

Aus dem Städtischen Klinikum München - GmbH -
Krankenhaus München - Schwabing
Lehrkrankenhaus der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

und dem

Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
(Lehrstuhl Bakteriologie) der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

Die Bedeutung enteroviraler Infektionen
für die Entstehung und den Verlauf von Inselautoimmunität
bei Kindern von Müttern und Vätern mit Typ 1 Diabetes

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der
medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von Armin Irnstetter
aus Ingolstadt
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. A.-G. Ziegler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Roscher
Prof. Dr. G. W. Bornkamm

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2008

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1-20
1.1 Ätiologie und Pathogenese des Typ 1 Diabetes	4
1.1.1 Rolle der T-Lymphozyten bei Typ 1 Diabetes	4
1.1.2 Insel-Antikörper bei Typ 1 Diabetes	6
1.1.3 Genetische Prädisposition des Typ 1 Diabetes	9
1.1.4 Umweltfaktoren	11
2. Fragestellung	21-22
3. Probanden und Methoden	23-30
3.1 Untersuchtes Kollektiv-Konzeption der BABYDIAB-Studie	23
3.2 BABYDIAB Follow Up	24
3.3 CV- Infektionen während der Schwangerschaft	26
3.3.1 Methoden	27
3.4.1 Coxsackievirus-Antikörper-Assay	27
3.4.1.1 CV-Ak-Screening-Test SERION ELISA classic	27
3.4.1.2 Sandwich-ELISA Test des Max v. Pettenkofer-Instituts München	28
3.4.1.3 Insel-Antikörper/ Assays und HLA-Bestimmung	29
3.5 Statistik	30

	Seite
4. Ergebnisse	31-46
4.1 Die Infektion mit Coxsackieviren in früher Kindheit war bei Kindern von Müttern oder Vätern mit T1D ein seltenes Ereignis	31
4.2 Coxsackievirusinfektionen waren bei Kinder von Mütter oder Vätern mit T1D nicht mit der Entwicklung von Insel-Antikörpern assoziiert	35
4.3 Einfluss des HLA-DR Genotyps auf die humorale Immunität gegenüber Coxsackieviren bei BABYDIAB-Kindern	38
4.4 Der Einfluss von CV-Infektionen bei Müttern mit T1D oder Gestationsdiabetes auf die Entwicklung von Inselautoimmunität bei deren Nachkommen	40
5. Diskussion	47-59
6. Zusammenfassung	60-61
7. Literaturverzeichnis	62-72
8. Abkürzungsverzeichnis	73
9. Danksagung	74
10. Lebenslauf	75

1. Einleitung

Schwerpunkte der aktuellen Pathogeneseforschung zum Typ 1 Diabetes (T1D) gelten heute der Charakterisierung der präklinischen Inselautoimmunität beim humanen T1D sowie im Tiermodell der NOD (Non-obese-diabetic)-Maus. 1989 wurde die weltweit erste und größte prospektive Studie zur Ätiologie und Pathogenese des humanen T1D, die BABYDIAB-Studie unter der Leitung von Prof. A.-G. Ziegler am Institut für Diabetesforschung in München begonnen. Diese untersucht die Entwicklung humoraler Inselautoimmunität in Relation zu genetischen und Umweltfaktoren bei Kindern von Eltern mit T1D vom Zeitpunkt der Geburt an (Roll et al 1996/ Ziegler et al 1999/ Ziegler et al 2003). Eines der ersten Hauptergebnisse war, dass Inselautoimmunität bereits sehr früh in den ersten beiden Lebensjahren entsteht. Neben der BABYDIAB-Studie haben eine Vielzahl weiterer internationaler Forschungsprojekte in den letzten 10 Jahren enorme Fortschritte auf dem Weg zu einer differenzierteren Immundiagnostik erzielt um das Auftreten von Inselautoimmunität in der präklinischen Phase präziser vorherzusagen und damit die diagnostische Basis für gezielte Immuninterventionen zu schaffen.

Der Typ 1 Diabetes (T1D) ist eine erbliche, chronische Stoffwechselerkrankung multifaktorieller Genese, bei der im Rahmen eines Autoimmunprozesses eine kontinuierliche selektive Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas durch das körpereigene Immunsystem erfolgt. Das Versiegen der Insulinproduktion führt letztendlich zu einem absoluten Mangel an Insulin und damit zur klinischen Manifestation der Erkrankung.

Der Bericht des Expert Committees zur Diagnose und Klassifikation des Diabetes mellitus aus dem Jahr 1997 unterscheidet ätiologisch 3 Diabetesformen:

Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes und andere spezifische Typen wie z.B. genetische Defekte in der β -Zellfunktion (früher MODY) oder Gestationsdiabetes.

In Deutschland beträgt die Prävalenz für den T1D aktuell etwa 0,7 Prozent. Die Zahl der Neuerkrankungen hat in den letzten Jahren weltweit stetig zugenommen (Michaelis et al 1993/Krolewski et al 1987).

Im Zeitraum von 1993 bis 1994 fand sich beispielsweise in der Region Düsseldorf bei Kindern und Jugendlichen im Alter unter 15 Jahren eine T1D - Inzidenz von 13,4 /100.000 Einwohner pro Jahr (Giani/ Rosenbauer 1996). In den neuen Bundesländern stieg die Inzidenz dabei vor allem in der Altersgruppe von 10 bis 19 Jahren, von 5,6 auf 11,8 Diabetiker pro 100.000 Einwohner pro Jahr (Michaelis et al 1993). Dabei bestehen erhebliche regionale Unterschiede, z. B. zeigte die ESPED-Studie (Erfassung seltener pädiatrischer Erkrankungen), dass die Neuerkrankungsrate in ländlichen Regionen deutlich niedriger als in urbanen Gebieten liegt. Im Jahre 1993 und 1994 wurde dabei im Rahmen einer bundesweiten Untersuchung bei Kindern im Alter unter 5 Jahren eine T1D - Inzidenzrate von 6,6 pro 100.000 Personenjahre ermittelt (Rosenbauer et al 1996). In Finnland, das weltweit zurzeit die höchste Rate an Neuerkrankungen aufweist, ist sie doppelt so hoch wie noch vor 30 Jahren (Green et al 1998/ Karvonen et al 2000/ Akerblom et al 1985).

Die rasche weltweite und stetige Zunahme der Erkrankungshäufigkeiten kann dabei nicht durch eine entsprechend beschleunigte Verbreitung von Suszeptibilitätsgenen erklärt werden, sondern legt eine Mitbeteiligung verschiedener Umweltfaktoren an der Krankheitsentstehung nahe. Von den diskutierten Umweltfaktoren stand in den letzten Jahren besonders die Bedeutung von Ernährungsbedingungen, Impfungen und Infektionen im Mittelpunkt der Diskussion (Viskary H et al 2005/ Viskary et al 2004/ Ziegler et al 2003/ Hummel et al 2002).

Insbesondere enteroviralen Infektionen wird in einer Vielzahl von aktuellen internationalen Studien eine Triggerfunktion bei der Initiierung und Beschleunigung des Autoimmunprozesses bei der Entstehung des T1D zugeschrieben. Dabei muss bedacht werden, dass fast sämtliche Befunde, die eine Assoziation zwischen enteroviralen Infektionen und der Entwicklung eines T1D nahe legen, in skandinavischen Ländern - und dort ganz besonders in Finnland - gemacht wurden und diese Befunde bislang nicht in weiteren Studien aus anderen Ländern bestätigt werden konnten. Umso bedeutsamer war es deshalb für uns, in der vorliegenden Arbeit, die Rolle der zur Familie der Enteroviren gehörenden Coxsackieviren im Zusammenhang mit der Entstehung und Progression der Inselautoimmunität im Rahmen der prospektiven BABYDIAB-Studie zu untersuchen.

Die aktuelle Bedeutung der „Enterovirus-Hypothese“ zeigt sich auch an der im Jahr 2000 begonnenen europäischen, von der EU geförderten INCO-Multizenterstudie, welche in der nicht-diabetischen Allgemeinbevölkerung (Neugeborene, Schulkinder und Schwangere) aus 8 europäischen Ländern die Prävalenz von Antikörpern gegen verschiedene Enteroviren in Relation zur Typ1-Diabetes-Prävalenz untersuchte. Unsere Arbeitsgruppe hatte hier als einziger Vertreter aus Deutschland an dieser Untersuchung teilgenommen.

Seit 2005 nimmt die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Ziegler als eines von drei europäischen Zentren teil an der internationalen TEDDY (Trial to evaluate the determinants of diabetes in the young)-Studiengruppe, bei der Kinder mit einem erhöhten genetischen Risiko für einen Typ 1 Diabetes von Geburt an engmaschig und prospektiv über 23 Jahre untersucht werden. Ziel dieser größten Typ 1 Diabetesstudie aller Zeiten ist es, genetische und Umweltfaktoren noch genauer zu evaluieren um herauszufinden welche Ursachen für die Entstehung von Inselautoimmunität verantwortlich sind und welche Faktoren den Verlauf der Immunantwort aggravieren oder attenuieren können. Die Rekrutierung von Kindern in diese Studie läuft von Beginn an sehr erfolgreich.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel im Rahmen der BABYDIAB-Studie den Einfluss von Coxsackievirusinfektionen während der Schwangerschaft bzw. der frühen Kindheit auf die Entstehung von Inselautoimmunität bei den Nachkommen von Typ 1 Diabetikern zu evaluieren.

1.1 Ätiologie und Pathogenese des Typ 1 Diabetes

1.1.1 T-Lymphozyten bei Typ 1 Diabetes (T1D)

Der T1D ist eine chronische Erkrankung, bei der es auf der Grundlage einer genetischen Prädisposition zu einer Autoimmuninsulinitis mit konsekutiver Zerstörung der β -Zellen der Langerhansschen Inseln und absolutem Insulinmangel kommt. Möglicherweise ist dabei die Entstehung der Insulinitis überwiegend genetisch determiniert, wobei Umweltfaktoren die weitere Progression entweder beschleunigen oder aber inhibieren könnten.

Über die Dynamik der β -Zellzerstörung im Verlauf des Autoimmunprozesses bei Typ 1 Diabetes bestehen dabei nur unzureichende Kenntnisse. Das klassische Modell von G. Eisenbarth geht vereinfacht von einem linearen Verlust der β -Zell-Masse aus wobei sich dieser Verlust proportional zur Aktivität des Autoimmunprozesses verhält, welche durch das Vorhandensein von zirkulierenden Insel-Antikörpern abgeschätzt werden kann (Eisenbarth 1986/ Atkinson 2001/ Verge et al 1996).

Andere Modelle vermuten in Analogie zu den Beobachtungen im Tiermodell der NOD-Maus auch bei der humanen Inselautoimmunität während der präklinischen Phase Perioden von latenten und aktiven Phasen der Immunantwort (Kolb 1997/ Shimada et al 1996).

Eine wesentliche pathogenetische Rolle spielen nach heutiger Auffassung spezifische T-Helferzellen, die Th1- bzw. Th2-Lymphozyten. Sie sind Träger der zellulären Immunität bzw. humoralen Immunität, die als entzündliche Infiltrate bei in-situ Untersuchungen der Langerhansschen Inseln insbesondere bei Ausbruch der Diabeteskrankheit nachgewiesen werden können (Bottazzo et al 1985). Ob die zelluläre Immunantwort relativ spät im Verlauf des Autoimmunprozesses nach einer latenten Phase nicht-destruktiver Th2-dominierter Immunantwort entsteht (Kolb 1997/ Schloot et al 2002) oder spontan und relativ früh mit einer Immunantwort gegen ein primäres Autoantigen beginnt, die sich dann in Form eines Spreadings gegen weitere Autoantigene ausbreitet (Tian et al 1998/ Tian et al 1999) ist dabei unklar.

Die beiden Lymphozytenpopulationen beeinflussen sich dabei gegenseitig über eine Ausschüttung von Zytokinen und wirken immunmodulatorisch:

Th1-Zellen führen über die Ausschüttung von spezifischen Mediatoren (z.B. Interferon γ , Interleukin IL-2, TNF) zu entzündlichen, autodestruktiven Prozessen im Sinne einer Beschädigung und Zerstörung der Inselzellen, während die als Gegenspieler fungierenden Th2-Zellen insbesondere Interleukin 4 und 10 sezernieren und bei Th1-dominierten Autoimmunerkrankungen protektiv wirken können (Tisch et al 1996/ Scott 1993/ Paul u. Seder 1994).

Die erwähnten Lymphokine sind befähigt ihre Produktionsorte jeweils gegenseitig zu hemmen und scheinen als immunologische Effektormoleküle an der Zerstörung der β -Zellen beteiligt zu sein (Mandrup-Poulsen et al 1986).

Verschiedene Studienergebnisse legen nahe, daß es beim T1D durch unspezifische Umweltfaktoren zu einem Ungleichgewicht der T-Helferzellen mit einem Überwiegen der Th1-Zellen kommt, die über die Ausschüttung der genannten Mediatoren die Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen einleiten. Eine erhöhte Th1/Th2-Ratio fördert, eine erniedrigte Th1/Th2-Ratio bremst demzufolge dieses Phänomen (Liblau et al 1995/ Oldstone 1988).

Inzwischen wurden auch Th₀- und Th₃-Zellen identifiziert, die ebenso regulatorische Eigenschaften bei autoimmunen Entzündungsprozessen besitzen. Deshalb wird heute das etwas zu reduktionistische dichotome Th1-Th2-Modell zunehmend zugunsten eines allgemeineren Konzeptes verlassen, in dessen Mittelpunkt immunregulatorische T-Zellen ohne feste Zuordnung zum Th1- oder Th2-Phänotyp stehen (Jaeckel et al 2005).

In aktuellen Studien zeigte sich, dass von dem Pankreas benachbarten Lymphknoten von Typ 1 Diabetikern T-Zellen extrahiert werden konnten, die ein Epitop des Humaninsulins erkannten (Kent et al 2005). Auch wurde parallel bei NOD-Mäusen ein Epitop des Insulinmoleküls neu identifiziert, dass für die Entstehung eines autoimmunen Typ 1 Diabetes eine entscheidende Rolle spielt (Nakayama et al 2005).

1.1.2 Insel-Antikörper und Typ 1 Diabetes

Neben der Zerstörung der β -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas durch Th1-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen und Makrophagen lässt sich der Autoimmunprozess durch das Auftreten spezifischer Insel-Antikörper charakterisieren.

Ihnen kommt eine entscheidende Rolle in der Diagnostik, und, da sie oft schon Jahre vor der klinischen Manifestation im Serum nachweisbar sind, auch in der Prädiktion des T1D zu (Roll u. Ziegler 1997/ Bonifacio et al 2004).

Die vier bedeutendsten und für die Prädiktion und Differentialdiagnose aussagekräftigsten Antikörper sind gegen Inselzell-Antigene (ICA), Protein-Tyrosinphosphatase IA-2 (IA-2A), Glutamatdecarboxylase (GADA) und Insulin (IAA) gerichtet.

Inselzell-Antikörper (ICA) wurden erstmals 1974 von Doniach und Bottazzo entdeckt. Sie repräsentieren Immunglobuline der Klasse IgG, die auf Gefrierschnitten von humanem Pankreas mit verschiedenen Antigenen der Inselzellen reagieren (Bottazzo et al 1974). Sie sind bei 50-80% der Typ 1-Diabetiker bei Manifestation der Erkrankung nachweisbar (Irvine et al 1977).

Insulin-Autoantikörper (IAA) wurden 1983 erstmals von Palmer beschrieben (Palmer et al 1983) und ihre Bedeutung für die Prädiktion in zahlreichen Studien bestätigt. IAA sind β -zellspezifische humorale Immunmarker, die vor exogener Insulintherapie auftreten, eine hohe Affinität für körpereigenes Insulin besitzen und altersabhängig bei 16-69 % der neu diagnostizierten Diabetiker im Serum nachweisbar sind (Wilkin 1990). Sie sind insbesondere bei Kindern, aber nur selten bei Erwachsenen nachweisbar (Karjalainen et al 1989).

In der 2-Jahres Analyse der deutschen BABYDIAB-Studie konnten IAA bei Kindern im Alter von 2 Jahren ebenfalls als häufigste Insel-Antikörper bestimmt werden und fehlten bei nur wenigen Kindern mit bestehender Inselautoimmunität.

Sie erschienen in der Mehrzahl der Fälle bevor andere Autoantikörper im Serum von Probanden nachweisbar waren (Ziegler et al 1999). Neue Befunde zeigen, dass insbesondere hoch-affine IAA ein deutlich höheres Risiko anzeigen, an TD1 zu erkranken als niedrig-affine IAA (Schlosser et al 2005).

60 % der Typ I Diabetiker besitzen zum Zeitpunkt der klinischen Manifestation Antikörper gegen das GABA-synthetisierende Enzym Glutamatdecarboxylase (GADA) (Seißler et al 1993). Im Zusammenhang mit T1D wurde von Antikörpern gegen GAD erstmals von Baekkeskov et al 1982 berichtet (Baekkeskov et al 1982). Die Funktion des Enzyms GAD besteht in der Umsetzung von Glutaminsäure zu GABA, einem Neurotransmitter im zentralen und peripheren Nervensystem (Baekkeskov et al 1990).

Daneben kommt GAD auch in den Inselzellen des Pankreas, in Epithelzellen des Eileiters und in Spermiovorstufen vor (Ellis u. Atkinson 1996). Gegen GAD gerichtete Antikörper sind nicht spezifisch für den T1D, da sie auch im Rahmen neurologischer Erkrankungen wie dem Stiffman-Syndrom oder dem polyendokrinen Syndrom auftreten können (Solimena et al 1990/ Seißler et al 1994).

Antikörper, die gegen das Antigen Protein-Tyrosinphosphatase (IA-2) gerichtet sind, das sich als identisch mit dem früher entdeckten (40 -kDa) Fragment eines 64-kDa Insel-Antigens herausstellte (Payton et al 1995), spielen heute vor allem bei der Risikoabschätzung im Rahmen der kombinierten Antikörperbestimmung (siehe unten) eine Rolle und werden bei 60 % der neu diagnostizierten Diabetiker nachgewiesen (Bonifacio et al 1998). Personen, die zusätzlich zu anderen Antikörpern IA-2A aufweisen, entwickeln schneller eine Diabeteserkrankung als solche ohne IA-2A. Deshalb gilt der Nachweis dieses Insel-Antikörpers im Serum als Hinweis auf eine besonders schnell verlaufende Zerstörung der β -Zellen (Christie et al 1994).

Aufgrund ihrer Sensitivität von etwa 98 % und der damit verbundenen verbesserten Aussagekraft bezüglich der Risikoabschätzung bei Verwandten erkrankter Personen stellt die kombinierte Antikörperbestimmung inzwischen die Methode der Wahl zur Prädiktion und Diagnose des T1D dar. Aktuelle Befunde aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die Prädiktion des Diabetes-Risikos durch Bestimmung und Stratifizierung von Antikörpersubklassen (IAA-IgG1/2/3/4) (Achenbach et al 2004) und der IAA-Affinitäten weiter deutlich verbessert werden kann (Schlosser et al 2005). Während im Kindesalter der gemeinsame Nachweis der Insel-Antikörper IAA und GAD das Screeningverfahren mit der höchsten Sensitivität darstellt, hat sich im Erwachsenenalter die Bestimmung von GAD für die Diabetesprädiktion durchgesetzt.

Das Risiko einen T1D zu entwickeln zeigt eine hohe Korrelation mit den im Serum nachweisbaren Antikörpern, sowie mit der Höhe der Antikörpertiter. Dabei zeigen Personen, die lediglich einen Insel-Ak aufweisen kein erhöhtes Erkrankungsrisiko in den folgenden 5 Jahren, während 2 Antikörper das kumulative Risiko auf 20 % erhöhen und Personen mit 3 oder 4 Antikörper mit einer 70 %-iger Wahrscheinlichkeit an T1D erkranken (Roll u. Ziegler 1997/ Ziegler et al 1990).

Es zeigte sich, daß die angeführten Insel-Antikörper bei Neugeborenen diabetischer Mütter signifikant häufiger nachweisbar sind als in der Normalbevölkerung, nicht dagegen bei Kindern deren Vater an T1D erkrankt ist.

Bei Geburt nachweisbare Insel-Antikörper bei Kindern von Müttern mit T1D repräsentieren transplazentar erworbene Antikörper. Aktuelle Befunde aus der BABYDIAB Studie zeigen, dass Kinder von Müttern, die bei Geburt Insel-Ak aufweisen, ein geringeres Risiko besitzen, an TD1 zu erkranken als Kinder ohne Insel-Ak (Koczwara et al 2004). Ab dem 6. Lebensmonat sind keine Unterschiede hinsichtlich der Prävalenz der Antikörper zwischen den Nachkommen diabetischer Mütter und Väter mehr festzustellen, was auf eine de-novo Produktion des kindlichen Organismus hindeutet (Ziegler et al 1999).

Im Gegensatz zu T-Lymphozyten wirken B-Zellen und die von ihnen gebildeten diabetesassoziierten Autoantikörper selbst nicht zelltoxisch, sondern haben als Antigen-präsentierende Zellen (APC) möglicherweise immunmodulatorische Aufgaben im Sinne einer Steuerung des Aktivierungsgrades spezifischer T-Zellen und damit einer Regulation der Immunantwort des Körpers (Simitsek et al 1995).

Dies erfolgt mit Hilfe der ausschließlich auf immunkompetenten Körperzellen (z.B. Antigen-präsentierenden Zellen) exprimierten HLA-Klasse II-Molekülen, die nach Antigenbindung der Antigenpräsentation gegenüber CD 4 T-Lymphozyten (T-Helferzellen) dienen. Auf diesem Weg können B-Lymphozyten den Autoimmunprozess durch Aktivierung von T-Zellen verstärken oder aber inhibieren.

1.1.3 Genetische Prädisposition des Typ 1 Diabetes

Der T1D ist eine Autoimmunerkrankung, die besonders Personen mit bestimmten genetischen Risikokonstellationen betrifft (Ziegler u. Eisenbarth 1990 / Ziegler et al 1989/ Ziegler et al 1990/ Walter et al 2003). Etwa 5 % der Verwandten ersten Grades eines Typ I Diabetikers entwickeln diese Erkrankung, bei eineiigen Zwillingen liegt die Konkordanzrate bei etwa 30-50 % (Barnett et al 1981).

Die Vererbung erfolgt polygen, wobei dem Major Histocompatibility Complex (MHC), einer Genregion angesiedelt auf dem Chromosom Nr. 6, die größte Bedeutung zukommt. Der MHC enthält die genetische Information sowohl für HLA-Klasse-1-(HLA-A,B,C)-Moleküle, die auf allen kernhaltigen Körperzellen sowie den Thrombozyten exprimiert werden, als auch für HLA-Klasse-2-(HLA-DR,DQ,DP)-Moleküle, die ausschließlich auf immunkompetenten Zellen des Körpers (B-Lymphozyten, aktivierte T-Lymphozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Langerhanszellen der Epidermis) zu finden sind. Bedeutsam für die Pathogenese des T1D sind die HLA-Klasse-2 Moleküle, da sie der Antigenpräsentation gegenüber CD 4 (Helfer)-T-Lymphozyten dienen und damit die Immunantwort regulieren. Erstmals aufgezeigt wurde diese Beziehung 1973 von Singal und seinen Mitarbeitern (Singal u. Blajchman 1973).

Um CD4-Helfer-Lymphozyten zu aktivieren müssen sie das spezifische Antigen sowie HLA-Klasse-2 Moleküle, wie zum Beispiel HLA-DR an der Membran der Antigen-präsentierenden Zelle erkennen. Diese Antigene können von T-Helferzellen nur dann erkannt werden, wenn sie gemeinsam mit HLA-Molekülen präsentiert werden. Verschiedene T-Lymphozyten-Subpopulationen reagieren dabei mit demselben Antigen, wenn dieses in Verbindung mit unterschiedlichen HLA-Molekülen präsentiert wird.

Dieses Phänomen wird als HLA-Selbst-Restriktion bezeichnet, da die HLA-Moleküle hemmenden Einfluss auf die Aktivierung von T-Lymphozyten ausüben (Bruserud et al 1985).

Die Allele DR 4 und DR 3 werden besonders häufig auf immunkompetenten Zellen von Typ I Diabetikern nachgewiesen: In 95 % der Fälle wird mindestens eines der beiden Risikoallele exprimiert, bei nicht-diabetischen Normalpersonen aber nur in etwa 40 %.

Daher scheinen diese Allele lediglich einen prädisponierenden Faktor, jedoch keine zwingende Voraussetzung für die Entstehung eines T1D darzustellen (Cudworth u. Wolf 1982).

Im Gegensatz dazu wirken HLA DR2- und DR5-Allele durch ihren protektiven Einfluss einer Diabetesentstehung entgegen und sind somit mit dem Erkrankungsrisiko negativ assoziiert (Thomson 1984/ Ziegler u. Eisenbarth 1990).

Weitere genetische Untersuchungen zeigten, daß das Risiko des Auftretens eines Typ 1 Diabetes insbesondere an das Vorhandensein spezifischer DQ-Allele gebunden ist, die mit den eingangs erwähnten DR-Allelen eng assoziiert sind. Bei identischen DR-Allelen entscheidet über die Diabetesanfälligkeit des Individuums ausschließlich der vorliegende DQ-Haplotyp: Beispielsweise ist der Haplotyp DR4-DQB1*302 mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert während die Kombination DR4-DQB1*301 keine Diabetes-Prädisposition darstellt (Ziegler u. Standl 1994).

In diesem Zusammenhang konnte im Rahmen mehrerer Studien gezeigt werden, daß innerhalb der kaukasischen Bevölkerung das Fehlen der Aminosäure Asparaginsäure (Asp) an Position 57 der DQ β -Kette mit einer erhöhten Inzidenz für Typ I Diabetes einhergeht (ReijonenH et al 1991).

1.1.4 Umweltfaktoren

Nach heutiger Vorstellung entsteht der T1D durch ein komplexes Zusammenspiel von genetischer Prädisposition und verschiedenen Umweltfaktoren, welche den der Erkrankung zugrundeliegenden Autoimmunprozess in seinem Verlauf sowohl beschleunigen als auch inhibieren können. Für das Vorliegen exogener Faktoren sprechen folgende Befunde:

1. Eineiige Zwillinge weisen lediglich eine Konkordanzrate von 30-50 % für den T1D auf. Somit können die genannten Risikogene bei vorliegender genetischer Identität nicht alleine für die Krankheitsentstehung verantwortlich gemacht werden.

2. Abhängig von der geographischen Lage ergibt sich ein unterschiedliches Erkrankungsrisiko: Ausgehend von den skandinavischen Ländern mit den höchsten Neuerkrankungsraten nimmt das relative Risiko im Sinne eines Nord-Süd-Gradienten ab (Diabetes Epidemiology Research Group 1988). So wurde nördlich des Äquators eine Diabetesinzidenz bis zu 35 pro 100.000 ermittelt, während in Ländern der südlichen Hemisphäre die Inzidenz bei Kindern unter 15 Jahren 15 pro 100.000 nicht überschreitet (Karvonen et al 1993). Die einzig bekannte Ausnahme stellt die Mittelmeerinsel Sardinien dar, bei der aus bisher noch ungeklärten Ursachen über Inzidenzen von bis zu 29 pro 100.000 im Jahr 1990 berichtet wurde (Songini et al 1993).

3. Die Inzidenz des T1D nimmt weltweit zu (Krolewski et al 1987/ Giani et al 1996 / Rosenbauer et al 2002). Dieser deutliche Anstieg der Neuerkrankungsraten um jährlich etwa 3 % kann keinesfalls alleine durch eine Frequenzzunahme von HLA-Risikoallelen erklärt werden.

4. Verschiedene Migrationsstudien zeigen, daß die Nachkommen von Einwanderern aus geographischen Regionen mit geringerer Diabetesinzidenz bereits ein erhöhtes Erkrankungsrisiko aufweisen, welches nach einiger Zeit das ihres Einwanderungslandes erreicht (Bodansky et al 1992/ Elliott 1992/ Patrick et al 1989).

5. Ebenso rückt heute die in vielen Ländern der westlichen Welt zunehmende Häufigkeit eines Übergewichts und damit verbundener Insulinresistenz im Kindesalter in den Blickpunkt. Die Akzelerator-Hypothese geht davon aus, dass die Manifestation eines T1D im Kindesalter durch Übergewicht (Insulinresistenz) vorverlegt wird. Aktuelle Daten einer Studie aus England bei 94 Kindern mit Typ 1 Diabetes, unterstützen dieses Konzept (Wilkin et al 2002). Diese Beobachtung muss bei der Interpretation einer steigenden Inzidenz des T1D im Kindesalter heute sicher zunehmend bedacht werden.

Eine Vielzahl epidemiologischer Studien, fast ausnahmslos Fallkontrollstudien, beschrieben eine mehr oder weniger starke Assoziation zwischen Umweltfaktoren und einem erhöhten Risiko, an T1D zu erkranken.

Dabei galt bislang generell, dass für ein und denselben Umweltfaktor oft widersprüchliche Befunde publiziert wurden und dass, mit Ausnahme der konnatalen Röteln- und CMV-Infektion, bis vor kurzem kein Umweltfaktor identifiziert werden konnte, der für die Krankheitsentstehung des Typ 1 Diabetes ätiologisch relevant ist. Allerdings zeigten Studien aus unserer Arbeitsgruppe und aus der DAISY- Gruppe aus Denver erstmals, dass die Gabe von glutenhaltiger Nahrung vor dem 3. Lebensmonat (BABYDIAB-Studie) bzw. zwischen dem 3. und 6. Lebensmonat (DAISY) mit einem erhöhten Risiko, Insel-Antikörper zu entwickeln, assoziiert war (Ziegler et al 2003/ Norris et al 2003).

- Ernährungsfaktoren

Nach den Ergebnissen einiger älterer Fallkontrollstudien sollten eine frühkindliche Kuhmilchexposition und eine verkürzte Stilldauer (< 3 Monate), das Risiko an T1D zu erkranken, erhöhen. Nach Gerstein et al spielte vor allem der Zeitpunkt der Einführung von Kuhmilchproteinen in die Säuglingsnahrung eine wesentliche Rolle, da Kinder, denen bereits vor dem 4. Lebensmonat Kuhmilchproteine zugefüttert worden war, im Verlauf häufiger einen insulinabhängigen Diabetes entwickelten (Gerstein 1998). Umgekehrt konnte bei Kindern aus Finnland ausschließliches Stillen während der ersten 3-4 Lebensmonate als protektiver Faktor ermittelt werden.

Im Gegensatz zu diesen zahlreichen Fall-Kontrollstudien konnten prospektive Studien keine Assoziation zwischen früher Kuhmilchexposition, bzw. kurzer Stilldauer und einem erhöhten Typ 1 Diabetes mellitus -Risiko finden, so auch die aktuellen Publikationen aus der BABYDIAB-, und der DAISY-Studie (Norris et al 2003/ Ziegler et al 2003).

So zeigte die BABYDIAB-Studie, daß Kinder Typ 1 diabetischer Mütter, die im Verlauf der ersten Lebensjahre Insel-Antikörper entwickelten, nicht kürzer gestillt wurden, oder früher Kuhmilchprodukte in der Säuglingsernährung erhielten, als Nachkommen, die keine Insel-Antikörper entwickelten (Hummel et al 2000).

Dies galt insbesondere auch für jene BABYDIAB- Kinder, die einen HLA-Genotyp aufwiesen, der mit einem stark erhöhten Risiko für Typ 1 Diabetes assoziiert ist.

Diese Ergebnisse stimmen mit den anderen prospektiven Studien aus den U.S.A. und Australien überein, die ebenfalls keine Assoziation zwischen der Stilldauer bzw. der Einführung von Kuhmilchproteinen und dem Auftreten von Inselautoimmunität nachweisen konnten (Norris et al 1996)/ Couper et al 1999). Dagegen zeigte sich in einer Studie im BABYDIAB-Kollektiv ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entstehung von Insel-Antikörpern bei Kindern, die bereits in den ersten drei Lebensmonaten glutenhaltige Nahrungszusätze erhalten hatten (Ziegler et al 2003).

Neben der Stilldauer und der Einführung von Kuhmilchproteinen in die Nahrung wurden noch weitere Ernährungsfaktoren und deren möglicher Einfluss auf die Diabetesentstehung bei Kindern im Rahmen nicht-prospektiver Fall-Kontrollstudien untersucht.

Während eine Arbeitsgruppe aus Kanada keinen Anhalt für einen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich des Konsums von nitrosaminhaltigen Fleischprodukten zwischen einer Gruppe diabetischer Kinder und einer gesunden Kontrollgruppe finden konnte (Siemiatycki et al 1987), ermittelten andere Studien Nahrungsmittel mit einem hohen Nitrosamingehalt (Dahlquist et al 1990) bzw. einem hohen Protein- oder Kohlenhydratanteil bei Kindern bestimmter Altersgruppen als Risikofaktor für Typ 1 Diabetes (Dahlquist et al 1991).

- Perinatale Determination

Eine Inkompatibilität im AB0-Blutgruppensystem zwischen mütterlichem und kindlichem Blut sowie ein hohes Geburtsgewicht wurden in einigen Studien ebenfalls als prädisponierende Faktoren für die Entstehung des T1D in Betracht gezogen, wobei verschiedene Arbeitsgruppen diesbezüglich zu keinem einheitlichen Ergebnis kamen (Dahlquist u. Kallen 1992/ Walczak et al 1989/ Metcalfe u. Baum 1992).

- Impfungen in früher Kindheit

Zahlreiche Studien, u.a. die BABYDIAB-Studie, die auch den Einfluss von Impfvakzinen (BCG, HiB, Tetanus, Pertussis, Diphtherie, Masern, Mumps, Röteln, FSME) auf die Entstehung des T1D untersuchten, kamen zu dem Ergebnis, dass die gemäß der Stiko (Ständige Impfkommission am Robert Koch-Institut) durchgeführten Impfprogramme die Diabetesinzidenz der jeweiligen Population nicht erhöhten (Hummel et al 2000).

Auch ergaben sich keine Hinweise für die von Shehadeh et al aufgestellte These nach der BCG-Impfungen im Sinne eines protektiven Faktors einer Diabeteserkrankung vorbeugen sollen (Shehadeh et al 1994).

Eine in Finnland durchgeführte Untersuchung (Juhela et al 1999) verglich das Ausmaß der zellulären Immunreaktion gegenüber Coxsackievirus B4 in zwei Populationen, die sich hinsichtlich der dort praktizierten Polio-Schutzimpfung unterschieden.

Demzufolge wiesen Kinder, die mit einem attenuierten Polio-Lebendimpfstoff immunisiert wurden eine stärkere, durch T-Lymphozyten vermittelte Immunreaktion gegenüber Coxsackieviren auf als eine Kontrollgruppe, die mit einer inaktivierten Poliovakzine behandelt worden war. Innerhalb der Population, deren zelluläre Immunreaktion durch die Gabe des Lebendimpfstoffs verstärkt ausgebildet war, erkrankten deutlich weniger Kinder an T1D.

Deshalb zogen die Autoren die Möglichkeit in Betracht, dass diese Impfstrategie als protektiver Faktor Einfluss auf die Rate der Diabetesneuerkrankungen nehmen könnte.

Eine Studie aus England (Montgomery et al 2002) untersuchte anhand zweier britischer Geburtskohorten, die von Geburt an bis zum Alter von 30 Jahren bzw. 42 Jahren beobachtet wurden, ob Infektionen mit Pertussis oder Pertussis-Impfungen Einfluss auf die Diabetesinzidenz in den beobachteten Kollektiven nahmen.

Die Autoren kamen hier zu der spekulativen Schlussfolgerung, dass eine Pertussiserkrankung in der Kindheit einen Risikofaktor bzw. eine Pertussis-Impfung einen protektiven Faktor hinsichtlich des Risikos an einem T1D zu erkranken, darstellen. Allerdings konnten diese Befunde bislang in keiner weiteren Studie, insbesondere in keiner prospektiven Untersuchung, bestätigt werden.

- Sozialer Status der Eltern

Interessanterweise wurde die Hypothese aufgestellt, dass Kinder von Eltern, die einer höheren sozialen Schicht angehören ein höheres Risiko aufweisen an einem T1D zu erkranken. So berichtete unter anderem La Porte in einer bereits 1981 erschienenen Studie aus Pittsburgh, dass ein hohes durchschnittliches Einkommen der Eltern auch mit einer erhöhten Diabetesinzidenz ihrer Nachkommen assoziiert war (La Porte et al 1981). Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen überein, die im Tiermodell bei der Non-obese-diabetic-mouse (NOD-Maus) gemacht wurden. Dabei handelt es sich um eine von Makino et al im Jahr 1980 entdeckte weibliche Maus, die spontan klinische Symptome einer Typ 1 Diabetes-Erkrankung entwickelte. NOD-Mäuse weisen einen signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschied bezüglich der Diabetesinzidenz auf: Diese beträgt bis zur 30. Lebenswoche 80 % bei den weiblichen, aber weniger als 20 % bei den männlichen Tieren. Die spontane Diabetesentwicklung ist der des Menschen sehr ähnlich; sie ist gekennzeichnet durch eine autoimmune Insulinitis mit konsekutiver Zerstörung der pankreatischen β -Zellen (Makino et al 1980/ Serreze et al 1988/ Ziegler et al 1989). Es zeigte sich, dass NOD-Mäuse, die unter besseren hygienischen Bedingungen, also einer pathogenärmeren Umgebung aufwuchsen, ebenfalls eine erhöhte Erkrankungsrate aufwiesen (Übersicht bei Fächtenbusch u. Ziegler 1995). Aus dieser Beobachtung ergab sich die zuletzt heftig diskutierte Hypothese, dass ein Immunsystem, welches nur mit wenigen exogenen Krankheitserregern konfrontiert ist, eine nur eingeschränkte Kontrolle über autoreaktive Prozesse erlangt. Ähnliche Beobachtungen wurden z.B. auch für den Morbus Crohn und andere chronische autoimmun-entzündliche Darmerkrankungen gemacht.

- Virale Infektionen

Eine Vielzahl von Fallberichten, der älteste liegt fast 100 Jahre zurück (Harris 1899), beobachtete ein gehäuftes Auftreten eines T1D unmittelbar im Anschluss an Virusinfektionen beziehungsweise einen Anstieg der Diabetesinzidenz nach Virusepidemien im Epidemiegebiet (Szopa et al 1993). Mit Ausnahme der äußerst seltenen kongenitalen Röteln- (Menser et al 1978) und Zytomegalie-Virus-Infektionen (Pak et al 1988) existieren bezüglich der Rolle von Virusinfektionen bei der Pathogenese des T1D bisher nur wenig gesicherte Daten. Inzwischen gilt als erwiesen, dass Kinder, die eine kongenitale Rötelninfektion durchgemacht haben postpartal ein deutlich erhöhtes Risiko (ca. 20 %) besitzen an T1D mellitus zu erkranken, insbesondere wenn sie gleichzeitig eine genetische Risikokonstellation aufwiesen (Menser et al 1978). Ebenso wurde für die konnatale Zytomegalie-Virus-Infektion ein erhöhtes Risiko für T1D nachgewiesen (Pak et al 1988).

- Enterovirale Infektionen

Neben diesen „historischen“ Untersuchungen rücken heute insbesondere die Familie der Enteroviren und speziell deren Untergruppe, die Coxsackieviren in den Blickpunkt. Sie werden aktuell am häufigsten als Risikofaktor für einen T1D diskutiert. Darüberhinaus wurden auch immer wieder Ergebnisse veröffentlicht, die anderen Viren eine Mitbeteiligung an der Pathogenese des T1D zusprechen, wie z.B. die Rotaviren. Diese stellen die häufigsten Erreger einer Gastroenteritis im Kindesalter dar und wurden bei Patienten mit einem genetisch bedingten, erhöhtem Erkrankungsrisiko für einen T1D für die Entwicklung von β -Zell-Autoimmunität verantwortlich gemacht (Honeyman et al 2000).

Die oben genannten Umweltfaktoren könnten auf verschiedene Weise Einfluss auf die Pathogenese des T1D nehmen. So geht ein hypothetisches Modell von der Vorstellung aus, dass Antigene, zum Beispiel Nahrungs- oder Virusbestandteile, das Verhältnis der Th1- und Th2-Lymphozytenpopulationen zugunsten der autodestruktiv wirkenden Th1-(Helfer-)Zellen verschieben könnten, und somit den Autoimmunprozess, der schließlich zur Zerstörung der β -Zellen führt, initiieren (Rabinovitch 1994).

Der Pathomechanismus, infolge dessen insbesondere Enteroviren an der Krankheitsentstehung beteiligt sein könnten, ist noch ungeklärt. Verschiedene Studien am Tiermodell der NOD-Maus legen nahe, dass bestimmte Viren einen Tropismus für β -Zellen aufweisen und auf diese Weise eine direkte Zellyse verursachen könnten. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, daß β -Zellen, die von Enteroviren befallen sind, im Rahmen einer indirekten, also virusinduzierten, Immunreaktion zerstört werden (Jenson et al 1980).

Die bei der direkten Zellzerstörung freigesetzten Inselantigene (ICA) könnten wiederum zur Aktivierung ruhender, autoreaktiver T-Lymphozyten führen und somit den Autoimmunprozess zusätzlich verstärken (Horwitz et al 1998).

Enteroviren könnten aber ebenso eine Rolle als sogenannte "innocent bystander" spielen. Demzufolge produzieren virusinfizierte Zellen als Ausdruck des stattfindenden Entzündungsvorgangs bestimmte Th1-assoziierte Zytokine, wie z.B. IL-2, IL-12 und IFN- γ und Radikale, die schließlich zum Untergang der β -Zellen führen (Kolb et al 1995).

Bei der NOD-Maus wurde 1992 erstmals eine homologe Sequenz von 10 Aminosäuren zwischen GAD 65 und einem Proteinbestandteil von Coxsackievirus B4 namens p2C identifiziert (Kaufman et al 1992/ Baekkeskov et al 1990). In einer Studie, in der die Antikörperreaktivität gegenüber GAD und synthetisch hergestelltem P2C-Protein überprüft wurde, konnten kreuzreagierende Antikörper nachgewiesen werden (Hou et al 1994). Es wurde deshalb zunächst spekuliert, dass es über diese Kreuzreaktion im Sinne eines "molekularen Mimikry" zu einer verstärkten und destruktiven Immunantwort gegen GAD-Antigene auf den β -Zellen und so zur Zerstörung der insulinproduzierenden Zellen kommen könnte.

Deshalb kamen verschiedene Studien zu dem Ergebnis, dass eine gegen GAD gerichtete Immunantwort eine wesentliche Voraussetzung für die Induktion und die Progression der β -Zell-Autoimmunität im Tiermodell darstellt (Kaufman et al 1993/ Tisch et al 1993).

Richter et al konnten bei neu manifestierten Typ I Diabetikern allerdings keine kreuzreagierenden Antikörper gegen das CVB4-pkc2-Protein nachweisen, weswegen unwahrscheinlich ist, dass beim Menschen ein Molekulares Mimikry zwischen Coxsackievirus B4 und GAD-65 eine relevante Rolle spielt. (Richter et al 1994).

Darüberhinaus haben Individuen, die ausschließlich gegen GAD gerichtete Antikörper entwickeln, kein erhöhtes Risiko an einem T1D mellitus zu erkranken (Christie et al 1994/ Gianani et al 1992).

Enterovirale Infektionen, die in den meisten Fällen asymptomatisch verlaufen sind beim Menschen relativ häufig. Enteroviren gehören der Familie der Picornaviren an. Man unterscheidet heute 67 für den Menschen pathogene Serotypen die für mehr als 20 klinische Syndrome verantwortlich gemacht werden, darunter Erkrankungen wie die Poliomyelitis, aseptische Meningitiden und Myokarditiden.

Enterovirale Infektionen zeigen eine jahreszeitliche Häufung in den Sommer- und Herbstmonaten. Nach erfolgter Inokulation erfolgt die Virusreplikation im lymphatischen Gewebe des Pharynx und des Darms, bevor sich die Viren über den Blutweg oder intrazellulär (über mononukleäre Zellen) im Organismus ausbreiten. Anschließend erreichen sie die verschiedenen Zielorgane (ZNS, Leber, Pankreas, Myokard, etc.), wo eine zweite Replikationsphase stattfindet (Graves et al 1997).

Als eine der ersten konnten Gamble et al 1969 über einen möglichen Zusammenhang zwischen dem der Gruppe der Enteroviren zugehörigen Coxsackievirus B4 (CVB4) und T1D berichten. Dabei fanden sich vor allem in der Gruppe der an T1D erkrankten Kinder unter 2 Jahren erhöhte Antikörpertiter für Coxsackieviren im Vergleich zu einer bezüglich des Alters gematchten, nicht-diabetischen Kontrollgruppe (Gamble et al 1969).

Im Jahre 1979 gelang Yoon und seinen Mitarbeitern dann das Anzüchten einer Kultur von Coxsackievirus B4 aus dem Autopsiematerial des Pankreas eines 10 jährigen Jungen, der an seinem neudiagnostizierten T1D verstorben war (Yoon et al 1979). Aufgrund des cross-sektionalen Designs all dieser epidemiologischer Studien konnte nicht entschieden werden, ob Prä-Typ 1 Diabetiker eine erhöhte Empfänglichkeit für enterovirale Infektionen besitzen, also enterovirale Infektionen lediglich ein Epiphänomen oder aber eine mögliche Ursache für die Entstehung von β -Zell-Autoimmunität darstellen und damit ätiologisch relevant sind. Neuere Studien, die sich vor allem mit der Rolle der Coxsackieviren vom Typ B befassen, berichteten über ein häufigeres Auftreten von enteroviralen Antikörpern bei Patienten mit neudiagnostiziertem T1D (D'Alessio 1992/ Helfland et al 1995/ Hyöti et al 1995/ Frisk et al 1992/ Schernthaner et al 1985/ Gamble u. Cumming 1985).

So fand die finnische, prospektive Studie (DiMe) gehäuft erhöhte CV-Antikörpertiter bei Schwangeren deren Nachwuchs im Verlauf sehr früh (vor dem 3. Lebensjahr) T1D entwickelte, sowie bei initial gesunden Geschwisterkindern von Typ 1 Diabetikern, die später ebenfalls erkrankten (Hyöti et al 1996).

Auch Dahlquist et al berichteten in einer, auf dem schwedischen Diabetesregister basierenden Fallkontrollstudie, über erhöhte enterovirale Antikörperserumspiegel (gegen Echo 30/ 9, Coxsackie B5) bei Müttern diabetischer Kinder (Dahlquist et al 1995).

Während diese Ergebnisse mit der Modellvorstellung, dass enterovirale Infektionen einen akzelerierenden Einfluss auf die klinische Manifestation des T1D ausüben, übereinstimmen, liegen bis heute im Rahmen prospektiver Studien nur wenige und teils widersprüchliche Daten bezüglich der Fragestellung vor, ob enterovirale Infektionen kausal an der Entstehung der β -Zell-Autoimmunität beteiligt sind oder lediglich Sekundärereignisse darstellen, zum Beispiel im Sinne einer erhöhten Anfälligkeit von β -Zell-positiven Individuen gegenüber enteroviralen Infektionen.

So konnten die Ergebnisse der finnischen DiMe-Studie, in der über eine Häufung von enteroviralen Infektionen bei Geschwisterkindern berichtet wurde, die im Verlauf Inselzell-Antikörper (ICA) und T1D entwickelten, von der DAISY-Studie aus Denver nicht bestätigt werden. Graves et al konnten in Serum-/ Speichelproben, bzw. Rektalabstrichen β -Zell-positiver Kinder nicht häufiger EV-RNA oder -Antikörper feststellen als in der Kontrollgruppe ohne nachweisbare β -Zell-Autoimmunität (Graves et al 1997).

Da die zahlreichen epidemiologischen Fall-Kontroll-Studien aufgrund ihres Designs keine kausalen Zusammenhänge zwischen EV-Infektionen und Inselautoimmunität aufzeigen konnten sind prospektive Studien erforderlich, um die Rolle von Umweltfaktoren bei genetisch vorbelasteten Patienten oder Verwandten ersten Grades zu bewerten.

Um den Einfluss von CV-Infektionen in utero und während der frühen Kindheit auf die Entwicklung von Inselautoimmunität beurteilen zu können, wurden CV-Infektionen im Rahmen einer prospektiven Studie im zeitlichen Zusammenhang mit dem Auftreten von Inselautoimmunität bei Nachkommen von Typ 1 Diabetikern innerhalb des BABYDIAB-Studienkollektivs untersucht.

Wie groß die Herausforderung ist, einzelne Risikofaktoren (Umweltfaktoren) und deren mögliche Abhängigkeit bzw. Interaktion mit genetischen Risikokonstellationen zu identifizieren, die mit einem T1D assoziiert sind, zeigt sich daran, dass sich im Jahre 2004 alle grossen T1D Forschungszentren weltweit - darunter auch die BABYDIAB-Gruppe- zusammengeschlossen haben, um TEDDY (The Enviromental Determinants of Diabetes in the Young) zu starten, eine prospektive Studie von Geburt an, die über 200 000 Kinder auf Insel-Ak screenen wird um dann Kinder, die diese Antikörper aufweisen bis zum 23. Lebensjahr prospektiv zu untersuchen.

2. Fragestellung

In früheren Fallkontrollstudien wurde über ein gehäuftes Vorkommen von Antikörpern gegen Antigene verschiedener Coxsackieviren bei Patienten mit neudiagnostiziertem T1D bzw. während der Schwangerschaft bei gesunden Müttern, deren Kinder später T1D erkrankten, berichtet (D'Alessio 1992/ Helfland et al 1995/ Frisk et al 1992/ Schernthaner et al 1985/ Gamble u. Cumming 1985).

Unter anderem konnten D'Alessio und seine Mitarbeiter in ihrer retrospektiven Studie aus dem Jahr 1992 eine erhöhte Prävalenz von CVB IgM Antikörpern bei neu diagnostizierten HLA DR 3 positiven Typ 1 Diabetikern (Alter 0-29 Jahre) nachweisen, während sich die Prävalenz bei Typ 1 Diabetikern, die dieses Risikoallel nicht besaßen, statistisch nicht von der (gesunden) Kontrollgruppe unterschied.

Deshalb wurde vermutet, dass Coxsackieviren in der Pathogenese des TD1 eine Rolle spielen. Ob Coxsackievirusinfektionen jedoch ursächlich an der Initiierung von β -Zell-Autoimmunität beteiligt sind oder lediglich deren Entwicklung beschleunigen ist bislang ungeklärt. Ebenso könnten die beschriebenen erhöhten CV-Antikörpertiter bei neumanifestierten Typ 1 Diabetikern auch ein Epiphänomen darstellen, im Sinne einer allgemein erhöhten Anfälligkeit von β -Zell-positiven Individuen gegenüber verschiedenen Virusinfektionen, darunter Erkrankungen an Coxsackieviren.

Auch denkbar wäre, dass Typ 1 Diabetiker aufgrund ihrer HLA-Risikokonstellation eine besonders stark ausgeprägte humorale Immunität gegenüber Virusinfektionen aufweisen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher:

1. den Einfluss von Coxsackievirusinfektionen während der Schwangerschaft bei Müttern mit T1D, Gestationsdiabetes und bei nichtdiabetischen Müttern, deren Partner an T1D erkrankt war auf die Entstehung von β -Zell-Autoimmunität bei deren Nachkommen zu untersuchen
sowie
2. den Einfluss von Coxsackievirusinfektionen während der ersten Lebensjahre auf die Entwicklung von Autoimmunität bei Kindern der oben genannten Kollektive zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurde, im Rahmen der prospektiven BABYDIAB-Studie, das Auftreten von Antikörpern gegen Coxsackieviren parallel zur Entwicklung diabetesassoziierter Autoantikörper (GADA, ICA, IAA, IA-2A) bei Nachkommen von Eltern mit T1D beziehungsweise Müttern mit Gestationsdiabetes bestimmt.

Im Sinne der Fragestellung wurde dann

1) eine Gruppe von Kindern, bei denen im Verlauf persistierende Insel-Antikörper nachgewiesen werden konnten (Versuchsgruppe), mit einer Kontrollgruppe von Nachkommen, die keine humoralen Insel-Antikörper entwickelten nach den Kriterien Alter, Wohnort und Diabetestyp der Eltern „gematched“ und bezüglich der Prävalenz von Antikörpern gegen die Coxsackievirus-Serotypen CVB 3/4/5 verglichen.

2) der zeitliche Zusammenhang von CV-Infektionen und dem Auftreten von Insel-Antikörper evaluiert, sowie die Höhe der CV-Antikörpertiter in beiden Gruppen verglichen.

3) die Häufigkeit des Auftretens von CV-Infektionen während der Schwangerschaft bei Müttern, deren Nachkommen während der Follow-up Untersuchungen Insel-Antikörper entwickelt hatten mit einer Kontrollgruppe von Müttern verglichen, deren Kinder im Verlauf frei von humoralen Insel-Antikörpern blieben.

4) die Prävalenz und Titerhöhe der CV-Antikörper in Abhängigkeit des HLA-DR-Haplotyps bestimmt, um zu untersuchen, ob CV-Infektionen mit bestimmten HLA-DR-Konstellationen assoziiert sind.

3. Probanden und Methoden

3.1 Untersuchtes Kollektiv - Konzeption der BABYDIAB-Studie

Die BABYDIAB-Studie ist eine am Institut für Diabetesforschung angesiedelte deutsche Multizenterstudie, die prospektiv vom Zeitpunkt der Geburt an Inselautoimmunität bei Nachkommen diabetischer Eltern evaluiert. Gleichzeitig wird neben genetischen Untersuchungen der Einfluss frühkindlicher Umweltfaktoren auf die Krankheitsentstehung analysiert um protektive Faktoren und Risikofaktoren zu identifizieren.

Dabei werden Kinder diabetischer Eltern bei Geburt erfaßt und in festgelegten Zeitintervallen bei Geburt und im Alter von 9 Monaten, 2, 5, 8 und 11 Jahren Antikörper gegen Inselzellen (ICA), Insulin (IAA), Protein-Tyrosinphosphatase (IA-2A) und Glutamatdecarboxylase (GADA) untersucht, mit deren Nachweis sich das Risiko eines zukünftigen T1D präzise voraussagen läßt. Die Kinder werden regelmäßig bis zu ihrem 11. Lebensjahr bzw. bis zur Manifestation eines T1D nachuntersucht, wobei bei jeder Verlaufsuntersuchung neben einer Blutentnahme ein anamnestischer Fragebogen ausgefüllt wird.

Neben der Familienanamnese und Angaben zur körperlichen Entwicklung des Kindes sind hierbei besonders Informationen über durchgemachte Infektionskrankheiten (z.B. Masern, Mumps, Röteln, Windpocken, etc.), sowie der Impfstatus von Interesse.

Seit dem Jahr 1989 bis März 2001 wurden 2079 Neugeborene in diese Studie aufgenommen, davon 1598 Kinder bei denen ein Elternteil an T1D erkrankt war und 481 Kinder von Müttern mit Gestationsdiabetes. 1391 der im Rahmen der Studie getesteten Neugeborenen nahmen an den Untersuchungen im Alter von 9 Monaten, 1019 im Alter von 2 Jahren und 298 an der Kontrolluntersuchung im 5. Lebensjahr teil. Die kumulative Drop-out Rate im Alter von 2 Jahren lag bei 7,5 %. Bei allen in die Studie eingeschlossenen Kindern wurde zudem der HLA-Genotyp DR- und DQ-Locus bestimmt, da Kinder mit einem HLA-DR 3/4 beziehungsweise HLA DR 4/4 DQ*non-Asp57 Genotyp ein etwa 20 %-iges Risiko aufweisen innerhalb der ersten beiden Lebensjahre an T1D zu erkranken (Schenker et al 1999).

Bis März 2001 wurden bei 28 Kindern persistierende Antikörper gegen eines oder mehrere Insel-Antigene nachgewiesen. „Persistierend“ wurde definiert als mindestens zweimaliger positiver Antikörpernachweis bei zwei voneinander verschiedenen Follow-up Untersuchungen. Bei 10 Kindern wurde während der Follow-Up Untersuchungen ein manifester T1D mellitus gemäß den Kriterien der WHO diagnostiziert.

In der vorliegenden Arbeit wurden somit nur Kinder der BABYDIAB-Studie berücksichtigt, die bis März 2001 in die laufende Untersuchung eingeschlossen worden sind.

3.2 BABYDIAB Follow Up

Bei allen, seit 1989 in die BABYDIAB-Studie aufgenommenen Kindern, die bis März 2001 im Verlauf Antikörper gegen ein oder mehrere Inselantigene entwickelten (n=28), wurde mit Hilfe eines Screening-Tests IgG-Antikörper gegen ein Panel von Coxsackieviren bestimmt. Dies erfolgte unter Verwendung eines gruppenspezifischen Antigens, das heterotypische (nicht-serotyp-spezifische) Antikörper im Patientenserum bindet.

Im Falle eines positiven Ergebnisses, sowie bei Nachweis von Werten in einem definierten Grenzbereich wurden zusätzlich Immunglobuline der Klassen IgM und IgG gegen die Serotypen CVB3, CVB4 und CVB5 ermittelt und mit denjenigen von 51 Kindern verglichen, die im Rahmen der Follow-up-Untersuchungen keine Insel-Antikörper entwickelt hatten.

Da Coxsackievirusinfektionen epidemisch, d.h. sowohl geographisch als auch saisonal gehäuft auftreten und die Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit fortschreitendem Alter zunimmt, wurden Versuchsgruppe (n =28) und Kontrollgruppe (n =51) nach Geschlecht, Geburtsdatum (Alter) und Geburtsort (regionale Zuordnung über deutsche Postleitzahlen) exakt „gematched“.

Eine Typisierung der HLA-Antigene war bei 68 der 79 getesteten Patienten verfügbar. Das gesamte Kollektiv wurde mindestens bis einschließlich der Follow-Up Untersuchung im zweiten Lebensjahr beobachtet, wobei die mediane Nachuntersuchungszeit beider Gruppen bei 3,3 Jahren (Range 2,0 bis 8,7 Jahre) lag. Die mediane Follow-up Zeit für die Versuchsgruppe betrug 3,6 Jahre, die der Kontrollgruppe 3,2 Jahre.

Bei 20 der 28 Kinder (71,4 %), die Antikörper gegen Inselzellen entwickelt hatten, war die Mutter Typ 1 Diabetikerin, 1 Kind hatte eine Mutter mit Gestationsdiabetes (3,7 %) und bei 7 Kindern war der Vater an T1D erkrankt (25 %).

In der Kontrollgruppe hatten 32 Kinder eine Mutter mit T1D (62,7 %), bei 6 Kindern litt die Mutter an Gestationsdiabetes (11,7 %) und bei 15 Kindern war der Vater Typ 1 Diabetiker (29,4 %).

Jedem Kind der Versuchsgruppe wurde ein nach Geschlecht, Geburtsdatum und Geburtsort gematchtes Kind der Kontrollgruppe zugewiesen und das Auftreten enteroviraler Infektionen in beiden Kollektiven verglichen.

	Insel-Ak positive Kinder	Insel-Ak negative Kinder
Mutter mit T1D	20/28 (71,4 %)	32/51 (62,7 %)
Gestationsdiabetes	1/28 (3,7 %)	6/51 (11,7 %)
Vater mit T1D	7/28 (25 %)	15/51 (29,4 %)

Tabelle 1. Formen und Verteilung des Diabetestyps der Eltern in der Follow-Up- Studie

	Insel-Ak positive Kinder	Insel-Ak negative Kinder
Mädchen	13/28 (46,4 %)	23/51 (45,1 %)
Jungen	15/28 (53,6 %)	28/51 (54,9 %)

Tabelle 2. Geschlechtsverteilung der BABYDIAB-Kinder

3.3 CV-Infektionen während der Schwangerschaft

Zusätzlich wurde bei 16 Müttern, deren Kinder Insel-Antikörper entwickelt hatten und von denen Serum bei Entbindung verfügbar war (Altersmedian bei Entbindung: 29,7 Spanne 23,4 - 44 Jahre) zunächst mit einem Screening-Test IgG-Antikörper gegen ein Panel von Coxsackieviren, sowie serotypenspezifische Antikörper der Klassen IgG und IgM gegen CVB3, CVB4 und CVB5 bestimmt.

Die erhobenen Daten wurden dann mit den Ergebnissen einer Kontrollgruppe von 110 Müttern (Altersmedian bei Entbindung: 30,1 (Spanne 19,3 - 43) Jahre) verglichen, deren Nachkommen im Laufe der Follow-up Untersuchungen keine Insel-Antikörper entwickelten.

Von den 16 Müttern der Versuchsgruppe hatten 14 einen T1D (87,5 %), eine Mutter war an Gestationsdiabetes erkrankt (6,3 %) und bei einer nicht-diabetischen Mutter litt der Ehemann an T1D (6,3 %).

Die Kontrollgruppe umfasste 68 Mütter mit T1D (61,8 %), 37 Müttern mit Gestationsdiabetes (33,6 %) und 5 Mütter, deren Ehemann an T1D erkrankt war (4,5 %).

	Mütter, deren Kinder im Verlauf Insel-Ak entwickelten	Mütter, deren Kinder im Verlauf keine Insel-Ak entwickelten
Mutter mit T1D	14/16 (87,5 %)	68/110 (61,8 %)
Gestationsdiabetes	1/16 (6,3 %)	37/110 (33,6 %)
Vater mit T1D	1/16 (6,3 %)	5/110 (4,5 %)

Tabelle 3. Formen und Verteilung des Diabetestyps im Mütterkollektiv

Die beiden Gruppen wurden für das Datum der Serumprobe bei Entbindung (\pm 21 Tage), den Geburtsort, das Geschlecht und die HLA-Allele der Nachkommen, sowie für das mütterliche Alter „gematched“.

Die Festlegung des Geburtsorts erfolgte dabei grundsätzlich anhand der teilnehmenden Krankenhauszentren. In Fällen bei denen diese Vorgehensweise nicht möglich war, ermittelten wir benachbarte Regionen durch Überprüfung der Postleitzahlen.

3.4 Methoden

3.4.1 Coxsackievirus-Antikörper-Assays

3.4.1.1 CV-Ak-Screening-Test SERION ELISA classic

Als Screening-Test für Infektionen mit Coxsackieviren wurde ein kommerzieller, indirekter ELISA-Test (Virion GmbH, Würzburg) verwendet, der gegen ein Panel von Coxsackieviren gerichtet ist und bei dem das entsprechende Antigen bereits an die Platte gebunden vorliegt. Das kommerzielle SERION ELISA classic Testprinzip dient der klinischen Diagnostik von akuten und chronischen Coxsackievirusinfektionen.

Die Sensitivität für den Nachweis verschiedener Coxsackievirus-Serotypen mit diesem ELISA-Test wurde mit Hilfe eines Neutralisationstests, bei dem eine Platte jeweils mit den einzelnen CV-Serotypen B1-6 und A9 beschichtet wurde, bestätigt (Samuelsson et al 1990). Zur Testdurchführung wurden jeweils 10 µl Patientenserum mit PBS-Puffer bei einem pH-Wert von 7,4 auf 1:500 verdünnt und auf die von der Firma bereitgestellten Mikrotiterplatten pipettiert.

Im Anschluss folgte eine Inkubationsphase von 60 Minuten bei einer Temperatur von 37°C. Um die serologische Reaktion sichtbar zu machen, wurden nach dem Waschen 100 µl einer Lösung von mit alkalischer Phosphatase markierten Nachweisantikörpern zugegeben, die gegen humane, an Antigene gebundene Immunglobuline des Serums gerichtet sind. Vor der Auslösung der Enzym-Substratreaktion (30 Minuten/ 37°C) mit Hilfe von Para-Nitro-Phenylsulfat, die zur Entstehung eines gelbgefärbten Endprodukts führt, erfolgte eine weitere 30 minütige Inkubationsphase bei einer Temperatur von 37°C. Die Farbintensität ist zur Menge an spezifisch gebundenen Antikörpern proportional und wurde photometrisch bestimmt. Die Extinktion wurde bei 450 nm gemessen und die ermittelten Werte anhand einer, vom Hersteller mitgelieferten Standardkurve einer Positivkontrolle, in Einheiten umgerechnet. Dabei wurden Werte zwischen 80 und 100 Einheiten

definitionsgemäß als grenzwertig definiert, Werte über 100 Einheiten wurden definiert als positives Testergebnis im Sinne einer akuten (Immunglobuline der Klasse IgM) oder bereits abgelaufenen (Immunglobuline der Klasse IgG) Infektion mit Coxsackieviren. Der Intra-Assay Variationsquotient dieses ELISA-Tests lag bei 0,9, der Inter-Assay Variationsquotient bei 0,85.

3.4.1.2 Sandwich ELISA-Test des Max v. Pettenkofer-Instituts München zum Nachweis von Coxsackieviren

Zusätzlich wurden gegen Coxsackievirus-Serotypen CVB3/CVB4 und CVB5 gerichtete Antikörper der Klassen IgM und IgG mit Hilfe eines am Max v. Pettenkofer-Institut München von Frau Dr. G. Jäger entwickelten und in der Routinediagnostik eingesetzten Sandwich ELISA-Tests bestimmt.

Für jeden nachgewiesenen CV-Serotyp lag der Intra-Assay Variationskoeffizient dieses Tests bei 0,96 und der Inter-Assay Variationskoeffizient bei 0,81.

Der Nachweis der spezifischen Serotypen wurde anhand eines Panels von 25 Patientenseren bestätigt, aus denen CVB3, CVB4 und CVB5 isoliert worden waren.

Zur Testdurchführung wurde zu den rabbit-anti-human- μ (Bindung an Antikörper der IgM-Klasse) bzw. anti- γ (Bindung an Antikörper der IgG-Klasse) (DAKO, Hamburg, Deutschland) gecoateten Mikrotiterplatten (Verdünnung mit PBS-Puffer auf 1:2000/ pH-Wert 7,4/ 37°C) Patienten- und Kontrollserum hinzugefügt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit einem PBS/Tween 20 (0,05 %)-Gemisch (Waschpuffer) zur Entfernung des ungebundenen Materials wurden jeweils 5 μ l Serum in der Verdünnung 1:100 mit PBS/ Tween 20 0,05 % zugegeben und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit Serotyp-spezifischem, auf RITA-Zellen kultiviertem Antigen (Verdünnung auf 1:4 mit PBS/ Tween 0,05 %) über Nacht bei 4°C.

Am dritten Tag wird die Mikrotiterplatte dreimal mit PBS/Tween 20 0,05 % gewaschen und mit monoklonalem mouse-anti-CVB3-, anti-CVB4- oder anti-CVB5 Antikörper (Chemocon International, Hofheim, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:1000 für 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach erneutem Waschen wird anti-mouse-Konjugat P161, auf 1:1000 verdünnt (DAKO, Hamburg, Deutschland), für eine Stunde bei 37°C zugegeben.

Im Anschluss wurde mit TMB in einer Verdünnung von 1:10 eine Enzym-Substrat-Reaktion ausgelöst und die Extinktion bei 492 nm photometrisch bestimmt und ausgewertet.

Um die Höhe der einzelnen Extinktionswerte verschiedener Mikrotiterplatten miteinander vergleichbar zu machen wurde ein Index erstellt, definiert als Quotient aus Extinktion Serum / Extinktion Positivkontrolle (Mütterstudie) bzw. Extinktion Serum / Extinktion Negativkontrolle (Kinderstudie). Als positive Befunde, d.h. Nachweis von Coxsackievirusinfektionen wurden Ergebnisse mit einem Index > 3 gewertet.

Als Obergrenze für als negativ anzusehende Messwerte wurde eine Extinktionsrate von $E = 0,1$ definiert, falls die gemessene Extinktion der Negativkontrolle $< 0,05$ betrug, und von $E = 3,1 \times E$, für den Fall, daß die Extinktion der Negativkontrolle einen Wert $> 0,05$ ergab. Serum-Extinktionen im Bereich von $> 2,1 \times E$ und $< 3,1 \times E$ der Negativkontrolle wurden als grenzwertige Titer angesehen. Sämtliche Serumproben eines Patienten wurden innerhalb desselben Testansatzes untersucht und bewertet. Alle Coxsackievirusbestimmungen wurden im Labor von Frau Dr. G. Jäger (Max von Pettenkofer-Institut, München), durchgeführt.

3.4.1.3 Insel-Antikörper/ Assays und HLA-Bestimmung

Inselzell-Autoantikörper (ICA) wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen und die ermittelten Endpoint-Titer in Juvenile Diabetes Foundation Units (JDF U) umgerechnet (Christie et al 1997).

GADA und IA-2A wurden mittels Radio-Immuno-Assay über Bindung an ^{35}S -Methionin markiertem, rekombinanten Human Antigen bestimmt (Ziegler et al 1999/ Bonifacio et al 1995). Der Nachweis von IAA erfolgte durch Bindung an ^{125}I Insulin mit dem Protein A/G radiobinding assay (Ziegler et al 1999/ Bonifacio et al 1995). Die obere Grenze für Normalwerte, definiert als 99. Perzentile der gemessenen Antikörperwerte in der Kontrollgruppe der nicht an T1D erkrankten Kinder, betrug 1,5 Units für IAA, 8,5 Units für GADA , 2,5 Units für IA-2 und 5 JDF Units für ICA.

Die Typisierung der HLA-Klasse II Allele erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und der Dot-Blot-Hybridisierung mit nicht radioaktiven, sequenz-spezifischen Oligonucleotiden (sequence-specific oligonucleotide typing=SSO) (Nevinny-Stickel et al 1991).

3.5 Statistik

CV-Antikörper-Titer wurden zwischen den jeweiligen Versuchs- und Kontrollgruppen mittels des Wilcoxon Rank Tests verglichen. Häufigkeiten wurden mit dem Chi-Quadrat, bzw. dem Fisher´s Exact Test berechnet.

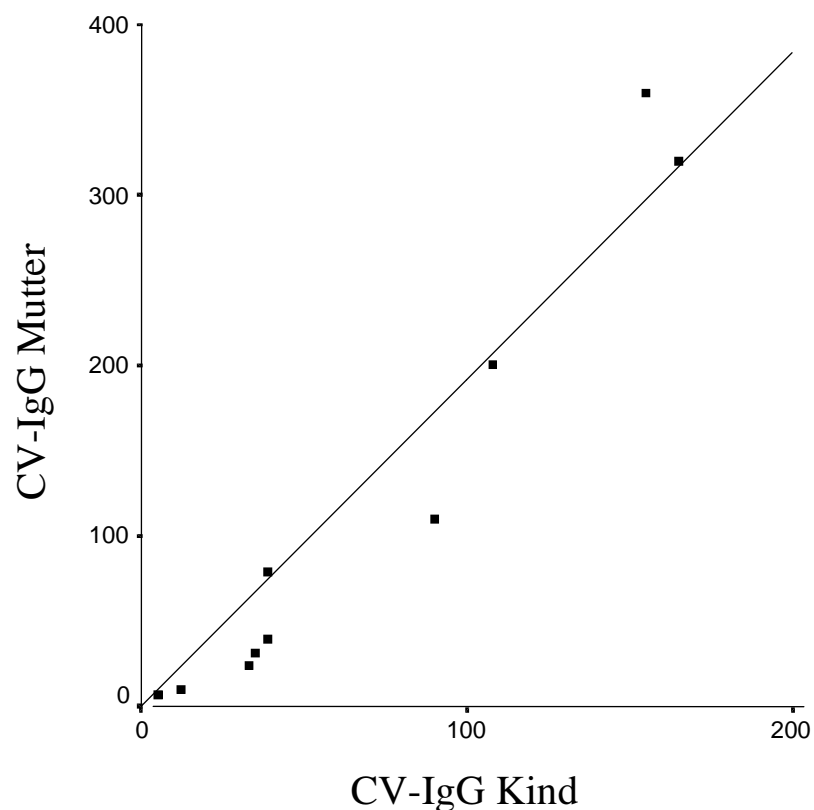
Im Falle des Vergleichs von Variablen aus mehr als zwei Gruppen wurden die errechneten P-Werte korrigiert (Bonferroni-Korrektur).

Für alle durchgeführten statistischen Analysen verwendeten wir das Programmpaket SPSS (Statistical Package For Social Sciences; SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

4. Ergebnisse

4.1 Die Infektion mit Coxsackieviren in früher Kindheit war bei Kindern von Müttern oder Vätern mit T1D ein seltenes Ereignis

Zwischen den im Nabelschnurblut der Neugeborenen nachgewiesenen Anti-CV-IgG-Antikörpern und den entsprechenden Antikörper-Titern im mütterlichen Serum zum Zeitpunkt der Geburt zeigte sich eine hohe positive Korrelation ($r = 0,96$, $p < 0,001$). Gegen Coxsackieviren gerichtete Antikörper konnten bei 12 (33,3 %) der Insel-Antikörper-positiven und bei 10 der Insel-Antikörper-negativen Kinder (32,2 %) im Follow-up ($p = 0,9$) bestimmt werden, jedoch bei keinem Kind im Alter von 9 Monaten, was auf eine transplazentare Übertragung mütterlicher Antikörper hinweist.



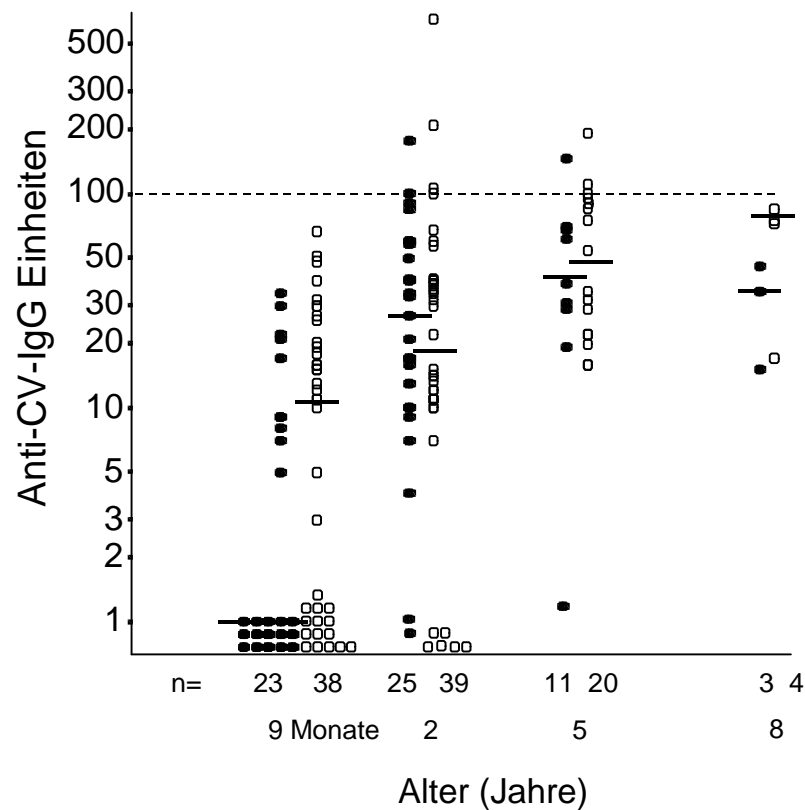
Graphik 1. Korrelation von CV-IgG-Ak im mütterlichen Serum und im Nabelschnurblut der Neugeborenen zum Zeitpunkt der Geburt

CV-IgG-Antikörper wurden erstmalig bei 2 von 28 Kindern (8 %) im Alter von 2 Jahren in der Gruppe der Insel-Ak positiven Individuen nachgewiesen, während in der Kontrollgruppe der Kinder, die keine Insel-Ak entwickelt hatten, 4 von 39 Individuen (10,8 %) in diesem Alter CV-IgG-Ak gebildet hatten ($p = 0,7$). (Graph.2). Im Alter von fünf Jahren ließen sich bei einem Kind (9 %) der Insel-Ak positiven Kinder CV-IgG-Ak nachweisen. Dagegen zeigten 3 von 20 Kindern (15 %) der Kontrollgruppe im Alter von 5 Jahren CV-IgG-Ak ($p = 0,2$). Dabei war keiner der im Alter von 5 Jahren CV-IgG-Ak positiven Fälle identisch mit jenen Kindern, die im Alter von 2 Jahren diese Antikörper gebildet hatten. Von zwei der vier CV-IgG-Ak-positiven Kinder der 2 Jahres-Untersuchung in der Kontrollgruppe lag auch eine Serumprobe im Alter von 5 Jahren vor, die zu diesem Zeitpunkt ein negatives Testergebnis zeigte. Bei allen Patienten, die im CV-IgG-Ak-Screening positive, bzw. grenzwertige Titer aufwiesen, wurden zusätzlich Antikörper gegen die Serotypen CVB3, CVB4 und CVB5 der Klassen IgM und IgG bestimmt. Hier zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede in der Prävalenz der Antikörper zwischen Kindern mit Inselautoimmunität und Kindern, die keine Insel-Ak entwickelt hatten. Von den genannten Serotypen waren Infektionen mit CVB5 im getesteten Kollektiv am häufigsten nachzuweisen, wobei CVB5-IgM- und -IgG-Ak ausschließlich in den 2- und 5-Jahres-Serumproben auftraten.

Alter	BABYDIAB-Nachkommen, die im Verlauf Insel-Ak entwickelt haben	BABYDIAB-Nachkommen, die im Verlauf keine Insel-Ak entwickelt haben	p-Wert (korrig.)
9 Monate	Median 1,0 U (Spanne 0-36)U	Median 10,5 U (Spanne 0-66)U	0,4
2 Jahre	Median 27 U (Spanne 0-170)U	Median 19 U (Spanne 0-650)U	0,6
5 Jahre	Median 40 U (Spanne 0-145)U	Median 49,5 U (Spanne 16-190)U	0,1
8 Jahre	Median 35 U (Spanne 15-36)U	Median 75 U (Spanne 17-85)U	0,4

Tabelle 4. Entwicklung der CV-IgG-Ak Titer bei Insel-Ak positiven und negativen Kindern

Wie aus Graphik 2 und Tab. 4 hervorgeht ergaben sich in beiden Gruppen bei allen Follow-Up Untersuchungen vergleichbare mediane CVB-IgG-Ak Titer (Units).



Graphik 2. Vergleich der CV-IgG-Ak-Titer von Kindern der BABYDIAB-Studie im Alter von 9 Monaten, 2, 5 und 8 Jahren, die Insel-Antikörper entwickelten (●) und Insel-Ak negativen Kindern (○). Die kleinen horizontalen Linien stellen den Median der Ak-Titer dar, die gestrichelte Linie markiert die Obergrenze der Normalwerte.

Auffallend war in diesem Zusammenhang, dass bereits innerhalb des Bereichs der als negativ definierten Messwerte IgG-Antikörper gegen CVB in beiden Gruppen im Verlauf kontinuierlich zunahmen (9 Monate vs. 2 Jahre: jeweils $p < 0,001$ und $p < 0,2$; 2 Jahre vs. 5 Jahre: $p < 0,03$ und $p < 0,08$).

Dieses Phänomen kann als Hinweis auf die für dieses Alter typische allmählich zunehmende Kompetenz der humoralen (B-Zell-vermittelten) Immunität des Organismus angesehen werden. In einigen Studien wurde auf eine mögliche Interferenz zwischen im Alter von 3, 5 und 12-15 Monaten durchgeführten Polio-Schutzimpfungen und der Bestimmung von CVB-Antikörpern hingewiesen. So wurden insbesondere kreuzreagierende Antikörper, die sowohl mit Coxsackieviren als auch Polioviren interagieren, beschrieben.

In unserem Kollektiv waren beim Vergleich der beiden getesteten Gruppen der Insel-Ak-positiven und Ak-negativen Kinder keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Impffrequenz nachweisbar. In der Gruppe der Insel-Ak positiven Nachkommen waren 100 % der Individuen gegen Poliomyelitis geimpft, während bei den Insel-Ak negativen Kinder in 94,3 % der Fälle ein Impfschutz vorlag ($p = 0,86$). Eine Verfälschung der gemessenen Werte durch die Polio-Impfvaccine kann somit für das untersuchte Kollektiv ausgeschlossen werden.

4.2 Coxsackievirusinfektionen waren bei Kindern von Müttern und Vätern mit T1D nicht mit der Entwicklung von Insel-Antikörpern assoziiert

Die zeitliche Abfolge der Entwicklung der Insel-Antikörper und dem Auftreten von IgG-Antikörpern gegen Coxsackieviren bei Insel-Antikörper-positiven Kindern (Versuchsgruppe) ist in Tabelle 5 dargestellt.

Fall	Alter	CV-Antikörper							Inselautoantikörper				DM Beginn	
		CV-IgG	CB3-IgG	CB4-IgG	CB5-IgG	CB3-IgM	CB4-IgM	CB5-IgM	ICA	IAA	GADA	IA-2A		
Fall 1 W	1	-	-	-	+	-	-	(+)	-	-	-	-	-	
	2	-	-	-	(+)	-	-	-	-	32	-	-	-	
	2.1	-	-	-	(+)	-	-	-	-	24.3	-	-	-	
	3	-	(+)	-	(+)	-	-	-	++	13.1	-	-	-	
	3.5	++	+	+	+	+	-	+	+	10	-	-	-	
	5	+	(+)	-	+	-	-	-	+	7.8	-	-	-	
	5.5	(+)	+	-	+	-	-	-	-	82.3	-	-	-	5.5 yr
Fall 2 M	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3.5	(+)	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	
	6.5	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	29	-	-	
	7.7	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	84	-	-	
Fall 3 W	0.75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2.5	(+)	-	+	-	+	-	+	-	-	67	131	-	
	3.5	(+)	-	(+)	-	-	-	-	-	7.6	-	-	-	
Fall 4 W	1	-	-	-	-	-	-	-	-	10.9	-	-	-	
	3.25	+	n.d.	n.d.	n.d.	(+)	-	+	-	-	-	-	-	
	4.25	(+)	+	(+)	(+)	+	-	+	-	-	31	-	-	
	8	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	33	-	-	

Inselzellautoantikörper > oberer Grenzwert des Normalbereichs werden als Units angeführt, für ICA-Werte gilt: ICA + (> 20 JDF Units), ICA ++ (> 40 JDF Units).

Für CV-Antikörperbestimmung gilt: + kennzeichnet Titer > Grenzwert des Normalbereichs, (+) kennzeichnet grenzwertig erhöhte Titer (Borderline Titer).

Negative Meßwerte sind als Linie (-) dargestellt. n.d. = not determined (nicht bestimmt).

Geschlechtszugehörigkeit: w = weiblich; m = männlich

Tabelle 5. Entwicklung von Coxsackievirusantikörpern und Insel-Antikörpern im BABYDIAB-Kollektiv

Bei lediglich zwei der 28 Kinder (Fälle 1 und 4), die im Follow-Up Inselautoimmunität entwickelt hatten waren eindeutig erhöhte CV-Ak Titer und damit abgelaufene Infektionen nachweisbar. Zwei weitere Individuen (Fälle 2 und 3) wiesen grenzwertig erhöhte (Borderline-) Titer für CV-IgG-Ak auf.

Von den vier Kindern, deren Erkrankungsverlauf oben dargestellt ist, entwickelte ein Mädchen (Fall 1) IgG-Ak gegen den Coxsackievirus Serotyp B5, sowie Borderline Titer für IgM-Ak gegen denselben Serotyp im 1. Lebensjahr, bevor schließlich mit 2 Jahren erstmals IAA nachweisbar waren.

Im weiteren Verlauf wurden dann bei diesem Kind im Alter von 3,5 Jahren stark erhöhte Werte für CV-IgG Antikörper und für CVB3- und CVB5-IgM und IgG-Antikörper nachgewiesen, die der Manifestation des Diabetes mellitus mit 5,5 Jahren vorausgingen.

Die Tatsache, dass im Zeitintervall von 2,5 bis 3 Jahren keine IgM-Ak gegen CVB5 nachweisbar waren, diese jedoch im weiteren Verlauf erneut auftraten, könnte als Indiz für eine zweite, akute Reinfektion angesehen werden.

Bei einem Jungen (Fall 2), traten im Alter von 3,5 Jahren CVB3-, CVB4- und CVB5-IgG-Antikörper sowie CVB3- und CVB5-IgM-Antikörper auf, 3 Jahre bevor Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase (GADA) nachgewiesen wurden. Interessanterweise zeigte der CV-Ak-Nachweis für CVB4- und CVB5-IgG und CVB5-IgM zu diesem Zeitpunkt ein negatives Ergebnis. Eine mögliche Ursache für den Verlust der Antikörper der Klasse IgG über diesen langen Zeitraum könnte darin bestehen, dass die Höhe der CV-IgG-Ak-Titer nicht in jedem Fall über einen Zeitraum von 3 Jahren stabil bleibt.

Ein weiteres Mädchen (Fall 3) entwickelte mit 2,5 Jahren gleichzeitig mit dem Auftreten von GADA und IA-2, IgG-Antikörper gegen CVB3, CVB4 und CVB5. Ein Jahr später waren die beiden Insel-Autoantikörper sowie IgG-CVB4-Antikörper und IgM-Antikörper gegen CVB3 und CVB5 nicht mehr nachweisbar während erstmalig Insulin-Autoantikörper (IAA) im Serum bestimmt werden konnten.

Das parallele Auftreten von Coxsackievirus-Ak und das eher seltene Phänomen eines nur passageren Nachweises zweier Insel-Antikörper könnte in diesem Zusammenhang durchaus als Hinweis auf eine möglicherweise bestehende Kreuzreaktivität gedeutet werden.

Im letzten aufgeführten Fall (4) erschienen bei einem Mädchen IAA erstmals im Alter von einem Jahr und gingen damit eindeutig den erst mit 3 Jahren nachweisbaren CV-IgG-, CVB3- und CVB5-Antikörpern voraus.

Berücksichtigt man alle oben angeführten Einzel-Verläufe, so ergeben sich keine Anhaltspunkte für eine konstante zeitliche Beziehung zwischen dem Auftreten von Coxsackievirus-Antikörpern und dem Nachweis von Insel-Antikörpern.

In zwei Fällen traten Infektionen mit Coxsackieviren vor der Entstehung von Insel-Antikörpern auf, während in zwei weiteren Fällen das Auftreten von Insel-autoimmunität eher zeitgleich mit dem serologischen Nachweis von Anti-CV-Antikörpern zur Darstellung kam.

Darüberhinaus zeigte der ELISA-Screening-Test auf Coxsackieviren während der Follow-up Untersuchungen lediglich bei einem der 10 Kinder, die schließlich einen manifesten T1D entwickelten, ein positives Ergebnis (Altersmedian für Diabetesmanifestation bei 2,2 Jahren, Altersspanne 1,3 bis 8,7 Jahre).

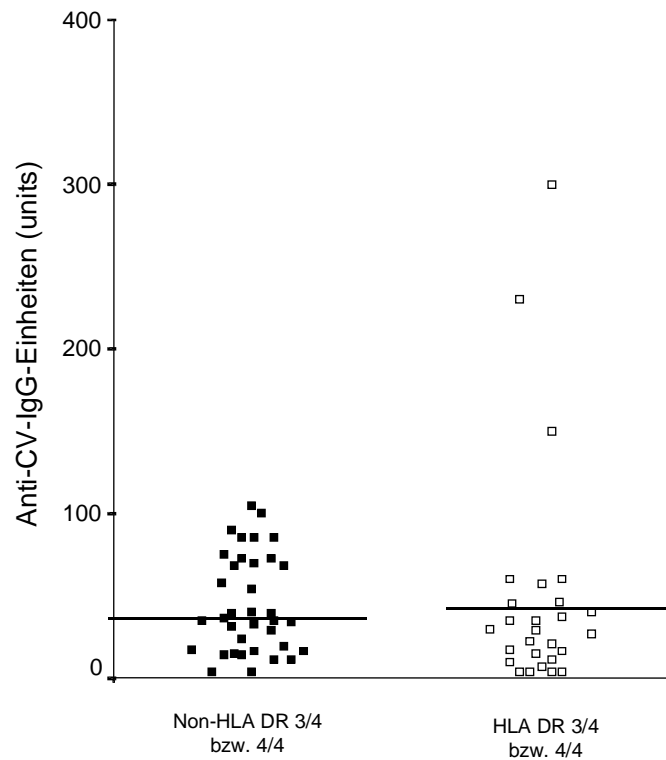
Ein weiteres wichtiges Ergebnis, das eine ursächliche Beziehung zwischen den erwähnten Parametern unwahrscheinlich macht, ist die Tatsache, dass sich die gemessenen mittleren CV-IgG-Antikörpertiter bei diesen 10 Kindern zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation nicht signifikant von den CV-IgG-Ak-Titern derjenigen Kinder unterschied, die im Verlauf keinen T1D entwickelten ($p = 0,7$).

4.3 Einfluss des HLA-DR Genotyps auf die humorale Immunität gegenüber Coxsackieviren bei BABYDIAB-Kindern

Inzwischen gilt als erwiesen, daß HLA-Klasse II-Allele die zelluläre und eventuell auch humorale Immunantwort des Körpers gegenüber Coxsackieviren steuern, bzw. beeinflussen können. In einer von Schernthaler et al. durchgeführten Studie aus dem Jahr 1985 wurde die Bildung von CVB-IgM-Antikörpern im Zusammenhang mit dem HLA-Genotyp der Probanden untersucht. Hierbei zeigte sich eine positive Korrelation zwischen dem HLA DR3/4 Genotyp und einer CVB-spezifischen Immunantwort, während keine Korrelation mit anderen untersuchten HLA-Allelen bestand. HLA Klasse II Moleküle spielen demnach eine grundlegende Rolle bei der Aktivierung und Steuerung von T-Lymphozyten im Rahmen einer Immunreaktion. Dabei können Antigene von T-Lymphozyten (z.B. T-Helferzellen) lediglich erkannt werden, wenn sie zusammen mit HLA- Molekülen wie zum Beispiel HLA-DR auf der Membran Antigen-präsentierender Zellen präsentiert werden (Bruserud et al 1985/ Schernthaler et al 1985).

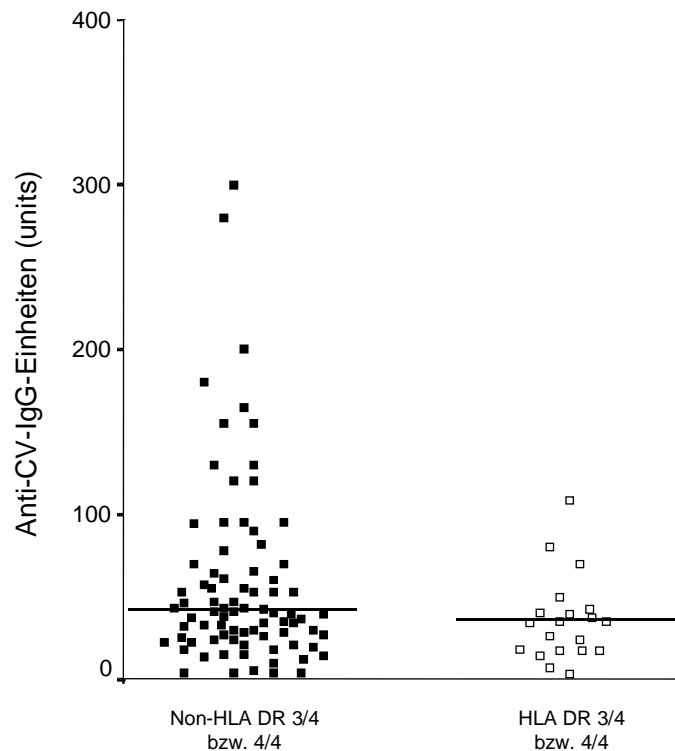
Aus diesem Grund wurden die im Laufe der Follow-Up Untersuchungen vom 9. Lebensmonat bis zum Alter von 8 Jahren im Serum der Mütter und ihrer Kinder gemessenen anti-CV-IgG-Antikörpertiter unter Berücksichtigung des HLA-DR Typs miteinander verglichen. Um eine Verfälschung der Ergebnisse im Kinderkollektiv durch von der Mutter erworbene anti-CV-IgG-Ak zu vermeiden, wurden aus Nabelschnurblutproben gewonnene Werte bei Untersuchung dieser Fragestellung nicht berücksichtigt. Individuen, deren genetische Konstellation einen HLA DR3/4 oder DR 4/4 Haplotyp aufweisen, zeigen sowohl ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Insel-Antikörpern als auch für die Manifestation eines T1D. Deshalb wurden die mittleren CV-IgG-Antikörpertiter von Kindern mit diesen T1D- assoziierten Risikomerkmale mit den CVB IgG-Ak-Titern verglichen.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der CV-IgG-Antikörpertiter zwischen HLA DR 3/4 bzw. DR 4/4 positiven Kindern (n=29, Median 29 Units, Spanne 0-300 Units) und Kindern, bei denen diese Risikoallele nicht nachgewiesen werden konnten (n=35, Median 35 Units, Spanne 0-108 Units, korrigiertes p=0,3)



Graphik 3. CV-IgG-Ak-Titer in Abhängigkeit der HLA DR-Konstellation in der Kinderstudie. Die kleinen horizontalen Linien stellen den Median der Ak-Titer dar.

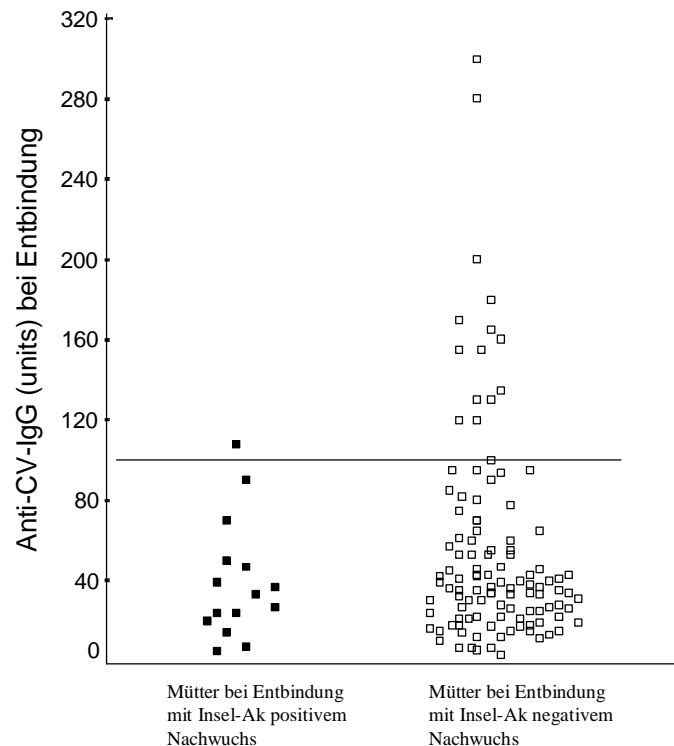
Ein ähnliches Ergebnis ergab sich bei der Überprüfung im Kollektiv der getesteten Mütter: Die mittleren anti-CV-IgG-Antikörpertiter der HLA DR 3/4 oder DR 4/4 positiven Versuchsgruppe (n=20, Median 34,5 Units, Spanne 3-108 Units) waren vergleichbar mit den gemessenen CV-Antikörpertitern in der Kontrollgruppe der Mütter (n=81, Median 40 Units, Spanne 0-300 Units), die diesen Haplotyp nicht aufwiesen (korrigiertes $p=0,1$).



Graphik 4. CV-IgG-Ak-Titer in Abhängigkeit der HLA DR-Konstellation in der Mütterstudie. Die kleinen horizontalen Linien stellen den Median der Ak-Titer dar.

4.4 Der Einfluss von CV-Infektionen bei Müttern mit T1D oder Gestationsdiabetes auf die Entwicklung von Inselautoimmunität bei deren Nachkommen

Beim Vergleich der Höhe der CV-IgG-Antikörper-Titer sowie der Häufigkeit des Auftretens von CV-IgG-Antikörpern in der mütterlichen Blutprobe bei Entbindung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der Mütter, deren Kinder Insel-Antikörper entwickelten (Median 35 Units, Spanne 5-108 Units, 6,3 %) und der Kontrollgruppe, deren Nachkommen keine Insel-Antikörper bildeten (Median 37,5 Units, Spanne 0-300 Units, $p=0,4$, 13,6 %, $p=0,7$). (s. Graphik 5)



Graphik 5. Mütterliche CV-IgG-Ak-Titer zum Zeitpunkt der Geburt im Vergleich zwischen Müttern deren Kinder Insel-Antikörper entwickelten und Müttern mit Insel-Antikörper negativem Nachwuchs. Die durchgezogene Linie markiert die Obergrenze der Normalwerte.

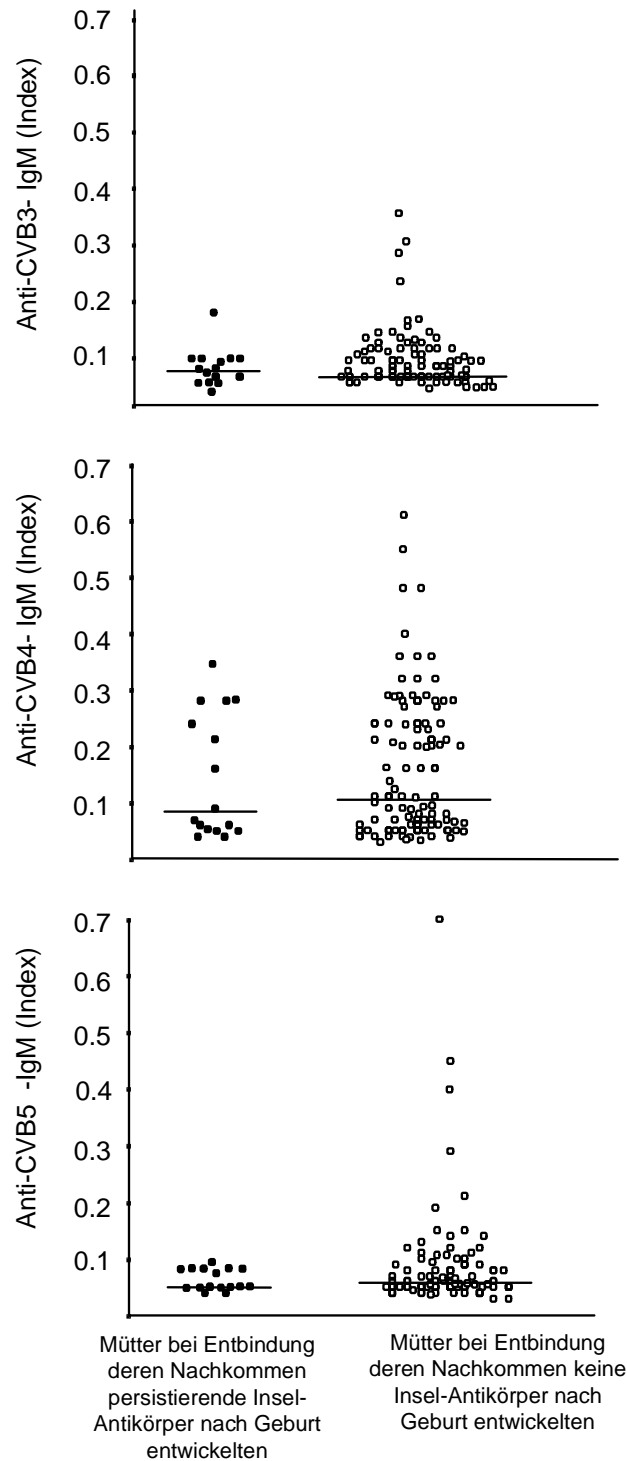
Diejenigen Mütter, bei denen im Screening-Test auf CV-IgG-Ak positive (> 100 Units) oder grenzwertige (Borderline-) Titer (80-100 Units) ermittelt werden konnten, wurden im Anschluss zusätzlich auf Antikörper gegen die Coxsackievirus-Serotypen CVB3, CVB4 und CVB5 untersucht. Dabei wies keine der Mütter mit Insel-Antikörper-positivem Nachwuchs gegen CVB3, CVB4 und CVB5 gerichtete IgG-Antikörper auf. Dagegen zeigte sich bei Müttern deren Kinder keine Inselautoimmunität entwickelt hatten folgendes Ergebnis: Bei 11/22 (50 %) wurden CVB3-IgG-Antikörper im Serum nachgewiesen, 6/22 (27,2 %) hatten CVB4-IgG-Antikörper und 5/22 Mütter (22,7 %) hatten eine Infektion mit dem Coxsackievirus-Serotyp CVB5 durchgemacht.

Dabei wiesen 8 Mütter IgG-Antikörper gegen einen der drei getesteten Coxsackievirus-Serotypen auf, bei 3 Müttern waren IgG-Ak gegen 2 CV-Serotypen nachweisbar und bei 3 Müttern fanden sich im Serum IgG-Ak, die gegen alle untersuchten Coxsackievirus-Serotypen gerichtet waren.

Das gesamte Kollektiv, bestehend aus 126 Müttern, wurde auf CV-IgM-Antikörper untersucht, wobei bei 2,4 % aller Patientinnen CV-IgM-Ak aller 3 Serotypen (CVB3/CVB4/CVB5) besaßen, 5,4 % hatten IgM-Ak gegen 2 der 3 getesteten CV-Serotypen entwickelt und bei 20,6 % fanden sich IgM-Ak, die entweder gegen CVB3, CVB4 oder CVB5 gerichtet waren.

Dabei stellten CVB5-IgM-Antikörper mit 18,8 % den am häufigsten nachgewiesenen Serotyp dar.

Aus den gemessenen Antikörpertitern wurden zur besseren Vergleichbarkeit, wie im Methodenteil beschrieben, Indizes berechnet.



Graphik 6. Mütterliche CVB3-IgM (oben), CVB4-IgM (Mitte) und CVB5-IgM-Ak (unten) zum Zeitpunkt der Geburt im Vergleich zwischen Müttern, deren Kinder Insel-Antikörper entwickelten und Müttern mit Insel-Antikörper negativem Nachwuchs (die kleinen horizontalen Linien stellen den Median der Ak-Titer dar).

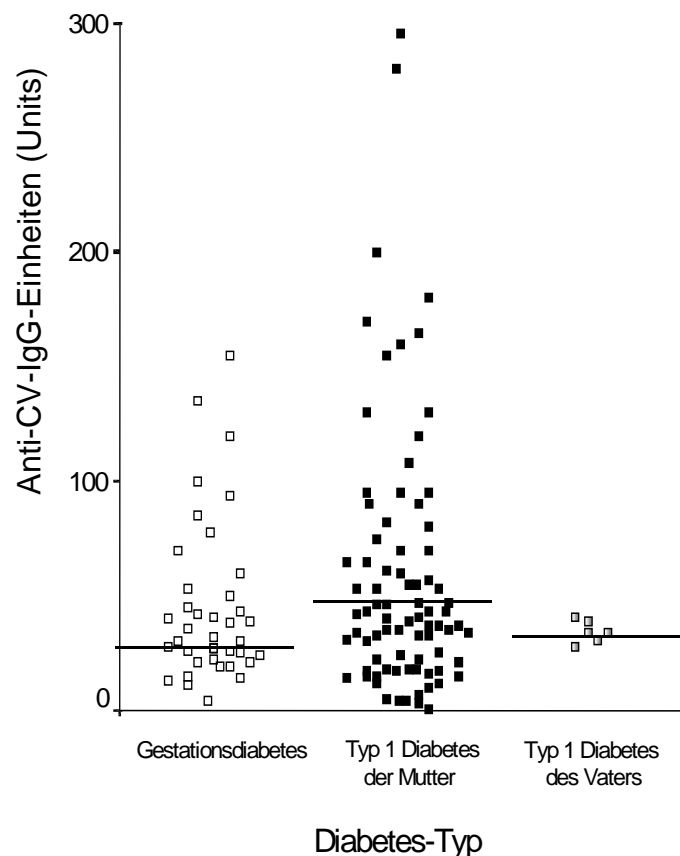
Wie aus Graphik 6 hervorgeht, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den medianen Werten von CVB3-, CVB4- und CVB5-IgM-Antikörper-Titern im Vergleich zwischen Müttern, deren Nachkommen Insel-Antikörper entwickelt hatten und Müttern der Kontrollgruppe, bei deren Kindern im Verlauf keine Insel-Antikörper nachweisbar waren. Ebenso ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Prävalenz der CVB3-, CVB4-, und CVB5-IgM-Antikörper, die bei allen Müttern getestet wurden. Bei einer von 16 Müttern mit Insel-Antikörper-positivem Nachwuchs waren CVB3-IgM-Ak nachweisbar (6,2 %) und bei 7 von 110 Müttern (6,3 %) der Kontrollgruppe (Insel-Ak-negativer Nachwuchs). CVB4-IgM-Antikörper waren bei keiner Mutter, deren Nachkommen Insel-Ak entwickelt hatten nachweisbar, jedoch bei 8 der 110 Mütter der Kontrollgruppe (7,2 %). Bei 2 von 16 Müttern (12,5 %) der Versuchsgruppe und bei 26 von 110 Müttern der Kontrollgruppe (23,6 %) konnten CVB5-IgM-Antikörper im mütterlichen Serum zum Zeitpunkt der Geburt nachgewiesen werden.

	Mütter deren Kinder im Verlauf Insel-Ak entwickelt hatten	Mütter deren Kindern im Verlauf keine Insel-Ak entwickelt hatten
CVB3-IgM	Index: 0,08 (Spanne 0,03-0,17) Prävalenz: 1/16 (6,2 %)	Index: 0,07 (Spanne 0,03-0,34) Prävalenz: 7/110 (6,3 %)
CVB4-IgM	Index: 0,08 (Spanne 0,04-0,36) Prävalenz: 0/16 (0 %)	Index: 0,11 (Spanne 0,03-0,61) Prävalenz: 8/110 (7,2 %)
CVB5-IgM	Index: 0,05 (Spanne 0,04-0,1) Prävalenz: 2/16 (12,5 %)	Index: 0,06 (Spanne 0,03-0,45) Prävalenz: 26/110 (23,6 %)

Index: Extinktion Serum/ Extinktion Positivkontrolle

Tabelle 6 Vergleich der medianen Antikörpertiter und der Prävalenz von CVB3-, CVB4-, und CVB5-IgM-Ak zwischen Müttern mit Insel-Antikörper positivem Nachwuchs und Mütter von Kindern, die keine Inselautoimmunität entwickelten.

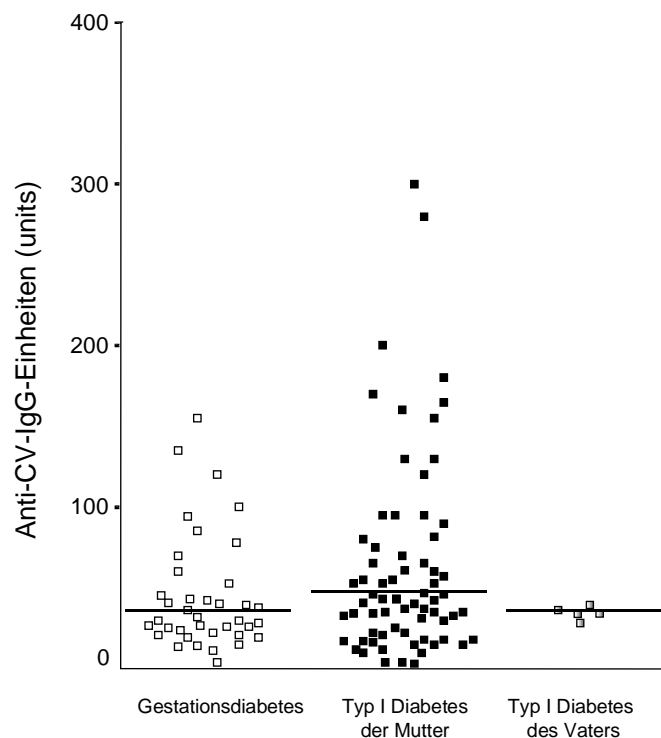
Unter Berücksichtigung der spezifischen Diabetesformen, an denen die Mütter, beziehungsweise deren Partner erkrankt waren, lassen sich folgende Aussagen bezüglich des Auftretens enteroviraler Infektionen im untersuchten Kollektiv machen: Die mittleren CV-IgG-Antikörperspiegel unterschieden sich nicht signifikant beim Vergleich von Müttern mit T1D (n=82, Median 42 Units, Spanne 0-300 Units), Müttern mit Gestationsdiabetes (n=38, Median 30 Units, Spanne 5-155 Units) und gesunden Müttern, deren Ehemann an T1D erkrankt war (n=6, Median 34 Units, Spanne 27-39 Units) (p-Werte > 0,2 wurden zum Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen innerhalb der Gesamtpopulation (n=126) korrigiert).



Graphik 7. Vergleich der mütterlichen CV-IgG-Ak-Titer in Abhängigkeit vom Typ der Diabetes-Erkrankung. Die kleinen horizontalen Linien stellen den Median der Ak-Titer dar.

Darüberhinaus zeigten sich innerhalb der Gruppe von Müttern, deren Kinder Insel-Antikörper entwickelt hatten, keine Unterschiede hinsichtlich der mittleren CV-IgG-Ak-Titer zwischen Müttern mit T1D (Median 37,5 Units, Spanne 7-108 Units), Müttern mit Gestationsdiabetes, (Median 27 Units, Spanne 5-50 Units) und Müttern, deren Ehemann einen T1D hatte (Median 28 Units, Spanne 19-35 Units) ($p > 0,5$ für alle Vergleiche korrigiert).

Betrachtet man die Gruppe der Mütter mit Insel-Ak negativem Nachwuchs ergibt sich ein ähnliches Bild: Zwischen Müttern, die an T1D erkrankt waren (Median 43 Units, Spanne 0-300 U), Müttern mit Gestationsdiabetes (Median 30 Units, Spanne 11-155 Units) und Müttern mit einem Typ 1 Diabetiker als Ehemann (Median 34 Units, Spanne 28-39 Units) waren keine Unterschiede in Bezug auf die mittleren CV-IgG-Ak Titer nachweisbar ($p > 0,2$ korrigiert für alle Vergleiche).



Graphik 8. Vergleich der CV-IgG-Ak-Titer im Kollektiv der Mütter deren Kinder keine Insel-Ak entwickelte in Abhängigkeit vom Typ der Diabetes-Erkrankung der Eltern. Die kleinen horizontalen Linien stellen den Median der Ak-Titer dar.

5. Diskussion

Die derzeit laufenden prospektiven Studien, die sich mit der Evaluierung von Umweltfaktoren für das Risiko eines T1D bei genetisch vorbelasteten Individuen oder bei Verwandten ersten Grades von Patienten mit T1D beschäftigen, untersuchen zwar eine große Anzahl von Personen, jedoch ist die Gesamtzahl derer bei denen eine persistierende Serokonversion für Insel-Ak nachweisbar ist heute immer noch relativ gering (Lönnrot et al 2000/ Graves et al 1997/ Couper et al 1999).

Aus diesem Grund wäre zunächst das Sammeln einer wesentlich größeren Datenmenge zu fordern, um den Einfluss von Virusinfektionen auf die Entwicklung von Insel-Ak genauer charakterisieren zu können (Hummel u. Ziegler 2001).

Die Vergleichbarkeit der meisten vorliegenden Studien zu Virusinfektionen und Diabetesrisiko wird zudem von einer Vielzahl möglicher konfundierender Variablen erschwert, die die Studienergebnisse verfälschen können. Darunter fallen geographische und durch die Jahreszeit bedingte Unterschiede (Vardi et al 1988) ebenso wie Abweichungen hinsichtlich der beteiligten Coxsackievirus-Serotypen (Verge et al 1996).

Darüberhinaus dürfen auch die Restriktion der Immunantwort gegenüber CV-Infektionen durch den HLA-DR Typ (Wegmann et al 1993), die mögliche Bildung heterotyper Antikörper in bestimmten Altersgruppen oder im Anschluss an Polio-Schutzimpfungen (Skyler 2003) und, als wichtigster Punkt, unterschiedliche Vorgehensweisen in Bezug auf Methodik und Matching, nicht unberücksichtigt bleiben.

Die erhöhte Rate Typ 1-diabetischer Neuerkrankungen unmittelbar im Anschluss an enterovirale Epidemien (Fohlman u. Friman 1993) wurde bereits vor 40 Jahren beschrieben und führte damals zur dominierenden Vorstellung, dass akute virale Infektionen Ursache der Erkrankung seien. Da es sich beim T1D jedoch um eine β -Zellzerstörung handelt, die ihren Anfang in vielen Fällen bereits Jahre bzw. Jahrzehnte vor der klinischen Manifestation nimmt, ist diese Hypothese der direkten und akuten β -Zellschädigung wieder verlassen worden.

Bislang konnten Coxsackievirusinfektionen lediglich im experimentellen Tiermodell der NOD-Maus als auslösende Ursache bei der Induktion von Inselautoimmunität bestätigt werden. Dabei handelt es sich um Mäuse, deren spontane Diabetesentwicklung derjenigen des Menschen ähnlich ist und mit der Bildung diabetesassoziierter Antikörper im Rahmen eines Autoimmunprozesses einherzugehen scheint (Atkinson u. Maclaren 1988)/ Horwitz et al 1998/Gerling et al 1991).

Die beiden gängigen, im Tiermodell entwickelten Hypothesen sehen die Rolle der Coxsackieviren dabei entweder als Initiatoren des sogenannten "molecular mimicry", bei dem Fremdproteine (z.B. Coxsackieviren) die Bildung von Antikörpern anregen, die aufgrund einer strukturellen Ähnlichkeit auch gegen körpereigenes Gewebe gerichtet sind (Hou et al 1994) oder aber als „innocent bystander" (Kolb et al 1995). Dabei initiieren virusinfizierte Zellen die Ausschüttung von Zytokinen, wie z.B. Interleukin 2 bzw. 12 oder Interferon- γ , die im Zusammenspiel mit verschiedenen T-Lymphozyten-Populationen den Autoimmunprozeß vorantreiben.

Serreze et al zeigten in einer Studie, daß eine vorbestehende Infiltration der Langerhansschen Inseln mit autoreaktiven T-Zellen bei NOD-Mäusen die Voraussetzung für die Diabetesakzeleration darstellt. Im Tiermodell konnten Coxsackievirusinfektionen die Entstehung eines autoimmunen Diabetes als „innocent bystander" beschleunigen, aber lediglich unter der Voraussetzung, dass bereits ein bestimmter kritischer Grenzwert von in der Insulitis nachweisbaren autoreaktiven und β -Zell-zerstörenden T-Lymphozyten überschritten war. Coxsackieviren spielen demnach im Tiermodell also keine Rolle als Auslöser der β -Zell-Autoimmunität, sondern unterhalten lediglich eine bereits stattfindende Entzündungsreaktion. Diese Erkenntnisse legen nahe, daß insbesondere der Zeitpunkt einer Infektion mit Coxsackieviren eine größere Bedeutung zu haben scheint (Serreze et al 2000). Unsere Daten können dieses Erklärungsmodell allerdings nicht stützen, da wir bei bereits Insel-Ak-positiven Kindern, die nach dem Insel-AK-Nachweis eine CV-Infektion durchmachten, keine Akzeleration einer Diabetesentwicklung beobachten konnten.

Die Sichtweise, in welcher Weise Umweltfaktoren und speziell CV-Infektionen an der Entstehung von β -Zellautoimmunität und letztendlich bei der Manifestation eines T1D beteiligt sind und welcher Stellenwert ihnen beigemessen wird, hat sich in den letzten Jahren deutlich gewandelt:

In einem Artikel, der neue Erkenntnisse und Strategien hinsichtlich Pathogenese und Behandlung des insulinabhängigen Diabetes diskutierte, sind Umweltfaktoren nicht mehr im Sinne eines vereinfachten mechanischen Modells als singuläre Trigger der Erkrankung, sondern zunehmend als modifizierende Einflussgrößen gesehen worden (Atkinson u. Eisenbarth 2001).

Entgegen der traditionellen Vorstellung, wonach verschiedene Einzelfaktoren den Beginn der Autoimmunität bei Individuen mit genetischen Risikokonstellationen triggern sollen (Castano u. Eisenbarth 1990/ Atkinson u. MacLaren 1994), geht man heutzutage, aufgrund neuer Beobachtungen, von einem wesentlich komplexeren Zusammenspiel der genannten Umweltfaktoren aus. Grundlegend hierfür ist die Modellvorstellung, wonach der Ausprägungsgrad angeborener Veränderungen des Immunsystems, ein Phänomen, das auch als „Immune Dysregulation“ bezeichnet wird, und genetisch bedingter Defekte im Bereich der Zielorgane, dem lebenslangen Einfluss verschiedenster Umweltfaktoren unterliegt, wie z.B. infektiösen Noxen, Ernährungsfaktoren, Umweltgiften und diversen Vakzinen.

Gestützt wird dieses modernere Modell durch verschiedene Studien, die bei Kindern mit überdurchschnittlich vielen Infekten in den ersten Lebensjahren über ein deutlich vermindertes Erkrankungsrisiko für einen T1D berichteten (Wasmuth et al 2000).

Demnach könnten Infektionen also einen altersabhängigen, modifizierenden Einfluss auf das heranreifende kindliche Immunsystem ausüben. Die Vorstellung, dass ein bestimmtes Agens, z.B. in Form einer viralen Erkrankung, organspezifische Autoimmunität anstößt, die im Verlauf zur Zerstörung der β -Zellen der Langerhansschen Inseln im Pankreas führt, könnte eher zugunsten der Sichtweise aufgegeben werden, dass Umweltfaktoren das Fortschreiten der Erkrankung während ihrer verschiedenen Stadien sowohl beschleunigen als auch attenuieren können, je nachdem zu welchem Zeitpunkt und wie häufig die Exposition erfolgte (Serreze et al 2000). Dies könnte zumindest teilweise erklären weshalb die Inzidenz des T1D in den letzten Jahrzehnten weltweit bei stetig zunehmenden Hygienestandards eine derart dramatische Steigerung erfuhr (Atkinson u. Eisenbarth 2001).

Vor diesem Hintergrund steht aktuell insbesondere die Klärung eines ursächlichen Zusammenhangs zwischen Infektionen mit Coxsackieviren und der Entwicklung von β -Zellautoimmunität im Mittelpunkt mehrerer internationaler, prospektiver Studien.

Beim Menschen war die Rolle der Coxsackievirusinfektionen bei der Diabetesentstehung bisher vor allem durch epidemiologische Erhebungen im Rahmen von Fallkontrollstudien untersucht worden, die sich aufgrund ihres Studiendesigns auf den Nachweis von CV-Antikörpern zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation beschränkten (Dahlquist et al Diabetes 1995/ Dahlquist et al Diabetologia 1995).

Dagegen existierten bislang nur wenige Studien, die den Einfluss von CV-Infektionen auf die Entwicklung von Inselautoimmunität in der prädiabetischen Phase prospektiv evaluierten (Graves et al 1997/ Lönnrot et al 2000).

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag deshalb auf dem Nachweis abgelaufener Coxsackievirusinfektionen im letzten Schwangerschaftstrimenon und während der frühen Kindheit, und zwar jeweils im Alter von 9 Monaten, 2, 5 und 8 Jahren bei Nachkommen von Müttern mit T1D bzw. Gestationsdiabetes und Vätern, die an T1D erkrankt waren. Unter Berücksichtigung der Erkenntnisse neuerer Fall-Kontroll-Studien, nach denen bestimmten CV-Serotypen (z.B. CVB 3/4/5 und CVA 9) eine höhere diabetogene Potenz beigemessen wird, erfolgte zunächst die Bestimmung von CV-IgG-Antikörpern, unter anderem gegen die Serotypen CVB1-9 und CVA9, mit Hilfe eines sensitiven kommerziellen ELISA-(Screening-) Tests, der gegen ein Panel von CV-Serotypen gerichtet war. In einem zweiten Schritt wurden dann alle mütterlichen Serumproben auf gegen CVB3, CVB4 und CVB5 gerichtete IgM-Ak untersucht. Diese wurden auch bei denjenigen Kindern bestimmt, die im Screening-Test in einem Sample erhöhte Werte für CV-IgG-Antikörper aufwiesen. Grund für diese selektivere Vorgehensweise in der Kinderstudie war die Tatsache, dass nur geringe Mengen der Inselzell-Ak positiven Seren als Material zur Verfügung standen. Da die virämische Phase bei einer Coxsackievirusinfektion eine relativ kurze Zeitspanne von nur wenigen Tagen bis einigen Wochen umfassen kann und die Konzeption der BABYDIAB-Studie auf Kontrolluntersuchungen im Alter von 9 Monaten, 2 Jahren, 5 Jahren und 8 Jahren ausgelegt ist, entschieden wir uns aufgrund der vorgegebenen Zeitabstände zwischen den Follow-Up Untersuchungen und der damit verbundenen relativ geringen Wahrscheinlichkeit Coxsackieviren direkt im Serum erfassen zu können gegen die RT-PCR (die unter anderem in aktuellen prospektiven Studien Finnlands neben den Virus-Antikörperbestimmungen zur Anwendung kommt) als Methode zum Virusnachweis.

Aufgrund der unterschiedlichen Methodik ist ein direkter Vergleich im Hinblick auf die Sensitivität und die Spezifität zwischen unserer Studie und den aktuellen prospektiven Studien aus Finnland (s. unten) nicht möglich.

Obwohl Hinweise darauf vorliegen, dass CV-Antikörper der Klasse IgG in einigen Fällen nicht über einen größeren Zeitraum hinweg stabil und damit im Serum nachweisbar bleiben, sind die Intervalle der Follow-Up Untersuchungen der BABYDIAB Studie dennoch überschaubar genug, um abgelaufene Infektionen über den Nachweis von CV-IgG-Antikörpern mit Hilfe der verwendeten ELISA-Testmethoden in den meisten Fällen zu erfassen (Tracy et al 1995).

Dennoch kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass in einigen Ausnahmefällen die Möglichkeit besteht, daß CV-Antikörper der Klasse IgG wegen ihrer geringeren Stabilität nach einer Latenz von bis zu 3 Jahren nicht mehr im Serum nachweisbar sind. Ein möglicher Erklärungsversuch für dieses Phänomen begründet sich auf der Vorstellung, dass enterovirale Infektionen aus bislang noch unbekanntem Ursachen lediglich zu einer lokalen, mukosaassoziierten Immunität der Darmschleimhaut führen können. Da dieses Phänomen die Versuchsgruppe und die Kontrollgruppe in gleichem Maße betrifft und beide Gruppen auch in allen anderen relevanten Aspekten vergleichbar sind, ist von keiner größeren Auswirkung auf das Studienergebnis auszugehen.

Im gesamten Studienkollektiv waren Coxsackievirusinfektionen vergleichsweise selten nachweisbar, wobei eine deutliche Zunahme der Inzidenz mit höherem Lebensalter festzustellen war.

Im Kollektiv der Kinderstudie wurden CVB-IgG-Ak lediglich bei 12 Kindern mit Insel-Antikörpern (33,3 %) und bei 10 Kindern ohne Inselautoimmunität (32,3 %) nachgewiesen.

Im Kollektiv der Mütterstudie waren bei einer von 16 (6,3 %) Müttern mit Insel-Ak positivem Nachwuchs CV-IgG-Ak nachweisbar, während 15 von 110 (13,6 %) Müttern deren Kinder keine Insel-Ak entwickelt hatten betroffen war. Nur 2 von 28 Kindern, die im Verlauf der Follow-Up Untersuchungen Insel-Ak entwickelten und lediglich eines der 10 Kinder, die vor dem 10. Lebensjahr an T1D erkrankten, wies positive CV-Antikörpertiter im Sinne einer Infektion auf. Es zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der mittleren CV-IgG-Antikörpertiterhöhe und -verteilung zwischen der Gruppe der Insel-Antikörper positiven Kinder (Versuchsgruppe) und der Kontrollgruppe, die keine Inselautoimmunität entwickelt hatte.

Weiterhin ließ sich kein zeitlich konstanter Zusammenhang zwischen Infektionen mit Coxsackieviren und dem Auftreten von Insel-Antikörpern erkennen. Die mittleren CV-IgG-Antikörpertiter stiegen kontinuierlich mit zunehmendem Lebensalter, was als Ausdruck des graduellen Reifungsprozesses innerhalb des humoralen Immunsystems betrachtet werden kann.

Schutzimpfungen gegen die Erkrankung Poliomyelitis, die im Alter von 3, 5 und 12-15 Monaten durchgeführt werden stehen im Verdacht die Neubildung heterotoper Antikörper zu induzieren, die die Fähigkeit zur Kreuzreaktivität mit Antigenbestandteilen von Coxsackieviren besitzen (Juhela et al 1999). Sowohl der Zeitpunkt zu dem die Poliovakzine an die getesteten Kinder verabreicht wurde, als auch die kumulative Häufigkeit der Polio-Schutzimpfung unterschieden sich zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant und schließen damit den Einfluss der Poliovakzine als Störgröße innerhalb unseres Studienkollektivs aus.

Hinsichtlich der humoralen Immunantwort gegenüber Coxsackievirusinfektionen fanden sich sowohl innerhalb des Mütterkollektivs als auch bei denjenigen Kindern, die den HLA DR3/4- oder DR4/4-Haplotyp aufwiesen im Vergleich zu Individuen ohne diese Risikoallele vergleichbare Antikörper-Prävalenzen und -Titer.

Diese Ergebnisse lassen eine Assoziation zwischen der humoralen Immunantwort gegen Coxsackieviren und spezifischen HLA-DR-Genotypen, die einen Risikofaktor für die Entwicklung von Inselautoimmunität, bzw. einer Typ 1-Diabeteserkrankung darstellen, unwahrscheinlich erscheinen. Einige Studien wiesen auf eine mögliche Assoziation zwischen dem HLA-DR3-Haplotyp und einer verstärkten zellulären Immunantwort gegenüber der Familie der Enteroviren und im Speziellen gegenüber dem PEVKEK-Motiv des Coxsackievirus B4 hin (Schernthaler et al 1985/ Horwitz et al 1998/ Samuelssen 1990).

Dieser Coxsackievirustyp und das Autoantigen GAD65, welches eine entscheidende Rolle bei der Diabeteserkrankung spielt, besitzen eine homologe Aminosäuresequenz, das sogenannte PEVKEK-Motiv. Im Rahmen der T-Zellaktivierung scheint die Präsentation dieser homologen Region durch HLA-Moleküle von großer Bedeutung zu sein. Es zeigte sich, dass das PEVKEK-Motiv spezifisch an HLA-DR3 Moleküle bindet, die erwiesenermaßen einen prädisponierenden Faktor für die Diabetesentstehung darstellen, nicht jedoch an die ebenfalls Typ 1-diabetesassoziierten Allele HLA-DR1 oder DR4.

Somit könnte dieses als „Molekulares Mimikry“ bezeichnete Phänomen zumindest bei Individuen des Haplotyps HLA-DR3 im Zusammenhang mit der Diabetesentstehung stehen (Vreudgenhill et al 1998).

Auch D’Alessio, der in seiner Fallkontrollstudie Patienten mit neu diagnostiziertem T1D auf vorausgegangene Infektionen mit Coxsackievirus B untersuchte fand in der Gruppe der HLA-DR3 positiven Individuen im Vergleich zur Kontrollgruppe, die diese HLA-Risikoallele nicht aufwies, signifikant erhöhte IgM-Antikörpertiter (D’Alessio 1992). Im Rahmen des getesteten Patientenkollektivs war die Anzahl der Individuen mit dem HLA-DR3/3 Haplotyp in dieser Studie jedoch zu gering, um einen Zusammenhang mit der humoralen Immunität gegenüber Coxsackievirusinfektionen zu belegen.

Die Ergebnisse unserer Studie stimmen mit ähnlichen Beobachtungen der prospektiven DAISY-Studie aus Denver überein, die sich ebenfalls vom Zeitpunkt der Geburt an mit dem Einfluss von CV-Infektionen auf Verwandte 1. Grades von Typ 1 Diabetikern beschäftigte. Dabei konnte in Serum, Speichel oder Rektalabstrichen von Kindern mit Inselautoimmunität keine höhere Prävalenz von Enterovirus-RNA nachgewiesen werden als in einer „gematchten“ Kontrollgruppe (Graves et al 1997).

Da innerhalb des von uns getesteten Kollektivs der BABYDIAB-Studie bei zwei Kindern Coxsackievirusinfektionen der Entwicklung von Insel-Autoantikörpern vorausgingen, ist zumindest nicht auszuschliessen, daß Coxsackieviren in Einzelfällen Inselautoimmunität auslösen oder zumindest als Einflussgröße an der Entstehung dieses Phänomens mitbeteiligt sein könnten. Dies würde aber eindeutig gegen die Modellvorstellung sprechen, wonach Coxsackievirusinfektionen in der Pathogenese des T1D eine entscheidende Rolle spielten.

Sowohl die erwähnte DAISY-Studie aus Denver (Graves et al 1997) als auch die in unserer BABYDIAB-Studie gewonnenen Daten können die Ergebnisse der beiden finnischen prospektiven Studien nicht bestätigen, die den zeitlichen Zusammenhang zwischen enteroviralen Infektionen und Inselautoimmunität bei prädiabetischen Geschwisterkindern (DIME) (Hyöty et al 1995) und bei Kindern mit erhöhtem genetischen Risiko für eine Diabeteserkrankung, im Rahmen einer Kohortensudie (DIPP) (Lönnrot et al 2000), untersuchten.

Die DiMe-Studie untersuchte prospektiv den zeitlichen Zusammenhang zwischen enteroviralen Infektionen und der Zunahme der ICA- und IAA-Titer bei 22 Geschwisterkindern von Typ 1 Diabetikern im Zeitraum vor der Erkrankungsmanifestation und bei 13 von 110 Geschwisterkindern der Kontrollgruppe, die im Verlauf nicht an T1D erkrankten. Da die Beobachtung der 22 Kinder erst mit der Diabetesmanifestation ihrer Geschwister begann, bestand im Gegensatz zur BABYDIAB-Studie dabei jedoch nicht die Möglichkeit vom Zeitpunkt der Geburt an den Beginn bzw. Verlauf des zugrundeliegenden Autoimmunprozesses aufzuzeigen.

Im Rahmen dieser Studie wurden ansteigende ICA-Titer zeitgleich mit nachgewiesenen EV-Infektionen bei 10 von 12 Geschwisterkindern, die später an Diabetes erkrankten, beobachtet, jedoch waren die Unterschiede zu den Kindern der Kontrollgruppe nicht statistisch signifikant. Die Tatsache, daß mehr als 60 % der Geschwisterkinder, die im Verlauf an Diabetes erkrankten bereits zu Beginn der Follow-Up Untersuchungen hohe ICA-Titer (> 80 JDF Units) aufwiesen, während in der Kontrollgruppe nur sehr niedrige ICA-Titer auftraten, sprechen gegen die These, dass EV-Infektionen Inselautoimmunität auslösen bzw. die Insulitis im Frühstadium beschleunigen können. Stattdessen unterstützen die Ergebnisse dieser Studie eher die Vorstellung, nach der EV-Infektionen die Spätphase des Autoimmunitätsprozesses, kurz vor der endgültigen Zerstörung der β -Zellen und der damit verbundenen Diabetesmanifestation, beschleunigen können.

Dies konnte in Studien an NOD-Mäusen bestätigt werden, bei denen Infektionen mit CVB4 lediglich bei 8 Wochen alten Tieren, nicht jedoch bei 6 Wochen alten NOD-Mäusen die Diabetesprogression beschleunigte. Im Falle einer Infektion mit dem Serotyp CVB4 scheint also, zumindest im Tiermodell, eine bestimmte Menge an autoreaktiven T-Lymphozyten in den Inselzellen des Pankreas nötig zu sein, um den Prozeß der β -Zellzerstörung weiter anzufachen (Serreze et al 2000).

Eine weitere Studie kam zu dem Ergebnis, dass eine CV-Infektion bei prädiabetischen BDC 2,5 [Barbara Darrs Center / T-Zell-Klon 2,5 (Colorado)] Mäusen, jedoch nicht bei 6-8 Wochen alten NOD-Mäusen, zu einer besonders raschen Diabetesprogression führt. Diese Tiere weisen als Besonderheit eine veränderte T-Zellen-Population im Sinne eines Überwiegens von T-Gedächtniszellen auf, die auf ihrer Oberfläche einen diabetogenen T-Zell-Rezeptor (TCR) exprimieren.

Dieser Rezeptor bindet an ein spezifisches Inselzellantigen, welches keine Kreuzreaktivität mit Coxsackievirus B4 zeigt und keine strukturelle Ähnlichkeit zu GAD 65 besitzt. Nach diesem Modell erfolgt die Induktion der Diabeteserkrankung im Anschluss an enterovirale Infektionen durch eine sogenannte „Bystander-Aktivierung“ von T-Gedächtniszellen, entweder bedingt durch Freisetzung sequestrierter Antigenbestandteile aus geschädigtem Gewebe oder durch Ausschüttung von Zytokinen (z. B. Interferon α) im Rahmen einer Immunantwort auf die Virusinfektion und nicht wie früher angenommen, im Rahmen des als „Molekulares Mimikry“ bezeichneten Phänomens (Horwitz et al 1998).

Auch nach den Ergebnissen einer zweiten in Finnland durchgeführten prospektiven Studie (DIPP) scheinen Enteroviren eine Rolle als Initiatoren der β -Zellzerstörung zu spielen. Bei 57 % der Typ 1-Diabetiker konnten enterovirale Infektionen mit Hilfe von serologischen Untersuchungen und der Bestimmung von Virus-RNA in einem Zeitintervall von 6 Monaten vor dem Auftreten von Inselautoimmunität nachgewiesen werden, während in der Kontrollgruppe nur 31 % der Individuen betroffen waren (Lönnrot et al 2000).

Eine ebenfalls im Rahmen der "Finnish Diabetes Prediction and Prevention Study" (DIPP) durchgeführte Studie aus dem Jahr 2001 untersuchte die Höhe enteroviraler Antikörpertiter bei Insel-Antikörper-positiven Kindern in der prädiabetischen Phase während der ersten beiden Lebensjahre (Sadharju et al 2001). Das Studienkollektiv bestand aus einer Gruppe von 21 Kindern, die Insel-Antikörper entwickelten und einer Kontrollgruppe von 104 Kindern, die keine Insel-Antikörper entwickelten, „gematched“ für den Geburtszeitraum, das Geschlecht und den HLA-Genotyp. Die Insel-Antikörper-positiven Kinder wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe im Alter von 6 bis 24 Monaten erhöhte IgG- und IgA-Titer gegen Coxsackievirus B4 auf, wobei sich ein signifikanter Unterschied lediglich deutlich bei den Jungen zeigte und vornehmlich bei Individuen mit dem HLA-DQB1*0302/x Genotyp.

Zu bemängeln war allerdings, dass diese Studie bei der Darstellung der Ergebnisse nicht präzise auf den zeitlichen Zusammenhang zwischen enteroviralen Infektionen und dem Auftreten von Insel-Antikörpern im untersuchten Kollektiv einging und somit unklar bleibt, ob Coxsackievirus B4 im Rahmen einer Infektion, die der Entwicklung der Inselautoimmunität vorausging, an der Auslösung der β -Zellzerstörung beteiligt war, oder ob eine bereits bestehende Autoimmuninsulinitis einer CV-Infektion den Weg bereitet hat.

In diesem Fall wäre aber auch denkbar, dass Insel-Antikörper-positive Individuen eine, im Vergleich zur Normalbevölkerung, höhere Bereitschaft aufweisen an enteroviralen Infektionen zu erkranken bzw. aufgrund ihrer HLA-Konstellation zu einer verstärkten Antikörperbildung gegenüber Coxsackieviren neigen.

Aus der Tatsache, dass in der Gruppe der Insel-Antikörper positiven Individuen in dieser Studie keine höheren Antikörpertiter gegenüber Polioviren gefunden werden konnten als in der Kontrollgruppe wurde gefolgert, dass eine verstärkte humorale Immunantwort bei Trägern von HLA-Risiko-Genotypen unwahrscheinlich ist. Jedoch bleibt zumindest fraglich ob die Immunantwort auf eine inaktivierte Poliovakzine im Rahmen einer Impfung als Maßstab für die Stärke der Antikörperbildung im Anschluss an eine Infektion gelten kann.

Darüber hinaus würde man im Falle einer höheren Erkrankungshäufigkeit für enterovirale Infektionen bei Jungen auch eine, im Vergleich zu Mädchen, stärker ansteigende Diabetesinzidenz in Finnland erwarten, tatsächlich gibt es jedoch diesbezüglich keinen Anhaltspunkt für einen geschlechtsspezifischen Unterschied. Falls sich Coxsackievirusinfektionen bei den Nachkommen im BABYDIAB-Studienkollektiv vor oder kurz nach dem Beginn der Inselautoimmunität ereignet hätten, würde man bei der Überprüfung der jeweils letzten Follow-Up Untersuchung einen positiven Nachweis von IgG-Antikörpern gegen CV erwarten. Es konnten jedoch weder bei den 23 der 25 Kinder, die im Verlauf Inselautoimmunität entwickelten, noch bei den 10 Kindern, die schließlich an einem T1D erkrankten, zum Zeitpunkt der Manifestation erhöhte CV-IgG-Antikörpertiter nachgewiesen werden.

Zusammenfassend läßt sich deshalb schlussfolgern, dass unsere Studienergebnisse gegen einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von enteroviralen Infektionen und der Initiierung von Inselautoimmunität bei dem überwiegenden Teil der Nachkommen von Müttern mit T1D oder Gestationsdiabetes bzw. Vätern mit T1D sprechen, obwohl transiente Erhöhungen von CV-Antikörpertitern zwischen den Follow-Up Untersuchungen oder Infektionen mit anderen Enteroviren nicht gänzlich ausgeschlossen werden können.

Ein internationaler Vergleich der mittleren EV-Antikörpertiter bei gesunden Kindern im Alter von einem Jahr, bei Schulkindern im Alter von 10-14 Jahren sowie bei nicht-diabetischen Schwangeren im ersten Trimenon war Gegenstand einer von H. Hyöti aus Finnland organisierten europäischen Multizenter-Studie (INCO-Programm), die 1998 begonnen und 2004 beendet wurde (Viskary et al 1998).

Auch unsere Arbeitsgruppe unter der Leitung von Frau Prof. Ziegler hat an dieser Studie teilgenommen. Serumproben von Schulkindern aus Finnland, Schweden, Rußland, Estland, Litauen, Ungarn und Deutschland wurden mittels EIA (Enzyme Immunoassay) auf IgG-Antikörper gegen Coxsackievirus B4, Poliovirus Typ I und synthetischem enteroviralem Peptid untersucht, um insbesondere zu evaluieren, ob ein Zusammenhang zwischen der jeweiligen landesspezifischen Inzidenz und Prävalenz von T1D und der Häufigkeit enteroviraler Infektionen besteht. Dabei zeigten sich erhebliche Unterschiede in der Höhe der ermittelten Antikörpertiter zwischen den verschiedenen Ländern, was auf eine variable Übertragung von enteroviralen Infektionen zurückgeführt wird.

Erstaunlicherweise fanden sich hier teilweise in Ländern, die eine hohe Inzidenz für T1D aufweisen (wie z.B. Finnland) vergleichsweise niedrige enterovirale Antikörpertiter, wogegen in Ländern, wie z.B. Deutschland (Serum, die von unserem Zentrum gesammelt wurden), die eine erheblich niedrigere T1D-Prävalenz aufweisen, deutlich höhere mediane EV-IgG-Ak-Titer bestimmt wurden. Dieses Phänomen ist nicht vereinbar mit der Vorstellung, wonach hohe Diabetesinzidenzen zwingend mit häufigeren enteroviralen Infektionen innerhalb der Population assoziiert sind. Diese mittlerweile publizierten Daten stützen daher die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen (Viskary et al 2004).

Die Untersuchung der im Rahmen unserer Mütterstudie bei Entbindung gewonnenen Seren zeigte für die Coxsackievirus-Serotypen CVB3, CVB4 und CVB5 keinerlei Unterschiede hinsichtlich der Höhe der gemessenen IgM- und IgG-Antikörpertiter zwischen Müttern, deren Kinder Insel-Antikörper entwickelt hatten und Müttern mit Insel-Antikörper negativem Nachwuchs.

Dies läßt darauf schließen, dass eine Infektion mit CVB3, CVB4 und CVB5 während der Schwangerschaft nicht mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Inselautoimmunität bei den Nachkommen assoziiert ist.

Eine erst kürzlich im Rahmen der finnischen DIPP-Studie durchgeführte Untersuchung bei Schwangeren kam zu einem ähnlichen Ergebnis: Die Prävalenz enteroviraler Infektionen bei Müttern Insel-Antikörper-positiver Kinder betrug 10 %, während Mütter mit Insel-Antikörper-negativem Nachwuchs in 16 % der Fälle betroffen waren (Lönnrot et al 2000).

Dagegen fand eine schwedische Studie bei nicht HLA-DR gematchten Müttern, deren Kinder vor dem 15. Lebensjahr an T1D erkrankten, gegen Ende der Schwangerschaft erhöhte IgG-Antikörper-Titer für Coxsackievirus B5 / Echovirus 9 bzw. 30 im Vergleich zu einer Gruppe von Müttern, deren Kinder nicht an T1D erkrankten (Dahlquist et al 1995).

In einer weiteren finnischen Studie, die anti-EV (enterovirale)-IgM- und IgG-Antikörper am Ende des ersten Trimenons verglich, zeigten sich bei 9,4 % der Mütter, deren Nachwuchs bereits sehr früh (im Alter von 0-3 Jahren) an "sporadisch auftretendem" T1D erkrankte, erhöhte EV-IgG-Ak-Titer (insbesondere CVB5- IgG-Ak-Titer), während die Prävalenz bei Müttern, deren Kinder nicht erkrankten lediglich 1 % betrug (Hyöty et al 1995).

Die Auswertung der Daten aller Mütter innerhalb des BABYDIAB-Studienkollektivs zeigte in Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen eine ähnliche Prävalenz von CV-IgG-Ak und insbesondere von Antikörpern gegen den Serotyp CVB5, jedoch konnte kein Unterschied zwischen Müttern Insel-Antikörper positiver und negativer Kinder nachgewiesen werden.

In erster Linie verantwortlich für die unterschiedlichen Ergebnisse ist wohl die Tatsache, dass im Gegensatz zu der erwähnten schwedischen Studie sowohl die Entwicklung von Inselautoimmunität als auch die Diabetesmanifestation bereits sehr frühe Ereignisse innerhalb des BABYDIAB-Studienkollektivs darstellen.

Darüberhinaus ist die Konzeption der BABYDIAB-Studie darauf ausgerichtet, den Erkrankungsverlauf bei Verwandten 1. Grades von Typ 1 Diabetikern zu verfolgen, die bekanntlich ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Inselautoimmunität aufweisen, während andere Studien sich auch mit den sogenannten sporadischen Formen der Typ 1 Diabeteserkrankung beschäftigen.

Zusammenfassend sprechen die Befunde der vorliegenden Arbeit gegen die insbesondere in den skandinavischen Ländern populäre Hypothese, wonach Coxsackievirusinfektionen während der Schwangerschaft für die Nachkommen in den frühen Lebensjahren einen Risikofaktor für die Entstehung von Insel-Antikörper und einen T1D darstellen.

Selbstverständlich gilt es zukünftig, den Einfluss weiterer Kandidaten-Viren und anderer bakterielle Infektionen in prospektiven Studien auf die Entstehung von Inselautoimmunität und eines T1D zu evaluieren.

Hier wird insbesondere die 2004 gestartete weltweite TEDDY-Studie (an der sich unser Zentrum beteiligt) einen Beitrag leisten. Dabei handelt es sich um eine prospektive Studie von Geburt an, die über 200 000 Kinder auf Insel-Ak screenen wird um dann Kinder, die diese Antikörper aufweisen bis zum 23. Lebensjahr prospektiv zu untersuchen.

6. Zusammenfassung

Der Typ 1 Diabetes (T1D) ist eine erbliche Stoffwechselerkrankung multifaktorieller Genese bei der es auf der Grundlage einer genetischen Prädisposition zu einer Autoimmuninsulinitis kommt, die chronisch progredient verläuft und letztendlich zu einer Zerstörung der β -Zellen des Pankreas und zu absolutem Insulinmangel führt.

Zwar zeigte sich in zahlreichen Fallkontrollstudien ein gehäuftes Vorliegen von Antikörpern gegen Enteroviren, insbesondere Coxsackievirus B, bei Patienten mit neu aufgetretenem Typ 1 Diabetes und während der Schwangerschaft bei Müttern von Kindern, die im Verlauf an insulinabhängigem Diabetes erkrankten.

Allerdings konnten alle bisherigen prospektiven Studien keinen Hinweis für einen kausalen Zusammenhang zwischen enteroviralen Infektionen und der Entwicklung von Inselautoimmunität finden. Die deutsche, multizentrische BABYDIAB-Studie untersucht den zeitlichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Inselautoantikörpern und genetischen Determinanten sowie Umweltfaktoren bei Nachkommen von Müttern mit T1D bzw. Gestationsdiabetes oder Vätern mit T1D. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der Einfluss von Coxsackievirusinfektionen während der Schwangerschaft und frühen Kindheit auf die Entstehung von Inselautoantikörpern im Kollektiv der BABYDIAB-Studie untersucht.

Hierzu wurde mittels indirekter ELISA-Tests IgG-Antikörper gegen ein Panel von Coxsackieviren, sowie IgG- bzw. IgM-Antikörper gegen CVB3, CVB4 und CVB 5 bei 28 Kindern, die im Verlauf persistierende Insel-Antikörper entwickelten im Alter von 9 Monaten, 2, 5 und 8 Jahren getestet und mit 51 Autoantikörper-negativen Kindern verglichen (Kinderstudie).

Außerdem wurde die Häufigkeit des Auftretens von Coxsackievirusinfektionen während der Schwangerschaft bei 16 Müttern, deren Kinder im Verlauf Insel-Antikörper entwickelten im Vergleich zu 110 Müttern Insel-Antikörper-negativer Kinder untersucht (Mütterstudie).

In beiden Studien zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der CV-Infektionshäufigkeit zwischen Insel-Antikörper-positiven Probanden und Individuen, die keine Inselautoimmunität entwickelten.

Ebenso ergab sich kein Anhalt für eine feste zeitliche Abfolge von CV-Infektionen und dem Auftreten von Insel-Antikörpern.

Diese Ergebnisse legen deshalb nahe, dass enterovirale Infektionen im untersuchten Kollektiv keine ursächliche Bedeutung als auslösender Faktor für die Entstehung der Autoimmuninsulinitis, die schließlich zur Manifestation des TD1 führt, beigemessen werden kann. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass zumindest in Einzelfällen Coxsackievirusinfektionen im Zusammenspiel mit anderen Faktoren (genetische Disposition, verschiedene Umweltfaktoren, etc.) einen akzelerierenden oder auch hemmenden Einfluss auf Autoimmunprozesse haben können.

7. Literaturverzeichnis

Achenbach P, Koczwara K, Knopff A, Naserke H, Ziegler AG, Bonifacio E. Mature high-affinity immune responses to (pro) insulin anticipate the autoimmune cascade that leads to type 1 diabetes. *J Clin Invest.* 114: 589-597, 2004

Akerblom HK, Reunanen A. The epidemiology of insulin dependent diabetes (IDDM) in Finland and northern Europe. *Diabetes Care*8: 10-16, 1985

Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type I diabetes: New perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358:221-29, 2001

Atkinson MA, MacLaren NK. The pathogenesis of insulin dependent diabetes. *N Engl J Med* 331: 1428-36, 1994

Atkinson MA, Maclaren NK. Autoantibodies in non-obese diabetic mice immunoprecipitate 64000-MR islet antigen. *Diabetes* 371: 587-90,1988

Baekkeskov S, Nielsen JH, Marner B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark A. Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature* 298: 167-169,1982

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

Barnett AH, Eff C, Leslie RDG and Pyke DA: Diabetes in identical twins: a study of 200 pairs. *Diabetologia* 20: 404-409,1981

Bodansky HJ, Staines A, Stephenson C, Haigh D, Cartwright R. Evidence for an environmental effect in the etiology of insulin dependent diabetes in a transmigatory population. *Br Med J* 304 : 1020-1022, 1992

Bonifacio E, Lampasona S, Genovese M, Ferrari M, Bosi E. Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA-2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes related 37/40k autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *J Immunol* 155: 5419-5426, 1995

Bonifacio E, Lampasona V, Bingley PJ. IA-2 (islet cell antigen) is the primary target of humoral autoimmunity against type I diabetes-associated tyrosine phosphatase autoantigens. *J Immunol* 161: 2648-2654,1998

Bonifacio E, Hummel M, Schmid S, Walter M, Knopff A, Ziegler AG. Brief communication: Early appearance of islet antibodies predicts childhood type 1 diabetes in offspring of diabetic parents. *Ann. Intern Med.* 140: 882-886, 2004

Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 1974

Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, MacKay EH, Swift PG, Gamble DR. In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine* 313: 353-360, 1985

Bruserud O, Jervell J, Thorsby E. HLA-DR3 and- DR4 control T-lymphocyte responses to mumps and Coxsackie 4 virus: studies on patients with Type 1 (insulin-dependent) diabetes and healthy subjects. *Diabetologia* 28: 420-426, 1985

Castano L, Eisenbarth GS. Type I diabetes: A chronic autoimmune disease of human, mouse and the rat. *Annu Rev Immunol* 8: 647-79, 1990

Christie MR, Roll U, Payton MA, Hatfield ECI, Ziegler AG. Validity of screening for individuals at risk for type 1 diabetes by combined analysis of antibodies to recombinant proteins. *Diabetes Care* 20: 965-970, 1997

Christie MR, Genovese S, Cassidy D et al. Antibodies to islet 37 k antigen, but not to glutamate decarboxylase, discriminate rapid progression to IDDM in endocrine autoimmunity. *Diabetes* 43: 1254-1259, 1994

Christie MR, Genovese S, Cassidy D, Bosi E, Brown TJ, Lai M, Bonifacio M, Bottazzo GF. Antibodies to islet 37k antigen, but not to glutamic decarboxylase, discriminate rapid progression to IDDM in endocrine autoimmunity. *Diabetes* 43: 1254-1259, 1994

Couper JJ, Steele C, Beresford S, Powell T, McCaul K, Pollard A, Gellert S, Tait B, Harrison LC, Colman PG. Lack of association between duration of breastfeeding or introduction of cow's milk and development of islet autoimmunity. *Diabetes* 48: 2145-2149, 1999

Cudworth AG, Wolf E. The genetic susceptibility to type I diabetes mellitus. *Clin Endocrinol Metab* 11: 389-408, 1982

D'Alessio DJ. A case control study of group B Coxsackie immunoglobulin IgM antibody prevalence and HLA-DR antigens in newly diagnosed cases of insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Epidemiol* 135: 1331-1338, 1992

Dahlquist CG, Frisk G, Ivarsson S, Svanberg L, Forsgren M, Diderholm H. Indications that maternal Coxsackie B virus infection during pregnancy is a risk factor childhood-onset IDDM. *Diabetologia* 38: 1371-73, 1995

Dahlquist G, Kallen B. Maternal-child blood-group-incompatibility and other perinatal events increase the risk for early-onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 35: 671-675, 1992

Dahlquist G, Blom L, Persson LA, Sandström A, Wall S. Dietary factors and the risk of developing insulin dependent diabetes in childhood. *Br Med J* 300: 1302-1306, 1990

Dahlquist G, Blom L, Lönnberg G. The Swedish childhood diabetes study—a multivariate analysis of risk determinants for diabetes in different age groups. *Diabetologia* 34: 757-62, 1991

Diabetes Epidemiology Research Group. Geographic patterns of childhood insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 37: 1113-19, 1988

Eisenbarth GS. Insulin-dependent diabetes mellitus: a chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 314: 1360-1368, 1986

Elliott RB. Epidemiology of diabetes in Polynesia and New Zealand. *Pediatr Adolesc Endocrinol* 21 : 66-71, 1992

Ellis TM, Atkinson MA. The clinical significance of an autoimmune response against glutamic acid decarboxylase. *Nature Med* 2: 148-153, 1996

Fohlman J, Friman G. Is juvenile diabetes a viral disease? *Ann Med* 25:569-574, 1993

Frisk G, Friman G, Tuvemo T, Fohlman J, Diderholm H: Coxsackie B virus specific IgM in children at onset of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: Evidence for IgM induction by a recent or current infection. *Diabetologia* 35: 249-253, 1992

Füchtenbusch M, Ziegler AG. Umweltfaktoren in der Pathogenese des Typ-1-Diabetes. *Diabetes und Stoffwechsel* 4: 369-377, 1995

Gamble DR, Kinsley ML, Fitzgerald MG, Bolton R, Taylor KW. Viral antibodies in diabetes mellitus. *Br Med J* 3: 627-630, 1969

Gamble DR, Cumming H, Coxsackie viruses and diabetes (Letter). *Lancet* ii: 455-456, 1985

Gerling IC, Chatterjee NK, Nejman C. Coxsackievirus B4-induced development of antibodies to 64000-Mr islet autoantigen and hyperglycemia in mice. *Autoimmunity* 10: 49-56, 1991

Gerstein HC. A critical overview of the clinical literature. *Diabetes Care* 17 : 13-20, 1998

Gianani R, Pugliese A, Bonner Weir Set al. Prognostically significant heterogeneity of cytoplasmic islet cell antibodies in relatives of patients with type I diabetes. *Diabetes* 41: 437-353, 1992

Giani G, Rosenbauer J. Inzidenz des Typ 1 Diabetes im Kindes- und Jugendalter in der Region Düsseldorf. *Diabet. Stoffw.* 5, Suppl.: 116, 1996

Graves PM, Norris JM, Pallansch MA, Gerling IC, Rewers M. The role of Enteroviral Infections In The Development of IDDM-Limitations of Current approaches. *Diabetes* 46: 161-168, 1997

Green A, Patterson CC on behalf of the EURODIAB TIGER Study Group: Trends in the incidence of childhood-onset diabetes in Europe 1989-1998. *Diabetologia* 44 (Suppl. 3) B3-8

Harris HF. A case of diabetes mellitus quickly following mumps. *Boston Med Surg J* 140: 465-69, 1899

Helfland RF, Gary HE, Freeman CY, Anderson LI, Pittsburgh Diabetes Research Group, Pallansch MA. Serologic evidence of an association between enteroviruses and the onset of type I diabetes mellitus. *J Inf Dis* 172: 1206-1211, 1995

Honeyman M, Coulson B, Stone N, Gellert S, Goldwater P, Steele C, Couper J, Tait B, Colman P, Harrison L. Association between rota virus infection and pancreatic islet auto immunity in children at risk of developing type I diabetes. *Diabetes* 49: 1319-1324, 2000

Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Sarvetnick JL and N. Diabetes induced by Coxvirus: Initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nature Med* 7: 781-785, 1998

Hou J, Said C, Franchi D, Dockstader P, Chatterjee NK. Antibodies to "GAD" and p2C-peptides in sera from "cox B4"-infected mice and IDDM patients. *Diabetes* 43: 1260-1266, 1994

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: 1111-1116, 2002

Hummel M, Ziegler AG. Environmental factors and type 1 diabetes. Response to Dahlquist. *Letter, Diabetes Care* 24: 181, 2001

Hummel M, Fuchtenbusch M, Schenker M, Ziegler AG. No major association of breast-feeding, vaccinations, and childhood viral diseases with early islet autoimmunity in the German BABYDIAB-Study. *DiabCare* Volume 23, Number 7: 969-974, July 2000

Hyöti H, Hiltunen M, Knip M, Laakkonen M, Vähäsalo P, Karjalainen J, Koskela P, Roivainen M, Leinikki P, Hovi T, Akerblom HK, the Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group: A prospective study on the role of Coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. *Diabetes* 44: 652-657, 1995

Irvine WJ, McCallum CJ, Gray RS, Campbell BJ, Duncan LJP, Farquahr JW, Vaughan H, Morris PJ. Pancreatic islet cell antibodies in diabetes mellitus correlated with the duration and type of diabetes, co-existent autoimmune disease, and HLA-type. *Diabetes* 26: 138-147, 1977

Jaeckel E, von Boehmer H, Manns MP. Antigen-specific FoxP3-transduced T-cells can control established type 1 diabetes. *Diabetes* 54 (2): 306-310, 2005

Jenson AB, Rosenberg HS, Notkins AL. Pancreatic islet-cell damage in children with fatal viral infections. *Lancet* 2: 354-358, 1980

Juhela S, Hyöty H, Uibo R, Meriste SH, Uibo O, Lonnrot M, Halminen M, Simmel O, Ilonen J. Comparison of enterovirus-specific cellular immunity in two populations of young children vaccinated with inactivated or live poliovirus Vaccines. *Clin Exp Immunol* 117: 100-105, 1999

Karjalainen J, Salmela P, Ilonen J, Surcel HM, Knip M. A comparison of childhood and adult type I diabetes. *N. Eng. J Med* 320: 881, 1989

Karvonen M, Vik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. *Diabetes Care* 23 (10), 1516-1526, 2000

Karvonen M, Tuomilehto J, Libman I, LaPorte R, for the World Health Organization DIAMOND Project Group. A review of recent epidemiological data on the world wide incidence of type I diabetes mellitus. *Diabetologia* 36: 883-892, 1993

Kaufman DL, Clare Salzler M, Tian Jet al. Spontaneous loss of T-cell tolerance to GAD in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 366: 69-72, 1993

Kaufman DL, Erlander MG, ClareSalzer M, Atkinson MA, MacLaren NK, Tobin AJ. Autoimmunity to two forms of glutamic acid decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J clin Invest* 89: 283-292, 1992

Kent SC, Chen Y, Bregoli L, Clemmings SM, Kenyon NS, Ricordi C, Hering BJ, Hafler DA. Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. *Nature* 435: 151-152, 2005

Koczvara K, Bonifacio E, Ziegler AG. Transmission of maternal islet antibodies and risk of autoimmune diabetes in offspring of mothers with type 1 diabetes. *Diabetes* 53:1-4, 2004

Kolb H, Kolb Bachofen V, Roep BO. Autoimmune versus inflammatory type I diabetes: a controversy? *Immunol Today* 16: 170-172, 1995

Kolb H. Benign versus destructive insulinitis. *Diabetes Metab* 13: 139-46, 1997

Krolewsky AS, Warram JH, Rand LI, Kahn CR. Epidemiologic approach to the etiology of type I diabetes mellitus and its complications. *N Engl J Med* 1390-98, 1987

Liblau RS, Singer SM, Mc Devitt HO. Th1 and Th2 CD4+ T-cells in the pathogenesis of organ specific autoimmune diseases. *Immunology today* 16: 34-38, 1995

Lönnrot M, Korpela K, Knip M, Ilonen J, Simell O, Korhonen S, Savola K, Muona P, Simell T, Koskela P, Hyöty H. Enterovirus infection as a risk factor for β -cell autoimmunity in a prospectively observed birth cohort. The Finnish Diabetes Prediction and Prevention Study. *Diabetes* 49: 1314-1318, 2000

Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* 29: 1-13, 1980

Mandrup-Poulsen J, Bendtzen K, Nerup JJ. Affinity purified human interleukin-1 isocytotoxin to isolated islets of langerhans. *Diabetol* 29: 63-67, 1986

Menser MA, Forrest JM, Bransby RD. Rubella infection and diabetes mellitus. *Lancet* 1; 57-60, 1978

Metcalfe MA, Baum JD. Family characteristics and insulin-dependent diabetes. *Arch Dis Child* 67, 731-736, 1992

Michaelis D, Jutzi E, Heinke P. Inzidenz-und Prävalenztrend des juvenilen Diabetes in der ostdeutschen Bevölkerung. *Diabet Stoffw* 2: 245-50, 1993

Montgomery SM, Ehlin AGC, Ekbohm A, Wakefield AJ. Pertussis infection in childhood and subsequent Type 1 diabetes mellitus. *Diabetic Med* 19: 986-93, 2002

Nakayama M, Abiru N, Moriayama H, Babaya N, Liu E, Miao D, Yu L, Wegmann DR, Hutton JC, Elliott JF, Eisenbarth GS. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* 435: 151-152, 2005

Nevinny-Stickel C, Hinzpeter M, Andreas A, Albert ED. Non-radioactive oligotyping for HLA-DR1-DRw10 using polymerase chain reaction, digoxigenin-labelled oligonucleotides, and chemiluminescence detection. *European journal of Immunogenetics* 18(5-6): 323-332, 1991

Norris JM, Beaty B, Klingensmith G, Hoffman M, Chase HP, Ehrlich HA, Hamman RF, Eisenbarth GS, Rewers M. Lack of association between early exposure to cow's milk protein and beta-cell autoimmunity. Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *JAMA* 276 (8): 647-648, 1996

Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, Hoffmann M, Eisenbarth GS, Erlich HA, Rewers M. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA* 290: 1713-1720, 2003

Oldstone MB. Prevention of Type I diabetes in non-obese diabetic mice by Virusinfection. *Science* 239: 500-502, 1988

Pak CY, McArthur RG, Eun M, Yoon JW. Cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet* 1: 1-14, 1988

Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL. Insulin autoantibodies in insulin-dependent diabetes before insulin treatment. *Science* 222: 1177-39, 1983

Patrick SL, Moy CS, La Porte RE. The world of insulin dependent diabetes mellitus: What international epidemiologic studies reveal about the etiology and natural history of IDDM. *Diabetes/ Metabolism* 5: 571-578, 1989

Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76: 241-251, 1994

Payton M, Hawkes C, Christie M. Relationship of the 37.000-and 40.000 type fragments of islet antigens in insulin dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule (IA-2). *J Clin Invest* 96: 1506-11, 1995

Rabinovitch A. Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes* 43, 613-621, 1994

Reijonen H, Ilonen J, Knip M, Akerblom HK. HLA-DQB1 alleles and absence of Asp 57 as susceptibility factors of IDDM in Finland. *Diabetes* 40: 1640-1644, 1991

Richter W, Mertens T, Schoel Beta. Sequence homology of the diabetes-associated autoantigen glutamate decarboxylase with coxsackie B4/2C-protein and heat shock protein 60 mediates no molecular mimicry of autoantibodies. *J Exp Med* 180: 721-726, 1994

Roll U, Ziegler AG. Combined antibody screenings for improved prediction of IDDM - Modern strategies. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105: 1-14, 1997

Roll U, Christie MR, Füchtenbusch M, Payton MA, Hawkes CJ, Ziegler AG. Perinatal Autoimmunity in Offspring of Diabetic Parents. The German Multicenter BABYDIAB Study: Detection of Humoral Immune Responses to Islet Antigens in Early Childhood. *Diabetes* 45: 967-973, 1996

Rosenbauer J, Fabian-Marx T, Herzig P, Giani G. Type 1 diabetes in children under 5 years in Germany: Incidence and geographical distribution. *Diabetologia* 39, Suppl. 1:A 190, 1996

Rosenbauer J, Icks A, Giani G. Incidence and prevalence of childhood type 1 diabetes mellitus in Germany- model based national estimates. *J Pediatr Endocrinol Metab* 15: 1497-1504, 2002

Sadharju K, Lönnrot M, Kimpimäki T, Savola K, Erkkilä S, Kalliokoski T, Savolainen P, Koskela P, Ilonen J, Simell O, Knip M, Hyöti H. Enterovirus antibody levels during the first two years of life in prediabetic autoantibody-positive children. *Diabetologia* 44: 818-23, 2001

Samuelsson A, Skoog E, Forsgren M. Aspects of the serodiagnosis, of enterovirus infections by ELISA. *Serodiag. Immunother. Inf. Dis.* 4: 395-406, 1990

Schenker M, Hummel M, Ferber K, Walter M, Keller E, Albert ED, Janka HU, Kastendiek C, Sorger M, Louwen F, Ziegler AG. Early expression and high prevalence of islet autoantibodies for DR3/4 heterozygous and DR4/4 homozygous offspring of parents with Type I diabetes: the German BABYDIAB study. Third Medical Department, Munich-Schwabing Hospital and Diabetes Research Institute, Germany. *Diabetologia* 42(6): 671-677, 1999

Schernthaner G, Banatvala JE, Scherbaum W, Bryant J, Schober E, Mayr WR: Coxsackie B virus specific IgM responses, complement fixing islet-cell antibodies, HLA-DR antigens, and C-peptide secretion in insulin-dependent diabetes mellitus: *Lancet* ii: 630-632, 1985

Schlott NC, Hanifi-Moghaddam P, Goebel C, Shantavi SV, Flohe S, Kolb H, Rothe H. Serum IFN- γ and IL-10 levels are associated with disease progression in non-diabetic mice. *Diabetes Metab Res Rev* 18: 64-70, 2002

Schlosser M, Koczwara K, Kenk H, Strebellow M, Rjasanowski I, Wassmuth R, Achenbach P, Ziegler AG, Bonifacio E. In insulin-autoantibody-positive children from the general population, antibody affinity identifies those at high and low risk. *Diabetologia* 48: 1830-1832, 2005.

Scott P. Selective differentiation of CD4+ T-helper cell subsets. *Curr Opin Immunol* 5: 391-397, 1993

Seißler J, Amann J, Mauch L, Haubruck H, Wolfahrt S, Bieg S, Richter W, Holl R, Heinze E, Northemann W, Scherbaum WA. Prevalence of autoantibodies to the Mr 65.000 and Mr 67.000 isoforms of glutamatdecarboxylase (GAD) in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 92: 1394-1399, 1993

Seißler J, Bieg S, Yassin N, Mauch L, Northemann W, Boehm BO, Scherbaum WA. Association between antibodies to the Mr 67.000 isoform of glutamat decarboxylase(GAD)and type I 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: 351-58, 1988

Serreze DV, Ottendorfer EW, Ellis TM, Gauntt CJ, Atkinson MA. Acceleration of Type I diabetes by a coxsackievirus infection requires a preexisting critical mass of autoreactive T-cells in pancreatic islets. *Diabetes* 49: 708-711, 2000

Shehadeh N, Calcinaro F, Bradley BJ, Bruchlim I, Vardi P, Lafferty KJ. Effect of adjuvant therapy on development of diabetes in mouse and man. *Lancet* 343: 706-707, 1994

Shimada A, Charlton B, Taylor-Edwards C, Fathman G. β -cell destruction may be a late consequence of the autoimmune process in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 45: 1063-1067, 1996

Simitsek PD, Campbell DG, Lanzavecchia A, Fairweather N, Watts C. Modulation of antigen processing by bound antibodies can boost or suppress class II major histo-compatibility complex presentation of different T cell determinants. *J Exp Med* 181: 1957-1963, 1995

Singal DP, Blajchman MA. Histocompatibility antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. *Diabetes* 22: 429-32, 1973

Skyler J on behalf of the Diabetes Prevention Trial-Type 1 Diabetes Study Group. Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes. Oral presentation of study results. 63rd Scientific Sessions of the American Diabetes Association, New Orleans, June 13-17, 2003

Solimena M, Folli F, Aparisi R, Pozza G, DeCamilli P. Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrom. *N Eng J Med* 322: 1555-1560, 1990

Songini M, Loche M, Muntoni Sa, Stabilini M, Coppola A, Dessi G, Green A, Bottazzo GF, Muntoni Se. Increasing prevalence of juvenile onset type I insulin-dependent diabetes mellitus in Sardinia: the military service approach. *Diabetol* 36: 547-52, 1993

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

Thomson G. HLA DR antigens and susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Hum Genet* 36: 1309-1317, 1984

Tian J, Olcott AP, Hanssen LR, Zekzer D, Middleton B, Kaufman DL. Infectious Th1 and Th2 autoimmunity in diabetes-prone mice. *Immunological Reviews* Vol 164: 119-127, 1998

Tian J, Olcott A, Hanssen L, Zekzer D, Kaufman DL. Antigen-based immunotherapy for autoimmune disease: from animal models to humans? *Immunol Today* 4: 190-195, 1999

Tisch R, Yang XD, Singer SM, Liblau RS, Fugger L, McDevitt HO. Immune response to GAD correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature* 366: 72-75, 1993

Tisch, R, McDevitt. Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: *Cell* Vol. 85: 291-297, 1996

Tracy S, Chapman N, Rubocki RJ, Beck MA. Host immune responses to enteroviral infections. In *Human Enterovirus Infections*. Rotbart HA, Ed. Washington, DC. ASM 175-191, 1995

Vardi P, Ziegler AG, Mathews JH, Dib S, Keller RJ, Ricker AT, Wolfsdorf JI, Herskowitz RD, Rabizadeh A, Eisenbarth GS. Concentration of insulin autoantibodies at onset of type 1 diabetes. Inverse log-linear correlation with age. *Diabetes Care* 11, 736-739, 1988

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: 926-933, 1996

Viskari H, Ludvigsson J, Uibo R et al. Relationship between the incidence of type 1 diabetes and enterovirus infections in different European populations: results from the EPIVIR project. *J Med Virol* 72, 610-617, 2004

Viskari H, Ludvigsson J, Uibo R, Salur L, Marciulionyte D, Hermann R, Soltesz G, Füchtenbusch M, Ziegler AG, Kondrashova A, Romanov A, Kaplan B, Laron Z, Koskela P, Vesikari T, Huhtala H, Knip M, Hyöty H. Relationship between the incidence of type 1 diabetes and maternal enterovirus antibodies: time trends and geographical variation. *Diabetologia* 48, 1280-1287, 2005

Viskari H, Salur L, Uibo R, Marciulionyte D, Hermann R, Soltesz G, Ludvigsson J, Füchtenbusch M, Ziegler AG, Kondrashova A, Romanov A, Karvonen A, Reunanen A, Ilonen J, Knip M, Hyöti H. Relationship between the incidence of type 1 diabetes and enterovirus in different European populations: Results from the EPIVIR project. *J Med Virol* 72: 610-617, 2004

Vreudgenhill GR, Geluk A, Ottenhoff TH, MelchersWJ, Roep BO, GalamaJM. Molecular mimicry in diabetes mellitus: the homologous domain in coxsackie B virusprotein 2C and islet autoantigen GAD65 is highly conserved in the coxsackie B-like enteroviruses and binds to the diabetes associated HLA-DR3 molecule. *Diabetologia* 41: 40-46, 1998

Walczak M, Grudziak A, Orzegowska E, Zygmunt A, Machczynski M, Stone R, Norris J, Jozwiak M, Rewers M. The risk for IDDM in childhood depends on maternal age and birth weight, but not on birth order. In Proceedings of the European Diabetes Epidemiology Study Group, Venice, Abstract, 103, 1989

Walter M, Albert E, Conrad M, Keller E, Hummel M, Ferber K, Barrat B.J., Todd J.A., 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.

Wasmuth HE, Hess G, Viergutz C, Henrichs HR, Martin S, Kolb H . Non-specific viral infections as possible synchronising events of the manifestation of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 16: 177-78, 2000

Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 14: 353-356, 1993.

Wilkin TJ, Kibirige M, Mallam KM, Renuka R, Metcalf BS: Testing the accelerator hypothesis: Type 1 diabetes presents earlier in the fatter child: the Early Bird Study. *Diabetologia suppl.* 1:OR 141, 2002

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* 48:460-8, 1999

Ziegler AG, Eisenbarth GS. Immunology of diabetes In: Alberti KGMM, Krall LP, eds. *The Diabetes Annual/ 5*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 22-50, 1990

Ziegler AG, Herskowitz R, Jackson RA, et al. Predicting Type I diabetes. *Diabetes Care* 13:72-775, 1990

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):1771-2, 2003

Ziegler AG, Standl E. Genetic patterns of IDDM related to environmental factors. *Research Methodologies in Human Diabetes - Part 1*, Walter de Gruyter, 1994

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: 358-63, 1989

Ziegler AG, Ziegler R, Vardi P et al. Life table analysis of progression to diabetes of anti-insulin-autoantibody positive relatives of type I diabetics. *Diabetes* 38: 1320-1325, 1989

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. *Diab* vol 48: 460-68, 1999

Ziegler AG, Baumgartl HJ, Standl E, Mehnert H. Risk of progression to diabetes of low-titer ICA-positive first-degree relatives of type I diabetics in southern Germany: *J Autoimmun* 3: 619-624, 1990

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zellen
CD	Cluster of differentiation
CI	Konfidenzintervall
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
GADA	Glutamatdecarboxylase-Antikörper
GDM	Gestationsdiabetes
HLA	Human leukocyte antigen
IAA	Insulinautoantikörper
IA2A	Protein-Tyrosinphosphatase IA-2-Antikörper
ICA	Inselzellantikörper
IFN- γ	Interferon- γ
IL-4, IL-10	Interleukin 4, bzw. 10
LADA	latent autoimmune diabetes in the adults
MS	Multiple Sklerose
NOD-Maus	non obese diabetic-Maus
OGTT	oraler Glukosetoleranztest
RIA	Radioimmunoassay
Th1-,Th2-Zellen	T-Helfer 1-, bzw. T-Helfer 2-Zellen
U	Units

9. Danksagung

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. A.G. Ziegler möchte ich für die Erteilung des Themas und für die persönliche und fachliche Unterstützung sehr herzlich danken.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Martin Fuchtenbusch für die exzellente Betreuung, sein beständiges Interesse an den Ergebnissen dieser Studie und die stetige Motivation zur Vollendung dieser Arbeit. Dr. Martin Fuchtenbusch stand mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite. Durch ihn bekam ich einen Einblick in die Methodik des wissenschaftlichen Arbeitens und eignete mir wesentliche Grundlagen zur Interpretation wissenschaftlicher Studien an.

Ebenfalls danke ich Frau Dr. G. Jäger (Abteilung Virologie am Max- von-Pettenkofer-Institut, München) sowie den Medizinisch-Technischen Assistentinnen, die mir im praktischen Teil meiner Arbeit mit endloser Geduld die Grundlagen der Durchführung von ELISA-Tests vermittelt haben und zu jeder Zeit wertvolle Hilfestellungen gaben.

Zuletzt möchte ich mich noch bei Herrn Dr. Michael Schenker, der mir trotz aller Hindernisse im statistischen Teil der Arbeit unermüdlich zur Seite stand und allen Angestellten des Instituts für Diabetesforschung für ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten: Armin Irnstetter
 Marbachstr. 3
 81369 München
 Familienstand: ledig
 Nationalität: deutsch
 Geboren am 06.06.1974 in Ingolstadt

Schulbildung:	1980 - 1993	Grundschule und Gymnasium in Ingolstadt
Hochschulbildung:	1994 - 2001	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians- Universität, München
	März 1996	Ärztliche Vorprüfung
	März 1997	1. Staatsexamen
	Sept. 1999	2. Staatsexamen
	Mai 2001	3. Staatsexamen
	2002 - 2003	Arzt im Praktikum Kinderklinik Klinikum Starnberg
	Seit Juli 2003	Assistenzarzt Kinderklinik Klinikum Starnberg