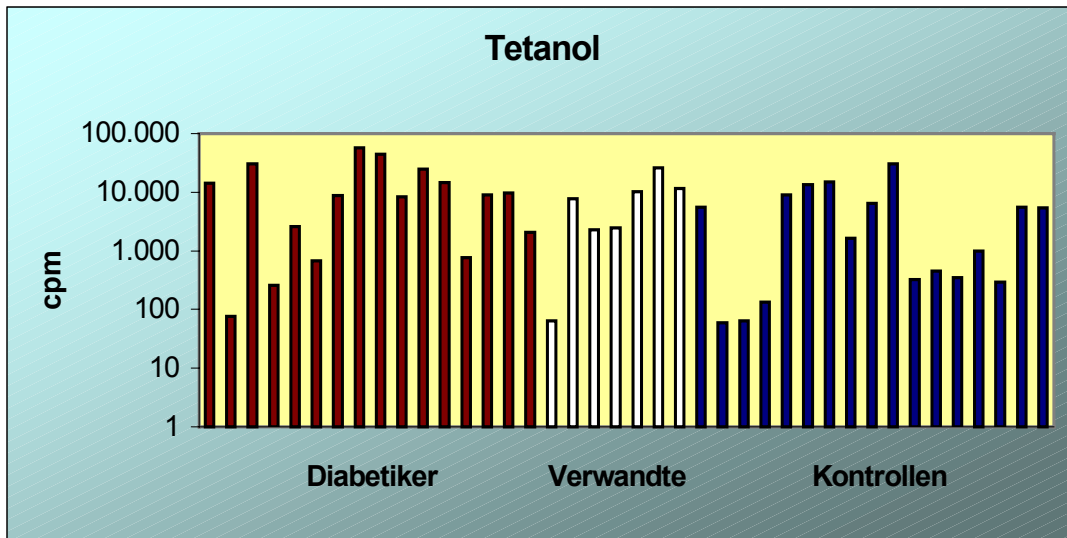


Abb. 5: Proliferative Antwort der Tetanol-Zelllinien auf Tetanol im Lymphozytenproliferationstest in cpm; Logarithmische Darstellung

4.8.2 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER CPM

Vergleicht man die proliferativen Antworten in cpm der Typ I Diabetiker, Verwandten und Kontrollpersonen mittels Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test, lässt sich kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Proliferationsantwort feststellen.

Der Vergleich zwischen Typ I Diabetikern und Kontrollpersonen hingegen ergibt eine signifikant bessere Antwort der Zellen der Typ I Diabetiker auf das Antigen Tetanol ($p=0,044$).

Die Betrachtung der Mittelwerte beider Gruppen verdeutlicht diese Ergebnis.

Tabelle 14: Mittelwerte der Tetanol-Zelllinien der einzelnen Gruppen im Lymphozytenproliferationstest in cpm

Tetanol 1% cpm		
Diabetiker	Verwandte	Kontrollpersonen
14.159	8.705	5.558

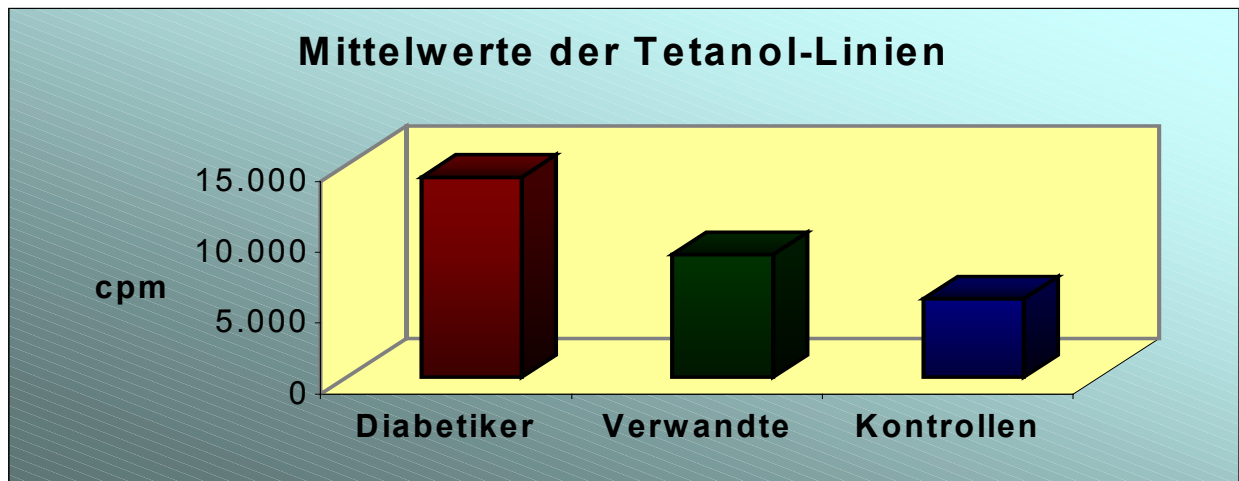


Abb. 6: Mittelwerte der Tetanol-Zelllinien der einzelnen Gruppen im Lymphozytenproliferationstest in cpm

4.8.3 VERGLEICH DER PROLIFERATIONSINDIZES AUF TETANOL ALS SPEZIFISCHES ANTIGEN ZWISCHEN TYP I DIABETIKERN, VERWANDTEN 1.GRADES UND KONTROLLPERSONEN

Um den Einfluß des Kulturmediums auf die Proliferation zu berücksichtigen wurde der Proliferationsindex gebildet (cpm in Anwesenheit von Antigen dividiert durch cpm in Abwesenheit von Antigen). Die errechneten Werte sind im Folgenden tabellarisch und graphisch dargestellt.

Tabelle 15: Proliferationsindizes der Tetanol Zelllinien

Tetanol 1% : Proliferationsindizes			
Nr.	Diabetiker	Verwandte	Kontrollen
1	97,22	0,25	2,84
2	0,29	2,74	0,42
3	2,36	21,89	0,25
4	0,42	2,46	1,54
5	3,39	6,25	40,53
6	0,61	1,28	7,05
7	25,25	91,75	8,18
8	1,15		6,22
9	12,77		0,96
10	0,35		8,47
11	0,63		0,86
12	1,79		2,92
13			1,13
14	0,87		7,82
15	1,08		1,55
16	11,76		2,1
17	1,62		2,26

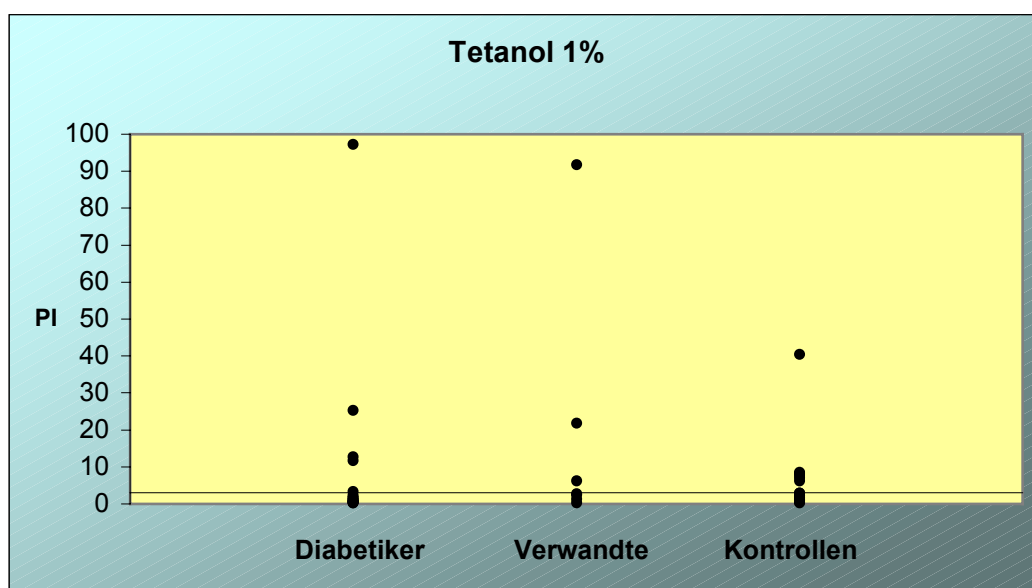


Abb. 7: Proliferationsindizes der Tetanol Zelllinien

4.8.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER PROLIFERATIONSINDIZES

Wie erwartet, fand bei einem Großteil der Typ I Diabetiker, der Verwandten und der Kontrollpersonen eine positive Reaktion auf Tetanol statt. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben sich dabei nicht. ($p=0,572$; Kruskal-Wallis 1-Way-Anova).

4.8.5 PROZENTUALE AUSWERTUNG DER POSITIVEN PROLIFERATIONSINDIZES

Von einer spezifischen Proliferation kann ausgegangen werden, wenn der Proliferationsindex ≥ 3 ist.

In der Gruppe der Typ I Diabetiker wiesen 5 von 16 Personen einen $PI \geq 3$ auf, entsprechend 31,3 %.

Bei den Verwandten 1. Grades befanden sich 3 Personen mit einem $PI \geq 3$, entsprechend 42,8 %, während unter den Kontrollpersonen 35,3 % einen positiven PI aufwiesen, entsprechend 6 von 17 Personen.

Insgesamt wiesen damit 14 von 40 getesteten Personen einen positiven PI auf, entsprechend 35 %.

Dieses Ergebnis zeigt, daß es mit der angewandten Methode möglich ist, antigenspezifische Zelllinien auf ein bekanntes Antigen zu bilden !

4.8.6 PROLIFERATIVE ANTWORT DER ZELLINIEN IN CPM / PI IN ABHÄNGIGKEIT DES ICA- TITERS

Wie einleitend beschrieben, erfolgte eine Unterteilung der Gruppe der Typ I Diabetiker anhand der Höhe ihrer ICA-Titer in drei Untergruppen

(Gruppe 1 : ICA-Titer < 10 JDF-Units; Gruppe 2 : ICA-Titer \geq 10 JDF-Units; Gruppe 3 : ICA-Titer negativ). Diese Gruppen wurden dann hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens untersucht (Kruskal-Wallis 1-Way Anova).

Die Untersuchung der Proliferationsantwort in cpm erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Untergruppen der Typ I Diabetiker.

Bei dem Vergleich der Proliferationsindizes zeichnete sich eine tendenziell bessere Antwort der Zellen der Untergruppe 1 (ICA- Titer < 10 JDF- Units) ab, ohne aber Signifikanzniveau zu erreichen ($p=0,072$).

4.9 ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG EINER SPEZIFISCHEN PROLIFERATION AUF BOVINES SERUM ALBUMIN (BSA) IN EINER KONZENTRATION VON 100 µG/ML

Für den Versuch der Bildung einer spezifischen Zelllinie mit BSA als Antigen wurden in der beschriebenen Weise Lymphozyten mit BSA in der Konzentration 100 µg/ml kultiviert. Darauf folgte der Lymphozytenproliferationstest auf antigenspezifische Proliferation.

4.9.1 PROLIFERATIVE ANTWORT AUF BSA 100 µG/ML ALS SPEZIFISCHES ANTIGEN, DARGESTELLT IN CPM; MEDIUM UND PHA ALS KONTROLLE

Es folgt die tabellarische Darstellung der Ergebnisse.

Tabelle 16.: Proliferative Antwort der BSA 100 µg/ml Zelllinien der Diabetiker im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm (Mittelwerte ± Standardabweichung)					
		BSA 100µg/ml		Medium		PHA	
1	Diabetiker	7.753	± 3.477	9.378	± 1.379	54.316	± 3.185
2	Diabetiker	501	± 233	708	± 275	15.106	± 1.688
3	Diabetiker	826	± 116	907	± 669	26.087	± 4.375
4	Diabetiker	588	± 114	598	± 177	20.731	± 1.567
5	Diabetiker	46.260	± 4.811	49.944	± 3.744	53.261	± 2.577
6	Diabetiker	1.204	± 338	2655	± 759	60.799	± 6.322
7	Diabetiker	33.710	± 4.109	18.919	± 2.101	32.154	± 880
8	Diabetiker	42.560	± 8.168	36.982	± 1.394	41.166	± 668
9	Diabetiker	402	± 255	397	± 309	679	± 160
10	Diabetiker	2.226	± 3.087	439	± 64	2.410	± 1.411
11	Diabetiker	38.830	± 18.477	45.977	± 20.914	34.815	± 10.560
12	Diabetiker	213	± 138	105	± 41	1.218	± 273
13	Diabetiker	932	± 108	932	± 764	3.558	± 793
14	Diabetiker	443	± 48	373	± 193	3.297	± 268

Tabelle 17 : Proliferative Antwort der BSA 100 µg/ml Zelllinien der Kontrollpersonen im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm (Mittelwerte ±Standardabweichung)					
		BSA 100 µg/ml		Medium		PHA	
1	Kontrolle	1.246	± 379	1.067	± 302	27.484	± 1.904
2	Kontrolle	2.033	± 606	1.524	± 525	25.306	± 1.262
3	Kontrolle	12.942	± 281	12.123	± 1.796	29.776	± 2.447
4	Kontrolle	9.241	± 1.521	3.926	± 1.443	22.031	± 923
5	Kontrolle	17.621	± 3.685	14.430	± 2.456	15.281	± 1.367
6	Kontrolle	4.394	± 841	4.826	± 317	57.981	± 1.783
7	Kontrolle	2.013	± 1.884	554	± 350	2.997	± 227
8	Kontrolle	426	± 229	193	± 24	1.060	± 429
9	Kontrolle	323	± 117	147	± 34	837	± 107
10	Kontrolle	485	± 209	135	± 54	477	± 110
11	Kontrolle	411	± 418	204	± 48	439	± 187
12	Kontrolle	868	± 792	332	± 229	429	± 119
13	Kontrolle	4.338	± 4.588	3.824	± 489	2.755	± 1.218

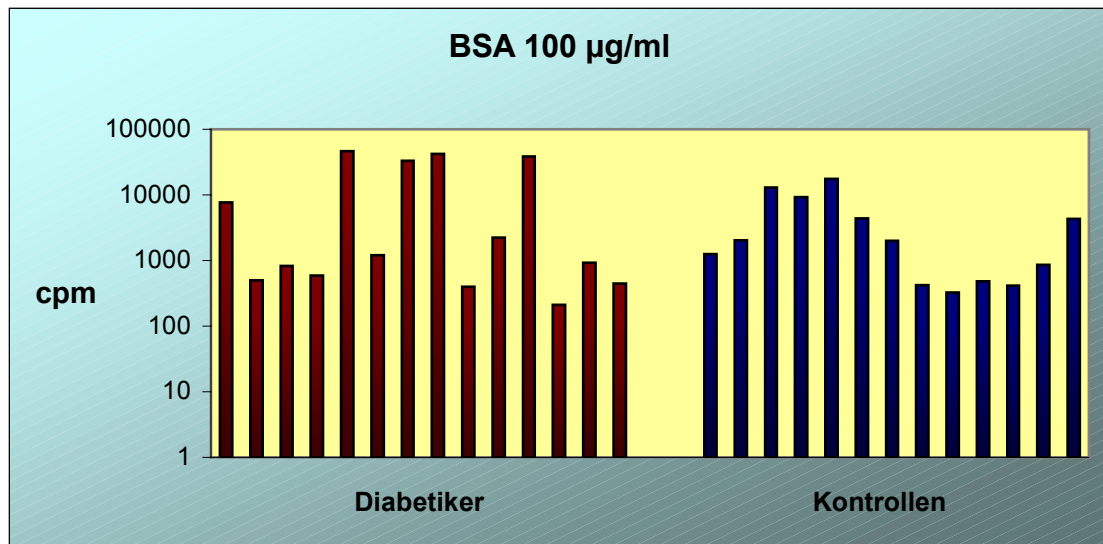


Abb. 8 : Darstellung der proliferativen Antwort in cpm der Typ I Diabetiker und Kontrollpersonen, logarithmische Darstellung

4.9.2 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER CPM

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test, der keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Höhe der proliferativen Antwort in cpm zwischen Typ I Diabetikern und Kontrollpersonen erbrachte ($p=0,808$).

4.9.3 VERGLEICH DER PROLIFERATIONSINDIZES AUF BSA 100 µg/ML ALS SPEZIFISCHES ANTIGEN ZWISCHEN TYP I DIABETIKERN UND KONTROLLPERSONEN

Die errechneten Proliferationsindizes sind im Folgenden tabellarisch und graphisch aufgeführt.

Tabelle 18: Proliferationsindizes der BSA 100 µg/ml Zelllinien

Proliferationsindizes BSA 100 µg/ml	
Diabetiker	Kontrollen
0,83	1,17
0,71	1,33
0,91	1,07
0,79	2,35
0,93	1,22
0,45	0,91
1,78	3,63
1,15	2,20
1,01	2,20
5,07	3,59
0,84	2,02
2,03	2,62
1,00	1,13
1,19	

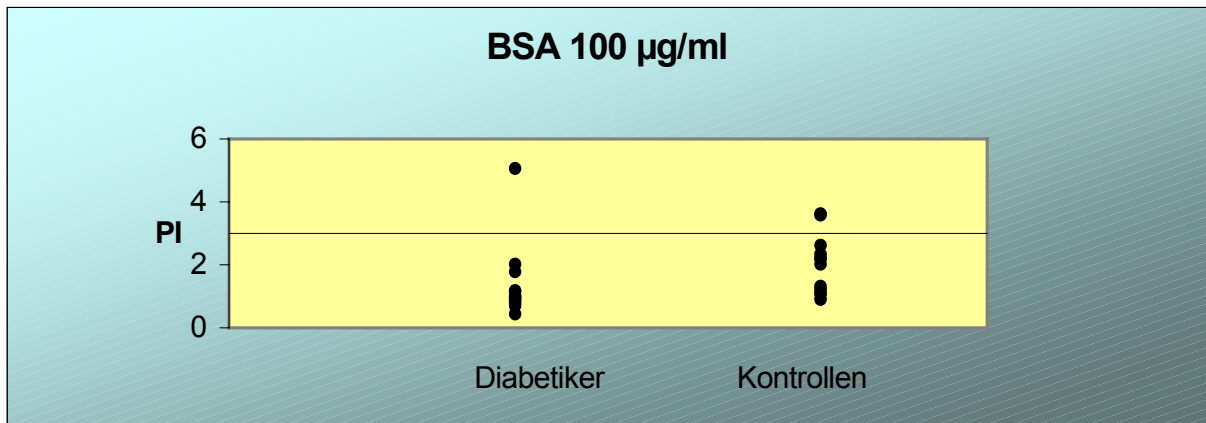


Abb. 9: Proliferationsindizes der BSA 100 µg/ml Zelllinien

4.9.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER PROLIFERATIONSINDIZES

Die statistische Auswertung der ermittelten Proliferationsindizes ergab für die Gruppe der gesunden Kontrollpersonen im Mann-Whitney U-Test für zwei Stichproben signifikant höhere Proliferationsindizes als für die Gruppe der Typ I Diabetiker ($p=0,008$), sodaß man trotz tendenziell niedrigerer cpm Werte bei den Kontrollpersonen von spezifischer Proliferation auf BSA in mehreren Fällen ausgehen kann.

4.9.5 PROZENTUALE AUSWERTUNG DER POSITIVEN PROLIFERATIONSINDIZES

In der Gruppe der Typ I Diabetiker wies 1 von 14 Personen einen $PI \geq 3$ auf, entsprechend 7 %, während unter den Kontrollpersonen 15 % einen positiven PI aufwiesen, entsprechend 2 von 13 Personen.

4.9.6 PROLIFERATIVE ANTWORT DER ZELLINIEN IN CPM /PI IN ABHÄNGIGKEIT DES ICA- TITERS

Wie einleitend beschrieben, erfolgte die Unterteilung der Gruppe der Typ I Diabetiker in drei Untergruppen, welche dann hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens untersucht wurden (Kruskal- Wallis 1- Way Test).

Hinsichtlich der Proliferationsindizes war tendenziell eine ausgeprägtere spezifische Proliferation bei den ICA-negativen Diabetikern festzustellen, die mit $p=0,076$ jedoch kein Signifikanzniveau erreicht.

4.10 ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG EINER SPEZIFISCHEN PROLIFERATION AUF BOVINES SERUM ALBUMIN (BSA) IN EINER KONZENTRATION VON 25 µG/ML

Für den Versuch der Bildung einer spezifischen Zelllinie mit BSA als Antigen wurden in der beschriebenen Weise Lymphozyten mit BSA in der Konzentrationen 25 µg/ml kultiviert. Es folgte der Lymphozytenproliferationstest auf antigenspezifische Proliferation.

4.10.1 PROLIFERATIVE ANTWORT AUF BSA 25 µG/ML ALS SPEZIFISCHES ANTIGEN, DARGESTELLT IN CPM; MEDIUM UND PHA ALS KONTROLLEN

Zunächst folgt die tabellarische Aufführung der ermittelten cpm im Lymphozytenproliferationstest.

Tabelle 19: Proliferative Antwort der BSA 25 µg/ml Zelllinien der Diabetiker im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm (Mittelwerte ± Standardabweichung)					
		BSA 25 µg/ml		Medium		PHA	
1	Diabetiker	4.933	± 1.829	3.682	± 1.078	48.703	± 4.607
2	Diabetiker	2.780	± 433	2.267	± 168	20.673	± 447
3	Diabetiker	1.124	± 1.093	1.572	± 219	2.564	± 725
4	Diabetiker	562	± 46	841	± 470	30.623	± 2.145
5	Diabetiker	50.193	± 3.989	48.804	± 1.522	52.672	± 3.721
6	Diabetiker	6.996	± 267	9.250	± 1.044	55.417	± 3.721
7	Diabetiker	35.626	± 785	26.197	± 2.148	43.867	± 4.962
8	Diabetiker	40.818	± 2.181	40.524	± 527	40.309	± 1.024
9	Diabetiker	282	± 205	562	± 463	1.105	± 334
10	Diabetiker	2.459	± 2.883	574	± 249	2.315	± 1.969
11	Diabetiker	26.614	± 15.482	20.474	± 1.948	23.444	± 2.519
12	Diabetiker	162	± 25	182	± 45	1.466	± 140
13	Diabetiker	1.574	± 499	777	± 37	6.793	± 1.366
14	Diabetiker	291	± 65	351	± 86	1.641	± 417

Tabelle 20 : Proliferative Antwort der BSA 25 µg/ml Zelllinien der Kontrollpersonen im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm (Mittelwerte ±Standardabweichung)					
		BSA 25 µg/ml		Medium		PHA	
1	Kontrolle	1945	± 861	1154	± 81	25.388	± 2.031
2	Kontrolle	1.298	± 1.261	1.142	± 246	31.010	± 2.201
3	Kontrolle	5.886	± 893	6.634	± 179	28.634	± 2.126
4	Kontrolle	3.301	± 2.758	349	± 154	21.723	± 5.412
5	Kontrolle	14.534	± 2.962	12.306	± 547	12.653	± 457
6	Kontrolle	1.571	± 276	2.632	± 563	43.272	± 3.477
7	Kontrolle	481	± 289	473	± 455	4.730	± 458
8	Kontrolle	540	± 320	577	± 680	851	± 31
9	Kontrolle	291	± 240	543	± 718	647	± 624
10	Kontrolle	229	± 18	146	± 36	919	± 276
11	Kontrolle	183	± 75	270	± 191	944	± 518
12	Kontrolle	707	± 444	422	± 200	865	± 408
13	Kontrolle	1.404	± 1.022	1.027	± 1.315	2.014	± 1.843

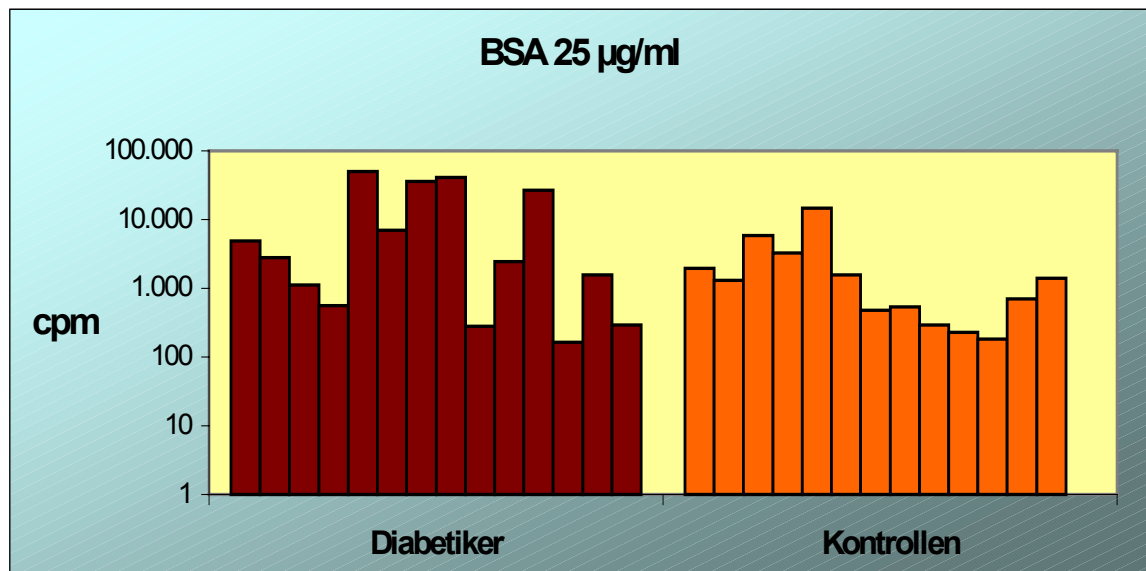


Abb. 10: Darstellung der proliferativen Antwort in cpm der Typ I Diabetiker und Kontrollpersonen; logarithmische Darstellung

4.10.2 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER CPM

Bei der Betrachtung der proliferativen Antwort in cpm lassen sich tendenziell höhere cpm Werte in der Gruppe der Typ I Diabetiker beobachten, ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen läßt sich jedoch nicht feststellen ($p=0,166$; Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test). Der Vergleich der Mittelwerte der beiden untersuchten Gruppen läßt diese Tendenz deutlicher werden.

Tab. 21: Mittelwerte der BSA-Zelllinien der Typ I Diabetiker und Kontrollpersonen in cpm

Mittelwerte cpm BSA 25 $\mu\text{g/ml}$	
Diabetiker	Kontrollen
12.458	2.490

4.10.3 VERGLEICH DER PROLIFERATIONSINDIZES AUF BSA 25 $\mu\text{g/ml}$ ALS SPEZIFISCHES ANTIGEN ZWISCHEN TYP I DIABETIKERN UND KONTROLLPERSONEN

Die errechneten Proliferationsindizes sind nun tabellarisch und graphisch aufgeführt.

Tabelle 22 : Proliferationsindizes der BSA 25 µg/ml Zelllinien

Proliferationsindizes BSA 25 µg/ml	
Diabetiker	Kontrollpersonen
1,34	1,69
1,23	1,18
0,72	0,89
0,56	9,46
1,03	1,18
0,76	0,60
1,36	1,02
1,01	0,93
0,50	0,54
4,29	2,33
1,30	0,68
0,89	1,68
2,03	1,37
0,83	

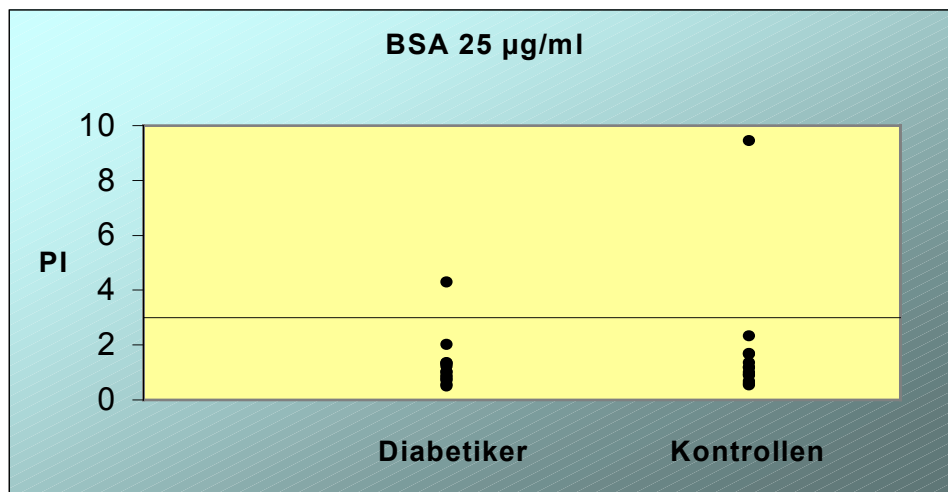


Abb. 11 : Proliferationsindizes der BSA 25 µg/ml Zelllinien

4.10.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER PROLIFERATIONSINDIZES

Der Vergleich der Proliferationsindizes erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen Typ I Diabetikern und Kontrollpersonen ($p=0,576$; Mann-Whitney U-Test).

4.10.5 PROZENTUALE AUSWERTUNG DER POSITIVEN PROLIFERATIONSINDIZES

Analog der Ergebnisse des Vergleiches der Proliferationsindizes, erbrachte der Vergleich der positiven Proliferationsindizes keine neuen Ergebnisse.

In der Gruppe der Typ I Diabetiker wies 1 von 14 Personen einen $PI \geq 3$ auf, entsprechend 7 %, ebenso fand sich in der Gruppe der Kontrollpersonen 1 Person mit einem positiven PI , entsprechend 7,5 %.

4.10.6 PROLIFERATIVE ANTWORT DER ZELLINIEN IN ABHÄNGIGKEIT DES ICA- TITERS

Wie einleitend beschrieben, erfolgte die Unterteilung der Gruppe der Typ I Diabetiker in drei Untergruppen, welche dann hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens untersucht wurden (Kruskal- Wallis 1-Way Test).

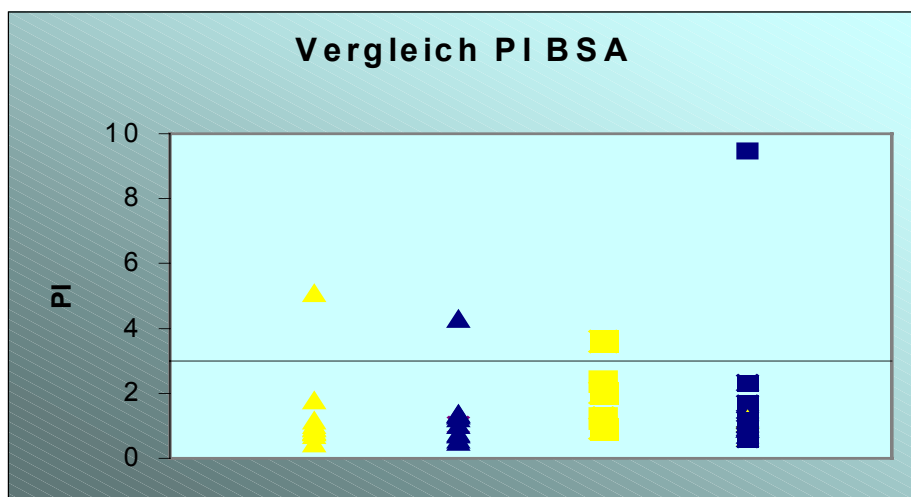
Weder für die proliferative Antwort in cpm ($p=0,813$), noch hinsichtlich der Proliferationsindizes ($p=0,228$) konnten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

4.10.7 VERGLEICH DER PROLIFERATIONSANTWORTEN AUF DIE ANTIGENKONZENTRATIONEN BSA 100 µG/ML UND BSA 25 µG/ML

Um einen möglichen Einfluß der Antigenkonzentration auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien nachzuweisen, wurden die proliferativen Antworten in cpm sowie die Proliferationsindizes der Typ I Diabetiker auf die beiden Antigenkonzentrationen BSA 100 µg/ml und BSA 25 µg/ml mittels Wilcoxon Matched- Pairs Signed- Ranks Test verglichen.

Sowohl für die proliferative Antwort in cpm ($p=0,789$), als auch für die Proliferationsindizes ($p=0,968$) ließen sich keine signifikant stärkere Proliferation für eine der beiden Antigenkonzentrationen feststellen.

Abb. 12 : Vergleich der Proliferationsindizes auf BSA 100 µg/ml bzw. 25 µg/ml als spezifisches Antigen



▲	Typ I Diabetiker BSA 100 µg
▲	Typ I Diabetiker BSA 25 µg
■	Kontrollperson BSA 100 µg
■	Kontrollperson BSA 25 µg

4.11 ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG EINER SPEZIFISCHEN PROLIFERATION AUF CASEIN 100 µG/ML ALS SPEZIFISCHES ANTIGEN

Für den Versuch der Bildung einer spezifischen Zelllinie mit Casein als Antigen wurden die isolierten Lymphozyten mit Casein in der Konzentration 100 µg/ml kultiviert. Anschließend folgte der Lymphozytenproliferationstest auf antigenspezifische Proliferation.

4.11.1 PROLIFERATIVE ANTWORT AUF CASEIN 100 µG/ML ALS SPEZIFISCHES ANTIGEN, DARGESTELLT IN CPM; MEDIUM UND PHA ALS KONTROLLEN

Die ermittelten Werte in Form von cpm sind in der Tabelle aufgeführt.

Tabelle 23: Proliferative Antwort der Casein 100 µg/ml Zelllinien der Diabetiker im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm (Mittelwerte ± Standardabweichung)					
		Casein 100 µg/ml		Medium		PHA	
1	Diabetiker	3.734	± 1.384	5.396	± 432	45.253	± 1.074
2	Diabetiker	47.740	± 8.422	49.956	± 6.011	45.672	± 10.528
3	Diabetiker	10.044	± 1.404	1.098	± 195	66.929	± 10.893
4	Diabetiker	37.172	± 10.412	21.181	± 3.596	25.363	± 514
5	Diabetiker	50.613	± 2.870	51.108	± 2.042	53.121	± 3.236
6	Diabetiker	761	± 800	2.109	± 3.028	495	± 140
7	Diabetiker	1.635	± 1.073	772	± 914	2.523	± 982
8	Diabetiker	8.497	± 4.373	14.800	± 7.586	11.184	± 418
9	Diabetiker	211	± 133	149	± 16	1.303	± 52
10	Diabetiker	946	± 58	648	± 47	5.152	± 927
11	Diabetiker	473	± 210	522	± 182	3.347	± 583

Tabelle 24: Proliferative Antwort der Casein 100 µg/ml Zelllinien der Kontrollpersonen im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm (Mittelwerte ±Standardabweichung)					
		Casein 100 µg/ml		Medium		PHA	
1	Kontrolle	686	± 274	303	± 98	20.149	± 858
2	Kontrolle	11.724	± 1.465	7.440	± 600	21.357	± 1.678
3	Kontrolle	17.859	± 800	2.143	± 1.437	97.582	± 11.411
4	Kontrolle	4.127	± 1.206	798	± 413	6.957	± 436
5	Kontrolle	400	± 392	276	± 167	811	± 401
6	Kontrolle	317	± 133	256	± 28	534	± 102
7	Kontrolle	225	± 110	201	± 69	407	± 140
8	Kontrolle	203	± 64	166	± 71	573	± 345
9	Kontrolle	632	± 328	230	± 103	1.080	± 571
10	Kontrolle	2.361	± 1.696	1.753	± 2.517	2.061	± 2.553

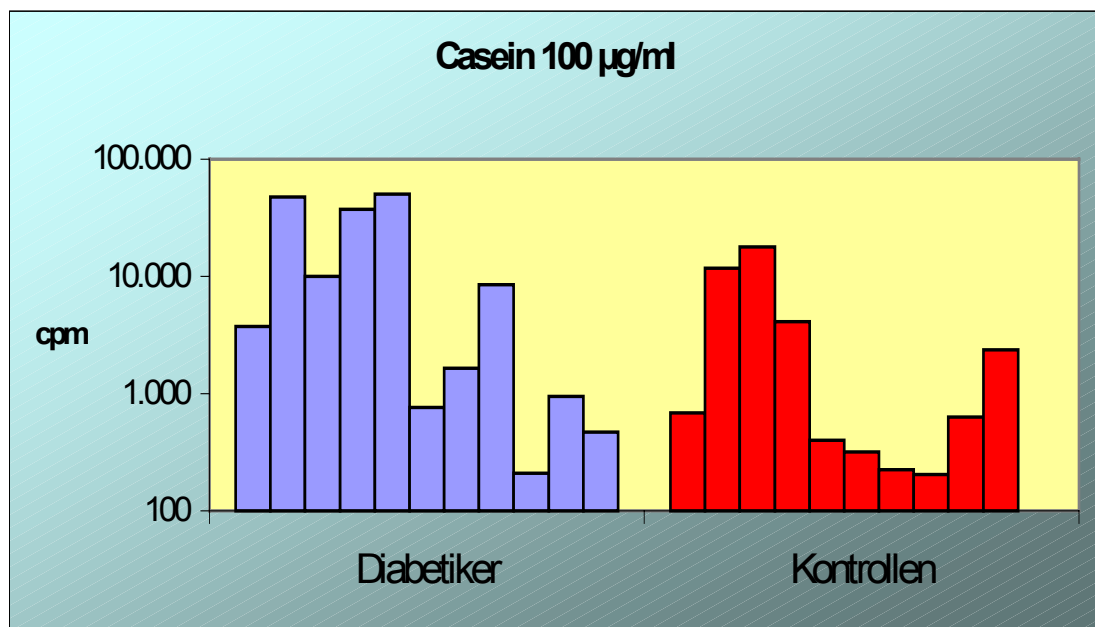


Abb. 13: Proliferative Antwort der Casein Zelllinien (100 µg/ml) im Lymphozytentransformationstest in cpm; Logarithmische Darstellung

4.11.2 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER CPM

Vergleicht man die proliferativen Antworten in cpm der Typ I Diabetiker und Kontrollpersonen mittels Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test, läßt sich eine tendenziell höhere Proliferationsantwort in der Gruppe der Typ I Diabetiker feststellen ($p=0,139$), ohne daß Signifikanzniveau erreicht wird.

4.11.3 VERGLEICH DER PROLIFERATIONSINDIZES AUF CASEIN 100 µg/ML ALS SPEZIFISCHES ANTIGEN

Die errechneten Proliferationsindizes sind nun tabellarisch und graphisch aufgeführt.

Tabelle 25 : Proliferationsindizes der Casein 100 µg/ml Zelllinien von Typ I Diabetikern und Kontrollpersonen

Proliferationsindizes Casein 100 µg/ml		
Nr.	Diabetiker	Kontrollpersonen
1	0,69	2,27
2	0,96	1,58
3	9,15	8,33
4	1,75	5,17
5	0,99	1,45
6	0,36	1,24
7	2,12	1,12
8	0,57	1,22
9	1,41	2,74
10	1,46	1,35
11	0,9	

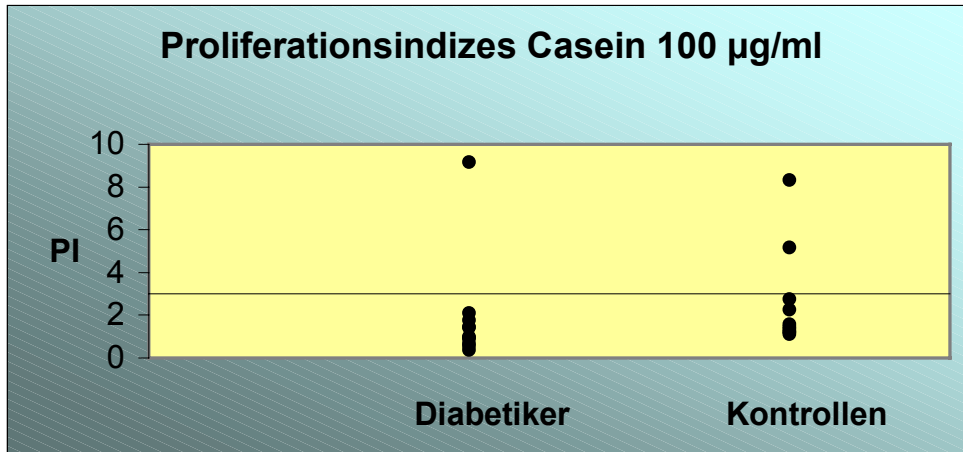


Abb. 14: Proliferationsindizes der Casein Zelllinien (100 µg/ml)

4.11.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER PROLIFERATIONSINDIZES

Die tendenziell bessere Proliferationsantwort der Zelllinien der Typ I Diabetiker in cpm konnte bei der Auswertung der Proliferationsindizes mittels Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test nicht bestätigt werden ($p=0,091$), tendenziell kann man hier sogar von einem besseren Ansprechen der Zelllinien der Kontrollpersonen auf Casein als Antigen sprechen.

4.11.5 PROZENTUALE AUSWERTUNG DER POSITIVEN PROLIFERATIONSINDIZES

In der Gruppe der Typ I Diabetiker wies eine von 11 Personen einen $PI \geq 3$ auf, entsprechend 9,1 %, während unter den Kontrollpersonen 20 % einen positiven PI aufwiesen, entsprechend 2 von 10 Personen.

4.11.6 PROLIFERATIVE ANTWORT DER ZELLINIEN IN CPM / PI IN ABHÄNGIGKEIT DES ICA -TITERS

Wie einleitend beschrieben, erfolgte die Unterteilung der Gruppe der Typ I Diabetiker in drei Untergruppen, welche dann hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens untersucht wurden (Kruskal-Wallis 1-Way Anova).

Weder für die proliferative Antwort in cpm ($p=0,682$), noch hinsichtlich der Proliferationsindizes ($p=0,548$) konnten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

4.12 ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG EINER SPEZIFISCHEN PROLIFERATION AUF CASEIN 25 µG/ML ALS SPEZIFISCHES ANTIGEN

Für den Versuch der Bildung einer spezifischen Zelllinie mit Casein als Antigen wurden in der beschriebenen Weise Lymphozyten mit Casein in der Konzentration 25 µg/ml kultiviert. Anschließend folgte der Lymphozytenproliferationstest auf antigenspezifische Proliferation.

4.12.1 PROLIFERATIVE ANTWORT AUF CASEIN 25 µG/ML ALS SPEZIFISCHES ANTIGEN, DARGESTELLT IN CPM; MEDIUM UND PHA ALS KONTROLLEN

Die ermittelten Werte sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 26: Proliferative Antwort der Casein 25 µg/ml Zelllinien der Diabetiker im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm (Mittelwerte ± Standardabweichung)					
		Casein 25 mg/ml		Medium		PHA	
1	Diabetiker	5.034	± 2.314	5.303	± 508	51.403	± 6.250
2	Diabetiker	46.014	± 3.523	42.758	± 7.487	50.326	± 2.648
3	Diabetiker	2.927	± 822	1.221	± 527	55.801	± 5.807
4	Diabetiker	40.249	± 10.450	27.355	± 2.592	31.166	± 3.185
5	Diabetiker	66.684	± 17.345	59.578	± 1.282	57.814	± 8.463
6	Diabetiker	301	± 113	228	± 223	802	± 185
7	Diabetiker	1.875	± 1.376	936	± 503	2.983	± 1.243
8	Diabetiker	1.277	± 367	4.175	± 1.172	2.263	± 859
9	Diabetiker	164	± 9	139	± 10	1.608	± 278
10	Diabetiker	727	± 201	977	± 238	4.740	± 658
11	Diabetiker	456	± 391	405	± 207	2.175	± 1.777

Tabelle 27: Proliferative Antwort der Casein 25 µg/ml Zelllinien der Kontrollpersonen im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm (Mittelwerte ±Standardabweichung)					
		Casein 25 µg/ml		Medium		PHA	
1	Kontrolle	440	± 180	242	± 92	26.314	± 2.303
2	Kontrolle	15.768	± 2.960	14.127	± 1.324	12.958	± 1.146
3	Kontrolle	12.617	± 1.521	11.312	± 2.161	67.503	± 7.123
4	Kontrolle	1.872	± 1.005	1.858	± 1.388	10.799	± 222
5	Kontrolle	386	± 211	234	± 38	1.273	± 166
6	Kontrolle	336	± 160	192	± 28	645	± 208
7	Kontrolle	272	± 94	211	± 101	470	± 71
8	Kontrolle	281	± 85	175	± 36	475	± 108
9	Kontrolle	925	± 302	790	± 237	1.519	± 552
10	Kontrolle	464	± 36	2.703	± 3.461	2.242	± 2.200

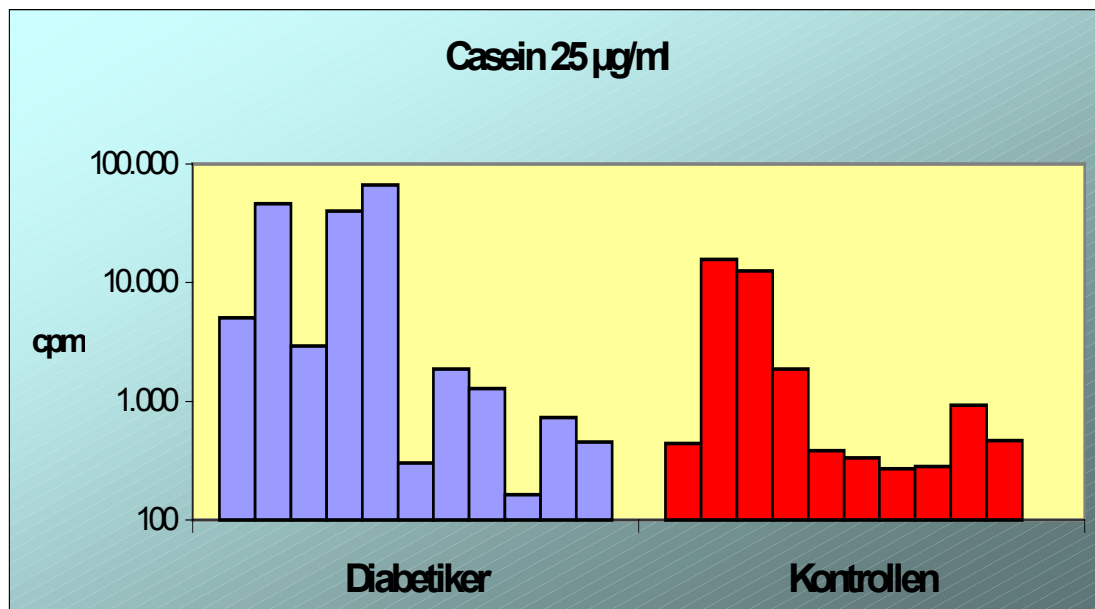


Abb. 15: Proliferative Antwort der Casein Zelllinien (25 µg/ml) im Lymphozytentransformationstest in cpm; Logarithmische Darstellung

4.12.2 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER CPM

Vergleicht man die proliferativen Antworten in cpm der Typ I Diabetiker und Kontrollpersonen mittels Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test, läßt sich eine tendenziell höhere Proliferationsantwort in der Gruppe der Typ I Diabetiker feststellen ($p=0,181$), ohne daß Signifikanzniveau erreicht wird.

4.12.3 VERGLEICH DER PROLIFERATIONSINDIZES AUF CASEIN 25 µg/ML ALS SPEZIFISCHES ANTIGEN

Die errechneten Proliferationsindizes sind nun tabellarisch und graphisch aufgeführt.

Tabelle 28: Proliferationsindizes der Casein 25 µg/ml Zelllinien

Proliferationsindizes Casein 25 µg / ml		
Nr.	Diabetiker	Kontrollen
1	0,95	1,82
2	1,08	1,12
3	2,4	1,12
4	1,47	1,01
5	1,12	1,65
6	1,32	1,75
7	2,0	1,29
8	0,31	1,61
9	1,18	1,17
10	0,74	0,17
11	1,13	

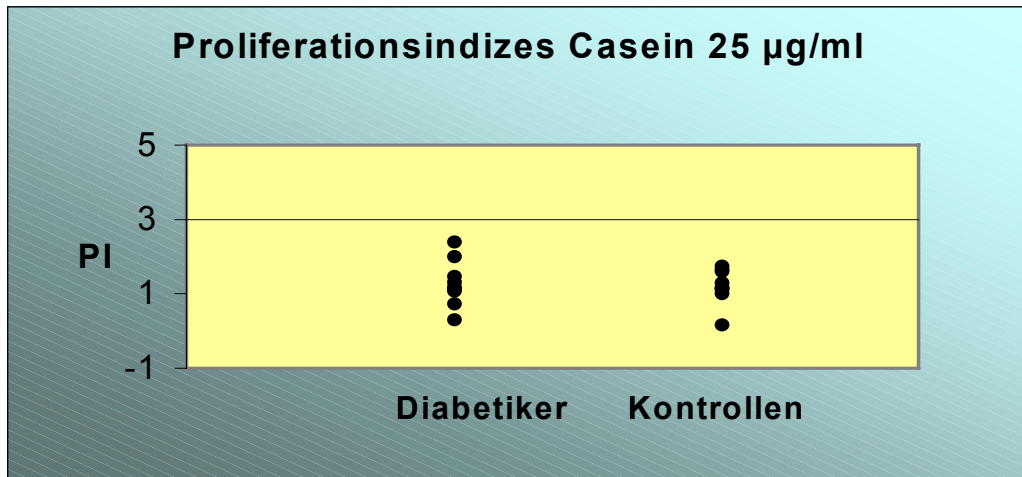


Abb. 16: Proliferationsindizes der Casein Zelllinien 25 µg/ml

4.12.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER PROLIFERATIONSINDIZES

Bei der Auswertung der Proliferationsindizes von Typ I Diabetikern und Kontrollpersonen konnte die für die proliferative Antwort in cpm tendenziell bessere Antwort der Typ I Diabetiker auf Casein 25 µg/ml als Antigen nicht bestätigt werden ($p=0,672$).

4.12.5 PROZENTUALE AUSWERTUNG DER POSITIVEN PROLIFERATIONSINDIZES

Erneut wird bei einem Proliferationsindex ≥ 3 von einer spezifischen Proliferation ausgegangen.

Weder in der Gruppe der Typ I Diabetiker, noch in der Gruppe der Kontrollpersonen wurde ein positiver Proliferationsindex erreicht.

4.12.6 PROLIFERATIVE ANTWORT DER ZELLINIEN IN CPM / PI IN ABHÄNGIGKEIT DES ICA-TITERS

Wie einleitend beschrieben, erfolgte die Unterteilung der Gruppe der Typ I Diabetiker in drei Untergruppen, welche dann hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens untersucht wurden (Kruskal-Wallis 1-Way Anova).

Weder für die proliferative Antwort in cpm ($p=0,296$), noch hinsichtlich der Proliferationsindizes ($p=0,648$) konnten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

4.12.7 VERGLEICH DER PROLIFERATIVEN ANTWORT AUF DIE ANTIGENKONZENTRATIONEN CASEIN 100 µG/ML UND CASEIN 25 µG/ML

Um einen möglichen Einfluß der Antigenkonzentration auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien nachzuweisen, wurden die proliferativen Antworten in cpm sowie die Proliferationsindizes der Typ I Diabetiker auf die beiden Antigenkonzentrationen Casein 100 µg/ml und Casein 25 µg/ml mittels Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Ranks Test verglichen.

Sowohl für die proliferative Antwort in cpm ($p=0,4$), als auch für die Proliferationsindizes ($p=0,678$) ließ sich keine signifikant bessere Proliferation für eine der beiden Antigenkonzentrationen feststellen. Die Darstellung der Proliferationsindizes auf die verschiedenen Antigenkonzentrationen verdeutlicht dies.

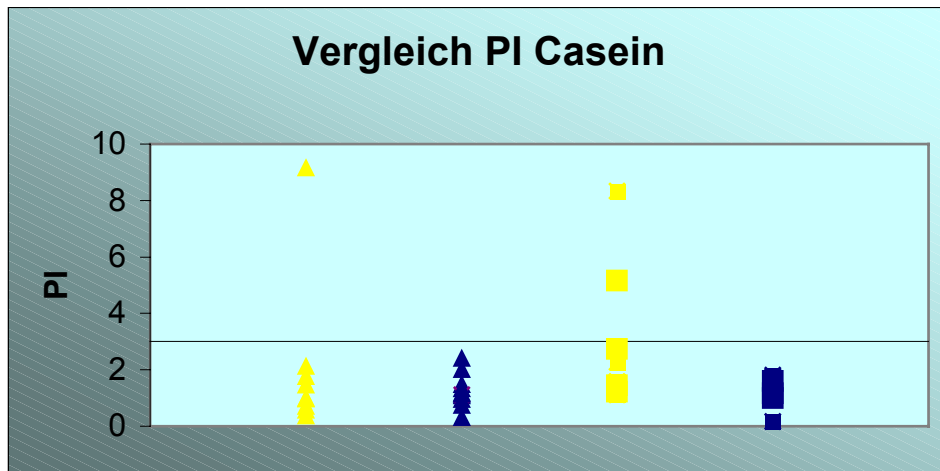


Abb. 17 : Vergleich der Proliferationsindizes auf Casein 100 µg/ml bzw. 25 µg/ml als spezifisches Antigen

▲	Typ I Diabetiker Casein 100 µg
▲	Typ I Diabetiker Casein 25 µg
■	Kontrollperson Casein 100 µg
■	Kontrollperson Casein 25 µg

4.13 ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG EINER SPEZIFISCHEN PROLIFERATION AUF INSULIN 250 µG/ML ALS SPEZIFISCHES ANTIGEN

Für den Versuch, spezifische Zelllinien auf Insulin zu generieren, wurden 1×10^6 Lymphozyten unter Zusatz von Insulin in einer Konzentration von 250 µg/ml als Antigen kultiviert. Nach der Zelllinien-Bildung folgte der Lymphozytenproliferationstest auf antigenspezifische Proliferation.

4.13.1 PROLIFERATIVE ANTWORT AUF INSULIN 250 µG/ML ALS SPEZIFISCHES ANTIGEN, DARGESTELLT IN CPM; MEDIUM UND PHA ALS KONTROLLEN

Die im Lymphozytenproliferationstest gemessenen cpm sind tabellarisch und graphisch dargestellt.

Tabelle 29: Proliferative Antwort der Insulin 250 µg/ml Zelllinien der Diabetiker im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm (Mittelwerte ± Standardabweichung)					
		Insulin 250 µg/ml		Medium		PHA	
1	Diabetiker	375	± 392	303	± 183	478	± 270
2	Diabetiker	9.380	± 3.410	15.860	± 3.633	15.524	± 3.156
3	Diabetiker	199	± 133	159	± 81	573	± 215
4	Diabetiker	966	± 674	1003	± 647	3.459	± 307
5	Diabetiker	488	± 277	374	± 176	1.296	± 156

Tabelle 30: Proliferative Antwort der Insulin 250 µg/ml Zelllinien der Kontrollpersonen im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm (Mittelwerte ±Standardabweichung)					
		Insulin 250 µg/ml		Medium		PHA	
1	Kontrolle	1.850	± 1.582	1.761	± 1.094	7.145	± 1.079
2	Kontrolle	255	± 119	219	± 12	766	± 122
3	Kontrolle	279	± 78	335	± 316	1.019	± 265
4	Kontrolle	327	± 161	153	± 33	577	± 47
5	Kontrolle	175	± 26	227	± 111	652	± 360
6	Kontrolle	394	± 294	334	± 77	1.015	± 520
7	Kontrolle	2.220	± 2.168	1.634	± 2.126	2.049	± 1.086

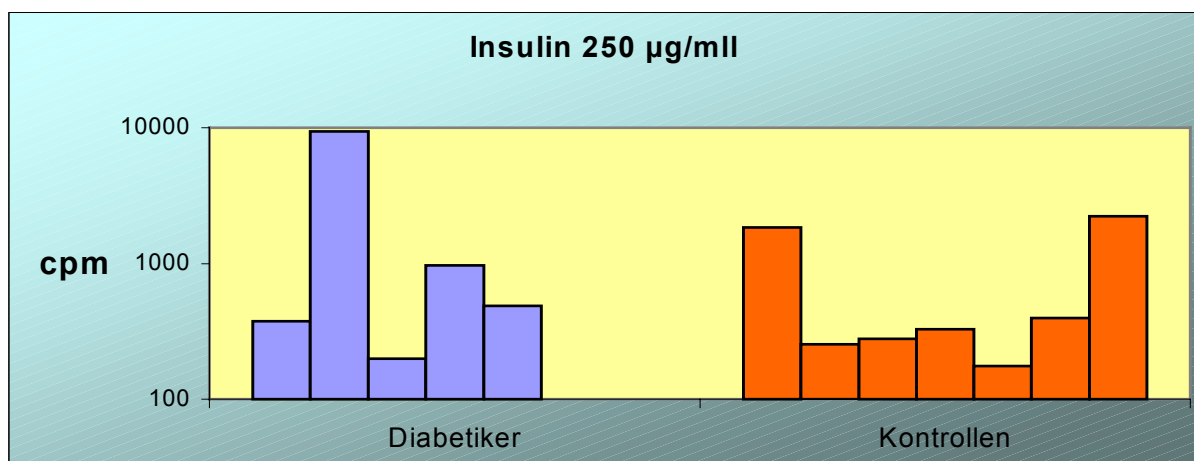


Abb. 18: Proliferative Antwort der Insulin Zelllinien (250 µg/ml) im Lymphozytenproliferationstest; Logarithmische Darstellung

4.13.2 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER CPM

Bei der Betrachtung der proliferativen Antwort in cpm ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festzustellen ($p=0,465$; Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test).

4.13.3 VERGLEICH DER PROLIFERATIONSINDIZES AUF 250 µg/ML INSULIN ALS SPEZIFISCHES ANTIGEN

Die errechneten Proliferationsindizes sind nun tabellarisch dargestellt.

Tabelle 31: Proliferationsindizes der Insulin 250 µg/ml Zelllinien

Proliferationsindizes Insulin 250 µg/ml		
Nr.	Diabetiker	Kontrollen
1	1,24	1,05
2	0,59	1,16
3	1,25	0,83
4	0,96	2,14
5	1,30	0,77
6		1,18
7		1,35

Die oben tabellarisch aufgeführten Proliferationsindizes der Zelllinien auf 250 µg/ml der Diabetiker und Kontrollen werden nun graphisch veranschaulicht.

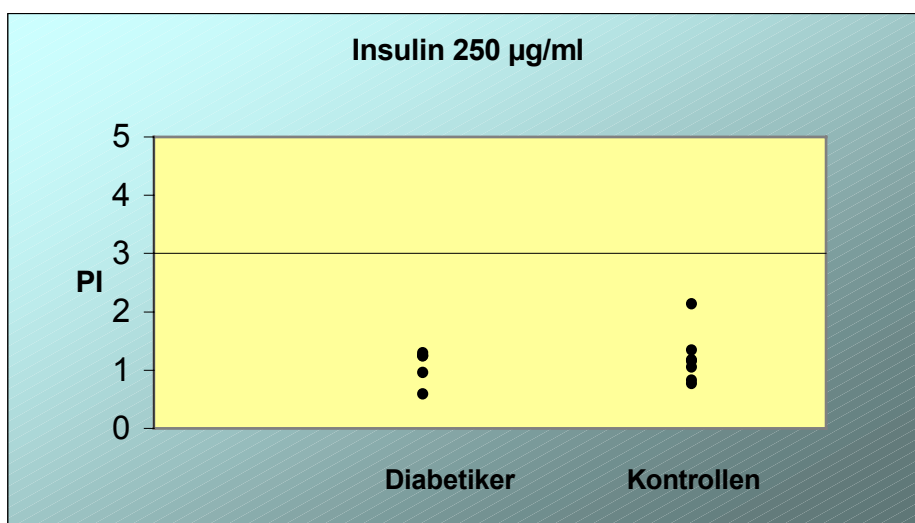


Abb. 19: Proliferationsindizes Insulin Zelllinien (250 µg/ml Insulin)

4.13.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER PROLIFERATIONSINDIZES

Der Vergleich der Proliferationsindizes erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen Typ I Diabetikern und Kontrollpersonen ($p=0,823$; Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test).

4.13.5 PROZENTUALE AUSWERTUNG DER POSITIVEN PROLIFERATIONSINDIZES

Weder in der Gruppe der Typ I Diabetiker noch in der Gruppe der Kontrollpersonen fanden sich positive Proliferationsindizes ≥ 3 , die eine antigenspezifische Proliferation angezeigt hätten.

4.13.6 PROLIFERATIVE ANTWORT DER ZELLINIEN IN CPM / PI IN ABHÄNGIGKEIT DES ICA- TITERS

Wie einleitend beschrieben, erfolgte die Unterteilung der Gruppe der Typ I Diabetiker in drei Untergruppen, welche dann hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens untersucht wurden (Kruskal-Wallis 1-Way Anova).

Weder für die proliferative Antwort in cpm ($p=0,563$), noch hinsichtlich der Proliferationsindizes ($p=0,563$) konnten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

4.14 ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG EINER SPEZIFISCHEN PROLIFERATION AUF INSULIN 25 µG/ML ALS SPEZIFISCHES ANTIGEN

Für den Versuch der Bildung einer spezifischen Zelllinie mit Insulin als Antigen wurden in der beschriebenen Weise Lymphozyten mit Insulin in der Konzentrationen von 25 µg/ml kultiviert. Es folgte der Lymphozytenproliferationstest zur Untersuchung einer antigenspezifischen Proliferation.

4.14.1 PROLIFERATIVE ANTWORT AUF INSULIN 25 µG/ML ALS SPEZIFISCHES ANTIGEN, DARGESTELLT IN CPM; MEDIUM UND PHA ALS KONTROLLEN

Die Ergebnisse sind tabellarisch und graphisch dargestellt.

Tabelle 32: Proliferative Antwort der Insulin 25 µg/ml Zelllinien der Diabetiker im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm (Mittelwerte ± Standardabweichung)					
		Insulin 25 mg/ml		Medium		PHA	
1	Diabetiker	400	± 94	333	± 148	2.924	± 3.519
2	Diabetiker	5 778	± 5886	308	± 105	3.212	± 1.500
3	Diabetiker	26 418	± 10439	20 566	± 6.812	18.304	± 2.254
4	Diabetiker	354	± 68	333	± 56	1.466	± 501
5	Diabetiker	1 205	± 448	967	± 719	3.879	± 715
6	Diabetiker	799	± 274	343	± 105	2.658	± 589

Tabelle 33: Proliferative Antwort der Insulin 25 µg/ml Zelllinien der Kontrollpersonen im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm (Mittelwerte ±Standardabweichung)					
		Insulin 25 µg/ml		Medium		PHA	
1	Kontrolle	1 504	± 559	1.447	± 948	4.819	± 1.409
2	Kontrolle	186	± 23	205	± 25	2.276	± 152
3	Kontrolle	209	± 20	146	± 47	1.001	± 297
4	Kontrolle	324	± 158	435	± 243	769	± 218
5	Kontrolle	259	± 87	185	± 57	1.388	± 397
6	Kontrolle	347	± 366	258	± 80	937	± 262
7	Kontrolle	554	± 212	1.971	± 1.472	4.425	± 445

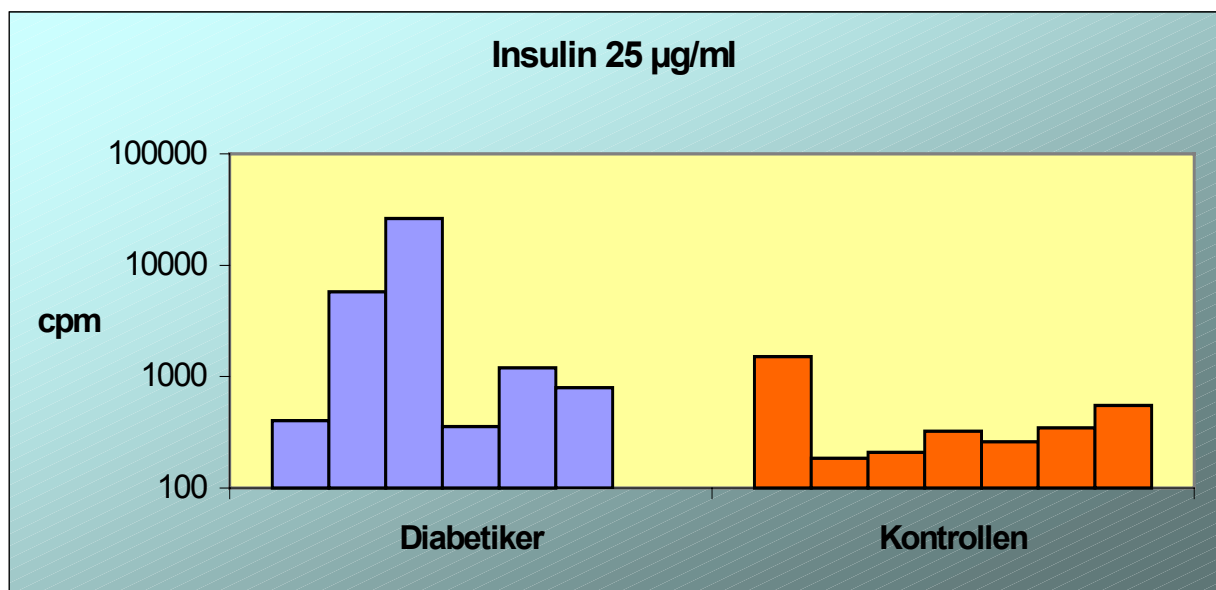


Abb. 20: Proliferative Antwort der Insulin Zelllinien (25 µg/ml) im Lymphozytenproliferationstest; Logarithmische Darstellung

4.14.2 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER CPM

Der Vergleich der Proliferationsantwort in cpm zwischen Typ I Diabetikern und Kontrollpersonen ergab eine signifikant höhere Reaktion der Zelllinien der Typ I Diabetiker ($p=0,032$; Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test).

4.14.3 VERGLEICH DER PROLIFERATIONSINDIZES AUF INSULIN 25 µG/ML ALS SPEZIFISCHES ANTIGEN

Um den Einfluß des Kulturmediums auf die Proliferation der Zellen auszuschließen, wurde der Proliferationsindex gebildet. Die errechneten Proliferationsindizes sind im Folgenden tabellarisch und graphisch dargestellt.

Tabelle 34: Proliferationsindizes der Insulin 25 µg/ml Zelllinien

Proliferationsindizes Insulin 25 µg/ml		
Nr.	Diabetiker	Kontrollen
1	1,20	1,04
2	18,78	0,91
3	1,28	1,43
4	1,06	0,75
5	1,25	1,40
6	2,35	1,35
7		0,28

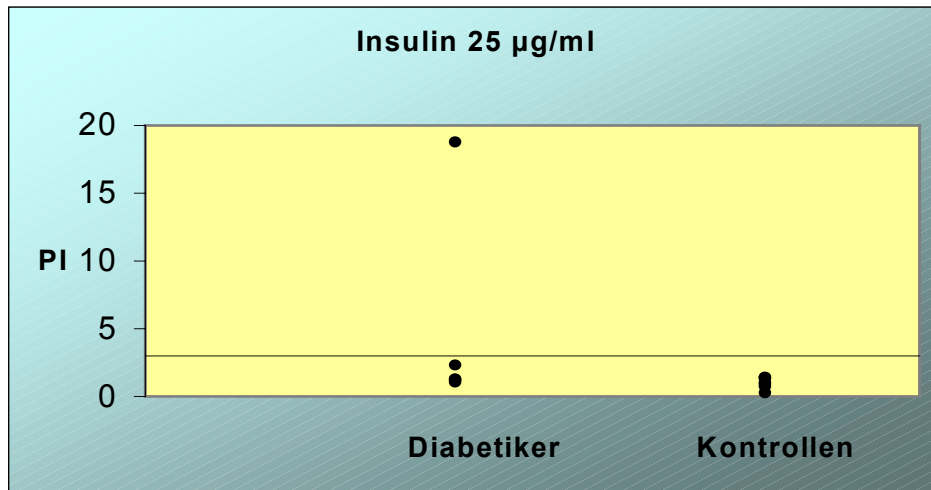


Abb. 21: Proliferationsindizes der Insulin Zelllinien (25 µg/ml)

4.14.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER PROLIFERATIONSINDIZES

Der Vergleich der Proliferationsindizes erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen Typ I Diabetikern und Kontrollpersonen ($p=0,110$; Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test). Damit konnte das Ergebnis der Betrachtung der Proliferationsantwort in cpm nicht bestätigt werden.

4.14.5 PROZENTUALE AUSWERTUNG DER POSITIVEN PROLIFERATIONSINDIZES

Von einer spezifischen Proliferation kann ausgegangen werden, wenn der Proliferationsindex ≥ 3 ist.

In der Gruppe der Typ I Diabetiker wies eine von sechs Personen einen $PI \geq 3$ auf, entsprechend 16,6 %.

Unter den Kontrollpersonen fand sich keine Person mit positivem PI.

4.14.6 PROLIFERATIVE ANTWORT DER ZELLINIEN IN CPM / PI IN ABHÄNGIGKEIT DES ICA- TITERS

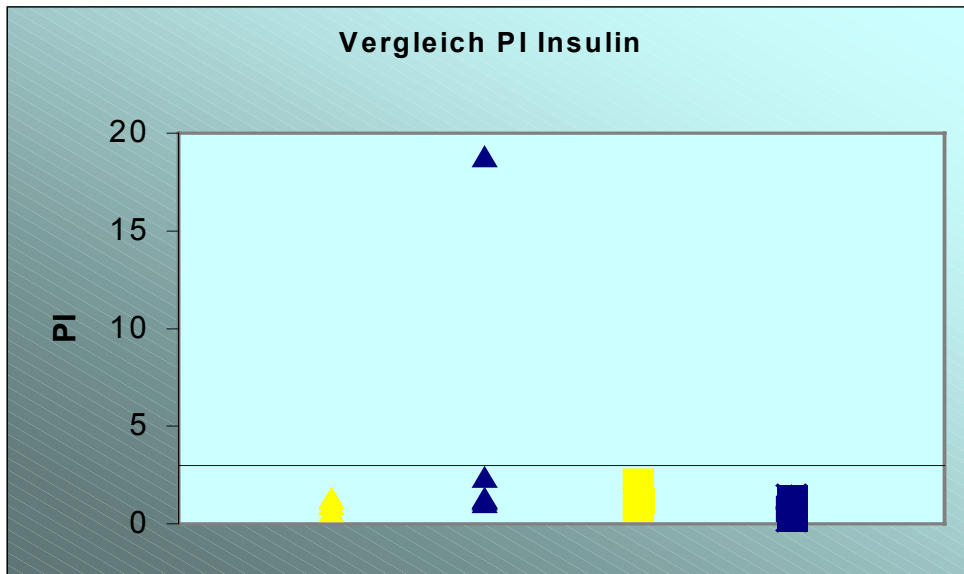
Wie einleitend beschrieben, erfolgte die Unterteilung der Gruppe der Typ I Diabetiker in drei Untergruppen, welche dann hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens untersucht wurden (Kruskal-Wallis 1-Way Anova).

Weder für die proliferative Antwort in cpm ($p=0,512$), noch hinsichtlich der Proliferationsindizes ($p=0,126$) konnten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

4.14.7 VERGLEICH DER PROLIFERATIONSANTWORTEN AUF DIE ANTIGENKONZENTRATIONEN INSULIN 250 $\mu\text{G}/\text{ML}$ UND INSULIN 25 $\mu\text{G}/\text{ML}$

Um einen möglichen Einfluß der Antigenkonzentration auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien nachzuweisen, wurden die proliferativen Antworten in cpm sowie die Proliferationsindizes der Typ I Diabetiker auf die beiden Antigenkonzentrationen Insulin 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und Insulin 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mittels Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Ranks Test verglichen.

Eine signifikant höhere Proliferationsantwort in cpm ergab sich dabei für die niedrigere Konzentration ($p=0,043$), im Vergleich der Proliferationsindizes ließ sich dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigen.



▲	Typ I Diabetiker Insulin 250 µg
▲	Typ I Diabetiker Insulin 25 µg
■	Kontrollperson Insulin 250 µg
■	Kontrollperson Insulin 25 µg

Abb. 22 : Vergleich der Proliferationsindizes auf Insulin 250 µg/ml bzw. 25 µg/ml als spezifisches Antigen

5 DISKUSSION

Die Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus ist nicht bis ins Detail geklärt. Eine Reihe von Phänomenen deutet jedoch darauf hin, daß es sich um eine Autoimmunerkrankung handelt. Dazu zählen das Auftreten von Antikörpern, die Assoziation bestimmter HLA-Typen mit der Erkrankung, Beobachtungen zur Insulinitis und Transferexperimente sowie der Therapieerfolg mit Immunsuppressiva im Tiermodell als auch beim Menschen. Die Mechanismen in der Pathogenese des insulinpflichtigen Diabetes münden in eine Zerstörung der Langerhans'schen Inselzellen des Pankreas. Die Beteiligung von Lymphozyten an diesem Prozeß ist bekannt. Bislang ist nicht geklärt, welche Strukturen der β -Zellen als Autoantigen wirken, somit die Lymphozyten aktivieren und damit den Autoimmunprozess auslösen.

Anhand dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine T-Lymphozytenreaktivität auf mit dem Diabetes mellitus Typ I assoziierte Antigene bei Typ I Diabetikern, Verwandten 1.Grades und gesunden Kontrollpersonen nachzuweisen ist, und ob sich die Reaktivität zwischen den Gruppen unterscheidet. Als Kontrollantigene fungierten zum einen das Mitogen Phytohämagglutinin (PHA), das unspezifisch Zellen stimuliert, und zum anderen das Recall-Antigen Tetanol als spezifisches Antigen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben bei Betrachtung der lymphozytären Proliferation in counts per minute (cpm) Hinweise darauf, daß die Lymphozyten der Typ I Diabetiker eine gesteigerte Aktivierung aufwiesen. So war eine vermehrte Proliferationsaktivität gegenüber BSA in der niedrigeren Konzentration und gegenüber Casein unabhängig von der Konzentration des Antigens zu beobachten, wobei die Unterschiede gegenüber den Kontrollpersonen kein Signifikanzniveau erreichten; gleiches konnte für das Recall Antigen Tetanol gezeigt werden. Ein signifikanter Unterschied der lymphozytären Proliferation lies sich nachweisen für das Antigen Insulin in der niedrigeren Konzentration.

Der Vergleich der Proliferationsantworten von Typ I Diabetikern und Kontrollpersonen nach Bildung der Proliferationsindizes erbrachte außer einer signifikant stärkeren Antwort der Kontrollpersonen auf BSA in der höheren Konzentration keine Unterschiede.

Die Betrachtung der Ergebnisse unter Verwendung von Tetanol als Antigen zeigten, dass der Versuchsaufbau geeignet war, antigenspezifische T-Lymphozyten zu generieren, und die antigenspezifische Proliferation nachzuweisen, da dieses bei 35 % aller getesteten Personen gelang.

5.1 DIE AUSWAHL DER TESTPERSONEN

Der Autoimmunprozeß, der in der Zerstörung der β -Zellen mündet, beginnt lange vor der klinischen Manifestation des Diabetes mellitus.

Auf dem Boden einer genetischen Disposition kommt es, vermutlich unter Einwirkung anderer Umweltfaktoren, wie z.B. Viren, zur Auslösung der Insulitis. Diese verläuft offenbar über Monate oder Jahre und führt zur fortlaufenden Zerstörung der β -Zellen. Dabei sind zunächst die Nüchternblutzuckerwerte und die postprandialen Blutzuckerwerte noch normal. Ab einem gewissen Grad der Inselerschädigung kann dann als erste Anomalie der Insulinsekretion im intravenösen Glucosetoleranztest eine Verminderung oder ein Fehlen der frühen Insulinantwort auf intravenöse Glucosegabe nachgewiesen werden (Srikanta et al., 1984).

Erst wenn die Menge der β -Zellen um ca. 80% abgenommen hat, macht sich der daraus resultierende Insulinmangel auch klinisch als Manifestation des Diabetes bemerkbar. Es kommt zum Anstieg der Nüchternblutzuckerwerte und der postprandialen Blutzuckerwerte. Relativ plötzlich treten die Symptome wie Heißhunger, Polyurie, Polydipsie, Gewichtsabnahme, Abgeschlagenheit und Mattigkeit auf.

Nach der klinischen Manifestation kommt es meist nach einigen Wochen zu einer Remissionsphase, in der die inzwischen eingeleitete Insulintherapie oft deutlich reduziert werden kann. Offensichtlich kommt es in dieser sogenannten „Honeymoon- Periode“ zu einer Erholung der verbliebenen β -Zellen mit einer vorübergehenden Zunahme der körpereigenen Insulinproduktion. In der Regel endet diese Remissionsphase nach ca. 6 - 18 Monaten. Dann sind alle β -Zellen endgültig zugrunde gegangen. Der Autoimmunprozess brennt langsam aus.

β - Zellaktivität(%)

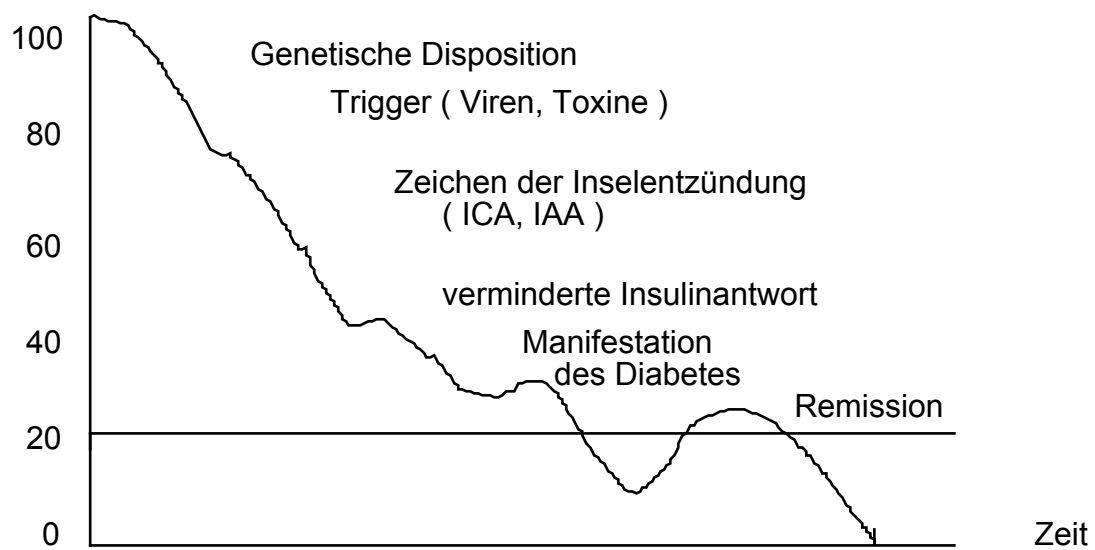


Abb. 23 : von Kuglin et al., 1989

Es kann also davon ausgegangen werden, daß bei Typ I Diabetikern mit längerer Krankengeschichte der Autoimmunprozeß bereits abgeschlossen ist, während bei frisch manifestierten Diabetikern noch autoimmunologische Vorgänge nachweisbar sein müßten.

Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen an frisch diagnostizierten Diabetikern durchgeführt. Die Blutentnahme erfolgte möglichst früh nach der Diagnosestellung , wenn möglich vor der ersten Insulingabe.

Als Kontrollpersonen dienten gesunde, nicht diabetische ICA-negative Personen, die keine Typ I Diabetiker in der Familienanamnese aufwiesen.

5.2 ALTER DER TESTPERSONEN

Hinsichtlich der Altersverteilung waren zwischen Typ I Diabetikern und den Kontrollpersonen keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

Der insulinpflichtige Diabetes mellitus tritt vorwiegend bis zum 30. Lebensjahr auf. Der Gipfel des Manifestationsalters liegt bei 15 bis 24 Lebensjahren. Das durchschnittliche Lebensalter bei den hier untersuchten Typ I Diabetikern zum Zeitpunkt der Manifestation betrug 30,6 Jahre (Standardabweichung 10,5 Jahre).

5.3 GESCHLECHTERVERTEILUNG IN DEN GRUPPEN

Innerhalb der Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Geschlechterverteilung. Für den Diabetes mellitus ist keine Bevorzugung eines Geschlechts bekannt.

5.4 ANTIKÖRPERBESTIMMUNGEN

Als Marker für die bestehende autoimmunologische Aktivität wurde eine Bestimmung der Inselzell-Antikörper herangezogen. Äquivalent zu dem zeitlichen Verlauf der Zerstörung der β -Zellen und damit zum zeitlichen Verlauf des immunologischen Geschehens treten diese Autoantikörper auf: Sie sind bereits vor der Diabetes-Manifestation nachweisbar und verschwinden mit zunehmender Krankheitsdauer aus dem Serum der Patienten (Lendrum et al. 1975, Kolb et al. 1988, Bruining et al. 1989, Mustonen 1984, Lendrum et al. 1976). Bei den hier untersuchten 17 frisch manifestierten Typ I Diabetikern war bei zehn Personen (58,8%) ein ICA-Titer nachweisbar, zwei (11,8%) zeigten nur einen grenzwertigen ICA-Titer und bei fünf der Diabetiker (29,4%) waren keine Inselzell-Antikörper nachweisbar. Diese Ergebnisse entsprechen den in der Literatur veröffentlichten Werten. Einige Autoren beschreiben Fälle der klinischen Manifestation eines insulinpflichtigen Diabetes mellitus ohne Nachweis von Inselzell-Antikörpern (Lendrum et al., 1975; Kolb et al., 1988; Bruining et al., 1989).

Bei den Verwandten ersten Grades wurde ebenfalls eine Bestimmung der Inselzell-Antikörper durchgeführt. Nach WHO Kriterien werden die Personen mit positivem ICA-Titer (in der Regel größer 40 JDF-Units) als Prädiabetiker bezeichnet, da sie ein erhöhtes Risiko haben, an Diabetes mellitus Typ I zu erkranken. Sie können erst nach Diabetes-Manifestation retrospektiv als echte Prädiabetiker bezeichnet werden.

Nach Maclaren besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der ICA-Titerhöhe und der Entwicklung eines manifesten Diabetes bei Prädiabetikern (Maclaren 1988). Nach Karjalainen können nur hohe und persistierende ICA-Titer (mehr als 18 JDF-Units) einen späteren Typ I Diabetes voraussagen (Karjalainen 1990). Auch Spencer beschreibt, daß das Risiko nur bei einer langen Persistenz der Inselzell-Antikörper über Monate bis Jahre erhöht zu sein scheint (Spencer et al. 1984). Allerdings sind nach Riley besonders die hochtitrigen Inselzell-Antikörper lange persistent (Riley 1984).

Nach Roep ist der prädiktive Wert der Inselzell-Antikörper abhängig vom Alter sowie Verwandtheitsgrad des Probanden mit einem Typ I Diabetiker, Höhe des ICA-Titers und evtl. noch weiteren bisher unbekanntem Parametern (Roep et al. 1992).

Bei den hier untersuchten sieben Verwandten 1. Grades war lediglich eine Person (14,3%) mit 40 JDF-Units ICA-positiv. Eine Person (14,3%) hatte mit 5 JDF-Units einen grenzwertigen Titer und bei fünf Personen (71,4%) waren keine Inselzell-Antikörper nachweisbar.

Eine Bestimmung anderer Antikörper, für die Untersuchungen hinsichtlich ihres prädiktiven Wertes in der Früherkennung des Diabetes mellitus vorliegen, wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Nach Atkinson führt z.B. eine zusätzliche Bestimmung von Insulin-Autoantikörpern dazu, daß sich der prädiktive Wert der Antikörper-Bestimmung in der Früherkennung bei Verwandten 1. Grades erhöht (Atkinson et al., 1996).

Die höchste Sensitivität hinsichtlich der Prädiktion des Typ I Diabetes hat jedoch die simultane Bestimmung der Antikörper gegen Tyrosinphosphatase 2A, Glutaminsäuredecarboxylase sowie Insulin (s.a. Kap. 1.3.3); mit steigender Anzahl von Antikörpern steigt auch die Erkrankungswahrscheinlichkeit.

Bei allen nicht-diabetischen Kontrollpersonen waren keine Inselzell-Antikörper nachweisbar.

5.5 PERIPHERE LYMPHOZYTEN DES BLUTES

Die Anzahlen der peripheren Lymphozyten von ICA-negativen Kontrollpersonen (n=17) und ICA-positiven Personen (ein Verwandter 1. Grades sowie zehn frisch manifestierte Diabetiker) und ICA-grenzwertigen Personen (ein Verwandter 1. Grades sowie zwei frisch manifestierte Typ I Diabetiker) zeigten keine signifikanten Unterschiede. Unterschiedliches Alter oder Geschlecht beeinflussten die Zellzahlen nicht.

Auch bei früheren Untersuchungen zu den peripheren mononukleären Zellen bei Diabetikern im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Buschard et al., 1983; Eliashiv et al., 1978; Omar et al., 1983).

Bekannt sind allerdings Unterschiede in der Verteilung der Lymphozytensubpopulationen bei Prädiabetikern, frisch manifestierten sowie Diabetikern mit längerer Krankheitsdauer im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen ohne Risiko für einen Typ I Diabetes. Dabei zeigt sich eine deutliche Fokussierung auf die T- Lymphozyten :

Prädiabetiker und frisch manifestierte Diabetiker weisen einen signifikant höheren Anteil an aktivierten T-Lymphozyten auf als gesunde Kontrollpersonen (Jackson et al., 1982; Ilonen et al., 1984; Ilonen et al., 1991). Dabei wurde sowohl eine Bevorzugung von HLA-DR3 positiven (Pozzilli et al., 1983), als auch von HLA-DR4 positiven Personen (Ilonen et al., 1984) postuliert. Mit zunehmender Dauer der Erkrankung geht die Zahl aktivierter T-Lymphozyten jedoch zurück, ihre Anzahl bleibt im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen aber erhöht (Alviggi et al., 1984).

Kontiainen bewies durch Analyse der V β - Ketten der Rezeptoren auf den aktivierten Lymphozyten, daß es sich um eine oligoklonale Aktivierung handelt (Kontiainen et al., 1991).

Die Phänotypisierung der T-Lymphozyten ergab in Bezug auf die Verteilung ihrer Subpopulationen zum Teil inhomogene Ergebnisse. So beobachtete man abnorme Erhöhungen von Zellen des T-Suppressor / zytotoxischen (CD8+) Typs bei gleichzeitiger Erniedrigung der T-Helfer / Inducer- (CD4+) Zellen (Faustmann et al., 1989; Faustmann et al., 1991; Ilonen et al., 1984; Herold et al., 1984).

Pozzilli beschrieb eine Erhöhung von aktivierten und zytotoxischen T-Lymphozyten bei erniedrigten T-Suppressor-Zellen und normale Zahlen für T-Helfer-Zellen bei frisch manifestierten Typ I Diabetikern im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen (Pozzilli et al., 1983; ebenso bei Buschard et al., 1980).

Ilonen fand dagegen erhöhte Zahlen von T-Helfer und T-Suppressor / Inducer Zellen bei erniedrigten zytotoxischen T-Zellen bei frisch manifestierten Diabetikern (Ilonen et al., 1991), während andere Autoren erniedrigte T-Helfer- Zellen und erhöhte T- Suppressor- Zellen beobachteten (Chatenoud et al., 1993).

Mit zunehmender Dauer der Erkrankung normalisierten sich die Verhältnisse der Lymphozytensubpopulationen wieder, es blieb jedoch eine Erniedrigung der Gesamtzahl an T-Lymphozyten bestehen (Pozzilli et al., 1983; Herold et al., 1984; Peakman et al. 1994).

Weiterhin wurde die Korrelation zwischen dem Vorhandensein aktivierter T-Lymphozyten und der Anwesenheit von Inselzell-Antikörpern und deren Titerhöhe untersucht : Einige Autoren beobachteten keine derartige Korrelation (Ziegler et al., 1987; Pozzilli et al., 1983), wohingegen Peakman für ICA-positive Diabetiker und Verwandte 1.Grades über erhöhte Zahlen von aktivierten CD4+ T-Helfer-Zellen berichtete (Peakman et al., 1994).

Auch bei genetisch suszeptiblen Personen ließen sich Veränderungen in der lymphozytären Zusammensetzung des peripheren Blutes beobachten. Verwandte 1. Grades von Typ I Diabetikern wiesen Erniedrigungen der T-Helfer / Inducer- Zellen auf (Al-Sakkaf et al., 1989; Peakman et al. 1994), bei gesunden Zwillingen von Patienten mit Typ I Diabetes fanden sich die

T-Suppressor / zytotoxischen Zellen vermindert (Johnston et al., 1988).

Die z.T. unterschiedlichen Ergebnisse deuten auf die Heterogenität des Prozesses hin, der letztendlich zur Zerstörung der insulinproduzierenden Zellen im Pankreas führt, sie beweisen jedoch die Beteiligung der unterschiedlichen Subpopulationen vor allem der T-Lymphozyten an der Pathogenese des Typ I Diabetes. Die nachgewiesenen Abnormitäten der Lymphozytensubpopulationen bei Verwandten 1. Grades von Typ I Diabetikern beweisen die genetische Determination dieser Veränderungen.

5.6 ANTGENSPEZIFISCHE T-ZELLREAKTIVITÄT

Zur Generierung der T-Zelllinien erfolgte eine Kokultivierung der frisch isolierten Lymphozyten der Test- bzw. Kontrollpersonen mit jeweils einem der folgenden Antigene :

- Bovines Serum Albumin (BSA) in 2 verschiedenen Konzentrationen
- β -Casein in 2 verschiedenen Konzentrationen
- Insulin in 2 verschiedenen Konzentrationen
- Tetanol als Positiv-Kontrolle (Recall Antigen)

Die Bildung der Zelllinien erfolgte über 12 bis 16 Tage. Die isolierten Lymphozyten wurden an Tag 1 mit dem jeweiligen Antigen kultiviert, unter Zugabe von 40 Vol.% Interleukin-2. Die Kulturen wurden jeden Tag lichtmikroskopisch auf Wachstum, Größe und Vitalität geprüft, bei Bedarf getrennt. An Tag 4 wurde aus jeder Kultur vorsichtig 1 ml Medium abgenommen, und durch frisches Medium ersetzt, in dem 20 % Interleukin-2 enthalten waren. Dies wurde nun jeden 2. Tag wiederholt bis zum Test auf antigenspezifische Stimulation, d.h. es erfolgten fünf bis sieben Stimulationen mit Interleukin-2.

5.7 LYMPHOZYTENPROLIFERATIONSTEST

Nach Bildung der Zelllinien standen die Lymphozyten für den Test auf antigenspezifische Proliferation zur Verfügung. Dafür wurden sie erneut dem Antigen ausgesetzt. Als antigenpräsentierende Zellen dienten autologe periphere Lymphozyten, die zuvor kryokonserviert, anschließend wieder aufgetaut und bestrahlt worden waren. Die Bestrahlung erfolgte, um die Zellen proliferationsunfähig zu machen. Ihre Vitalität wurde mittels Eosin-Färbung überprüft.

Nach einer Kulturdauer von 72 Stunden erfolgte die Messung der ³H-Thymidin Inkorporation durch die Zellen sowohl in Anwesenheit des spezifischen Antigens

als auch in dessen Abwesenheit, sowie nach Stimulation mit dem unspezifischen Lektin Phythämagglutinin als Positiv-Kontrolle.

Angegeben wurde der gemessene ^3H -Thymidin-uptake in counts per minute (cpm). Weiterhin erfolgte die Bildung des Proliferationsindex (PI), um den Einfluß des Kulturmediums auf das Zellwachstum auszuschließen. Dieser ist der Wert der ^3H -Thymidin Inkorporation in Anwesenheit des Antigens dividiert durch die Inkorporation in Abwesenheit des Antigens. Bei einem Proliferationsindex ≥ 3 kann von einer gelungenen Zelllinien-Bildung und somit dem Nachweis einer spezifischen Proliferation ausgegangen werden.

5.8 SPEZIFISCHE T-ZELL PROLIFERATION AUF TETANOL

Als Positiv-Kontrolle wurde aus den peripheren Lymphozyten aller Test- und Kontrollpersonen sowie der Verwandten 1. Grades eine Zelllinie auf Tetanol gebildet, deren spezifische Proliferation gemessen wurde. Dieser Ansatz erfolgte unter der Vorstellung, daß Tetanol durch Impfungen gegen Wundstarrkrampf ein bekanntes Antigen darstellt, und sich somit bei allen Personen Tetanol-spezifische Zelllinien generieren lassen müßten.

Für Tetanol ergab die Messung des ³H-Thymidin-uptakes, dargestellt in counts per minute (cpm) in den drei Gruppen - Typ I Diabetiker, Verwandte 1. Grades und gesunde Kontrollpersonen - erwartungsgemäß häufige T-Zellantworten, wobei sich die Typ I Diabetiker nicht von den Verwandten 1. Grades und den Kontrollpersonen unterschieden. Verglichen mit den Kontrollpersonen alleine wiesen die Typ I Diabetiker jedoch eine signifikant höhere T-Zellaktivität gegen Tetanol auf. Insgesamt konnten bei mehr als einem Drittel aller getesteten Personen Tetanol-spezifische T-Lymphozyten nachgewiesen werden.

Die mit dem Recall-Antigen Tetanol erzielten Ergebnisse beweisen, daß es möglich ist mit der vorgestellten Methode antigenspezifische T-Zellen zu generieren.

5.9 SPEZIFISCHE T-ZELL PROLIFERATION AUF BOVINES SERUM ALBUMIN

beide Konzentrationen Bovines Serum Albumin (BSA) wird als ein in der Pathogenese des Typ I Diabetes bedeutsames Antigen diskutiert. Wie in der Einleitung aufgeführt, lassen sich sowohl in den Tiermodellen der BB-Ratte und der NOD-Maus als auch bei frisch manifestierten Typ I Diabetikern Antikörper gegen BSA nachweisen (Beppu et al., 1987; Glerum et al., 1989; Saukonen et al., 1994).

Karjalainen, der ebenfalls erhöhte Titer für anti-BSA-IgG- Antikörper bei Typ I Diabetikern beobachtete, stellte fest, daß ein Großteil davon spezifisch war für ABBOS, eine aus 17 Aminosäuren (Position 152 - 168) bestehende Sequenz des bovinen Serum Albumins. In dieser Sequenz unterscheidet sich BSA von Ratten-Albumin, Maus- Albumin und humanem Albumin. ABBOS wird als das antigene Epitop von BSA angesehen (Karjalainen et al., 1992).

Die ABBOS spezifischen Antikörper zeigten sich kreuzreaktiv mit p69, einem durch Gamma-Interferon auf der Oberfläche der β -Zelle induzierbarem Antigen (Glerum et al., 1989; Martin et al., 1991; Karjalainen et al., 1992). Hier könnte ein Zusammenhang zwischen einer Immunisierung gegen Milchproteine und der β -Zellzerstörung liegen.

Ein Zusammenhang zwischen der Titerhöhe der ABBOS-spezifischen Antikörper und bestimmten Diabetes-assoziierten HLA-Haplotypen war nicht nachzuweisen. Die erhöhten Titer fielen mit zunehmender Krankheitsdauer ab und hatten sich nach zwei Jahren wieder normalisiert.

Karjalainen kam zu dem Schluß, daß durch die Exposition von BSA bzw. ABBOS im frühen Kleinkindalter ein Immunprozeß in Gang gebracht wird, der später durch endogene Antigene wie p69 aufrecht erhalten wird. Dies würde auch das Absinken des Antikörpertiters mit zunehmender Krankheitsdauer erklären, da im weiteren Verlauf der Erkrankung kaum noch p69 exprimierende Zellen im Pankreas existieren (Karjalainen et al., 1992).

Auf diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zur proliferativen Antwort von T-Zellen auf BSA durchgeführt, wobei Lymphozyten frisch manifestierter insulinpflichtiger Diabetiker verglichen wurden mit Lymphozyten gesunder Kontrollpersonen. Dabei wurde BSA in zwei Konzentrationen eingesetzt (100 µg/ml und 25 µg/ml).

Es zeigte sich, daß in der Gruppe der Kontrollpersonen signifikant häufiger BSA-reaktive Antworten meßbar waren (BSA 100µg/ml). Prozentual gesehen war bei den Kontrollpersonen häufiger eine spezifische Proliferation durch einen Proliferationsindex größer drei nachweisbar. Für die niedrigere BSA-Konzentration (25µg/ml) waren bei der Betrachtung der gemessenen counts per minute tendenziell höhere Werte in der Gruppe der Diabetiker nachweisbar, diese erreichten aber kein Signifikanzniveau. Unter Berücksichtigung des Einfluß des Kulturmediums auf die Proliferation der Zellen durch Bildung des Proliferationsindex waren für die Konzentration von 25 µg/ml keine signifikanten Unterschiede mehr nachweisbar. Auch die positiven Proliferationsindizes ($PI \geq 3$) waren in keiner Gruppe häufiger. Für konnten in der Diabetikergruppe keine Abhängigkeiten von der Höhe der ICA-Titer festgestellt werden.

Auch Atkinson untersuchte die spezifische proliferative Antwort von T-Lymphozyten auf BSA. Er konnte keine signifikanten Unterschiede in der zellulären Antwort auf BSA zwischen frisch manifestierten Typ I Diabetikern und gesunden Erwachsenen feststellen (Atkinson et al., 1993).

Ähnliche Ergebnisse lieferte Vaarala. Sie zeigte allerdings eine spezifische Proliferation von T-Zellen frisch manifestierter Diabetiker in 55% der Fälle auf β -Lactoglobulin. Im Vergleich dazu war bei gesunden Kontrollpersonen eine signifikante Proliferation auf β -Lactoglobulin nur in 22% der Fälle nachzuweisen (Vaarala et al., 1996).

Eine BSA-spezifische T-Zellproliferation wurde von Cheung beschrieben. Ihm gelang es aus peripher mononukleären Zellen frisch manifestierter Typ I Diabetiker ABBOS-sensitive T-Zelllinien zu bilden. Dies gelang ihm bei 28 von 31 diabetischen Kindern, wohingegen es bei gesunden Kindern nicht gelang. Auch die

T-Zellen von Patienten mit Juveniler Rheumatoider Arthritis bzw. Systemischem Lupus Erythematodes zeigten diese Proliferation nicht. Der Haplotyp HLA-DR4 war mit einer stärkeren Proliferation der Zellen assoziiert (Cheung et al., 1994).

Es bleibt unklar, ob die frühe Ernährung von Kleinkindern mit Kuhmilchprodukten zu einer Immunisierung im humoralen und zellulären System führt. Es wäre denkbar, daß aufgrund eines noch unreifen Darmtraktes im Kleinkindalter größere BSA-Peptide wie ABBOS die Mucosa passieren können. Bei genetisch suszeptiblen Personen scheint eine Toleranz- Entwicklung auszubleiben (es lassen sich auch bei Normalpersonen Antikörper gegen verschiedene Kuhmilchproteine nachweisen, jedoch scheint sich bei diesen eine Toleranz zu entwickeln).

Ein unspezifischer Infekt könnte dann durch die folgende Produktion von Interferon-Gamma durch immunkompetente Zellen zur Expression von p69 auf der β -Zelle führen. Daraufhin, so die Hypothese, beginnen die kreuzreaktiven ABBOS-Antikörper und die sensibilisierten Lymphozyten mit der Zerstörung der β -Zelle (Karjaleinen et al., 1992; Nerup et al., 1988; Hannenberg et al., 1989).

5.10 SPEZIFISCHE T-ZELL PROLIFERATION AUF β -CASEIN

Neben BSA ist ein weiteres Kuhmilchprotein, Casein, Gegenstand der Untersuchungen. Casein besteht aus vier verschiedenen Fraktionen (α , β , γ , κ). In humaner Milch macht Casein ca. 25% des totalen Proteins aus, in Kuhmilch 80%, davon sind 35% β -Casein. Es konnte gezeigt werden, daß die enzymatische Verdauung von β -Casein in vitro Peptide mit immunmodulatorischer Aktivität auf humane Phagozyten ergibt (Jazir et al., 1992).

Casein steht in der Diskussion an der Pathogenese des Typ I Diabetes beteiligt zu sein, seit gezeigt wurde, daß eine proteinfreie Ernährung bei der NOD-Maus die Entstehung eines Diabetes verhindert, wohingegen eine Diät, die nur Casein als alleinige Proteinquelle enthält, die Diabetes-Entstehung fördert (Reddy et al., 1995; Elliott et al., 1988).

Wurden dahingegen hydrolysiertes Casein oder einzelne Aminosäuren anstatt intaktes Protein verfüttert, wurde die Diabetes-Entstehung verhindert (Elliott et al., 1988; Coleman et al., 1990; Karges et al., 1997). Es scheint also intaktes Fremdprotein als Trigger erforderlich zu sein. Gleiches konnte für die BB-Ratte gezeigt werden (Scott et al. 1997).

Die Hypothese der pathogenetischen Wirkung von Casein in der Diabetes-Entstehung wird weiterhin gestützt durch die Tatsache, daß sich bei Typ I Diabetikern zum Zeitpunkt der Diagnose Auto-Antikörper gegen β -Casein nachweisen lassen (Wasmuth et al. 1995).

Es konnten homologe Sequenzen zwischen bovinem β -Casein und Molekülen, die von der β -Zelle des Pankreas exprimiert werden, identifiziert werden. Darunter auch p69 und Carboxypeptidase (Becker et al, 1995). Beide werden als Autoantigene in der Pathogenese des Diabetes mellitus diskutiert (Atkinson et al., 1994). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß eine Sequenz, in der sich bovines und humanes β -Casein (Position 63 - 76) unterscheiden, identisch ist mit einer Sequenz des für die β -Zelle spezifischen Glucose-Transporters GLUT-2. Antikörper gegen

GLUT-2 konnten bei den meisten Patienten mit frisch manifestiertem Typ I Diabetes gefunden werden (Inman et al., 1993).

Karges und Kollegen berichteten, daß durch Milzzellen von NOD- Mäusen, die eine Diabetes-protective Diät mit hydrolysiertem β -Casein erhalten hatten, kein Diabetes transferiert werden konnte (Diabetes- Inzidenz von 6,2% vs. 94,7% bei Transfer von Milzzellen von normal ernährten NOD-Mäusen). T-Lymphozyten von diabetogenen Milzzellen-Empfängern zeigten eine Reaktivität gegenüber dem Inselzellantigen p69 und GAD (Karges et al., 1997).

Hisatsune konnte NOD-Mäuse mit Casein sensibilisieren und zeigen, daß angereicherte CD8+ T-Lymphozyten spezifisch auf vorverdautes Casein reagieren, weniger gut auf intaktes Casein. Die gut proliferierenden Zellen produzierten außerdem auffällige Mengen an Interferon-Gamma. Hisatsune interpretierte diese Ergebnisse als Beweis für eine orale Immunisierung von T-Lymphozyten (Hisatsune et al., 1995).

Ähnliche Ergebnisse lieferten Versuche mit vorverdaulichem β -Casein (Coste et al., 1992).

Von Cavallo wurden 1996 Untersuchungen publiziert, die sich mit der immunologischen Antwort auf β -Casein auf zellulärer Ebene beschäftigten. In einer Untersuchung an 47 Personen mit frisch manifestiertem Diabetes war eine spezifische Proliferation der Lymphozyten auf β -Casein in 51,1% nachweisbar. Dahingegen war dies nur bei 2,7% der 36 gesunden Kontrollpersonen zu zeigen, dieser Unterschied war signifikant. Keine signifikante Korrelation war nachweisbar zwischen der Höhe der proliferativen Antwort und Blutzucker, C- Peptid, HbA1c und HLA-DR-Phänotyp (Cavallo et al., 1996).

Im Gegensatz dazu konnte Vaarala keine signifikanten Unterschiede bezüglich einer T-Zell Proliferation auf Casein zwischen Typ I Diabetikern und gesunden Kontrollpersonen nachweisen (Vaarala et al., 1996).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine spezifische Proliferation der Lymphozyten von frisch manifestierten Typ I Diabetikern auf Casein nachweisbar ist. Dabei wurde β -Casein in zwei Konzentrationen (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) als Antigen eingesetzt.

Vergleicht man die proliferativen Antworten in cpm der Typ I Diabetiker und Kontrollpersonen läßt sich tendenziell eine höhere Proliferationsantwort in der Gruppe der Typ I Diabetiker für beide Casein- Konzentrationen feststellen, allerdings wird das Signifikanzniveau nicht erreicht. Auch bei der Betrachtung der Proliferationsindizes für beide Konzentrationen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Für beide Konzentrationen ließen sich in der Diabetiker- Gruppe keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Höhe des ICA-Titers nachweisen.

Insgesamt scheint jedoch Casein die Zellen von Typ I Diabetikern stärker zu stimulieren als die der Kontrollpersonen; die höheren Mediumwerte könnten sich im Sinne einer allgemein höheren Aktivierung der Zellen interpretieren lassen.

5.11 SPEZIFISCHE T- ZELL- PROLIFERATION AUF INSULIN

Seit der Entdeckung von Insulin-Autoantikörpern bei Patienten mit frisch manifestiertem Typ I Diabetes mellitus (Palmer et al., 1983) wird Insulin als ein Autoantigen für T-Lymphozyten von Typ I Diabetikern diskutiert. Weiterhin ist Insulin das einzige inselspezifische der als potentiell an der Pathogenese des Typ 1 Diabetes beteiligten Antigene.

Insulin besteht aus zwei Peptidketten, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die A-Kette besteht aus 21 Aminosäuren, die B-Kette aus 30 Aminosäuren. Die A-Kette enthält außerdem eine zweite Disulfidbrücke. Bei der Biosynthese wird das Insulinmolekül beim Menschen zunächst in Form einer einzigen, 107 Aminosäuren enthaltenden unverzweigten Polypeptidkette hergestellt (Prä-Proinsulin). Dieses Prä-Proinsulin stellt das primäre Translationsprodukt dar. Durch enzymatische Abspaltung eines N-terminalen Peptids entsteht Proinsulin. Die Primärstruktur des Proinsulins begünstigt die spontane Ausbildung der Disulfidbrücken. Anschließend wird das nicht benötigte Mittelstück (C-Peptid) enzymatisch entfernt, so daß im fertigen Insulinmolekül zwei Peptidketten vorliegen. Das Insulin wird in Sekretionsvesikeln gespeichert, die nach Fusion mit der Zellmembran ihren Inhalt an den perikapillären Raum abgeben.

Im Tierversuch ließen sich bei Guinea-Schweinen und NOD-Mäusen Lymphozytenproliferationen auf tierisches Insulin nachweisen, wobei jeweils verschiedene Zuchtstämme spezifisch auf eine bestimmte Determinante des Insulins reagierten. Dies wurde interpretiert als ein genetisch determiniertes Erkennen von Unterschieden in der Aminosäuren-Zusammensetzung der verschiedenen Insuline (Rosenwasser et al., 1981; Barcinski et al., 1977).

Mehrere Autoren berichteten über eine spezifische Proliferation von Lymphozyten von Typ I Diabetikern auf Rinder - oder / und Schweineinsulin (MacCuish et al., 1975) bzw. Humaninsulin als Antigen (Nell et al., 1983, 1985). Interessanterweise zeigten auch Lymphozyten von unbehandelten bzw. kürzer als drei Wochen

behandelten frisch manifestierten Diabetikern Proliferationen gegen Insulin, womit eine aktive Immunisierung bei diesen Personen ausgeschlossen ist.

Wegmann und Kollegen gelang bereits bei 4 bis 12 Wochen alten NOD-Mäusen die Isolation von insulinspezifischen T-Zellen aus Inselzellinfiltrat (Wegmann et al., 1994). Sie zeigten weiterhin, daß 55% von primär inselspezifischen T-Zellklonen, die aus der Insulitis von 12 Wochen alten NOD-Mäusen etabliert werden konnten, mit Schweineinsulin reagierten (Wegmann et al., 1994). Das Vorhandensein dieser Klone in der Insulitis von prädiabetischen NOD-Mäusen gibt Hinweise auf das Mitwirken von insulinspezifischen T-Zellen bei der Zerstörung der β -Zellen.

In einer anderen Untersuchung der gleichen Arbeitsgruppe isolierte Daniel aus der Insulitis prädiabetischer NOD-Mäuse sechs T-Zellklone, die alle spezifisch waren für ein Epitop der B-Kette von synthetischem Mäuseinsulin. Alle T-Zellklone konnten den Diabetes in NOD-Mäusen verstärken bzw. Diabetes auf nicht-diabetische NOD-Mäuse transferieren. Es war somit gezeigt, daß insulinspezifische T-Zellklone β -Zellen in vivo zerstören können (Daniel et al., 1995).

Auch Schloot gelang es, durch Transfer von insulinspezifischen T-Zellklonen der NOD-Maus den Ausbruch des Diabetes in prädiabetischen NOD-Mäusen zu beschleunigen. Dies war mit GAD-spezifischen Klonen nicht gelungen (Schloot et al., 1996).

Naquet untersuchte Lymphozyten von mit Insulin behandelten Diabetikern sowie ihren nicht-diabetischen Verwandten 1.Grades. Die höchsten Proliferationen auf Humaninsulin zeigten die mit einer Mischung aus Rinder- und Schweineinsulin behandelten Diabetiker. Jedoch zeigten auch die Lymphozyten von Verwandten 1.Grades proliferative Reaktionen auf Humaninsulin. Diese Zelllinien bestanden aus CD4⁺ Lymphozyten. Sie erkannten zwei Epitope des Insulinmoleküls, wobei die Erkennung der Epitope sich als HLA-DR abhängig erwies. Naquet war also der Nachweis Insulin-spezifischer autoreaktiver T-Zellen bei nicht-diabetischen Verwandten 1. Grades gelungen (Naquet et al., 1988).

Die Immunisierung gegen Insulin findet schon im Kleinkindalter statt. Auf Kuhmilch basierende Nahrungen für Säuglinge enthalten bovines Insulin, dies führte bei ausschließlich mit einer solchen Diät ernährten Kindern zu signifikant häufigerer Antikörperbildung. Diese Antikörper waren spezifisch für bovines Insulin. Analog dazu waren die Ergebnisse hinsichtlich der zellulären Immunität (Paronen et al., 2000). Hier könnte die Verbindung zwischen dem Umweltfaktor Ernährung und der Entwicklung eines Typ1 Diabetes liegen; in suszeptiblen Individuen könnte die Immunität in Autoaggression münden.

Andererseits gibt es auch Hinweise auf eine Toleranzentwicklung gegen Insulin im Säuglingsalter beziehungsweise in utero. Bekanntermaßen haben Kinder diabetischer Eltern ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes. Das höhere Risiko haben Kinder von diabetischen Vätern, Kinder von diabetischen Müttern scheinen bereits in utero eine Toleranz gegen exogen zugeführtes Insulin zu entwickeln (Warram et al., 1984; Tuomilehto et al., 1992). Dies läßt sich auf den Ebenen der zellulären und humanen Immunität im Alter 6 Monaten nachweisen, wenn die mütterlichen Antikörper aus dem kindlichen Serum verschwunden sind (Paronen et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, eine insulinspezifische Proliferation von T- Zellen frisch- manifestierter Diabetiker nachzuweisen.

Dabei wurden zwei Insulin-Konzentrationen (250 µg/ml und 25 µg/ml) eingesetzt. Für die höhere Insulin-Konzentration zeigte der ³H-Thymidin-uptake, gemessen in counts per minute (cpm), zwischen Diabetikern und Kontrollpersonen keine signifikanten Unterschiede, allerdings schien beim Vergleich der Mittelwerte der cpm in der Gruppe der Diabetiker eine stärkere Proliferation vorzuliegen. Für die niedrigere Insulin- Konzentration ließ sich in der Diabetiker-Gruppe eine signifikant höhere Proliferation nachweisen. Beides könnte interpretiert werden im Sinne einer erhöhten Reaktionsbereitschaft der Zellen gegenüber Insulin.

Nach Bildung der Proliferationsindizes lagen allerdings keine signifikanten Unterschiede mehr vor. Betrachtet man die positiven Proliferationsindizes, also

größer gleich 3, sieht man, daß es in der Diabetiker- Gruppe einmal gelungen war, eine spezifische Proliferation nachzuweisen. Dies lies sich bei demselben Patienten für die höhere Konzentration von 250 µg/ml nicht reproduzieren. In der Kontrollgruppe fand sich keine Person mit positivem Proliferationsindex.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der antigenspezifischen T-Zellreaktivität auf die in der Nahrung vorkommenden Proteine Bovines Serum Albumin und β -Casein sowie Insulin bei Typ I Diabetikern.

Dafür wurden Lymphozyten von Typ I Diabetikern isoliert. Voraussetzung war, daß es sich um frisch manifestierte Diabetiker handelte, unter der Vorstellung, daß sich bei diesen Personen die autoimmunologischen Vorgänge im Gegensatz zu Patienten mit längerer Krankheitsdauer noch nachweisen lassen müßten. Als Kontrolle dienten die Zellen gesunder Personen.

Zur Bildung von antigenspezifischen T-Zelllinien wurden die peripheren mononukleären Zellen kokultiviert mit Antigenen (Bovines Serum Albumin, β -Casein und Insulin), deren Beteiligung an der Pathogenese des juvenilen Diabetes diskutiert wird. Als Kontrollantigen wurde das Recall-Antigen Tetanol eingesetzt.

In einem nachfolgend durchgeführten Lymphozytenproliferationstest wurde untersucht, ob die Zellen dieser Zelllinien das jeweilige Antigen wiedererkennen und mit einer gesteigerten Proliferation reagieren.

Wie erwartet konnten mit dieser Methodik sowohl bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ I (31,3 %), als auch bei Verwandten ersten Grades (42,8 %) und Kontrollpersonen (35,3 %) T-Zelllinien generiert werden, die mit dem Recall-Antigen Tetanol reagierten. Dies zeigt, daß der Nachweis der Antigenpezifität mit der durchgeführten Methodik möglich ist.

Insgesamt waren antigenspezifische T-Zelllinien bei Typ I Diabetikern auf alle untersuchten Antigene nachweisbar, ebenso bei den Kontrollpersonen, mit Ausnahme des Insulins.

Deutliche Unterschiede ergaben sich z.T. hinsichtlich der Lymphoproliferation zwischen Typ I Diabetikern und Kontrollpersonen. So zeigten die Zelllinien der Diabetiker deutlich höhere Proliferationen gegen BSA und Tetanol in der jeweils niedrigeren Konzentration, sowie gegen β -Casein unabhängig von der Konzentration. Die Unterschiede zu den Kontrollpersonen erreichten jedoch kein Signifikanzniveau. Signifikant unterschiedlich war die Proliferation bezüglich des Antigens Tetanol, mit erhöhter Proliferation bei den Typ I Diabetikern.

Bei der Betrachtung der Proliferationsindizes zeigte sich eine signifikant erhöhte Antwort der Kontrollpersonen gegenüber der höheren BSA-Konzentration; gleiches gilt in der Tendenz für β -Casein.

Dabei ergaben sich Unterschiede in der Reaktivität zwischen Typ I Diabetikern und Kontrollpersonen auf Casein. Ob die gefundenen, spezifischen T-Zellreaktionen für die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ I relevant sind, lässt sich nur in longitudinalen Studien untersuchen, in denen echte Prädiabetiker bis zur Manifestation des Diabetes mellitus Typ I verfolgt und auf Veränderung der T-Zellantworten untersucht werden.

7 LITERATUR

- Adams S.F.
The seasonal variation in the onset of acute diabetes
Arch. Intern. Med. 37 : 861 - 864 (1926)
- Al - Sakkaf,L.; Pozzilli,P.; Tarn,A.; Schwarz,G.; Gale,E.; Bottazzo,G.
Persistent reduktion of CD5/CD8 lymphocyte ratio and cell activation before the onset of type 1 diabetes
Diabetologia 1989, 32 : 322-25
- Alviggi,L.; Hoskins,P.J.; Pyke,D.A.; Johnston,C.; Tee,D.E.H.; Leslie,R.D.G.
Pathogenesis of insulin dependent diabetes : a role for activated T lymphocytes
Lancet 1984, 2 : 4-6
- Andreolotti L, Hober D, Hober-Vandenberghe C, Belaich S, Vantighem MC, Lefebvre J, Wattré P
Detection of coxsackie B virus RNA sequences in whole blood samples from adult patients at the onset of type I diabetes mellitus
J Med Virol 1997 Jun; 52 (2) :121-7
- Andreolotti L, Hober D, Hober-Vandenberghe C, Fajardy I, Belaich S, Lambert V, Vantighem MC, Lefebvre J, Wattré P
Coxsackie B virus infection and beta-cell autoantibodies in newly diagnosed IDDM adult patients
Clin Diagn Virol 1998 apr; 9 (2-3) : 125-33
- Atkinson, MA.; Maclaren, NK.; Riley, WJ.; Winter, WE.; Fisk, DD.; Spillar, RP.
Are Insulin Autoantibodies markers for insulin- dependent diabetes mellitus
Diabetes, 1986; 35: 894-98
- Atkinson MA, Maclaren NK
The pathogenesis of insulin dependent diabetes mellitus
N Eng J Med 1994; 331 : 1428 - 1436
- Atkinson MA, Bowman MA, Campbell L, Darrow BL, Kaufman DL, MacLaren NK
Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie viruses in insulin-dependent diabetes
J Clin Invest. 1994 Nov; 94 (5) :2125-9
- Baekkeskov-S, J.H. Nielsen, B. Marnér, T. Bilde, J. Ludvigsson, A. Lenmark
Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins
Nature (Lond.) 298 (1982) : 167 - 169
- Baekkeskov-S; Aanstoot-T; Christgau-S; Reetz-A; Solimena-M; Cascalho-M; Folli-F; Richter-OelsenH; Camilli-P
Identification of the 64k autoantigen in insulin-dependent-diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase
Nature 1990; 347 : 151-56

Bärmeier

Risk for developing IDDM and the presence of islet 64kD antibodies
Diabetologia 1991; 34 : 727 – 733

Ballinger WF, Lacy PE

Transplantation of intact pancreatic islets in rats
Surgery 1972; 72: 175-86

Barcinski MA, Rosenthal AS.

Immune response gene control of determinant selection. I. Intramolecular mapping of the immunogenic sites on insulin recognized by guinea pig T and B cells.
J Exp Med 1977 Mar 1;145(3):726-42

Barnett-A.H., Eff-C., Leslie-R.D., Pyke-D.A.

Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs
Diabetologia, 1981; 20 (2) : 87 - 93

Becker, F.; Helmke, K.; Seggewies, K.; Sauer, H.; Federlin, K.

Inselzell (ICA)- und Insulin (IAA)- sowie andere Autoantikörper als Marker der Autoimmunität von Typ I Diabetikern und ihren Verwandten 1. Grades
Akt. Enokr. Stoffw. 1989; 10: 37-41

Becker F, Wasmuth HE; Hahnen J, Elliott RB, Federlin K

Prediction of common epitopes between cow's milk proteins and β - cell antigens
Autoimmunity 1995; 21 : A 342 (Abstrakt)

Bell-G.I., Horita-S., Karam-J.H

A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin - dependent diabetes mellitus
Diabetes 1984; 33 (2) : 176 - 183

Bendelac, AC.; Carnaudm, C.; Boitard, C., Bach, FC.

Syngenic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates.
Requirement for both Lyt2+ L3T4+ T- cells
Exp Med 1987; 166: 823

Beppu-H; Winter-WE; Atkinson-MA; MacLaren-NK; Fujita-K; Takahshi-H;

Bovine albumine antibodies in NOD mice
Diabetes Research 1987; 6: 67 -9

Bertrams-J

The HLA association of insulin - dependent (type 1) diabetes mellitus
Behring.Inst.Mit. 1984 (75) : 89 - 99

Block MB, Berk JE, Fridhandler LS

Diabetic ketoacidosis associated with mumps virus infection
Ann. Intern. Med.78 : 663 - 667 (1973)

Blom L, Dahlquist G, Nyström L, Sandström, A

The Swedish childhood diabetes study - social and perinatal determinants for diabetes in childhood
Diabetologia 32 : 7 - 13 (1989)

- Blom L, Nyström L, Dahlquist G
The Swedish childhood diabetes study : vaccinations and infections as risk determinants for diabetes in childhood
Diabetologia 34 : 176 - 181 (1991)
- Boitard C, Michie S, Serrurier P, Butcher GW, Larkins AP, McDevitt HO.
In vivo prevention of thyroid and pancreatic autoimmunity in the BB rat by antibody to class II major histocompatibility complex gene products.
Proc Natl Acad Sci U S A 1985 Oct;82(19):6627-31
- Boitard, C.; Yasunami, R.; Dardenne, M.; Bach JF.
T- cell mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice
J Exp Med 1989; 169: 1669- 80
- Boitard-C, LARGER-E, Timsit-J, Sempe-P, Bach-JF.
IDDM : an islet or an immune disease ?
Diabetologia 1994; 37 : 90 - 8
- Borch-Johnsen K
Relation between breast - feeding and incidence rates of IDDM
The Lancet, November 10, 1984, S. 1083
- Boyum, A.
Isolation of Lymphocytes, Granulocytes and Macrophages
Scand.J.Immun. 1976, 5 (Suppl.) : 9-16
- Bottazzo, GF.; Florin- Christensen, A.; Doniach, D.
Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies
Lancet 1974; 2: 1279-82
- Bottazzo, GF.; Cudworth, AG.; Moul, DJ.; Doniach, D.; Festenstein, H.
Evidence for a primary autoimmune type of diabetes mellitus (type Ib)
BMJ 1978;2: 1253-55
- Bottazzo, GF.; Dean, BM.; McNally, JM.; MacKay, EH.; Swift, PGF.;
Gamble, DR.
In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis
N Engl J med 1985; 313: 353-60
- Brain B , Vas, M.R.; Lowenstein T
Blood 1964, 23; 108
- Brendel MD, Hering BJ, Schultz AO, Bretzel RG
International Islet Transplant Registry
Newsletter No. 9, Vol. 8, No. 1, June 2001
- Bretzel R , Hering B , Ferderlin K
Islet transplantation registry report 1991
Diab.Nutr.Metabolism 1992,5 (Suppl.): 177-81

Bruining-GJ D.E. Grobbee, G.J. Scheffer, A.M. de Bruyn, J.L. Molenaar, A. Hofman, H.A. Bruining, H.A. Valkenburg
Ten - year follow - up study of islet - cell antibodies and childhood diabetes mellitus
Lancet I (1989) : 1100 - 1102

Buschard,K.; Madsbad,S.; Rygaard,J.
Depressed suppressor cell activity in patients with newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus
Clin.Exp. Immunol. 1980, 45 : 25-31

Buschard-K, S. Madsbad, J. Mehlsen, J. Rygaard
T - Lymphocyte Subsets in patients with newly diagnosed type 1 (insulin - dependent) diabetes mellitus . A prospective study
Diabetologia 1983; 25 : 247 - 251

Cavallo MG, Fava D, Monetini L, Barone F, Pozzilli P
Cell - mediated Immune response to β - casein in recent - onset insulin - dependent diabetes : implications for disease pathogenesis
Lancet 1996; 348 : 926 - 928

Chan-S.H., Yeo-P.P., Lee-B.W., Tan-S.H., Cheah-J.S., Wong-H.B.
HLA and insulin - dependent diabetes mellitus in Singaporean Chinese
An.Acad.Med.Singapore, 1985; 14 (2) : 215 - 8

Chatenoud, L.; Volpini, W.; Timsit, J.; Boitard, C.; Bach, J.-F.
Aberrant distribution of CD4 and CD8 lymphocyte subsets in recent onset IDDM patients
Diabetes 1993, 42 : 869-75

Claasen,M.; Diehl,V.; Kochsiek,K.
Innere Medizin, 2. Auflage, 1993, Urban und Schwarzenberg,

Coleman-TJ, D.R. Gamble, K.W. Taylor
Diabetes in mice after coxsackie B4 virus infection
Br. Med. J. 3 : 25 - 27, 1973

Coleman DL, Kuzava JE, Leiter EH
Effect of diet on incidence of Diabetes in Nonobese diabetic mice
Diabetes 1990; 39 432 - 436

Coste M, Rochte V, Leonil J, Molle D, Bouhallab S, Tome D
Immunol. Lett. 1992; 33 (1) : 41 - 46

Crino A, Cavallo MG, Corbi S, Mesturino CA, Ferrazzoli F, Coppolino G, Bizzari C, Cervoni M, Monetini L, Pozzilli P, IMDIAB Group
Intradermal skin test with diabetes specific antigens in patients with type 1 diabetes
Clin. Exp. Immunol. 2001; 123(3) : 382-6

Cudworth,A.G.: Wolf,E.
Genetic susceptibility to type 1 (insulin - dependent) diabetes mellitus
Clin. Endocrinol. Metab., 1982, 11 (2) : 389 - 408

- Dahl-Jorgensen-K., Joner-G., Kristian-FH.
Relationship between Cow's Milk Consumption and Incidence of IDDM
in Childhood
Diabetes care 1991; 14 : 1081 - 83
- G. Dahlquist-G, L. Blom, G. Lönnberg
The Swedish Childhood Diabetes Study - a multivariate analysis of risk
determinants for diabetes in different age groups
Diabetologia (1991) 34 : 757 - 762
- Dahlquist-G., Blom-L., Holmgren-G., Hagglof-B., Larsson-Y., Sterky-G., Wal-S.
The epidemiology of diabetes in Swedish children 0 - 14 years - a six year prospective study
Diabetologia 1985; 28 (11) 802 - 808
- Daneman-D, L. Fishman, C. Clarson, J.M. Martin
Dietary triggers of insulin - dependent diabetes in BB - rat
Diabetes research 5 : 93 - 97 , 1987
- Daniel D, Gill RG, Schloot N, Wegmann D.
Epitope specificity, cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T cell
clones isolated from NOD mice.
Eur J Immunol 1995 Apr;25(4):1056-62
- Dean, BM.; Becker, F.; McNelly, JM.; Tarn, AC.; Schwartz, G.; Gale, EAM.; Bottazzo, GF.
Insulin- antibodies in the prediabetic period: Correlation with islet cell- antibodies and
development of diabetes
Diabetologia 1986; 29: 339-42
- Diabetes epidemiology research international group
Geographic patterns of childhood insulin dependent diabetes - mellitus
Diabetes 1988; 37 (8) : 1113 - 9
- Eisenbarth,G.
Type I Diabetes mellitus: A chronic Autoimmune Disease
N.Eng.J.Med.1986,314: 1360-67
- Eisenbarth GS, Jackson RA, Pugliese A
Insulin autoimmunity : the rate limiting factor in pre-type 1 diabetes
J. Autoimmun. 1992; 5 Suppl. A :241-6
- Eliashiv-A, F. Olumide, L. Norton, B. Eiseman
Depression of cell - mediated immunity in diabetes
Arch. Surg. 1978, 113 : 1180 - 1183
- Elliot-RB., Martin-JM.
Dietary protein : a trigger of insulin – dependent diabetes in the B rat ?
Diabetologia 1984; 26 : 297 – 99
- Elliott RB, Reddy SN, Bibby NJ, Kida K
Dietary prevention of diabetes in the NOD mouse
Diabetologia 1988; 30 : 62 – 64

- Elliott RB, Harris DP, Hill JP, Bibby NJ, Wasmuth HE
 Type 1 diabetes mellitus and cow milk : casein variant consumption
 Diabetologia 1999; 42(8) : 1032
- Ellis TM, Ottendorfer E, Jodoin F, Salisbury PJ, She XJ, Schatz DA, Atkinson MA
 Cellular immune responses to beta casein : elevated but not specific for individuals with type 1 diabetes
 Diabetologia 1998; 41(6) : 731-5
- Faustmann D, Eisenbarth G, Daley J, Breitmeyer J
 Abnormal T - Lymphocyte subsets in type 1 diabetes
 Diabetes 1989; 38 : 1462 - 1468
- Faustmann D, Schoenfeld D, Ziegler R
 T - lymphocyte changes linked to autoantibodies
 Diabetes 1991; 40 : 590 - 597
- Federlin, K.
 Diabetes mellitus Typ I
 Klinische Immunologie, 1991, Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, Peter-H
 (Hrsg.)
- Foulis, C.N. Liddle, M.a. Farquharson, J.A. Richmond, R.S. Weir
 The histopathology of the pancreas in Type I (insulin - dependent) diabetes mellitus : a 25 - year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom
 Diabetologia (1986) 29 : 267 - 274
- Gamble DR , Tylor KW
 Seasonal incidence of diabetes mellitus
 Br. Med. J. 3 : 631 - 633 (1969)
- Gepts W
 Pathologic Anatomy of the Pancreas in Juvenile Diabetes Mellitus
 Diabetes 1965; 14 : 619 - 33
- Ginsberg-Fellner F , Klein E , Doberson M , Jenson AB
 The interrelationship of congenital rubella and insulin - dependent diabetes mellitus
 Pediatr. Res. 1980, 14 : 572
- Gleichmann, H.; Bottazzo, GF.
 Progress towards standardization of cytoplasmic islet cell antibodies assay
 Diabetes 1987; 37: 578-84
- Glerum-M; Robinson-BH; Martin-JM
 Could bovine serum albumin be the initiating antigen ultimately responsible for the development of IDDM
 Diabetes Res. 1989; 10: 103 -7

Gorsuch, AN.; Spencer, KM.; Lister, J., McNelly, JM.; Dean, BM.;
Bottazo, GF., Cudworth, AG.

The natural history of type 1 (insulin- dependent) diabetes mellitus: Evidence for a long
prediabetic periode
Lancet 1981; 2: 1336-65

Green-A, Anderson-PK

Epidemiological studies of diabetes mellitus in Denmark

3. Clinical characteristics and incidence of diabetes among males aged 0 to 19 years.

Diabetologia 1983; 25 : 226 - 30

Häglöff B, Blom L, Lönnberg G, Sahlin B, Dahlquist G

The Swedish childhood diabetes study : indications for severe psychological stress as a risk factor
for Type 1 (insulin - dependent) diabetes in childhood

Diabetologia 34 : 579 - 583 (1991)

Hamman RF, Gay EC, Cruickshanks KJ, Lezotte DC

Colorado IDDM Registry

Incidence and Validation of IDDM in children aged 0 - 17 yr

Diabetes care 13 : 499 - 506 (1990)

Hanafusa T, Miyazaki A, Miyagawa J, Tamura S, Inada M, Yamada K, Shinji Y, Katsura H,
Yamagata K, Itoh N, et al.

Examination of islets in the pancreas biopsy specimens from newly diagnosed type 1 (insulin-
dependent) diabetic patients.

Diabetologia 1990 Feb;33(2):105-11

Harrison, LC.; Campbell, IL.; Colman, PG.; Chosich, N.; Kay, THW.; Tait, B.;

Bartholomeusz, RK.; De Azipura, H.; Joseph, JL.; Chu, S. ; Kielczynski, WE.

Type I diabetes : Immunopathology and immunotherapy.

Adv Endocrinol Metab 1990; 1: 35-94

Harrison, LC.; De Aizpurua, H.; Loudovaris, T.; Campbell, IL.; Cebon, JS.; Tait, BD. ; Colman,
PG.

Reactivity to Human Islets and Feta Pig Proislets by Peripheral Blood Mononuclear Cells from
Subjects with Preclinical and clinical Insulin- Dependent Diabetes

Diabetes 1991; 40: 1128- 33

Harrison, LC.; Chu, SX.; De Aizpurua, H.; Graham, M.; Honeyman, MC.; Colman, PG.

Islet- reactive T cells are a marker of preclinical insulin- dependent diabetes

J Clin Invest 1992; 89: 1161-5

Helgason T, Jonasson MR

Evidence for a food additive as a cause of ketosis - prone diabetes

The Lancet, October 3, 1981 S. 716 - 720

Hering BJ, Browatzki CC, Schultz A, Bretzel RG, Federlin K

Clinical islet transplantation registry report – accomplishments in the past and future needs.

Cell Transplant 1993 ; 2(4) : 269-82

Hermitte L, Allan Gepner C, Payan MJ, Mehelleb M, Vialettes B
Dietary protection against diabetes in NOD mice : lack of a major change in the immune system
Diabet. Metab. 1995 ; 21(4) : 261-8

Herold, KC.; Huen, A.; Gould, L.; Traisman, H.; Rubenstein, AH.
Alterations in lymphocyte subpopulations in type 1 diabetes mellitus : exploration of possible mechanisms and relationships to autoimmune phenomena
Diabetologia 1984, 27 : 102-105

Hinden E
Mumps followed by diabetes
E. Hinden
Lancet 1 : 1381 (1962)

Horwitz, MS.; Bradley, LM.; Habertson, J.; Krahl, T.; Lee, J.; Sarvetnick, N.
Diabetes induced by Coxsackie virus: Initiation by bystander damage and not molecular mimicry
Nat Med 1998; 4: 781-5

Huff et al. 1974
An outbreak of juvenile Diabetes mellitus : Consideration of a viral etiology
J.C. Huff, J.C. Hierholzer, W.A. Farris
American Journal of Epidemiology, Vol. 100, No. 4 S. 277 - 287

Hutchings, P.; Rosen, H.; O'Reilly, L.; Simpson, E.; Gordon, S.; Cooke, A.
Transfer of diabetes in mice prevented by blockade of adhesion- promoting receptor on macrophages
Nature 1990; 348: 639- 42

Ilonen J, Surcel HM, Mustonen A, Kläär ML, Akerblom HA
Lymphocyte subpopulations at the onset of Type 1 (insulin - dependent) diabetes
Diabetologia 1984; 27 : 106 - 108

Ilonen J, Surcel HM, Kläär ML
Abnormalities within CD4 and CD8 T lymphocyte subsets in type 1 (insulin - dependent) diabetes
Clin. Exp. Immunol. 1991; 85 : 278 - 281

Inman LR, Mc Allister CT, Chen L, Hughes S, Newgard CB, Kettmann JR, Unger RH, Johnson JH
Autoantibodies to the GLUT - 2 - Glucose - Transporter of β - cells in insulin dependent diabetes mellitus of recent onset
Proc Natl. Acad. Sci USA 1993; 90 : 1281 - 1288

Jackson RA, Morris MA, Haynes BF, Eisenbarth GS
Increased circulating Ia - antigen - bearing T cells in type I diabetes mellitus
New Engl. J. Med. 1982; 306 : 785 - 788

Jaeger C, Hatziagelaki E, Stroedter A, Becker F, Scherer S, Petzold R, Federlin K.
The Giessen-Bad Oeynhausen familie study : improved prediction of type-I-diabetes in a low incidence population of relatives using combinations of islet autoantibodies in a dual step model
Exp Clin Endocrinol Diabetes 1999; 107 (8) : 496-505

Jaeger C, Brendel MD, Hering BJ, Eckhard M, Bretzel RG
Progressive islet graft failure occurs earlier in autoantibody-positive than in autoantibody-negative
IDDM recipients of intrahepatic islet allografts
Diabetes 1997; 46(11), 1907-10

Jazir M, Migliore - Samour D, Morgat JL, Jolles P
Specific binding sites on human phagocytic blood cells for Gly - Leu - Phe and Val - Glu - Pro -
Ile - Pro - Tyr, immunostimulating peptides from human milk proteins
Biochem Biophys Acta 1992; 1160 : 251 - 261

Johnston-C, Algivvi L, Millward BA, Leslie RDG, Pyke DA, Vergani D
Alterations in T - lymphocyte subpopulations in type 1 diabetes. Exploration of genetic influence
in identical twins
Diabetes 1988; 37 : 1484 - 1488

Joner-G., Sovik-O.
Incidence, age at onset on seasonal variations of diabetes mellitus in norwegian children
1973 - 1977
Acta paediatr.Scand. 1981; 70 (3) : 329 - 335

Karges W, Hammond - Mc Kibben D, Cheung RK, Visconti M, Shibuya N, Kemp D, Dosch
HM
Immunological aspects of nutritional Diabetes prevention in NOD mice
Diabetes 1997; 46 : 557 - 564

Karjaleinen, J.
Islet cell antibodies as predictive markers for IDDM in children with high background incidence
of disease
Diabetes, 1990; 39: 1140- 50

Karjaleinen-J; Martin-JM; Kip-M; Ilonen-J; Robinson-BH; Savilahti-E; Akerblom-HK; Dosch-
HM
A Bovine Albumin Peptide as a possible Trigger of Insulin- Dependent Diabetes mellitus
New Eng J Med 1992; 327: 302-7
Karlsson MG, Ludvigsson J
The ABBOS-peptide from bovine serum albumin causes an IFN-gamma and IL-4mRNA
response in lymphocytes from children with recent onset of type 1 diabetes
Diabetes Res. Clin. Pract. 2000 ; 47(3) : 199-207

Karlsson MG, Lawesson SS, Ludvigsson J
Th-1 like dominance in high-risk first-degree relatives of type 1 diabetic patients
Diabetologia 2000 ; 43(6) : 742-9

Karlsson MG, Garcia J, Ludvigsson J
Cow `s milk proteins cause similar Th1 and Th2 like immune reactions in diabetic and healthy
children
Diabetologia 2001 ; 44(9) : 1140-7

Knospe S, Köhler E, Rjasanowki I, Titze K
Autologous mixed lymphocyte reaction in newly diagnosed Type I Diabetes
Exp. Clin. Endocrinol., Vol. 95, No 1, 1990, 148 - 156

Kohno T, Kobashiri Y, Sugle Y, Takai S, Watabe K, Kaino Y, Kida K
Antibodies to food antigens in Japanese patients with type 1 diabetes
Diabetes Res. Clin. Pract. 2002; 55(1) : 1-9

Kolb H, Dannehl K, Grünekle D, Zielasek J, Bertrams J, Hübinger A,
Gries FA
Prospective analysis of islet cell antibodies in children with type 1
(insulin - dependent) diabetes
Diabetologia (1988) 31 : 189 - 194

Kontainen et al., 1991
Kontainen-S; Toomath-R; Lowdwe-J, Feldmann_M
Selective Activation of T Cells in Newly Diagnosed Insulin-Dependent Diabetic Patients:
Evidence for Heterogeneity of T Cell Receptor Usage
Clin.Exp.Immun. 1991; 83: 347-51

Kontainen et al. 1991
Human islet cell induced T cell lines and clones from diabetic children
Kontainen, R.L. James, M. Feldmann
Autoimmunity 1991, 8 (3) : 193 - 197

Kostabra-JN, Cruickshanks-KJ, Lawler-Heavner-J, Jobim-LF., Rewers-MJ., Gay-EC., Chase-HP.,
Klingensmith-G, Hamman-RF
Early Exposure to cow's milk and solid foods in infancy, genetic predisposition, and risk of
IDDM
Diabetes 1993; 42 : 288 - 95

Kuglin, B.; Bertrams, J.; Kolb, H.; Gries, FA.
Früherkennung des Typ I Diabetes
Dtsch Med Wschr 1989; 114: 762-67

Lacy PE, Kostianovsky M
Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas
Diabetes 1972; 72: 175-186

La Porte-RE, Tajima-N, Akerblom-HK, Berlin-N, Broseau-J, Christy-M, Drash-AL, Fishbein-H,
Green-A, Hammna-R, Harris-M, King-H, Laron-Z, Neil-A
Geographic differences in the risk of insulin – dependent diabetes mellitus : the importance of
registry
Diabetes care 1985, 8 :1, 101 - 7

Lee, KL. ; Amano, K. ; Yoon, JW.
Evidence for initial involvement of macrophage in development of insulinitis in NOD mice
Diabetes 1988; 37: 989-91

Lendrum R, Walker IG, Gamble DR
Islet cell antibodies in juvenile diabetes mellitus of recent onset
Lancet 1975 : 880 - 882

Lendrum, R ; Walker, G. ; Cudworth, AG., Teophanidis, C.; Pyke, DA.; Bloom, A., Gamble, DR.
Islet cell antibodies in diabetes mellitus
Lancet 1976;2: 1273-6

- Lernmark, A.; Sehlin, J.; Täljedal, I.; Kronman, H., Nerup, J.
Possible toxic effects of normal and diabetic patient serum on pancreatic B- cells
Diabetologia 1978; 14: 25-31
- Like, AA.; Biron, CA.; Werniger, EJ.; Byman, K.; Sroczyński, E.,
Gubersky, DL.
Prevention of diabetes in Biobreeding/ Worcester rats with monoclonal antibodies that
recognised t-lymphocytes or natural killer- cells
Exp Med 1986; 164: 1145-59
- Lohmann T, Scherbaum WA
The demonstration and specificity of autoreactive T-lymphocytes in type 1 diabetes
Dtsch. Med. Wochenschrift 1997; 122(23) : 737-42
- Lohmann, T.; Leslie, RD.; Hawa, M.; Geysen, M.; Rodda, SM.
Immunodominant epitopes of glutamic acid decarboxylase 56 and 67 in insulin dependent
diabetes mellitus
Lancet; 1994: 343: 1607-08
- Lorenz D, Reding R, Petermann J
Transplantation of isolated islets of Langerhans into the liver of diabetic dogs
Zentralbibl. Chir. 1976; 101: 1359-1368
- MacCuish AC, Jordan J, Campbell CJ, Duncan LJ, Irvine WJ.
Cell-mediated immunity in diabetes mellitus; lymphocyte transformation by insulin and insulin
fragments in insulin-treated and newly-diagnosed diabetes.
Diabetes 1975 Jan;24(1):36-43
- Martin et al.,1991
Martin-JM; Trink-B; Danemann-D; Dosch-HM; Robinson-BH
Milk proteins in the etiology of insulin- dependent Diabetes Mellitus (IDDM)
Ann Med 1991; 23: 447-52
- MacLaren NK
Immunology of diabetes mellitus
Ann Allergy 1992; 68: 5-9
- Makino, S.; Kunimoto, K.; Muraoka, Y.; Mizushima, Y.; Katagiri, K.;
Tochino, Y.
Breeding of a non- obese, diabetic strain of mice
Exp Anim 1980; 29: 1-13
- Mandrup- Poulsen, T.; Molwig, J.; Andersen, HU.; Helqvist, S.; Spinas, GA., Munck, M. et al.
Lack of predictive value of islet cell antibodies, insulin antibodies, and HLA-DR phenotype for
remission in cyclosporine- treated IDDM patients
Diabetes, 1990; 39: 204-10
- Mc Crae WM
Diabetes mellitus following mumps
Lancet 1 : 1300 - 1301 (1963)

- McEvoy, RC.; Witt, ME.; Ginsberg- Fellner, F.; Rubinstein, P.
Anti- insulin antibodies in children with type I diabetes mellitus
Diabetes 1986; 35: 634-41
- Mellert J, Hering BJ, Liu X, Brandhorst D, Brandhorst H, Pfeffer F, Federlin K, Bretzel RG,
Hopt UT
Critical islet mass for succesful porcine islet transplantation
J. Mol. Med. 1999 ; 77(1) : 126-9
- Menser MA, Forrest JM, Brandy RD
Rubella infection and diabetes mellitus
Lancet 1978; i: 57 - 60
- Mirkovitch V, Campiche M
Succesful intrasplenic autotransplantation of pancreatic tissue in totally pancreatectomised dogs
Transplantation 1976 ; 21 : 265-69
- Miyazaki, A.; Hanafusa, T.; Yamada, K.; Myagawa, J., Fujino- Kurihara, H.; Nakajima, H.;
Nonaka, K.; Tarui, S.
Predominance of T- lymphocytes in pancreatic islets and spleen of pre- diabetic non- obese-
diabetic (NOD) mice: A longitudinal study
Clin Exp Immunol 1985; 60: 622-30
- Monetini L, Cavallo MG, Stefanini L, Ferrazoli F, Bizzari C, Marietti G, Curro V, Cervoni M,
Pozzilli P ; IMDIAB Group
Bovine beta-casein antibodies in breast- and bottle-fed infants and their relatives in type 1
diabetes
Diabetes Metab. Res. Rev.2001 ; 17(1) : 51-4
- Morel-PA, Dorman-J.S., Todd-J.A., McDevitt-H.O., Trucco-M.
Aspartic acid at position 57 of the HLA DQ beta chain protects against type 1 diabetes : a family
study
Proc.Natl. Acad. Sci. U-S-A 1988, 85 (21) : 8111 - 5
- Mustonen A
Islet cell antibodies and HLA antigens in children with insulin -
dependent diabetes mellitus
Acta universitatis ouluensis Series D Medica No. 21 (1984)
- Nagata, M. ; Yoon, JW.
Studies on Autoimmunity for T- cell- mediated beta- cell destruction. Distinct difference in beta-
cell destruction between CD4+ and CD8+ T- cell clones derived from lymphocytes infiltrating
the islets of NOD- mice
Diabetes 1992; 41: 998- 1008
- Najarian JS, Sutherland DE, Matas AJ
Human islet transplantation : a preliminary report
Transplant Proc. 1977; 9: 233-36
- Naquet P, Ellis J, Tibensky D, Kenshole A, Singh B, Hodges R, Delovitch TL.
T cell autoreactivity to insulin in diabetic and related non-diabetic individuals.
J Immunol 1988 Apr 15;140(8):2569-78

Nell LJ, Virta VJ, Thomas JW.
Recognition of human insulin in vitro by T cells from subjects treated with animal insulins.
J Clin Invest 1985 Dec;76(6):2070-7

Nell LJ, Thomas JW.
The human immune response to insulin. I. Kinetic and cellular aspects of lymphocyte proliferative responses in diabetics.
J Immunol 1983 Aug;131(2):701-5

Oberholzer J, Toso C, Ris F, Bucher P, Triponez F, Demirag A, Lou J, Morel P
β-cell replacement for the treatment of diabetes
Annals of the New York Academy of Sciences 2001 ; 944 : 373-387

Ogawa, M.; Maruyama, T.; Hasegawa, T. et al.
The inhibitory effect of neonatal thymectomy on the incidence of insulinitis in non- obese (NOD) mice
Biomed Res 1985; 6: 103-5

Omar MAK, Pudfin DJ, Coovadia HM, Duursma J, Kiepiela F, Stretton M, Asmal AC
The Phytohaemagglutinin Response and lymphocyte subpopulations in young Blacks and Indians with inulin - dependent diabetes mellitus
Afr. Med. J. 1983, 63 : 776 - 778

Padberg S, Schumm-Draeger PM, Petzold R, Becker F, Federlin K
The significance of anti A1 and A2 antibodies against beta-casein in type 1 diabetes mellitus
Deutsche Medizinische Wochenschrift 1999; 124(50) : 1518-21

Palmer, J.; Asplin, CH.; Clemens, P.
Insulin- antibodies in insulin- dependent diabetics before insulin treatment
Science 1983; 222: 1337

Palmer, J.P.; McCulloch, D.K.
Prediction and prevention of IDDM - 1991
Diabetes, 1991, 40 (8) : 943 - 7

Pancewyz, O.; Strom, T.; Rubin- Kelly, V.
Islet infiltrating T- cell clones from Non obese diabetic mice that promote or prevent accelerated onset diabetes
Eur J Immun 1991; 21: 873-79

Paronen J, Knip M, Savilahti E, Virtanen SM, Ilonen J, Akerblom HK, Vaarala O, and the finish Trial to reduce IDDM in the genetically at risk Study
Effects of cow`s milk exposure and maternal type 1 diabetes on cellular and humoral immunization to dietary insulin in infant at genetic risk for type 1 diabetes
Diabetes 2000, 49 : 1657-65

Paxson JA, Weber JG, Kulczycki A jr.
Cow`s milk free diet does not prevent diabetes in NOD-mice
Diabetes 1997 ; 46(11) : 1711-7

Peakman, M.; Warnock, T.; Vats, A.; McNab, G.L.; Underhill, J.; Donaldson, P.T.; Vergani, D.
Lymphocyte subset abnormalities, autoantibodies and their relationship with HLA DR types in
children with type 1 diabetes and their first degree relatives
Diabetologia 1994, 37 : 155-165

Pozzilli P, Zuccarini O, Andreani D; Iavicoli M, Sensi M, Spencer KM, Bottazzo GF, Beverly
PCL, Kyner JL, Cudworth AG
Monoclonal antibodies defined abnormalities of T-lymphocytes in type 1 (insulin - dependent)
diabetes
Diabetes 1983, 32 : 91-94

Pugliese,A.; Kawasaki,E; Zeller,M; Yu,L.; Babu,S; Solimena, M.; Moraes,CT.; Pietropaolo,M.;
Friday, RP., Trucco,M.; Ricordi,C.; Allen,M.; Noble,JA.; Erlich,HA.; Eisenbarth,GS.
Sequence analysis of the diabetes protective human leucocyte antigen -DQB1*0602 allele in
unaffected islet cell antibodies positive first degree relatives and in rare patients with type I
diabetes
J Clin Endocrinol Metab 1999; 84: 1722-8

Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Shapiro AM, Rajotte RV, Power R
Combination therapy with sirolimus and interleukin-2 prevents spontaneous and recurrent
autoimmune diabetes in NOD mice
Diabetes 2002; 51(3): 638-45

Räsänen L, Hyöty H, Lehto M, Kallioniemi OP, Anttonen J, Huupponen T
Defective autologous mixed leukocyte reaction in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus
Clin. Exp. Immunol. 1988; 71 : 470 - 474

Reddy SN, Bibby NJ, Wu S, Swinney C, Barrow G, Elliott RB
A combined casein - free - nicotinamide diet provides diabetes in the NOD mouse with
minimum insulinitis
Diabetes Res Clin Prac 1995; 29 : 83 - 92

Reich, EP. ; Scaringe, D. ; Yagi, J.; Sherwin, RS, Janeway, CA.
Prevention of diabetes in NOD- mice by injection of autoreactive T- lymphocytes
Diabetes 1989; 38: 1647- 51

Reunanen-A., Akerblom-H.K., Kaar-M.L.
Prevalence and ten year (1970 - 1979) incidence of insulin dependent diabetes mellitus in
children and adolescents in Finland
Acta paediatr.Scand. 1982; 71 (6) : 893 - 899

Rewers-M, LaPorte-RE, Walczak-M, Dmochowski-K, Bogaczynska-E
Apparent epidemic of insulin – dependent diabetes mellitus in midwestern Poland
Diabetes 1987; 36: 106-13

Riley, W.; Maclaren, N.
Islet- cell- antibodies are seldom transient
Lancet 1984; 1: 1351-2

Robertson,P.P.
Pancreas Transplantation in Humans with Diabetes Mellitus
Diabetes 1991,40 (9):1085-89

Roep BO, Arden SD, de Vries RRP, Hutton JC
T - cell clones from a type I diabetes patient respond to insulin secretory granule proteins
Nature, 345 : 632 - 634 (1990)

Roep BO, Kallan AA, Hazenbos WLW, Bruining GJ, Baileys EM, Arden SD, Hutton JC, de Vries RRP
T - cell reactivity to 38 kDa insulin - secretory granule protein in patients with recent - onset type I diabetes
Lancet 337 : 1439 - 1441 (1991)

Roep-BO. 1992
T - Lymphocytes and the pathogenesis of type 1 (insulin - dependent) diabetes mellitus
Haveka B.V., Alblasserdam, The Netherlands (Vlg), 1992

Roep, B.O.; de Vries, R.R.P.
T-lymphocytes and the pathogenesis of type 1 (insulin - dependent) diabetes mellitus
European Journal of clinical Investigations (1992) 22 : 697-711

Roep et al. 1995
B.O. Roep, A.A. Kallan, G. Duinkerken, S.D. Arden, J.C. Hutton, G.J. Bruining, R.R.P. de Vries
T - Cell reactivity to β - cell membrane antigens associated with β - cell destruction in IDDM
Diabetes 1995; 44 : 278 - 283

Rosenwasser LJ
Immunologic reactivity to insulin: animal models and clinical syndromes.
Clin Immunol Rev 1981-82;1(2):311-35

Ryan EA, Kakey JR, Rajotte RV, Korbitt GS, Kin T, Imes S, Rabinovitch A, Elliott JF, Bigam D, Knetemann, NM, Warnock GL, Larsen I, Shapiro AM
Clinical outcome and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol.
Diabetes 2001, 50(4) : 710-9

Saruger E, Dozio N, Meschi F, Pastore MR, Bonifacio E
Cellular and humoral immunity against cow`s milk protein in type 1 diabetes
Autoimmunology 1999 ; 13(3) : 365-73

Saukkonen-T; Savilahti-E; Vaarala-O; Virtala-ET; Tuomilehto-J; Akerblom-HK; The Childhood Diabetes in Finland Study Group
Children with newly diagnosed IDDM have increased levels of Antibodies to Bovine Serum Albumin but not to Ovalbumin
Diabetes Care 1994; 17: 970- 76

Saukkonen T, Savilahti E, Laudin-Olsson M, Dahlquist G
IgA bovine serum albumin antibodies are increased in newly diagnosed patients with type 1 diabetes , but the increase is not an independent risk factor for diabetes
Acta Paediatr. 1995 ; 84(11) : 1258-61

Schlott-NC; Daniel-D; Norbury-Glaser-M; Wegmann-DR
Peripheral t cell Clones from NOD Mice Specific for GAD65 Peptides : Lack of Islet Responsiveness or Diabetogenicity
J.Autoimm.1996; 9 : 357 - 363

Scott FM, Cloutier HE, Kleemann R, Woerz - Pagenstert U, Rowsell H, Modler W, Kolb H
Potential mechanisms by which certain foods promote or inhibit the development of
spontaneous Diabetes in BB rats
Diabetes 1997; 46 : 589 – 598

Seissler, J. et al.
Prävalenz von ICA in der Normalbevölkerung : 0,3 bis 3%
Deutsche med. Wochenschrift 1990; 115: 689

Seissler, J.; Hering, B.; Richter, W.; Glück, M.; Yassin, NGF.; Bretzel, RG.; Boehm, BO.;
Federlin, K.; Scherbaum, WA.
Antibodies to the Mr 64,000 (64K) protein in islet cell antibody positive non- diabetic individuals
indicate high risk for impaired beta- cell function
Diabetologia 1992; 35: 550-4

Serjeantson-S.W., Ranfort-P.R, Kirk-R.L., Kohonen-Corish-M.R., Mohan-V., Ramachandran-A.,
Snehalatha-C., Viswanathan-M.
HLA-DR and - DQ DNA genotyping in insulin - dependent diabetes patients in South India
Dis.Markers, 1987, 5 (2) : 101 - 8

Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA
Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes using a glucocorticoid-free
immunosuppressive regimen
N. Engl. J. Med. 2000; 343: 230-238

Siegenthaler,W.; Kaufmann,W.; Waller,H.
Lehrbuch der Inneren Medizin
1992, 3.Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York

Singal,D.P.; Blajchman,M.A.
Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in
patients with diabetes mellitus
Diabetes 1973, 22 : 429 – 432

Spencer, S.; Tarn, A.; Dean, BM.; Lister, J.; Bottazzo, GF.
Fluctuating islet cell autoimmunity in unaffected relatives of patients with insulin- dependent
diabetes
Lancet 1984; i: 764- 66

Srikanta S, Gamda O, Gleason R, Jackson R, Soeldner J,
Eisenbarth G
Pre - Type I Diabetes - Linear loss of beta - cell response to intravenous
Glucose
Diabetes 1984, 33 : 171 - 720

Srikanta, S.; Ricker, AT.; MacCulloch, DK.; Soeldner, JS.; Eisenbarth, GS., Palmern, SP.
Autoimmunity to insulin, beta- cell- dysfunction and development of IDDM
Diabetes, 1986; 39: 139-42

Statistisches Bundesamt
Gesundheitsbericht für Deutschland 1998
Kapitel 5.20 Diabetes mellitus

Steward – Brown-S, Haslum-M, Butler-N
Evidence for increasing prevalence of diabetes mellitus in childhood
Br Med J 1983; 286 : 1855 - 7

Sun Y, Ma X, Zhou D
Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgous monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression
J. Clin. Invest. 1996; 98: 1417-28

Svejgaard-A., Platz-P, Ryder-L.P, Nielsen-L.S, Thomsen-M.,
HLA and disease associations - a survey
Transplant. Rev. 1975, 22 : 3 - 43

Svejgaard-A., Platz-P., Ryder-L.P.
HLA and disease 1982 – a survey
Immunol.Rev. 1983;70: 193 – 218

Szopa TM, Gamble DR, Taylor KW
Long - term disturbances of the metabolic functions of the pancreatic islets from mice infected with Coxsackie B4 virus
Diabetes res. Clin. Prac. 1985; (suppl. 1) : S542 A.

Szopa TM, Gamble DR, Taylor KW
Coxsackie B4 virus induces short term changes in the metabolic function of mouse pancreatic islets in vitro
Cell Biochem Function 1986; 4 181 - 7

Tarn, AC.; Dean, BM.; Schwartz, G.; Thomas, JM.; Ingram, D.; Bottazo, GF, Gale, EAM.
Predicting insulin- dependent diabetes
Lancet 1988; 2: 845-50

Thomsen,M.; Platz,P.; Andersen, O.O.; Christy, M.; Lyngsoe,J.; Nerup,J.; Rasmussen,K.;
Ryder,L.P.; Nielsen,L.S.; Svejgaard,A.
MLC - typing in juvenile diabetes mellitus and idiopathic Addison´s disease
Transplant-Rev. 1975; 22 : 125 - 47

Todd-J.A., Bell-J.I., McDevitt-H.O.
HLA - DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin - dependent diabetes mellitus
Nature 1987; 329 (6140) : 599 - 640

Tuomilehto J, Lounamaa R, Tuomilehto-Wolf E, Reunanen A, Virtala E, Kaprio EA, Akerblom HK
Epidemiology of childhood diabetes mellitus in Finland- background of a nationwide study of type 1 diabetes mellitus. The childhood Diabetes in Finland Study Group
Diabetologia 1992; 35(1) : 70-6

- Vaarala O, Knip M, Paronen J, Hamalainen AM, Muona P, Vaatainen M, Ilonen J, Akerblom HK
Cow`s milk formula feeding induces primary immunization to insulin in infants at genetic risk for type 1 diabetes
Diabetes 1999; 48 (7) : 1389-94
- Vaarala O, Klemetti P, Savilahti E, Reijonen H, Ilonen J, Akerblom HK
Cellular immune response to cow`s milk beta-lactoglobulin in patients with newly diagnosed IDDM
Diabetes 1996 ; 45(2) : 178-82
- vanVliet E, Roep BO, Meulenbroek L, Bruining GJ, deVries RPR
Human T cell clones with specificity for insulinoma cell antigens
Eur. J. Immunol. 19: 213 - 216, 1989
- Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS
Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies
Diabetes 1996 Jul; 45 (7) : 926-33
- Virtanen-SM, Räsänen_I, Ylönen-K., Aro-AI., Clayton-D., Langholz-B., Pitkäniemi-J, Savilahti-E, Lounamaa-R., Tuomilehto-J., Akerblom-HK., and the childhood in diabetes in Finland Study Group
Early Introduction of diary products associated with increased risk of IDDM in finish children
Diabetes 1993; 42 : 1786 - 90
- Virtanen, SM.
Infant feeding in finish children < 7 yr of age with newly diagnosed IDDM
Diabetes care 1991; 14: 415-17
- Vreugdenhil GR, Geluk A, Ottenhoff TH, Melchers WJ, Roep BO, Galama JM
Molecular mimicry in diabetes mellitus : the homologous domain in coxsackie B virus protein 2cC and islet autoantigen GAD65 is highly conserved in the coxsackie B-like enteroviruses and binds to the diabetes associated HLA-DR3 molecule
Diabetologia 1998 Jan.; 41 (1) : 40 - 6
- Warram JH, Krolewski AS, Gottlieb MS, Kahn CR
Differences in risk of insulin-dependent diabetes in offspring of diabetic mothers and diabetic fathers
N.Engl.J.Med. 1984; 311(3) : 149-52
- Wasmuth HF, Becker F, Seebaum S, Elliott RB, Federlin K
Association of antibodies to β - Casein with type I Diabetes
Autoimmunity 1995; 21 : A 328
- Wegmann DR, Gill RG, Norbury-Glaser M, Schloot N, Daniel D.
Analysis of the spontaneous T cell response to insulin in NOD mice.
J Autoimmun 1994 Dec;7(6):833-43

WHO Report
Diabetes mellitus, Report of a WHO Study group
WHO technical report series 727
WHO Genf 1985

Williams PW
Notes on diabetes treated with grafts of sheep`s pancreas
British Medical Journal 1894; 2: 1303

Williams-A.J.K, Krug-J., Lampeter-E.F., Mansfield-K.
Raised temperature reduces the incidence of diabetes in NOD - mouse
Diabetologia 1990; 33 : 635 - 37

Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL
Virus - induced diabetes mellitus : Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis
New. Eng. J. med. 1979, 300 : 1173 – 9

Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL
Virus - induced diabetes mellitus : beta - cell damage and insulin - dependent hyperglycaemia in mice infected with Coxsackie virus B4
J. Exp. Med. 148 : 1086 - 1080 (1978)

Yoon JW, London NT, Curfman BL, Brown RI, Notkins AL
Coxsackie virus B4 produces transient diabetes in non - human primates
Diabetes 1986; 35 712 - 716

Ziegler, A.G.; Standl, E.; Lander, T.; Nerl, C.; Rieber, E.P.; Mehnert, H.
Cell mediated autoimmunity at onset of insulin dependent diabetes mellitus
Klinische Wochenschrift 1987, 65 : 546-50

Ziegler AG, Hummel M
Entstehung des Typ I Diabetes – Die ersten Lebensjahre sind entscheidend
Ergebnisse der Multicenterstudie BABYDIAB
Deutsches Ärzteblatt 2001; 98 A : 1260 – 1265 (Heft 19)

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABBOS	Antigenes Epitop von BSA (Aminosäuresequenz Pos. 152-168)
BB-Ratte	Bio Breeding Ratte
BSA	Bovines Serum Albumin
cpm	counts per minute
DMSO	Dimethylsulfoxid
GAD	Glutamic acid decarboxylase
HLA	Human leucocyte antigen
ICA	Islet cell antibody
IDDM	Insulin dependent diabetes mellitus
IMDM	Iscove´s modified Dulbeccos Medium
JDF	Juvenile Diabetes Foundation
MHC	Major histocompatibility complex
ml	Milliliter
MLC	Mixed lymphocyte culture
μ Ci	Mikro Curie
NOD-Maus	Non obese diabetic Maus
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Proliferationsindex
SD	Standard deviation
WHO	World Health Organisation

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. R.G. Bretzel, Direktor der Medizinischen Klinik III und Poliklinik, für die Überlassung des Themas.

Mein Dank gilt weiterhin Dr. Frank Becker, der bis zu seinem Tod für den theoretischen Unterbau der vorliegenden Arbeit verantwortlich war, und dessen gute Kontakte zu Dr. B. O. Roep aus Leiden die praktische Umsetzung ermöglichten.

Weiteren Anteil an der praktischen Durchführung hatte Herr Dr. Döll aus dem Strahlencentrum mit der Bestrahlung der Lymphozyten; theoretisch mitgewirkt hat Herr Pabst aus dem Hochschulrechenzentrum durch seine Hilfe bei der Statistik.

Sabine Schaum, Michael Stein sowie allen anderen Mitarbeiter/innen des Immunologischen Labors an der Medizinischen Klinik III und Poliklinik danke ich für ihre Geduld mit unerfahrenen Doktoranden, sowie für manche Problemlösung auf dem kleinen Dienstweg.

Ein großes Dankeschön gebührt Dr. Nanette Schloot, die zusammen mit Dr. Roep entscheidend an der praktischen Umsetzung der Arbeit beteiligt war, die immer ein offenes Ohr Probleme hatte, und trotz mittlerweile bestehender großer räumlicher Distanz zu Gießen die erste Korrekturlesung vornahm.

Ich bedanke mich schließlich ganz herzlich bei Herrn Prof. em. Dr. Dres. h.c. Federlin für seine Geduld und Anleitung bei der Fertigstellung dieser Dissertation.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

NAME	Stephan Quinkenstein	
ADRESSE	Im Stöbener 8a 76829 Landau Tel.: 06341/995907 e-mail : Stequi@aol.com	
GEBURTSDATUM	13.01.1968	
ALTER	34 Jahre	
FAMILIENSTAND	Verheiratet, 1 Kind	
GEBURTSORT	Köln	
ELTERN	Heinrich Quinkenstein Hildegard Quinkenstein	Diplom-Ingenieur Realschullehrerin

SCHULBILDUNG

GRUNDSCHULE	1976-1979 in Dormagen
GYMNASIUM	1979-1987 in Dormagen Abschluß Abitur

ZIVILDienst

SENIORENZENTRUM DES DRK DORMAGEN	01.09.1987 - 30.04.1989
-------------------------------------	-------------------------

STUDIUM

JUSTUS-LIEBIG UNIVERSITÄT GIEßEN

BEGINN	Sommersemester	1989
ÄRZTLICHE VORPRÜFUNG	März	1991
1.STAATSEXAMEN	März	1992
2.STAATSEXAMEN	August	1994
3.STAATSEXAMEN	November	1995

Arzt im Praktikum

1.12.1995 - 31.5.1997

Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin
Max-Planck Institut für medizinische und klinische Forschung,
Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim
CA Prof. Dr. G.F. Karliczek

1.12.1995 - 31.01.1997

OP Kardioanästhesie

1.02.1997 - 31.05.1997

Operative Intensivstation

ASSISTENZARZT

01.06.1997- 14.04.1998
Klinik

Operative Intensivstation Kerckhoff-
Bad Nauheim

15.04.1998 – 31.08.1999

Ketteler Krankenhaus Offenbach
Anästhesie und Intensivmedizin
CA Dr. H.J. Schröder

01.09.1999 – 31.05.2000

Städt. Klinikum Brandenburg GmbH
Anästhesie und Intensivmedizin
CA Dr. H. Dettenborn

seit 01.06.2000

St. Vinzentius-Krankenhaus Landau
Abteilung für Anästhesie,
Intensivmedizin und Schmerztherapie
CA Dr. D. Fingerhut

ZUSATZBEZEICHNUNGEN

Fachkunde Radiologie
Notfallmedizin