

Technische Universität München
Department für Lebensmittel und Ernährung
Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie

Immuninterventionen zum Erhalt der β -Zellfunktion im murinen und humanen Autoimmundiabetes

Kerstin Koczvara

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Haushalts- und Ernährungswissenschaften

(Dr. oec. troph.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. med. habil. J.J. Hauner

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Daniel
2. apl. Prof. Dr. med., Dr. med. habil. A.-G. Ziegler,
Ludwig-Maximilians-Universität München
3. apl. Prof. Dr. med., Dr. med. habil. V. H. Schusdziarra

Die Dissertation wurde am 10.02.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 15.07.2004 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1 <u>EINLEITUNG</u>	9
1.1 Allgemeine Grundlagen des Typ 1 Diabetes	12
1.1.1 T-Zellen im Typ 1 Diabetes	13
1.1.2 B-Zellen im Typ 1 Diabetes und mit Typ 1 Diabetes assoziierte Antigene	14
1.1.3 Kooperation von T- und B-Zellen in der Pathogenese von Typ 1 Diabetes	15
1.1.4 Ansätze zum Eingriff in die Pathogenese des Typ 1 Diabetes	16
1.1.5 Die NOD Maus, ein Tiermodell für Typ 1 Diabetes	17
1.2 Stand der Forschung als Grundlage dieser Arbeit	19
1.2.1 Einfluss von Antikörperübertragungen während der Schwangerschaft von Müttern mit Inselzell-Autoimmunität oder Typ 1 Diabetes auf das Autoimmundiabetesrisiko der Nachkommen	19
1.2.2 Immunisierungen mit Insulin und davon ausgehende protektive Auswirkungen auf die Entwicklung von autoimmunem Diabetes im NOD Mausmodell	20
1.2.3 Mucine und deren Einfluss auf das Immunsystem	20
1.2.4 Die Rolle von Gluten bei den Autoimmunerkrankungen Typ 1 Diabetes und Zöliakie	22
1.2.5 Histamin, Histamin-1-Rezeptoren und Histamin-2-Rezeptoren und deren Einfluss auf das Immunsystem	24
1.2.6 Einfluss von Vitamin D auf das Immunsystem und bekannte Wirkungen von Vitamin D auf die Entwicklung von Typ 1 Diabetes	26
1.3 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit	29
2 <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	31
2.1 Untersuchungsgruppen und Behandlungsprotokolle	31
2.1.1 Untersuchungen im NOD Mäusekollektiv	31
2.1.1.1 Diabetesprotektion durch Immunisierungen mit Insulin und Auswirkungen auf die Nachkommen	33

2.1.1.2	Behandlung mit Mucin über das Trinkwasser	37
2.1.1.3	Glutenfreie Nahrung über verschiedene Zeiträume und glutenfreie Nahrung mit dem Zusatz von Gliadin	39
2.1.1.4	Therapie mit Histamin-1- und Histamin-2-Rezeptor-Antagonisten über das Trinkwasser	41
2.1.1.5	Unbehandelte weibliche Mäuse zur Darstellung der natürlichen Diabetes-Inzidenz und Insulinautoantikörper-Prävalenz in der verwendeten NOD Kolonie	42
2.1.1.6	Behandlung und Nachverfolgung der weiblichen NOD Mäuse in allen Behandlungs- und Kontrollgruppen	42
2.1.1.7	Durchführung von Blutabnahmen an lebenden Mäusen	43
2.1.1.8	Exitus bei Diabetesmanifestation oder am Versuchsende mit Blut- und Organentnahme und Herstellung von Einzelzellpräparationen aus NOD Milzen	43
2.1.2	Diabetesrisiko bei Kindern von Müttern mit Typ 1 Diabetes in Abhängigkeit der transplazentär übertragenen Inselantikörper	45
2.1.3	Orale Supplementierung mit Calcitriol über neun Monate bei erwachsenen Personen mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes	46
2.2	Beschreibung der angewendeten Messmethoden	50
2.2.1	Detektion von Insulin(auto)antikörpern in murinen und humanen Seren im Radioliganden-Bindungsassay	50
2.2.2	Detektion von Insulin(auto)antikörpersubklassen in murinen und humanen Seren im Radioliganden-Bindungsassay	51
2.2.3	Detektion von Autoantikörpern gegen GAD und IA-2 in humanen Seren	53
2.2.3.1	Antigenmarkierung durch Einbau von ³⁵ S-Methionin	53
2.2.3.2	Detektion von Antikörpern gegen die Autoantigene GAD und IA-2 im Radioliganden-Bindungsassay	53
2.2.4	Detektion von IgG1-spezifischen Anti-Gliadin-Antikörpern in murinen Seren im ELISA	55
2.2.5	Detektion von Anti-Tetanus-Toxoid-Antikörpersubklassen in murinen Seren im ELISA	56
2.2.6	Bestimmung der Zytokinsekretion von murinen Milzzellen nach Stimulation mit Tetanus-Toxoid mit Elispot-Tests	57

2.2.7	Bestimmung der C-Peptid-Ausschüttung nüchtern und nach Stimulation mit einer Mischmahlzeit	58
2.2.8	Safety-Parameter der mit Calcitriol behandelten Personen	59
2.2.9	Typisierung der HLA-Genotypen	59
2.3	Statistik	60
3	<u>ERGEBNISSE</u>	61
3.1	Kumulative Diabetes-Inzidenz und Insulinautoantikörper-Prävalenz bei unbehandelten weiblichen NOD Mäusen	61
3.2	Diabetesprotektion durch Immunisierungen mit Insulin, Übertragung von mütterlichen (Auto)Antikörpern und deren Auswirkungen auf die Nachkommen	63
3.2.1	Immunisierungen von weiblichen NOD Mäusen vor und während der Trächtigkeit und Übertragbarkeit der induzierten Diabetesprotektion auf die Nachkommen	63
3.2.1.1	Diabetes-Inzidenzen der immunisierten und unbehandelten Muttertiere	63
3.2.1.2	Diabetes-Inzidenzen der weiblichen Nachkommen abhängig von der Behandlung ihrer Muttertiere	64
3.2.1.3	Insulin(auto)antikörper-Prävalenzen der immunisierten und unbehandelten Muttertiere	65
3.2.1.4	Diabetes-Inzidenzen der weiblichen Nachkommen abhängig vom Insulinantikörperstatus ihrer Muttertiere	66
3.2.1.5	Insulinautoantikörper-Prävalenzen der Nachkommen	67
3.2.2	Auswirkungen der Übertragung von Inselautoantikörpern während der Schwangerschaft auf das Diabetesrisiko bei Kindern von Müttern mit Typ 1 Diabetes	69

3.3	Auswirkungen von Mucin auf die Entwicklung von Diabetes und Autoimmunität bei weiblichen NOD Mäusen	73
3.3.1	Kumulative Diabetes-Inzidenzen der mit Mucin behandelten Mäuse	73
3.3.2	Insulinautoantikörper-Prävalenzen der mit Mucin behandelten Mäuse bei zehn Lebenswochen und bei Exitus	74
3.4	Auswirkungen von glutenfreier Ernährung und glutenfreier Ernährung mit dem Zusatz von Gliadin auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes und das Immunsystem von weiblichen NOD Mäusen	75
3.4.1	Kumulative Diabetes-Inzidenzen der glutenfrei ernährten Mäusegruppen	75
3.4.2	Insulinautoantikörper-Prävalenzen der glutenfrei ernährten Mäusegruppen bei zehn Lebenswochen	77
3.4.3	IgG-spezifische Anti-Gliadin-Antikörper-Prävalenzen der glutenfrei ernährten Mäusegruppen bei zehn Lebenswochen	79
3.5	Auswirkungen der oralen Zufuhr von HR-Antagonisten auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes und das Immunsystem von weiblichen NOD Mäusen	81
3.5.1	Diabetes-Inzidenzen der oral mit H1R- und H2R-Antagonisten behandelten Mäuse	81
3.5.2	Insulinautoantikörper-Prävalenzen der oral mit H1R- und H2R-Antagonisten behandelten Mäuse bei zehn Lebenswochen	82
3.5.3	Insulinautoantikörper-Subklassen der oral mit H1R- und H2R-Antagonisten behandelten Mäuse bei zehn Lebenswochen	83
3.5.4	Anti-Tetanus-Toxoid-Subklassen-Antikörper der oral mit H1R- und H2R-Antagonisten behandelten Mäuse bei zehn und sechzehn Lebenswochen	84
3.5.5	IL-4- und IFN- γ -Zytokinsekretion von murinen Milzlymphozyten nach Stimulation mit Tetanus-Toxoid	85
3.6	Auswirkungen der Behandlung mit Calcitriol bei erwachsenen Personen mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes auf deren β-Zellreserve und Autoimmunität	87
3.6.1	Venöse C-Peptid-Mengen nüchtern und nach Stimulation mit einer Mischmahlzeit	87

3.6.2	Insulin(auto)antikörper-Prävalenzen bei null, drei, neun und achtzehn Monaten nach Studieneinschluss	90
3.6.3	Insulin(auto)antikörper-Subklassenverteilungen bei drei, neun und achtzehn Monaten nach Studieneinschluss	92
3.6.4	Glycosylierte Hämoglobinwerte und Insulinbedarf der mit Calcitriol behandelten und der Kontrollpersonen	93
3.6.5	Engmaschig kontrollierte Safety-Parameter bei den mit Calcitriol behandelten Personen	94
4	<u>DISKUSSION</u>	95
4.1	Einfluss der transplazentären Insel(auto)antikörperübertragung von Müttern auf das Autoimmundiabetesrisiko ihrer Nachkommen	95
4.2	Einfluss der oralen Behandlung mit Mucin auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes und das Immunsystem im NOD Mausmodell	100
4.3	Auswirkungen glutenfreier Nahrung und glutenfreier Nahrung mit Gliadinzusatz auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes und das Immunsystem im NOD Mausmodell	101
4.4	Einfluss der oralen Zufuhr von Histamin-Rezeptor-Antagonisten auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes und das Immunsystem im NOD Mausmodell	104
4.5	Behandlung mit Calcitriol bei erwachsenen Personen mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes	106
4.6	Zukunftsaussicht	108
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	110
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	114
	VORVERÖFFENTLICHUNGEN	134
	DANKSAGUNG	136
	LEBENS LAUF	137

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AUC	Fläche unter der Kurve (area under the curve)
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CD	Cluster of differentiation
ConA	Concanavalin A
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute (counts per minute)
DAG	Diazylglycerol
DC	dendritische Zellen
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOB	Geburtsdatum (date of birth)
DT	Diphtherie-Tetanus-Toxoid
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	enzyme-linked immunospot assay
FKS	fötales Kälberserum
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GAD(A)	(Antikörper gegen) Glutamatdecarboxylase
GAD65	Glutamatdecarboxylase mit einer Atommasse von 65 kD
H1R	Histamin-1-Rezeptoren
H2R	Histamin-2-Rezeptoren
HbA _{1c}	glycosyliertes Hämoglobin der Subklasse A _{1c}
HEL	Hühnerei-Lysozym
HLA	Histokompatibilitätskomplex (human leucocyte antigen)
HR	Histaminrezeptoren
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish-peroxidase)
I(A)A	Insulin(auto)antikörper
i.c.	intrazellulär
i.m.	intra muskulär
IA-2(A)	(Antikörper gegen) Protein-Tyrosinphosphatase IA-2
ICA	Inselzell-Antikörper
ICT	intensivierte konventionelle (Insulin)Therapie

IE	internationale Einheiten
IFA	Inkomplettes Freund'sches Adjuvanz
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
KG	Körpergewicht
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min.	Minuten
MUC	Mucin
mur	murin
n.b.	nicht bekannt
NaCl	Natriumchlorid
NOD	nonobese diabetic
OD	Optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline
PBST	phosphate buffered saline plus Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pen	Penicillin
RBA	Radioliganden-Bindungsassay
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SE	Standardfehler (standard error)
Strep	Streptomycin
T1D	Typ 1 Diabetes
Tab.	Tabelle
TBST	Tris buffered saline plus Tween
TBT	Tris buffered Tween
Th1-*, Th2-*	T Helfer 1-*, T Helfer 2-*
TT	Tetanus-Toxoid
VDR	Vitamin D-Rezeptor
vs.	versus
WHO	World Health Organization

1 EINLEITUNG

Typ 1 Diabetes mellitus ist eine chronische, multifaktorielle Autoimmunerkrankung. Sie resultiert aus einer Zerstörung der pankreatischen β -Zellen durch das körpereigene Immunsystem. Dabei wird zunächst eine Infiltration der Langerhans'schen Inseln mit mononukleären Zellen beobachtet, woran sich eine selektive Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen anschließt. Diese Zerstörung kann sich über einen langen Zeitraum hinziehen, bis letztendlich ein absoluter Insulinmangel vorliegt und es zur klinischen Manifestation des Typ 1 Diabetes kommt. Die Entstehung von Typ 1 Diabetes beruht zu einem großen Teil auf genetischer Prädisposition. Da die genetische Veranlagung aber nicht in jedem Fall zur Entwicklung von Typ 1 Diabetes führt, wird vermutet, dass zusätzliche Auslöser das Krankheitsgeschehen in Gang setzen. Verschiedene Umweltfaktoren wie Virusinfektionen oder Ernährungsbedingungen werden diskutiert. Autoantikörper gegen Inselantigene sind ein charakteristisches Merkmal der präklinischen Phase von Typ 1 Diabetes.

Autoantikörper und autoreaktive Immunzellen, die im Typ 1 Diabetes gegen Inselantigene gerichtet sind, werden durch Zytokine reguliert. Verschiedene Studien im Tiermodell deuten darauf hin, dass beim Typ 1 Diabetes T-Helfer 1 (Th1)-Zellen pathogen und T-Helfer 2 (Th2)-Zellen protektiv wirken können. Interferon- γ (IFN- γ) ist das vorrangige Zytokin von Th1-Zellen und Interleukin-4 (IL-4) von Th2-Zellen. Im Tiermodell wurde ermittelt, dass die Verabreichung von Zytokinen, die das Th1-Zellwachstum fördern, die Entwicklung von Autoimmundiabetes begünstigt, während die Gabe von Zytokinen, die Th2-Zellen stimulieren, vor Diabetes schützt. Darüber hinaus werden eine Reihe von anderen Faktoren als Ursache für die Entwicklung der Autoimmunität beim Typ 1 Diabetes diskutiert wie die Verminderung der Antigenpräsentation, eine Modulation von dendritischen Zellen (DC), die Unterdrückung von regulatorischen T-Lymphozyten oder B-Lymphozyten und die von ihnen produzierten Antikörper.

In NOD (nonobese diabetic) Mäusen, einem Tiermodell, das spontan autoimmunen Diabetes entwickelt, kann durch verschiedenartige Interventionen die Diabetesmanifestation verzögert oder sogar verhindert werden. Bisher konnte jedoch kein Faktor eindeutig identifiziert werden, der die Erkrankung triggert bzw. vor der Erkrankung schützt. Vor allem sehr frühzeitig im Leben ansetzende Interventionen sind für einen Schutz vor der Entwicklung von Autoimmundiabetes wirksam. Eine erfolgreiche Verschiebung der zellulären Immunreaktivität weg vom Th1- hin zum Th2-Phänotyp scheint zur Prävention und Behandlung von autoimmunem Diabetes sehr vielversprechend zu sein.

In der vorliegenden Arbeit sollen im Tiermodell und beim Menschen verschiedene Therapieansätze zur Verhinderung von Autoimmundiabetes und in einem Fall zum Erhalt der β -Zellrestfunktion bei Personen mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes untersucht werden. Die Therapieansätze bestehen aus immunmodulatorischen (Immunisierungen, Antikörpertransfer), nutritiven (Gluten, Gliadin) und pharmakologischen Ansätzen (Mucin, Histamin-Rezeptor-Antagonisten, Vitamin D₃) und werden vor allem in der frühen Phase der Krankheitsentstehung getestet.

Es ist bekannt, dass durch Immunisierung mit Insulin Diabetes bei NOD Mäusen verhindert werden kann. Ziel der ersten Therapiestudie ist es zu testen, ob Insulinimmunisierungen bei trächtigen Muttertieren nicht nur die Muttertiere selbst, sondern auch ihre Nachkommen vor Diabetes schützen und ob der transplazentäre Transfer von Insulinautoantikörpern die Entwicklung von Autoimmundiabetes bei den Nachkommen beeinflusst. In einem ähnlichen zweiten Ansatz soll analysiert werden, ob auch beim Menschen der Transfer von mütterlichen Insulinantikörpern und Inselautoantikörpern während der Schwangerschaft das Risiko der Kinder eigene Autoimmunität und Typ 1 Diabetes zu entwickeln erhöht.

In einem dritten Studienteil sollen NOD Mäuse oral mit Mucin Typ 1 (MUC1) über das Trinkwasser behandelt werden. Es soll untersucht werden, ob sich auf diese Weise ein Prozess initiieren lässt, der durch Generierung von toleranten und regulatorischen dendritischen Zellen im darmassoziierten Immunsystem die T-Zellproliferation unterdrückt und in einer Th2-Dominanz und einem Schutz vor der Entwicklung von Diabetes mündet. Als vierter Therapieansatz soll durch glutenfreie Ernährung im NOD Mausmodell die Ausschaltung einer Noxe und dadurch eine bereits beschriebene Verschiebung des immunologischen Gleichgewichts hin zum Th2-Phänotyp erreicht werden. Der Mechanismus dieser Verschiebung ist bisher ungeklärt. Es soll untersucht werden, ob dieser Effekt durch die Gabe von Gliadin aufhebbar ist. Im Rahmen der fünften Therapiestudie sollen NOD Mäuse oral über das Trinkwasser mit einer Histamin-1-Rezeptor-antagonistischen pharmakologischen Substanz behandelt werden. Untersuchungen sprechen dafür, dass durch Ligation von Histamin an Histamin-1-Rezeptoren (H1R) andere Zytokin- und Antikörperantworten ausgelöst werden als durch Ligation an Histamin-2-Rezeptoren (H2R).

Als sechster und letzter Therapieansatz soll der Einfluss der aktiven Vitamin D₃-Form, dem Calcitriol, bei erwachsenen Personen mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes untersucht werden. Über Calcitriol wird berichtet, dass es durch eine reduzierte Antigenpräsen-

tation und durch Induktion von toleranten dendritischen und regulatorischen T-Zellen schützend auf Typ 1 Diabetes wirken kann.

Insgesamt soll die Arbeit im Tiermodell und beim Menschen neue innovative Therapien zur Prävention des autoimmunen (Typ 1) Diabetes erforschen und gleichzeitig zum besseren Verständnis seiner Pathogenese beitragen.

1.1 Allgemeine Grundlagen des Typ 1 Diabetes

Diabetes mellitus wird ätiologisch in drei große Klassen unterteilt: Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes und andere Diabetesformen (Expert Committee 1997). Die Bereitschaft für die Entwicklung von Typ 1 Diabetes ist erblich. Kinder von Müttern oder Vätern mit Typ 1 Diabetes haben ein Risiko von fünf Prozent selbst an Typ 1 Diabetes zu erkranken. Die Typ 1 Diabetes-Prävalenz in der deutschen Bevölkerung liegt bei etwa 0,3%. Die genetische Prädisposition für Typ 1 Diabetes ist polygen; mindestens achtzehn verschiedene mit Typ 1 Diabetes assoziierte Genorte wurden bisher identifiziert (Davies 1994). Der Genort, der am stärksten mit Typ 1 Diabetes assoziiert ist, kodiert die HLA Klasse II-Moleküle, die im Immunsystem für die Präsentation von Antigen gegenüber CD4+ T-Zellen verantwortlich sind. Kinder von Eltern mit Typ 1 Diabetes, die einen der risikoreichen HLA-Genotypen tragen, haben ein kumulatives Risiko von zwanzig Prozent bereits innerhalb der ersten fünf Lebensjahre Inselautoimmunität zu entwickeln, Kinder von Eltern mit Typ 1 Diabetes ohne Risikogenotyp allerdings nur von etwa drei Prozent (Ziegler 1999, Walter 2003). Bei eineiigen Zwillingen liegt für Typ 1 Diabetes eine gemittelte Konkordanzrate von vierzig Prozent vor (Barnett 1981, Olmos 1988). Folglich wird davon ausgegangen, dass auf der Basis einer genetischen Prädisposition die autoimmune Reaktion vermutlich durch exogene Faktoren ausgelöst wird. Eine ganze Reihe von Umweltfaktoren wird als Auslöser für Typ 1 Diabetes diskutiert (Füchtenbusch 1995). Die Ergebnisse aus verschiedenen Studien sind allerdings kontrovers. Wahrscheinlich gibt es mehrere mögliche Trigger für die Entwicklung von Typ 1 Diabetes. Ein kürzlich als Auslöser identifizierter Faktor ist die Zufuhr von glutenhaltiger Nahrung im Säuglingsalter unter drei Lebensmonaten, wenn die Kinder den HLA DR3/DR4-DQ8-Risikogenotyp für Typ 1 Diabetes tragen (Ziegler 2003). Der anschließende Krankheitsverlauf gliedert sich in mehrere Stufen (Ziegler 1994). Zunächst wandern Immunzellen in die Inseln des Pankreas ein (Bottazzo 1985). Bei der nachfolgenden autoimmunen Zerstörung der β -Zellen, die sich über einen langen Zeitraum hinziehen kann, werden unter anderem Antikörper gegen Inselantigene freigesetzt. Der β -Zellverlust führt zu einer gestörten Insulinsekretion (Soeldner 1965), aber erst wenn bis zu 80% der insulinproduzierenden β -Zellen zerstört sind (Foulis 1986), wird Typ 1 Diabetes klinisch manifest.

Die klinische Manifestation von Typ 1 Diabetes äußert sich unter anderem in einer Hyperglykämie, die zur Ausscheidung von erhöhten Glukosemengen im Urin führt (Glukosurie). Durch die bei Insulinmangel gesteigerte Lipolyse werden Ketonkörper gebildet und ausgeschieden (Ketoazidose). Wenn nicht rechtzeitig therapeutisch Insulin verabreicht

wird, kann ein diabetisches Koma auftreten. Typ 1 Diabetes ist heutzutage gut behandelbar und für die Betroffenen ist eine weitgehend normale Lebensführung möglich. Verschiedene Insulinarten und deren Verabreichungsmöglichkeiten sichern in der Regel eine gute Stoffwechseleinstellung, die das Auftreten von Akutkomplikationen minimiert. Trotzdem kommt es häufig immer noch zu diabetischen Folgeerkrankungen, besonders an Augen, Nieren und Nerven. Deswegen wird angestrebt den Ausbruch der Krankheit durch geeignete Prävention und Intervention in der prädiabetischen Phase zu verhindern.

1.1.1 T-Zellen im Typ 1 Diabetes

Die pankreatischen Inseln einer Person mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes zeigen eine chronische Entzündung und eine Infiltration mit mononukleären, inflammatorischen Zellen. Dieser Zustand wird „Insulitis“ genannt (Gepts 1981). Vor allem T-Zellen und Makrophagen infiltrieren die Inseln (Hänninen 1992), seltener werden B-Zellen und natürliche Killerzellen gefunden (Bottazzo 1985).

Im Immungeschehen des autoimmunen Diabetes wurden T-Zellen als zentrale Aggressorzellen erkannt. Es wird vermutet, dass CD4+ T-Zellen die maßgeblichen Effektorzellen bei der Zerstörung der pankreatischen β -Zellen sind (Haskins 1990, O'Reilly 1991, Thivolet 1991). CD4+ T-Zellen werden anhand der Zytokine, die sie ausschütten, in zwei Untergruppen eingeteilt: Th1-Zellen schütten IFN- γ aus, während Th2-Zellen IL-4 und IL-10 produzieren. Ebenfalls wurde eine Vielzahl von anderen Zelltypen gefunden, die in der Lage sind Th1- und Th2-Zytokine zu produzieren, wie CD8+ T-Zellen, Monozyten, natürliche Killerzellen, B-Zellen, Mastzellen, eosinophile und basophile Zellen. Th1- und Th2-Zellen sind wichtige Gegenspieler in der Immunregulation und können einander über die Ausschüttung von Zytokinen beeinflussen. Th1-Zytokine vermindern die Th2-Immunität und Th2-Zytokine die Th1-Immunität. Die Th1-Immunantwort ist eine zellvermittelte Immunität und geht mit inflammatorischen T-Helferzellen einher, die infizierte Makrophagen zur Vernichtung intrazellulärer Pathogene aktivieren. Die mit einer Th2-Immunantwort einhergehenden T-Helferzellen regen eine humoral vermittelte Immunität an, indem sie spezifische B-Zellen zur Antikörperproduktion stimulieren, und agieren in dieser Form gegen extrazelluläre Pathogene (Scott P 1993, Paul 1994).

Verschiedene Studienergebnisse aus dem Tiermodell deuten darauf hin, dass beim autoimmunen Diabetes Th1-Zellen dominieren und die Entstehung der Krankheit auslösen oder verstärken. Den Th2-Zellen wird dagegen ein vorbeugender Einfluss zugeschrieben

(Tian 1997). So begünstigt die Verabreichung von Th1-Zellwachstum fördernden Zytokinen die Entwicklung von Autoimmundiabetes (Rabinovitch 1994), während die Gabe von Th2-Zellwachstum fördernden Zytokinen NOD Mäuse vor Diabetes schützt (Rapoport 1993, Pennline 1994). Weiterhin wird Diabetes sehr effizient durch Transfer von Th1-Zellen übertragen. Allerdings gibt es auch kontroverse Ergebnisse, die keine schützende Wirkung von Th2-Zellen aufzeigen (Katz 1995) und es konnten Th1-Zellen etabliert werden, welche die Übertragung von Diabetes in Transferversuchen unterdrücken (Akhtar 1995).

1.1.2 B-Zellen im Typ 1 Diabetes und mit Typ 1 Diabetes assoziierte Antigene

Antikörper sind lösliche Rezeptorproteine der B-Lymphozyten. Sie spielen eine zentrale Rolle im Typ 1 Diabetes. Bereits viele Jahre vor der Manifestation von Typ 1 Diabetes treten bei betroffenen Personen Inselautoantikörper im venösen und kapillaren Blut auf (Roll 1997). Diese Inselautoantikörper sind ein sehr spezifisches Merkmal für Typ 1 Diabetes (Atkinson 2001) und können mit sensitiven und international standardisierten Testmethoden nachgewiesen werden. Derzeit gibt es vier Inselautoantikörper, die für die Diagnostik und Prädiktion von Typ 1 Diabetes etabliert sind. Das sind Autoantikörper, die gegen zytoplasmatische Inselzellantigene (ICA), Insulin (IAA), Glutamatdecarboxylase (GADA) und gegen die Protein-Tyrosinphosphatase IA-2 (IA-2A) gerichtet sind. Aufgrund der hohen prädiktiven Aussagekraft der IAA, GADA und IA-2A sind diese Autoantigene wohl am engsten mit der Entwicklung von Typ 1 Diabetes verknüpft. Titer und Anzahl der Antikörper korrelieren mit dem Risiko Typ 1 Diabetes zu entwickeln und machen sie dadurch zu einem wichtigen Instrument für die Prädiktion und Differentialdiagnostik (Verge 1996, Bingley 1997, Kulmala 1998, Ziegler 1999, Maclaren 1999).

Insulin ist das einzige β -zellspezifische Antigen im Typ 1 Diabetes. IAA, die gegen endogenes Insulin gerichtet sind, wurden bereits 1983 bei unbehandelten Personen mit Typ 1 Diabetes entdeckt (Palmer 1983). Ihre Messung erfolgt im Radioliganden-Bindungsassay (RBA; Palmer 1983, Vardi 1987). IAA korrelieren invers mit dem Manifestationsalter (Vardi 1988) und sie sind bei einem Großteil von Hochrisiko-Kindern die ersten detektierbaren Antikörper. Folglich sind sie ein wichtiges Hilfsmittel für die Früherkennung des Typ 1 Diabetes bei Kleinkindern (Ziegler 1993).

Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase (GAD) und IA-2 werden ebenfalls in RBA detektiert (Grubin 1994, Gianani 1995). GADA treten auch bei neurologischen Erkrankungen

wie dem Stiffman- und dem polyendokrinen Syndrom auf (Solimena 1990, Seißler 1994), dagegen sind IA-2A sehr spezifisch für Typ 1 Diabetes (Bonifacio 1998a). GAD katalysiert als Enzym die Umsetzung von Glutaminsäure zu GABA, einem Neurotransmitter im zentralen und peripheren Nervensystem (Baekkeskov 1990). Das Molekül wird im Zytoplasma synthetisiert und kommt außer im Nervensystem auch in pankreatischen Inseln, in Epithelzellen des Eileiters und in Spermiovorstufen vor (Ellis 1996). Die Protein-Tyrosinphosphatase IA-2 wurde bei der Trypsin-Proteolyse eines 64 kD Proteins aus dem Lysat von Inselmembranen entdeckt und in weiteren Studien als Diabetes-assoziiertes Antigen identifiziert (Christie 1990, Rabin 1992, Christie 1993, Lan 1994, Rabin 1994). IA-2 ist als transmembranes Protein in der Membran von sekretorischen Vesikeln lokalisiert (Lan 1994, Rabin 1994) und wird in allen endokrinen Zellen und im Nervengewebe gebildet (Solimena 1996, Wasmeier 1996). IA-2A reagieren nur gegen den intrazellulären Teil des Moleküls (Lampasona 1996).

Messungen von IgG-spezifischen Antikörpersubklassen sind mit RBA durchführbar und ermöglichen genauere Charakterisierungen von Antikörperantworten auf Autoantigene und exogene Antigene. Bei humanen Antikörpern werden die IgG-spezifischen Antikörpersubklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 unterschieden. Untersuchungen humaner IgG-Antikörpersubklassen zeigen, dass IAA und Insulinantikörper (IA) gegen verabreichtes Insulin von den Subklassen IgG1 und IgG4 dominiert werden (Füchtenbusch 2000). GADA und IA-2A sind zumeist der Subklasse IgG1 zuzurechnen (Bonifacio 1999).

1.1.3 Kooperation von T- und B-Zellen in der Pathogenese von Typ 1 Diabetes

Eine bedeutsame Rolle spielen B-Zellen in der Prozessierung und Präsentation von T-Zellantigenen. Antikörper binden Antigene und können als Zelloberflächenrezeptoren auf B-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen zur Erleichterung oder Verstärkung der Antigenpräsentation an T-Zellen beitragen (Manca 1988, Lin 1991, Watts 1993, Simitsek 1995). Als Folge könnten Antikörper eine Rolle in der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten spielen (Noorchashm 1997). Im Typ 1 Diabetes ging man lange davon aus, dass Autoantikörper nur ein Nebeneffekt der Immunreaktion sind und lediglich eine Rolle als Marker für das Krankheitsgeschehen spielen. So beeinflusste eine Blockierung der B-Zellfunktionen die Entwicklung von Autoimmundiabetes in experimentellen Modellen nicht (Bendelac 1988) und bei Personen mit Typ 1 Diabetes zeigte der Entzug von Immunglobulinen nur geringe Auswirkungen auf den Verlauf der Erkrankung (Ludvigsson 1983, Seidel

1998). Diese Beobachtungen legten nahe, dass Autoantikörper alleine nicht ausreichend für die Entwicklung von Typ 1 Diabetes sind.

Kontrovers zeigen neuere Studien, dass NOD Mäuse ohne B-Zellrepertoire nur wenig Insulinitis und eine markant verringerte Diabetes-Inzidenz aufweisen. Das lässt schlussfolgern, dass B-Zellen und vielleicht auch Antikörper eine Rolle in der Pathogenese vom Autoimmundiabetes spielen (Forsgren 1991, Serreze 1996, Noorchashm 1997, Silveira 2002). Diese Annahme wird aktuell durch eine Studie im NOD Mausmodell verstärkt, die durch die Eliminierung von Immunglobulinen während der Schwangerschaft eine markante Verringerung der Diabetes-Inzidenz bei den Nachkommen zeigen konnte (Greeley 2002).

Ein zusätzliches Wechselspiel haben B- und T-Zellen bei der Differenzierung von CD4+ T-Zellen in die Subklassen Th1 und Th2. Diese Entwicklung wird unter anderem durch Zytokine gesteuert, die von B-Zellen ausgeschüttet werden. Beispielsweise ist IL-12 ein wichtiges Zytokin für die Entwicklung von Th1-Zellen (Scott P 1993).

1.1.4 Ansätze zum Eingriff in die Pathogenese des Typ 1 Diabetes

Verschiedene Autoren haben in den letzten Jahren beschrieben, dass bei Autoimmunerkrankheiten, die mit chronischen Entzündungen einhergehen, Th1-Zellen pathogen und Th2-Zellen protektiv wirken sollen. Somit scheint eine erfolgreiche Verschiebung weg von einer Th1- hin zu einer Th2-dominierten Immunantwort zur Prävention und Behandlung von Krankheiten wie Diabetes mellitus, multipler Sklerose und rheumatoider Arthritis sehr vielversprechend zu sein (Lafaille 1998). Schon lange wird im NOD Modell versucht die Diabetesmanifestation durch antigenspezifische Therapien zu verzögern oder ihr sogar vorzubeugen.

Studien am Menschen und in Tiermodellen ergaben, dass Umwelteinflüsse das Risiko autoimmunen Diabetes zu entwickeln beeinflussen. Daher könnte die Modifizierung der Exposition zur Umwelt ein möglicher Weg sein Autoimmunität und Typ 1 Diabetes zu verzögern oder ihnen vorzubeugen (Knip 1999, Atkinson 2001). Nahrungsantigene gehören zu den ersten Umweltfaktoren, denen ein Körper begegnet und die die Entwicklung von Typ 1 Diabetes beeinflussen könnten. Es wurde berichtet, dass Nahrungsergänzungen mit alpha-omega-3 (n 3) Fettsäuren und Vitamin D₃ mit reduzierter Diabetes-Inzidenz assoziiert sind (Linn 1989, Mathieu 1994, The Eurodiab Substudy 2 Study Group 1999, Stene 2000, Hypponen 2001). Für Nahrungsproteine wie Kuhmilchproteine oder Weizenproteine wird diskutiert, ob sie für Menschen diabetogen sein könnten (Kimpimaki 2001, Norris 2002).

Nahrungsmodifikationen konnten ebenfalls die Diabetes-Inzidenz in Tiermodellen verändern (Hoorfar 1993, Funda 1999, Reddy 2001, Beales 2002).

Autoimmunität zu Inselantigenen wurde bereits sehr frühzeitig im Leben nachgewiesen (Rewers 1996, Ziegler 1999, Komulainen 1999). Als Diabetesschutz scheinen Modulationen vor Beginn der Inselautoimmunität sinnvoll zu sein und diese müssen folglich sehr frühzeitig im Leben ansetzen. Die frühe Säuglingsphase und der Zeitraum direkt nach der Entwöhnung scheinen wichtig zu sein. In diesem Zeitraum könnte der kritische Zeitpunkt liegen, an dem Proteine oder Peptide die gastrointestinale Barriere durchschreiten könnten, um einen Prozess, der in der Zerstörung der β -Zellen mündet, zu initiieren (Scott 1988). Im NOD Modell wurde gezeigt, dass durch andauernde Intervention mit untoxischen Substanzen ein Schutz vor Autoimmundiabetes erreicht werden kann, wenn die Intervention frühzeitig im Leben beginnt (Bach 1994a).

1.1.5 Die NOD Maus, ein Tiermodell für Typ 1 Diabetes

Makino (1980) entdeckte bei dem Versuch einen Mäusestamm zu generieren, in dem alle Tiere Katarakt entwickeln, zufällig eine weibliche Maus, die spontan klinische Symptome von autoimmunem Diabetes zeigte. Ihre Nachkommen wurden per Inzucht weiter vermehrt und nach Diabetes und Fruchtbarkeit selektiert, woraus die diabetische NOD Maus mit spontan auftretendem Autoimmundiabetes etabliert wurde. Bei NOD Mäusen liegt ein auffälliger geschlechtsspezifischer Unterschied bei der Diabetesentwicklung vor: die kumulative Diabetesinzidenz bis zur dreißigsten Lebenswoche beträgt achtzig Prozent bei den weiblichen, aber weniger als zwanzig Prozent bei den männlichen Tieren. Die spontane Diabetesentwicklung ist der beim Menschen ähnlich und das Auftreten von Insulitis wurde nachgewiesen (Makino 1980). Bei den meisten NOD Mäusen beginnt die Zerstörung der pankreatischen Inseln kurz nach der Geburt. Sie scheint aus einem autoimmunen Prozess zu resultieren, da auch die Mäuse Diabetes-assoziierte Antikörper produzieren (Atkinson 1988, Reddy 1988, Serreze 1988, Ziegler 1989). Die Ähnlichkeit zum humanen Typ 1 Diabetes wird durch die Erkenntnis gestützt, dass genau wie beim Menschen auch bei NOD Mäusen der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC), bei den Mäusen H2⁹⁷ genannt, als Hauptrisikokomponente für Autoimmundiabetes nachgewiesen wurde. Zusätzlich wurde aufgeklärt, dass die MHC-Klasse-II-I-A β -Kette dieselbe diabetogene Aminosäuresequenz trägt, wie das mit höchstem Diabetesrisiko assoziiert humane DQ*0302-Allel.

Bei NOD Mäusen sind genau wie bei Menschen IAA vor Manifestation der Erkrankung detektierbar. Allerdings ist Insulin das bisher einzig bekannte Inselantigen für Diabetes-assoziierte Autoantikörper im NOD Mausmodell (Yu 2000). Das Auftreten und die Verläufe von IAA in NOD Mäusen sind mit Verläufen derselben Autoantikörper bei prädiabetischen Kindern vergleichbar: IAA bei NOD Mäusen sind häufig schon im Alter zwischen acht und sechzehn Lebenswochen detektierbar und ihr Auftreten ist stark mit einer späteren Diabetesentwicklung assoziiert (Yu 2000, Abiru 2001). Analysen der IgG-spezifischen Antikörpersubklassen sind bei murinen Antikörpern ebenso möglich, wie bereits für die humanen Antikörper angesprochen. Auch im Mausmodell ist dadurch eine genauere Charakterisierung der Antikörperantworten auf Autoantigene und verabreichte Antigene möglich. Bei Mäusen werden die IgG-spezifischen Antikörpersubklassen IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 unterschieden. Eigene Arbeiten ergaben, dass IAA in unbehandelten NOD Mäusen vorwiegend aus den Subklassen IgG1 und IgG2b bestehen (Koczwara 2003), welche mit dem Zytokin IL-4 und der Th2-Immunität assoziiert sind. Internationale Workshops zur Charakterisierung von Autoantikörpern im NOD Modell zeigten, dass Autoantikörper gegen die im humanen Typ 1 Diabetes auftretenden Autoantigene GAD und IA-2 in unbehandelten NOD Mäusen nur sehr unspezifisch nachweisbar sind (Bonifacio 2001). Darüber hinaus wurde kürzlich bewiesen, dass GAD kein wichtiges Diabetes-assoziiertes Autoantigen in NOD Mäusen darstellt (Jaeckel 2003).

Durch eine zum humanen Typ 1 Diabetes parallel verlaufende Pathogenese stellen NOD Mäuse ein exzellentes Tiermodell für Studien des Immungeschehens im Autoimmundiabetes dar (Kikutani 1992, Bach 1994b, Tisch 1996, Delovitch 1997) und werden für Untersuchungen zur Pathogenese, Therapie und Prävention der Erkrankung genutzt. Ein weiteres etabliertes Nagetiermodell für spontan auftretenden Autoimmundiabetes ist das Modell der BioBreeding Ratte (BB Ratte), welches weniger häufig verwendet wird. Die Vorteile des NOD Modells sind ein besser aufgeklärtes Genom, eine größere Vielzahl an vorhandenen monoklonalen Reagenzien für Untersuchungen des Immunsystems und geringere Haltungskosten (Atkinson 1999). Allerdings gibt es auch NOD Maus spezifische Charakteristiken, die dieses Modell vom Menschen und dessen Risiko für Typ 1 Diabetes unterscheiden. Dazu zählen die Taubheit der NOD Mäuse (Atkinson 1997), das Fehlen von C5-Plasmaproteinen des Komplementsystems (Baxter 1993), das Fehlen eines murinen Homologs zum HLA-DR-Molekül auf antigenpräsentierenden Zellen (Hattori 1986) und Abweichungen in der Art der Insulinitis (Miyazaki 1985). Bei allen Untersuchungen im NOD Modell muss beachtet werden, dass der Stamm so starker Inzucht unterliegt, dass er eigentlich

ebenso gewertet werden sollte wie eine einzige Fallstudie im Menschen (Atkinson 1999). Bevor aus dem NOD Modell gezogene Ergebnisse auf den Menschen übertragen werden, sollte vorab angestrebt werden möglichst viele andere Tiermodelle auf dieselbe Wirkung zu untersuchen.

1.2. Stand der Forschung als Grundlage dieser Arbeit

1.2.1 Einfluss von Antikörperübertragungen während der Schwangerschaft von Müttern mit Inselzell-Autoimmunität oder Typ 1 Diabetes auf das Autoimmundiabetesrisiko der Nachkommen

Inselantikörper sind ein Marker für die Entwicklung von autoimmunem Diabetes beim Menschen und in der NOD Maus. Alle IgG-Antikörpersubklassen können während der Schwangerschaft die Plazenta frei passieren, wobei der transplazentäre Transfer von IgG-Antikörpern und deren Subklassen mit zunehmender Schwangerschaftsdauer linear ansteigt (Pitcher-Wilmott 1980). Es wurde gezeigt, dass Inselantikörper während der Schwangerschaft über die Plazenta von Antikörper-positiven Müttern auf ihre Babys übertragen werden. Folglich korrelieren die Inselantikörpermengen im Nabelschnurblut von Kindern von Müttern mit Typ 1 Diabetes sehr stark mit den Antikörpermengen im mütterlichen Blut (Ziegler 1993, Roll 1996). Diese mütterlich übertragenen Antikörper werden üblicherweise innerhalb des ersten Lebensjahres des Kindes undetektierbar (Hamalainen 2000, Naserke 2001).

Der Einfluss dieser übertragenen Antikörper auf die Entwicklung von eigener Inselautoimmunität und Typ 1 Diabetes bei den Nachkommen ist bisher ungeklärt. Im NOD Mausmodell wurde kürzlich sehr eindrucksvoll gezeigt, dass die Unterdrückung des mütterlichen Immunglobulin-Transfers die spontane Entwicklung von Autoimmundiabetes bei den Nachkommen verhindert (Greeley 2002). In dieser Studie wurden drei verschiedene Ansätze untersucht. Im ersten Experiment wurden NOD Muttertiere ohne B-Zellrepertoire eingesetzt. Diese Muttertiere ohne B-Zellen als Antikörperproduzenten hatten folglich überhaupt keine Immunglobuline und damit auch keine Inselantikörper, die sie auf ihre Nachkommen hätten transferieren können. Im zweiten Ansatz wurden Immunglobulintransgene NOD Muttertiere verwendet, die wohl B-Lymphozyten besaßen, welche allerdings so manipuliert waren, dass sie nur Antikörper gegen Hühnereilysozym (HEL) und keine autoreaktiven Antikörper bilden und transferieren konnten. Im dritten Ansatz wurden

NOD Embryonen in scheinsschwangere Muttertiere eines nicht autoimmunen Mäusestammes mit normalem B-Zellrepertoire implantiert. Die Embryonen besaßen ein unverändertes Immunsystem und den NOD spezifischen genetischen Hintergrund, bekamen aber von ihren Leihmüttern nur die üblichen, nicht autoimmunen Antikörper übertragen. In allen drei Ansätzen war die Diabetes-Inzidenz der NOD Nachkommen im Vergleich zu Kontrolltieren stark verringert. Diese Untersuchungen legten die Schlussfolgerung nahe, dass humorale Faktoren, einschließlich Immunglobuline und Autoantikörper, die während der Schwangerschaft vorhanden sind, eine wichtige Rolle in der Pathogenese der β -Zellzerstörung spielen könnten (Greeley 2002, von Herrath 2002). Gegen diese These spricht die Tatsache, dass Kinder von Vätern mit Typ1 Diabetes häufiger selbst an Diabetes erkranken als Kinder von Müttern mit Typ 1 Diabetes (Warram 1984, Bleich 1993, Pociot 1993).

1.2.2 Immunisierungen mit Insulin und davon ausgehende protektive Auswirkungen auf die Entwicklung von autoimmunem Diabetes im NOD Mausmodell

Bereits zahlreiche Studien wurden durchgeführt, bei denen das Diabetes-assoziierte Inselantigen Insulin oder Peptidfragmente des Insulins an NOD Mäuse verabreicht wurden. Wöchentliche orale Gaben (Zhang 1991) und tägliche subkutane Injektionen (Atkinson 1990) von Insulin führten ebenso zu einer signifikanten Verringerung der Diabetes-Inzidenz wie eigene Untersuchungen, die den Effekt von wöchentlichen Injektionen aus Insulin kombiniert mit Inkomplettem Freund'schem Adjuvanz (IFA) oder dem für den Gebrauch am Menschen zugelassenen Adjuvanz Montanide ISA 720 analysierten (Koczwara 2003). Verschiedene T-Zelltests zeigten, dass diese schützenden Effekte tatsächlich mit einer Verschiebung des Immunsystems, weg vom der Th1- und hin zum eher protektiven Th2-Phänotyp, einhergehen. Die durch die Immunisierungen verabreichten Stoffe scheinen eine Th2-Antwort der β -zellspezifischen T-Zellen zu induzieren und auf diese Weise als potente Antigene zur Toleranzinduktion zu wirken.

1.2.3 Mucine und deren Einfluss auf das Immunsystem

Mucine sind Glycoproteine mit vielen, vor allem O-glycosidisch verknüpften, Saccharidseitenketten und sehr hohen Molekulargewichten. Mucine können in eine Gruppe der klassisch sekretorischen Mucine und in eine Gruppe der membranassoziierten Mucine aufgeteilt werden. Die sekretorischen Mucine sind Bestandteil des Mucus und kommen als Schutz- und Gleitsubstanz im respiratorischen, verdauenden und reproduktiven System

vor. Sie werden von Zellen im Epithel ausgeschieden, verbleiben an der apikalen Oberfläche und bilden dort ein Mucusgel. Die membranassoziierten Mucine sind über hydrophobe Transmembrandomänen mit der Plasmamembran verbunden und bilden keine oligomeren Komplexe aus. Bisher wurden sechs verschiedene Gene für Mucine isoliert und kloniert. Das Mucin Typ 1 (MUC1) gehört zu den membranassoziierten Mucinen und ist auf der Apikalseite von fast allen sekretorischen Epithelzellen vorhanden. Das MUC1 Protein beinhaltet eine zwanzig Aminosäuresäuren umfassende Sequenz, die repetitiv bis zu 125 mal wiederholt wird. Etwa die Hälfte aller Aminosäuren im Protein sind Serin und Threonin, welche mit den Kohlenhydratseitenketten verbunden sind (Gendler 1987, Gendler 1990, Ligtenberg 1990, Lan 1990, Lancaster 1990).

Viele humane Karzinome schütten große Mengen an MUC1 aus. Dazu zählen Brust-, Colon-, Eierstock-, Pankreas-, Lungen-, Magen-, Prostata- und Darmtumore (Zaretsky 1990, Devine 1992, Gendler 1995). Untersuchungen in Mäusen ohne MUC1 zeigten ein wesentlich verringertes Mammakarzinomwachstum im Vergleich zu Wildtypmäusen, was auf eine wichtige Rolle von MUC1 im Tumorwachstum schließen lässt (Spicer 1995). Grundsätzlich ist das Immunsystem in der Lage Antigene, die von Tumoren ausgeschüttet werden, zu erkennen und eine Immunantwort zu generieren, die den Wirtsorganismus schützt, indem es den Tumor zerstört (Boon 1997, Timmerman 1999, Rosenberg 2001). Maligne Tumore können allerdings Toleranz auslösen: sie wachsen folglich ungehemmt und töten den Wirtsorganismus. Verschiedene Mechanismen können diese Toleranzinduktion erklären, unter anderem das Vorliegen einer gestörten Präsentation von Tumor-assoziierten Antigenen an T-Zellen. Eine immunregulatorische Rolle von MUC1, das von Tumoren ausgeschieden wird, wird ebenfalls vermutet. Verstärkungen der Synthese und Verschiebungen in den Mengen der gebundenen Kohlenhydratketten werden als Ursache für den Einfluss von MUC1 auf die Proliferation von Tumorzellen verantwortlich gemacht: MUC1 kann die T-Zellproliferation als Antwort auf den Antigenkontakt unterdrücken (Agrawal 1998a). In einer neuen unpublizierten Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Mikroumgebung von Tumoren, die das von den Tumoren ausgeschiedene Mucin beinhaltet, die Differenzierung und Ausreifung von dendritischen Zellen (DC) beeinflusst und daraus eine tolerante und regulatorische Form der DC als antigenpräsentierende Zellen resultiert (mündliche Auskunft von Herrn Dr. Piemonti; San Raffaele Institut, Mailand). Sowohl in vitro als auch in vivo konnte nachgewiesen werden, dass im Mikromilieu um Tumoren herum eine dominante Th2-Immunität vorliegt und dass diese Dominanz von MUC1 ausgelöst wird.

Über eine Rolle von MUC1 als Suppressor des Immunsystems wurde bereits zuvor berichtet, als für Krebspatienten in vivo nachgewiesen wurde, dass eine erhöhte Ausscheidung von MUC1 für verschiedene Krebsarten eine schlechtere Prognose verursacht (Agrawal 1998b). In einem Mausmodell mit Asthma wurde gezeigt, dass eine durch Th2-Zellen ausgelöste Luftwegsentzündung die Mucusproduktion über einen IL-13-vermittelten Weg induziert (Cohn 2002). Folglich fördert MUC1 die Ausbildung einer Th2-Immunität und im Wechselspiel regen Th2-Zellen die Mucinbildung an. Bisher gibt es keine beschriebenen Studien zum Einsatz von Mucin als therapeutisches Agens bei Autoimmunerkrankungen.

1.2.4 Die Rolle von Gluten bei den Autoimmunerkrankungen Typ 1 Diabetes und Zöliakie

Zöliakie ist eine Autoimmunerkrankung, die sehr oft gemeinsam mit anderen Autoimmunerkrankheiten und so auch mit Typ 1 Diabetes auftritt. Die Zöliakie-Prävalenz liegt ebenso wie die Typ 1 Diabetes-Prävalenz in Deutschland bei 0,3% (Dieterich 1997). Allerdings haben etwa fünf Prozent der Personen mit Typ 1 Diabetes ebenfalls eine Zöliakie und umgekehrt (Collin 1994a, Cronin 1997, Not 2001). Kinder von Eltern mit Typ 1 Diabetes sind eine Risikogruppe für Typ 1 Diabetes, in der ebenfalls eine erhöhte Zöliakie-Prävalenz beobachtet wurde (Hummel 2000). Beide Erkrankungen sind mit dem Vorhandensein eines identischen genetischen Faktors assoziiert und in beiden Erkrankungen wurden zelluläre und humorale Störungen des Immunsystems beobachtet und als gemeinsame Pathomechanismen diskutiert (Hummel 1996, Schuppan 2000, Atkinson 2001). Auf der T-Zellebene wird in beiden Erkrankungen ein gestörtes immunologisches Gleichgewicht, einhergehend mit einer Th1-Dominanz, mit der Entwicklung der Autoimmunität in Verbindung gebracht (Haskins 1996, Scott 1997, Schuppan 2000, Flohe 2003). Auch bei der Zöliakie scheinen B-Zellen in den Autoimmunprozess involviert zu sein, da hier spezifische Autoantikörper gegen Endomysium, Gewebetransglutaminase C und den Glutenbestandteil Gliadin auftreten (Dieterich 1997). Neben diesen Parallelen bei der Autoimmunität manifestieren beide Erkrankungen sehr früh im Kindes- oder Jugendalter. Das lässt vermuten, dass Faktoren, die sehr früh im Leben auf den Organismus einwirken, verantwortlich für einen Defekt im Immunsystem sind. Diese Annahme stützen neueste Untersuchungen, die für Kinder mit einem Diabetes-Hochrisikogenotyp ein fünffach erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Diabetes-assoziiierter Autoimmunität zeigen, wenn die Kinder bereits sehr frühzeitig im Säuglingsalter mit glutenhaltiger Nahrung ernährt wurden (Ziegler 2003).

Vor allem pflanzliche Proteine aus Weizen und der Sojabohne werden als diabetogen diskutiert (Scott 1988, Hoorfar 1993, Scott 1997, Flohe 2003). Als Auslöser der Zöliakie wurde das im Getreide enthaltene Klebereiweiß Gluten identifiziert (Lundin 1993, van de Wal 1998). Auch für andere Autoimmunerkrankungen und Typ 1 Diabetes wird Gluten als möglicher Auslöser oder Verstärker des Autoimmunprozesses diskutiert (Pocecco 1995, Bonifacio 1998b). Osborne beschrieb bereits 1907, dass der Eiweißkleber Gluten keinen einheitlichen Eiweißkörper darstellt, sondern aus den Eiweißstoffen Gliadin und Glutenin zusammengesetzt ist. Gliadin ist in wässrigem Alkohol und in Säuren löslich, Glutenin dagegen in schwachem Alkali. Das Institut für Getreidewirtschaft in Detmold beschreibt den Glutengehalt von Weizen mit 27-28% (mündliche Auskunft von Herrn Dr. Madry). Der Gliadinanteil des Glutens wurde mit 41,6% und der Gluteninanteil mit 58,4% beschrieben (Osborne 1907). Der diabetogene Nahrungsfaktor scheint im Chloroform-Methanol-Extrakt von Nagetiernahrung enthalten zu sein (Coleman 1990) und sowohl α - als auch γ -Gliadin, die als immunreaktive Proteine der Zöliakie gelten, können durch Chloroform-Methanol-Extraktion aus Weizenendosperm isoliert werden (Rocher 1995).

Epidemiologische Untersuchungen weisen auf einen Zusammenhang der Glutenexposition und Diabetesentstehung hin: bei gemeinsamem Auftreten von Zöliakie und anderen Autoimmunerkrankungen wird Zöliakie meist nach dem Auftreten der anderen Krankheit, also auch erst nach Typ 1 Diabetes, diagnostiziert und mit glutenfreier Ernährung behandelt (Collin 1994b, Corazza 1995, Lepore 1996, Cronin 1997). Die Prävalenz anderer Autoimmunkrankheiten ist vor allem bei Personen mit klinisch silenter Zöliakie erhöht, die lange Zeit nicht diagnostiziert wird (Ventura 1999). Andere Studien berichten sogar über eine Abnahme von Autoantikörpern nach Diagnose der Zöliakie und eine Abnahme von Inselautoantikörpern durch glutenfreie Ernährung (Wortsman 1994, Ventura 2000).

Zusätzlich gibt es Ergebnisse im Tiermodell, die durch eine glutenfreie Ernährung der Tiere eine signifikante Verringerung der Diabetes-Inzidenz im Vergleich zu Kontrolltieren erreichen (Funda 1999). Neueste Untersuchungen zeigen unterstützend, dass nach einer weizenreichen Nahrung im NOD Modell eine Verschiebung des intestinalen Zytokingleichgewichts hin zum Th1-Typ erfolgt. Das lässt eine Modulation des darmassoziierten Immunsystems als Beitrag zur Diabetesentwicklung vermuten (Flohe 2003). Diese Beobachtungen im Tiermodell sowie die Ergebnisse der epidemiologischen Untersuchungen zum gemeinsamen Vorkommen von Zöliakie und Typ 1 Diabetes beim Menschen lassen einen präventiven Effekt von glutenfreier Ernährung im Hinblick auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes schlussfolgern.

Angelehnt an die genannten Fütterungsversuche (Funda 1999) wurden in unserer Arbeitsgruppe im Institut für Diabetesforschung in München ebenfalls Fütterungsstudien im NOD Mausmodell durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde glutenfreie Nahrung mit Zusätzen von Vitamin D (siehe 1.2.6) und Fischöl und Variationen davon eingesetzt, wobei sich die glutenfreie Komponente der Futtermischungen als Diabetes-protektiv herausstellte (Schmid 2004). Im nächsten Schritt wurden drei verschiedene Studienansätze durchgeführt um den Zeitpunkt zu ermitteln, an dem der Einsatz von glutenfreier Nahrung die größte protektive Wirkung auf die Diabetesentwicklung bei den Mäusen hat. In einer Gruppe wurden NOD Mäuse, deren Elterntiere glutenhaltige Nahrung erhalten hatten, nach der Entwöhnung von der Mutter vom Anfang der vierten Lebenswoche bis zum Lebensende glutenfrei ernährt. Eine zweite Tiergruppe wurde im Zeitfenster nach der Entwöhnung bis zu Beginn der zehnten Lebenswoche glutenfrei ernährt. Die Mäuse einer dritten Gruppe wurden lebenslang glutenfrei ernährt, und auch schon deren Elterntiere während Schwangerschaft und Stillzeit. Die Diabetes-Inzidenzen dieser drei Untersuchungsgruppen betragen mit zwei- und drei- bis zehnwöchigen Lebenszeiten 42%, 36% und 51%. Sie waren signifikant verringert im Vergleich zu lebenslang mit glutenhaltigem Standardfutter ernährten NOD Mäusen, von denen 83% Diabetes entwickelten (Schmid 2004). Schlussfolgernd wird ein kritischer Zeitraum nach der Entwöhnung bis zur zehnten Lebenswoche vermutet. Dieses Ergebnis passt zur These, dass anscheinend die Periode direkt nach der Entwöhnung wichtig für die Initiierung eines Prozesses ist, der die β -Zellzerstörung auslöst (Scott 1988).

1.2.5 Histamin, Histamin-1-Rezeptoren und Histamin-2-Rezeptoren und deren Einfluss auf das Immunsystem

Histamin (β -Imidazolylethylamin) ist ein gut bekanntes biogenes Amin. Es ist in vielen verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen involviert. Bisher sind multiple regulatorische Funktionen von Histamin im Verdauungs-, zentralen Nerven- und Immunsystem bekannt, welche die Regulation von Immunantworten, vor allem bei allergischen Reaktionen, einschließen (Leurs 1995). Auch die Immunantwort, die während Entzündungsreaktionen abläuft, kann durch Histamin beeinflusst werden (Roszkowski 1977, Beer 1987, Vannier 1993, Banu 1999).

Die vielfältigen Effekte von Histamin werden durch vier verschiedene Typen von Transmembranrezeptoren vermittelt, die an G-Protein gekoppelt sind (Yamashita 1991, Gantz 1992, Lovenberg 1999, Nakamura 2000). Histamin-1-Rezeptoren (H1R) und Histamin-2-

Rezeptoren (H2R) werden auf verschiedenen Zelltypen expressioniert, so auch auf T- und B-Lymphozyten (Leurs 1995). Neueste Untersuchungen haben eine dominante Expression von H1R auf Oberflächen von Th1- und von H2R auf Oberflächen von Th2-Zellen nachgewiesen (Jutel 2001, Pedotti 2003). H1R sind hauptsächlich in allergische Reaktionen, die vaskuläre Permeabilität und die Kontraktion glatter Muskulatur im Respirations- und Gastrointestinaltrakt involviert. Das primäre H1R-Signal wird durch eine Calcium-abhängige Aktivierung von Phospholipase C vermittelt, die zur Generierung von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) führt. Ein Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Spiegel ist die Folge (Hill 1991, Leurs 1995). H2R haben regulatorische Aufgaben bei der Zellproliferation, der Magensäuresekretion, der Relaxation der glatten Atemwegs- und Gefäßmuskulatur und bei Immunantworten. Sie sind an zwei Systeme gekoppelt: an das Adenylatcyclase- und an das Phosphoinositidesystem (Hill 1991). Die Ligation von Histamin an H2R löst vorrangig die Bildung des second-Messengers cAMP aus (Roszkowski 1977, Plaut 1983, Beer 1987). Das Vorkommen von H3R und H4R ist geringer als das von H1R und H2R und ihre Funktionen sind noch nicht vollständig bekannt. Sie sollen hier nicht weiter betrachtet werden.

H1R-Antagonisten hemmen alle H1R-Wirkungen, während sie gegenüber H2R-Effekten wirkungslos sind. H1R-Antagonisten haben anticholinerge, sedative und lokalanästhetische Wirkungen auf das periphere Nervensystem und Serotonin-antagonistische Nebenwirkungen (Baroody 2000). Histamin ist im Gehirn über H1R in viele verschiedene physiologische Funktionen involviert, dazu zählen die Regulation des Schlaf-Wach-Zyklus, das Wiedererkennen und die Erinnerung. Entsprechend sind Nebenwirkungen von H1R-Antagonisten Schläfrigkeit und Erkennungsstörungen (Tashiro 2002). Die wichtigste therapeutische Funktion von H2R-Antagonisten ist die Hemmung der histaminvermittelten Salzsäureproduktion in der Magenschleimhaut. Folglich haben H2R-Antagonisten klinische Bedeutung bei der Behandlung von Magengeschwüren (Barocelli 2003). Durch tägliche Behandlung mit H2R-Antagonisten kann Tumorstadium durch Veränderung der lokalen Zytokinexpression unterdrückt werden. Neuere Versuche zeigen, dass die endogene Histaminsynthese in Tumorgewebe über H2R die lokale Tumormunität unterdrückt, was zur Förderung des Tumorstadiums führt (Takhashi 2002).

Eine Studie in einem Mausmodell mit zerstörten H1R ergab, dass bei diesen Tieren nach Stimulation mit Histamin die IFN- γ -Sekretion vermindert und die Sekretion der Th2-assoziierten Zytokine IL-4 und IL-13 verstärkt ist. Dagegen sind bei Mäusen mit zerstörten H2R sowohl Th1- als auch Th2-typische Zytokine im Vergleich zu Wildtypmäusen verstärkt.

Zusätzlich zeigen Mäuse ohne H1R im Vergleich zu Mäusen ohne H2R verstärkte Antikörperreaktionen mit Anstiegen der Subklassenantikörper IgE, IgG1, IgG2b und IgG3 und es wurde keine Verminderung der Subklasse IgG2a bei den Mäusen ohne H2R beobachtet. Die Schlussfolgerung dieser Studie war, dass Histamin T-Zell- und Antikörperantworten durch unterschiedliche Expressionen von H1R und H2R regulieren kann und Histamin folglich einen regulatorischen Mechanismus bei der Kontrolle von entzündlichen Reaktionen darstellt (Jutel 2001). Die Untersuchung lässt den Umkehrschluss zu, dass Histamin Th1-typische Antworten durch Auslösung von H1R verstärkt, wogegen sowohl Th1- als auch Th2-Immunität negativ von biochemischen Signalen reguliert werden, die durch die Histaminbindung an H2R ausgelöst werden. Die Stimulation mit Histamin verstärkt die IFN- γ -Produktion und die Proliferation von Th1-Zellen und inhibiert die Proliferation von Th2-Zellen und deren IL-4-Produktion (Jutel 2001, Schneider 2002). Widersprüchlich zu diesen Thesen gibt es Annahmen, dass Histamin die Entwicklung von Th2-Zellen unterstützt und Immunantworten vom Th1-Phänotyp vermindert (Hart 2002). Ebenso soll es die IFN- γ -Produktion von Th1-Zellen vermindern und keinen Effekt auf die Zytokinausschüttung von Th2-Zellen haben (Lagier 1997). Diese gegensätzlichen Aussagen lassen regulatorische Funktionen von Histamin in verschiedene Richtungen vermuten, die beispielsweise konzentrationsabhängig sein könnten und weitere Untersuchungen erfordern.

Es gibt einen beschriebenen Interventionsversuch mit dem H1R-Antagonisten Ketotifen über drei Monate bei neun prädiabetischen erwachsenen Personen, um deren β -Zellfunktion zu erhalten. Diese Intervention in einer sehr späten Phase der Krankheitsentwicklung war nicht mit einem Schutz vor der Diabetesmanifestation verbunden (Bohmer 1994). Zusätzlich konnten erhöhte Histamingehalte im Plasma bei Personen mit Typ 1 und Typ 2 Diabetes nachgewiesen werden (Gill 1989).

1.2.6 Einfluss von Vitamin D auf das Immunsystem und bekannte Wirkungen von Vitamin D auf die Entwicklung von Typ 1 Diabetes

Die biologisch aktivste Form vom Vitamin D ist das Calcitriol (= $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ = $1\alpha,25$ -Dihydroxycholecalciferol). Die klassischen Calcitriolfunktionen beinhalten die Aufrechterhaltung der Calciumspiegel im Serum innerhalb der Norm und die Regulation der Knochenumbildung (DeLuca 1984). Calcitriol ist ebenso für den intrazellulären Stoffwechsel in einer Vielzahl von Geweben von Bedeutung. Hierbei bindet Calcitriol an den zytosolischen Vitamin D-Rezeptor (VDR).

Der VDR ist ein Mitglied der Nukleorrezeptoren-Superfamilie, die transkriptionelle Regulatoren sind (DeLuca 1984, MacDonald 1999). Darüber hinaus existieren membrangebundene VDR ohne genomische Wirkung. VDR wurden mittlerweile in mehr als dreißig verschiedenen Geweben nachgewiesen, dazu zählen in pankreatische β -Zellen, Monozyten und aktivierte T-Zellen. Folglich modulieren ligandenaktivierte VDR die Expression von vielen verschiedenen Genen, auch solche für die Produktion von Zytokinen. Auf diese Weise ist Calcitriol in die Regulation des zellulären Stoffwechsels involviert (DeLuca 2001). Bereits zweiundzwanzig einzigartige nichtfunktionelle VDR-Varianten wurden beschrieben, die meist zu seltenen Syndromen führen (Pike 1997). Für einige T-Zell-vermittelte Autoimmunkrankheiten, einschließlich Typ 1 Diabetes, wurden Assoziationen zu spezifischen VDR-Genpolymorphismen nachgewiesen. Sowohl das Risiko für Typ 1 als auch das für Typ 2 Diabetes werden durch den Genotyp des VDR an der BmsI-Restriktionsstelle beeinflusst, wobei der Genotyp BB mit einem erhöhten Risiko im Vergleich zu den Genotypen Bb und bb einhergeht (Chang 2000, Ortlepp 2001). Diese Assoziationen wurden allerdings uneinheitlich für verschiedenen Populationen beschrieben (McDermott 1997, Hauache 1998, Pani 2000, Chang 2000). Erst kürzlich wurde von einer Korrelation zwischen einem VDR-Genpolimorphismus und einer schnell manifestierenden Typ 1 Diabetesform berichtet (Motohashi 2003).

Zu den vielen nicht calcämischen Funktionen von Vitamin D zählen die Induktion der Differenzierung von peripheren Blutmonocyten, antiproliferative Effekte und eine Rolle als notwendiger Faktor für die Insulinsekretion. Es ist bekannt, dass durch Ligandierung von Vitamin D an VDR die Aktivierungen von T-Zellen unterdrückt werden kann. Zudem ist Calcitriol ein starker Modulator des Immunsystems (Holick 1995). Calcitriol kann seine Immuneffekte und damit auch eine Modulation von Typ 1 Diabetes auf zwei Ebenen vermitteln: einerseits auf der Ebene der T-Lymphozyten durch Verschiebungen der Zytokinprofile weg vom Th1- und hin zum Th2-Typ und durch eine Verminderung der *in vitro* Proliferation von humanen T-Lymphozyten (Saggese 1989). Andererseits auf der Ebene der antigenpräsentierenden Zellen durch eine reduzierte Antigenpräsentation, die durch die Reduktion von Th1-unterstützenden Zytokinen und kostimulatorischen Molekülen vermittelt wird. DC induzieren nicht nur, sondern modulieren auch die T-Zellaktivierung. Calcitriol induziert DC von einem toleranten Phänotyp, der durch eine verminderte Expression von kostimulatorischen Molekülen, eine geringe IL-12- und verstärkte IL-10-Sekretion charakterisiert ist. Die Behandlung mit Calcitriol scheint zusätzlich die Menge an regulatorischen Zellen zu erhö-

hen (Adorini 2003). Dagegen scheint Vitamin D nicht direkt an B-Lymphozyten agieren zu können, da diese kaum messbare Mengen an VDR tragen (Veldman 2000).

Ergebnisse einer multizentrischen Fallkontrollstudie beim Menschen zeigen, dass eine höhere Vitamin D-Supplementierung im ersten Lebensjahr mit einem verminderten Diabetesrisiko verbunden ist (The Eurodiab Study 2 Study Group 1999). In einer norwegischen Studie wurde festgestellt, dass die Einnahme von Lebertran während der Schwangerschaft und von Vitamin D-Supplementen während des ersten Lebensjahres des Kindes das Diabetesrisiko des Kindes signifikant verringert (Stene 2000). In einer finnischen Studie wurde die Diabeteshäufigkeit dreißig Jahre nach der Geburt erfasst und zur Rachitisprophylaxe im Säuglingsalter in Beziehung gesetzt. Hierbei hatten Personen mit einer regulären Rachitisprophylaxe im Vergleich zu denen, die als Säugling kein Vitamin D bekamen, ein stark reduziertes Risiko für Typ 1 Diabetes. Dagegen erhöhte eine Rachitis im Säuglingsalter das Diabetesrisiko um das Dreifache (Hyponen 2001).

Im NOD Mausmodell konnte durch eine Supplementierung mit Calcitriol sowohl im Pankreas als auch im peripheren Immunsystem eine Verschiebung hin zu einer Th2-dominanten Immunantwort gegen Autoantigene des Pankreas induziert werden (Overbergh 2000). Diese durch Calcitriol ausgelöste Veränderung der Immunantwort wird für eine reduzierte Insulitis- und Diabetes-Inzidenz im NOD Modell verantwortlich gemacht (Mathieu 1992, Mathieu 1994). Bei NOD Mäusen konnte durch die Behandlung mit einem Analog von Calcitriol die DC-Reifung, eine verminderte IL-12- und IFN- γ -Produktion, eine verminderte Insulitis mit verminderter Th1-Zellinfiltration und Diabetesprotektion gezeigt werden (Gregori 2002). In unserer eigenen Arbeitsgruppe wurden ebenfalls Versuche mit Vitamin D-Supplementierungen im NOD Modell durchgeführt. Ziel dieser Untersuchungen war es ein Agens zu finden, das in unschädlichen Mengen bereits sehr früh im Leben eingesetzt werden kann um der Entwicklung von Autoimmundiabetes vorzubeugen. NOD Mäusen wurde folglich Cholecalciferol in Mengen pro kg Körpergewicht gefüttert, die für Säuglinge akzeptabel wären. Diese Versuche zeigen keine Verminderung der Diabetes-Inzidenz bei den behandelten Mäusen (Schmid 2004). Dagegen wurden die vorher beschriebenen Versuche, die mit Protektion einher gingen, mit sehr hohen Mengen von Calcitriol durchgeführt.

1.3 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Durchführung von innovativen immunsuppressiven Therapien um im Tiermodell der NOD Maus die Entwicklung von Autoimmundiabetes zu verhindern bzw. beim Menschen die residuale Insulinreserve und β -Zellrestfunktion zu erhalten. Um dieses Ziel zu erreichen werden immunmodulatorische, nutritive und pharmakologische Therapieansätze getestet. Es sollen subkutane Immunisierungen mit β -Zellantigenen, Analysen des Einflusses von transplazentär übertragenen Insel(auto)antikörpern, Verabreichungen von Mucin Typ 1 und Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten über das tägliche Trinkwasser, glutenfreie Nahrungsmodifikationen, unter anderem mit Gliadinzusatz, und eine Supplementierung mit Calcitriol ($1\alpha,25$ -Vitamin D_3) durchgeführt werden. Alle Therapien werden in randomisierten kontrollierten Studienansätzen getestet. Die Studienendpunkte der Untersuchungen sind die Manifestation von Autoimmundiabetes und der Erhalt der β -Zellreserve, reflektiert durch die Messungen der verbliebenen C-Peptidmengen im Rahmen der Studie bei Personen mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes. Darüber hinaus dient die Entwicklung von Inselautoantikörpern als zusätzlicher Endpunkt bei den untersuchten Kindern zur Analyse des Einflusses von transplazentär übertragenen Insel(auto)antikörpern. Sekundäre Endpunkte der durchgeführten Studien sind Surrogatparameter, die durch die Therapien erreichte Veränderungen in der Immunantwort aufzeigen können. Dazu zählen die Messungen von Insulin(auto)antikörpern zu definierten Studienzeitpunkten bei allen Therapieansätzen, von Anti-Gliadin-Antikörpern, von Anti-Tetanus-Toxoid-Antikörpern und die Detektion der Zytokinausschüttungen von murinen Milzzellen mittels Elispot-Methodik.

Durch diese Therapien sollen folgende spezielle Fragen geklärt werden:

1. Kann die Immunisierung von Muttertieren mit Insulin Autoimmundiabetes bei den Nachkommen im NOD Mausmodell verhindern?
2. Führt der Transfer von mütterlichen Insel(auto)antikörpern zu einem erhöhten Diabetesrisiko bei den Kindern von Müttern mit Typ 1 Diabetes?
3. Kann die Gabe von Mucin Typ 1 oder die Gabe von Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten Autoimmundiabetes im NOD Mausmodell verhindern?
4. Kann eine glutenfreie Ernährung NOD Mäuse vor Diabetes schützen und ist dieser Effekt durch die Gabe von Gliadin reversibel?

5. Welches ist der Zeitpunkt, an dem die Glutenzufuhr Einfluss auf die Pathogenese von Autoimmundiabetes im NOD Mausmodell nimmt?
6. Ist durch eine permanente Aufnahme von H1R-Antagonisten tatsächlich eine Verschiebung des immunologischen Gleichgewichts hin zum Th2-Phänotyp möglich?
7. Kann die aktive Vitamin D₃-Form in einer tolerablen, nicht-toxischen Dosis eine Wirkung auf das humorale Immunsystem ausüben und kann dadurch die β -Zellrestfunktion erhalten werden?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchungsgruppen und Behandlungsprotokolle

2.1.1 Untersuchungen im NOD Mäusekollektiv

Für alle im Folgenden beschriebenen Versuche im NOD Mausmodell wurden weibliche Tiere aus eigener Zucht des Instituts für Diabetesforschung in München benutzt. Die ursprünglichen Zuchtpaare stammten von Taconics. Für alle Tierexperimente wurden die Prinzipien für die Versorgung von Tieren (NIH Publikation Nr. 85-23, überarbeitet 1985) und die nationalen Tierschutzgesetze befolgt. Die Immunisierungsstudie wurde durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Lizenz-Nummer: 209.1/211-2531-51/02).

Insgesamt wurden 286 weibliche NOD Mäuse in die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Versuchs- und Kontrollgruppen eingeschlossen. Bei der Verteilung in die Untersuchungsgruppen wurde das „litter-matching“ Prinzip angewendet, nach dem die Nachkommen eines Wurfes in möglichst viele verschiedene Untersuchungsgruppen aufgeteilt werden. Dieses Prinzip wird angewendet um den genetischen Hintergrund der Gruppen ähnlich zu halten. So können mögliche Effekte auf die Behandlung zurückgeführt werden und sind nicht von Besonderheiten eines Wurfes und dessen Genetik abhängig.

Sechsendvierzig NOD Weibchen wurden als Muttertiere in den Untersuchungsteil eingeschlossen, der die Übertragbarkeit des durch Insulinimmunisationen bei den Muttertieren induzierten Diabetesschutzes auf deren weibliche Nachkommen prüfen und zusätzlich die Auswirkungen des mütterlichen Insulin(auto)antikörper-Transfers auf die Risiken der Nachkommen für Autoimmunität und Diabetes analysieren soll. Die Muttertiere wurden auf sieben Untersuchungsgruppen aufgeteilt. In die Analysen der Auswirkungen von MUC1 auf die Entstehung von Autoimmundiabetes wurden fünfunddreißig Mäuse eingeschlossen und auf drei Untersuchungsgruppen verteilt. Neunundvierzig Tiere wurden in die Untersuchung des diabetogenen Einflusses des Ernährungsbestandteils Gluten eingeschlossen und auf vier Untersuchungsgruppen aufgeteilt. Für den Studienteil, der den Einfluss von H1R-Antagonisten auf die Diabetesentwicklung analysiert, wurden zweiundvierzig NOD Mäuse in vier Untersuchungsgruppen beobachtet. Für die permanent geführte Kontrollgruppe, die als Spiegel für die Diabetes-Inzidenz und die I(A)A-Prävalenz in der verwendeten NOD Kolonie dient, wurden im Rahmen dieser Studien 114 Tiere nachverfolgt (Tab. 1).

Tab. 1: 311 weibliche NOD Mäuse wurden im Alter von drei Lebenswochen auf vier Therapiestudien und eine Kontrollgruppe aufgeteilt

Untersuchungsgruppe	n =	Therapie
1 Insulinimmunisierungen vor bzw. während der Trächtigkeit (n = 46)		
1A	9	Insulin vor
1B	8	Insulin während
1C	4	Glucagon vor
1D	4	Glucagon während
1E	4	NaCl vor
1F	4	NaCl während
1G	13	unbehandelt
2 Gabe von Mucin über das Trinkwasser (n = 35)		
2A	11	Mucin Typ 1 (MUC1)
2B	11	Mucin Typ 3 (MUC3)
2C	13	unbehandelt
3 Glutenmodifikationen in der Ernährung (n = 49)		
3A	12	glutenfrei 6.-12. Lebenswoche
3B	12	glutenfrei 4.-10. Lebenswoche
3C	12	glutenfrei+Gliadin 4.-10. Lebenswoche
3D	13	unbehandelt
4 Gabe von Histamin-Rezeptor-Antagonisten über das Trinkwasser (n = 42)		
4A	11	Histamin-1-Rezeptor(H1R)-Antagonist
4B	10	Histamin-2-Rezeptor(H2R)-Antagonist
4C	11	nur mit DT immunisiert (siehe 2.1.1.4)
4D	10	unbehandelt
5 Unbehandelte permanente Kontrollgruppe der NOD Kolonie		
	114	unbehandelt

2.1.1.1 Diabetesprotektion durch Immunisierungen mit Insulin und Auswirkungen auf die Nachkommen

Die NOD Weibchen der Versuchsgruppe 1A (n = 9) wurden im Alter von vier, fünf, sechs und sieben Lebenswochen subkutan mit Insulin plus Inkomplettes Freund'sches Adjuvanz (IFA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) immunisiert. Die Tiere der Gruppe 1B (n = 8) wurden mit den gleichen Insulin- und IFA-Mengen zur ersten, zweiten und dritten Woche der Trächtigkeit behandelt. Zur Kontrolle, ob sich positive Effekte tatsächlich aus den Immunisierungen mit Insulin plus IFA ergeben, wurde zusätzlich mit einem Kontrollantigen bzw. Natriumchlorid (NaCl) plus IFA immunisiert, ebenfalls vor bzw. während der Trächtigkeit. In Gruppe 1C (n = 4) wurde Glucagon plus IFA vor und in Gruppe 1D (n = 4) während der Trächtigkeit immunisiert. In Gruppe 1E (n = 4) wurde NaCl als Vehikel plus IFA vor und in Gruppe 1F (n = 4) während der Trächtigkeit immunisiert (Abb. 1, Abb. 2, Tab. 2).

Pro Immunisierung wurden den Mäusen 30 µl Antigenlösung kombiniert mit 100 µl IFA injiziert. Für die Insulin-Immunisierungen wurden den Tieren der Gruppen 1A und 1B jeweils 3 IE (= 30 µl) humanes Insulin (Insuman[®] Rapid, 3,47 mg/ml; Aventis) injiziert. Um bei den Glucagon-Immunisierungen die gleiche Proteinmenge wie beim Insulin zu verwenden, wurde lyophilisiertes Glucagon (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) mit Wasser für Injektionszwecke (steril und pyrogenfrei, B. Braun Melsungen AG) in der Konzentration 3,47 mg/ml gelöst und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Pro Glucagon-Immunisierung (Gruppen 1C und 1D) wurden 30 µl Glucagon injiziert. Für die Immunisierungen mit NaCl (Gruppe 1E und 1F) wurde das gleiche Volumen verwendet und folglich jeweils 30 µl NaCl (isotone 0,9%ige Natriumchloridlösung, B. Braun Melsungen AG) injiziert.

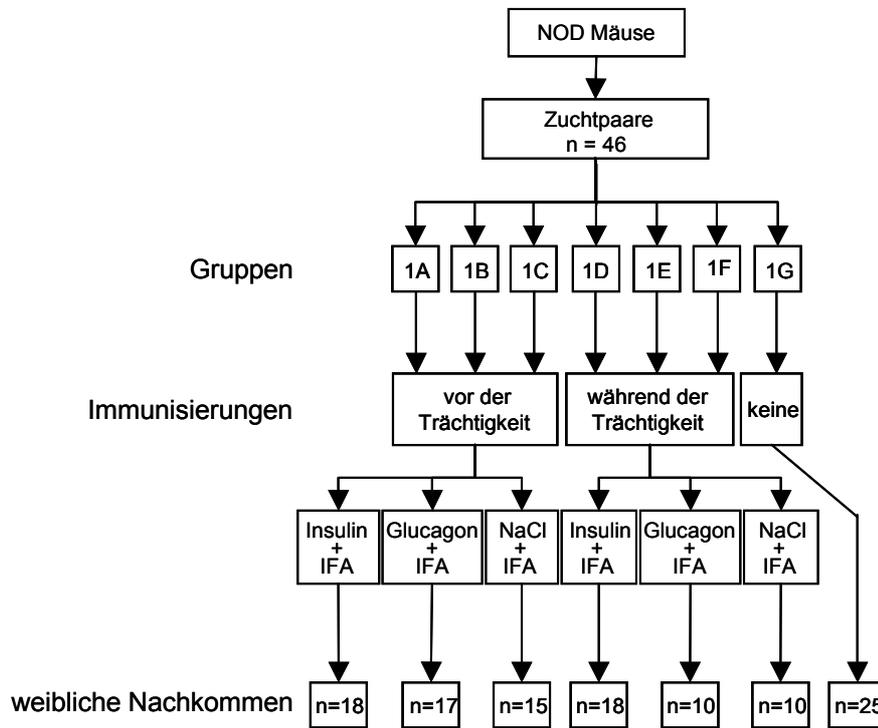
Die entsprechenden Antigen- und IFA-Mengen pro Immunisierungsgruppe inklusive einem Bonus für Misch- und Injektionsverluste werden in ein Glasröhrchen pipettiert. Direkt vor der Immunisierung wird die Immunisierungslösung durch etwa fünfzigfaches Aufziehen und Ausdrücken durch eine dicke Kanüle (BD Microlance[™] 3, 0,9 × 40 mm; Becton Dickinson GmbH) in eine Glasspritze (Tropfspritze nach Dr. Böhm, Seidel Medipool) emulgiert und anschließend blasenfrei aufgezogen. Die dicke Kanüle wird entfernt und durch eine feinere Kanüle (Neolus, 0,55 × 25 mm; Terumo) ersetzt. Durch einen Einstich in die rechte und einen Einstich in die linke Leistenengegend wird den Mäusen jeweils die Hälfte der Immunisierungslösung subkutan injiziert. Auf diese Weise wird eine bessere Verteilung der Immunisierungslösung unter der Haut erreicht.

Bei allen Muttertieren wurde mit vier Lebenswochen (vor der ersten Immunisierung) die erste und mit etwa elf Lebenswochen (unmittelbar vor der Entbindung) die zweite Blutabnahme durchgeführt (siehe 2.1.1.7). Ab der achten Lebenswoche wurden die Weibchen aller Untersuchungsgruppen mit vier unbehandelten NOD Männchen aus einem Wurf verpaart (Abb. 2). Dadurch sollte der genetische Hintergrund der Nachkommen möglichst ähnlich gehalten werden.

Für die Darstellung der natürlichen Diabetes-Inzidenz in der Untersuchungskohorte wurde von jedem Wurf mindestens ein Weibchen in die unbehandelte Kontrollgruppe 1G (n = 13) eingeschlossen. Diese Tiere durchliefen das Blutabnahme- und Verpaarungsprotokoll ebenso wie die Versuchstiere, und deren Nachkommen wurden parallel zu den Nachkommen aus den Immunisierungsgruppen behandelt. Achtundzwanzig (61%) der sechsundvierzig eingeschlossenen NOD Weibchen warfen 235 Nachkommen, davon waren 113 weiblich und 122 männlich (Abb. 1).

Die Trennung aller Jungtiere von ihren Muttertieren erfolgte mit vier Lebenswochen. Um die Untersuchungsgruppe nicht zu groß werden zu lassen, wurden nur die weiblichen Nachkommen engmaschig weiter untersucht. Ihnen wurde mit vier und mit zehn Lebenswochen Blut entnommen (siehe 2.1.1.7). In allen gesammelten Blutseren der Mutter- und Jungtiere wurden mittels Radioliganden-Bindungsassay (RBA) die IgG-spezifischen IAA bzw. die durch die Impfungen induzierten Insulinantikörper (IA) gemessen (siehe 2.2.1). Nach sechsunddreißig Lebenswochen ohne Diabetesmanifestation endete bei allen Mäusen dieser Untersuchung der Beobachtungszeitraum (siehe 2.1.1.8).

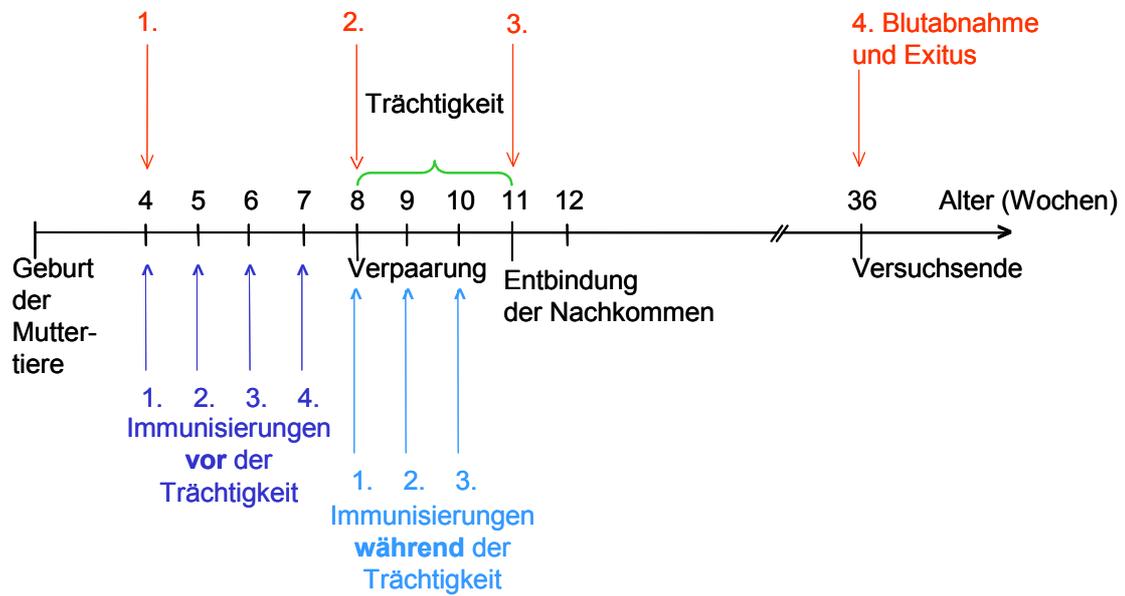
Abb. 1: Aufteilung der NOD Muttertiere in die Untersuchungsgruppen im Rahmen der Analyse der transplazentären Übertragbarkeit von Diabetesprotektion



Tab. 2: Immunisierungslösungen und Behandlungszeitpunkte der NOD Muttertiere für die Analyse der transplazentären Übertragbarkeit von Diabetesprotektion

♀ NOD (n)	Therapie	Zeitpunkte der Immunisierungen
1A 9	3 IE Insulin (3,47 mg/ml) + 100µl IFA	4., 5., 6. und 7. Lebenswoche
1B 8	3 IE Insulin (3,47 mg/ml) + 100µl IFA	1., 2. und 3. Woche der Trächtigkeit
1C 4	30µl Glucagon (3,47 mg/ml) + 100µl IFA	4., 5., 6. und 7. Lebenswoche
1D 4	30µl Glucagon (3,47 mg/ml) + 100µl IFA	1., 2. und 3. Woche der Trächtigkeit
1E 4	30µl NaCl + 100µl IFA	4., 5., 6. und 7. Lebenswoche
1F 4	30µl NaCl + 100µl IFA	1., 2. und 3. Woche der Trächtigkeit
1G 13	keine	

Abb. 2: Behandlungsplan der NOD Muttertiere für die Analyse der transplazentären Übertragbarkeit von Diabetesprotektion



2.1.1.2 Behandlung mit Mucin über das Trinkwasser

Um den täglichen Trinkwasserbedarf von weiblichen NOD Mäusen der verwendeten Kolonie zu bestimmen, wurde über zehn Tage die von den Tieren verbrauchte Leitungswassermenge gemessen und zwar mit Messzylindern täglich zur gleichen Uhrzeit. Das Trinkwasservolumen wurde in drei Tierkäfigen auf 300 ml eingestellt und am nächsten Tag die verbliebene Menge ermittelt. Die verbrauchte Menge wurde durch die Mäuseanzahl im jeweiligen Käfig geteilt und damit die mittlere Trinkwassermenge pro Maus und pro Tag berechnet (Tab. 3). Mögliche Wasserverluste durch das Ein- und Aushängen der Trinkflaschen in die Käfiggitter sind in den berechneten Mengen enthalten.

Tab. 3: Ermittlung der durchschnittlichen Trinkmenge pro weiblicher NOD Maus pro Tag:

Tiere pro Käfig (n)	Alter (Wochen)	Durchschnittliche Trinkmenge pro Tier und Tag (ml)					
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5-8	Tag 8-10
3	36	4,7	4,3	5,3	3,0	4,4	4,5
4	6	6,3	6,5	6,3	4,8	6,5	7,1
8	6	6,0	5,5	5,5	4,1	6,0	5,9

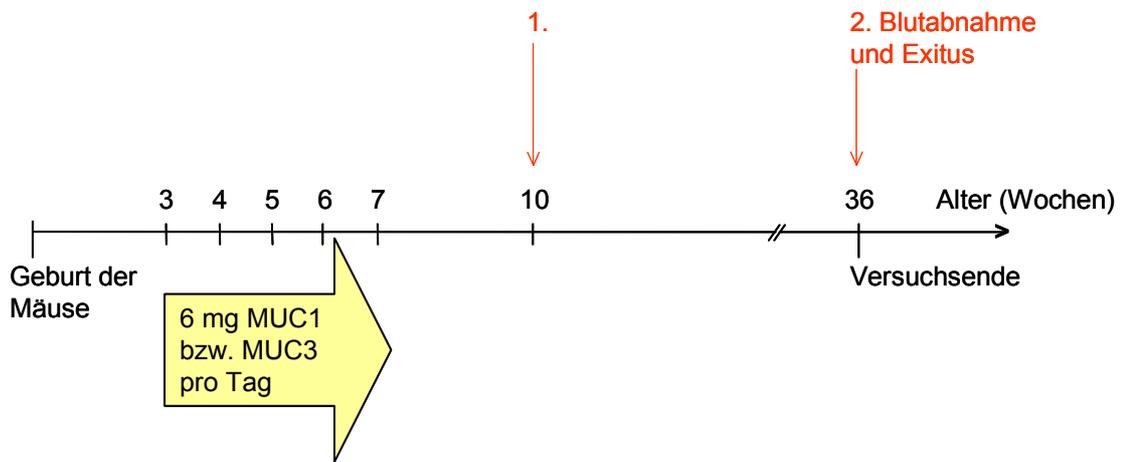
⇒ Trinkmenge pro NOD Weibchen (arithmetisches Mittel): **5,4 ml pro Tag**

Folglich wurden aufgerundete 6 ml Leitungswasser, über normale Trinkwasserflaschen angeboten, als täglich notwendiges Trinkwasservolumen für weibliche NOD Mäuse unserer Kolonie geschlussfolgert und als Grundlage für Berechnungen von Wirkstoffkonzentrationen, die über das Trinkwasser verabreicht werden sollten, genutzt.

Nach der Entwöhnung von den Muttertieren mit drei Lebenswochen wurden drei Untersuchungsgruppen mit weiblichen NOD Mäusen besetzt. In Gruppe 2A (n = 11) wurden die Tiere für dreißig Tage nach der Entwöhnung (vierte bis etwas mehr als siebte Lebenswoche) täglich mit 6 mg Mucin 1 (MUC1, Mucin Typ I, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und in Gruppe 2B (n = 11) mit 6 mg Mucin 3 (MUC3, Mucin Typ III, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) behandelt. Von dem Bedarf von 6 ml Trinkwasser pro Tag ausgehend, wurden die Mucine in der Konzentration 1 mg/ml in Leitungswasser gelöst und verabreicht (Abb. 3). In einer dritten Gruppe 2C (n = 13) wurden unbehandelte Kontrolltiere nachverfolgt.

In dieser Studie erfolgte in allen drei Gruppen eine Blutabnahme bei zehn Lebenswochen und eine weitere bei Diabetesmanifestation bzw. am Versuchsende (siehe 2.1.1.7 und 2.1.1.8). In diesen Blutproben wurden die murinen IAA mittels RBA gemessen (siehe 2.2.1). Darüber hinaus wurden die Tiere nicht behandelt und die maximale Nachbeobachtungszeit betrug sechsunddreißig Lebenswochen.

Abb. 3: Behandlungsplan für weibliche NOD Mäuse im Rahmen der Mucintherapie



2.1.1.3 Glutenfreie Nahrung über verschiedene Zeiträume und glutenfreie Nahrung mit dem Zusatz von Gliadin

In enger Kooperation mit Herrn Dr. Madry von der Gesellschaft für Tierernährung Altromin war es möglich durch Modifikationen der Standardnahrung Altromin 1324 für Ratten und Mäuse gewünschte Eigenschaften verschiedener Nahrungen zu erreichen. Glutenfreies Futter wurde hergestellt, indem alle glutenhaltigen Inhaltsstoffe (Weizen- und Gerstenkomponenten) durch Maisstärke als Kohlenhydratquelle und Geflügelfleischmehl als Proteinquelle ersetzt wurden. Eine glutenfreie Nahrung plus Gliadinzusatz wurde hergestellt, indem der glutenfreien Nahrung 40 g Gliadin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) pro kg Futter zugemischt und für den Nährstoffausgleich dafür 3,7% Maisstärke und 0,3% Geflügelfleischmehl entzogen wurden. Grundlage für den 4%igen Gliadinzusatz war die Information vom Institut für Getreidewirtschaft in Detmold (mündliche Auskunft von Herrn Dr. Madry), dass Weizen einen Glutengehalt von 27-28% hat. Der Gliadinanteil des Glutens wurde mit 41,6% beschrieben (Osborne 1907). Daraus wurde der Gliadiningehalt im Weizen mit 11,7% kalkuliert. Die Standardnahrung Altromin 1324 enthält 32% Weizenanteil (mündliche Auskunft von Herrn Dr. Madry). Damit ließ sich der Gliadiningehalt im Standardfutter 1324 mit 3,7% Gliadin ableiten. Schlussfolgernd wurde ein glutenfreies Futter mit gerundeten 4% Gliadinzusatz hergestellt. Allgemeines Ziel aller Futtervarianten waren möglichst vergleichbare Nährstoffgehalte (Tab. 4). Alle Futtervarianten standen den Mäusen ad libitum zur Verfügung.

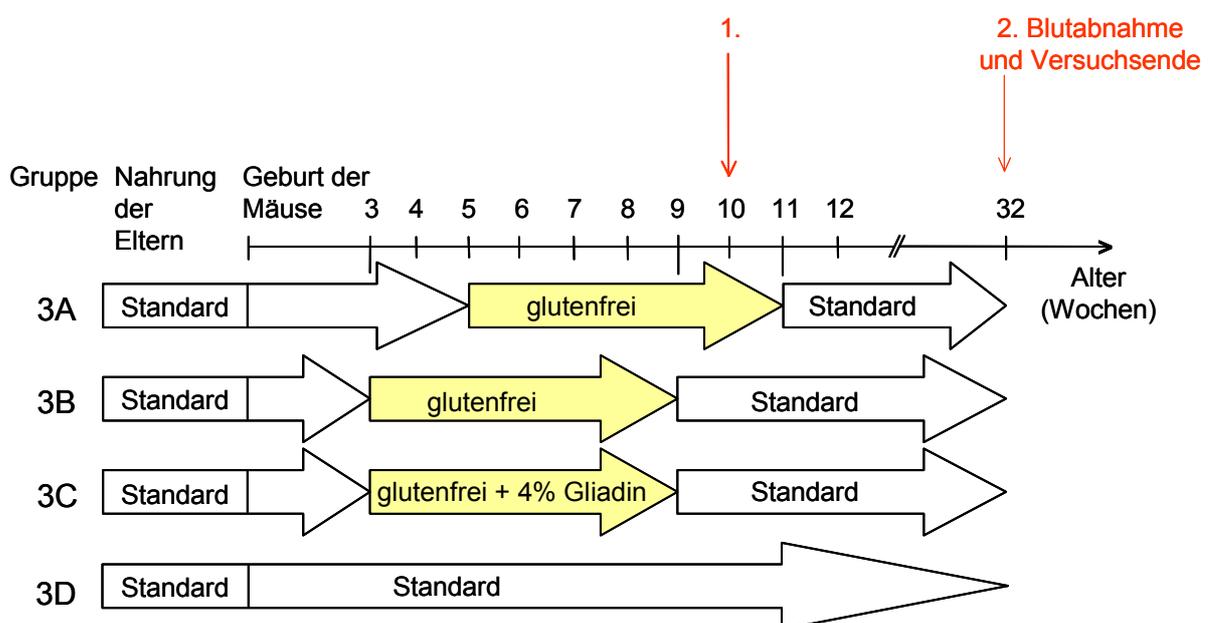
Tab. 4: Nährstoffzusammensetzungen der verwendeten Mäusenahrungen:

Futter	glutenfrei	glutenfrei plus 4% Gliadin	Standard
Energie (kcal/kg)	3151	3005	2474
Protein (g/kg)	187	185	186
Kohlenhydrate (g/kg)	511	478	371
Fett (g/kg)	39	39	38

Diese Studie gliedert sich in vier Untersuchungsgruppen mit drei Wochen alten weiblichen NOD Mäusen. Alle Muttertiere dieser Versuchsmäuse wurden während Verpaarung, Trächtigkeit und Stillzeit mit Standardnahrung gefüttert. Die Mäuse in Gruppe 3A (n = 12) bekamen nach der Entwöhnung zwei weitere Wochen die Standardnahrung (vierte und fünfte Lebenswoche) und anschließend für sechs Wochen (sechste bis Anfang zwölfte Lebenswoche) glutenfreies Futter. In Gruppe 3B (n = 12) wurde das glutenfreie Futter für sechs Wochen im Zeitraum direkt nach der Entwöhnung (vierte bis Anfang zehnte Lebenswoche) verabreicht. Im gleichen Zeitintervall wurden die Mäuse der Gruppe 3C (n = 12) mit glutenfreiem Futter plus 4% Gliadinzusatz gefüttert. Über die genannten Zeiträume hinaus bekamen alle Tiere Standardnahrung angeboten. Als unbehandelte Kontrollgruppe diente die Gruppe 3D (n = 13), die lebenslang Standardnahrung bekam (Abb. 4).

Den Mäusen wurde mit zehn Lebenswochen Blut entnommen (siehe 2.1.1.7) und der Untersuchungszeitraum war auf zweiunddreißig Lebenswochen begrenzt. Bei Exitus, am Versuchsende oder bei vorzeitiger Diabetesmanifestation, wurde zusätzlich Blut gesammelt (siehe 2.1.1.8, Abb. 4). In den Blutproben bei zehn Lebenswochen wurden die IAA-Titer mittels RBA gemessen (siehe 2.2.1) und in den Proben bei zehn Lebenswochen und bei Exitus Anti-Gliadinantikörper mit einem ELISA-Verfahren detektiert (siehe 2.2.4).

Abb. 4: Behandlungsplan der weiblichen NOD Mäuse für die Untersuchungen des Einflusses glutenfreier Nahrung und glutenfreier Nahrung plus Gliadin auf Autoimmundiabetes



2.1.1.4 Therapie mit Histamin-1- und Histamin-2-Rezeptor-Antagonisten über das Trinkwasser

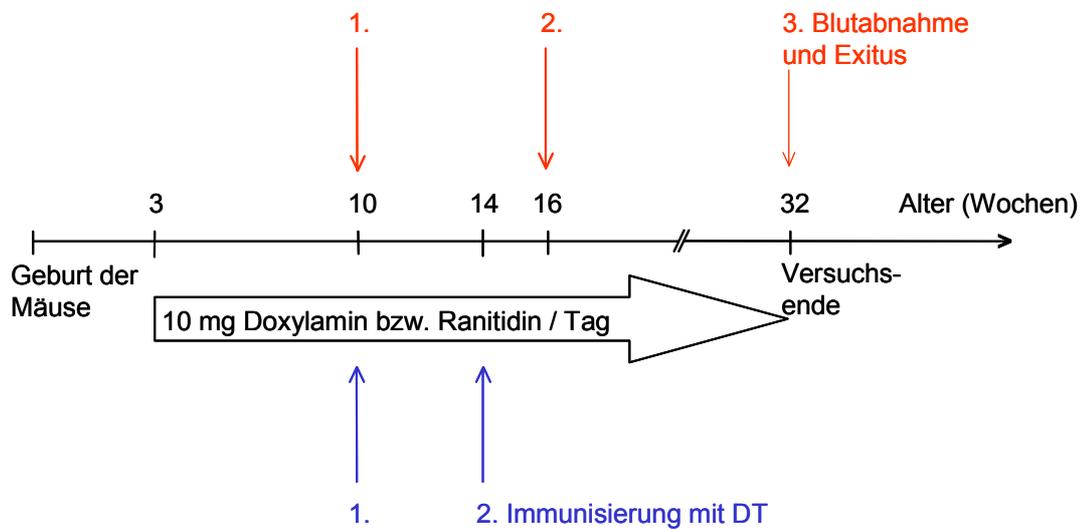
Für diesen Therapieansatz wurden der H1R-Antagonist Doxylamin (Doxylamine Succinate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und der H2R-Antagonist Ranitidin (Ranitidine Hydrochloride, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) verwendet.

Weibliche NOD Mäuse wurden im Alter von drei Lebenswochen auf vier Untersuchungsgruppen aufgeteilt. Die Tiere der Gruppe 4A (n = 11) wurden mit 10 mg Doxylamin behandelt und die Tiere der Gruppe 4B (n = 10) mit 10 mg Ranitidin pro Tag. Die Substanzen wurden in der Konzentration 10 mg / 6 ml Leitungswasser (siehe 2.1.1.2) gelöst und den Mäusen lebenslang verabreicht. Zusätzlich gab es zwei Gruppen, die keine Wirkstoffe zugeführt bekamen: 4C (n = 11) und 4D (n = 10, Abb. 5).

Um neben den autoimmunen IAA einen zusätzlichen Marker für die Analyse der Immunantwort nach HR-Blockierung zu induzieren wurden alle Tiere der Gruppen 4A, 4B und 4C mit zehn und vierzehn Lebenswochen mit einem Diphtherie-Tetanus-Toxoid subkutan immunisiert (Abb. 5). Das an Aluminiumhydroxid adsorbierte Diphtherie-Tetanus-Toxoid (DT-Impfstoff Mérieux für Kinder; Aventis Pasteur MSD) wurde 1:22,5 mit NaCl (B. Braun Melsungen AG) verdünnt, wie bereits beschrieben (Koczwara 2003). 125 µl dieser Verdünnung wurden den Mäusen pro Immunisierung subkutan injiziert, zur besseren Verteilung durch zwei Einstiche in die Leistengegend. Auf diese Weise wurden jeweils 0,45 IE Tetanus-Toxoid und 0,34 IE Diphtherie-Toxoid verabreicht.

Allen Mäusen wurde bei zehn und bei sechzehn Lebenswochen Blut abgenommen (siehe 2.1.1.7). Sie wurden zweiunddreißig Wochen nachverfolgt und bei vorzeitiger Diabetesmanifestation oder am Versuchsende getötet (siehe 2.1.1.8, Abb. 5). Antikörper (siehe 2.2.1) und deren Subklassen (siehe 2.2.2) gegen das Autoantigen Insulin wurden nur in den bei zehn Lebenswochen gesammelten Blutproben mittels RBA gemessen. In den Proben bei zehn Lebenswochen (vor der ersten Immunisierung) und bei sechzehn Lebenswochen (nach den Immunisierungen) wurden die induzierten Antikörpersubklassen gegen Tetanus-Toxoid mittels ELISA (siehe 2.2.5) detektiert. In diesem Projekt wurden die bei Exitus gesammelten und in flüssigem Stickstoff gelagerten Milzzellen genutzt (siehe 2.1.1.8) um die Zytokinantworten der Zellen nach Tetanus-Toxoid-Stimulation mit Elispot-Tests zu analysieren (siehe 2.2.6).

Abb. 5: Behandlungsplan für weibliche NOD Mäuse mit Histaminrezeptoren-Antagonisten



2.1.1.5 Unbehandelte weibliche Mäuse zur Darstellung der natürlichen Diabetes-Inzidenz und Insulinautoantikörper-Prävalenz in der verwendeten NOD Kolonie

Um Veränderungen in der Diabetesentwicklung, unter anderem beruhend auf der ständigen Inzucht in der benutzten, relativ kleinen NOD Kolonie zu erkennen und gegebenenfalls eingreifen zu können, wird aus jedem Wurf ausnahmslos ein Weibchen in eine ständig laufende Kontrollgruppe eingeschlossen. Diese Tiere bleiben lebenslang unbehandelt. Ihnen wird bei zehn Lebenswochen Blut abgenommen (siehe 2.1.1.7) und ihre Beobachtungszeit beträgt sechsundfünfzig Lebenswochen (siehe 2.1.1.8). Diese Tiergruppe repräsentiert die natürliche Diabetes-Inzidenz und IAA-Prävalenz der NOD Kolonie, die für alle Untersuchungen dieser Arbeit benutzt wurde. Ihre Daten dienen als Kontrolle für sämtliche Interventionsgruppen. Daher wurden die IAA dieser Tiere im Rahmen dieser Arbeit gemessen und deren Diabetes-Inzidenz und Antikörper-Prävalenz bei zehn Lebenswochen und bei Exitus für den Zeitraum der hier durchgeführten Untersuchungen kalkuliert.

2.1.1.6 Behandlung und Nachverfolgung der weiblichen NOD Mäuse in allen Behandlungs- und Kontrollgruppen

Ab der zehnten Lebenswoche wurden alle NOD Mäuse der Kolonie, sowohl in den Untersuchungsgruppen als auch in der ständigen Kontrollgruppe, dreimal wöchentlich mit Glu-

cosemesstreifen (Gluketur Test, Boehringer Mannheim) auf Glucoseausscheidung im Urin kontrolliert. Zwei aufeinander folgend positive Messergebnisse wurden als Diagnose eines manifesten Diabetes definiert. Alle Tiere wurden entweder bei manifestem Diabetes oder am Ende des jeweiligen Untersuchungszeitraums getötet und deren Milz, Pankreas und Blut entnommen (2.1.1.8). Mit einem Glucometer Elite (Bayer Diagnostics GmbH) wurden Blutzuckermessungen durchgeführt um das Vorliegen einer diabetischen Stoffwechsellage zusätzlich zu bestätigen bzw. auszuschließen. Die Pankreata der Mäuse wurden histologisch in Paraffin fixiert und später mit Haemotoxylin und Eosin gefärbt. In Schnitten davon sind in weiterführenden Untersuchungen Stadien der Insulitis auswertbar. Aus den Milzen wurden die Zellen separiert und für zukünftige Bestimmungen der Zytokinprofile in flüssigem Stickstoff gelagert (2.1.1.8).

2.1.1.7 Durchführung von Blutabnahmen an lebenden Mäusen

Die betreffende NOD Maus wird direkt vor der Blutabnahme in einem Behälter mit Diethylether (Fischer) betäubt. Mit Hilfe von Schmelzpunktbestimmungsröhrchen (\varnothing 0,8 mm; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wird die Augenvene (Plexus venorum retroorbitalis) der Tiere punktiert und etwa 300 μ l Mäuseblut abgenommen. Das Blut wird für zehn Minuten bei 9000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert (Centrifuge 5415 C, Eppendorf). Anschließend wird das Serum abpipettiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.1.1.8 Exitus bei Diabetesmanifestation oder am Versuchsende mit Blut- und Organentnahme und Herstellung von Einzelzellpräparationen aus den NOD Milzen

Die betreffende NOD Maus wird in einer Schachtel mit Trockeneis getötet. Der Mäusekörper wird mit 80%igem Ethanol abgespült und auf dem Rücken liegend auf ein Korkbrett fixiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgen in einer Sterilbank (LaminAir[®] HBB 2472, Heraeus), wobei ausschließlich mit sterilem Material gearbeitet wird. Die äußere Haut wird mit einer Schere abpräpariert, so dass die Bauchmuskulatur frei liegt. Mit einer feinen Schere wird die Bauchhöhle eröffnet und der Darm zur rechten Seite gelegt. Aus der freigelegten Vena Cava wird mit einer Insulinspritze (Terumo) das Blut abgenommen. Der Darm wird auf die linke Seite verlagert und unter der hochgeklappten Leber erscheinen Pankreas und Milz. Da die beiden Organe eng miteinander verbunden sind, werden sie gemeinsam mit einer Pinzette ergriffen und aus den umgebenden Geweben herausgelöst. Das Pankreas wird von der Milz abgetrennt, in eine Einbettkassette (universal; Lan-

genbrinck) eingeklemmt und in 4%ige Formaldehydlösung (neutral gepuffert; Fa. SAV) gegeben. Später werden die Pankreata in die Pathologie im Krankenhaus München-Schwabing überführt und dort in Paraffin eingebettet. Auf diese Weise dauerhaft konserviert, können jederzeit Organschnitte angefertigt und daran weitere Untersuchungen durchgeführt werden, die nicht Bestandteil dieser Arbeit sind.

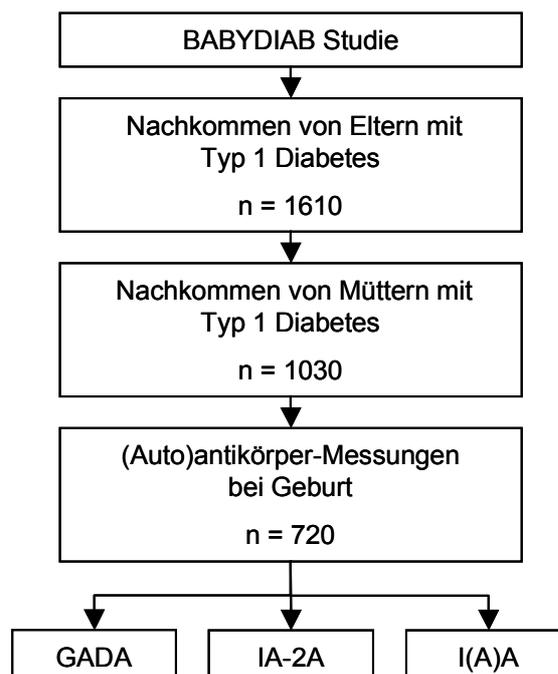
In eine Petrischale (100 × 15 mm, Falcon) werden 3 ml Kulturmedium [RPMI-1640 Medium (mit Glutamax I, Invitrogen), 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 U/ml Pen und 10000 µg/ml Strep; Invitrogen), 5% FKS (FCS-Gold, hitzeinaktiviert; PAA Laboratories GmbH); nach dem Mischen durch 0,2 µm Filter sterilfiltriert] vorgelegt. Durch ein feinmaschiges Zellkultursieb (Netzgröße 40 µm; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wird die entnommene Milz mit Hilfe eines Stempels in das Kulturmedium passiert. Die resultierende Zellsuspension wird in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml; Falcon) überführt. Mit weiteren 3 ml Kulturmedium werden Stempel, Sieb und Petrischale nachgewaschen, das Medium zur Zellsuspension addiert und für etwa fünf Minuten stehen gelassen, damit größere Gewebefragmente sedimentieren können. Der Mediumüberstand, in dem die einzelnen Milzzellen enthalten sind, wird mit einer Pipette in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und die groben Gewebefragmente werden verworfen. Der Überstand wird sieben Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert (GPKR Centrifuge, Beckman Coulter).

Das nach der Zentrifugation entstandene Zellpellet wird in 1 ml FKS resuspendiert. In wässrigen Lösungen eingefrorene Zellen werden durch die Bildung von Eiskristallen zerstört. Fügt man der Einfrierlösung 20% DMSO zu und friert die Zellsuspensionen stufenweise ein, unterbleibt die Bildung von großen Kristallen und die Zellen bleiben erhalten. DMSO wirkt bei Temperaturen über dem Gefrierpunkt aber toxisch auf die Zellen, daher müssen Zellsuspensionen, die DMSO enthalten, immer sehr kalt gehalten und die folgenden Schritte auf Eis durchgeführt werden. Der Zellsuspension in FKS wird 1 ml Einfriermedium [RPMI-1640 Medium, 1% Pen/Strep-Lösung, 20% DMSO (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)] zugefügt, die Flüssigkeiten kurz gemischt und jeweils 1 ml in zwei Einfrieröhrchen (Cryo-Röhrchen 1,5 ml; Nalge Nunc) verteilt. Über Nacht werden die Zellen bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag in einen Tank mit flüssigem Stickstoff (-196°C) überführt. In dieser Form gelagert behalten die Zellen über mehrere Jahre ihre Lebensfähigkeit.

2.1.2 Diabetesrisiko bei Kindern von Müttern mit Typ 1 Diabetes in Abhängigkeit der transplazentär übertragenen Inselantikörper

Für die Untersuchungen zur Klärung der Frage, ob der Transfer mütterlicher Insel-(auto)antikörper zu einem erhöhten Diabetesrisiko bei den Kindern von Müttern mit Typ 1 Diabetes führt, konnte auf die vorhandenen Proben des Kollektivs der deutschen BABYDIAB Studie zugegriffen werden. Diese Studie verfolgt prospektiv Kinder von Vätern und/oder Müttern mit Typ 1 Diabetes. Beginnend mit der ersten Blutprobe aus der Nabelschnur bei Geburt werden von den Kindern bei neun Lebensmonaten, bei zwei, fünf, acht und elf Lebensjahren Blutproben gesammelt und individuelle Umweltfaktoren per Fragebogenerhebung erfasst (Ziegler 1999). Die Rekrutierung für die Studie begann im Juli 1989 und endete im November 2000. Insgesamt 1610 Kinder von mindestens einem Elternteil mit Typ 1 Diabetes wurden bei ihrer Geburt in die Studie eingeschlossen und haben am Nachverfolgungstermin zum neunten Lebensmonat teilgenommen. Diese Zahl beinhaltet 1030 Kinder von Müttern mit Typ 1 Diabetes. Bei 720 von diesen 1030 Kindern waren Nabelschnurblutproben in ausreichender Menge vorhanden, um im Rahmen dieser Arbeit die drei Diabetes-assoziierten Antikörper I(A)A (siehe 2.2.1), GADA und IA-2A (siehe 2.2.3) zu messen. Bei den übrigen 290 Kindern war das Volumen des Nabelschnurblutes zu gering für die Messung aller drei Antikörper.

Abb. 6: Eingeschlossene und auf den Antikörperstatus bei Geburt untersuchte Kinder von Müttern mit Typ 1 Diabetes aus der BABYDIAB Studie



In allen während der Nachverfolgungszeit gesammelten Blutproben wurden ebenfalls die IAA, GADA und IA-2A bestimmt. Die mittlere Nachverfolgungszeit der 720 Kinder bis zum letzten Nachverfolgungstermin beträgt zum Zeitpunkt dieser Studie 6,5 Jahre (0,75 bis 12,5 Jahre) mit einer Gesamtsumme von 9773 Untersuchungsjahren. Bei 602 von den 720 Kindern, bei denen alle drei Antikörper im Nabelschnurblut messbar waren, wurden Bestimmungen der HLA DR- und DQ-Genotypen durchgeführt (siehe 2.2.9). Die mögliche Diagnose von Typ 1 Diabetes wurde bei den Kindern gemäß den WHO-Kriterien vorgenommen. Alle Eltern haben schriftlich ihr Einverständnis für die Teilnahme an der BABYDIAB Studie gegeben und die bayrische Landesärztekammer hat die Studiendurchführung geprüft und genehmigt (Nummer 95357).

In diesem Untersuchungsteil wurde neben der Entwicklung von Typ 1 Diabetes auch die Entwicklung von Inselautoimmunität während der Nachverfolgungszeit als Studienendpunkt analysiert. Positive Inselautoantikörper, welche die Kinder gegebenenfalls im Verlauf ihrer Kindheit entwickeln, wurden definiert als: positive Antikörpermengen zu mindestens zwei Inselantigenen (Insulin, GAD oder IA-2), welche in mindestens zwei aufeinander folgenden Blutproben nachweisbar sind. Diese Kinder werden als Kinder mit persistierenden multiplen Inselautoantikörpern bezeichnet. Frühere Auswertungen der BABYDIAB Studie zeigten, dass Antikörper gegen ein einzelnes Inselautoantigen nicht mit der Entwicklung von Typ 1 Diabetes assoziiert sind (Ziegler 1999). Daher wurden die Kinder, die nur eine positive Inselautoantikörperart aufwiesen, als Antikörper-negativ eingestuft. Das Alter der Inselautoantikörper-Positivität wurde definiert als: Alter bei der ersten Blutprobe, die mit einem positiven Befund einhergeht. Alle Antikörper-negativen Kinder gehen mit dem Alter bei ihrer letzten Nachverfolgungsuntersuchung in die Analysen ein, die zum Zeitpunkt der Auswertung vorliegt.

2.1.3 Orale Supplementierung mit Calcitriol über neun Monate bei erwachsenen Personen mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes

Seit Januar 2001 wird eine offene kontrollierte Pilotstudie mit Calcitriol bei Personen mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes am Institut für Diabetesforschung in München durchgeführt. Personen im Alter von siebzehn bis einschließlich neununddreißig Jahren mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes mellitus kommen für die Studie in Betracht. Für den Studieneinschluss muss mindestens einer der Diabetes-assoziierten Antikörper positiv nachweisbar sein um sicher zu stellen, dass nur Personen mit Autoimmundiabetes behandelt

werden. Ferner muss ein Tetanus-Impfschutz vorliegen. Ausschlusskriterien sind Schwangerschaft oder Schwangerschaftswunsch, schwere oder chronische Erkrankungen, Unverträglichkeit gegen Tetanus-Toxoid, Erkrankungen der Nieren (Nierensteine) oder Nebenschilddrüsen (Hyper- und Hypoparathyreodismus) bzw. des Calcium-Stoffwechsels, Herzrhythmusstörungen und psychiatrische Erkrankungen. Als Abbruchkriterien der Studie gelten eine Unverträglichkeit der Calcitriol-Einnahme und jegliche unerwünschte Nebenwirkungen sowie eine Schwangerschaft. In die Studie sollen insgesamt sechszwanzig behandelte und dreizehn Kontrollpersonen (Verhältnis 2:1) eingeschlossen werden.

Die Behandlung besteht aus einer täglichen oralen Einnahme von 0,25 µg Calcitriol (Rocaltrol, Hoffmann-La Roche AG) über einen Zeitraum von neun Monaten. Folgend schließt sich eine Nachbeobachtungszeit von weiteren neun Monaten an. Der Diabetes aller eingeschlossenen Personen wird mit einer intensiven Insulintherapie (ICT) mit dem Ziel einer einheitlich guten, normnahen Blutzuckereinstellung behandelt. Im achtzehn Monate andauernden Studienzeitraum werden elf Visiten mit den Studienpersonen durchgeführt. Zu allen elf Terminen werden bei den mit Calcitriol behandelten Personen Safety-Parameter bestimmt (siehe 2.2.8). Falls die Normwerte dieser Parameter nicht eingehalten werden sollten, wird die Calcitriol-Zufuhr gesenkt oder beendet. Ergänzend werden Nierensonographien bei Studieneinschluss, nach neun und achtzehn Monaten durchgeführt um Veränderungen an den Nieren vollständig ausschließen zu können. In der Kontrollgruppe werden diese Safety-Parameter nicht gemessen. In beiden Studiengruppen wird parallel Blut für die Messung von Diabetes-assoziierten Antikörpern (ICA, IAA, GADA und IA-2A), der C-Peptidausschüttung, der HbA_{1C}-Werte, für Elispot-Analysen und eine DNA-Bestimmung abgenommen (Tab. 5 und 6). Allen Personen wird bei sechs Monaten nach Studieneinschluss eine Tetanus-Auffrischung (Tetanol[®] pur, 40 IE Tetanus-Toxoid/0,5 ml, Chiron Behring GmbH&Co) geimpft. Durch diese Impfung wird das Immunsystem der Studienpersonen mit Tetanus-Toxoid (TT) als Antigen konfrontiert. Folglich werden Antikörper und reaktive T-Lymphozyten gegen TT gebildet. Durch diese Impfung wird eine spätere Analyse der Zytokinausschüttungen von peripheren Blutlymphozyten mit Elispot-Methoden möglich, da diese Lymphozyten bei einer Stimulation mit TT das Antigen erkennen und darauf mit Zytokinausschüttungen reagieren.

Als Zielkriterien und Erfolgsparameter der Studie dienen einerseits die C-Peptidmengen am Studienende, der tägliche Insulinbedarf pro kg Körpergewicht (KG), die Diabeteseinstellung, repräsentiert durch die HbA_{1C}-Werte und das Einhalten der Safety-Parameter, andererseits aber auch der Nachweis eines immunologischen Effektes von Calcitriol, der

auf der Ebene der Diabetes-assoziierten Antikörper, der Antikörpersubklassen und durch Messungen der Zytokinprofile als Antwort auf die Tetanus-Impfungen nachgewiesen werden soll.

Tab. 5: Studienzeitplan für die mit Calcitriol behandelte Gruppe:

Untersuchungszeitpunkt nach X Studienmonaten	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	12	18
Diabetes-assoziierte Antikörper (Serum)	x			x			x			x	x	x
1, 25 Vitamin D (Serum)	x			x			x			x		x
Osteocalcin (Serum)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Calcium (Plasma)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Alkalische Phosphatase (Plasma)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Phosphat (Plasma)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Creatinin (Plasma)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Parathormon (Plasma)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
C-Peptid (0, 30, 60, 90 und 120 Min.) (Serum)		x								x		x
ELISPOT (Heparinblut)	x			x			x			x	x	x
DNA (EDTA-Blut)	x											
HbA _{1C} (EDTA-Blut)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Calcium (Urin)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Nierensonographie	x									x		x
Kontrolle der Blutzucker-Einstellung	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Vitamin D Interventionszeitraum (oral)	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
Tetanusauffrischung (i. m.)							x					

Tab. 6: Studienzeitplan für die Kontrollgruppe:

Untersuchungszeitpunkt nach X Studienmonaten	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	12	18
Diabetes-assoziierte Antikörper (Serum)	x			x			x			x	x	x
1, 25 Vitamin D (Serum)	x			x			x			x		x
C-Peptid (0, 30, 60, 90 und 120 Min.) (Serum)		x								x		x
ELISPOT (Heparinblut)	x			x			x			x	x	x
DNA (EDTA-Blut)	x											
HbA _{1C} (EDTA-Blut)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Kontrolle der Blutzucker-Einstellung	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Tetanusauffrischung (i. m.)							x					

Bisher wurden insgesamt dreiunddreißig Personen in diese Studie eingeschlossen. Im Rahmen dieser Arbeit soll eine Zwischenauswertung durchgeführt werden. Zu diesem Zeitpunkt haben vier behandelte und vier Kontrollpersonen die achtzehn Monate dauernde Studie vollständig durchlaufen. Zusätzliche elf behandelte Personen und zwei Kontrollpersonen haben die neunte Visite absolviert. In die Zwischenauswertung sollen die vorliegenden Proben von allen Personen, die mindestens die neunte Visite absolviert haben (zusammen

fünfzehn behandelte und sechs unbehandelte Personen, Tab. 7), eingeschlossen und deren I(A)A (siehe 2.2.1), die I(A)A-Subklassen (siehe 2.2.2) und C-Peptidmengen (siehe 2.2.7) im RBA gemessen werden. Zusätzlich sollen die vorliegenden Safety-Parameter-Ergebnisse (siehe 2.2.8), die Daten des jeweiligen Insulinbedarfs und die HbA_{1C}-Werte analysiert werden.

Tab. 7: Im Rahmen der Zwischenauswertung der Calcitriol-Therapie untersuchte Personen mit ihren studienrelevanten Merkmalen bei Diabetesdiagnose und Studienbeginn

♀ oder ♂	Studiendauer bei Auswertung (Monate)	bei Diabetesdiagnose				bei Studienbeginn	
		Symptombdauer (Wochen)	Ketoazi- dase	GADA	IA-2A	Alter (Jahre)	Diabetes- dauer (Tage)
Mit Calcitriol behandelte Studienpersonen:							
1	18	8	nein	+	-	31,4	8
2	9	12	nein	+	+	24,4	13
3	9	8	ja	+	-	31,1	11
4	9	3	nein	+	-	30,9	12
5	18	2	nein	+	-	33,6	6
6	18	n.b.	ja	+	-	21,4	8
7	9	0	nein	+	+	26,2	13
8	9	n.b.	n.b.	-	+	18,3	n.b.
9	9	4	nein	+	+	19,2	12
10	9	1	nein	+	+	23,7	10
11	9	n.b.	n.b.	+	+	19,8	n.b.
12	18	n.b.	n.b.	+	+	35,4	7
13	9	2	nein	-	+	32,6	13
14	9	0	nein	+	-	39,2	12
15	9	20	nein	+	+	17,7	4
Median		3				26,2	11
8 ♀	4 mal 18	von 0 bis 20	2 ja	13 +	9 +	17,7 -	4 bis 13
7 ♂	11 mal 9		10 nein	2 -	6 -	39,2	
Unbehandelte Studienkontrollpersonen:							
16	18	36	nein	+	-	36,6	
17	9	3	ja	+	-	33,6	
18	18	5	nein	+	-	38,0	
19	18	n.b.	n.b.	+	-	35,5	
20	18	6	nein	+	-	39,9	
21	9	n.b.	n.b.	+	+	24,2	
Median		5,5				36,1	
2 ♀	4 mal 18	von 3 bis 36	1 ja	6 +	5 -	24,2 -	
4 ♂	2 mal 9		3 nein	0 -	1 +	39,9	

+ = Antikörper-positiv, - = Antikörper-negativ, n.b. = nicht bekannt

2.2 Beschreibung der angewendeten Messmethoden

2.2.1 Detektion von Insulin(auto)antikörpern in murinen und humanen Seren im Radioliganden-Bindungsassay

Die Bestimmung der I(A)A basiert auf einem RBA (Williams 1997, Naserke 1998), der für Mäuseseren modifiziert wurde (Koczwara 2003). Es handelt sich um einen Protein-A/G-Sepharose-Test, der nur sehr geringe Serummengen benötigt und dessen Sensitivität und Spezifität in den Workshops diabetischer Tiermodelle 2000 (Bonifacio 2001) und 2002 bestätigt wurden. Alle Testschritte werden auf Eis und mit eiskaltem TBT [50 mM Tris (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 1% Tween (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), pH 8,0] durchgeführt. In jedem Testansatz werden zwei murine Standards mit definierten IAA-Mengen und ein IAA-positives und ein IAA-negatives Mäuseserum zur Kontrolle der Testfunktionalität mitgemessen.

Pro Probe werden jeweils 5 µl unverdünntes murines Serum in vier Rundbodenröhrchen (Kreuzprobenröhrchen 75/12 mm aus Polystyrol, Peske) pipettiert. Einem Duplikat werden zur Inhibition je 25 µl humanes „kaltes“ Insulin (8 U/ml, Insuman[®] Rapid, Aventis) zugegeben. Dem zweiten Duplikat werden zum Volumenausgleich je 25 µl TBT zugefügt. Die Inhibition blockiert alle insulinspezifischen Bindungsstellen und die in diesem Duplikat gemessene Radioaktivität in Zerfällen pro Minute (cpm) repräsentiert die unspezifische Bindung. Jedem Röhrchen wird 1,5 µl ¹²⁵I-A14 markiertes humanes Insulin (spezifische Aktivität 360 µCi/µg, zirka 22000 cpm/Röhrchen; Aventis) verdünnt in 25 µl TBT zugefügt. Diese Ansätze werden für 72 Stunden bei 4°C inkubiert. Am Vorabend der Weiterbearbeitung werden 2 mg Protein-A-Sepharose (Amersham Pharmacia) bei 4°C in TBT vorgequollen, am nächsten Tag pro Röhrchen mit 6 µl Protein-G-Sepharose (Amersham Pharmacia) gemischt und einmal mit TBT gewaschen. Das Sepharosegemisch (50 µl/Röhrchen) wird den Röhrchen zugefügt und während der anschließenden einstündigen Inkubation bei 4°C auf einem leicht rotierenden Mixer präzipitieren die Antigen-Antikörperkomplexe. Es folgen sechs Waschschrte mit je 1,8 ml TBT und fünf Minuten Zentrifugation bei 4°C und 2100 rpm (CL-GPR Centrifuge, Beckmann Coulter) um das ungebundene ¹²⁵I-Insulin zu entfernen. Zum Absaugen der Überstände wird eine Vakuumpumpe (UNO 004 B, Pfeiffer) benutzt. Anschließend wird die Radioaktivität der Pellets im Radioaktivitätsmessgerät (γ-counter Cobra II, Canberra Packard) bestimmt. Für alle Proben werden von jedem Duplikat die arithmetischen Mittel der gemessenen cpm berechnet. Von den Mittelwerten der

Proben ohne Zugabe von kaltem Insulin wird der Mittelwert derselben Probe mit Zugabe von kaltem Insulin subtrahiert. Auf diese Weise werden die Messwerte um die unspezifische Bindung bereinigt. Sie tragen die Einheit „ Δ cpm“. Um die in verschiedenen Testansätzen bestimmten Messwerte miteinander vergleichbar zu machen werden Indizes nach folgender Formel berechnet: $I(A)A\text{-Index} = (\Delta \text{ cpm Probe} / \Delta \text{ cpm Standard}) \times 100$. Die Grenze für positive Messwerte liegt bei $IAA\text{-Index} \geq 4$ und entspricht der 99sten Perzentile von Messwerten, die in Seren von BALB/c und C57/B6 Mäusen ermittelt wurde.

Die Bestimmung von I(A)A in humanen Seren erfolgt in einem analogen Testverfahren. Hier liegt die obere Grenze für Normalwerte bei $\geq 1,5$ Testunits pro ml (U/ml) und entspricht der 99sten Perzentile von Messwerten, die in Seren von nicht diabetischen Kontrollpersonen ermittelt wurde. Das Testverfahren erreichte 30% Sensitivität und 98% Spezifität im ersten internationalen „Diabetes Autoantibodies Standardization Program Proficiency“ Workshop (DASP). Als Inter-Assay Abweichungskoeffizient wurden 11% ermittelt (Bingley 2003). Alle Serumproben werden kodiert und sind folglich bei der Antikörperbestimmung für die durchführende Person verblindet.

Der RBA wird in allen Schritten ebenso durchgeführt wie die beschriebene Messung von I(A)A in Mäuseseren. Daher werden an dieser Stelle lediglich die Abweichungen im Testablauf aufgezeigt. So werden nur 1,5 mg Protein-A- und 2 μ l Protein-G-Sepharose zugegeben, da sich diese Mengen für die Detektion von humanen I(A)A als ausreichend erwiesen haben. Die Testergebnisse werden auf eine Standardkurve aus elf Verdünnungen von einem I(A)A-positiven Humanserum bezogen, die in jedem Testansatz mitgemessen wird. Sie werden als willkürlich definierte I(A)A-Units (U) angegeben. Die Grundlage für die Berechnung der Standardkurve und der individuellen Proben-I(A)A-Units bilden auch hier die um unspezifische Bindung bereinigten „ Δ cpm“ = Mittelwert des nicht inhibierten Duplikates (cpm) – Mittelwert des inhibierten Duplikates (cpm) von jeder Probe.

2.2.2 Detektion von Insulin(auto)antikörpersubklassen in murinen und humanen Seren im Radioliganden-Bindungsassay

Der von Bonifacio (1999) beschriebene I(A)A-Subklassentest wurde für die Durchführung mit Mäuseseren modifiziert (Koczwara 2003). Es wird ein Testverfahren verwendet, das analog zum RBA für murine I(A)A abläuft (siehe 2.2.1), allerdings werden lediglich 2,5 μ l Mäuseserum pro Röhrchen eingesetzt. Sepharose-Streptavidin-Beads (Streptavidin-Sepharose 4B, Zymed) werden mit biotinierten monoklonalen Anti-Maus-Antikörpern be-

schichtet: Anti-Maus-IgG1 (A 85-1, 0,5 mg/ml, PharMingen), -IgG_{2a}^b (Igh-1b, 0,5 mg/ml, PharMingen), welche die IgG_{2a}-Subklasse von NOD Mäusen detektieren, -IgG_{2b} (R 12-3, 0,5 mg/ml, PharMingen), -IgE (R35-118, 0,5 mg/ml, PharMingen) oder zur Bestimmung von unspezifischen Bindungen mit Anti-humanen-IgE-Antikörpern (0,5 mg/ml, PharMingen). Diese beschichtete Sepharose wird anstelle der Protein-A/G-Sepharosemischung zur Präzipitation der Antigen-Antikörperkomplexe verwendet. Zur Beschichtung werden pro Röhrchen 10 µl Sepharose-Beads dreimal mit eiskaltem PBS [50 mM Phosphatpuffer, 150 mM NaCl, pH 7,4] gewaschen. Anschließend werden jeweils 5 µl der spezifischen biotinierten Anti-Subklassenantikörper hinzugefügt und unter langsamer Rotation bei 4°C über Nacht inkubiert. Über Biotin-Streptavidinbindungen bilden sich Sepharose-Antikörperkomplexe. Am folgenden Tag wird die beschichtete Sepharose einmal mit PBS und zweimal mit TBT gewaschen, in TBT resuspendiert und jedem Röhrchen werden 50 µl dieser Sepharoselösung zugefügt. Alle folgenden Testschritte entsprechen denen, die in 2.2.1 für den Gesamt-I(A)A-Test beschrieben sind.

Für die Bestimmung der IgG_{2a}-, IgG_{2b}- und IgE-Subklassenantikörper werden die murinen Seren unverdünnt eingesetzt, zur Messung der IgG₁-Subklassenantikörper dagegen 1:10 mit TBT verdünnt, da hier sehr große Antikörpermengen zu erwarten sind. Für jede Probe wird die unspezifische Bindung, repräsentiert durch die cpm der humanen IgE-Antikörper, von den cpm der einzelnen Subklassenantikörper subtrahiert. Die resultierenden spezifischen Subklassenantikörpermengen tragen die Einheit „Δ cpm“. Die Δ cpm der IgG₁-I(A)A werden mit zehn multipliziert um sie trotz der zehnfachen Serenverdünnung mit den übrigen Subklassen vergleichbar zu machen. In jedem Test wird eine I(A)A-positive und eine I(A)A-negative murine Serumprobe zur Kontrolle der Testfunktionalität mitgemessen.

Der I(A)A-Subklassentest für humane Seren wurde bereits 1999 beschrieben (Bonifacio 1999). Er wird analog zum RBA für murine I(A)A-Subklassen durchgeführt. An dieser Stelle werden lediglich Abweichungen im Testablauf aufgezeigt. Es werden 5 µl Serum pro Röhrchen eingesetzt und die Sepharose-Streptavidin-Beads werden mit folgenden biotinierten monoklonalen Anti-humanen-Subklassenantikörpern beschichtet: Anti-human-IgG₁ (0,5 mg/ml, PharMingen), -IgG₂ (0,5 mg/ml, PharMingen), -IgG₃ (0,5 mg/ml, Zymed), -IgG₄ (0,5 mg/ml, PharMingen) und zur Bestimmung von unspezifischen Bindungen mit Anti-Ratte-IgM-Antikörpern (0,5 mg/ml, PharMingen). Die so beschichtete Sepharose wird zur Präzipitation der Antigen-Antikörperkomplexe verwendet. Abweichend zur murinen Methodik werden allerdings 10 µl der biotinierten Anti-Subklassenantikörper pro Röhr-

chen verwendet. Für alle Subklassen werden die Seren unverdünnt eingesetzt. Für die humanen I(A)A-Subklassen wird die von einem ml Serum gebundene Menge an Insulin in nU/ml nach folgender Formel berechnet:

(subklassenspezifischer IgG-Messwert (cpm) – probenspezifischer Anti-Ratte-IgM-Messwert [cpm]) / Menge der pro Röhrchen eingesetzten Radioaktivität (cpm) \times 1,159 \times 200 \times 1000 (Bonifacio 1999). Die Grenze für positive Messwerte liegt bei \geq 125 nU/ml.

2.2.3 Detektion von Autoantikörpern gegen GAD und IA-2 in humanen Seren

2.2.3.1 Antigenmarkierung durch Einbau von ^{35}S -Methionin

Die im Institut für Diabetesforschung in München hergestellte cDNA von humanem GAD65- und humanem IA-2i.c.-Antigen wird mit Hilfe des „TNT[®] SP6 Coupled Reticulocyte Lysate Kits“ (Promega) in vitro transkribiert und translatiert. Die radioaktive Markierung erfolgt dabei durch den Einbau von ^{35}S -Methionin (Redivue L- ^{35}S]-Methionin; 18,5 MBq, 500 Ci; Amersham Pharmacia). Dem nach Herstellerangaben vorbereiteten Reaktionsmix werden 6 μl cDNA zugefügt. Nach der Zugabe von 1 μl RNAsin und 10 μl Nuklease-freiem Wasser wird der Ansatz für zwei Stunden bei 30°C im Wärmeblock (Thermostat 5320, Eppendorf) inkubiert. Anschließend wird das Gemisch mit 100 μl TBST [50 mM Tris (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 1% Tween (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 150 mM NaCl, pH 7,4] aufgenommen und das nicht eingebaute freie ^{35}S -Methionin über Massengewichtssäulen (NAP 5 Columns, Sephadex G-25 DNA Grade, Amersham) abgetrennt. 2 μl des aufgereinigten radioaktiv markierten Antigenproteins werden in 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Microscint 40, Packard) pipettiert und die eingebaute Radioaktivität mit einem Betazähler (LKB 1219 Rackbeta Liquid Scintillation Counter) gemessen. Das Antigen wird bei -20°C gelagert.

2.2.3.2 Detektion von Antikörpern gegen die Autoantigene GAD und IA-2 im Radioliganden-Bindungsassay

Für die Bestimmungen der GADA werden die von Grubin (1994) und für die IA-2A die von Gianani (1995) beschriebenen analogen RBA verwendet. Alle Testschritte werden auf Eis und mit eiskaltem TBST durchgeführt. Auch diese beiden Testverfahren wurden in den internationalen „Diabetes Autoantibodies Standardization Program Proficiency“ Workshops (DASP) analysiert. Die Ergebnisse sind Sensitivitäten und Spezifitäten von 80% und 94%

für die GADA- und 58% und 100% für die IA-2A-Bestimmung (Bingley 2003). Alle Messungen werden mit kodierten und für den Messenden verblindeten Proben durchgeführt.

Von jedem Testserum werden Duplikate bestimmt. Je 2 μl Serum und 25 μl TBST werden mit 20000 cpm des jeweiligen ^{35}S -markierten Antigens in Deepwell-Platten (Polystyrol, 1 ml/Well, 96 Wells, Beckman Coulter) pipettiert und gut gemischt. Diese Ansätze werden bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden pro Probe 1 mg vorgequollene Protein-A-Sepharose (Amersham Pharmacia) und 3 μl Protein-G-Sepharose (Amersham Pharmacia) in 50 μl TBST suspendiert, zu den Proben pipettiert und für die Antigen-Antikörper-Präzipitation eine Stunde bei 4°C auf einem Schüttler (IKA-VIBRAX-VXR, Bachofer) leicht geschüttelt. Die Sepharose-Antigen-Antikörperkomplexe werden anschließend fünfmal mit 800 μl eiskaltem TBST gewaschen. Dafür wird der Puffer mit einem Mehrkanalspender zugegeben, die Platten fünf Minuten bei 4°C und 2100 rpm zentrifugiert und der Überstand mit einem Mehrkanalaufsatz (Multiwell Plate Washer/Dispenser Manifold, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und einer Vakuumpumpe abgesaugt. Nach dem letzten Waschgang werden die Pellets in 100 μl TBST resuspendiert und in eine Messplatte (OptiPlate-96, Packard) überführt. Jeder Probe werden 150 μl Szintillationsflüssigkeit (Microscint 40, Packard) zugefügt, die Platte mit einer Folie (TopSeal-A, Packard) verschlossen und in Alufolie verpackt für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (IKA-VIBRAX-VXR, Bachofer) geschüttelt. Anschließend werden die cpm der gebundenen Radioaktivität in einem Platten-Radioaktivitätsmessgerät (Top Count Microplate Scintillation Counter, Packard) bestimmt.

Die Ergebnisse der Messungen werden auf jeweils eine Standardkurve aus neun Verdünnungen von GADA- bzw. IA-2A-positiven Humansenen bezogen, die in jedem Testansatz mitgemessen wird. Die Grenze für positive Messwerte entspricht für beide Tests der 99sten Perzentile von Messwerten, die in Seren von nicht diabetischen Kontrollpersonen ermittelt wurde. Sie liegt bei $\geq 8,5$ Testunits/ml bzw. 25 WHO Units/ml für GADA und $\geq 2,5$ Testunits/ml oder 4 WHO Units/ml für IA-2A.

2.2.4 Detektion von IgG1-spezifischen Anti-Gliadin-Antikörpern in murinen Seren im ELISA

Bei diesem Test erfolgen alle Schritte bei Raumtemperatur. Von den Mäuseseren werden 1:200 Verdünnungen mit PBST [147 mmol/l NaCl, 1,5 mmol/l KCl, 2,7 mmol/l KH_2PO_4 , 81 mmol/l Na_2HPO_4 , 0,05% Tween (Sigma-Aldrich Chemie), pH 7,4] hergestellt, einmal ohne und einmal mit Zusatz von Gliadin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; 20 μg Gliadin/ml). Diese Serenverdünnungen werden für eine Stunde inkubiert, wobei in den Proben mit Gliadinzusatz alle gliadinspezifischen Antikörper gebunden werden. Anschließend werden jeweils 100 μl dieser Serenverdünnungen in Duplikaten auf eine mit Gliadin beschichtete ELISA-Platte (96 Wells; Euroimmun) pipettiert, abgedeckt und eine Stunde stehen gelassen. Folgend wird die Platte dreimal gewaschen. Dazu werden mit einer Mehrkanalpipette (Eppendorf) jeweils 200 μl PBST eingefüllt und anschließend aus der Platte herausgekippt. Nach dem letzten Waschgang wird die Platte auf Zellstoff trocken geklopft. Vom biotinilierten monoklonalen Anti-Maus-Subklassenantikörper IgG1 (A 85-1, 0,5 mg/ml, PharMingen) werden 1:1000 Verdünnungen mit PBST hergestellt, 100 μl der Verdünnung zu jeder Probe zugefügt und für zwei Stunden inkubiert. Folgend wird die Platte erneut gewaschen. An Peroxidase konjugiertes Streptavidin (Sav-HRP, PharMingen) wird 1:1000 mit PBST verdünnt, 100 μl der Verdünnung zu jeder Probe zugefügt und für eine Stunde inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift werden je 100 μl Substratlösung (TMB Peroxidase EIA Substrate Kit, Lösung A 9:1 mit Lösung B gemischt; BIO-RAD) eingefüllt. Die so präparierte ELISA-Platte wird auf einen Schüttler (100 rpm, IKA-VIBRAX-VXR, Bachofer) gestellt. Die Zugabe von 100 μl 1 N H_2SO_4 pro Well nach etwa acht Minuten des Substratumsatzes stoppt die Farbreaktion. Die Optische Dichte (OD) der einzelnen Proben wird bei einer Wellenlänge von 405 nm im ELISA-Messgerät (MR 600 Microplate Reader, Dynatech) gemessen.

Die Ergebnisse werden um unspezifische Bindungen bereinigt, indem von den Probenmesswerten ohne Gliadinzusatz die Messwerte derselben Probe mit Gliadinzusatz abgezogen werden. Die Ergebnisse werden als „ Δ OD“ angegeben. In jedem Testansatz wird ein Anti-Gliadinantikörper-positives und ein -negatives Mäuseserum zur Kontrolle der Testfunktionalität mitgetestet.

2.2.5 Detektion von Anti-Tetanus-Toxoid-Antikörpersubklassen in murinen Seren im ELISA

Tetanus-Toxoid (TT) (3500 LF/ml, Chiron Behring GmbH&Co) wird 1:7000 mit PBS [8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH_2PO_4 , 1,442 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ auf 1 l Aqua Bidest; pH 7,4] auf 0,5 LF/ml verdünnt und 125 μl in jedes Well einer ELISA-Platte (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp Surface, 96 Wells, Nalge Nunc) eingefüllt. Die Platte wird abgedeckt und über Nacht bei 4°C aufbewahrt, wobei die Plattenoberfläche mit TT beschichtet wird ("coating"). Alle folgenden Schritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Am folgenden Tag wird die Platte gewaschen. Dazu werden mit einer Mehrkanalpipette (Eppendorf) dreimal jeweils 200 μl PBST [PBS plus 0,05% Tween (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)] eingefüllt und anschließend aus der Platte herausgekippt. Nach dem letzten Waschgang wird die Platte auf Zellstoff trocken geklopft. In jedes Well werden 200 μl Blockpuffer [PBS plus 0,1% Gelatine (BIO-RAD)] eingefüllt und für eine Stunde inkubiert. Die Gelatine blockiert unspezifische Bindungsstellen an der Plattenoberfläche. Anschließend wird die Platte erneut gewaschen. Jeweils 100 μl von 1:100000 (IgG1) und 1:1000 (IgG2a, IgG2b und IgE) mit PBST verdünnten Mäuseseren werden eingefüllt und für zwei Stunden inkubiert. Die Platte wird wiederum gewaschen. Biotinilierte monoklonale Anti-Maus-Subklassen-IgG1- (A 85-1, 0,5 mg/ml, PharMingen), IgG_{2a}^b- (Igh-16, 0,5 mg/ml, PharMingen) IgG2b- (R 12-3, 0,5 mg/ml, PharMingen) und IgE-Antikörper (R35-118, 0,5 mg/ml, PharMingen) werden 1:500 mit PBST verdünnt, 100 μl zu jeder Probe addiert und für eine Stunde inkubiert. Folgend wird die Platte erneut gewaschen. An Peroxidase konjugiertes Streptavidin (Sav-HRP, PharMingen) wird 1:1000 mit PBST verdünnt, 100 μl der Verdünnung zu jeder Probe zugefügt und für eine Stunde inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift werden jeweils 100 μl Substratlösung (TMB Peroxidase EIA Substrate Kit, Lösung A 9:1 mit Lösung B gemischt; BIO-RAD) eingefüllt. Die so präparierte ELISA-Platte wird auf einen Schüttler (100 rpm, IKA-VIBRAX-VXR, Bachofer) gestellt. Die Zugabe von 100 μl 1 N H_2SO_4 pro Well nach etwa acht Minuten des Substratumsatzes stoppt die Farbreaktion. Die Optische Dichte (OD) der einzelnen Proben wird bei einer Wellenlänge von 405 nm im ELISA-Messgerät (MR 600 Microplate Reader, Dynatech) gemessen.

Für die Vergleichbarkeit mit den übrigen Subklassen werden die Ergebnisse der IgG1-Antikörper mit 100 multipliziert und alle Ergebnisse werden als „OD“ angegeben. In jedem Testansatz wird ein Anti-TT-Antikörper-positives und ein -negatives Mäuseserum zur Kontrolle der Testfunktionalität mitgetestet.

2.2.6 Bestimmung der Zytokinsekretion von murinen Milzzellen nach Stimulation mit Tetanus-Toxoid mit Elispot-Tests

Elispot-Kits zur Messung der IL-4- und INF- γ -Zytokinausschüttung von Mäuselymphozyten werden gekauft (U-CyTech B.V. Diagnostics). Die aus den Mäusemilzen gewonnenen und in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellproben (siehe 2.1.1.8) von den Gruppen 4A, 4B und 4C aus dem HR-Antagonisten-Projekt wurden für diese Messungen benutzt. Da die Tiere aus diesen Gruppen alle mit TT immunisiert wurden, wird die Möglichkeit einer Vorinkubation der Zellen genutzt, bevor sie in den Test eingesetzt werden. Nach der Herausnahme aus dem flüssigen Stickstoff werden die Einfrierröhrchen mit den Zellen (zwei Röhrchen pro Maus) im Wasserbad (37°C; Julabo 20B, Julabo) zügig aufgetaut und in 7 ml vorgelegtes (15 ml Zentrifugenröhrchen, Falcon) Kulturmedium überführt [RPMI-1640 Medium (mit Glutamax I, Invitrogen), 1% Pen-Strep-Lösung (10000 U/ml Pen und 10000 μ g/ml Strep; Invitrogen), 5% FKS (FCS-Gold, hitzeinaktiviert; PAA Laboratories GmbH); nach dem Mischen durch 0,2 μ m Filter sterilfiltriert]. Die zwei separat eingefrorenen Zellproben einer Mäusemilz werden vereint. Mit jeweils 1 ml Kulturmedium werden die Einfrierröhrchen nachgewaschen und die Zellen für sieben Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert (GPKR Centrifuge, Beckman Coulter) um das zelltoxische DMSO auszuwaschen. Die Mediumüberstände werden abgegossen und die Zellen in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. 20 μ l der Zellsuspension werden abgenommen, mit 20 μ l Trypanblau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in einem Well einer 96-Wellplatte gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer (Brand) überführt. Trypanblau färbt nur tote Zellen an und macht sie dadurch von lebenden Zellen abgrenzbar. Unter einem Lichtmikroskop (Olympus) werden die lebenden Zellen in den sechzehn Feldern eines Zählkammerquadrats ausgezählt. Die Lebendzellzahl berechnet sich nach der Formel: Zellen pro ml = Mittel der gezählten Zellzahl pro Feld $\times 10^4$. Folgend werden etwa 4×10^6 Zellen pro Probe in 1 ml Volumen mit TT (6,6 LF/ml Medium; Statens Serum Institut) antigenspezifisch stimuliert. Als Positivkontrolle werden 2×10^6 Zellen pro Probe mit Concanavalin A (ConA, 2 μ g/ml Medium; Amersham Biosciences AB) und als Negativkontrolle und für die Detektion von unspezifischen Reaktionen ein dritter Zellteil pro Probe (4×10^6 Zellen) mit reinem Kulturmedium vorinkubiert. Alle Zellen werden in einer Zellkulturplatte (48 Wells, Flachboden; Falcon) bei 37°C und 5% CO₂-Gasdruck für achtundvierzig Stunden stimuliert. 200000 der mit TT und Medium und 2000 der mit ConA vorstimulierten Zellen werden in die Elispot-Platte überführt. Alle weiteren Schritte werden gemäß den Herstelleranweisungen durchgeführt.

Die entwickelten Spots werden unter einem reversen Lichtmikroskop (Olympus) mit vierfacher Vergrößerung ausgezählt. Die mediane Spotzahl der mit Tetanus stimulierten Zellen wird berechnet und für jede Maus um unspezifische Reaktionen bereinigt, indem die mediane Spotzahl des mit Medium behandelten Zellteils subtrahiert wird.

2.2.7 Bestimmung der C-Pepid-Ausschüttung nüchtern und nach Stimulation mit einer Mischmahlzeit

Alle Personen der Calcitriolstudie kommen einen, neun und achtzehn Monate nach Studieneinschluss ins Krankenhaus München-Schwabing um C-Peptidtests durchführen zu lassen. Der Blutzucker soll zu Beginn des Tests bei 140 mg/dl liegen. Die erste Blutabnahme erfolgt nüchtern um den basalen C-Peptidspiegel zu messen. Anschließend bekommt der Patient umgehend 360 ml einer als Mischmahlzeit bezeichneten Flüssignahrung (Boost High Protein, 49,5 g KH, 9 g Fett, 22,5 g Eiweiß in 360 ml; Mead Johnson Nutritionals) zum Trinken. Dadurch wird die Insulin- und daran gekoppelt die C-Peptidsekretion stimuliert. Nach dreißig, sechzig, neunzig und hundertzwanzig Minuten wird der Person erneut venöses Blut abgenommen. Nach der letzten Blutabnahme wird der Blutzuckerspiegel kontrolliert und bei stark erhöhten Werten (> 300 mg/dl) vorsichtig mit Insulininjektionen korrigiert. Die Blutproben werden umgehend für zehn Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert (GPKR Centrifuge, Beckman Coulter), die Seren abgenommen und in 300 μ l Aliquots bei -20°C gelagert. Durch mehrfaches Auftauen und längere Aufbewahrung bei Raumtemperatur wird das C-Peptid in den Seren zerstört. Daher sind die Aliquots so gewählt, dass sie für eine C-Peptidmessung im Duplikat ausreichen und folglich ein erneutes Einfrieren unnötig wird.

Für die Messung der C-Peptidspiegel wird ein käuflich erworbener RBA (C-Peptide Double Antibody, 259 kBq, DPC-Biermann), der mit ^{125}I -markiertem C-Peptid arbeitet, nach den Herstellerangaben benutzt. Dabei wird die sensitivere, über Nacht dauernde Testvariante angewendet, bei der 100 μ l Serum pro Probenröhrchen eingesetzt werden. Alle Proben werden im Duplikat und alle sechs Proben eines Patienten pro Testzeitpunkt in einem Ansatz gemessen. In jedem Testansatz werden zwei, dem Testkit zugehörige Kontrollseren zur Überprüfung der Testfunktionalität und sechs Standardseren mitgetestet. Nach Herstellerangaben werden die Messwerte um unspezifische Bindungen bereinigt und die Probenmesswerte bezogen auf die Standardkurve in ng C-Peptid pro ml Serum (ng/ml) berechnet. Aus den jeweils sechs Messwerten pro Patient pro Testzeitpunkt wird mit Hilfe

der Tai's Formel (Tai 1994) die Fläche unter der Kurve der Messwerte (Area under the Curve = AUC) berechnet. Diese AUC-Werte sind pro Patient im Verlauf und im Vergleich der Patienten untereinander auswertbar. Zusätzlich sollen die basalen C-Peptidwerte analysiert werden.

2.2.8 Safety-Parameter der mit Calcitriol behandelten Personen

Die Safety-Parameter wurden so gewählt, dass die drei für den Einfluss von Calcitriol sensibelsten Stoffwechselfunktionen sehr engmaschig kontrolliert und jegliche Abweichungen von der Norm umgehend bemerkt und korrigiert werden können. Diese drei Kategorien sind der Calciumstoffwechsel, der Knochenstoffwechsel und die Nierenfunktionen. Die Parameter, die zur Überwachung des Calciumstoffwechsels herangezogen werden, sind der Parathormonspiegel im Plasma und der Calciumspiegel im Plasma und im Vierundzwanzig-Stunden-Urin. Zur Überwachung des Knochenstoffwechsels dienen die Messungen von Osteocalcin im Serum und von alkalischer Phosphatase und Phosphat im Plasma. Zur Überwachung der Nierenfunktion wird das Kreatinin im Urin gemessen. Alle diese Messungen werden durch etablierte und standardisierte Messmethoden im Klinisch-Chemischen Institut des Krankenhauses München-Schwabing durchgeführt.

2.2.9 Typisierung der HLA-Genotypen

Die HLA-DRB1-, HLA-DQA1- und HLA-DQB1-Allelen werden im Labor für Gewebetypisierung der Ludwig-Maximilian-Universität München aus Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)-amplifizierter DNA mittels nicht-radioaktiven sequenzspezifischen Oligonukleotid-Sonden bestimmt, wie bereits beschrieben (Walter 2003).

2.3 Statistik

Zur Berechnung der kumulativen Diabetesfrequenzen und den Diabetesrisiken in Assoziation zu den IAA-Titern bei zehn Wochen bei den NOD Mäusen bzw. bei Geburt bei den Kindern der BABYDIAB Studie werden Überlebensanalysen benutzt. Für alle Überlebensanalysen im NOD Modell wird als Ereignis die Diabetesmanifestation eingesetzt, also das Datum der ersten Uringlucose-Ausscheidung. Hazard Ratios für die Analysen der Kinder von Müttern mit Typ 1 Diabetes, werden mit Hilfe von Cox's proportionalem Hazard-Modell kalkuliert, wobei die Typ 1 Diabetesdauer der Mutter (< 10 oder > 10 Jahre), ein verringertes Geburtsgewicht (< 2700 g) und Frühgeburten (< 36 Wochen) als Covariablen benutzt werden. Signifikanzen der Antikörperpositivität und der Diabetesfrequenz im Vergleich werden mit dem log-rank Test ermittelt. Die Vergleiche der Insulitisscores und Antikörper-Prävalenzen zwischen den Gruppen im NOD Modell und der C-Peptidmengen und der IA-Subklassen der Personen der Calcitriolstudie werden mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U Tests durchgeführt. Für den Vergleich der medianen IA-Titer und der medianen basalen C-Peptidmengen der Personen der Calcitriolstudie wird der Wilcoxon-Test verwendet. Der exakte Test nach Fischer wird für die Berechnung der Unterschiede in den IA-IgG4-Subklassenprävalenzen im Rahmen der Calcitrioltherapie und bei den Zytokinausschüttungen der mit HR-Antagonisten behandelten NOD Mäuse durchgeführt. Die Korrelationen der IAA-Titer bei zehn Lebenswochen zum Alter bei Diabetesmanifestation und der Zytokinsekretionen im NOD Modell werden mit Hilfe des Spearman's Test ermittelt. Als Signifikanzgrenze aller Auswertungen wird $P < 0,05$ angewendet. Alle statistischen Auswertungen werden mit dem Softwarepaket „Statistical Package for Social Science“ (SPSS) durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Kumulative Diabetes-Inzidenz und Insulinautoantikörper-Prävalenz bei unbehandelten weiblichen NOD-Mäusen

Der Zeitraum der in dieser Arbeit durchgeführten Projekte erstreckt sich von Juni 2001 bis Juni 2003. In dieser Zeit wurden 114 weibliche NOD Mäuse in die laufende Kontrollgruppe eingeschlossen. Von sechundsiebzig dieser Tiere wurden im Rahmen dieser Arbeit die Blutproben bei zehn Lebenswochen und bei fünfundfünfzig zusätzlich bei Exitus auf IAA getestet und ausgewertet. Von allen 114 Mäusen war eine Auswertung der Diabetes-Inzidenz möglich. Diese Ergebnisse dienen als Referenzwerte für alle behandelten Tiergruppen.

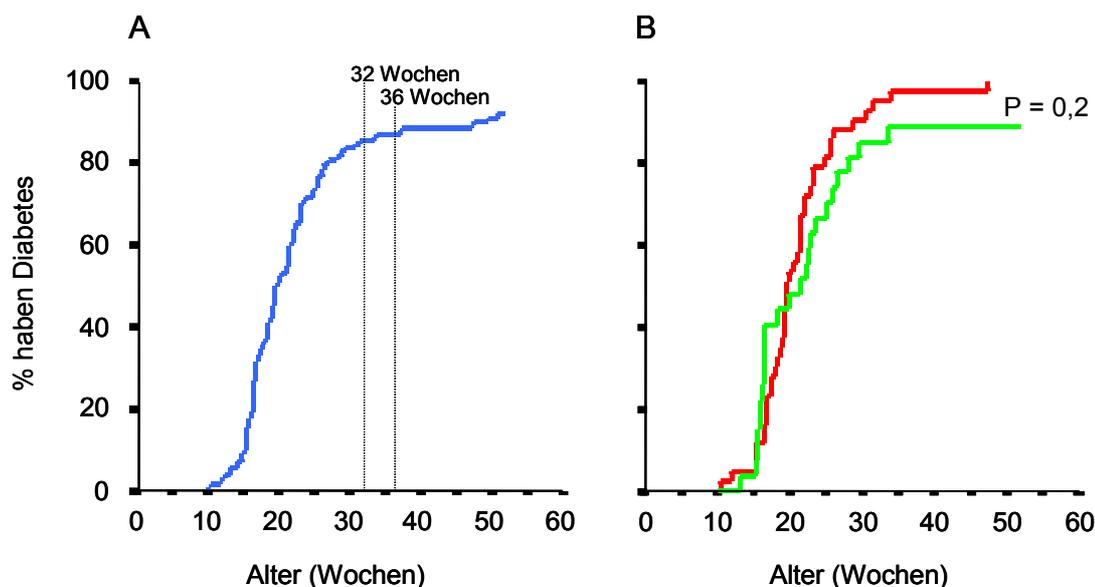


Abb. 7: Kumulatives Diabetesrisiko der unbehandelten weiblichen Mäuse aus der verwendeten NOD Kolonie. Überlebensanalysen der Diabetesrisiken wurden A) für alle bis zum Exitus beobachteten Kontrolltiere ($n = 114$) durchgeführt, wobei die Zeitpunkte von zweiunddreißig und sechsunddreißig Lebenswochen markiert sind, und B) für die Mäuse, bei denen bei zehn Lebenswochen IAA-Messungen durchgeführt wurden ($n = 70$). Die rote Linie repräsentiert das kumulative Diabetesrisiko bei zweiundfünfzig Lebenswochen von den Mäusen, die bei zehn Lebenswochen IAA-positiv ($n = 43$) und die grüne Linie von den Mäusen, die IAA-negativ ($n = 27$) waren.

Das Lebensalter, bei dem die ersten Mäuse der verwendeten NOD Kolonie Autoimmundiabetes manifestieren, beginnt ab der zehnten Lebenswoche und setzt sich über den gesamten Beobachtungszeitraum fort (Abb. 7A). Die größte Manifestationshäufigkeit liegt zwischen der zweiundzwanzigsten und sechsundzwanzigsten Lebenswoche. Bei zwei-

unddreißig Lebenswochen beträgt die kumulative Diabetes-Inzidenz der 114 untersuchten Kontrolltiere 86%, bei sechsunddreißig Lebenswochen 87% und bei zweiundfünfzig Lebenswochen 92%. Die Werte bei zweiunddreißig und sechsunddreißig Lebenswochen stellen die direkten Vergleichszahlen für die folgenden Werte der Behandlungsgruppen dar.

Bei zehn Lebenswochen waren 59% und bei Exitus 47% der Kontrolltiere IAA-positiv (Abb. 8). Das kumulative Diabetesrisiko von IAA-positiven und IAA-negativen NOD-Mäusen war nicht unterschiedlich ($P = 0,2$; Abb. 7B).

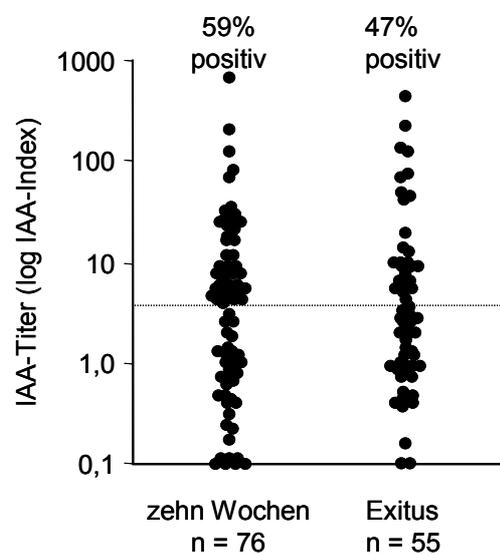


Abb. 8: IAA-Ergebnisse von unbehandelten weiblichen Mäusen der verwendeten NOD Kolonie. Auf der x-Achse sind die Messwerte nach ihren Messzeitpunkten bei zehn Lebenswochen und Exitus gruppiert. Auf der y-Achse sind die dazu gehörigen IAA-Indizes auf einer logarithmischen Skalierung aufgetragen. Über den Messwerten der jeweiligen Gruppen sind die IAA-Prävalenzen in Prozent (%) angegeben. Die gepunktete Linie entspricht dem Grenzwert für Positivität.

3.2 Diabetesprotektion durch Immunisierungen mit Insulin, Übertragung von mütterlichen (Auto)Antikörpern und deren Auswirkungen auf die Nachkommen

3.2.1 Immunisierungen von weiblichen NOD Mäusen vor und während der Trächtigkeit und Übertragbarkeit der induzierten Diabetesprotektion auf die Nachkommen

In dieser Untersuchung sollte durch Immunisierungen mit Insulin bei weiblichen NOD Mäusen ein Schutz vor der Entwicklung von Autoimmundiabetes erreicht werden (siehe 1.2.2). Dazu wurden die Mäuse vor bzw. während einer Trächtigkeit immunisiert und die Übertragbarkeit der induzierten Diabetesprotektion auf ihre weiblichen Nachkommen untersucht. Darüber hinaus sollte dieser Untersuchungsansatz dazu dienen, die I(A)A-Prävalenzen vor der Trächtigkeit und bei der Entbindung der immunisierten Mäuse zu messen und in Abhängigkeit dazu die Entwicklung von eigener Autoimmunität und Diabetes bei deren weiblichen Nachkommen zu analysieren (siehe 1.2.1). Parallele Immunisierungen mit einem Kontrollantigen und einem Vehikel dienen bei diesen Untersuchungen als Kontrolle.

3.2.1.1 Diabetes-Inzidenzen der immunisierten und unbehandelten Muttertiere

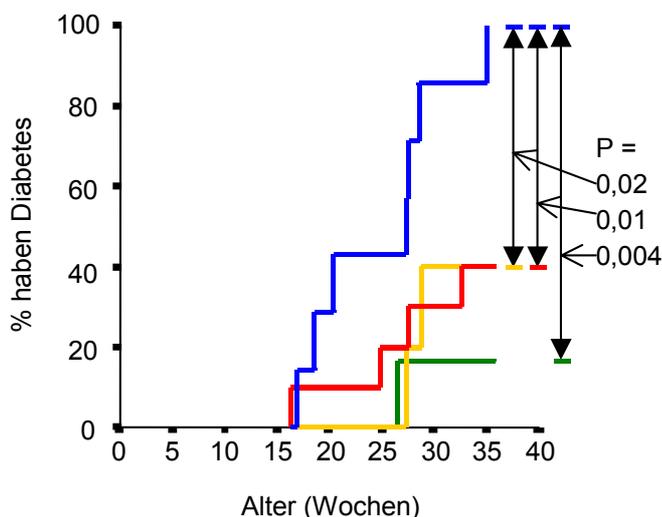


Abb. 10: Kumulatives Diabetesrisiko der NOD Muttertiere. Dargestellt sind die Überlebensanalysen der Diabetesrisiken in Abhängigkeit zu den Behandlungsgruppen, wobei die rote Linie die mit Insulin plus IFA ($n = 10$), die grüne Linie die mit Glucagon plus IFA ($n = 6$), die orange Linie die mit NaCl plus IFA immunisierten ($n = 5$) und die blaue Linie die unbehandelten NOD Weibchen ($n = 7$) repräsentieren.

Die Diabetes-Inzidenzen der immunisierten Muttertiere liegen signifikant unter der Diabetes-Inzidenz der unbehandelten trächtigen Kontrolltiere. Während die Mäuse der Kontroll-

gruppe in dieser Untersuchung zu 100% (7/7) Diabetes entwickelten, haben lediglich 40% (4/10, $P = 0,01$) der mit Insulin plus IFA, 17% (1/6, $P = 0,004$) der mit Glucagon plus IFA und 40% (2/5, $P = 0,02$) der mit NaCl plus IFA immunisierten Mäuse Autoimmundiabetes entwickelt.

3.2.1.2 Diabetes-Inzidenzen der weiblichen Nachkommen abhängig von der Behandlung ihrer Muttertiere

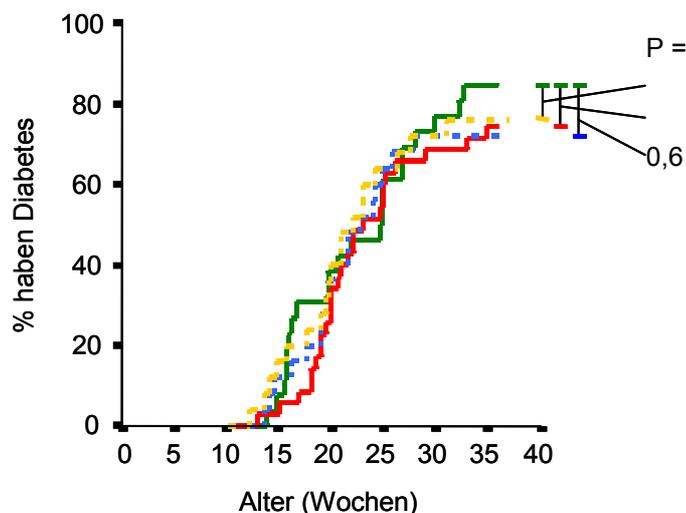


Abb. 11: Kumulatives Diabetesrisiko der weiblichen Nachkommen abhängig von der Behandlung ihrer Muttertiere vor der Geburt. Die rote Linie repräsentiert die Nachkommen der mit Insulin plus IFA ($n = 36$), die grüne Linie die Nachkommen der mit Glucagon plus IFA ($n = 27$), die orange Linie die Nachkommen der mit NaCl plus IFA ($n = 25$) immunisierten und die blaue Linie die Nachkommen von unbehandelten ($n = 25$) Muttertieren.

Die Diabeteshäufigkeit der Nachkommen blieb unbeeinflusst von der Behandlung, d.h. Immunisierung der Muttertiere während oder vor der Trächtigkeit (Abb. 11). Nachkommen von unbehandelten Kontrolltieren haben die gleiche kumulative Diabetes-Inzidenz bei sechsunddreißig Lebenswochen (72%) wie Nachkommen der mit Insulin (72%), Glucagon (82%) oder NaCl (76%) immunisierten Muttertieren ($P > 0,05$). Das bedeutet, dass die durch die Immunisierung induzierte Diabetesprotektion bei den Muttertieren nicht auf die Nachkommen übertragen werden konnte.

3.2.1.3 Insulin(auto)antikörper-Prävalenzen der immunisierten und unbehandelten Muttertiere

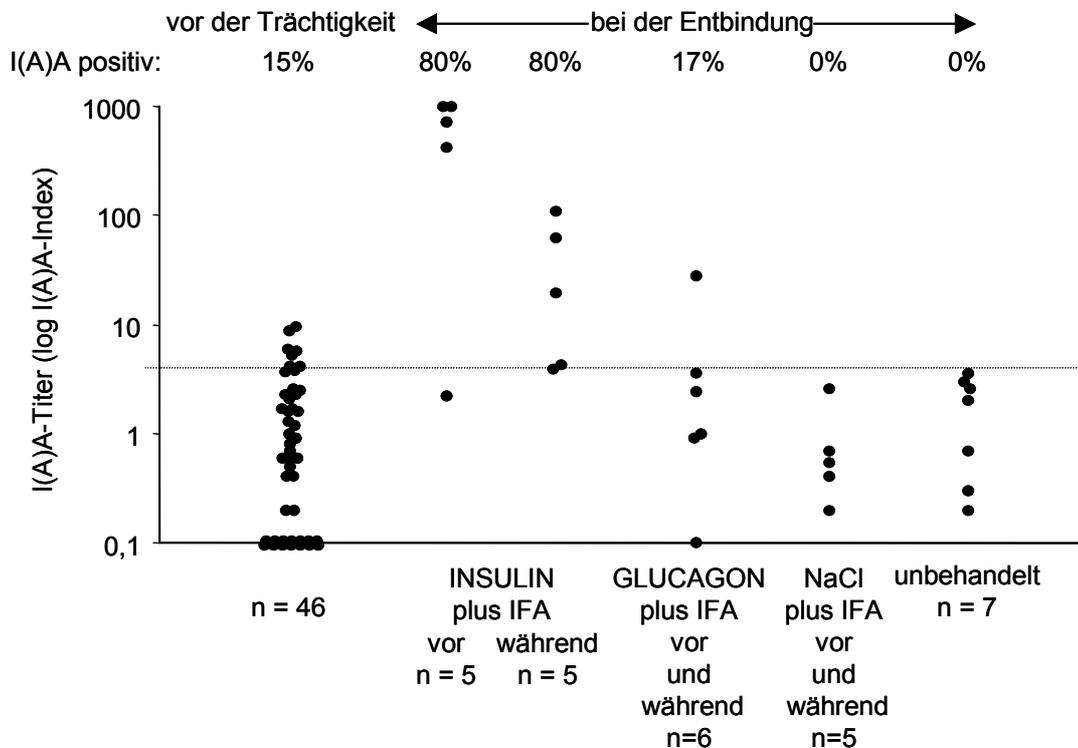


Abb. 12: I(A)A-Ergebnisse der immunisierten und unbehandelten NOD Muttertiere. Auf der x-Achse sind die vor bzw. während ihrer Trächtigkeit immunisierten NOD Muttertiere, nach ihren Behandlungsgruppen angeordnet, aufgetragen. Die y-Achse zeigt die detektierten I(A)A-Indizes auf einer logarithmischen Skalierung. Über den Messwerten der jeweiligen Gruppen sind die I(A)A-Prävalenzen in Prozent (%) und die Zeitpunkte der I(A)A-Messungen, vor der Trächtigkeit bzw. bei der Entbindung, angegeben. Die gepunktete Linie entspricht dem Grenzwert für Positivität.

Die IAA-Prävalenz der Muttertiere vor Trächtigkeit und Immunisierungsbehandlung beträgt 15% (Abb. 12). Bei Entbindung wiesen 80% der mit Insulin plus IFA und 17% der mit Glucagon plus IFA immunisierten Muttertiere Insulinantikörper (IA) auf. Keine der nur mit NaCl plus IFA immunisierten Mäuse und keine der unbehandelten Mäuse hatte IA.

3.2.1.4 Diabetes-Inzidenzen der weiblichen Nachkommen abhängig vom Insulinantikörperstatus ihrer Muttertiere

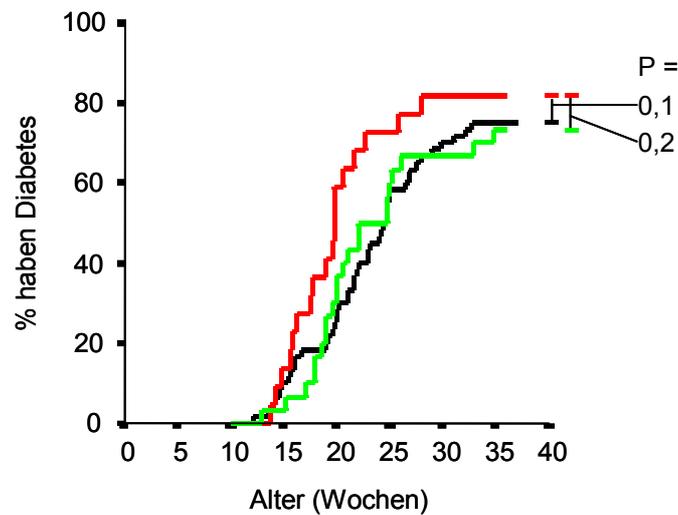


Abb. 13: Kumulatives Diabetesrisiko der 113 weiblichen Nachkommen abhängig von der I(A)A-Positivität ihrer Muttertiere bei Entbindung. Die rote Linie repräsentiert die Nachkommen von IAA-positiven (n = 22), die schwarze Linie die Nachkommen von IAA-negativen (n = 55) und die grüne Linie die Nachkommen von IA-positiven Muttertieren (n = 31).

Das Diabetesrisiko ist nicht signifikant unterschiedlich bei Nachkommen, die von Muttertieren mit oder ohne Insulinantikörper bei Entbindung geboren wurden (Abb. 13). Allerdings wird ein Trend sichtbar, der für die Nachkommen von IAA-positiven Muttertieren eine etwas höhere Rate der Diabetesentwicklung zeigt als für Nachkommen von IAA-negativen Muttertieren (P = 0,1). Die jeweilige kumulative Diabetes-Inzidenz im Alter von sechsunddreißig Lebenswochen liegt bei 82% für Nachkommen von IAA-positiven, bei 71% für Nachkommen von IA-positiven und bei 75% für Nachkommen von IAA-negativen Muttertieren (P = 0,1).

3.2.1.5 Insulinautoantikörper-Prävalenzen der Nachkommen

Tab. 8: Behandlungsgruppen der NOD Muttertiere und die resultierende weibliche Nachkommenschaft einschließlich einer Ergebnisübersicht

Muttertiere		weibliche Nachkommen	
Immunisierungen vor bzw. während der Trächtigkeit	I(A)A-pos. vor Entbindung (n (%))	♀ Nachkommen (n)	IAA-pos. bei zehn Wochen (n (%))
1A Insulin vor	4 (80)	18	9 (50)
1B Insulin während	4 (80)	18	8 (44)
1C Glucagon vor	1 (33)	17	7 (41)
1D Glucagon während	0	10	7 (70)
1E NaCl vor	1 (33)	15	7 (47)
1F NaCl während	0	10	3 (30)
1G unbehandelte Kontrollen	2 (29)	25	14 (56)

Insgesamt zeigen 34% aller weiblichen Nachkommen bei vier Lebenswochen und 46% bei zehn Lebenswochen positive IAA-Titer.

In Tabelle 8 sind die I(A)A-Prävalenzen der Nachkommen in Abhängigkeit zur IA(A)-Häufigkeit der Muttertiere vor der Entbindung aufgeführt und nach den Behandlungsgruppen der Muttertiere sortiert. Die IAA-Prävalenzen der weiblichen Nachkommen bei zehn Lebenswochen liegen zwischen 30-70%, ähnlich wie in der unbehandelten Kontrollgruppe. Einflüsse der I(A)A-Mengen bei Geburt auf die Entwicklung von eigenen IAA bei zehn Lebenswochen sind bei den Nachkommen nicht erkennbar. Dagegen ist der Nachweis der IAA im Alter von vier Lebenswochen bei den Nachkommen abhängig vom Vorhandensein von Insulinantikörpern vor Entbindung (Abb. 14). 90% der weiblichen Nachkommen von IA-positiven Muttertieren sind bei vier Lebenswochen I(A)A-positiv, was für eine verbliebene Menge der mütterlich übertragenen IA spricht. Dagegen sind 0% der weiblichen Nachkommen von IAA-positiven und 13% der Nachkommen von IAA-negativen Muttertieren bei vier Lebenswochen IAA-positiv.

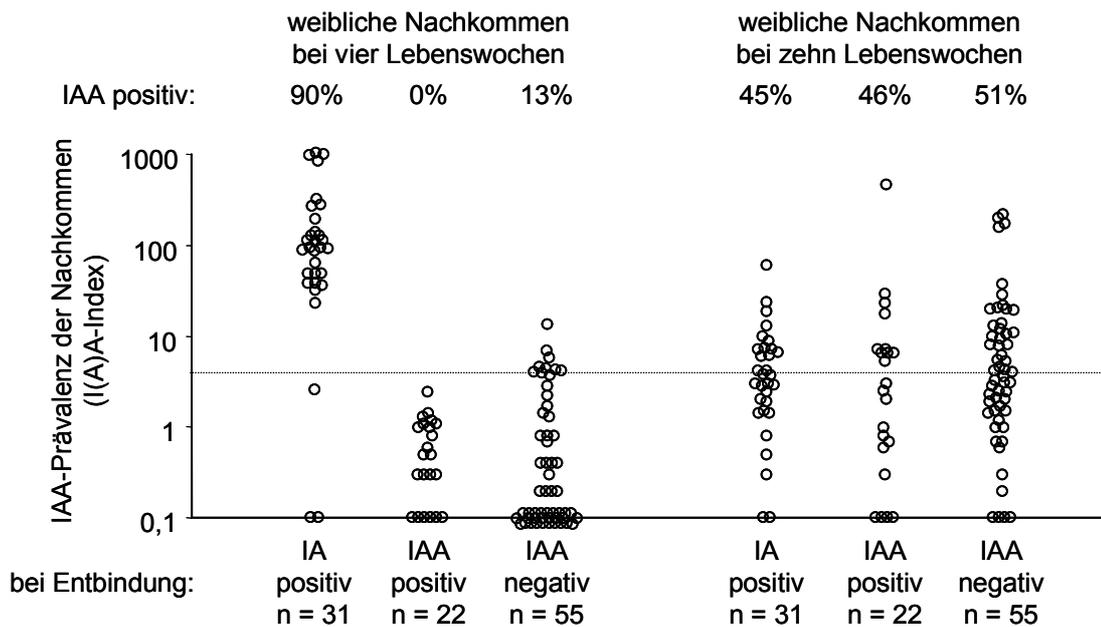


Abb. 14: IAA-Ergebnisse der weiblichen Nachkommen gruppiert nach den I(A)A-Titern ihrer Muttertiere bei Entbindung. Auf der y-Achse sind die gemessenen IAA-Indizes der weiblichen Nachkommen auf einer logarithmischen Skalierung aufgetragen. Auf der x-Achse sind diese Mäuse danach gruppiert, ob ihre Muttertiere vor Geburt IA-positiv, IAA-positiv oder IAA-negativ waren. Über den Messwerten der jeweiligen Gruppen sind die IAA-Prävalenzen in Prozent (%) und die Zeitpunkte der Messungen, bei vier bzw. zehn Lebenswochen, angegeben. Die gepunktete Linie entspricht dem Grenzwert für Positivität.

3.2.2 Auswirkungen der Übertragung von Inselautoantikörpern während der Schwangerschaft auf das Diabetesrisiko bei Kindern von Müttern mit Typ 1 Diabetes

Für die Untersuchungen zur Klärung der Frage, ob der Transfer von mütterlichen Insel(auto)antikörpern beim Menschen zu einem erhöhten Diabetesrisiko bei den Kindern von Müttern mit Typ 1 Diabetes führt (siehe 1.2.1), wurden Kinder von Müttern mit Typ 1 Diabetes aus der deutschen BABYDIAB Studie analysiert. Von 1030 Kindern von Müttern mit Typ 1 Diabetes waren bei 720 Kindern Messungen von I(A)A, GADA und IA-2A in Nabelschnurblutproben und in ergänzenden Proben im Studienverlauf möglich.

Bei 86% (620/720) dieser Kinder konnten bei Geburt im Nabelschnurblut IA, bei 56% (401/720) GADA und bei 37% (267/720) IA-2A nachgewiesen werden; 6,3% (45) hatten keine Antikörper im Nabelschnurblut, 7,5% (54) hatten nur die Autoantikörper GADA und/oder IA-2A, 58,9% (424) hatten GADA und/oder IA-2A zusammen mit Insulinantikörpern IA und 27,2% (196) hatten ausschließlich IA (Tab. 9).

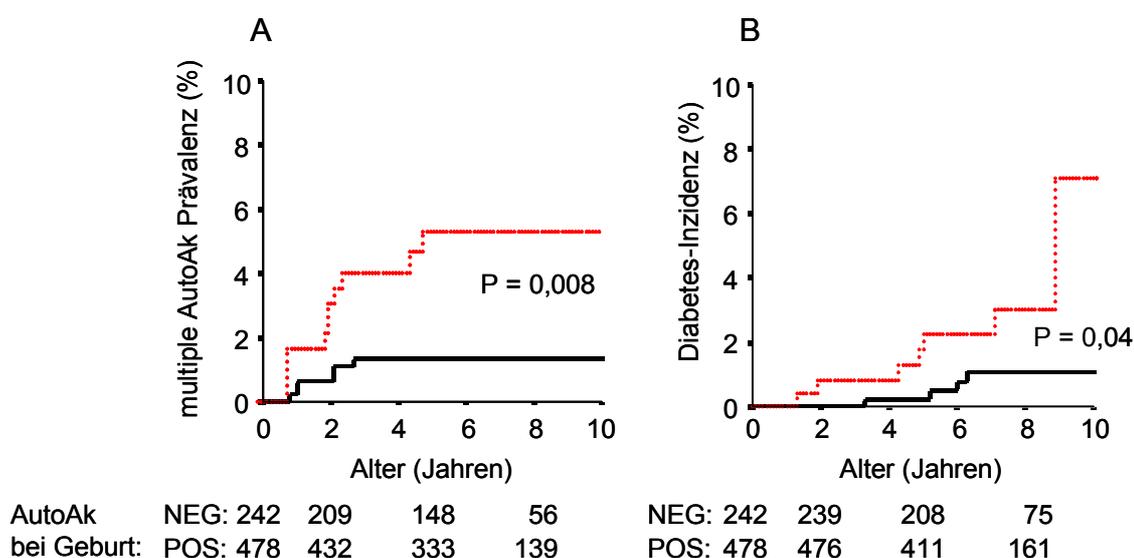


Abb. 15: Kumulative Risiken für die Entwicklung von persistierenden multiplen Inselautoantikörpern und Typ 1 Diabetes bei Kindern von Müttern mit Typ 1 Diabetes. Überlebensanalysen der Risiken sind in A) für die Entwicklung von persistierenden multiplen Inselautoantikörpern und in B) für Typ 1 Diabetes aufgetragen. Die Risiken der Kinder, die bei Geburt Autoantikörper, also GADA und/oder IA-2A, positiv waren, werden durch die schwarzen Linien und die der Kinder, die bei Geburt Autoantikörper-negativ waren, durch die roten Linien repräsentiert. Die Zahlen unter der x-Achse geben die analysierten Fallzahlen bei Geburt, zwei, fünf und acht Lebensjahren an, wobei die Gruppe der Autoantikörper-positiven Kinder bei Geburt mit POS und der Autoantikörper-negativen mit NEG bezeichnet ist.

Einunddreißig von 720 untersuchten Kindern entwickelten eigene persistierende multiple Inselautoantikörper in ihrer frühen Kindheit und sechzehn von ihnen manifestierten Typ 1 Diabetes. Der Inselautoantikörper-Status bei Geburt hat signifikante Auswirkungen auf das Diabetesrisiko der Kinder (Abb. 15, Tab.9). Nachkommen, die Inselautoantikörper, also GADA und/oder IA-2A, bei Geburt hatten, haben ein signifikant verringertes Risiko für die Entwicklung von eigenen multiplen Inselautoantikörpern (1,3% im Alter von fünf Jahren) und Typ 1 Diabetes (1,1% im Alter von acht Jahren) im Vergleich zu den Nachkommen, die bei Geburt Inselautoantikörper-negativ waren (5,3%, $P = 0,008$ für die Entwicklung von multiplen Inselautoantikörpern; 3,0%, $P = 0,04$ für die Entwicklung von Diabetes).

Die Risiken für Kinder mit GADA und/oder IA-2A bei Geburt blieben auch nach einer Berichtigung um die mütterliche Diabetesdauer, die Schwangerschaftsdauer und das Geburtsgewicht verringert. Die berichtete Hazard-Ratio für die Entwicklung von multiplen Inselautoantikörpern ist $HR = 0,25$ ($P = 0,007$) und für die Entwicklung von Typ 1 Diabetes $HR = 0,25$ ($P = 0,02$; Tab. 9).

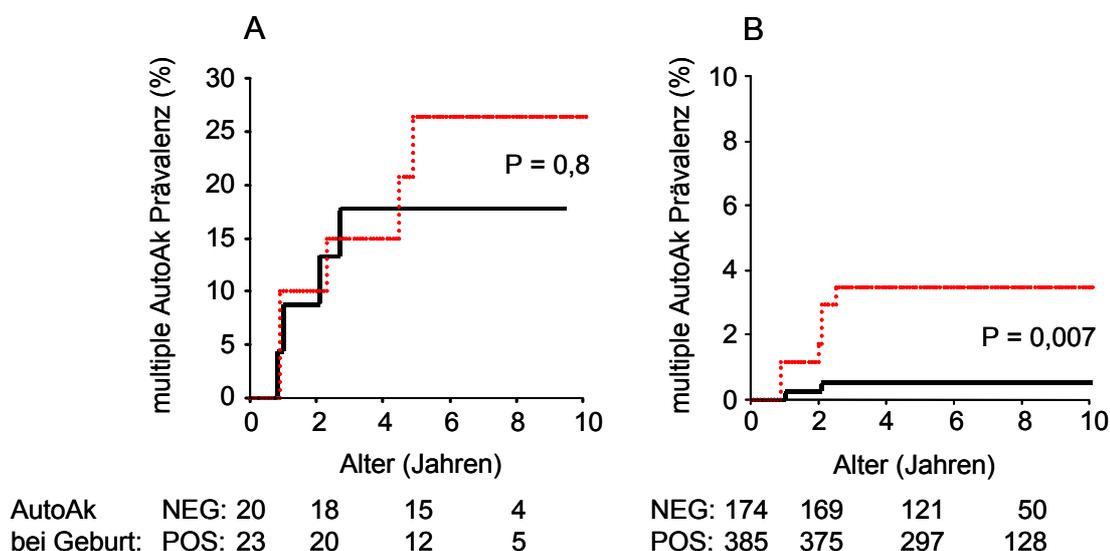


Abb. 16: Kumulative Risiken für die Entwicklung von persistierenden multiplen Inselautoantikörpern bei Kindern von Müttern mit Typ 1 Diabetes in Abhängigkeit von deren HLA-Genotyp. Überlebensanalysen der Risiken sind für die Entwicklung von persistierenden multiplen Inselautoantikörpern in A) für die Kinder mit und in B) für die Kinder ohne HLA DR3/DR4-DQ8 Risikogenotyp aufgetragen. Die Risiken der Kinder, die bei Geburt Autoantikörper, also GADA und/oder IA-2A, positiv waren, werden durch die schwarzen Linien und die der Kinder, die bei Geburt Autoantikörper-negativ waren, durch die roten Linien repräsentiert. Die Zahlen unter der x-Achse geben die analysierten Fallzahlen bei Geburt, zwei, fünf und acht Lebensjahren an, wobei die Gruppe der Autoantikörper-positiven Kinder bei Geburt mit POS und die der Autoantikörper-negativen mit NEG bezeichnet ist.

Die Auswirkung des Inselautoantikörper-Status bei Geburt ist am stärksten bei den Kindern, die nicht den Hochrisiko-Genotyp HLA DR3/DR4-DQ8 tragen (Abb. 16). Diese haben ein Risiko von 0,5% für die Entwicklung von multiplen Inselautoantikörpern im Alter von fünf Jahren, wenn sie bei Geburt Inselautoantikörper-positiv waren, entgegen dem Risiko von 3,5% bei den Kindern, die Inselautoantikörper-negativ waren ($P = 0,007$). Das Risiko für die Entwicklung von Typ 1 Diabetes im Alter von acht Lebensjahren liegt bei den Kindern, die nicht den HLA-Risikogenotyp und positive Inselautoantikörper bei Geburt hatten, bei 0,3% entgegen dem Risiko von 2,4% bei den Kindern ohne Inselautoantikörper bei Geburt ($P = 0,05$). Der Einfluss von Inselautoantikörpern im Nabelschnurblut ist dagegen unbedeutend bei den Kindern, die den Hochrisikogenotyp HLA DR3/DR4-DQ8 tragen. Diese haben ein Risiko für die Entwicklung von multiplen Inselautoantikörpern bei fünf Lebensjahren von 17,8%, wenn sie Inselautoantikörper-positiv und von 26,3%, wenn sie Inselautoantikörper-negativ bei Geburt waren ($P = 0,8$). Die Risiken dieser Kinder für die Entwicklung von Typ 1 Diabetes bei acht Lebensjahren sind 18,4% bei positiven und 15,6% bei negativen Inselautoantikörpern bei Geburt ($P = 0,7$). Für die Gruppen der Kinder, die IA-positiv oder -negativ im Nabelschnurblut waren, sind keine signifikanten Unterschiede im Risiko für die Entwicklung von multiplen Inselautoantikörpern oder Typ 1 Diabetes nachweisbar (Tab. 9).

Tab 9: Kumulatives Risiko für die Entwicklung von multiplen Inselautoantikörpern und Typ 1 Diabetes bei Kindern von Müttern mit Typ 1 Diabetes in Abhängigkeit zu ihrem Antikörperstatus bei Geburt

Antikörperstatus bei Geburt	(n)	Ak-Risiko bei fünf Jahren % (SE)	P	adjusted HR	P	T1D-Risiko bei acht Jahren % (SE)	P	adjusted HR	P
<u>IA</u>									
positiv	620	3,1 (0,7)	0,7	1,4	0,6	2,3 (0,7)	0,2	nicht kalkulierbar	0,9
negativ	100	2,1 (1,5)		Referenz		0			
<u>GADA</u>									
positiv	401	1,6 (0,6)	0,1	0,4	0,1	1,3 (0,6)	0,2	0,4	0,1
negativ	319	4,0 (1,2)		Referenz		2,3 (1,0)		Referenz	
<u>IA-2A</u>									
positiv	267	1,3 (0,7)	0,1	0,3	0,1	1,5 (0,9)	0,4	0,6	0,5
negativ	453	3,5 (0,9)		Referenz		1,9 (0,7)		Referenz	
<u>GAD oder IA-2A</u>									
positiv	478	1,3 (0,5)	**	0,25	**	1,1 (0,5)	*	0,25	*
negativ	242	5,3 (1,6)		Referenz		3,0 (1,3)		Referenz	

* P < 0,05

** P < 0,01

HR = Hazard Ratios, adjusted um die mütterliche Diabetesdauer, die Schwangerschaftsdauer und das Geburtsgewicht

3.3 Auswirkungen von Mucin auf die Entwicklung von Diabetes und Autoimmunität bei weiblichen NOD Mäusen

In diesem Studienteil sollte untersucht werden, ob durch eine orale Behandlung mit Mucin Typ 1 (MUC1) über das tägliche Trinkwasser bei weiblichen NOD Mäusen ein Schutz vor der Entwicklung von Autoimmundiabetes erreicht werden kann, der mit einer Verringerung der Diabetes-Inzidenz und einer Veränderung der IAA-Mengen bei zehn Lebenswochen einhergeht (siehe 1.2.3).

3.3.1 Kumulative Diabetes-Inzidenzen der mit Mucin behandelten Mäuse

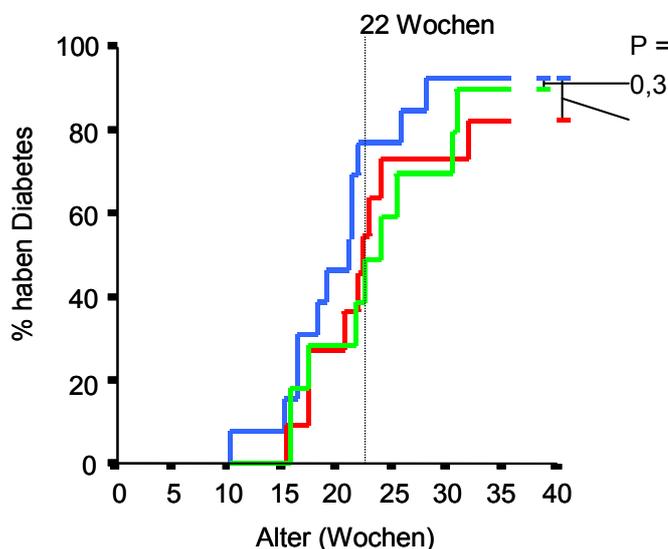


Abb. 17: Kumulative Diabetesrisiken der weiblichen NOD Mäusen nach Behandlung mit Mucin. Überlebensanalysen der Diabetesrisiken wurden durchgeführt, gruppiert nach den drei verschiedenen Behandlungsgruppen dieser Studie. Die grüne Linie repräsentiert die für dreißig Tage nach der Entwöhnung mit MUC1 behandelten ($n = 11$), die rote Linie die mit MUC3 behandelten ($n = 11$) und die blaue Linie die unbehandelten ($n = 13$) NOD Weibchen. Der Zeitpunkt der größten Abweichung der Diabetesrisiken zwischen den Gruppen liegt bei zweiundzwanzig Wochen und ist durch eine schwarze gepunktete Linie markiert.

Die kumulative Überlebensanalyse der drei Untersuchungsgruppen bei sechsunddreißig Lebenswochen ergibt Diabetes-Inzidenzen von 91% für die mit MUC1 behandelten, 82% für die mit MUC3 behandelten und 92% für die unbehandelten NOD Weibchen (Abb. 17). Es liegen keine signifikanten Unterschiede der Diabeteshäufigkeiten zwischen den drei Behandlungsgruppen vor ($P > 0,05$). Allerdings wird eine geringe Zeitverschiebung zwischen der Kontrollgruppe und beiden Behandlungsgruppen sichtbar. Diese Verschiebung ist bei zweiundzwanzig Lebenswochen am ausgeprägtesten, als bereits 77% der Kontrolltiere Autoimmundiabetes entwickelt hatten, dagegen erst 55% der mit MUC3 und 48% der mit MUC1 behandelten Mäuse.

3.3.2 Insulinautoantikörper-Prävalenzen der mit Mucin behandelten Mäuse bei zehn Lebenswochen und bei Exitus

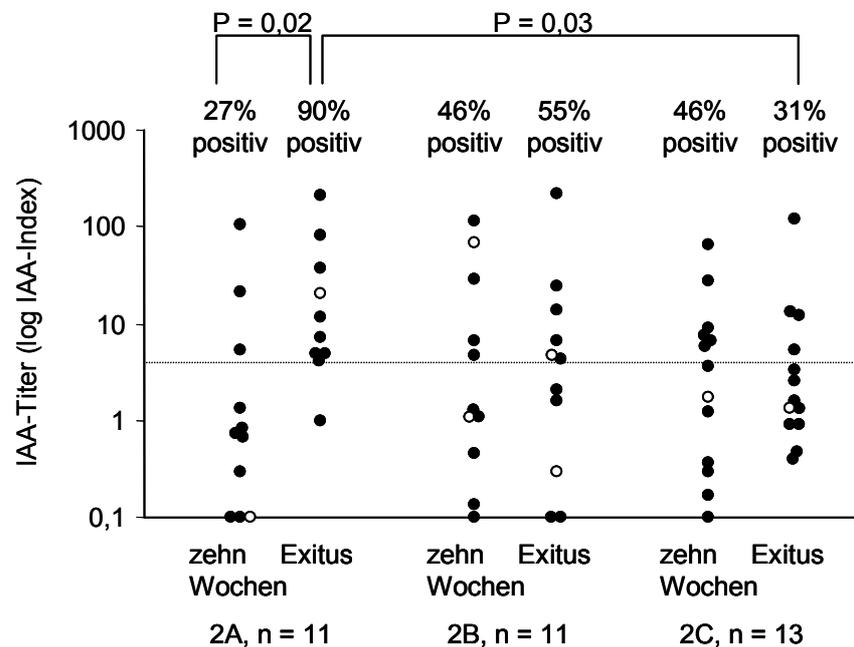


Abb. 18: IAA-Ergebnisse der weiblichen NOD Mäuse nach Behandlung mit Mucin. Auf der x-Achse sind die Behandlungsgruppen und die Zeitpunkte der IAA-Messungen mit zehn Lebenswochen und bei Exitus angegeben. Die Mäuse in Gruppe 2A wurden für dreißig Tage nach der Entwöhnung mit MUC1 behandelt (n = 11), die Mäuse in Gruppe 2B wurden für dreißig Tage nach der Entwöhnung mit MUC3 behandelt (n = 11) und die Gruppe 2C repräsentiert die unbehandelten NOD Weibchen (n = 13). Die y-Achse zeigt die detektierten IAA-Indizes auf einer logarithmischen Skalierung. Die ausgefüllten Punkte zeigen die Mäuse an, die Autoimmundiabetes entwickelt haben, und die offenen Punkte die, die keinen Diabetes manifestiert haben. Über den Messwerten der jeweiligen Gruppen sind die IAA-Prävalenzen in Prozent (%) angegeben; die Verbindungslinien markieren signifikante Unterschiede der IAA-Titer zwischen den Gruppen. Die gepunktete Linie entspricht dem Grenzwert für Positivität.

Bei zehn Lebenswochen, als die Behandlungen mit den jeweiligen Mucin-Typen bereits abgeschlossen waren, beträgt die IAA-Prävalenz in der mit MUC1 behandelten Gruppe 27%, in der mit MUC3 behandelten Gruppe 46% und in der Kontrollgruppe 46% (Abb. 18). Im weiteren Zeitverlauf steigen die IAA-Prävalenzen in beiden Behandlungsgruppen an. Bei Exitus wurden in der mit MUC1 behandelten Gruppe bei 90% und in der mit MUC3 behandelten Gruppe bei 55% der Mäuse positive IAA-Mengen detektiert. Dagegen fiel die IAA-Prävalenz der Kontrollgruppe auf 31% ab. Der Vergleich der IAA-Titer bei zehn Lebenswochen und Exitus innerhalb der Gruppen zeigt einen signifikanten Unterschied in der mit MUC1 behandelten Gruppe ($P = 0,02$). Zusätzlich liegt bei dem Vergleich der IAA-Titer zwischen den Gruppen ein signifikanter Unterschied zwischen der mit MUC1 behandelten und der Kontrollgruppe bei Exitus vor ($P = 0,03$). Es gibt keine Assoziation zwischen den IAA-Mengen der einzelnen Tiere und deren Diabetes-Manifestation.

3.4 Auswirkungen von glutenfreier Ernährung und glutenfreier Ernährung mit dem Zusatz von Gliadin auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes und das Immunsystem von weiblichen NOD Mäusen

Eine glutenfreie Ernährung reduziert die Diabeteshäufigkeit bei weiblichen NOD Mäusen. Hier sollte untersucht werden, ob ein Zusatz von Gliadin zu der glutenfreien Nahrung den protektiven Effekt dieser Kost aufhebt und welche Auswirkungen eine glutenfreie Nahrung und eine Nahrung mit Gliadinzusatz auf die Entwicklung von Insulinautoantikörpern und Gliadinantikörpern bei den NOD Mäusen hat (siehe 1.2.4).

3.4.1 Kumulative Diabetes-Inzidenzen der glutenfrei ernährten Mäusegruppen

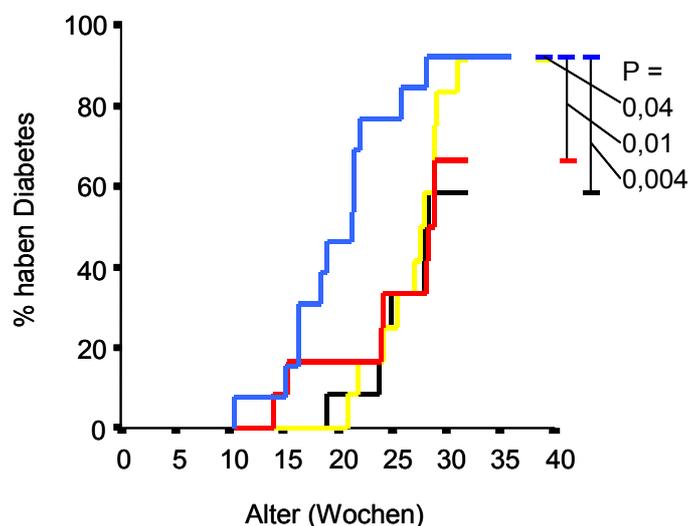


Abb. 19: Kumulatives Diabetesrisiko der weiblichen NOD Mäuse nach glutenfreier Nahrung über verschiedene Zeiträume und glutenfreier Nahrung mit dem Zusatz von Gliadin. Überlebensanalysen der Diabetesrisiken wurden durchgeführt und nach den vier verschiedenen Behandlungsgruppen dieser Studie gruppiert. Die rote Linie repräsentiert die von der sechsten bis zwölften Lebenswoche glutenfrei (3A, n = 12) ernährten NOD Mäuse, die gelbe Linie die von der vierten bis zur zehnten Lebenswoche glutenfrei (3B, n = 12), die schwarze Linie die von der vierten bis zur zehnten Lebenswoche glutenfrei mit Gliadinzusatz (3C, n = 12) und die blaue Linie die mit Standardnahrung ernährten unbehandelten (3D, n = 13) NOD Mäuse.

Die Diabetes-Inzidenz bei zweiunddreißig Lebenswochen in der von der sechsten bis zwölften Lebenswoche glutenfrei ernährten Untersuchungsgruppe 3A beträgt 67% und in der von der vierten bis zur zehnten Lebenswoche glutenfrei ernährten Gruppe 3B 92% (Abb. 19). In der von der vierten bis zur zehnten Lebenswoche glutenfrei mit Gliadinzusatz behandelten Gruppe 3C liegt die Diabetes-Inzidenz bei 58% und in der lebenslang mit Standardnahrung ernährten Kontrollgruppe 3D bei 92%. Die Diabetes-Inzidenzen aller drei Untersuchungsgruppen mit veränderter Glutenezufuhr (3A, 3B und 3C) sind signifikant ver-

ringert im Vergleich zur Kontrollgruppe 3D (3D vs. 3A $P = 0,01$; 3D vs. 3B $P = 0,04$; 3D vs. 3C $P = 0,004$).

Die medianen Überlebenszeiten betragen 26,7 Lebenswochen in Gruppe 3A, 27,1 Lebenswochen in Gruppe 3B, 28,0 Lebenswochen in Gruppe 3C und 21,0 Lebenswoche in der Kontrollgruppe 3D.

Diese Daten zeigen somit, dass ein Schutz vor Diabetes auch durch eine glutenfreie Nahrung mit Gliadinzusatz erreicht werden kann und Gliadin demnach nicht das entscheidende Agens ist, welches mit einem erhöhten Diabetesrisiko assoziiert werden kann.

3.4.2 Insulinautoantikörper-Prävalenzen der glutenfrei ernährten Mäusegruppen bei zehn Lebenswochen

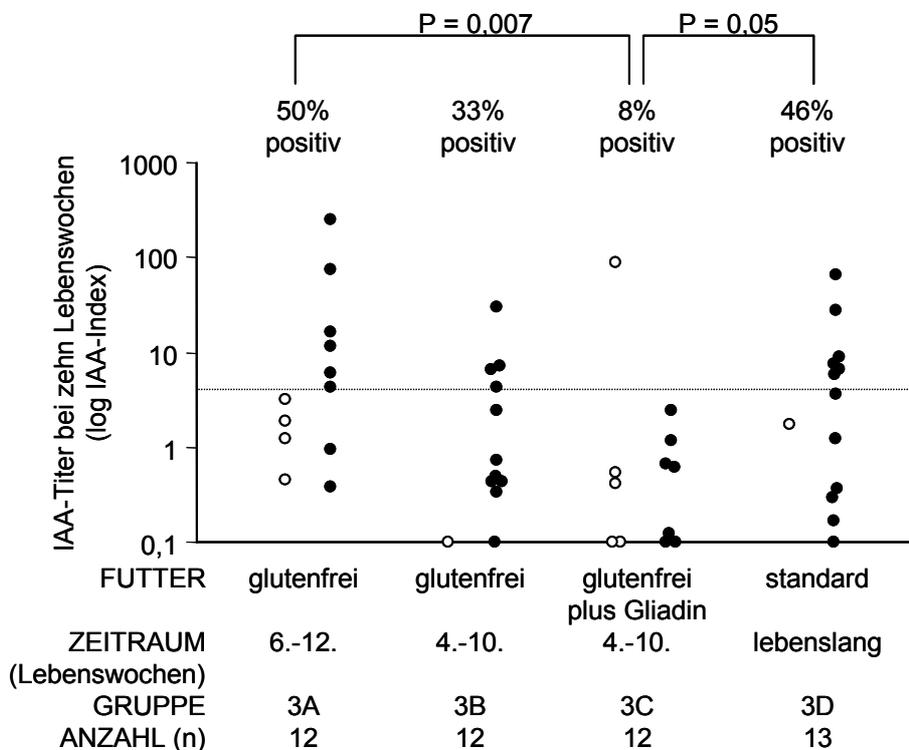


Abb. 20: IAA-Ergebnisse der glutenfrei über verschiedene Zeiträume und glutenfrei mit dem Zusatz von Gliadin ernährten weiblichen NOD Mäuse. Auf der x-Achse sind die Behandlungsgruppen angegeben, wobei Gruppe 3A die NOD Mäuse repräsentiert, die von der sechsten bis zwölften Lebenswoche glutenfrei (n = 12) ernährt wurden. Gruppe 3B repräsentiert die von der vierten bis zur zehnten Lebenswoche glutenfrei (n = 12), Gruppe 3C die von der vierten bis zur zehnten Lebenswoche glutenfrei mit Gliadinzusatz (n = 12) und Gruppe 3D die ausschließlich mit Standardnahrung ernährten Mäuse (n = 13). Die y-Achse zeigt die IAA-Indizes auf einer logarithmischen Skalierung bei zehn Lebenswochen. Die ausgefüllten Punkte repräsentieren die Mäuse, die Diabetes entwickelt haben und die offenen Punkte jene, die keinen Diabetes manifestiert haben. Über den Messwerten der jeweiligen Gruppen sind die IAA-Prävalenzen in Prozent (%) angegeben; die Verbindungslinien markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Die gepunktete Linie entspricht dem Grenzwert für Positivität.

Die IAA-Prävalenz bei zehn Lebenswochen liegt bei 50% in der von der sechsten bis zwölften Lebenswoche glutenfrei ernährten Gruppe 3A, bei 33% in der von der vierten bis zur zehnten Lebenswoche glutenfrei ernährten Gruppe 3B, bei 8% in der von der vierten bis zur zehnten Lebenswoche glutenfrei mit Gliadinzusatz ernährten Gruppe 3C und bei 46% in der mit Standardnahrung ernährten Kontrollgruppe 3D (Abb. 20). Auffällig niedrig ist die IAA-Häufigkeit in Gruppe 3C. Sie ist signifikant geringer als in Gruppe 3A ($P = 0,007$) und in der Kontrollgruppe 3D ($P = 0,05$). In allen vier Gruppen wurden die Tiere, die später im Leben Diabetes entwickelten, von denen ohne Diabetes-Manifestation unterschieden. Dabei wird sehr markant sichtbar, dass von elf Tieren aus allen Gruppen, die

nicht an Autoimmundiabetes erkrankten, nur eines (9%) bei zehn Lebenswochen IAA-positiv war. Dagegen hatten 42% (16/38) der Mäuse, die während der Nachverfolgung Diabetes entwickelten, positive IAA-Titer bei zehn Lebenswochen.

3.4.3 IgG-spezifische Anti-Gliadin-Antikörper-Prävalenzen der glutenfrei ernährten Mäusegruppen bei zehn Lebenswochen

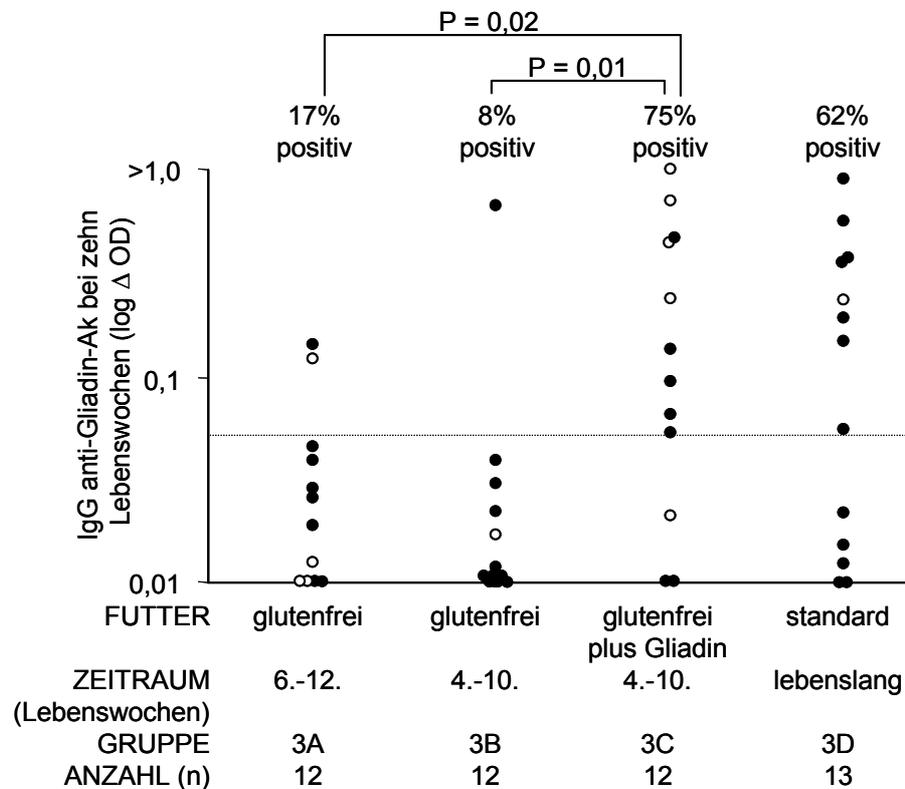


Abb. 21: IgG-spezifische Anti-Gliadin-Antikörper-Ergebnisse der glutenfrei über verschiedene Zeiträume und glutenfrei mit dem Zusatz von Gliadin ernährten NOD Mäuse bei zehn Lebenswochen. Auf der x-Achse sind die Behandlungsgruppen angegeben, wobei Gruppe 3A die NOD Mäuse repräsentiert, die von der sechsten bis zwölften Lebenswoche glutenfrei (n = 12) ernährt wurden. Gruppe 3B repräsentiert die von der vierten bis zur zehnten Lebenswoche glutenfrei (n = 12), Gruppe 3C die von der vierten bis zur zehnten Lebenswoche glutenfrei mit Gliadinzusatz (n = 12) und Gruppe 3D die ausschließlich mit Standardnahrung ernährten NOD Mäuse (n = 13). Die y-Achse zeigt die Anti-Gliadin-Ak-Titer in Δ OD auf einer logarithmischen Skalierung bei zehn Lebenswochen. Die ausgefüllten Punkte repräsentieren die Mäuse, die Diabetes entwickelt haben, und die offenen Punkte jene, die keinen Diabetes manifestiert haben. Über den Messwerten der jeweiligen Gruppen sind die Anti-Gliadin-Ak-Prävalenzen in Prozent (%) angegeben. Die gepunktete Linie entspricht dem Grenzwert für Positivität.

Bei zehn Lebenswochen haben 17% der Mäuse in der von der sechsten bis zwölften Lebenswoche glutenfrei ernährten Gruppe 3A und 8% (1/12) in der von der vierten bis zur zehnten Lebenswoche glutenfrei ernährten Gruppe 3B positive IgG-spezifische Anti-Gliadin-Ak (Abb. 21). Die Mäuse der Gruppe 3A hatten bei zehn Lebenswochen vier, die Mäuse der Gruppe 3B dagegen bereits sechs glutenfreie Wochen absolviert. In Gruppe, deren Mäuse bei zehn Lebenswochen sechs Wochen mit glutenfreiem Futter plus Gliadinzusatz durchlaufen hatten, wurde mit 75% erwartungsgemäß eine hohe Anti-Gliadin-Ak-Prävalenz gefunden. In der Kontrollgruppe waren 62% der Mäuse Anti-Gliadin-Ak-positiv. Die Anti-Gliadin-Ak bei zehn Lebenswochen waren in den von der vierten zur zehnten

bzw. sechsten bis zwölften Lebenswoche glutenfrei ernährten Gruppen 3A und 3B signifikant niedriger als in der mit glutenfreiem Futter plus Gliadinzusatz ernährten Gruppe 3C (3A vs. 3C $P = 0,02$ und 3B vs. 3C $P = 0,01$). Die Antikörper-Titer in Gruppe 3B waren zusätzlich signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Positive oder negative Anti-Gliadin-Ak bei zehn Lebenswochen waren bei den untersuchten Mäusen nicht mit deren IAA-Titern oder der Manifestation von Autoimmundiabetes assoziiert.

3.5 Auswirkungen der oralen Zufuhr von HR-Antagonisten auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes und das Immunsystem von weiblichen NOD Mäusen

In diesem Untersuchungsteil sollte geprüft werden, ob eine Therapie mit Histamin-1-Rezeptor (H1R)-, bzw. H2R-Antagonisten bei weiblichen NOD Mäusen Einfluss auf die Entwicklung der Immunantwort und die Diabetesentstehung hat. Die Immunantwort wurde durch Messung der Insulinautoantikörper (IAA) und IAA-Subklassen, sowie der humoralen und zellulären Reaktivität auf Tetanus nach einer bei allen Tieren durchgeführten Diphterie-tetanus (DT)-Vakkzinierung charakterisiert.

3.5.1 Diabetes-Inzidenzen der oral mit H1R- und H2R-Antagonisten behandelten Mäuse

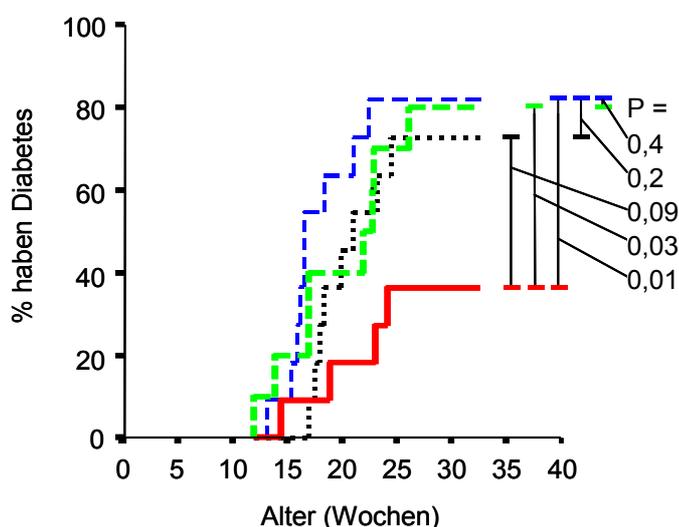


Abb. 22: Kumulatives Diabetesrisiko der weiblichen NOD Mäuse nach der Zufuhr von H1R- und H2R-Antagonisten über das Trinkwasser. Überlebensanalysen der Diabetesrisiken wurden durchgeführt und nach den vier Behandlungsgruppen dieser Studie gruppiert. Die rote Linie repräsentiert die mit H1R-Antagonisten plus DT ($n = 11$), die grüne Linie die mit H2R-Antagonisten plus DT ($n = 10$), die schwarze Linie die nur mit DT behandelten ($n = 11$) und die blaue Linie die unbehandelten Kontrollmäuse ($n = 10$).

Die Diabetesentwicklung bei NOD Mäusen konnte durch eine Therapie mit H1R-Antagonisten plus DT signifikant reduziert werden (Abb. 22). Sie liegt bei 36% gegenüber 82% in der unbehandelten Kontrollgruppe ($P = 0,01$). Eine Therapie mit H2R-Antagonisten plus DT oder mit DT alleine führte zu keiner signifikanten Reduktion der Diabeteshäufigkeit (80% und 73%, $P > 0,05$).

3.5.2 Insulinautoantikörper-Prävalenzen der oral mit H1R- und H2R-Antagonisten behandelten Mäuse bei zehn Lebenswochen

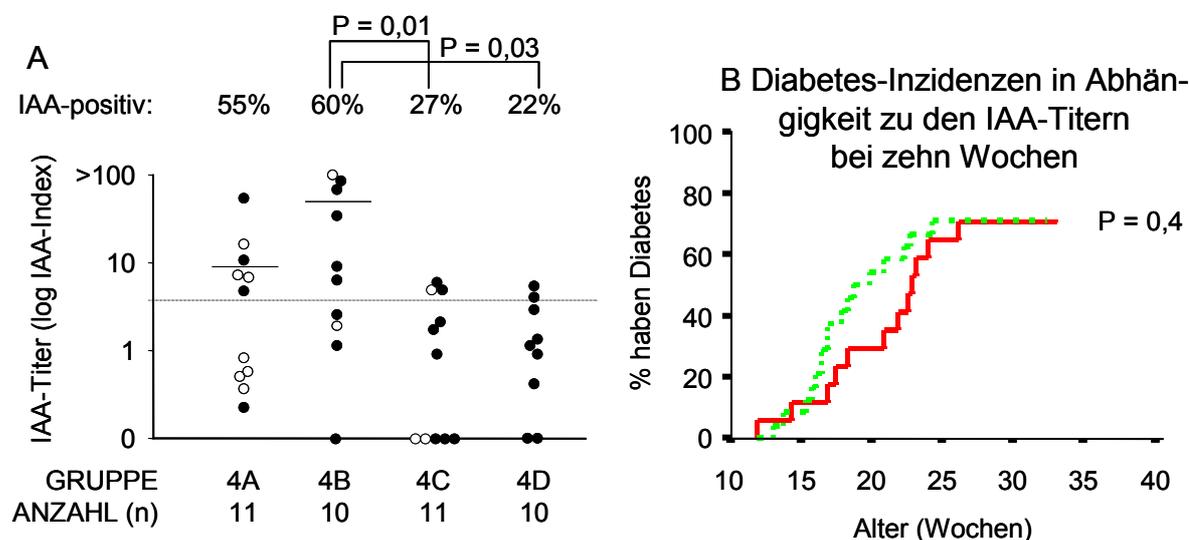


Abb. 23: IAA-Ergebnisse der oral mit H1R- und H2R-Antagonisten behandelten NOD Mäuse bei zehn Lebenswochen und ihre Diabetesentwicklung in Abhängigkeit zu diesen IAA-Titern. In A) sind die IAA-Ergebnisse bei zehn Lebenswochen dargestellt. Auf der x-Achse sind die Behandlungsgruppen angegeben, wobei Gruppe 4A die NOD Mäuse repräsentiert, die mit H1R-Antagonisten plus DT (n = 11) behandelt wurden, Gruppe 4B repräsentiert die mit H2R-Antagonisten plus DT (n = 10), Gruppe 4C die nur mit DT behandelten (n = 11) und Gruppe 4D die unbehandelten Kontrollmäuse (n = 10). Auf der y-Achse sind die IAA-Indizes auf einer logarithmischen Skalierung dargestellt. Die ausgefüllten Punkte repräsentieren die Mäuse, die Autoimmundiabetes entwickelt haben, und die offenen Punkte die, die keinen Diabetes manifestierten. Über den Messwerten sind die IAA-Prävalenzen in Prozent (%) angegeben. Die horizontalen Linien markieren den Median der positiven IAA-Titer von den Mäusen der mit dem H1R-Antagonisten behandelten Gruppe 4A und der mit dem H2R-Antagonisten behandelten Gruppe 4B. Die gepunktete Linie entspricht dem Grenzwert für Positivität. In B) sind die Diabetes-Inzidenzen von allen Mäusen dieses Untersuchungsteils dargestellt, gruppiert nach deren positiven (durchgezogene Linie, n = 17) oder negativen (gestrichelte Linie, n = 24) IAA-Titern bei zehn Lebenswochen.

NOD Mäuse, die mit dem H2R-Antagonisten behandelt wurden, zeigen signifikant höhere IAA-Titer als die Kontrollgruppen (Median positive IAA-Titer: In der mit dem H1R-Antagonisten plus DT behandelten Gruppe 4A 9,2, in der mit dem H2R-Antagonisten plus DT behandelten Gruppe 4B 53,4, in der nur mit DT immunisierten Gruppe 4C 5,1 und in der unbehandelten Kontrollgruppe 4D 4,9; 4B vs. 4C P = 0,01 und 4B vs. 4D P = 0,03) (Abb. 23A). Die IAA-Mengen korrelieren nicht mit der späteren Diabetesentwicklung (Abb. 23B). Das kumulative Diabetesrisiko bei zweiunddreißig Lebenswochen ist 71% bei den IAA-negativen und 71% bei den IAA-positiven Mäusen (P > 0,05).

3.5.3 Insulinautoantikörper-Subklassen der oral mit H1R- und H2R-Antagonisten behandelten Mäuse bei zehn Lebenswochen

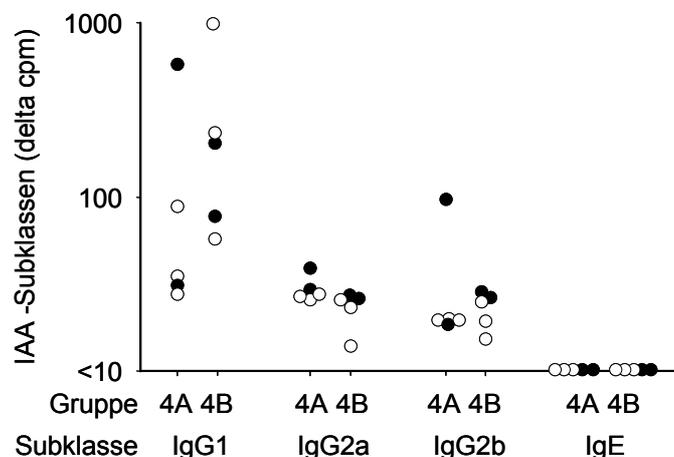


Abb. 24: IAA-Subklassenergebnisse der oral mit H1R- und H2R-Antagonisten behandelten weiblichen NOD Mäuse bei zehn Lebenswochen. Auf der x-Achse sind jeweils die Gruppen der mit H1R- bzw. H2R-Antagonisten behandelten Mäuse nebeneinander aufgetragen, wobei Gruppe 4A die mit H1R-Antagonisten plus DT (n = 11) und Gruppe 4B die mit H2R-Antagonisten plus DT (n = 10) behandelten NOD Mäuse repräsentiert. Zusätzlich sind die zu den Messwerten gehörigen IAA-Subklassen bei zehn Lebenswochen auf der x-Achse angegeben. Die y-Achse zeigt die IAA-Subklassentiter in Δ cpm auf einer logarithmischen Skalierung. Die ausgefüllten Punkte markieren die Mäuse, die Autoimmundiabetes entwickelt haben, und die offenen Punkte jene, die keinen Diabetes manifestierten.

Das IAA-Subklassenprofil unterscheidet sich zwischen den unterschiedlichen Behandlungsgruppen nicht (Abb. 24). IgG1 ist die dominante IAA-Subklasse bei den mit H1R- und H2R-behandelten Gruppen. Entsprechend der Gesamt-IgG-Ak-Ergebnisse sind auch die IgG1-IAA in der mit H2R-Antagonisten plus DT behandelten Gruppe 4B höher als in der mit dem H1R-Antagonisten plus DT behandelten Gruppe 4A (Median Δ cpm IgG1-IAA: 4A 35,5 und 4B 200,0). IAA der Subklassen IgG2a und IgG2b waren in beiden Gruppen in ähnlich geringen Mengen vorhanden und IAA der Subklasse IgE waren bei keiner der Mäuse detektierbar.

3.5.4 Anti-Tetanus-Toxoid-Subklassen-Antikörper der oral mit H1R- und H2R-Antagonisten behandelten Mäuse bei zehn und sechzehn Lebenswochen

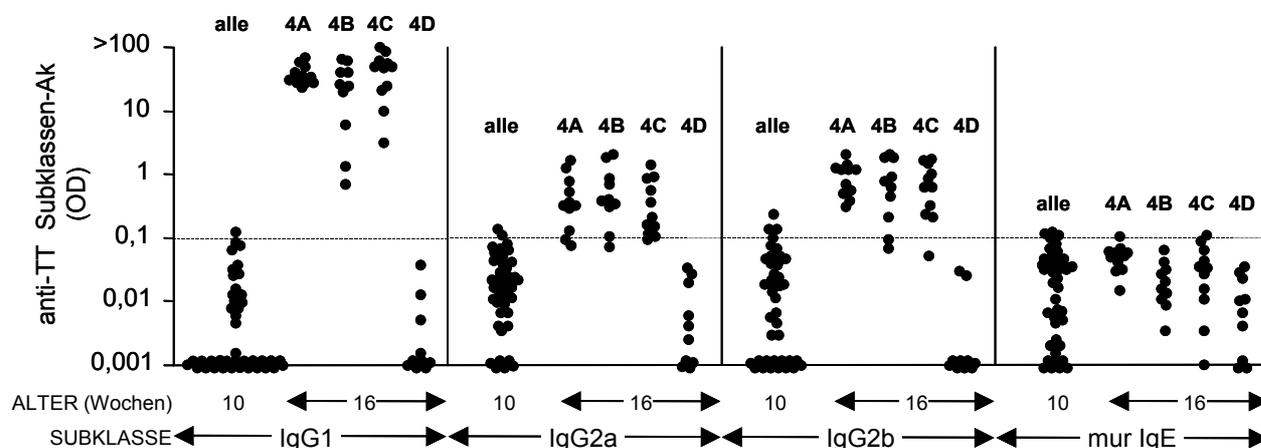


Abb. 25: Anti-TT-Subklassenergebnisse der oral mit H1R- und H2R-Antagonisten behandelten weiblichen NOD Mäuse bei zehn und sechzehn Lebenswochen. Auf der x-Achse sind die Zeitpunkte der Messungen angegeben, wobei die Ergebnisse bei zehn Lebenswochen, die vor der ersten Immunisierung mit DT-Impfstoff liegen, für alle Gruppen gemeinsam dargestellt sind. Gruppe 4A repräsentiert die NOD Mäuse, die mit H1R-Antagonisten plus DT ($n = 11$), Gruppe 4B die mit H2R-Antagonisten plus DT ($n = 10$), Gruppe 4C die nur mit DT behandelt wurden ($n = 11$) und Gruppe 4D die unbehandelten NOD Mäuse ($n = 10$). Zusätzlich sind die zu den Messwerten gehörigen Anti-TT-Subklassen markiert. Die y-Achse zeigt die detektierten Anti-TT-Subklassentiter als OD auf einer logarythmischen Skalierung. Die gestrichelte Linie entspricht dem Grenzwert für Positivität.

Subkutane Immunisierungen mit DT-Impfstoff bei zehn und vierzehn Lebenswochen führten zu starken Antikörper-Antworten mit sehr hohen Anti-Tetanus-Toxoid-Antikörper(TT-Ak)-Titern bei sechzehn Lebenswochen (Abb. 25). Wie erwartet wurden in der nicht mit DT immunisierten Gruppe keine Anti-TT-Ak gefunden. In allen drei immunisierten Gruppen gehörte die dominante Anti-TT-Ak-Menge zur Subklasse IgG1. IgG2a- und IgG2b-Anti-TT-Ak waren in 91% der immunisierten Tiere messbar, allerdings in viel geringeren Mengen als die Subklasse IgG1. IgE-Anti-TT-Ak waren in keiner behandelten oder unbehandelten Maus messbar, weder vor noch nach den Immunisierungen. Die Anti-TT-Ak-Subklassenantworten in allen drei mit DT immunisierten Gruppen zeigen sehr ähnliche Profile mit fast identischen medianen Titern (Daten nicht gezeigt).

3.5.5 IL-4- und IFN- γ -Zytokinsekretion von murinen Milzlymphozyten nach Stimulation mit Tetanus-Toxoid

Für die Bestimmung der Zytokinsekretion nach Tetanus-Toxoid(TT)-Stimulation im Elispot wurden die präparierten und in flüssigem Stickstoff gelagerten murinen Milzzellen verwendet (siehe 2.1.1.8).

Tab. 10: Mit TT-stimulierte IFN- γ - und IL-4-Ausschüttungen von murinen Milzlymphozyten nach der Therapie mit H1R- bzw. H2R-Antagonisten

Gruppe	Diabetes?	IFN- γ Spots pro 200 000 Zellen	IL-4
4A	ja	26	76
4A	ja	16	49
4A	ja	180	48
4A	nein	1	0
4A	nein	111	91
4A	nein	0	0
4A	nein	0	0
4A	nein	48	82
4B	ja	64	140
4B	ja	2	5
4B	ja	1	19
4B	ja	0	0
4B	nein	0	0
4B	nein	0	0
4B	ja	0	0
4B	ja	0	0
4C	ja	5	30
4C	ja	87	>300
4C	ja	1	23
4C	ja	23	65
4C	nein	12	116
4C	nein	8	8
4C	ja	0	0
4C	ja	0	0
4C	ja	0	0
4C	ja	0	0

In keiner der nicht mit DT immunisierten Mäuse war eine Zytokinantwort nach der TT-Stimulation erkennbar (Gruppe 4D; Daten nicht gezeigt) (Tab. 10). Nur sechs Zellproben der mit dem H1R-Antagonisten plus DT behandelten Gruppe 4A beinhalteten Spot-auslösende Zellen, drei der mit dem H2R-Antagonisten plus DT behandelten Gruppe 4B

und sechs der nur mit DT behandelten Gruppe 4C. Das Vorhandensein einer Diabeteserkrankung korreliert nicht mit der Reaktivität der Zellen auf die Stimulation.

Die IL-4-Mengen korrelieren signifikant mit den IFN- γ -Mengen in den jeweiligen Gruppen (4A: $r = 0,7$, $P = 0,04$; 4B: $r = 0,97$, $P < 0,001$; 4C: $r = 0,95$, $P < 0,001$) und in allen drei Gruppen zusammen ($r = 0,93$, $P < 0,001$) (Tab. 10). Drei Zellproben von Mäusen aus Gruppe 4A sezernierten dominant IFN- γ , die übrigen drei IL-4. Im Gegensatz dazu schütteten alle drei reaktiven Zellproben aus Gruppe 4B und fünf von sechs Proben der Gruppe 4C dominant das Zytokin IL-4 aus. Eine weitere Probe der Gruppe 4C zeigte dieselbe Spotanzahl für IFN- γ und IL-4. Die Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der dominanten Zytokine waren nicht signifikant (4A vs. 4B $P = 0,5$, 4A vs. 4C $P = 0,2$ und 4B vs. 4C $P = 1,0$). Weder eine IL-4- noch eine IFN- γ -Dominanz noch die Spotmenge ist mit dem Vorhandensein von Autoimmundiabetes bei den Mäusen assoziiert.

3.6 Auswirkungen der Behandlung mit Calcitriol bei erwachsenen Personen mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes auf deren β -Zellreserve und Autoimmunität

In diesem Untersuchungsabschnitt wurden erwachsene Personen mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes täglich oral mit 0,25 μ g Calcitriol über einen Zeitraum von neun Monaten behandelt. Anhand dieser Personen sollte, vergleichend zu einem unbehandelten Kontrollkollektiv, die Frage beantwortet werden, ob Calcitriol als aktive Vitamin D₃-Form in einer tolerablen, nicht-toxischen Dosis Wirkungen auf das Immunsystem hat und als Folge davon die β -Zellrestfunktion der Personen erhalten werden kann (siehe 1.2.6). Der Einfluss auf die β -Zellrestfunktion wird durch Verlaufsmessungen von C-Peptid, HbA_{1c} und Insulinbedarf (Insulinmenge pro kg KG) bestimmt. Auswirkungen auf das Immunsystem sollen an Hand von I(A)A und deren Subklassen analysiert werden. Zusätzliche sollen verschiedene sequentiell gemessene Safety-Parameter ausgewertet werden, die Aussagen zur Sicherheit der Calcitriol-Einnahme ermöglichen.

3.6.1 Venöse C-Peptid-Mengen nüchtern und nach Stimulation mit einer Mischmahlzeit

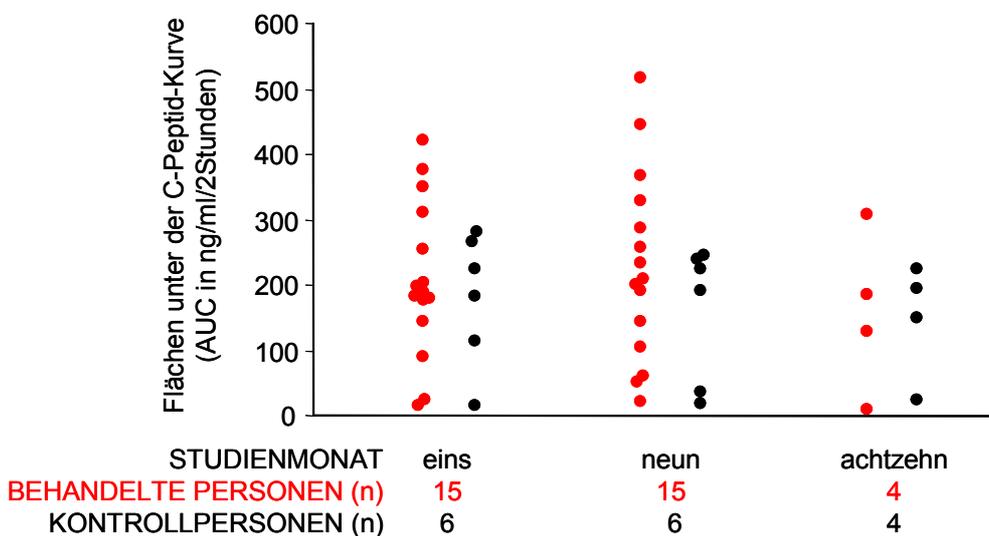


Abb. 26: C-Peptid-Ergebnisse der mit Calcitriol behandelten und der Kontrollpersonen im Studienverlauf. Auf der x-Achse sind die Messzeitpunkte und die Anzahl der gemessenen Personen aufgetragen. Auf der y-Achse sind die C-Peptid-Mengen als Flächen unter den Kurven der Messwerte (AUC) in ng/ml/2 Stunden aufgetragen. Die roten Punkte repräsentieren die mit Calcitriol behandelten und die schwarzen Punkte die unbehandelten Personen.

In Abbildung 26 sind die Flächen unter den Kurven der C-Peptid-Messwerte (AUC) pro Patient und Gruppe dargestellt. Die Kurve aus den Mittelwerten dieser AUC von den mit Calcitriol behandelten Personen liegt zu allen drei betrachteten Zeitpunkten oberhalb der Kurve der Kontrollpersonen. Dies spricht für eine insgesamt bessere mittlere Insulinreserve in der Behandlungsgruppe (Abb. 27).

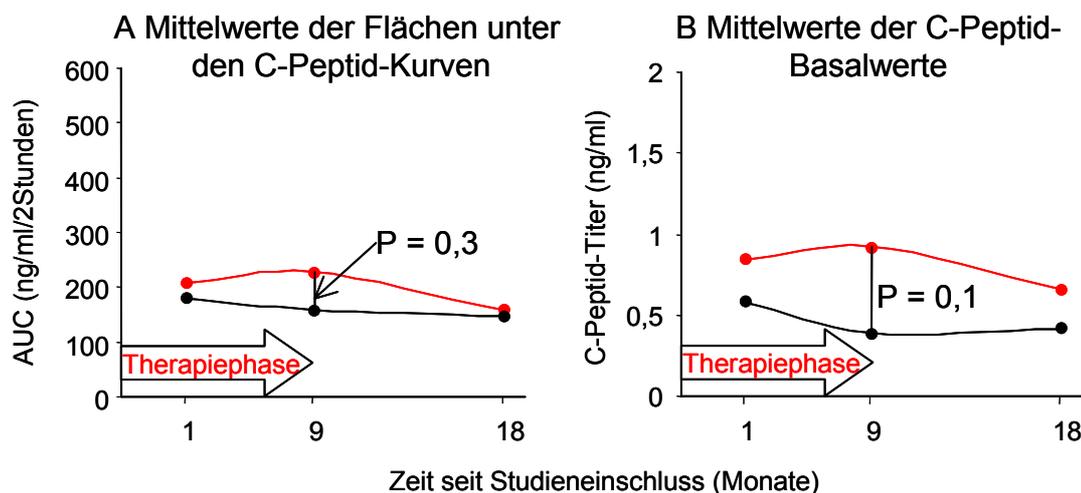


Abb. 27: C-Peptid-Ergebnisse der mit Calcitriol behandelten und der Kontrollpersonen als Mittelwerte der AUC und die Mittelwerte der basalen C-Peptid-Mengen. Auf der x-Achse sind die Messzeitpunkte in Monaten nach Studieneinschluss aufgetragen. Die Behandlung mit Calcitriol erfolgt vom Einschluss bis zum neunten Studienmonat. Auf der y-Achse sind A) die arithmetischen Mittel der Flächen unter den C-Peptid-Messwerten in ng/ml/2 Stunden und B) die arithmetischen Mittel der basalen C-Peptid-Werte in ng/ml aufgetragen. Die roten Linien repräsentieren die mit Calcitriol behandelten und die schwarzen Linien die unbehandelten Personen.

Die arithmetischen Mittelwerte der Flächen unter den C-Peptid-Messwerten betragen beim ersten Studienmonat 207,2 (\pm 119,1 SD) ng/ml/2 Stunden in der mit Calcitriol behandelten und 179,6 (\pm 100,9 SD) ng/ml/2 Stunden in der Kontrollgruppe (Abb. 27A). Bei neun Monaten steigt dieser Wert in der Behandlungsgruppe auf 227,9 (\pm 144,0 SD) ng/ml/2 Stunden an, fällt hingegen in der Kontrollgruppe auf 159,0 (\pm 104,5 SD) ng/ml/2 Stunden ab ($P = 0,3$). Zum achtzehnten Monat nach Studieneinschluss hin fallen die Mengen in beiden Gruppen ab.

Zusätzlich sind die basalen C-Peptid-Mengen vergleichend dargestellt, die in den unstimulierten Blutproben vor der Einnahme der Mischmahlzeit gemessen wurden (Abb. 27B). Auch hier liegt die Kurve der behandelten Personen zu allen drei Zeitpunkten oberhalb der Kurve der Kontrollpersonen. Die arithmetischen Mittelwerte der basalen C-Peptid-Mengen liegen beim ersten Studienmonat bei 0,84 (\pm 0,68 SD) ng/ml bei den behandelten und bei

0,59 (\pm 0,39 SD) ng/ml bei den Kontrollpersonen. Diese Werte steigen in der Behandlungsgruppe bei neun Monaten nach Studieneinschluss auf 0,91 (\pm 0,77 SD) ng/ml an, dagegen fallen sie in der Kontrollgruppe auf 0,40 (\pm 0,25 SD) ng/ml ab ($P = 0,1$). In den jeweils nur vier gemessenen Proben bei achtzehn Monaten nach Studieneinschluss fallen die Mengen in der Behandlungsgruppe auf 0,71 ng/ml ab und bleiben in der Kontrollgruppe mit 0,42 ng/ml konstant.

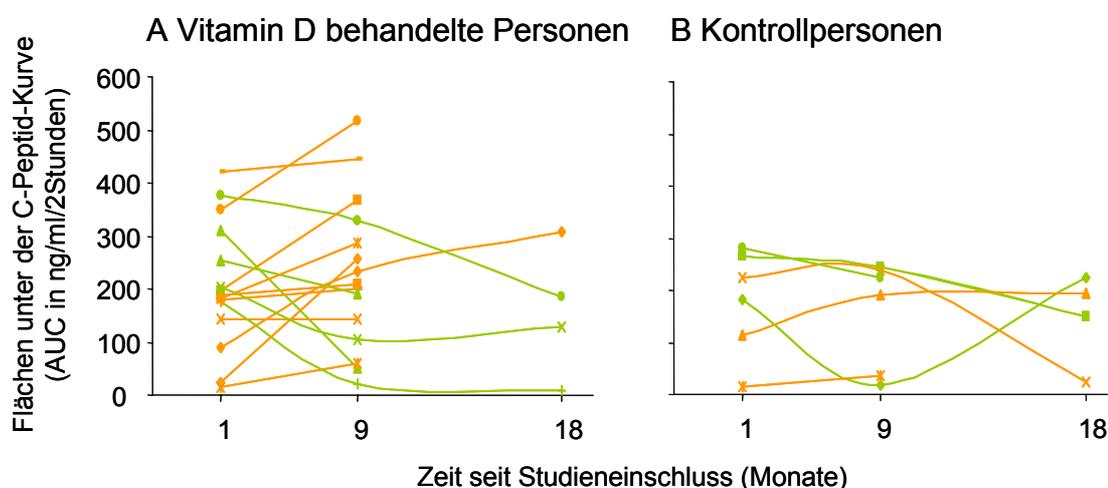


Abb. 28: C-Peptid-Ergebnisse der mit Calcitriol behandelten und der Kontrollpersonen im Studienverlauf. Auf der x-Achse sind die Messzeitpunkte in Monaten nach Studieneinschluss markiert. Auf der y-Achse sind die AUC in ng/ml/2 Stunden aufgetragen. In A) sind die individuellen Verläufe der mit Calcitriol behandelten und in B) die der unbehandelten Personen dargestellt. Die orangefarbenen Linien repräsentieren die Personen, deren C-Peptid-Mengen vom ersten zum neunten Studienmonat ansteigen, und die grünen die Personen, deren C-Peptid-Mengen vom ersten zum neunten Studienmonat abfallen.

Bei der Analyse der individuellen C-Peptid-Mengen der einzelnen Personen wird ein überwiegender Anstieg der Mengen in der mit Calcitriol behandelten Gruppe deutlich. In dieser steigen die Werte vom ersten zum neunten Studienmonat bei zehn Personen (67%) an und bei fünf Personen (33%) fallen sie ab (Abb. 28). In der Kontrollgruppe sind diese Verläufe dagegen ausgeglichen: bei drei Personen (50%) steigen die C-Peptid-Mengen vom ersten zum neunten Monat an und bei drei (50%) anderen fallen sie ab. Ein Anstieg oder Abfall der Werte ist nicht mit der Titerhöhe bei einem oder neun Studienmonaten assoziiert.

3.6.2 Insulin(auto)antikörper-Prävalenzen bei null, drei, neun und achtzehn Monaten nach Studieneinschluss

Bei Studieneinschluss und nach drei, neun und achtzehn Monaten danach wurden I(A)A gemessen. Laut Studienprotokoll wurden Personen mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes in die Studie eingeschlossen, deren Therapie mit exogenem Insulin unmittelbar vor Studieneinschluss begonnen hatte. Vor Studieneinschluss waren bei einer von allen in die Studie eingeschlossenen Personen positive I(A)A nachweisbar (7% (1/15) in der Behandlungs- und 0% (0/6) in der Kontrollgruppe).

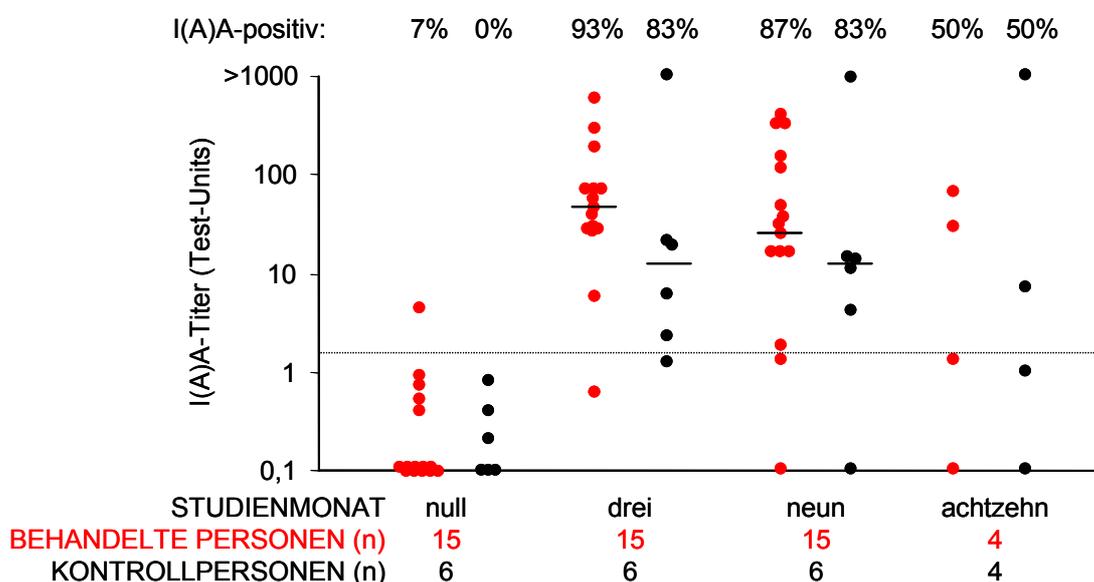


Abb. 29: I(A)A-Ergebnisse der mit Calcitriol behandelten und der Kontrollpersonen im Studienverlauf. Auf der x-Achse sind die Messzeitpunkte und die Anzahl der gemessenen Personen aufgetragen. Auf der y-Achse sind die IAA-Titer auf einer logarithmischen Skalierung in Test-Units dargestellt. Die roten Punkte repräsentieren die mit Calcitriol behandelten und die schwarzen Punkte die unbehandelten Personen. Über den Messwerten der Gruppen sind die I(A)A-Prävalenzen in Prozent (%) angegeben. Die gepunktete Linie entspricht dem Grenzwert für Positivität. Die horizontalen Linien markieren die Mediane der IAA-Titer der behandelten und der Kontrollpersonen bei drei und neun Studienmonaten.

Vom Studienbeginn zum dritten Studienmonat steigen die IA-Mengen, bedingt durch die Therapie mit exogenem Insulin, in beiden Personengruppen signifikant an (Abb. 29). In der mit Calcitriol behandelten Gruppe sind beim dritten Studienmonat 93% (14/15, $P < 0,001$) und in der Kontrollgruppe 83% (5/6, $P = 0,004$) IA-positiv. Im weiteren Verlauf sind die Veränderungen der IA-Mengen innerhalb der Gruppen nicht signifikant. Bei neun Studienmonaten zeigen 87% (13/15) der behandelten und 83% (5/6) der Kontrollpersonen positive IA-Titer ($P = 0,09$) und am Studienende, nach achtzehn Monaten, jeweils 50% (2/4) in beiden Gruppen ($P = 0,2$). Die medianen IA-Mengen liegen in der mit Calcitriol be-

handelten Gruppe bei drei Studienmonaten bei 44,4 Units und bei neun Studienmonaten bei 30,9 Units. Die Kontrollgruppe zeigt bei drei Studienmonaten mediane IA-Titer von 12,6 Units und bei neun Studienmonaten von 12,3 Units ($P = 0,6$; Abb. 29).

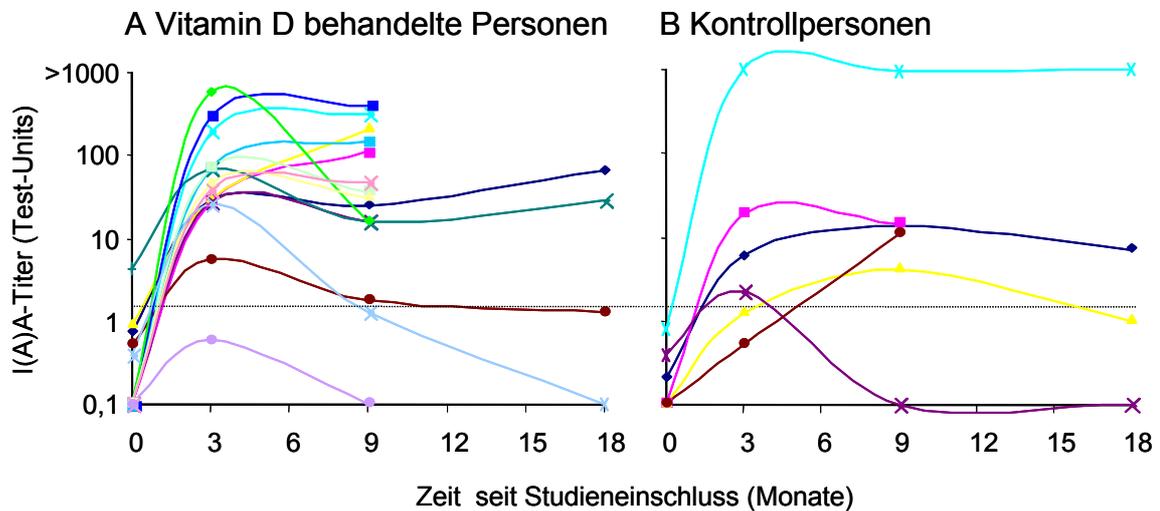


Abb. 30: Individuelle Verläufe der I(A)A-Ergebnisse der mit Calcitriol behandelten und der Kontrollpersonen im Studienverlauf. Auf der x-Achse sind die Messzeitpunkte in Monaten im Studienverlauf aufgetragen. Auf der y-Achse sind die I(A)A-Titer auf einer logarithmischen Skalierung in Test-Units dargestellt. Jede Person ist durch eine einzelne Linie repräsentiert. In A) sind die mit Calcitriol behandelten und in B) die unbehandelten Kontrollpersonen dargestellt. Die gepunktete Linie entspricht dem Grenzwert für Positivität.

3.6.3 Insulin(auto)antikörper-Subklassenverteilungen bei drei, neun und achtzehn Monaten nach Studieneinschluss

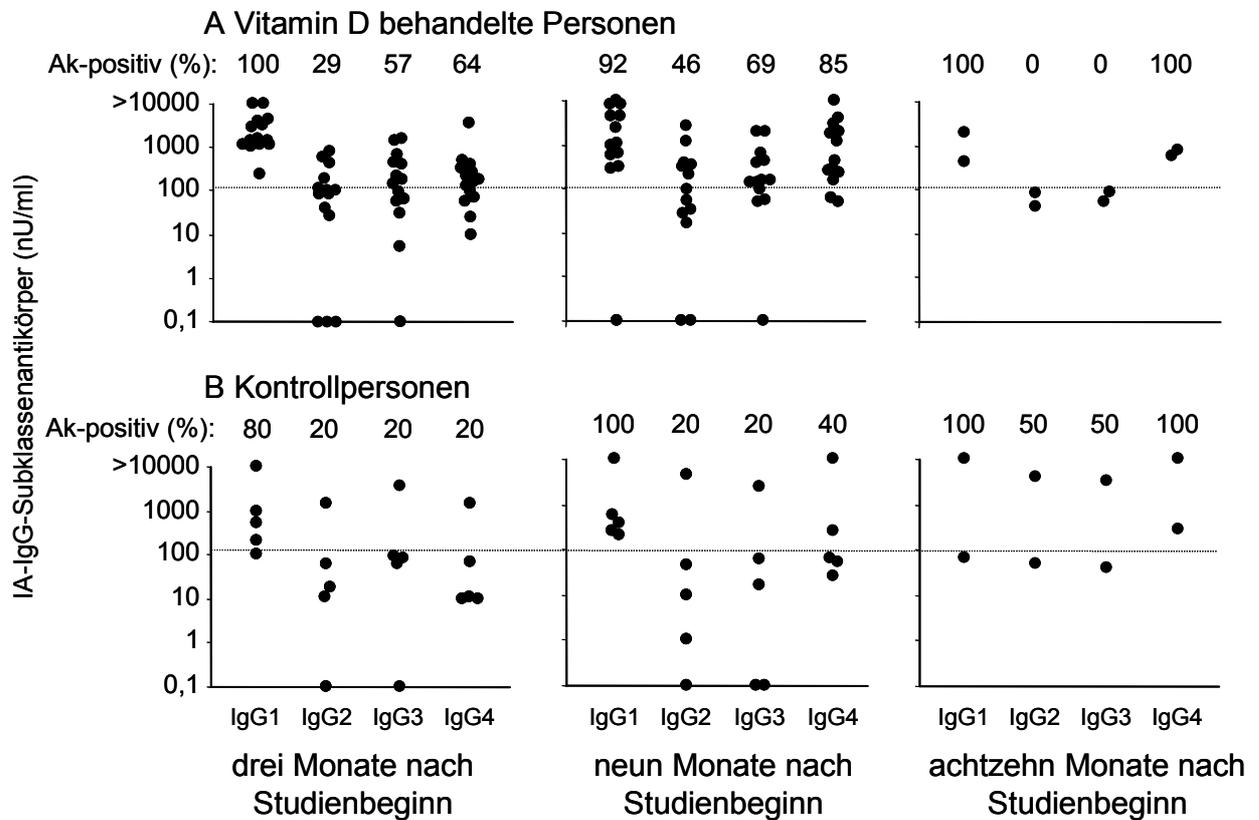


Abb. 31: I(A)A-Subklassen-Ergebnisse von den mit Calcitriol behandelten und den Kontrollpersonen im Studienverlauf. Auf der x-Achse sind die Messzeitpunkte in Monaten im Studienverlauf aufgetragen und die jeweilige I(A)A-Subklassen. Auf der y-Achse sind die I(A)A-Subklassen-Titer mit einer logarithmischen Skalierung in nU/ml aufgetragen. In A) sind die Messergebnisse der mit Calcitriol behandelten Personen und in B) die der unbehandelten Kontrollpersonen dargestellt. Die gepunkteten Linien entsprechen dem Grenzwert für Positivität.

Die IgG1-I(A)A-Subklasse ist sowohl bei drei als auch bei neun Monaten nach Studienbeginn in beiden Untersuchungsgruppen dominant (100% Prävalenz bei den behandelten und 80% bei den Kontrollpersonen bei drei und 92% und 100% bei neun Studienmonaten), gefolgt von der Subklasse IgG4 (64% und 20% mit drei und 85% und 40% mit neun Studienmonaten) (Abb. 31). Nicht bei allen Personen waren IgG2- und IgG3-I(A)A nachweisbar, teilweise nur mit sehr geringen Titern.

In beiden Untersuchungsgruppen steigt die IgG4-Prävalenz über die Zeit betrachtet stetig an. Drei Monate nach Studieneinschluss beträgt die IgG4-Prävalenz in der mit Calcitriol behandelten Gruppe 64% und in der Kontrollgruppe 20% ($P = 0,1$) und bei neun Monaten 85% in der behandelten und 40% in der Kontrollgruppe ($P = 0,3$).

Die medianen IgG4-I(A)A-Titer stiegen vom dritten zum neunten Monat in der Behandlungsgruppe von 172 auf 430 nU/ml, in der Kontrollgruppe von 11 auf 106 nU/ml an.

3.6.4 Glycosylierte Hämoglobinwerte und Insulinbedarf der mit Calcitriol behandelten und der Kontrollpersonen

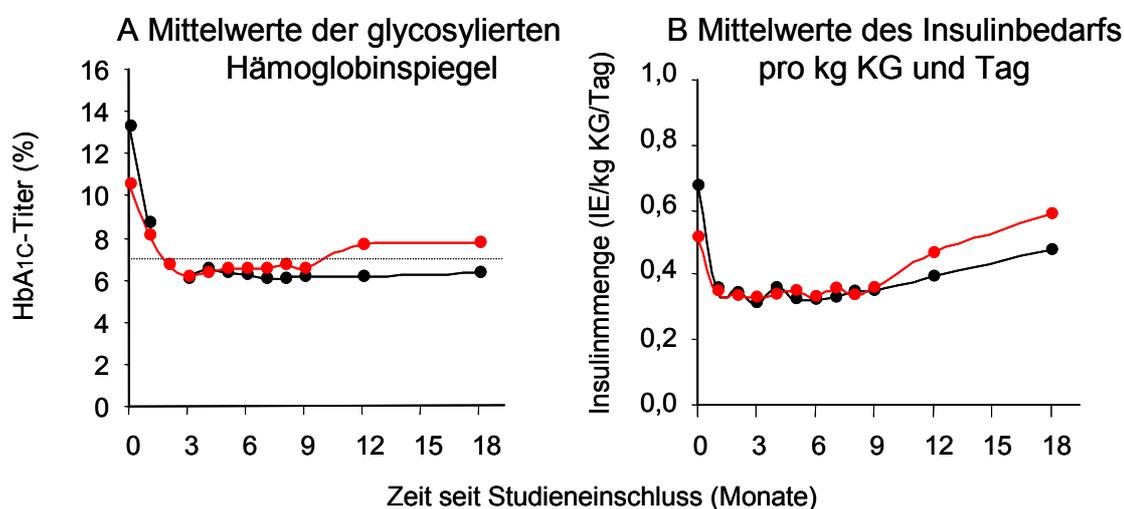


Abb. 32: Erfolgsparameter der Behandlung mit Calcitriol: die Mittelwerte der glycosylierten Hämoglobinspiegel und der mittlere Insulinbedarf im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Auf der x-Achse sind die Messzeitpunkte in Monaten nach Studieneinschluss aufgetragen. Auf der y-Achse sind in A) die arithmetischen Mittel der glycosylierten Hämoglobinspiegel (HbA_{1c}) in Prozent (%) und in B) die arithmetischen Mittel des Insulinbedarfs pro kg KG und Tag dargestellt. Die roten Linien repräsentieren die mit Calcitriol behandelten und die schwarzen Linien die unbehandelten Personen.

Es bestand kein Unterschied zwischen dem täglichen Insulinbedarf und der Stoffwechselkontrolle (HbA_{1c}) zwischen der Behandlungs- und der Kontrollgruppe (Abb. 32).

3.6.5 Engmaschig kontrollierte Safety-Parameter bei den mit Calcitriol behandelten Personen

Die bei den mit Calcitriol behandelten Personen gemessenen Safety-Parameter liegen fast ausschließlich im Normbereich. Siebenunddreißig Prozent der Personen zeigen erwartungsgemäß erhöhte Calciumausscheidungen im Vierundzwanzig-Stunden-Urin. Dabei liegt der höchste Messwert bei 24,4 mmol/24 Stunden (Normbereich: bis 10 mmol/24 Stunden). In diesem Fall wurde die Calcitriol-Zufuhr gesenkt, wobei die 0,25 µg nur jeden zweiten Tag eingenommen wurden. Für alle anderen Kontrollparameter lagen die Messwerte der mit Calcitriol behandelten Personen im Normbereich (Daten nicht gezeigt). Alle Ultraschalluntersuchungen zur Vorbeugung von Nephrocalcinosen bei neun und achtzehn Monaten nach Studieneinschluss ergaben normale Ergebnisse. Es wurden keine durch die tägliche Calcitriol-Einnahme verursachte Abweichungen in den beobachteten Parametern gefunden, die einen Abbruch der Calcitriol-Supplementierung bedingt hätten. Das spricht für die physiologische Sicherheit der gewählten Menge und für den oralen Aufnahmeweg des Calcitriols.

4 DISKUSSION

4.1 Einfluss der transplazentären Insel(auto)antikörperübertragung von Müttern auf das Autoimmundiabetesrisiko ihrer Nachkommen

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Applikation des Inselantigens Insulin die Diabetesentwicklung im NOD Mausmodell verhindern kann. Wöchentliche orale Gaben (Zhang 1991) und tägliche subkutane Injektionen (Atkinson 1990) führen ebenso zu einer signifikanten Verringerung der Diabetes-Inzidenz (25% und 8%) wie eigene Untersuchungen mit wöchentlichen Insulininjektionen kombiniert mit IFA (17%) bzw. dem Adjuvanz Montanide ISA 720 (Diabetes-Inzidenz 10%; Koczwara 2003). Verringerte Diabetes-Inzidenzen wurden ebenfalls nach Immunisierungen mit Plasmid-DNA der Insulin-B-Kette plus IFA (Coon 1999), einem Peptid der Insulin-B-Kette mit und ohne IFA und dessen intranasale Verabreichung berichtet (Muir 1995, Daniel 1996). Diese Immunisierungen scheinen eine Th2-Antwort der β -zellspezifischen T-Zellen zu induzieren und Insulin scheint als potentes Antigen zur Toleranzinduktion zu wirken. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob solch eine Diabetes-Protektion auch während der Trächtigkeit hervorgerufen werden kann. Erstmals konnte nachgewiesen werden, dass Immunisierungen mit Insulin plus IFA vor bzw. während der Trächtigkeit ebenfalls eine signifikante Verringerung der Diabetes-Inzidenz (40%) bei NOD Muttertieren auslösen. Diese Verringerung bei trächtigen NOD Weibchen ist nicht so stark, wie für die Voruntersuchungen mit nicht trächtigen Mäusen beschrieben. Der Grund dafür scheint die Reduktion der Insulinmenge zu sein. Bei den eigenen Voruntersuchungen wurden NOD Weibchen pro Immunisierung mit 5 IE Insulin behandelt (Koczwara 2003) und im Rahmen dieser Arbeit wurden dagegen, mit Rücksichtnahme auf die Trächtigkeit, nur jeweils 3 IE Insulin injiziert.

Seit längerer Zeit wird vermutet, dass das Adjuvanz IFA allein Diabetes-protective Wirkungen hervorrufen kann (Hutchings 1998, Liddi 2000). Es gibt Beobachtungen, dass von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH hergestelltes IFA im NOD Modell Diabetes-protectiv ist, nicht aber das gleiche Adjuvanz von anderen Herstellern. Die Gründe dafür sind unbekannt (mündliche Auskunft von Herrn Dr. Leiter, The Jackson Laboratory). In dieser Arbeit wurden Kontrolltiere mit IFA plus Glucagon immunisiert, da Glucagon parallel zum Insulin im Pankreas ausgeschüttet wird und ebenfalls im Körper zirkuliert. Eine dritte Tiergruppe erhielt IFA plus NaCl. Die Diabetes-Inzidenz der vor bzw. während der Trächtigkeit mit IFA plus Glucagon immunisierten Muttertiere beträgt 17% und die der mit IFA plus NaCl im-

munisierten 40%. Die Inzidenzen beider Gruppen sind im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (100%) signifikant verringert. Dieses Ergebnis entspricht den Vorbefunden bezüglich dem von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH hergestellten IFA und bestärkt die Vermutung, dass dieses IFA auch ohne Kombination mit einem Protein protektiv auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes im NOD Modell wirken kann.

Es wurde beschrieben, dass intranasale Immunisierungen mit virusähnlichen Partikeln eines Rotavirus-Stamms bei Mäusemuttertieren Antikörper gegen diese Partikel generieren, die deren Jungtiere vor Rotavirus-induziertem Durchfall schützen können (Coste 2000). Zusätzlich konnten Immunisierungen mit inaktivem Enterovirus Typ 71 bei Muttermäusen deren Nachkommen vor tödlichen Virusgaben schützen (Yu CK 2000). Im Autoimmundiabetes bzw. bei anderen Autoimmunerkrankungen sind bisher keine Untersuchungen bezüglich der Übertragbarkeit von mütterlichem Schutz vor der Erkrankung auf die Nachkommen beschrieben worden. In dieser Studie sollte untersucht werden, ob ein bei den Muttertieren durch die Immunisierungen erreichter Diabetes-Schutz transplazentär auf deren weibliche Nachkommen übertragen werden kann. Unabhängig von den Wirkmechanismen, welche die durchgeführten Immunisierungen tatsächlich auslösen, konnte keine Gruppe von Muttertieren, die einen Schutz vor der Entwicklung von Autoimmundiabetes zeigte, diesen transplazentär auf ihre Nachkommen weitergeben. Die Nachkommen aller Untersuchungsgruppen zeigten eine sehr ähnliche Diabetes-Inzidenz wie die Nachkommen von unbehandelten Muttertieren (alle Gruppen etwa 80%). Das lässt vermuten, dass die schützenden Faktoren, die von den Immunisierungen ausgehen, die Plazenta nicht passieren bzw. die Entwicklung von Autoimmundiabetes bei den Nachkommen nicht beeinflussen können. Auch dann nicht, wenn die Immunisierungen während der Trächtigkeit durchgeführt werden.

Insulinautoantikörper sind die einzigen bisher identifizierten humoralen Marker, die spezifisch für Autoimmundiabetes im NOD Modell sind (Bonifacio 2001). Zusätzlich ist bekannt, dass murine Insulinautoantikörper zum IgG-Isotyp gehören (Koczwara 2003) und daher die Plazenta durchwandern können (Picher-Wilmott 1980). Der Einfluss dieser übertragenen Antikörper auf die Entwicklung von Inselautoimmunität und Diabetes bei den Nachkommen ist bisher ungeklärt. Sehr eindrucksvoll wurde kürzlich gezeigt, dass die Unterdrückung von mütterlichem Immunglobulin-Transfer die spontane Entwicklung von Autoimmundiabetes bei NOD Nachkommen verhindert (Greeley 2002). Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob der transplazentäre Transfer von Insulinautoantikörpern oder von durch Immunisierungen induzierten Insulinantikörpern die Entwicklung von Autoim-

mundiabetes bei den weiblichen NOD Nachkommen beeinflusst. Dazu wurde die Entwicklung von Insulinautoantikörpern und Autoimmundiabetes der Nachkommen in Abhängigkeit zu ihrem Antikörperstatus bei Geburt ermittelt. Die Insulinautoantikörpermengen der Jungtiere bei vier Lebenswochen korrelieren signifikant mit den Insulin(auto)antikörpermengen der Muttertiere bei der Entbindung, was dafür spricht, dass es sich dabei um Antikörper mütterlicher Herkunft handelt. Bei zehn Lebenswochen ist diese Korrelation nicht mehr vorhanden. Folglich repräsentieren die Insulinautoantikörper bei zehn Lebenswochen die von den Nachkommen selbst gebildeten Antikörper. Die kumulative Diabetes-Inzidenz der Nachkommen von Insulinautoantikörper-negativen Muttertieren ist 75%, von Insulinautoantikörper-positiven 82% und von Insulinantikörper-positiven 71%. Weder das Vorhandensein von Insulin(auto)antikörpern noch von sehr großen Mengen an induzierten Insulinantikörpern bei Geburt führt zu einer Veränderung der Insulinautoantikörper- und Diabetesentwicklung bei den weiblichen NOD Nachkommen. Das deutet darauf hin, dass die Auseinandersetzung des Fetus mit hohen Antikörpertitern gegen exogenes Insulin die Empfindlichkeit zum Autoantigen nicht beeinflusst. Das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Insulinautoantikörpern während der Fetalperiode ist wahrscheinlich nicht der Auslöser für die markante Diabetes-Verringerung, die für Nachkommen von NOD Muttertieren ohne B-Zellrepertoire (20%), von Immunglobulin-transgenen NOD Muttertieren ohne Insulinautoantikörper (20%) und von nicht autoimmunen DBA/2 Muttertieren durch Embryonentransfer (14%) berichtet wurde (Greeley 2002).

Die BABYDIAB Studie bot die Möglichkeit im Menschen zu untersuchen, inwieweit die Konfrontation mit Autoantikörpern, die gegen endogene Autoantigene (GAD oder IA-2) oder exogen verabreichtes Autoantigen (Insulin) gerichtet sind, im fetalen Entwicklungsstadium das Diabetesrisiko im späteren Leben beeinflussen kann. BABYDIAB ist eine Studie an Nachkommen von Eltern mit Typ 1 Diabetes und verfolgt über eintausend Kinder von Müttern mit Typ 1 Diabetes. In unserer eigenen und in anderen Arbeitsgruppen wurde gezeigt, dass Inselantikörper im Nabelschnurblut sehr stark mit den Antikörpermengen bei der Entbindung im mütterlichen Blut korrelieren. Daraus wurde geschlossen, dass eine Übertragung dieser Antikörper durch die Plazenta stattfindet (Ziegler 1993, Roll 1996). In der hier durchgeführten Studie wurde die Inselantikörper-Prävalenz im Nabelschnurblut von Kindern von Müttern mit Typ 1 Diabetes gemessen und mit der Entwicklung von eigener persistierender Inselautoreaktivität bzw. der Manifestation von Typ 1 Diabetes bei den Kindern verglichen. Antikörper gegen exogen verabreichtes Insulin wurden

bei 86% und Autoantikörper gegen GAD und/oder IA-2 bei 66% der Kinder im Nabelschnurblut nachgewiesen. Überraschenderweise konnte für die Nachkommen, die bei Geburt Autoantikörper gegen GAD und/oder IA-2 hatten, ein signifikant verringertes Diabetesrisiko nachgewiesen werden im Vergleich zu den Kindern, die Autoantikörper-negativ im Nabelschnurblut waren. Diese Verringerung war auch nach Korrektur um andere Faktoren, die das Diabetesrisiko beeinflussen (mütterliche Diabetesdauer, Schwangerschaftsdauer und Geburtsgewicht), signifikant. Dagegen hatte das Vorhandensein von Insulin(auto)antikörpern bei Geburt keinen Einfluss auf das Risiko der Kinder später im Leben Autoimmundiabetes oder Diabetes-assoziierte Antikörper zu entwickeln.

Vorrausgesetzt, dass die im Nabelschnurblut detektierten (Auto)antikörper die Antikörpermengen während der Schwangerschaft repräsentieren, lassen diese Ergebnisse schlussfolgern, dass die fetale Konfrontation mit Autoantikörpern gegen GAD und/oder IA-2 vor einer späteren Diabetesentwicklung schützen könnte. Eine Auseinandersetzung des Fetus mit Diabetes-spezifischer Autoimmunität ist nur im Uterus von selbst erkrankten Müttern möglich. Kinder von Vätern mit Typ 1 Diabetes, die in gesunden, nicht autoimmunen Müttern heranwachsen, haben diese Konfrontation nicht. Das Ergebnis dieser Arbeit wird von den gesicherten Beobachtungen gestärkt, dass bei Nachkommen von Müttern mit Typ 1 Diabetes ein verringertes Diabetesrisiko (Warram 1984, Bleich 1993, Pociot 1993) und eine verringerte Entwicklung von eigener Inselautoimmunität (Yu 1995) im Vergleich zu Nachkommen von Vätern mit Typ 1 Diabetes vorliegt. Dieser Schutz könnte durch eine effiziente Eliminierung von autoreaktiven T-Zellklonen, bedingt durch die antikörpervermittelte Präsentation von Autoantigenen während der fetalen Entwicklung ausgelöst werden. Eine andere mögliche Erklärung bietet ein beschriebener Mechanismus, der einen Zustand von immunologischer Ignoranz gegen Autoantigene als Resultat einer Antikörpervermittelten Blockierung der Präsentation von relevanten Autoantigenpeptiden beschreibt (Kurts 1999). Interessanterweise ist der Schutz, der aus der fetalen Konfrontation mit Autoantikörpern resultiert, bei den Kindern am stärksten, die nicht den typischen HLA DR3/DR4-DQ8-Risikogenotyp für Typ 1 Diabetes tragen. Das lässt vermuten, dass der vorliegende Mechanismus wahrscheinlich von speziellen HLA-Typen unabhängig ist.

Dieser Untersuchungsteil zeigt, dass bereits die sehr frühe Lebensphase im Uterus einen Einfluss auf das Risiko für die Entwicklung von Autoimmundiabetes und Inselautoimmunität hat. Die Ergebnisse im NOD Modell sprechen dafür, dass die Konfrontation des Fetus mit Insulin(auto)antikörpern die Entwicklung von Autoimmundiabetes später im Leben

nicht beeinflusst. Die Ergebnisse aus der BABYDIAB Studie sind abweichend und gehen darüber hinaus. Sie lassen das Fazit zu, dass die fetale Konfrontation mit Autoantikörpern sogar vor einer Diabetesentwicklung im späteren Leben der Kinder schützt. Eine ähnliche Untersuchung im Kollektiv der amerikanischen DAISY Studie, die ebenfalls Kinder von Eltern mit Typ 1 Diabetes von Geburt an untersucht, zeigt keinen Einfluss von Insel(auto)antikörpern im Nabelschnurblut auf das Diabetesrisiko. Diese Studie konnte allerdings auch keine Verringerung des Diabetesrisikos aufzeigen (Stanley 2003). Die Summe dieser Ergebnisse schließt transplazentär übertragene Inselautoantikörper quasi als Verursacher von Inselautoimmunität und Diabetes aus. Daher muss angenommen werden, dass die berichtete reduzierte Diabetes-Inzidenz bei Nachkommen von Mäusemuttertieren ohne IgG-Repertoire (Greeley 2002) von anderen Faktoren ausgelöst werden, wie zum Beispiel dem Entzug von bisher unbekanntem Autoantikörpern oder dem gesamten IgG-Repertoire an sich.

Ein wichtiger Aspekt für weiterführende Untersuchungen über die Auswirkungen von mütterlichen Autoantikörpern auf die Nachkommen ist die Aufklärung von unbekanntem Diabetes-assoziierten Autoantigenen im NOD Modell. Werden solche Autoantigene entdeckt, könnten ähnliche Analysen wie in dieser Arbeit mit Autoantikörpern gegen die neuen Autoantigene durchgeführt werden. Dadurch könnten womöglich die ursächlichen Faktoren für den Einfluss auf das Diabetesrisiko der Nachkommen im IgG-Repertoire der Muttertiere identifiziert bzw. die Ergebnisse des BABYDIAB Kollektivs bezüglich des schützenden Einflusses von Autoantikörpern bestätigt werden. Ergänzende Untersuchungen im BABYDIAB Kollektiv könnten Antikörpersubklassen- und Epitopenanalysen der GADA und IA-2A sein. Diese Spezifitäten würden weiteren Aufschluss über deren Rolle und Besonderheiten bei der Verminderung des Diabetesrisikos der Kinder ermöglichen.

4.2 Einfluss der oralen Behandlung mit Mucin auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes und das Immunsystem im NOD Mausmodell

Voruntersuchungen über die Auswirkung von Mucin Typ 1 auf das Immunsystem lassen schlussfolgern, dass Mucin Typ 1 den Phänotyp der Immunreaktion hin zum Th2-Typ verschieben könnte (mündliche Auskunft von Herrn Dr. Piemonti). Bisher gibt es keine beschriebenen Studien zum Einsatz von Mucin als therapeutisches Agens bei Autoimmunerkrankungen. Ziel der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie war es durch die orale Verabreichung von Mucin Typ 1 die Entwicklung von Autoimmundiabetes bei weiblichen NOD Mäusen zu verhindern. Der spekulierte Mechanismus, der solch einem Schutz theoretisch zu Grunde liegt, soll durch eine proinflammatorische Aktivierung von dendritischen Zellen im darmassoziierten Immunsystem erreicht werden, die mit einer Th2-Dominanz einher geht. Idealerweise solle diese Th2-Dominanz auf das endogene Immunsystem übertragen und folgend die pankreatischen Inseln vor einer autoimmunen Zerstörung bewahrt werden. In der durchgeführten Studie wurden NOD Weibchen für dreißig Tage oral mit Mucin Typ 1 behandelt. Als Kontrolle dazu dienten unbehandelte Mäuse und Mäuse, die im gleichen Zeitraum Mucin Typ 3 bekamen. Mucin Typ 3 hat im Vergleich zum Mucin Typ 1 nur eine geringe Auswirkung auf das Immunsystem (Zhang S 1998).

Die Auswertung der Diabetes-Inzidenz bei sechsunddreißig Lebenswochen zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Mäusen. Die mit Mucin Typ 1 behandelte Untersuchungsgruppe zeigte eine signifikante Zunahme der Insulinautoantikörper im Verlauf von der zehnten Lebenswoche bis zum Exitus. Darüber hinaus waren die Insulinautoantikörpertiter bei Exitus in der Gruppe der mit Mucin Typ 1 behandelten Mäuse im Vergleich zu den mit Mucin Typ 3 und den Kontrollmäusen signifikant erhöht. Die Antikörperentwicklung der mit Mucin Typ 3 behandelten Mäuse war erwartungsgemäß sehr ähnlich wie bei den unbehandelten Tieren.

Th2-Immunität geht mit einer gesteigerten Antikörperproduktion einher, daher könnte die erhöhte Insulinautoantikörper-Prävalenz nach der Behandlung mit Mucin Typ 1 theoretisch für eine Verstärkung der Th2-Immunität und damit für eine Auswirkung von Mucin Typ 1 auf das Immunsystem sprechen. Dieser Effekt war aber anscheinend nicht so stark, dass er Einfluss auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes bei den Mäusen nehmen konnte. Daher sollten in zukünftigen Versuchen andere Applikationswege für Mucin Typ 1 getestet werden, die mit stärkeren Auswirkungen auf das Immunsystem assoziiert sind.

4.3 Auswirkungen glutenfreier Nahrung und glutenfreier Nahrung mit Gliadinzusatz auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes und das Immunsystem im NOD Mausmodell

Nahrungsmodifikationen können die Diabetes-Inzidenz in Tiermodellen verändern (Hoorfar 1993, Funda 1999, Reddy 2001, Beales 2002), wobei vor allem Proteine aus Weizen und der Sojabohne als diabetogen diskutiert werden (Scott 1988, Hoorfar 1993, Scott 1997, Flohe 2003). Das Diabetesrisiko kann durch orale Antigenadministration während der ersten Lebenswoche beeinflusst werden, allerdings wird das Risiko anscheinend von der Ernährung im Zeitraum nach der Entwöhnung stärker bestimmt (Scott 2002). Bei NOD Weibchen konnte durch lebenslange glutenfreie Ernährung eine signifikante Verzögerung und Verringerung der Diabetes-Inzidenz (15%) erreicht werden (Funda 1999). Auch Studien unserer Arbeitsgruppe erreichten bei NOD Weibchen, die lebenslang bzw. im Zeitraum nach der Entwöhnung (vierte bis zehnten Lebenswoche) glutenfrei ernährt wurden, verringerte Diabetes-Inzidenzen (51% und 36%). Diese gingen mit verringerten Insulinautoantikörper-Prävalenzen und geringerem Ausmaß an Insulitis einher. Diese Beobachtung spricht für eine durch glutenfreie Nahrung induzierte Veränderung der Diabetes-assoziierten Autoimmunität (Schmid 2004). Kürzlich wurde nachgewiesen, dass im NOD Modell nach weizenreicher Nahrung eine Verschiebung des intestinalen Zytokingleichgewichts hin zum Th1-Typ erfolgt. Das lässt eine Modulation des darmassoziierten Immunsystems als Beitrag zur Diabetesentwicklung vermuten (Flohe 2003). Der Mechanismus, der diesem Einfluss auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes zu Grunde liegt, ist bisher ungeklärt. Eine sehr frühzeitige Verabreichung von Gluten könnte zu einer Entzündung des Darms führen und/oder das Immunzellrepertoire verändern. Es könnte eine verstärkte Immunreaktion gegen Gluten selber oder gegen assoziierte Antigene stattfinden, die eine Ausweitung auf autoreaktive Zellen oder eine Unterdrückung von regulatorischen Zellen zur Folge hat. Andererseits könnte die Glutenverabreichung direkt oder indirekt zu Veränderungen der pankreatischen β -Zellen führen, die im Neugeborenen noch unreif sind. Anknüpfend an diese Ergebnisse und Hypothesen sollte in der vorliegenden Arbeit der exakte Zeitraum bestimmt werden, in dem sich die glutenfreie Ernährung positiv auf die Inselautoimmunität auswirkt. Darüber hinaus sollte analysiert werden, ob die Glutenkomponente Gliadin der Auslöser für den beobachteten Einfluss von Gluten auf die Diabetesentwicklung ist.

Dazu wurden weibliche NOD Mäuse untersucht. Die Mäuse in der ersten Gruppe wurden von der sechsten bis zur zwölften und in der zweiten Gruppe von der vierten bis zur zeh-

ten Lebenswoche mit glutenfreiem Futter ernährt. Eine dritte Tiergruppe wurde von der vierten bis zur zehnten Lebenswoche mit glutenfreiem Futter plus Gliadinzusatz gefüttert. Die Diabetes-Inzidenzen aller drei Gruppen bei zweiunddreißig Lebenswochen sind signifikant verringert im Vergleich zu einer lebenslang mit glutenhaltiger Standardnahrung gefütterten Kontrollgruppe (67%, 92%, 58% im Vergleich zu 92%). Bei zwanzig Lebenswochen betragen die Diabetes-Inzidenzen 17%, 0%, 8% im Vergleich zu 38% in der Kontrollgruppe und erklären die Signifikanz der Unterschiede. Die Verringerung der Diabetes-Inzidenz unter glutenfreier Ernährung entspricht den Erwartungen und den Vorergebnissen. Schlussfolgernd bleibt festzuhalten, dass auch eine kurzzeitige Ernährung ohne Gluten für vier Wochen direkt nach der Entwöhnung die Diabetesentwicklung in NOD Mäusen verzögert. Der kritische Zeitraum für den Einfluss von glutenfreier Nahrung scheint in der frühen Lebensphase direkt nach der Entwöhnung zu liegen. Die Zugabe der Glutenfraktion Gliadin kann den positiven Einfluss der glutenfreien Nahrung nicht aufheben. Folglich ist anscheinend Gliadin nicht die Diabetes-fördernde Substanz im Weizenprotein.

Bei Menschen mit Inselautoantikörpern konnte durch glutenfreie Ernährung keine Verringerung der Autoantikörpertiter erreicht werden (Hummel 2002). Bei NOD Mäusen beginnt die autoimmune Zerstörung der pankreatischen Inseln kurz nach der Geburt. Bei sechs Lebenswochen der Mäuse sind größere Insulinautoantikörpermengen zu erwarten als bei vier Lebenswochen. In den durchgeführten Untersuchungen zeigt bei zehn Lebenswochen die Mäusegruppe, die von der vierten bis zur zehnten Lebenswoche mit glutenfreiem Futter plus Gliadinzusatz ernährt wurde, eine signifikant verringerte Insulinautoantikörper-Prävalenz im Vergleich zu der von der sechsten bis zur zwölften Lebenswoche mit glutenfreiem Futter ernährten Gruppe und der Kontrollgruppe. Die von der sechsten bis zur zwölften Lebenswoche glutenfrei gefütterte Mäusegruppe zeigte bei zehn Lebenswochen eine ähnliche Insulinautoantikörper-Prävalenz wie die Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass glutenfreie Ernährung im Zeitraum von der vierten bis zur sechsten Lebenswoche Auswirkungen auf die Diabetes-assoziierte Autoimmunität der NOD Mäuse hat. Anscheinend kann glutenfreie Ernährung in dieser sehr frühen Phase der Diabetesentwicklung die Autoimmunität verlangsamen oder aufhalten, nicht aber in einer späteren Phase die dann bereits vorhandene Antikörpermengen verringern.

Eine Voruntersuchung beschreibt, dass kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Anti-Gliadinantikörpern und Autoimmundiabetes vorliegt (Scott 1991). Analysen der Anti-Gliadinantikörper im Rahmen dieser Studie ergaben bei zehn Lebenswochen signifikant verringerte Antikörper-Prävalenzen in beiden glutenfrei ernährten Tiergruppen im Ver-

gleich zur glutenfrei plus Gliadinzusatz gefütterten Tiergruppe. Die Anti-Gliadinantikörpertiter in der glutenfrei plus Gliadinzusatz ernährten Mäusegruppe war höher als bei den mit Standardfutter ernährten Tieren. Das könnte damit erklärt werden, dass Gliadin im Standardfutter in Vernetzung mit dem Glutenin als gesamter Gluten-Eiweißkörper vorliegt und nicht in aufgereinigter Form wie bei dem Gliadinzusatz, wodurch die Antikörperbildung erleichtert wird. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen und auch in dieser Studie liegt, entspricht den Voruntersuchungen (Scott 1991), keine Korrelation zwischen den Anti-Gliadinantikörpermengen und der Insulinautoantikörper- und Diabetesentwicklung vor.

Für Menschen wurde bereits vermutet, dass Gluten kein auslösendes Antigen im Typ 1 Diabetes ist (Hummel 2002) und darüber hinaus soll im Tiermodell ein nicht-Gluten-Weizenprotein Einflüsse auf das Immunsystem und den Autoimmundiabetes haben (MacFarlane 2003). Ein sehr wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist die Beobachtung, dass die durch glutenfreie Nahrung erreichte Verringerung der Diabetes-Inzidenz nicht durch den Zusatz der Glutenkomponente Gliadin aufgehoben wird. Folglich sollten zukünftige Untersuchungen von glutenmodifizierter Ernährung auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes die Rolle und die Auswirkungen der gesamten Weizenproteine (nur etwa 80% sind Gliadin und Glutenin, die übrigen sind Globuline und Albumine) oder sogar die gesamten Getreideproteine berücksichtigen. Nachdem als Ergebnis dieser Arbeit Gliadin als Verursacher der Effekte, welche die Entwicklung von Autoimmundiabetes fördern, unwahrscheinlich ist, sollte nicht zwangsläufig die Glutenkomponente Glutenin als Auslöser betrachtet werden.

4.4 Einfluss der oralen Zufuhr von Histamin-Rezeptor-Antagonisten auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes und das Immunsystem im NOD Mausmodell

Für Mäuse mit zerstörten Histamin-1-Rezeptoren wurde eine verstärkte Produktion des Th2-Zytokins IL-4 berichtet. Bei Mäusen mit zerstörten Histamin-2-Rezeptoren dagegen wurde sowohl eine verstärkte Sekretion von Th1- als auch von Th2-typischen Zytokinen gezeigt (Jutel 2001). Diese Beobachtung wurde im Rahmen dieser Arbeit auf das NOD Mausmodell übertragen. Es sollte untersucht werden, ob durch Aufnahme von Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten über das Trinkwasser eine Blockierung der Histamin-1-Rezeptoren erreicht werden kann, die zu einer Verschiebung hin zur Th2-Immunität führt und womöglich mit einer Verringerung der Diabetes-Inzidenz einhergeht.

Bei den oral mit Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten behandelten Mäusen wurde tatsächlich eine signifikante Verringerung der Diabetes-Inzidenz erreicht. Die in einer Kontrollgruppe parallel mit Histamin-2-Rezeptor-Antagonisten behandelten Mäuse zeigten eine ähnliche Diabetes-Inzidenz wie unbehandelte Tiere. Allerdings ergab die Analyse der Insulinautoantikörper-Prävalenzen bei zehn Lebenswochen signifikant gesteigerte Insulinautoantikörpertitern bei den mit Histamin-2-Rezeptor-Antagonisten behandelten Tieren. Antikörper sind ein charakteristisches Merkmal von Th2-Immunität und die verstärkten Insulinautoantikörpertiter könnten Marker für die erwartete Verstärkung der Th2-Immunität sein.

Unbehandelte NOD Mäuse haben ein Insulinautoantikörpersubklassenprofil, das von der mit dem Zytokin IL-4 assoziierten Subklasse IgG1 dominiert wird (Koczwara 2003). Die dieser Studie zugrunde liegende Untersuchung von Mäusen mit zerstörten Histamin-1- bzw. Histamin-2-Rezeptoren berichtet von einem signifikanten Anstieg der Antikörpersubklassen und -isotypen IgE, IgG1, IgG2b und IgG3 bei Mäusen ohne Histamin-1-Rezeptoren im Vergleich zu Mäusen ohne Histamin-2-Rezeptoren (Jutel 2001). Es wurde berichtet, dass Mäuse mit zerstörten Histamin-1-Rezeptoren eine Unterdrückung der IFN- γ - und eine Dominanz der IL-4-Zytokinausschüttung zeigen. Dagegen würden Mäuse ohne Histamin-2-Rezeptoren eine gesteigerte Ausschüttung von beiden Zytokinen zeigen (Jutel 2001). In dieser Arbeit konnten weder auf der Insulinautoantikörper- noch auf der Anti-Tetanus-Toxoid-Antikörpersubklassenebene Unterschiede zwischen den mit Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten und den mit Histamin-2-Rezeptor-Antagonisten behandelten Mäusegruppen nachgewiesen werden. Die Insulinautoantikörpersubklassenprofile beider Tiergruppen waren IgG1 dominiert und denen von unbehandelten NOD Mäusen sehr ähnlich. Folglich scheint in beiden Tiergruppen eine Th2-Immunität vorherrschend zu sein, was der

grundlegenden Annahme der Auswirkungen von Histamin-Rezeptor-Blockade entspricht. Ähnliches gilt für die Analysen der Anti-Tetanus-Toxoid-Antikörpersubklassen. Allerdings konnte eine tendenziell stärkere IFN- γ -Ausschüttung für die mit Histamin-1-Rezeptoren-Antagonisten behandelten Mäuse gezeigt werden. Diese Beobachtung widerspricht den Voruntersuchungen und dem beobachteten Diabetes-Schutz. Die mit Histamin-2-Rezeptoren-Antagonisten behandelten Tiere zeigten dagegen eine ähnliche Zytokinausschüttung wie die Kontrolltiere mit einer leichten IL-4-Dominanz. Überraschend wenige Zellproben, besonders von den mit dem Histamin-2-Rezeptor-Antagonisten Ranitidin behandelten Mäusen, reagierten auf die Tetanus-Toxoid-Stimulierung. Übereinstimmend mit den Voruntersuchungen von Jutel (2001) wurde in dieser Studie bei den Mäusen, die mit Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten behandelt wurden, eine signifikante Verringerung der Diabetes-Inzidenz erreicht. Daraus kann geschlossen werden, dass die Antikörpersubklassenanalyse bei der durchgeführten Intervention kein Marker ist, der die offensichtlich verursachten Auswirkungen auf das Immunsystem und die Diabetesentwicklung im NOD Modell darstellen kann. Die geringe Immunantwort der T-Lymphozyten auf die Tetanus-Toxoid-Stimulierung lässt die Vermutung zu, dass regulatorische T-Zellen eine Rolle spielen könnten. Diese könnten die T-Zellantwort auf die Stimulierung unterdrücken. Das würde für eine induzierende Wirkung von Ranitidin auf regulatorische T-Zellen sprechen, die die reaktiven T-Zellen in den behandelten Mäusen unterdrücken.

Schlussfolgernd widersprechen die Ergebnisse dieser Arbeit den Vorbefunden von Jutel (2001) nicht bezüglich der Verstärkung von Th2-Immunität nach Blockierung von Histamin-1-Rezeptoren. Allerdings sind sie kontrovers zu den Vorergebnissen mit dem Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten Ketotifen. Ketotifen wurde neun prädiabetischen erwachsenen Personen über drei Monate verabreicht um deren β -Zellfunktion zu erhalten. Die Intervention war nicht mit einem Schutz vor der Diabetesmanifestation verbunden (Bohmer 1994). Dieses gegensätzliche Ergebnis ist einerseits mit dem Ansatz der Intervention zu einem sehr späten Zeitpunkt in der Entwicklung von Autoimmundiabetes erklärbar und andererseits mit der sehr kleinen Untersuchungsgruppe. Allerdings könnte auch die Wirkung im NOD Modell von der Wirkung im Menschen abweichen. Daher sind zukünftige Untersuchungen zur Verifizierung des protektiven Einflusses der Histamin-1-Rezeptor-Blockade auf die Entstehung von Autoimmundiabetes und genauere Analysen des zugrunde liegenden Wirkmechanismus im Anschluss an diese Studie sehr viel versprechend. Ebenfalls scheint ein Einsatz von Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten in größeren Studienkollektiven gerechtfertigt zu sein.

4.5 Behandlung mit Calcitriol bei erwachsenen Personen mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes

Calcitriol hat starke immunmodulatorische Effekte (Holick 1995) und kann die Entwicklung von Typ 1 Diabetes beeinflussen. Einerseits nimmt Calcitriol Einfluss auf T-Lymphozyten, indem es ihre in vitro Proliferation verringert (Saggese 1989) und Zytokinprofile verschiebt, andererseits reduziert es die Antigenpräsentation, vermittelt durch die Reduktion von Th1-Zytokinen und kostimulatorischen Molekülen. Zusätzlich scheint Calcitriol die Menge an regulatorischen Zellen zu erhöhen (Adorini 2003). Ergebnisse verschiedener Studien zeigen, dass eine Einnahme von Lebertran während der Schwangerschaft (Stene 2000) und Vitamin D-Supplementen im ersten Lebensjahr zu einem stark reduzierten Diabetesrisiko führen (The Eurodiab Study 2 Study Group 1999, Stene 2000, Hypponen 2001). Diese von Calcitriol ausgelösten Veränderungen der Immunantwort gehen mit einer reduzierten Diabetes-Inzidenz im NOD Modell einher (Mathieu 1992, Mathieu 1994). Nach Supplementierung mit Calcitriol konnte im NOD Modell eine Verschiebung hin zur Th2-Immunantwort gegen Autoantigene des Pankreas induziert werden (Overbergh 2000).

In dieser Arbeit wurde eine Pilotstudie ausgewertet, die Personen mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes mit Calcitriol behandelt um zu untersuchen, ob die aktive Vitamin D₃-Form in einer tolerablen, nicht-toxischen Dosis eine Wirkung auf das humorale Immunsystem ausüben und ob dadurch ein Erhalt der β -Zellrestfunktion erreicht werden kann. Der Erhalt der körpereigenen C-Peptidreserve ist mit einem Schutz vor Diabetes-assoziierten Folgeerkrankungen verbunden (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group 1998, Steffes 2003). Aus diesem Grund wurde die Messung der verbleibenden C-Peptidspiegel in dieser Untersuchung als einer der Erfolgsparameter der Behandlung mit Calcitriol herangezogen. Dabei wurde kein negativer Effekt auf die C-Peptidreserve der behandelten Personen sichtbar, was für die Sicherheit der durchgeführten Intervention spricht. Allerdings ist bei der geringen Fallzahl in diesem Stadium der Analyse kein signifikanter Anstieg der C-Peptidreserven nach den Calcitrioleinnahmen nachweisbar. Ein wichtiger Faktor, der Einfluss auf die verbleibende C-Peptidreserve nimmt, ist die Einstellung des Glucosestoffwechsels. Der Verlauf der monatlich bestimmten HbA_{1c}-Werte repräsentiert diese Einstellung und liegt im Mittel in beiden Personengruppen im Normbereich von < 7,0% (Jorgensen 2002). Ein weiterer Erfolgsparameter dieser Untersuchung ist die benötigte Insulinmenge der Personen pro kg Körpergewicht und Tag. Auch diese monatlich berechneten Werte sind bis zum neunten Studienmonat in beiden Untersuchungsgruppen

nahezu identisch. Dieser Parameter gibt hier keinen Hinweis auf die Auswirkung der Einnahme von Calcitriol.

Bereits bei drei Monaten haben 64% der mit Calcitriol behandelten Personen IgG4-IA, dagegen nur 20% der Kontrollpersonen. Obwohl beim Menschen die Antikörpersubklassen den assoziierten Th-Phänotypen nicht so eindeutig wie bei der Maus zugeordnet werden können, besteht die Annahme, dass IgG4- und IgE-Antikörper mit dem Th2-Phänotyp einhergehen, da beide durch das Th2-Zytokin IL-4 stimulierbar sind (Lundgren 1989, King 1993). Eine sehr ähnliche Entwicklung der Subklassen ist auch in den hier untersuchten Personen zu sehen. Bei den unbehandelten Kontrollpersonen ist diese IgG4-Verstärkung anscheinend zeitlich etwas später, allerdings können zum jetzigen Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede in den IA-Subklassenprofilen und -entwicklungen aufgezeigt werden. Eine Verstärkung der IgG4-IA bei den mit Calcitriol behandelten Personen als Marker für eine ausgeprägtere Th2-Immunität im Vergleich zu den Kontrollen ist sehr vielversprechend. Wenn sich dieser Trend zukünftig bestätigt, würde er dafür sprechen, dass das Calcitriol in der verwendeten Dosis einen immunologischen Effekt hat. Diese Entwicklung und der Einfluss auf den Krankheitsverlauf bleiben im weiteren Studienfortschritt abzuwarten.

Schlussfolgernd lässt sich aus dieser Zwischenauswertung bei neun Studienmonaten kein Nachweis für die Verschiebung der Immunlage durch die Einwirkung von Calcitriol aufzeigen. Die frühzeitiger und in größeren Mengen nachweisbaren IgG4-IA und der Trend hin zu größeren C-Peptidmengen nach Calcitriol-supplementierung lassen auf einen zukünftig zu verifizierenden Erfolg der Behandlung mit Calcitriol blicken. Sehr wichtig und hier bereits sicher feststellbar ist, dass die Supplementierung mit Calcitriol in der gewählten Form und Menge ohne negative Auswirkungen auf den Stoffwechsel der behandelten Personen möglich ist. Damit kann ein Erfolgsparameter der Studie, der das Einhalten der Safety-Parameter fordert, bereits jetzt positiv beantwortet werden. Das lässt zukünftige Ausweitungen dieses therapeutischen Ansatzes auf größere Studienpopulationen zu. Alle weiteren Effekte der Zufuhr sind in einer Gesamtauswertung mit entsprechend größeren Personenzahlen und nach längeren Nachverfolgungszeiten zu analysieren.

4.6 Zukunftsaussicht

Insulin-Immunisierungen, die NOD Muttertiere vor der Entwicklung von Autoimmundiabetes schützen, konnten transplazentär nicht auf die Nachkommen der geschützten Muttertiere übertragen werden. Dagegen führten die Untersuchungen im Kollektiv der BABYDIAB Studie zum überraschenden Ergebnis, dass die fetale Auseinandersetzung mit Autoantikörpern gegen GAD und/oder IA-2 vor der Entwicklung von Inselautoimmunität und Typ 1 Diabetes schützen kann. Wenn sich diese Beobachtung in weiteren Untersuchungen bestätigt, ist daraus eine Therapieform ableitbar, die sehr früh in die Entstehung von Typ 1 Diabetes eingreifen könnte. Humane Anti-GAD- und Anti-IA-2-Antikörper wurden bereits isoliert und stehen zur Verfügung (Prof. Dr. Endl, Boehringer Mannheim). Diese könnten Frauen vor oder während einer Schwangerschaft injiziert werden, wenn für das Kind ein erhöhtes Risiko für Typ 1 Diabetes besteht. Ähnliche Injektionen werden bereits zur Rhesus-Prophylaxe durchgeführt. Folglich würde eine Konfrontation des Fetus mit den GAD- und IA-2-Autoantikörpern induziert, die sich in dieser Arbeit als Diabetes-protektiv herausgestellt hat. Solch eine Therapieform wäre wenig aufwendig und grundsätzlich sind keine negativen Auswirkungen durch diese Antikörperverabreichungen zu erwarten. Wenn diese Therapieform tatsächlich mit schützendem Einfluss auf Typ 1 Diabetes einhergehen würde, wäre eine einfache und elegante Methode gefunden worden um in einer sehr frühen Lebensphase die Entwicklung von Typ 1 Diabetes zu beeinflussen.

Die Ergebnisse des Studienteils, in dem NOD Mäuse glutenfrei ernährt wurden, sind bereits auf den Menschen übertragen worden. Im Institut für Diabetesforschung in München wird eine offene kontrollierte Studie durchgeführt, die Kinder von Eltern mit Typ 1 Diabetes einschließt, die einen Hochrisikogenotyp für Diabetes tragen. Diese Kleinkinder bekommen während der ersten zwölf Lebensmonate glutenfreie Nahrung. Die Kontrollgruppe wird, den deutschen Empfehlungen entsprechend, nur die ersten sechs Lebensmonate glutenfrei ernährt. In dieser Studie wird analysierbar sein, ob auch beim Menschen durch glutenfreie Ernährung im Zeitraum nach dem Abstillen das Risiko für die Entwicklung von Inselautoimmunität und Typ 1 Diabetes beeinflusst werden kann. Diese Intervention im ersten Lebensjahr ist für die betreffenden Familien recht einfach und ohne größeren Aufwand durchführbar. Wenn für diese Therapieform tatsächlich ein positiver Effekt auf die Diabetesentwicklung nachweisbar wird, wäre sogar eine Modulation des Immunsystems mit einem natürlichen Nahrungsfaktor ohne pharmazeutischen Eingriff erreichbar. Bei dieser Therapieform ist mit einer großen Akzeptanz bei den betroffenen Familien zu rechnen.

Die Ergebnisse des Studienteils mit der oralen Zufuhr von Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten scheinen besonders viel versprechend als Therapieform für Typ 1 Diabetes zu sein. Antihistaminika werden in der Allergieprophylaxe und als Hemmer der Salzsäureproduktion im Magen bereits vielen Personen verabreicht. Die verwendeten pharmazeutischen Mittel sind gut erforscht und deren Anwendung lange Zeit erprobt. Einerseits scheint eine retrospektive Erhebung von Diabetes-bezogenen Daten bei Personen, die prophylaktisch Antihistaminika einnehmen, vor einer Pilotstudie mit Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten sinnvoll und vielversprechend zu sein. Andererseits scheint eine Pilotstudie mit Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten beim Menschen nicht mit großen ethischen und praktischen Hindernissen verbunden zu sein. Die guten Ergebnisse im NOD Modell rechtfertigen eine Übertragung auf den Menschen und weiterführende Studien mit Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten zur Diabetes-Protektion scheinen sehr viel versprechend zu sein.

Ein großer einschränkender Faktor für den Gebrauch von Calcitriol für die klinische Immuntherapie sind dessen Nebenwirkungen auf den Calcium- und Knochenstoffwechsel. Im hier analysierten Studiendesign an erwachsenen Personen werden keine negativen Effekte durch diese Nebenwirkungen sichtbar. Allerdings wäre die Verabreichung von Calcitriol an Kleinkinder vor der Entwicklung von Inselautoimmunität die Therapieform, die mit dem größten positiven Effekt verbunden wäre. Die Nebenwirkungen auf den Knochen- und Calciumstoffwechsel, deren Funktionen gerade bei Kleinkindern maximale Bedeutung haben, macht solche Interventionen derzeit unmöglich. Ein Anliegen der Forschung ist es Calcitriol-Analoga zu entwickeln, die verminderte oder keine calcämische und eine verstärkte immunmodulatorische Aktivität verglichen zum Ausgangsmolekül besitzen (van Halteren 2002, Zugel 2002, Gregori 2002, Van Etten 2003). Im Widerspruch zu solchen nicht calcämischen Analoga stehen die Beobachtung, dass die calcämische Wirkung von Calcitriol für die Behandlung von Autoimmunkrankheiten notwendig zu sein scheint, und die Annahme, dass die Unterdrückung von Autoimmunkrankheiten sogar neben der aktiven Form von Vitamin D₃ eine adäquate oder hohe Calciumzufuhr notwendig macht (DeLuca 2001). Weitere intensive Forschung auf diesem Gebiet scheint erforderlich zu sein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Typ 1 Diabetes mellitus ist eine chronische, multifaktorielle Autoimmunerkrankung, die aus einer Zerstörung der insulinproduzierenden pankreatischen β -Zellen durch das körpereigene Immunsystem resultiert. Verschiedene Studien im Tiermodell deuten darauf hin, dass bei der Pathogenese T-Helfer-1-Zellen pathogen und T-Helfer-2-Zellen protektiv wirken. Ebenfalls werden die Unterdrückung von regulatorischen T-Lymphozyten, Modulationen der Antigenpräsentation durch Veränderungen der präsentierenden Zelltypen und Einflüsse von B-Lymphozyten und die von B-Lymphozyten sezernierten Antikörper als Auslöser der Autoimmunreaktion diskutiert, die zum Typ 1 Diabetes führt.

Das Tiermodell der NOD (nonobese diabetic) Maus entwickelt spontan autoimmunen Diabetes, der bezüglich der Genetik und dem Immungeschehen dem humanen Typ 1 Diabetes sehr ähnlich ist. Dieses Modell ist daher geeignet um die Pathogenese und Therapien der Erkrankung zu untersuchen. Inhalt dieser Arbeit war die Durchführung von sechs verschiedenen innovativen Therapieansätzen mit dem Ziel die Entwicklung von Autoimmundiabetes im Tiermodell und beim Menschen zu verhindern. Zu diesen Therapieansätzen zählen immunmodulatorische (Immunisierungen, Antikörpertransfer), nutritive (Gluten, Gliadin) und pharmakologische Interventionen (Mucin, Histamin-Rezeptor-Antagonisten, Vitamin D₃), die vor allem in sehr frühen Stadien der Krankheitsentstehung ansetzen. Als Endpunkt der Therapieansätze wurde vorrangig die Manifestation von Autoimmundiabetes analysiert. In einem Studienteil stellt der C-Peptid-Erhalt den Studienendpunkt dar, da diese Intervention bei Personen mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes getestet wurde. Bei allen Therapiestudien wurden Surrogatparameter als sekundäre Marker bestimmt, die mögliche Veränderungen im Immungeschehen aufzeigen sollen. Dazu zählen humane und murine Insel(auto)antikörper, murine Anti-Gliadin- und Anti-Tetanus-Toxoid-Antikörper und murine Zytokine.

Durch Insulin-Immunsierung kann bekanntermaßen die Entstehung von Autoimmundiabetes bei NOD Mäusen verhindert werden. NOD Weibchen wurden vor bzw. während einer Trächtigkeit mit Insulin, Glucagon als Kontrollantigen und Natriumchlorid in Kombination mit Inkomplettem Freund'schem Adjuvanz immunisiert um zu untersuchen, ob die Muttertiere ihren Diabetes-Schutz transplazentär auf ihre Nachkommen übertragen können. In einer ähnlichen Untersuchung wurde beim Menschen geprüft, ob der Transfer von mütterlichen Insulinantikörpern und Insel-Autoantikörpern während der Schwangerschaft das Diabetesrisiko der Kinder beeinflusst. Dazu wurden Kinder von Müttern mit Typ 1 Diabetes

aus der deutschen BABYDIAB Studie analysiert. Mucin Typ 1 fungiert als Immunsuppressor und soll im Mikromilieu von Tumoren eine T-Helfer-2-Dominanz auslösen. Folglich wurden NOD Mäuse mit Mucin Typ 1 oral über das Trinkwasser behandelt. Glutenfreie Ernährung ist im NOD Mausmodell bekanntermaßen mit einer Verringerung der Diabetes-Inzidenz verbunden und der Glutenbestandteil Gliadin ist als immunreaktives Protein der Autoimmunerkrankung Zöliakie bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte aufgeklärt werden, welcher Zeitraum im Leben von NOD Mäusen kritisch für die Auswirkung von glutenfreier Ernährung auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes ist, und ob Gliadin das diabetogene Weizenprotein ist. Es wurde publiziert, dass nach Ligandierung von Histamin an Histamin-1-Rezeptoren andere Zytokin- und Antikörperantworten resultieren als nach Ligandierung an Histamin-2-Rezeptoren. NOD Mäuse wurden über das Trinkwasser oral mit Histamin-Rezeptor-antagonistischen pharmakologischen Substanzen behandelt, wobei die Behandlung mit Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten eine Verschiebung hin zum regulatorischen Immunphänotyp und Diabetes-protective Effekte auslösen sollte. Von der aktiven Vitamin D₃-Form, dem Calcitriol, ist bekannt, dass es durch Reduktion der Antigenpräsentation und Induktion von regulatorischen T-Zellen und toleranten dendritischen Zellen Diabetes-protectiv wirken kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zwischenauswertung einer Pilotstudie durchgeführt, die erwachsene Personen mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes über neun Monate täglich oral mit Calcitriol behandelt.

Von vier im NOD Mausmodell durchgeführten Studien hatten zwei Therapien Diabetes-protective Auswirkungen. Glutenfreie Ernährung in zwei verschiedenen Zeitfenstern und glutenfreie Ernährung mit Gliadinzusatz führten zu signifikant verringerten Diabetes-Inzidenzen. Der Zeitraum von zwei Lebenswochen direkt nach der Entwöhnung von den Muttertieren (vierte und fünfte Lebenswoche) scheint der kritische Zeitraum zu sein, in dem glutenfreies Futter schützende Auswirkungen auf die Diabetesentwicklung der NOD Mäuse hat. Dieser protective Effekt konnte durch Gliadinegaben nicht aufgehoben werden, was gegen eine immunreaktive Rolle von Gliadin im Autoimmundiabetes spricht. Die Behandlung mit Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten führte ebenfalls zu einer signifikanten Verringerung der Diabetes-Inzidenz der NOD Mäuse. Beim Menschen führte die Auswertung der Nabelschnur(auto)antikörper von Kindern von Müttern mit Typ 1 Diabetes zu einem überraschenden Ergebnis. Das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen GADA und/oder IA-2A war im Vergleich zu Kindern ohne Autoantikörper im Nabelschnurblut mit einer signifikanten Verringerung des Diabetesrisikos und des Risikos für Inselautoimmunität korreliert. Die Auseinandersetzung des fetalen Organismus mit Inselautoantikörpern

gegen GAD und/oder IA-2 scheint die Kinder vor Typ 1 Diabetes zu schützen. Das Vorhandensein von Insulinantikörpern im Nabelschnurblut war dagegen nicht mit dem Diabetesrisiko der Kinder assoziiert.

Keine Diabetes-protektiven bzw. die β -Zellfunktion erhaltenden Auswirkungen konnten für zwei Interventionsstudien im NOD Modell und für die Calcitriolintervention gefunden werden. So konnte durch Insulin-Immunisierungen in Kombination mit Inkomplettem Freund'schem Adjuvanz im Zeitraum der Trächtigkeit erstmals eine signifikante Verringerung der Diabetes-Inzidenz bei den Muttertieren, nicht aber bei deren Nachkommen erreicht werden. Die von Insulin-Immunisierungen ausgehenden schützenden Faktoren scheinen die Plazenta nicht zu durchwandern. Allerdings war die Konfrontation des Fetus mit Insulin(auto)antikörpern auch nicht mit einem destruktiven Einfluss auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes assoziiert, was frühere Berichte widerlegt. Die orale Therapie mit Mucin Typ 1 über das Trinkwasser konnte die Diabetes-Inzidenz von NOD Mäusen nicht verringern. Bei der durchgeführten Zwischenauswertung der Calcitrioltherapie bei Personen mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes liegt kein signifikanter Anstieg der C-Peptidreserven nach den Calcitrioleinnahmen vor. Allerdings wird auch kein negativer Effekt deutlich, was für die Sicherheit der durchgeführten Intervention spricht.

Bei den Analysen der verschiedenen Surrogatparameter konnten Veränderungen der Marker im Rahmen folgender Therapiestudien im NOD Modell und beim Menschen aufgezeigt werden. Insulin-Immunisierungen führten zu signifikant erhöhten Insulinantikörpertitern von NOD Muttertieren bei der Entbindung, welche noch bei vier, aber nicht mehr bei zehn Lebenswochen im Serum der Nachkommen nachweisbar waren. Folglich scheinen Insulin-Immunisierungen keinen Einfluss auf die Inselautoimmunität der Nachkommen zu nehmen. Die Intervention mit Mucin Typ 1 führte zu signifikant erhöhten Insulinautoantikörpertitern am Lebensende. Daher scheint Mucin Typ 1 tatsächlich Auswirkungen auf das Immunsystem zu haben, die in dieser Studie die Diabetesentwicklung allerdings nicht beeinflusst. Glutenfreie Ernährung plus Gliadinzusatz führte, den Voruntersuchungen entsprechend, zu signifikant verringerten Insulinautoantikörpertitern bei zehn Lebenswochen. Die Behandlung der Kontrollmäuse mit Histamin-2-Antagonisten führte zu signifikant erhöhten Insulinautoantikörpertitern bei zehn Lebenswochen. Das belegt, dass Histamin-Rezeptor-Antagonisten Einfluss auf das Immunsystem nehmen können.

Keinen Effekt auf die gemessenen Surrogatparameter zeigte die Calcitriolstudie. Es konnten keine signifikanten Verschiebungen der Insulinantikörpermengen und -subklassenanti-

körpermengen detektiert werden. Folglich ist in diesem Stadium der Interventionsstudie kein Einfluss von Calcitriol auf das Immunsystem nachweisbar.

Die Messung der Anti-Gliadinantikörper bei den Mäusen mit veränderter Glutenzufuhr bei zehn Lebenswochen zeigte signifikant verringerte Antikörpermengen bei den glutenfrei ernährten Tieren im Vergleich zu den glutenfrei plus Gliadinzusatz ernährten Mäusen. Das entspricht den Erwartungen und belegt die Gliadin-Präsenz bzw. -Abwesenheit in den verschiedenen Futtervariationen. Weder durch die gemessenen Insulin- oder Anti-Tetanus-Toxoid-Subklassenantikörper noch durch die Zytokinausschüttungen der Milzzellen im Rahmen des Studienteils mit den Histamin-Rezeptor-Antagonisten konnten signifikante Veränderungen im Immungeschehen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist im Hinblick auf die durch diese Intervention erreichte Diabetes-Reduktion überraschend. Bei den behandelten Personen der Calcitriolintervention wurden verschiedene Safety-Parameter gemessen. Die Analyse dieser Parameter zeigt sehr deutlich, dass eine Calcitriol-supplementierung entsprechend dem Studiendesign keine negativen Auswirkungen auf den Stoffwechsel verursacht. Das lässt zukünftige Ausweitungen dieser Intervention auf größere Studienpopulationen zu.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit sind verschiedene Therapieansätze für zukünftige Anwendungen beim Menschen denkbar. Die fetale Konfrontation mit Autoantikörpern gegen GAD und/oder IA-2 scheint Kinder vor der Entwicklung von Inselautoimmunität und Typ 1 Diabetes zu schützen. Verabreichungen von humanen Anti-GAD- und Anti-IA-2-Antikörpern durch Injektionen bei schwangeren Frauen würden solch eine Konfrontation induzieren. Diese Therapie wäre eine wenig aufwendige und elegante Methode um in einer sehr frühen Lebensphase die Entwicklung von Typ 1 Diabetes zu beeinflussen. Der Diabetes-protective Einfluss von glutenfreier Nahrung im Zeitraum nach dem Abstillen wird bereits bei Kindern getestet: Kinder mit einem hohen Diabetesrisiko werden im ersten Lebensjahr glutenfrei ernährt. Wenn für diese einfach durchführbare Therapie tatsächlich ein Diabetes-protectiver Effekt nachweisbar wird, wäre eine Modulation des Immunsystems mit einem natürlichen nutritiven Faktor ohne pharmazeutischen Eingriff möglich, für den eine große Akzeptanz zu erwarten ist. Darüber hinaus scheint es sehr wichtig zu sein den immunreaktiven Faktor ausfindig zu machen, der den diabetogenen Effekt von Getreide verursacht. Ebenfalls sollte eine zukünftige Verifizierung und Aufklärung der protectiven Wirkung von Histamin-1-Rezeptor-Blockierungen auf die Entstehung von Autoimmundiabetes durchgeführt werden. Dieser Therapieansatz ist sehr viel versprechend und eine Übertragung auf den Menschen scheint gerechtfertigt zu sein.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abiru N**, Yu L, Miao D, Maniatis AK, Liu E, Moriyama H, Eisenbarth GS. Transient insulin autoantibody expression independent of development of diabetes: comparison of NOD and NOR strains. *J Autoimmun* 17(1), 1-6, 2001
- Adorini L**, Penna G, Giarratana N, Uskokovic M. Toerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases. *J Cell Biochem* 88(2), 227-233, 2003
- Agrawal B**, Krantz MJ, Reddish MA, Longenecker BM. Cancer-associated MUC1 mucin inhibits human T-cell proliferation, which is reversible by IL-2. *Nat Med* 4(1), 43-49, 1998a
- Agrawal B**, Gendler SJ, Longenecker BM. The biological role of mucins in cellular interactions and immune regulation: prospects for cancer immunotherapy. *Mol Med Today* 4(9), 397-403, 1998b
- Akhtar I**, Gold JP, Pan LY, Ferrara JL, Yang XD, Kim JI, Tan KN. CD4+ β islet cell reactive T cell clones that suppress autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 182, 87-97, 1995
- Atkinson MA**, Maclaren NK. Autoantibodies in nonobese diabetic mice immunoprecipitate 64,000-M_r islet antigen. *Diabetes* 37, 1587-1590, 1988
- Atkinson MA**, Maclaren NK, Luchetta R. Insulinitis and diabetes in NOD mice reduced by prophylactic insulin therapy. *Diabetes* 39, 933-937, 1990
- Atkinson M**, Gendreau P, Ellis T, Petitto J. NOD mice as a model for inherited deafness. *Diabetologia* 40(7), 868, 1997
- Atkinson MA**, Leiter EH. The NOD mouse model of type 1 diabetes: As good as it gets? *Nat Med* 5(6), 601-604, 1999
- Atkinson MA**, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358(9277), 221-229, 2001
- Bach JF**. Predictive medicine in autoimmune diseases: from the identification of genetic predisposition and environmental influence to precocious immunotherapy. *Clin Immunol Immunopathol* 72(2), 156-161, 1994a

- Bach JF.** Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev* 15(4), 516-542, 1994b
- Baekkeskov S,** Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, de Camilli P. Identification of the 64 k autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347, 151-156, 1990
- Banu Y,** Watanabe T. Augmentation of antigen receptor-mediated responses by histamine H1 receptor signaling. *J Exp Med* 189(4), 673-682, 1999
- Barnett AH,** Eff C, Leslie RDG, Pyke DA. Diabetes in identical twins: a study of 200 pairs. *Diabetologia* 20, 404-409, 1981
- Barocelli E,** Ballabeni V. Histamine in the control of gastric acid secretion: a topic review. *Pharmacol Res* 47(4), 299-304, 2003
- Baroody FM,** Naclerio RM. Antiallergic effects of H1-receptor antagonists. *Allergy* 55 Suppl. 64, 17-27, 2000
- Baxter AG,** Cooke A. Complement lytic activity has no role in the pathogenesis of autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 42(11), 1574-1578, 1993
- Beales PE,** Elliott RB, Flohe S, Hill JP, Kolb H, Pozzilli P, Wang GS, Wasmuth H, Scott FW. A multi-centre, blinded international trial of the effect of A(1) and A(2) beta-casein variants on diabetes incidence in two rodent models of spontaneous Type 1 diabetes. *Diabetologia* 45(9), 1240-1246, 2002
- Beer DJ,** Rocklin RE. Histamine modulation of lymphocyte biology: membrane receptors, signal transduction, and functions. *Crit Rev Immunol* 7(1), 55-91, 1987
- Bendelac A,** Boitard C, Bedossa P, Bazin H, Bach JF, Carnaud C. Adoptive T cell transfer of autoimmune nonobese diabetic mouse diabetes does not require recruitment of host B lymphocytes. *J Immunol* 141(8), 2625-2628, 1988
- Bingley PJ,** Bonifacio E, Williams AJ, Genovese S, Bottazzo GF, Gale EA. Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes* 46(11), 1701-1710, 1997
- Bingley PJ,** Bonifacio E, Mueller PW, and Participating Laboratories. Diabetes Antibody Standardization Program: First Assay Proficiency Evaluation. *Diabetes* 52, 1128-1136, 2003

- Bleich D**, Polak M, Eisenbarth GS, Jackson RA. Decreased risk of type 1 diabetes in offspring of mothers who acquire diabetes during adrenarchy. *Diabetes* 42(10), 1433-1439, 1993
- Bohmer KP**, Kolb H, Kuglin B, Zielasek J, Hubinger A, Lampeter EF, Weber B, Kolb-Bachofen V, Jastram HU, Bertrams J, et al. Linear loss of insulin secretory capacity during the last six month preceding IDDM. No effect of antiedematous therapy with ketotifen. *Diabetes Care* 17(2), 138-141, 1994
- Bonifacio E**, Lampasona V, Bingley PJ. IA-2 (islet cell antigen 512) is the primary target of humoral autoimmunity against type 1 diabetes-associated tyrosine phosphatase autoantigens. *J Immunol* 161, 2648-2654, 1998a
- Bonifacio E**, Ziegler AG, Hummel M, Dittler J, Lampasona V, Pastore MR, Bosi E. Gluten: is it also a determinant of islet autoimmunity? *Diabetes Metab Rev* 14(3), 258-259, 1998b
- Bonifacio E**, Scirpoli M, Kredel K, Füchtenbusch M, Ziegler AG. Early autoantibody responses in prediabetes are IgG1 dominated and suggest antigen-specific regulation. *J Immunol* 163(1), 525-532, 1999
- Bonifacio E**, Atkinson M, Eisenbarth G, Serreze D, Kay T W, Lee-Chan E and Singh B. International Workshop on Lessons From Animal Models for Human Type 1 Diabetes: identification of insulin but not glutamic acid decarboxylase or IA-2 as specific autoantigens of humoral autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 50, 2451-2458, 2001
- Boon T**, Coulie PG, Van den Eynde B. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today* 18(6), 267-268, 1997
- 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* 313, 353-360, 1985
- Chang TJ**, Lei HH, Yeh JI, Chiu KC, Lee KC, Chen MC, Tai TY, Chuang LM. Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. *Clin Endocrinol (oxf)* 52(5), 575-580, 2000
- Christie MR**, Vohra G, Champagne P, Daneman D, Delovitch TL. Distinct antibody specificities to a 64-kD islet cell antigen in type 1 diabetes as revealed by trypsin treatment. *J Exp Med* 172, 789-794, 1990

- Christie MR**, Hollands JA, Brown TJ, Michelsen BK, Delovitch TL. Detection of pancreatic islet 64,000 Mr autoantigens in insulin-dependent diabetes distinct from glutamate decarboxylase. *J Clin Invest* 92, 240-248, 1993
- Cohn L**, Whittaker L, Niu N, Homer RJ. Cytokine regulation of mucus production in a model of allergic asthma. *Novartis Found Symp* 248, 201-213, 2002
- Coleman DL**, Kuzava JE, Leiter EH. Effect of diet on incidence of diabetes in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 39(4), 432-436, 1990
- Collin P**, Reunala T, Pukkala E, Laippala P, Keyrilainen O, Pasternack A. Coeliac disease-associated disorders and survival. *Gut* 35(9), 1215-1219, 1994a
- Collin P**, Salmi J, Hallstrom O, Reunala T, Pasternack A. Autoimmune thyroid disorders and coeliac disease. *Eur J Endocrinol* 130(2), 137-140, 1994b
- Coon B**, An LL, Whitton JL, von Herrath MG. DNA immunization to prevent autoimmune diabetes. *J Clin Invest* 104, 189-194, 1999
- Corazza GR**, Gasbarrini G. Coeliac disease in adults. *Baillieres Clin Gastroenterol* 9(2), 329-350, 1995
- Coste A**, Sirard JC, Johansen K, Cohen J, Kraehenbuhl JP. Nasal immunization of mice with virus-like particles protects offspring against rotavirus diarrhea. *J Virol* 74(19), 8966-8971, 2000
- Cronin CC**, Feighery A, Ferriss JB, Liddy C, Shanahan F, Feighery C. High prevalence of celiac disease among patients with insulin-dependent (type 1) diabetes mellitus. *Am J Gastroenterol* 92(12), 2210-2212, 1997
- Daniel D**, Wegmann DR. Protection of nonobese diabetic mice from diabetes by intranasal or subcutaneous administration of insulin peptide B-(9-23). *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 956-960, 1996
- Davies JL**, Kawaguchi Y, Bennett ST, Copeman JB, Cordell HJ, Pritchard LE, Reed PW, Gough SC, Jenkins SC, Palmer SM, et al. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* 371(6493), 130-136, 1994
- Delovitch TL**, Singh B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity* 7(6), 727-738, 1997
- DeLuca HF**. The metabolism, physiology and function of vitamin D. In *Vitamin D, Basic and Clinical Aspects*. Kumar R, Ed. Boston, MA, Nijhoff Publishing, 259-302, 1984

- DeLuca HF**, Cantorna MT: Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB* 15, 2579-2585, 2001
- Devine PL**, McKenzie IF. Mucins: structure, function, and associations with malignancy. *Bioessays* 14(9), 619-625, 1992
- Dieterich W**, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 3(7), 797-801, 1997
- Ellis TM**, Atkinson MA. The clinical significance of an autoimmune response against glutamic acid decarboxylase. *Nature Med* 2, 148-153, 1996
- Expert Committee** on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 20, 1183-1197, 1997
- Flohe SB**, Wasmuth HE, Kerad JB, Beales PE, Pozzilli P, Elliott RB, Hill JP, Scott FW, Kolb H. A wheat-based, diabetes-promoting diet induces a Th1-type cytokine bias in the gut of NOD mice. *Cytokine* 21(3), 149-154, 2003
- Forsgren S**, Andersson A, Hillron V, Soderstrom A, Holmberg D. Immunoglobulin-mediated prevention of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Scand J Immunol* 34(4), 445-451, 1991
- Foulis AK**, Liddle CN, Farquharson MA, Richmond JA, Weir RS. 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* 29, 267-274, 1986
- Füchtenbusch M**, Ziegler AG. Umweltfaktoren in der Pathogenese des Typ-I-Diabetes. *Diab Stoffw* 4, 1-9, 1995
- Füchtenbusch M**, Kredel K, Bonifacio E, Schnell O, Ziegler AG. Exposure to exogenous insulin promotes IgG1 and T-helper 2-associated IgG4 responses to insulin but not to other islet autoantigens. *Diabetes* 49, 918-925, 2000
- Funda DP**, Kaas A, Bock T, Tlaskalova-Hogenova H, Buschard K. Gluten-free diet prevents diabetes in NOD mice. *Diabetes Metab Res Rev* 15(5), 323-327, 1999

- Gantz I**, DelValle J, Wang LD, Tashiro T, Munzert G, Guo YJ, Konda Y, Yamada T. Molecular basis for the interaction of histamine with the histamine H2 receptor. *J Biol Chem* 267(29), 20840-20843, 1992
- Gendler SJ**, Burchell JM, Duhig T, Lamport D, White R, Parker M, Taylor-Papadimitriou J. Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumor-associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(17), 6060-6064, 1987
- Gendler SJ**, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Peat N, Burchell J, Pemberton L, Lalani EN, Wilson D. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J Biol Chem* 265(25), 15286-15293, 1990
- Gendler SJ**, Spicer AP. Epithelial mucine genes. *Annu Rev Physiol* 57, 607-634, 1995
- Gepts W**, Lecompte PM. The pancreatic islets in diabetes. *Am J Med* 70, 105-115, 1981
- Gianani R**, Rabin DU, Verge CF, Yu L, Babu SR, Pietropaolo M, Eisenbarth GS. ICA512 autoantibody radioassay. *Diabetes* 44, 1340-1344, 1995
- Gill DS**, Barradas MA, Fonseca VA, Dandonna P. Plasma histamine concentrations are elevated in patients with diabetes mellitus and peripheral vascular disease. *Metabolism* 38(3), 243-247, 1989
- Greeley SA**, Katsumata M, Yu L, Eisenbarth GS, Moore DJ, Goodarzi H, Barker CF, Najj A, Noorchashm H. Elimination of maternally transmitted autoantibodies prevents diabetes in nonobese diabetic mice. *Nat Med* 8(4), 399-402, 2002
- Gregori S**, Giarratana N, Smiroldo S, Uskokovic M, Adorini L. A 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 51(5), 1367-1374, 2002
- Grubin CE**, Daniels T, Toivola B, Landin-Olsson M, Hagopian WA, Li L, Karlsen AE, Boel E, Michelsen B, Lernmark A. A novel radioligand binding assay to determine diagnostic accuracy of isoform-specific glutamic acid decarboxylase antibodies in childhood IDDM. *Diabetologia* 37(4), 344-350, 1994
- Hamalainen AM**, Ronkainen MS, Akerblom HK, Knip M. Postnatal elimination of transplantally acquired disease-associated antibodies in infants born to families with type 1 diabetes. The Finnish TRIGR Study Group. Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk. *J Clin Endocrinol Metab* 85(11), 4249-4253, 2000

- Hänninen A**, Jalkanen S, Salmi M, Toikannen S, Nikolakaros G, Simell O. Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 90, 1901-1910, 1992
- Hart PH**, Townley SL, Grimbaldston MA, Khalil Z, Finlay-Jones JJ. Mast cells, neuropeptides, histamine, and prostaglandins in UV-induced systemic immunosuppression. *Methods* 28(1), 79-89, 2002
- Haskins K**, McDuffie M. Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet-specific T cell clone. *Science* 249, 1433-1436, 1990
- Haskins K**, Wegmann D. Diabetogenic T-cell clones. *Diabetes* 45(10), 1299-1305, 1996
- Hattori M**, Buse JB, Jackson RA, Glimcher L, Dorf ME, Minami M, Makino S, Moriwaki K, Kuzuya H, Imura H et al. The NOD mouse: recessive diabetogenic gene in the major histocompatibility complex. *Science* 231(4739), 733-735, 1986
- Hauache OM**, Lazaretti-Castro M, Andreoni S, Gimeno SG, Brandao C, Ramalho AC, Kasamatsu TS, Kunii I, Hayashi LF, Dib SA, Vieira JG. Vitamin D receptor gene polymorphism: correlation with bone mineral density in a Brazilian population with insulin-dependent diabetes mellitus. *Osteoporosis Int* 8, 204-210, 1998
- Hill SJ**. Histamine receptors and interactions between second messenger transduction systems. *Agents Actions Suppl.* 33, 145-159, 1991
- Holick MF**. Noncalcemic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and clinical applications. *Bone* 17, 107S-111S, 1995
- Hoorfar J**, Buschard K, Dagnaes-Hansen F. Prophylactic nutritional modification of the incidence of diabetes in autoimmune non-obese diabetic (NOD) mice. *Br J Nutr* 69(2), 597-607, 1993
- Hummel M**, Durinovic-Bello I, Ziegler AG. Relation between cellular and humoral immunity to islet cell antigens in type 1 diabetes. *J Autoimmun* 9(3), 427-430, 1996
- Hummel M**, Bonifacio E, Stern M, Dittler J, Schimmel A, Ziegler AG. Development of celiac disease-associated antibodies in offspring of parents with type 1 diabetes. *Diabetologia* 43(8), 1005-1011, 2000
- Hummel M**, Bonifacio E, Naserke HE, Ziegler AG. Elimination of dietary gluten does not reduce titers of type 1 diabetes-associated autoantibodies in high-risk subjects. *Diabetes Care* 25(7), 1111-1116, 2002

- Hutchings P**, Cooke A. Protection from insulin dependent diabetes mellitus afforded by insulin antigens in incomplete Freund's adjuvant depends on route of administration. *J Autoimmun* 11(2), 127-130, 1998
- Hypponen E**, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 358(9292), 1500-1503, 2001
- Jaeckel E**, Klein L, Martin-Orozco N, von Boehmer H. Normal incidence of diabetes in NOD mice tolerant to glutamic acid decarboxylase. *J Exp Med* 197(12), 1635-1644, 2003
- Jorgensen LG**, Brandslund I, Stahl M, Hyltoft Petersen P, Iversen S, Klitgaard N, de Fine Olivarius N. Upper reference limit, analytical quality specifications and clinical use of haemoglobin A1C. *Scand J Clin Lab Invest* 62(8), 609-622, 2002
- Jutel M**, Watanabe T, Klunker S, Akdis M, Thomet OAR, Malolepszy J, Zak-Nejmark T, Koga R, Kobayashi T, Blaser K und Akdis CA. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* 413, 420-425, 2001
- Katz J**, Benoist C, Mathis D. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science* 268, 1185-1188, 1995
- Kikutani H**, Makino S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv Immunol* 51, 285-322, 1992
- Kimpimaki T**, Erkkola M, Korhonen A, Kupila A, Virtanen SM, Ilonen J, Simell O, Knip M. Short-term exclusive breastfeeding predispose young children with increased genetic risk of type 1 diabetes to progressive beta-cell autoimmunity. *Diabetologia* 44, 63-69, 2001
- King CL**, Nutman TB. IgE and IgG subclass regulation by IL-4 and IFN-gamma in human helminth infections. Assessment by B cell precursor frequencies. *J Immunol* 151(1), 458-465, 1993
- Knip M**, Akerblom HK. Environmental factors in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrin Diabetes* 107,93-100, 1999
- Koczvara K**, Schenker M, Schmid S, Kredel K, Ziegler AG, Bonifacio E. Characterization of antibody responses to exogenous and endogenous antigen in the nonobese diabetic mouse. *Clin Immunol* 106, 155-162, 2003

- Komulainen J**, Kulmala P, Savola K, Lounamaa R, Ilonen J, Reijonen H, Knip M, Akerblom HK. Clinical, autoimmune, and genetic characteristics of very young children with type 1 diabetes. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetes Care* 22, 1950-1955, 1999
- Kulmala P**, Savola K, Petersen JS, Vahasalo P, Karjalainen J, Lopponen T, Dyrberg T, Akerblom HK, Knip M. Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings of children with diabetes. A population-based study. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *J Clin Invest* 101(2), 327-336, 1998
- Kurts C**, Sutherland RM, Davey G, Lew AM, Blanas E, Carbone F, Miller JFAP, Heath WR. CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 12703-12707, 1999
- Lafaille JJ**. The role of helper T cell subsets in autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 9(2), 139-151, 1998
- Lagier B**, Lebel B, Bousquet J, Pene J. Different modulation by histamine of IL-4 and interferon-gamma (IFN-gamma) release according to the phenotype of human Th0, Th1 and Th2 clones. *Clin Exp Immunol* 108(3), 545-551, 1997
- Lampasona V**, Bearzatto M, Genovese S, Bosi E, Ferrari M, Bonifacio E. Autoantibodies in insulin-dependent diabetes recognize distinct cytoplasmic domains of the protein tyrosine phosphatase-like IA-2 autoantigen. *J Immunol* 157, 2707-2711, 1996
- Lan MS**, Batra SK, Qi WN, Metzgar RS, Hollingsworth MA. Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. *J Biol Chem* 265(25), 15294-15299, 1990
- Lan MS**, Lu J, Goto Y, Notkins AL. Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma. *DNA Cell Biol* 13, 505-514, 1994
- Lancaster CA**, Peat N, Duhig T, Wilson D, Taylor-Papadimitriou J, Gendler SJ. Structure and expression of the human polymorphic epithelial mucin gene: an expressed VNTR unit. *Biochem Biophys Res Commun* 173(3), 1019-1029, 1990
- Lepore L**, Mertelossi S, Pennesi M, Falcini F, Ermini ML, Ferrari R, Perticarari S, Presani G, Lucchesi A, Lapini M, Ventura A. Prevalence of celiac disease in patients with juvenile chronic arthritis. *J Pediatr* 129(2), 311-313, 1996
- Leurs R**, Smit MJ, Timmerman H. Molecular pharmacological aspects of Histamine receptors. *Pharmacol Ther* 66(3): 413-463, 1995

- Liddy R**, Beales PE, Rosignoli G, Pozzilli P. Incomplete Freund's adjuvant reduces diabetes in non-obese diabetic mouse. *Horm Metab Res* 32(6), 201-206, 2000
- Ligtenberg MJ**, Vos HL, Gennissen AM, Hilkens J. Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini. *J Biol Chem* 265(10), 5573-5578, 1990
- Lin RH**, Mamula MJ, Hardin JA, Janeway CA Jr. Induction of autoreactive B cells allows priming of autoreactive T cells. *J Exp Med* 173(6), 1433-1439, 1991
- Linn T**, Noke M, Woehrle M, Kloer HU, Hammes HP, Litzlbauer D, Bretzel RG, Federlin K. Fish oil-enriched diet and reduction of low-dose streptozocin-induced hyperglycemia – inhibition of macrophage activation. *Diabetes* 38(11), 1402-1411, 1989
- Lovenberg TW**, Roland BL, Wilson SJ, Jiang X, Pyati J, Huvar A, Jackson MR, Erlander MG. Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor. *Mol Pharmacol* 55(6), 1101-1107, 1999
- Ludvigsson J**, Heding L, Lieden G, Marnier B, Lernmark A. Plasmapheresis in the initial treatment of insulin-dependent diabetes mellitus in children. *Br Med J (Clin Res Ed)* 286(6360), 176-178, 1983
- Lundgren M**, Persson U, Lansson P, Magnusson C, Smith CIE, Hammarstrom L, Severinson E. Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells. *Eur J Immunol* 19(7),1311-1315, 1989
- Lundin KE**, Scott H, Hansen T, Paulsen G, Halstensen TS, Fausa O, Thorsby E, Sollid LM. Gliadin-specific, HLA-DQ(alpha 1*0501,beta 1*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med* 178(1), 187-196, 1993
- MacDonald PN**, Molecular biology of the vitamin D receptor. In *Vitamin D. Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications*. Holick MF, Ed. Boston, MA, Humana Press, 109-128, 1999
- MacFarlane AJ**, Burghardt KM, Kelly J, Simell T, Simell O, Altosaar I, Scott FW. A type 1 diabetes-related protein from wheat (*Triticum aestivum*). cDNA clone of a wheat storage globulin, Glb1, linked to islet damage. *J Biol Chem* 278(1), 54-63, 2003
- Maclaren N**, Lan M, Coutant R, Schatz D, Silverstein J, Muir A, Clare-Salzer M, She JX, Malone J, Crockett S, Schwartz S, Quattrin T, DeSilva M, Vander Vegt P, Notkins A, Krischer J. Only multiple autoantibodies to islet cells (ICA), insulin, GAD65, IA-2 and IA-

- 2beta predict immune-mediated (Type 1) diabetes in relatives. *J Autoimmun* 12(4), 279-287, 1999
- Makino S**, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* 29(1), 1-13, 1980
- Manca F**, Fenoglio D, Kunkl A, Cambiaggi C, Sasso M, Celada F. Differential activation of T cell clones stimulated by macrophages exposed to antigen complexed with monoclonal antibodies. A possible influence of paratope specificity on the mode of antigen processing. *J Immunol* 140(9), 2893-2898, 1988
- Mathieu C**, Laureys J, Sobis H, Vandeputte M, Waer M, Bouillon R. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ prevents insulinitis in NOD mice. *Diabetes* 41(11), 1491-1495, 1992
- Mathieu C**, Waer M, Laureys J, Rutgeerts O, Bouillon R. Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Diabetologia* 37(6), 552-558, 1994
- McDermott MF**, Ramachandran A, Ogunkolade BW, Aganna E, Curtis D, Boucher BJ, Snehalatha C, Hitman GA. Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians. *Diabetologia* 40 (8), 971-975, 1997
- Miyazaki A**, Hanafusa T, Yamada K, Miyagawa 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* 60(3), 622-630, 1985
- Motohashi Y**, Yamada S, Yanagawa T, Maruyama T, Suzuki R, Niino M, Fukazawa T, Kasuga A, Hirose H, Matsubara K, Shimada A, Saruta T. Vitamin D receptor gene polymorphism affects onset pattern of type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 88(7), 3137-3140, 2003
- Muir A**, Peck A, Clare-Salzler M, Song YH, Cornelius J, Luchetta R, Krischer J, Maclaren N. Insulin immunisation of nonobese diabetic mice induces a protective insulinitis characterized by diminished intraislet interferon- γ transcription. *J Clin Invest* 95. 628-634, 1995
- Nakamura T**, Itadani H, Hidaka Y, Ohta M, Tanaka K. Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R. *Biochem Biophys Res Commun* 279(2), 615-620, 2000
- Naserke HE**, Dozio N, Ziegler AG, Bonifacio E: Comparison of a novel micro-assay for insulin autoantibodies with the conventional radiobinding assay. *Diabetologia* 41, 681-683, 1998

- Naserke HE**, Bonifacio E, Ziegler AG. Prevalence, characteristics and diabetes risk associated with transient maternally acquired islet antibodies and persistent islet antibodies in offspring of parents with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 86(10), 4826-4833, 2001
- Noorchashm H**, Noorchashm N, Kern J, Rostami SY, Barker CF, Naji A. B-cells are required for the initiation of insulinitis in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 46(6), 941-946, 1997
- Norris J**, Barriga K, Rewers M. Does cereal protein in the infant diet play a role in the etiology of β -cell autoimmunity? The Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Diabetes* 51, A234 Abstrakt, 2002
- Not T**, Tommasini A, Tonini G, Buratti M, Pocceco M, Tortul C, Valussi M, Cricchiutti G, Berti I, Trevisiol C, Azzoni E, Neri E, Torre G, Martelossi S, Soban M, Lenhardt A, Cattin L, Ventura A. Undiagnosed coeliac disease and risk of autoimmune disorders in subjects with Type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 44(2), 151-155, 2001
- O'Reilly LA**, Hutchings PR, Crocker PR, Simpson E, Lund T, Kioussis D, Takei F, Baird J, Cooke A. Characterization of pancreatic islet infiltrates in NOD mice: effect of cell transfer and transgene expression. *Eur J Immunol* 21, 1171-1180, 1991
- Olmos P**, A'Hern R, Heaton DA, Millward BA, Risley D, Pyke DA, Leslie RD. The significance of the concordance rate for type-1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins. *Diabetologia* 31, 747-750, 1988
- Ortlepp JR**, Lauscher J, Hoffmann R, Hanrath P, Joost HG. The vitamin D receptor gene variant is associated with the prevalence of type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Diabet Med* 18, 842-845, 2001
- Osborne TB**. The proteins of the wheat kernel. *Carnegie Inst Publ* 84, 1907
- Overbergh L**, Decallonne B, Waer M, Rutgeerts O, Valckx D, Casteels KM, Laureys J, Bouillon R, Mathieu C. $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ induces an autoantigen-specific T-helper 1/T-helper 2 immune shift in NOD mice immunized with GAD65 (p524-543). *Diabetes* 49(8), 1301-1307, 2000
- Palmer JP**, Asplin CM, Clemons P, Lyne K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL. Insulin autoantibodies in insulin-dependent diabetes before insulin treatment. *Science* 222, 1337-1339, 1983

- Pani MA**, Knapp M, Donner H, Braun J, Baur MP, Usadel KH, Badenhoop K. Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes* 49, 504-507, 2000
- Paul WE**, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76, 241-251, 1994
- Pedotti R**, DeVoss JJ, Youssef S, Mitchel D, Wedemeyer J, Madanat R, Garren H, Fontoura P, Tsai M, Galli SJ, Sobel RA, Steinman L. Multiple elements of the allergic arm of the immune response modulate autoimmune demyelination. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(4), 1867-1872, 2003
- Pennline KJ**, Roque-Gaffney E, Monahan M. Recombinant human IL-10 (rHUIL-10) prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Clin Immunol Immunopathol* 71, 169-175, 1994
- Pike JW**. The vitamin D receptor and its gene. In *Vitamin D*. Feldman D, Glorieux FH, Pike JW, Eds. San Diego, CA, Academic Press, 105-125, 1997
- Pitcher-Wilmott RW**, Hindocha P, Wood CB. The placental transfer of IgG subclass in human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 41(2), 303-308, 1980
- Plaut M**, Marone G, Gillespie E. The role of cyclic AMP in modulating cytotoxic T lymphocytes. II. Sequential changes during culture in responsiveness of cytotoxic lymphocytes to cyclic AMP-active agents. *J Immunol* 131(6), 2945-2952, 1983
- Pocecco M**, Ventura A. Coeliac disease and insulin-dependent diabetes mellitus: a causal association? *Acta Paediatr* 84(12), 1432-1433, 1995
- Pociot F**, Norgaard K, Hobolth N, Andersen O, Nerup J. A nationwide population-based study of the familial aggregation of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in Denmark. Danish Study Group of Diabetes in Childhood. *Diabetologia* 36(9), 870-875, 1993
- Rabin DU**, Pleasic S, Palmer-Crocker R, Shapiro J. Cloning and expression of IDDM-specific human autoantigens. *Diabetes* 41, 183-186, 1992
- Rabin DU**, Pleasic SM, Shapiro JA, Yoo-Warren H, Oles J, Hicks JM, Goldstein DE, Rae PMM. Islet antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. *J Immunol* 152, 3183-3188, 1994
- Rabinovitch A**. Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation. *Diabetes* 43, 613-621, 1994

- Rapoport MJ**, Jaramillo A, Zipris D, Lazarus AH, Serreze DV, Leiter EH, Cyopick P, Danska JS, Delovitch TL. IL-4 reverses T cell proliferation unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in NOD mice. *J Exp Med* 178, 87-99, 1993
- Reddy S**, Bibby NJ, Elliot RB. Ontogeny of islet cell antibodies, insulin autoantibodies and insulinitis in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia* 31(5), 322-328, 1988
- Reddy S**, Karanam M, Robinson E. Prevention of cyclophosphamide-induced accelerated diabetes in the NOD mouse by nicotinamide or a soy protein-based infant formula. *Int J Exp Diabetes Res* 1(4), 299-313, 2001
- Rewers M**, Norris JM, Eisenbarth GS, Erlich HA, Beaty B, Klingensmith G, Hoffmann M, Yu L, Bugawan TL, Blair A, Hamman RF, Groshek M, McDuffie RS Jr. Beta-cell autoantibodies in infants and toddlers without IDDM relatives: diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). *J Autoimmun* 9, 405-410, 1996
- Rocher A**, Soriano F, Molina E, Gonzalez-Limas G, Mendez E. Characterisation of distinct alpha- and gamma-type gliadins and low molecular weight components from wheat endosperm as coeliac immunoreactive proteins. *Biochim Biophys Acta* 1247(1), 143-148, 1995
- Roll U**, Christie MR, Fuchtenbusch M, Payton MA, Hawkes CJ, Ziegler AG. Perinatal autoimmunity in offspring of diabetic parents. The German multicenter BABY-DIAB study: detection of humoral immune responses to islet antigens in early childhood. *Diabetes* 45(7), 967-973, 1996
- Roll U**, Ziegler AG. Combined antibody screening for improved prediction of IDDM - modern strategies. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105, 1-14, 1997
- Rosenberg SA**. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411(6835), 380-384, 2001
- Roszkowski W**, Plaut M, Lichtenstein LM. Selective display of histamine receptors on lymphocytes. *Science* 195(4279), 683-685, 1977
- Saggese G**, Federico G, Balestri M, Toniolo A. Calcitriol inhibits the PHA-induced production of IL-2 and IFN-gamma and the proliferation of human peripheral blood leukocytes while enhancing the surface expression of HLA class II molecules. *J Endocrinol Invest* 12(5), 329-335, 1989
- Schmid S**, Koczwara K, Schwinghammer S, Lampasona V, Ziegler AG, Bonifacio E. Delayed exposure to wheat and barley proteins reduces diabetes inci-

dence in non-obese diabetic mice. Clin Immunol 2004 – zur Veröffentlichung akzeptiert und im Druck

- Schneider E**, Rolli-Derkinderen M, Arock M und Dy M. Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. Trends Immunol 23(5): 255-263, 2002
- Schuppan D**. Current concepts of celiac disease pathogenesis. Gastroenterology 119(1), 234-242, 2000
- Scott FW**, Daneman D, Martin JM. Evidence for a critical role of diet in the development of insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes Res 7(4), 153-157, 1988
- Scott FW**, Marliss EB. Conference summary: Diet as an environmental factor in development of insulin-dependent diabetes mellitus. Can J Physiol Pharmacol 69, 311-319, 1991
- Scott FW**, Cloutier HE, Kleemann R, Woerz-Pagenstert U, Rowsell P, Modler HW, Kolb H. Potential mechanisms by which certain foods promote or inhibit the development of spontaneous diabetes in BB rats: dose, timing, early effect on islet area, and switch in infiltrate from Th1 to Th2 cells. Diabetes 46(4), 589-598, 1997
- Scott FW**, Rowsell P, Wang GS, Burghardt K, Kolb H, Flohe S. Oral exposure to diabetes-promoting food or immunomodulators in neonates alters gut cytokines and diabetes. Diabetes 51(1), 73-78, 2002
- Scott P**. Selective differentiation of CD4+ T-helper cell subsets. Curr Opin Immunol 5, 391-397, 1993
- Seidel DK**, Geiss HC, Donner MG, Ritter MM, Schwandt P, Koll RA, Standl E, Ziegler AG. Course of islet autoantibody titers during Ig-immunoabsorption in a patient with newly diagnosed type 1 diabetes. J Autoimmun 11(3), 273-277, 1998
- Seißler J**, Bieg S, Yassin N, Mauch L, Northemann W, Boehm BO, Scherbaum WA. Association between antibodies to the Mr 67,000 isoform of glutamate decarboxylase (GAD) and type 1 diabetes mellitus with coexisting autoimmune polyendocrine syndrome II. Autoimmunity 19, 231-238, 1994
- Serreze DV**, Leiter EH, Kuff EL, Jardieu P, Ishizaka K. Molecular mimicry between insulin and retroviral antigen p73. Development of cross-reactive autoantibodies in sera of NOD and C57BL/KsJ db/db mice. Diabetes 37(3), 351-358, 1988

- Serreze DV**, Chapman HD, Varnum DS, Hanson MS, Reifsnyder PC, Richard SD, Fleming SA, Leiter EH, Shultz LD. B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new "speed congenic" stock of NOD.Ig μ ^{null} mice. *J Exp Med* 184(5), 2049-2053, 1996
- Silveira PA**, Johnson E, Chapman HD, Bui T, Tisch RM, Serreze DV. The preferential ability of B lymphocytes to act as diabetogenic APC in NOD mice depends on expression of self-antigen-specific immunoglobulin receptors. *Eur J Immunol* 32(12), 3657-3666, 2002
- Simitsek PD**, Campbell DG, Lanzavecchia A, Fairweather N, Watts C. Modulation of antigen processing by bound antibodies can boost or suppress class II major histocompatibility complex presentation of different T cell determinants. *J Exp Med* 181(6), 1957-1963, 1995
- Soeldner JS**, Slone D. Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin using the double antibody technic. *Diabetes* 14, 771-779, 1965
- Solimena M**, Folli F, Aparisi R, Pozza G, DeCamilli P. Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrome. *N Engl J Med* 322, 1555-1560, 1990
- Solimena M**, Dirx R, Hermel JM, Pleasic-Williams S, Shapiro A, Caron L, Rabin DU. ICA512, an autoantigen of type 1 diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules. *EMBO J* 15, 2102-2114, 1996
- Spicer AP**, Rowse GJ, Lidner TK, Gendler SJ. Delayed mammary tumor progression in MUC-1 null mice. *J Biol Chem* 270(50), 30093-30101, 1995
- Stanley H**, Norris J, Barriga K, Eisenbarth G, Rewers M. Is presence of beta-cell autoantibodies at birth associated with persistent islet autoimmunity or diabetes in the child? The Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Diabetes* 52 Suppl. 1, A277 Abstrakt, 2003
- Steffes MW**, Sibley S, Jackson M, Thomas W. beta-Cell function and the development of diabetes-related complications in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care* 26(3), 832-836, 2003
- Stene LC**, Ulriksen J, Magnus P, Joner G. Use of cod liver oil during pregnancy associated with lower risk of Type 1 diabetes in offspring. *Diabetologia* 43, 1093-1098, 2000

- Tai MM.** A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes Care* 17(2), 152-154, 1994
- Takahashi K,** Tanaka S, Furuta K, Ichikawa A. Histamine H(2) receptor-mediated modulation of local cytokine expression in a mouse experimental tumor model. *Biochem Biophys Res Commun* 297(5), 1205-1210, 2002
- Tashiro M,** Mochizuki H, Iwabuchi K, Sakurada Y, Itoh M, Watanabe T, Yanai K. Roles of histamine in regulation of arousal and cognition: functional neuroimaging of histamine H1 receptors in human brain. *Life Sci* 72(4-5), 409-414, 2002
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group.** Effect of intensive therapy on residual beta-cell function in patients with type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial. A randomized, controlled trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Ann Intern Med* 128(7), 517-523, 1998
- The Eurodiab Study 2 Study Group.** Vitamin D supplement in early childhood and risk for Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. *Diabetologia* 42(1), 51-54, 1999
- Thivolet C,** Bendelac A, Bedossa P, Bach JF, Carnaud C. CD8+ T cell homing to the pancreas in the nonobese diabetic mouse is CD4+ T cell-dependent. *J Immunol* 146, 85-88, 1991
- Tian J,** Lehmann PV, Kaufman DL. Determinant spreading of T helper cell 2 (Th2) responses to pancreatic islet autoantigens. *J Exp Med* 186, 2039-2043, 1997
- Timmerman JM,** Levy R. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu Rev Med* 50, 507-529, 1999
- Tisch R,** McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85(3), 291-297, 1996
- van de Wal Y,** Kooy YM, van Veelen PA, Pena SA, Mearin LM, Molberg O, Lundin KE, Sollid LM, Mutis T, Benckhuijsen WE, Drijfhout JW, Koning F. Small intestinal T cells of celiac disease patients recognize a natural pepsin fragment of gliadin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17), 10050-10054, 1998
- Van Etten E,** Decallonne B, Verlinden L, Verstuyf A, Bouillon R, Mathieu C. Analogs of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 as pluripotent immunomodulators. *J Cell Biochem* 88(2), 223-226, 2003

- van Halteren AG**, van Etten E, de Jong EC, Bouillon R, Roep BO, Mathieu C. Redirection of human autoreactive T-cells Upon interaction with dendritic cells modulated by TX527, an analog of 1,25 dihydroxyvitamin D(3). *Diabetes* 51(7), 2119-2125, 2002
- Vannier E**, Diarello CA. Histamine enhances interleukin (IL)-1-induced IL-1 gene expression and protein synthesis via H2 receptors in peripheral blood mononuclear cells. Comparison with IL-1 receptor antagonist. *J Clin Invest* 92(1), 281-287, 1993
- Vardi P**, Dib SA, Tuttleman M, Connely JE, Grinbergs M, Radizabeh A, Riley WJ, MacLaren NK, Eisenbarth GS, Soeldner JS. Competitive insulin autoantibody assay. Prospective evaluation of subjects at high risk for development of type 1 diabetes mellitus. *Diabetes* 36, 1286-1291, 1987
- Vardi P**, Ziegler AG, Mathews JH, Dib S, Keller RJ, Ricker AT, Wolfsdorf JI, Herskowitz RD, Rabizadeh A, Eisenbarth GS, Soeldner JS. Concentration of insulin autoantibodies at onset of type 1 diabetes. Inverse Log-linear correlation with age. *Diabetes Care* 11, 736-739, 1988
- Veldman CM**, Cantorna MT, DeLuca HF. Expression of 1,25dihydroxyvitamin D₃ receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys* 374, 334-338, 2000
- Ventura A**, Magazzu G, Greco L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology* 117(2), 297-303, 1999
- Ventura A**, Neri E, Ughi C, Leopaldi A, Citta A, Not T. Gluten-dependent diabetes-related and thyroid-related autoantibodies in patients with celiac disease. *J Pediatr* 137(2), 263-265, 2000
- Verge CF**, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS. Prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 45(7), 926-933, 1996
- von Herrath M**, Bach JF: Juvenile autoimmune diabetes: a pathogenic role for maternal antibodies? *Nat Med* 8(4), 331-333, 2002
- Walter M**, Albert E, Conrad M, Keller E, Hummel M, Ferber K, Barratt BJ, Todd JA, Ziegler AG, Bonifacio E. IDDM2/insulin VNTR modifies risk conferred by IDDM1/HLA for development of Type 1 diabetes and associated autoimmunity. *Diabetologia* 46, 712-720, 2003

- Warram JH**, Krolewski AS, Gottlieb MS, Kahn CR. Differences in risk of insulin-dependent diabetes in offspring of diabetic mothers and diabetic fathers. *N Engl J Med* 311(3), 149-152, 1984
- Wasmeier C**, Hutton JC. Molecular cloning of phogrin, a protein tyrosine phosphatase homologue localized to insulin secretory granule membranes. *J Biol Chem* 271, 18161-18170, 1996
- Watts C**, Lanzavecchia A. Suppressive effect of antibody on processing of T cell epitopes. *J Exp Med* 178(4), 1459-1463, 1993
- Williams AJK**, Bingley PJ, Bonifacio E, Palmer JP, Gale EAM. A novel micro-assay for insulin-autoantibodies. *J Autoimmunity* 10, 473-478, 1997
- Wortsman J**, Kumar V. Case report: idiopathic hypoparathyroidism co-existing with celiac disease: immunologic studies. *Am J Med Sci* 307(6), 420-427, 1994
- Yamashita M**, Fukui H, Sugama K, Horio Y, Ito S, Mizuguchi H, Wada H. Expression cloning of a cDNA encoding the bovine histamine 1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(24), 11515-11519, 1991
- Yu CK**, Chen CC, Chen CL, Wang JR, Liu CC, Yan JJ, Su IJ. Neutralizing antibody provided protection against enterovirus type 71 lethal challenge in neonatal mice. *J Biomed Sci* 7(6), 523-528, 2000
- Yu L**, Chase HP, Falorni A, Rewers M, Lernmark A, Eisenbarth GS. Sexual dimorphism in transmission of expression of islet autoantibodies to offspring. *Diabetologia* 38, 1353-1357, 1995
- Yu L**, Robles DT, Abiru N, Kaur P, Rewers M, Kelemen K, Eisenbarth GS. Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: Evidence for early determination of subsequent diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(4), 1701-1706, 2000
- Zaretsky JZ**, Weiss M, Tsarfaty I, Hareuveni M, Wreschner DH, Keydar I. Expression of genes coding for pS2, c-erbB2, estrogen receptor and the H23 breast tumor associated antigen. A comparative analysis in breast cancer. *FEBS Lett* 265(1-2), 46-50, 1990
- Zhang S**, Zhang HS, Reuter VE, Slovin SF, Scher HI, Livingston PO. Expression of potential target antigens for immunotherapy on primary and metastatic prostate cancers. *Clin Cancer Res* 4(2), 295-302, 1998

- Zhang ZJ**, Davidson L, Eisenbarth GS, Weiner HL. Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 10252-10256, 1991
- Ziegler AG**, Vardi P, Ricker AT, Hattori M, Soeldner JS, Eisenbarth GS. Radioassay determination of insulin autoantibodies in NOD mice. Correlation with increased risk of progression to overt diabetes. *Diabetes* 38(3), 358-363, 1989
- Ziegler AG**, Hillebrand B, Rabl W, Mayrhofer M, Hummel M, Mollenhauer U, Vordemann J, Lenz A, Standl E. On the appearance of islet associated autoimmunity in offspring of diabetic mothers: a prospective study from birth. *Diabetologia* 36(5), 402-408, 1993
- Ziegler AG**, Standl E. Typ-I-Diabetes: Pathogenese einer Immunkrankheit. *Dtsch Med Wschr* 119, 705-706, 1994
- Ziegler AG**, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes* 48(3), 460-468, 1999
- Ziegler AG**, Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA* 290(13), 1721-1728, 2003
- Zugel U**, Steinmeyer A, Giesen C, Asadullah K. A novel immunosuppressive 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ analog with reduced hypercalcemic activity. *J Invest Dermatol* 119(6), 1434-1442, 2002

VORVERÖFFENTLICHUNGEN

Originalarbeiten:

Bearzatto M, Naserke H, Piquer S, Koczwara K, Lampasona V, Williams A, Christie MR, Bingley PJ, Ziegler AG, Bonifacio E. Two distinctly HLA-associated contiguous linear epitopes uniquely expressed within the islet antigen 2 molecule are major autoantibody epitopes of the diabetes-specific tyrosine phosphatase-like protein autoantigens. J Immunol 168 (8), 4202-4208, 2002

Koczwara K, Schenker M, Schmid S, Kredel K, Ziegler AG, Bonifacio E. Characterization of antibody responses to endogenous and exogenous antigen in the nonobese diabetic mouse. Clin Immunol 106 (2), 155-162, 2003

*Schmid S, Koczwara K, Schwinghammer S, Lampasona V, Ziegler AG, Bonifacio E. Delayed exposure to wheat and barley proteins reduces diabetes incidence in non-obese diabetic mice. Clin Immunol 2004 – zur Veröffentlichung akzeptiert und im Druck

*Koczwara K, Ziegler AG, Bonifacio E. Transmission of maternal islet antibodies and risk of autoimmune diabetes in offspring of mothers with type 1 diabetes. Diabetes 53, 3017-3020, 2004

*Koczwara K, Ziegler AG, Bonifacio E. Maternal immunity to insulin does not affect diabetes risk in progeny of non obese diabetic mice. Clin Exp Immunol 2004
– zur Veröffentlichung akzeptiert und im Druck

*Koczwara K, Schwinghammer S, Ziegler AG, Bonifacio E. Influence of oral H1 and H2 receptor blockade on type 1 diabetes progression in the nonobese diabetic mouse.
– in Vorbereitung

In den mit * gekennzeichneten Artikeln sind wesentliche Teile der Doktorarbeit enthalten.

Übersichtsarbeiten:

Achenbach P, Koczwara K, Schmid S, Walter M. 37. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Dresden 8.5.-11.5.2002: Immunologie des Diabetes mellitus Typ 1. Diabetes Congress-Report 2, 13-18, 2002

Abstracts:

Koczwara K, Naserke HE, Ziegler AG, Bonifacio E. Analyse von Antikörpersubklassen in NOD-Mäusen nach Immunisierungen mit Diabetes-assoziierten Antigenen und Kontroll-Antigenen (Ag). Diabetes und Stoffwechsel 10, Suppl. 1, 82, 2001

Koczwara K, Schenker M, Schmid S, Kredel K, Ziegler A-G, Bonifacio E. Characterization of antibody responses to endogenous and exogenous antigen in the NOD mouse. Diabetes Metab Res Rev 18, Suppl. 4, S18, 2002

Schmid S, Koczwara K, Ziegler AG, Bonifacio E. Delayed exposure to dietary gluten reduces diabetes incidence in NOD-mice. Diabetes Metab Res Rev 18, Suppl. 4, S18, 2002

Koczwara K, Hummel M, Knopff A, Mollenhauer U, Bonifacio E, Ziegler A-G. Ist die Übertragung mütterlicher Inselantikörper bei Geburt mit einem erhöhten späteren Diabetesrisiko bei den Nachkommen verbunden? Diabetes und Stoffwechsel 12, Suppl. 1, 24, 2003

Walter M, Koczwara K, Knopff A, Pfeilschifter J, Standl E, Ziegler A-G. 1,25-Dihydroxy-Vitamin D3 for preservation of beta cell function in patients with newly diagnosed type 1 diabetes. Diabetes und Stoffwechsel 12, Suppl. 1, 98, 2003

Walter M, Koczwara K, Knopff A, Pfeilschifter J, Standl E, Ziegler A-G. 1,25-Dihydroxy-Vitamin D3 for preservation of beta cell function in patients with newly diagnosed type 1 diabetes. Diabetologia 46, Suppl. 2, 2003

DANKSAGUNG

Frau Prof. Dr. Anette-G. Ziegler und Herrn Dr. Ezio Bonifacio möchte ich ganz herzlich danken, da sie die Durchführung und das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben. Frau Prof. Dr. Ziegler danke ich im Besonderen, da sie mir das Thema zur Bearbeitung überlassen hat und für die Möglichkeit diese Arbeit in ihrer Klinisch-Immunologischen Abteilung am Institut für Diabetesforschung in München durchzuführen. Ebenso möchte ich mich für die unermüdliche Hilfe und Diskussion bezüglich der vorliegenden Niederschrift bedanken. Ferner ist ihre wissenschaftliche Förderung außergewöhnlich; das ermöglichte mir bereits die Teilnahme an Kongressen im In- und Ausland und die Veröffentlichungen unserer Studien. Herrn Dr. Bonifacio danke ich ganz besonders für die ständig neuen innovativen Ideen und Vorschläge bezüglich der Umsetzung dieser Arbeit. Darüber hinaus danke ich ihm für die andauernde fachliche Diskussion und seine Hilfe bei den Ergebnisanalysen.

Für die universitäre Betreuung als Doktormutter, was die Voraussetzung war um diese Arbeit als Dissertation anfertigen zu können, für die wertvollen Hinweise bezüglich des Aufbaus und der Niederschrift und letztendlich für die Beurteilung meiner Arbeit bedanke ich mich sehr herzlich bei Frau Prof. Dr. Hannelore Daniel.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Sandra Schmid für ihre ständige Bereitschaft zur Diskussion und für viele wertvolle Vorschläge bezüglich der alltäglich Durchführung meiner Therapiestudien. Ferner danke ich ihr für ihre Vorarbeiten, die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfe bei den Untersuchungen des Einflusses von glutenfreier Ernährung im NOD Mausmodell. Herrn Dr. Markus Walter gilt mein Dank für die Patientenbetreuung und seine unermüdliche Bereitschaft meine Fragen bezüglich der klinischen Durchführung der Calitrioltherapie zu beantworten. Herrn Mike Schenker möchte ich für die Erstellung, Pflege und stets verfügbare fachliche Hilfe im Umgang mit der „Mäusle“- und Patienten-Datenbank danken.

Frau Annette Knopff danke ich für alle ihre Hilfen, Bemühungen und Durchführungen bei den alltäglichen Laborarbeiten, die zum Gelingen dieser Arbeit außerordentlich beigetragen haben. Ferner danke ich Karolina von Dalwigk und Ulrike Mollenhauer für ihre Unterstützung bei den Antikörpermessungen der Nabelschnurproben von Kinder aus der BABYDIAB Studie.

Bei Stefanie Krause, Christine Engelhardt, Karolina von Dalwigk und Susanne Schwinghammer möchte ich mich für ihre tatkräftige Mithilfe bei der Versorgung, Nachverfolgung, Aufbereitung, Konservierung und ihren ergänzenden Untersuchungen meiner, im Rahmen dieser Arbeit verwendeten, NOD Mäuse von ganzem Herzen bedanken.

Allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe und des Instituts für Diabetesforschung in München danke ich für eine nette und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Frau Christa Adler danke ich herzlich für die engagierte Korrektur von Rechtschreibung und Grammatik in der vorliegenden Niederschrift.

Selbstverständlich gilt mein außerordentlicher Dank Stefan und meiner Familie, die mich immer bestätigt und eifrig unterstützt haben, was ich als Fundament für die erfolgreich Durchführung und Niederschrift dieser Arbeit bezeichnen möchte.

LEBENS LAUF

Name Kerstin Koczvara
Geburtstag 28.01.1976
Geburtsort Lüdenscheid
Staatsangehörigkeit deutsch
Anschrift Hanselmannstr. 10
80809 München
Telefon: 089-35818877

Schul Ausbildung

- Grundschule 1982 bis 1986 Grundschule-West in Halver
- Realschule 1986 bis 1988 Realschule in Halver
- Gymnasium 1988 bis 1995 Anne-Frank-Gymnasium in Halver
- Abitur 19.06.1995 am Anne-Frank-Gymnasium in Halver mit der Note 2,3 ("gut")

weitere Ausbildung

- Diplomstudium 1995 bis 2001 Studium der Haushalts- und Ernährungswissenschaften im Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
- Diplomarbeit vom 01.11.1999 bis 01.06.2000 am Institut für Diabetesforschung in München unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. A.-G. Ziegler zum Thema "Charakterisierung der humoralen Immunantwort im Tiermodell des Typ 1 Diabetes nach Immunisierungen mit diabetesassoziierten Antigenen"
- Diplomabschluss Diplomprüfung zur Diplom Oecotrophologin (Dipl.oec.troph.) am 25.04.2001 in Gießen mit der Endnote 2,1 ("gut")
- Doktorarbeit seit 01.06.2001 am Institut für Diabetesforschung in München in der Klinisch-Immunologischen Abteilung bei Frau Prof. Dr. A.-G. Ziegler zum Thema "Immuninterventionen zum Erhalt der β -Zellfunktion im murinen und humanen Autoimmundiabetes"
- Promotionsstudium seit 01.10.2001 an der Technischen Universität in München, am Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt