

Aus der III. Medizinischen Abteilung des  
Akademischen Lehrkrankenhauses München Schwabing

Vorstand: Prof. Dr. Eberhard Standl

und

der klinisch experimentellen Abteilung des

Instituts für Diabetesforschung

Leitung: Prof. Dr. Anette-G. Ziegler

**Charakterisierung von Insel-Autoantikörper-Subklassen im Verlauf des  
spontanen Autoimmunprozesses, bei Manifestation und nach Immuninter-  
vention bei Typ 1 Diabetes und im Tiermodell der NOD-Maus**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Katharina Kredel

aus Heidelberg

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1.Berichterstatter: Prof. Dr. Anette-G. Ziegler  
2.Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. K. Parhofer  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Wank  
Prof. Dr. H.P. Schwarz

Mitbetreuung durch den  
Promovierten Mitarbeiter: Dr. Martin Füchtenbusch

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2004

**WEGE SIND NIE VORGEGEBEN; SIE ENTSTEHEN UNTER UNSEREN  
FÜSSEN, INDEM WIR SIE GEHEN.**

Jörg Zink

## **GLIEDERUNG**

<b>1</b>	<b>Einführung und Fragestellung</b>	
1.1	Zentrale Fragestellung und Hypothese	1
1.2	Spezifische Fragestellungen	5
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	
2.1	Pathogenese des Typ 1 Diabetes	7
2.2	Risikofaktoren: Genetik und Umwelt	9
2.2.1	Genetik - Prädisposition für den Typ 1 Diabetes	9
2.2.2	Umweltfaktoren	11
2.3	Humorale Immunmarker	13
2.3.1	Inselzellantikörper (ICA)	14
2.3.2	Insulinautoantikörper (IAA)	15
2.3.3	Antikörper gegen Glutamat Decarboxylase und IA2 (GADA und IA2A)	15
2.3.4	Weitere diabetesassoziierte Antikörper	17
2.4	Zelluläre Immunmarker	18
2.4.1	CD4+ T-Zellen	19
2.4.2	CD8+ T-Zellen	20
2.4.3	Zuordnung von IgG-Antikörper Subklassen zu einer Th1- bzw. Th2-Immunantwort	21
2.5	Die Rolle der Zytokine in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus	22
2.6	Immunintervention	25
2.6.1	Immunsuppression mit CyclosporinA und Azathioprin	25

2.6.2	Weitere nicht-selektive und semi-selektive Immunmodulatoren	26
2.6.3	Selektive Immunintervention	28
2.7	Unterschiedliche Testverfahren zum Ermitteln von Insulinantikörpern	32
<b>3</b>	<b>Kollektive und Methoden</b>	
3.1	Probandenkollektive	
3.1.1	BABYDIAB. Beobachtung antikörperpositiver Kinder von Geburt an	34
3.1.2	Patienten mit neumanifestem Typ 1 Diabetes	35
3.1.2.1	Patienten mit neumanifestem Typ 1 Diabetes unter verschiedenen Regimen einer Insulinbehandlung	35
3.1.2.2	Immunintervention mit Cyclosporin A	36
3.1.3	Prädiabetische Verwandte 1. Grades von Typ 1 Diabetikern: Die Schwabinger Insulin Prophylaxe (SIP) Pilot-Studie	37
3.2	Tiermodelle	39
3.2.1	Unbehandelte NOD-Mäuse	40
3.2.2	Immunintervention mit Insulinvaccinierung im Tiermodell der NOD-Maus	40
3.2.2.1	Dosierung des Impfstoffes	40
3.2.2.2	Insulin und Immunstimulans	41
3.2.3	Blutentnahme	43
3.3	Methoden	
3.3.1	Analyse der humoralen Immunantwort gegen Insulin	43
3.3.1.1	Mikro-Radioimmunoassay zum Nachweis von IA	43
3.3.1.2	Protein A/G-Sepharose RIA zur Bestimmung der IAA	44
3.3.1.3	RIA zur Bestimmung der Insulinantikörper bei Mäusen	45

3.3.2	Bestimmung der IAA Subklassen mittels Mikro-RIA	47
3.3.2.1	I(A)A-Subklassen beim Menschen	47
3.3.2.2	I(A)A-Subklassen bei der NOD-Maus	48
3.3.3	Bestimmung der GADA- und IA-2A-Subklassen mit Hilfe eines Radioimmunoassay	50
3.3.3.1	Herstellung von 35-markiertem Antigen	50
3.3.3.2	Radioimmunoassay	51
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	
4.1	BABYDIAB. Entwicklung der Autoantikörper-Subklassen gegen Insulin, GAD und IA-2 in der prädiabetischen Phase beim Menschen	52
4.1.1	Starke Inselautoantikörperproduktion in den ersten Lebensjahren	52
4.1.2	Verteilung der Inselantikörper-Subklassen – IgG1 als dominante Subklasse	56
4.1.3	Verteilung der Inselantikörper-Subklassen im Verlauf – kein Wechsel in der Dominanz	62
4.1.4	Inselantikörper-Subklassen und Manifestation des Diabetes mellitus	65
4.2	Entwicklung von Inselantikörper-Subklassen bei Immun- intervention nach Diabetesmanifestation	69
4.2.1	Insulinautoantikörper (IAA) bei Diabetesmanifestation	69
4.2.2	Insulinantikörper nach Insulintherapie	71
4.2.3	Verlauf der IA-Subklassen nach Insulintherapie	76
4.2.4	Humorale Immunantwort gegen Insulin bei Immunintervention mit Cyclosporin A	77
4.3	Immunantwort gegen Insulin bei prädiabetischen Verwandten 1. Grades von Typ 1 Diabetikern	80

4.3.1	Verlauf der Insulinantikörper nach Beginn der Insulinprophylaxe	80
4.3.2	Verteilung der IA Subklassen	81
4.3.3	Muster der IA-Antwort unter prophylaktischer Insulintherapie im Hinblick auf die Diabetesentwicklung	82
4.3.4	Muster der IA und deren Subklassen bei 7 unbehandelten Kontrollen	83
4.4	GADA und IA2A und deren Subklassen bei Immunintervention mit Insulin bei neumanifestierten Typ 1 Diabetikern und bei Insulinprophylaxe bei prädiabetischen Verwandten 1. Grades von Typ 1 Diabetikern	84
4.5	Entwicklung der spontanen humoralen Autoimmunantwort gegen Insulin bei unbehandelten NOD-Mäusen	86
4.5.1	Verteilung der Insulinautoantikörper	86
4.5.2	Verteilung der Insulin IgG-Antikörper- Subklassen bei unbehandelten NOD-Mäusen	90
4.6	Humorale Immunantwort gegen Insulin nach Immunintervention bei der NOD-Maus	93
4.6.1	IAA- und IAA-Subklassen bei Immunintervention mit Adjuvans alleine	93
4.6.2	Insulinantikörper nach Immunintervention mit Insulin	96
4.6.3	IA-Subklassen bei Immunintervention mit Insulin	99
4.6.4	Verteilung der IA- und IA-Subklassen in neugeborenen NOD-Mäusen	101

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	
5.1	BABYDIAB. Entwicklung der Autoimmunantwort in unbehandelten antikörper-positiven Kindern	104
5.1.1	Verlauf der Autoantikörper in der prädiabetischen Phase	104
5.1.2	Reihenfolge der aufgetretenen Inselantikörper und Antikörper-Subklassen-Muster	106
5.1.3	IgG-Antikörper-Subklassen und Zuordnung zu einer Th1- und Th2-Immunantwort	107
5.1.4	Verteilung der Autoantikörper bei Diabetesmanifestation	111
5.2	Antikörper-Subklassen-Profile nach Immunintervention	112
5.2.1	Immunintervention mit Insulin	113
5.2.2	Immunintervention mit Cyclosporin A	116
5.2.3	GADA- und IA2-A- Subklassen nach Immunintervention mit Insulin	118
5.2.4	Bedeutung der Th2 Antwort für die Manifestation des Typ 1 Diabetes	119
5.3	Entwicklung der spontanen humoralen Autoimmunantwort gegen Insulin bei unbehandelten NOD-Mäusen	120
5.4	Verschiebung der murinen Immunantwort gegen Insulin nach Immunintervention	123
5.4.1	IAA- und IAA-Subklassen nach alleiniger Impfung mit Adjuvans	124
5.4.2	IAA- und IAA-Subklassen nach Impfung mit Insulin und Adjuvans	126
5.4.3	IA- und IA-Subklassen nach Immunintervention bei neugeborenen NOD-Mäusen	129

<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	132
<b>7</b>	<b>Literaturangaben</b>	137
	<b>Lebenslauf</b>	162
	<b>Danksagungen</b>	164

### **Verzeichnis der Abbildungen**

Abb 1	Hypothetisches Modell zur Diabetesentstehung	7
Abb 2	QQ-Diagramm der im Radioimmunoassay gemessenen murinen Insulinantikörper	46
Abb 3	QQ-Diagramm der im Radioimmunoassay gemessenen murinen Insulinantikörper-Subklassen	50
Abb 4	Insel-Antikörpern und Inselantikörper-Subklassen bei 4 Kindern der BABYDIAB-Studie	53
Abb 5	Antikörper-Spezifität von IgG1-Antikörper-Spitzenwerten bei 26 BABYDIAB Kindern	55
Abb 6	Spitzenwerte der Autoantikörper-Subklassen und –Isotypen gegen Insulin, GAD und IA-2 bei unbehandelten Kindern	60
Abb 7	Kumulatives Diabetesrisiko der BABYDIAB-Kinder bei Immunreaktivität gegen Insulin	66
Abb 8a	Kumulatives Diabetesrisiko der BABYDIAB-Kinder bei Immunreaktivität gegen IA-2A	67
Abb 8b	Kumulatives Diabetesrisiko der BABYDIAB-Kindern bei Immunreaktivität gegen GAD	68
Abb 9	IgG-IA-Subklassen 12 Monate nach Beginn der Insulintherapie	72
Abb 10	Korrelationen der Gesamt-IA, IgG1-IA und IgG4-IA -Titer nach 12-monatiger Insulintherapie	74

Abb 11	Verlauf von IA, IgG1-IA, IgG4-IA bei Behandlung mit s.c. plus i.v., oder nur s.c. Insulin	75
Abb 12	Verlauf der IA- und IA-Subklassen bei 5 mit Cyclosporin A behandelten Patienten	78
Abb 13	IA- und IA-Subklassen prophylaktischer Insulinbehandlung	81
Abb 14	IgG4-GADA und IgG4-IA2A bei Immunintervention bei neu manifestem Diabetes mellitus und bei Verwandten ersten Grades	86
Abb 15	Prävalenz und Höhe der IAA bei unbehandelten NOD-Mäusen	87
Abb 16	IA-Spitzenwerte bei unbehandelten NOD- Mäusen und nach Immunintervention	88
Abb 17	Verlauf der Insulinautoantikörper bei unbehandelten NOD-Mäusen	90
Abb 18	IAA-Subklassen bei IAA-positiven unbehandelten NOD-Mäusen der Gruppe 1a	91
Abb 19	IAA-Subklassen bei IAA-positiven unbehandelten NOD-Mäusen der Gruppe 1b	92
Abb 20	Verlauf der Insulinautoantikörper bei NOD-Mäusen bei Immunintervention mit Immunadjuvans allein	95
Abb 21	I(A)A- Subklassen bei NOD-Mäusen nach Impfung mit Immunadjuvans allein.	96
Abb 22	IA bei NOD-Mäusen nach Behandlung mit 0,25 IE Insulin und Immunadjuvans	97
Abb 23	Verlauf der IA bei NOD-Mäusen nach Behandlung mit Injektionen von 4 IE Insulin und Immunadjuvans	98

Abb 24 A+B	I(A)A- Subklassen bei MI(A)A-positiven NOD-Mäusen bei Immunintervention mit Insulin und Adjuvans	100
Abb 25	Verlauf der IAA bei neugeborenen NOD-Mäusen nach Immunintervention mit Insulin und Immunadjuvans	102
Abb 26	IAA-Subklassen bei I(A)A-positiven neugeborenen NOD-Mäusen nach Behandlung mit Insulin plus Adjuvans	103

### **Verzeichnis der Tabellen**

Tabelle 1	Gruppen von NOD- Mäusen, die in dieser Arbeit nach verschiedenen Behandlungsregimen eingeteilt waren	42
Tabelle 2	Autoantikörper-Subklassen bei 26 Kindern der BABYDIAB-Studie, die persistierende Autoantikörper gegen mehr als ein Antigen aufwiesen	58
Tabelle 3	Autoantikörper-Subklassen bei 6 BABYDIAB-Kindern, bei denen es nach den IgG1-Antikörpern zum Auftreten von anderen Antikörper-Subklassen kam	64
Tabelle 4	Insulinautoantikörper-Subklassen bei 17 Erwachsenen mit neu-manifestem Typ 1 Diabetes	69
Tabelle 5	Entwicklung der IA-Subklassen bei Kinder mit neu-manifestem Typ 1 Diabetes, die mit i.v. + s.c. oder nur s.c. Insulingaben behandelt wurden	70

## **1. Einführung und Fragestellung**

### **1.1. Zentrale Fragestellung und Hypothese**

Die aktuellen Schwerpunkte der Pathogeneseforschung zum Typ 1 Diabetes gelten heute der Charakterisierung der präklinischen Inselautoimmunität beim humanen Typ 1 Diabetes sowie im Tiermodell der NOD-Maus. 1989 wurde die weltweit erste und grösste prospektive Studie zur Ätiologie und Pathogenese des humanen Typ 1 Diabetes, die BABYDIAB-Studie [238], angesiedelt am Institut für Diabetesforschung in München, begonnen, die von Geburt an die Entwicklung humoraler Inselautoimmunität in Relation zu genetischen und Umweltfaktoren bei Kindern von Eltern mit Typ 1 Diabetes untersucht. Eines der ersten Hauptergebnisse war, dass Inselautoimmunität bereits sehr früh in den ersten beiden Lebensjahren entsteht. Neben der BABYDIAB-Studie haben eine Vielzahl internationaler Forschungsprojekte in den letzten 10 Jahren dazu beigetragen, enorme Fortschritte auf dem Weg zu einer differenzierten Immundiagnostik zu erzielen, um das Auftreten von Inselautoimmunität in der präklinischen Phase präziser vorherzusagen, um so die diagnostische Basis für gezielte Immuninterventionen zu schaffen. Dabei hat mit der Standardisierung und Weiterentwicklung von Testverfahren zur Bestimmung von Inselantikörpern insbesondere die humorale Immundiagnostik an Bedeutung gewonnen. So sind auch die aktuellsten Projekte auf der humoralen Ebene angesiedelt, um mit neuen Verfahren wie der Bestimmung von Antikörper- Epitopen, -Affinitäten und -Subklassen, sowie der Tetrameranalyse die Entwicklung des  $\beta$ -Zell-Autoimmunprozesses genauer zu charakterisieren. Obgleich der Typ 1 Diabetes eine T-Zell vermittelte Autoimmunerkrankung darstellt, haben die Versuche zur Standardisierung von T-Zell-Assays bislang nur wenig Erfolg gezeigt. Dies liegt u.a. daran, dass sich im peripheren Blut nur wenig inselspezifische T-Zellen finden und die Stimulationsindizes oftmals nur sehr gering sind. Auch wegen der aufwendigen Labortechniken sind sie, zumal im Rahmen grosser Screeninguntersuchungen, nicht geeignet.

Am Modell der NOD-Maus konnten verschiedene Studien zeigen, dass destruktive Autoimmunität durch eine Th1-dominierte, zelluläre Immunantwort gekennzeichnet ist, wobei unklar ist, ob diese relativ spät im Verlauf des Autoimmunprozesses nach einer latenten Phase nicht-destruktiver Th2-dominierter Immunantwort entsteht [116] oder spontan und relativ früh mit einer Immunantwort gegen ein primäres Autoantigen beginnt, die sich dann in Form eines Spreadings gegen weitere Autoantigene ausbreitet [85].

Das Konzept, wonach sich organspezifische Autoimmunerkrankungen aus einer T-Helferzell-1 (Th1)/T-Helferzell-2 (Th2)-Imbalance entwickeln können, ging aus der Beobachtung hervor, dass gegensätzliche, dichotome Immunantworten nach experimentellen Immunisierungen entstehen können, die gleichermaßen von der Helferfunktion von CD4-Lymphozyten abhängig sind. Erst mit der Entwicklung von Methoden, T-Zell-Linien zu etablieren und Zytokine zu messen, konnte dieses Konzept entwickelt werden. Mosmann et al. klassifizierte als erster Maus-CD4-T-Zellklone auf der Basis ihrer Zytokinmuster und führte die Begriffe der Th1- und Th2-Populationen ein [136]. Th1-Klone produzieren IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\beta$ , und Th-2-Zellklone wurden solche genannt, die IL-4, IL-5, IL-6, und IL-13 sezernieren. Auch IL-10 galt zunächst als alleiniges Th2-Zytokin, mittlerweile weiß man aber, dass auch Th1-Zellen IL-10 produzieren können. Dabei wird heute noch viel zu wenig bedacht, dass die funktionelle Diversität individueller T-Helfer-Zellen und ihre Zuordnung zum Th1-, bzw. Th2-Kompartiment für jedwede Immunantwort dagegen weitaus variabler ist [3]. Individuelle T-Zellen können heterogene und komplexe Zytokinmuster exprimieren, die für keines der beiden klassischen Subsets charakteristisch sind, wobei dies insbesondere für humane T-Zellen gilt. CD4-Zellen, die sowohl Th1-als auch Th2-Zytokine produzieren, werden daher auch Th0-Zellen genannt. Sie sind oft insbesondere in der frühen Phasen einer Immunantwort, vor einer zunehmenden Polarisierung in eine Th1 oder Th2 Richtung, nachweisbar. Aufgrund der heterogenen Zytokinmuster innerhalb einer Th1- oder Th2-Zellpopulation und der Schwierigkeit, diese zu quantifizieren, schlagen heute viele Immunologen vor, statt von einer Th1- bzw.

Th2-Antwort zu sprechen, die Begriffe "Th1-like" bzw. "Th2-like" oder "Th1-dominant", bzw. "Th2-dominant" zu verwenden [3,193].

Nunmehr unstrittig ist, dass in der Maus eine polarisierte Th2-Immunität mit der Produktion von IgG1 Antikörpern, eine Th-1 Antwort dagegen mit der Subklasse IgG2a/c assoziiert ist. Dies ist in verschiedenen Tiermodellen organspezifischer Autoimmunität wie der experimentellen Retinitis [195] oder der Thyreoiditis [229] gezeigt worden. Auch die Induktion eines Th2-Kompartiments mit der Generierung von IgG1-Subklassen in der Maus nach Immunisierung mit Autoantigen ist in verschiedenen Studien gezeigt worden [89,198]. Anders als in der Maus ist die Zuordnung einer Th1-, bzw. Th-2-dominierten Antwort zu distinkten Antikörper-Isotypen und Subklassen-Mustern beim Menschen schwieriger und deren Bedeutung für organspezifische Autoimmunerkrankungen bislang unklar. Th2-Immunität, insbesondere gegen exogenes Antigen, ist mit IgG4- und IgE-Antikörper-Antworten assoziiert, da diese durch IL-4 induziert werden können [112]. Die IgG-Subklassen-Antworten bei Th1-dominierte Immunität können dagegen mit überwiegender IgG1-AK Produktion assoziiert sein oder aber alle IgG-Subklassen umfassen [221].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die grundsätzlichen Fragen zu klären, ob sich die Antikörpersubklassenmuster gegen verschiedene Inselantigene, altersabhängig, zwischen Mensch und Tiermodell, bei Manifestation, und nach Immunintervention unterscheiden, und wie sich diese im Verlauf des Autoimmunprozesses entwickeln.

Darüberhinaus galt es, die Hypothese zu überprüfen, dass sich mit der Charakterisierung der Antikörper-Subklassen gegen verschiedene Inselantigene eine mögliche Polarisierung der Immunantwort in Richtung einer putativ destruktiven Th1-Antwort, bzw. einer protektiven Th2-Antwort beschreiben lässt, und somit ein Marker für die Dynamik und die Veränderungen der Immunantwort gegen Inselantigene während des spontanen Autoimmunprozesses und nach

Immunintervention beim humanen Typ 1 Diabetes und im Tiermodell etabliert werden kann.

Folgende Einzelprojekte wurden realisiert: Antikörper-Subklassen-Profile gegen verschiedene Inselantigene wurden im Verlauf der präklinischen, spontanen Entwicklung von Inselautoimmunität erstens bei 26 Kindern mit multiplen Antikörpern des BABYDIAB Kollektivs, (IAA, GADA, IA-2A) und zweitens im Tiermodell der NOD-Maus (IAA) charakterisiert. Drittens wurde die humorale Immunantwort auf Subklassenebene gegen exogene (Insulin) und endogene Antigene (IAA, GADA, IA-2A) unter intensivierter (i.v. plus s.c.) oder konventioneller (s.c.) Insulintherapie bei 29 Patienten mit neumanifesten Typ 1 Diabetes, viertens nach Immunintervention mit Insulin bei 7 Prättyp 1 Diabetikern („Insulinprophylaxe“) und 7 Kontrollpersonen, und fünftens, nach Immunintervention mit Cyclosporin bei 5 neumanifesten Typ 1 Diabetikern und 5 Kontrollen analysiert. Sechstens wurden verschiedene Immunisierungsprotokolle mit Insulin in unterschiedlichen Dosen und Adjuvantien (IFA, Diphtherie-Tetanus-Toxoid) in der NOD-Maus verschiedenen Alters getestet und deren Einfluss auf die Entstehung von Insulinantikörpern (IA) und deren Subklassen untersucht.

Die Arbeit kann zeigen, dass der relativ zeitgleich auftretende frühe Antikörper-Peak bei BABYDIAB-Kindern auf eine spontane, möglicherweise programmierte Insulinitis hinweist, die akut und fulminant oder aber im Sinne eines Spreadings der Immunantwort chronisch verlaufen kann und dann einer Regulation zu unterliegen scheint. Akute  $\beta$ -Zell-Destruktion und Manifestation eines Diabetes entwickelt sich oft während einer frühen oder nachfolgend IgG1-dominierten Antikörper-Peak-Antwort. Die Insulinautoimmunität ist sowohl beim Menschen als auch bei der NOD-Maus exzeptionell und schließt im Gegensatz zur Immunantwort gegen andere Inselantigene ein Th1- und Th2-Kompartiment ein, wobei letzteres durch Behandlung mit exogenem Insulin verstärkt wird. Die Induktion von Ig4-AK beim Menschen bzw. von IgG1-AK bei der NOD sind nicht mit einer spontanen oder durch Immunintervention induzierten

Diabetesprotektion assoziiert. Als Marker für  $\beta$ -Zell-Protektion oder Destruktion scheint die Analyse von Inselantikörper-Subklassen nach unseren Ergebnissen im Gegensatz zu anderen Studien, die eine solche Assoziation nahelegen [198], jedoch nicht geeignet zu sein.

## 1.2. Spezifische Fragestellungen

Die Fragenkomplexe lassen sich 3 zentralen Bereichen zuordnen:

1. Der natürliche Verlauf der humoralen Inselautoimmunität bei Kindern von Eltern mit Typ 1 Diabetes und im Tiermodell der NOD-Maus.
2. Charakterisierung der Immunantwort bei Manifestation und nach Beginn der Insulinbehandlung.
3. Charakterisierung der Immunantwort nach Immunintervention bei prädiabetischen Verwandten ersten Grades von Menschen mit Typ 1 Diabetes und im Tiermodell der NOD-Maus.

Folgende spezifische Fragen wurden dabei in der vorliegenden Arbeit untersucht:

- Wie ist der Beginn spontaner Inselautoimmunität in den ersten Jahren im BABYDIAB-Kollektiv charakterisiert und welche Antikörper-Subklassen-Profile finden sich ?
- Können bei der unbehandelten NOD-Maus Insulinantikörper-Subklassen nachgewiesen werden? Welche IAA-Subklasse dominiert zu Beginn der spontanen Immunantwort der NOD-Maus und verändert sich das Muster der IAA-Subklassen im Verlauf?
- Sind bestimmte Autoantikörper-Subklassen bei BABYDIAB-Kindern oder der NOD-Maus mit einem höheren Risiko eines Diabetes assoziiert?

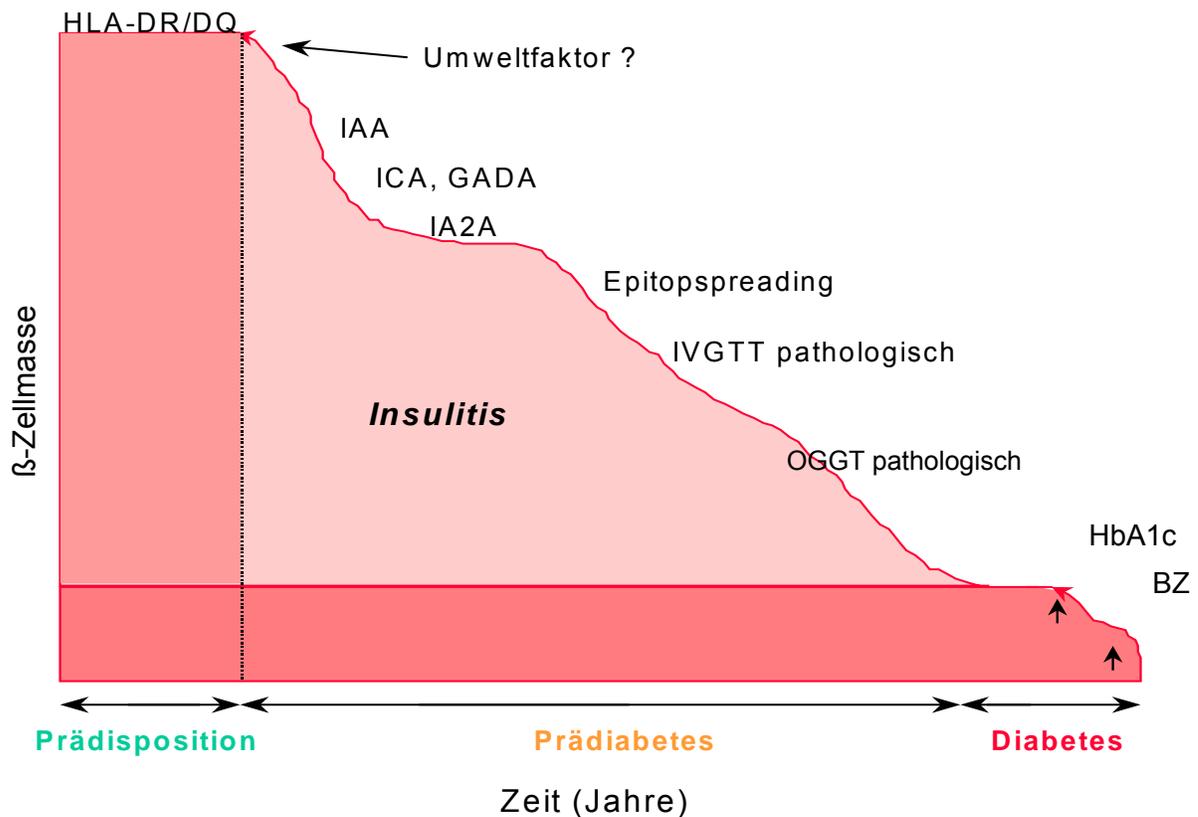
- Verändert sich unter Behandlung mit Insulin oder Cyclosporin A plus Insulin bei neu manifesten Typ 1 Diabetikern die humorale Immunantwort auf Subklassen-Ebene?
- Wie verändert die prophylaktische Immunintervention mit Insulin bei Hochrisikopatienten während der prädiabetischen Phase die humorale Immunantwort auf Subklassenebene?
- Lässt sich ein „shift“ von einer IgG1- zu einer IgG4-dominierten Immunantwort nach Immunintervention nachweisen?
- Welchen Einfluss haben die unterschiedlichen Immunisierungsprotokolle bezüglich der Faktoren Alter, Dosis, und Art des Adjuvans auf die Insulinantikörper-Subklassenprofile ?

## 2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

### 2.1 Pathogenese des Typ 1 Diabetes

Der Typ 1 Diabetes wird nach dem heutigen Stand der Wissenschaft als eine chronische Autoimmunerkrankung angesehen, in deren Verlauf sich das körpereigene Immunsystem in einer oft jahrelangen chronisch-selektiven Immunreaktion gegen die insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas richtet und diese zerstört [234,78]. Im Tiermodell der NOD-Maus konnte gezeigt werden, dass es zunächst zum Einwandern von autoreaktiven B- und T- Lymphozyten und Plasmazellen in die pankreatischen Inseln kommt. Und später auch zum Einwandern von dendritischen Zellen und Makrophagen [82,122,235,34]. Es entsteht eine progrediente Entzündung der Inselzellen, die sogenannte Insulitis. Im weiteren Verlauf kommt die Insulinproduktion der  $\beta$ -Zellen zum Erliegen [72,73].

Abb. 1



*Abb. 1 zeigt ein hypothetisches Modell zur Diabetesentstehung. Auf der y-Achse ist die Masse der  $\beta$ -Zellen dargestellt. Die x-Achse kennzeichnet einzelne Phasen in der Entwicklung des Typ-1-Diabetes. HLA-DR/DQ bedeutet die genetische Prädisposition, die als Voraussetzung für die Diabetesentwicklung angesehen wird. IAA (Insulinautoantikörper), ICA (Inselzellantikörper), GADA (Glutamat-Decarboxylase-Antikörper) und IA2A (Antikörper gegen IA-2) sind Autoantikörper, die im Verlauf der Diabetesentstehung messbar werden können. IVGTT kennzeichnet den intravenösen Glucosetoleranztest, OGTT den oralen Glucosetoleranztest. HbA1c ist eine glykosilierte Form des Hämoglobin, die einen Blutzuckerlangzeitwert darstellt, der den mittleren Blutzucker der letzten 3 Monate widerspiegelt. BZ bedeutet den Blutzucker im venösen und kapillären Blut.*

Die Abbildung 1 zeigt ein hypothetisches Modell zur Diabetesentstehung. Auf der y-Achse ist die  $\beta$ -Zell-Masse dargestellt, die im Verlauf durch die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Krankheit deutlich abnimmt. Der erste Abschnitt auf der x-Achse bezeichnet die genetische Prädisposition (verbunden mit bestimmten HLA-Haplotypen), die als Voraussetzung für die Entwicklung des Typ 1 Diabetes angesehen wird. Jedoch entwickeln nicht alle Personen mit genetischer Prädisposition eine manifeste Erkrankung, es müssen also noch weitere Ursachen hinzukommen. Unklar ist, welches das initiale Ereignis ist, das den Autoimmunprozess gegen die pankreatischen  $\beta$ -Zellen in Gang setzt. Es werden verschiedene Umweltfaktoren als „exogener Trigger“ diskutiert (in Abb. 1 als Umweltfaktoren gekennzeichnet). Welche Relevanz ihnen tatsächlich im Rahmen der Entwicklung des Typ 1 Diabetes zukommt, ist noch weitgehend ungeklärt [115,139]. In dieser frühen Phase sind die pankreatischen  $\beta$ -Zellen noch in der Lage, ihre metabolische Funktion zu erfüllen, es lassen sich aber bereits Autoantikörper (gegen Insulin (IAA), gegen Glutamatdecarboxylase (GADA), gegen eine Thyrosin-Phosphatase (IA2A), sowie Inselzellantikörper (ICA); siehe in Abb. 1) im Serum messen, die auf das Vorhandensein einer Insulinitis hinweisen. Man geht davon aus, dass es in dieser Phase zu einer progredienten Abnahme der  $\beta$ -Zell-Masse kommt. Oft erst viele Jahre später kommt es dann bei noch normalen Blutzuckerspiegeln zu einem Verlust der frühen Insulinsekretion (1+3min) im Rahmen eines intravenösen Glucosetoleranztests (IVGTT). Erst wenn 80-90% der insulinproduzierenden Zellen zerstört sind, kommt es zu einer gestörten Glucosetoleranz im oralen Glucosetoleranztest (OGTT) und schließlich zur Diabetesmanifestation,

gekennzeichnet durch die klassischen Zeichen des absoluten Insulinmangels, wie Müdigkeit und Schwäche, Polyurie, Polydypsie [156,56,212,23] und einem Nüchternblutzucker, der nach WHO-Kriterien über einem Wert von 7.0 mmol/L liegt [47]. Nach Beginn der Insulintherapie kommt es in vielen Fällen zu einer vorübergehenden Remissionsphase mit sinkendem (partielle Remission) oder vollständig wegfallendem (totale Remission) Bedarf an exogenem Insulin. Martin et al untersuchten 1992 95 neu manifestierte Typ 1 Diabetiker im ersten Jahr nach Diagnosestellung und beobachteten bei 27% eine totale Remission [131].

Die NOD Maus entwickelt eine dem menschlichen Typ 1 Diabetes sehr ähnliche Form einer Autoimmunerkrankung [207]. Viele Studien des menschlichen Typ 1 Diabetes wurden daher am Tiermodell der NOD Maus durchgeführt. Die NOD Maus zeigt im Alter von 4-6 Wochen ein periduktales und perivaskuläres inflammatorisches Infiltrat in den pankreatischen Inseln (Periinsulitis), im Alter von 6-8 Wochen folgt die Infiltration der Insel und Zerstörung der  $\beta$ -Zellen (Insulitis). Ab einem Alter von 3 Monaten entwickeln die Tiere einen manifesten Typ 1 Diabetes. Die Inzidenz im Alter von 180 Tagen liegt (je nach Kolonie) bei den weiblichen Tieren bei ca. 80%, bei den männlichen bei ca. 30% [220].

## **2.2 Risikofaktoren: Genetik und Umwelt**

### **2.2.1 Genetik - Prädisposition für den Typ 1 Diabetes**

Die Wahrscheinlichkeit an Typ 1 Diabetes zu erkranken liegt in der deutschen Bevölkerung bei ca. 0,3%. Bei Verwandten ersten Grades von Typ 1 Diabetikern liegt das Risiko um den Faktor 10 über dem der Normalbevölkerung. Dies scheint vor allem durch bestimmte genetische Risikomerkmale begründet zu sein. Ausschlaggebend sind in dieser Beziehung vor allem HLA-Antigene. Das HLA-System (Human Leucocyte Antigen) ist ein Genprodukt des major histocompatibility gene complex (MHC), welcher auf dem kurzen Arm des

Chromosom 6 lokalisiert ist. Die MHC Moleküle binden prozessierte Antigene und machen deren optimale Erkennung durch T-Zellen möglich. Sie sind ein wichtiges Regulationssystem für die Immunabwehr beim Menschen und ermöglichen die Unterscheidung von Selbst und Fremd-Antigenen durch die an der Immunantwort beteiligten Zellen. Diese Genprodukte werden in drei Klassen eingeteilt: die Klasse I mit den Loci HLA-A, -B, -C wird auf fast allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert und vom T-Zell-Rezeptor der zytotoxischen T-Zellen erkannt. Die Moleküle der Klasse II, mit den Loci HLA-DP, -DR, -DQ finden sich hingegen nur auf B- und T-Lymphozyten und einigen Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. Sie werden von T-Helferzellen erkannt. Nur Zellen, die Moleküle der Klasse II exprimieren, können somit als Antigen präsentierende Zellen (APC) fungieren. Die Klasse III beinhaltet die Komponenten C4, C2, BF des Komplementsystems. Fast 23% der Typ 1 Diabetiker weisen das sonst sehr seltene (1,9% der Normalbevölkerung) Allel BF(F1) auf [159]. Von den Molekülen der Klasse II exprimieren die meisten Typ 1 Diabetiker die Antigene HLA-DR3 und HLA-DR4 (DR3+DR4 = 69%)[234,125,202,206]. Ungefähr 30% sind heterozygot für HLA-DR3/DR-4 [148,227,18,197]. Die Kombination aus DR3 und DR4 scheint das höchste Risiko für Diabetesmanifestation zu beinhalten [197]. Betrachtet man die unterschiedlichen Allele dieser HLA-Antigene, so fällt auf, dass vor allem die Antigene HLA-DR3-DQB1\*0201 und DR4-DQB1\*0302 mit einem erhöhten Risiko für Typ 1 Diabetes verbunden sind [208]. 90-95% aller Typ 1 Diabetiker weisen eines oder beide dieser Antigene auf, während der Prozentsatz unter den Nicht-Diabetikern bei 40-50 liegt [12,208]. Die HLA Allele, die ein erhöhtes Diabetesrisiko beinhalten, werden rezessiv vererbt.

Die HLA Genotypen DQB1\*0602 und DQA1\*0102 werden mit einem Schutz vor Diabetes ist assoziiert. Diese Genotypen sind dominant gegenüber den Risikogenen. Auch wenn Hochrisikogene wie DQB1\*0302 oder DQB1\*0201 vorhanden sind, scheinen DQB1\*0602 das Auftreten von Typ 1 Diabetes zu verhindern [12]. Todd et al. zeigten 1987, dass eine Resistenz gegenüber dem Typ 1 Diabetes erheblich mit dem Vorliegen von Aspartat an Position 57 der  $\beta$ -

Kette von HLA-DQ assoziiert ist. Liegt dagegen an Position 57 eine andere Aminosäure vor (non-Asp), besteht ein erhöhtes Diabetesrisiko. In den Allelen DR4-DQB1\*0302 und DR3-DQB1\*0201, welche mit einem erhöhten Diabetesrisiko verbunden sind (s.o.), fehlt Aspartat an Position 57 der  $\beta$ -Kette [208].

Obwohl dem HLA-System die größte Rolle in der genetisch bedingten Prädisposition des Typ 1 Diabetes zukommt, wurden auch andere Gene (Non-MHC Gene) beschrieben, die mit einem erhöhten Krankheitsrisiko assoziiert sind. Verschiedene Studien weisen eine Assoziation zwischen Typ 1 Diabetes und dem humanen Insulingen (INS), beziehungsweise den flankierenden 3'-und 5'-Regionen auf dem kurzen Arm des Chromosom 11 auf [15,92]. Bell et al beschrieben 1984 ein gehäuftes Vorkommen des INS-Klasse I Allels bei Typ 1 Diabetikern im Vergleich zur Normalbevölkerung [15]. Es wird diskutiert, ob die Anlage zum Typ 1 Diabetes, die durch das INS und dessen flankierende Regionen vermittelt wird, HLA-DR4-abhängig ist [101]. Andere Studien konnten allerdings keine Interaktion zwischen INS und HLA-DR4 nachweisen [11].

### **2.2.2 Umweltfaktoren**

Die Konkordanzrate für eineiige Zwillinge liegt beim Typ 1 Diabetes bei nur 30-50% [142]. Es erkranken also nur in einem Drittel aller Fälle beide Zwillinge, obwohl sie den identischen Genotyp aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes noch andere, exogene, Einflüsse eine entscheidende Rolle spielen. Dies wird von folgenden Beobachtungen unterstützt: Das relative Risiko an Typ 1 Diabetes zu erkranken ist geographisch unterschiedlich. So ist beispielsweise die Inzidenz in den skandinavischen Ländern um ein vielfaches höher, als in Frankreich (Die Inzidenzen je 100.000 Einwohner: Finnland 32, Schweden 25, Frankreich 3,7). Es wurde ein Nord-Süd Gefälle der Prävalenz beschrieben [120,79], das allerdings von Trucco et al.

angezweifelt wird. Er konnte zeigen, dass die für verschiedene Breitengrade von Ost nach West kalkulierten Inzidenzen keinesfalls kontinuierlich von Süd nach Nord zunehmen (persönliche Mitteilung, IDW-Meeting, Paris 1994). Weiterhin zeigten Bodansky [25], Elliott [65] und Patrick [146] in Migrationsstudien, dass unter den Nachkommen von Populationen, die aus Ländern mit niedriger Diabetesinzidenz in Regionen mit hoher Diabetesinzidenz eingewandert waren, schon in der zweiten Generation deutlich steigende Inzidenzen zu verzeichnen waren. In der ersten Generation entsprach dagegen die Häufigkeit noch der des Ursprungslandes. Welche exogenen Einflüsse nun relevant für die Diabetesmanifestation sind, ist unklar. Unter anderem wurde die Stilldauer und die Exposition gegenüber Kuhmilchproteinen als Säugling diskutiert. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass bei einer Stilldauer unter 3 Monaten und einer Exposition gegenüber Kuhmilch im Alter von weniger als 3 Monaten ein erhöhtes Erkrankungsrisiko vorliegt [99,32,217,75]. Stilldauer und Kuhmilchexposition sind allerdings miteinander assoziiert, d.h. je kürzer die Stilldauer, desto früher erfolgt in der Regel eine Exposition gegenüber Kuhmilch. Der ausschlaggebende Faktor scheint eher die Kuhmilchexposition zu sein [75]. In einer in England durchgeführten Studie an 184 Kindern fand sich allerdings kein erhöhtes Risiko bei kurzer Stilldauer und früher Kuhmilchexposition [26].

Auch virale Einflüsse werden als Trigger für den Typ 1 Diabetes diskutiert. Für sie schien eine saisonale Häufung des Auftretens im Herbst und Winter und ein erhöhter Antikörpertiter gegen Enteroviren am Zeitpunkt der Krankheitsmanifestation zu sprechen [196,13,42]. Es gab schon sehr früh Fallberichte, die vom Auftreten eines Typ 1 Diabetes kurz nach einer Virusinfektion berichteten [83]. Mittlerweise ist jedoch klar, dass eine akute Virusinfektion unmittelbar vor Diabetesmanifestation keinen kausalen Zusammenhang mit der Zerstörung der  $\beta$ -Zellen haben kann, da diese schon Jahre bis Jahrzehnte vor der klinischen Manifestation ihren Anfang nimmt. Bis auf die kongenitale Rötelninfektion [135] und die Infektion mit dem Zytomegalievirus (CMV)[143] gibt es über eine ursächliche Beteiligung von Viren

an der Pathogenese des Typ 1 Diabetes wenig gesicherten Daten. Als möglicher Pathomechanismus, durch den exogene Faktoren die Autoreaktivität im Körper induzieren könnten, wird das molekulare Mimikry zwischen fremden und eigenen Proteinen angesehen [14]. Man geht davon aus, dass körperfremde Proteine wie Viren oder Nahrungsbestandteile eine Kreuzreaktivität mit körpereigenen Antigenen aufweisen und sich in deren Folge die primär xenogene Immunreaktion in eine autogene umwandelt. Neben Röteln [154,167,135], CMV [143] und Mumpsviren [90,83], wurden vor allem Coxsackie B4-Viren [74] mit der Diabetes-Pathogenese in Verbindung gebracht. Tatsächlich findet man Homologien zwischen dem Coxsackie B4 Virus und dem GAD Antigen [104]. Allerdings konnten Richter et al. eine derartige Kreuzreaktion zumindest auf humoraler Ebene wiederlegen [160]. Weitere Umweltfaktoren wie Sonnenexposition, Vitamin-D3-Spiegel [233,71] und der Sozialstatus der Familie [119,188] wurden ebenfalls als Initiatoren bei der Entwicklung eines manifesten Diabetes diskutiert. Es müssen aber in allen Fällen noch weitere Studien durchgeführt werden, um deren Bedeutung für die Pathogenese des Typ 1 Diabetes zu untersuchen. In den meisten Fällen ist die Bewertung der Studien über die Bedeutung exogener Faktoren auf die Pathogenese des Typ 1 Diabetes nur begrenzt möglich, da ihre Daten in der Regel retrospektiv gewonnen sind. Die im Juli 2000 veröffentlichten Daten der prospektiven Münchner BABYDIAB Studie konnte keine Assoziation von Stilldauer, Impfungen oder Virusinfektionen mit Inselzellautoimmunreaktionen zeigen [95].

### **2.3 Humorale Immunmarker**

Der Prozess der präklinischen  $\beta$ -Zell Destruktion beginnt meist schon Jahre bis Jahrzehnte vor der klinischen Manifestation der Erkrankung [78,237]. Noch bevor es in den Langerhansschen Inseln zu einer signifikanten Reduktion der  $\beta$ -Zellen und konsekutiven Störung der Glukosehämostase kommt, lässt sich die Autoimmunreaktion anhand von Autoantikörpern verfolgen. Diese Antikörper

treten im Blut auf und richten sich gegen verschiedene Inselzellantigene des Pankreas [191,192,61,237,163]. Ein gemeinsames Auftreten von mehreren Autoantikörpern lässt mit großer Sicherheit die spätere Manifestation der Krankheit vorhersagen, weswegen bei Risikopatienten (v.a. Verwandte 1. Grades von Typ 1 Diabetikern) ein kombinierter Antikörperscreeningtest zur Prädiktion genutzt werden kann. Folgende Autoantikörper können während der prädiabetischen Krankheitsphase als Marker genutzt werden: Insulinautoantikörper (IAA)[144,213,214,5], Inselzellantikörper (ICA)[29,33,161], Antikörper gegen die 65-kDa Glutamat Decarboxylase (GAD)[20,10,108,205] und gegen eine in der  $\beta$ -Zelle vorkommende Thyrosin Phosphatase, Islet antigen 2 (IA2)[222,134,30].

### **2.3.1 Inselzellantikörper (ICA)**

Die Inselzellantikörper wurden bereits 1974 von Doniach und Bottazzo entdeckt [33]. ICA sind Immunglobuline der Klasse IgG, die auf humanen Pankreas-Gefrierschnitten mit verschiedenen Inselzellantigenen, unter anderem mit GAD und IA2, reagieren. Sie können mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden. Die ICA-Titer werden in standardisierten JDF Units (Juvenile Diabetes Foundation) angegeben. Positive ICA (> 5 JDF-U) werden bei etwa 0,5% der Normalbevölkerung gefunden, bei nicht-diabetischen Verwandten ersten Grades von Typ 1 Diabetikern bei 3-4%. Bei neu-diagnostizierten Diabetikern liegt der Prozentsatz dagegen bei 70-80 [37,29,161]. Der ICA-Test hat als Einzeltest die höchste Sensitivität und Spezifität bezüglich der Diagnostik und Prädiktion eines sich entwickelnden Typ 1 Diabetes: Bonifacio et al. untersuchten bei 719 Verwandten ersten Grades von Typ 1 Diabetikern prospektiv ICA und beobachteten sie über einen Zeitraum von bis zu 10,5 Jahren und ermittelten einen positiven Vorhersagewert des ICA Tests von bis zu 100% und eine Sensitivität von bis zu 88% [29]. Die Praktikabilität bei großen

Fallzahlen ist allerdings durch die mangelnde Verfügbarkeit und schwankende Qualität der humanen Pankreasgewebeprobe begrenzt.

### **2.3.2 Insulinautoantikörper (IAA)**

Insulinautoantikörper (IAA) richten sich gegen körpereigenes Insulin. Sie sind von den nach exogener Insulintherapie auftretenden Insulinantikörpern nicht zu unterscheiden. Sie eignen sich, vor allem in Kombination mit anderen Antikörpern, als Marker für die Prädiktion des Typ 1 Diabetes. Die Höhe der IAA ist mit dem Fortschreiten der Erkrankung hin zur Krankheitsmanifestation assoziiert. IAAs werden bei 50% aller neu erkrankten Diabetiker gefunden, bei Kindern unter fünf Jahren sogar in 90 bis 100% der Fälle [240]. Das Auftreten der Insulinautoantikörper ist mit dem Lebensalter invers assoziiert. Bei einem gemeinsamen Auftreten mit ICA oder GADA liegt das Erkrankungsrisiko innerhalb der nächsten 5 Jahre bei 60-80% [162].

IAA können mittlerweile in geringen Serummengen (5µl) mit hoher Sensitivität und Spezifität mit Hilfe eines Radioimmunoassay (RIA) bestimmt werden [139,240]. Sie stellen bis jetzt den einzigen  $\beta$ -zell spezifischen Antikörper dar und scheinen außerdem oft vor den anderen serologisch messbaren Antikörpern aufzutreten [107,183]. In einer von Ziegler et al. durchgeführten Studie an 51 neu-manifestierten Typ 1 Diabetikern war außerdem eine Assoziation der IAA mit HLA-DR4, nicht allerdings mit HLA-DR3 zu beobachten [239].

### **2.3.3 Antikörper gegen Glutamat Decarboxylase und IA2 (GADA und IA2A)**

1990 wurde ein 64kD-Antigen, das mit Typ 1 Diabetes assoziiert ist [8], als Glutamatdecarboxylase (GAD) charakterisiert [10]. Das Enzym GAD ist für die Biosynthese des inhibitorischen Neurotransmitters GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure)

notwendig und wird sowohl im Pankreas, als auch in den GABA-sekretorischen Neuronen des zentralen Nervensystems exprimiert.

GAD-Antikörper, die mit Hilfe eines Radioimmunoassays bestimmt werden können [8], kommen bei neu-manifestierten Typ 1 Diabetikern mit einer Häufigkeit von 60-80% vor [180]. Die Prävalenz scheint mit dem Alter der Typ 1 Diabetiker korreliert zu sein, junge Typ 1 Diabetiker weisen seltener GAD-Antikörper vor, als ältere. GAD-Antikörper sind sehr sensitive Marker für die Prädiktion des Diabetes [211], sie sind jedoch nicht spezifisch für die Erkrankung, sondern kommen auch bei anderen Erkrankungen autoimmunen Ursprungs vor, zum Beispiel beim Stiffman Syndrom, oder beim autoimmunen polyendokrinen Syndrom (APS)[190,181].

IA-2 ist eine in der  $\beta$ -Zelle vorkommende Thyrosin-Phosphatase. Antikörper gegen IA-2 kommen bei 60-80% der neu-manifestierten Typ 1 Diabetiker vor [30,175] und stellen somit ebenfalls einen sensitiven Marker für die Prädiktion des Typ 1 Diabetes dar. Es konnte gezeigt werden, dass Personen, die zusätzlich zu anderen diabetes-assoziierten Autoantikörpern auch IA-2A aufweisen, schneller einen manifesten Diabetes entwickeln, als Personen ohne IA-2A [45]. GAD und IA-2 können heute auch in einem Kombinationstest gemessen werden, sogar ein Verfahren mit Kapillarblut liefert zuverlässige Aussagen [54]. Heutzutage werden für die bessere Prädiktion und Diagnostik des Typ 1 Diabetes kombinierte Antikörpertests verwendet. Die Kombination aller vier Antikörpertests ergibt die höchste Sensitivität. Fast 100% aller Patienten unter 30 Jahren haben mindestens einen Autoantikörper. Nach dem 30.Lebensjahr sind nur noch 40% der Patienten autoantikörperpositiv [165].

### 2.3.4 Weitere diabetesassoziierte Antikörper

Weiteren Antikörpern wurden bisher eine Assoziation mit Typ 1 Diabetes zugeschrieben. So wurden beim Typ 1 Diabetiker vermehrt Antikörper gegen das Heat Shock Protein (HSP) nachgewiesen. Das HSP wurde sogar von manchen als eines der frühen, oder sogar als das primäre Autoantigen in der Autoimmunreaktion gegen die pankreatischen Inseln diskutiert [63]. 1991 beschrieben dann Castano et al. die Carboxypeptidase H als Autoantigen im menschlichen Prädiabetes. Die Carboxypeptidase H ist ein 52kD- Antigen, welches auf Insulin-sezernierenden Granula exprimiert wird [41]. Bei 20% der Patienten mit Typ 1 Diabetes lassen sich Antikörper gegen Glima 38, ein neuroendokrines Membranprotein, nachweisen. Auch dieses Protein schien ein Autoantigen beim Typ 1 Diabetes darzustellen [164]. Weiterhin wurde die Rolle hinsichtlich der Pathogenese des Typ 1 Diabetes bei bekannten Molekülen diskutiert. So z.B. bei anti-bovinen Serumalbumin Antikörpern (anti-BSA) [103], Anti-Insulin-Rezeptor Antikörpern [62], Antikörpern gegen jun-B [93].

Von diesen beim Typ 1 Diabetes gefundenen Antikörpern konnte allerdings keiner eine Bedeutung für die Prädiktion des Diabetes erlangen. Sie sind nicht spezifisch für den Typ 1 Diabetes, sondern kommen auch im Rahmen anderer Autoimmunerkrankungen vor. So kann man zum Beispiel Antikörper gegen das HSP auch bei der rheumatoiden Arthritis und dem Systemischen Lupus erythematodes finden. Die Carboxypeptidase H ist kein inselzellspezifisches Antigen. Sie ist auch in der bovinen Nebenniere, Hypophyse und Niere vorhanden [51]. Auch weisen diese weiteren diabetesassoziierten Antikörper im Vergleich zu den diabetesspezifischen Antikörpern eine geringe Prävalenz bei Typ 1 Diabetes mellitus auf.

## 2.4 Zelluläre Immunmarker

Im Tiermodell des menschlichen Typ 1 Diabetes wurde beobachtet, dass es im Verlauf der Insulitis zum Einwandern von autoreaktiven Zellen in die endokrinen Inseln des Pankreas kommt. Dieses Infiltrat scheint v.a. aus mononukleären Leukozyten, Makrophagen [96], dendritische Zellen [235] und B-Lymphozyten bestehen. Die B-Lymphozyten haben die Funktion von antigenpräsentierenden und antikörperproduzierenden Zellen und sollen vor allem an der initialen Induktion der Autoimmunreaktion beteiligt sein [60]. Die dominierende Zellart des Inselinfiltrats sind allerdings die T-Zellen [209,152,204].

Leukozyten werden entsprechend ihrer Oberflächenmoleküle, der Leukozytendifferenzierungsantigene, seit 1982 in eine sogenannte CD-Nomenklatur (Cluster of Differentiation) eingeteilt. Bei einer Inselzellentzündung findet man hauptsächlich CD4- und CD8-positive Zellen. Die CD4-Zellen entsprechen dabei im Wesentlichen T-Helfer-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK). Sie erkennen Antigene, die ihnen in Verbindung mit dem Oberflächenmolekül der MHC Klasse II präsentiert werden. CD8-Zellen sind zytotoxische T-Zellen, sie erkennen Antigene bei Präsentation durch MHC I exprimierende Zellen. Beide Populationen von T-Zellen sind an der Insulitis, der Zerstörung der Inselzellen und somit an der Entwicklung des Typ 1 Diabetes beteiligt [88,194,67]. Verschiedene Studien haben dies durch Transfermodelle gezeigt, in denen CD4- und CD8-positive T-Zellen von bereits diabetischen NOD Mäusen die Krankheit auf junge, nicht diabetische NOD Mäuse übertragen konnten [16]. Welche Art von T-Zellen die eigentlichen Effektorzellen darstellen, ist gegenwärtig noch Gegenstand der Diskussion. Einerseits sollte in einer Arbeit gezeigt werden, dass CD8+ T-Helfer Zellen die eigentlichen Initiatoren der Autoimmunreaktion darstellen, die dann das Einwandern von CD4+ T-Helferzellen und Makrophagen erleichtern [215]. Andere Studien kommen jedoch zu dem Schluss, dass CD4+ T-Helferzellen die dominierende Population im Rahmen der Inselzelldestruktion ist [218,209]. Haskins et al. konnten durch

übertragene CD4<sup>+</sup> Zellen in gesunden NOD Mäusen Typ 1 Diabetes hervorrufen, ohne dass sie CD8<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls nachweisen konnten [88,35].

### 2.4.1 CD4<sup>+</sup> T-Zellen

1986 wurden von Mosman et al erstmals 2 Subtypen von CD4-Zellen in NOD Mäusen nachgewiesen. Die beiden Subtypen der CD4-Zellen wurden nach ihren unterschiedlichen Zytokinmustern in Th1- und Th2-Zellen eingeteilt [136]. Auch beim Menschen bestehen diese Untergruppen der T-Helfer Zellen mit ähnlichen Zytokinmustern [52]. Die Th1-Zellen produzieren u.a. Interleukin-2 (Il-2), Il-12, Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), TNF- $\beta$  und Lymphotoxin (LT) und sind im Wesentlichen an einer zellvermittelten, entsprechend ihrer Zytokine, proinflammatorischen Immunreaktion beteiligt. Th2-Zellen sezernieren hauptsächlich Il-4, Il-5, Il-6, Il-9, Il-13 und werden einer allergischen, IgE dominierten Immunantwort mit starker Antikörperproduktion und hoher Eosinophilenanzahl zugeordnet [137]. Auch Il-10 wurde zunächst als Th2 assoziiertes Zytokin angesehen, mittlerweile weiss man jedoch, dass auch Th1-Zellen dieses Zytokin produzieren können. Th1- und Th2-Zellen sind in der Regulation der Immunantwort wichtige Gegenspieler und beeinflussen sich gegenseitig. So hemmt IFN- $\gamma$  selektiv die Proliferation der Th2 Zellen [210], Il-4 und Il-10 hingegen unterdrücken die Zytokinsynthese der Th1 Zellen [172]. Il-4 induziert auch die Differenzierung von der nativen CD4-T-Helfer-Zelle in Richtung Th2, wohingegen die Zytokine INF- $\gamma$ , Il-12 und TGF- $\beta$  eine Differenzierung zu Th1 induzieren [166]. Dabei wird heute noch viel zu wenig bedacht, dass die funktionelle Diversität individueller T-Helfer-Zellen und ihre Zuordnung zum Th1-, bzw. Th2-Kompartiment für jedwede Immunantwort weit aus variabler ist [3]. Auch andere Zellen des Immunsystems beeinflussen das Gleichgewicht zwischen Th1 und Th2: Natürliche Killerzellen produzieren nach Antigenkontakt INF- $\gamma$  und stimulieren somit eine Th1 dominierte Immunreaktion [49,176], Il-4 wird im Rahmen der Insulitis bei NOD Mäusen auch

von Mastzellen, Basophilen und einer Untergruppe von CD3<sup>+</sup>,CD4<sup>+</sup>NK produziert [169].

Man geht heute davon aus, dass vor allem Th1-Zellen durch den Effekt ihrer proinflammatorischen Zytokine für die  $\beta$ -Zell Destruktion und damit für die Entstehung des Diabetes verantwortlich sind. So begünstigt die Gabe von Th1-Zell-Wachstum fördernden Zytokinen die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes, während Gaben von Th2-assoziiertem Il-4 und Il-10 NOD Mäuse vor Diabetes schützt [152,158].

#### **2.4.2 CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Auch bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen kann eine Unterscheidung in Untergruppen getroffen werden. Die zytotoxischen T-Zellen produzieren vor allem Zytokine, die einer Th1 Antwort zuzuordnen sind. Allerdings bestehen immer mehr Hinweise auf eine auch bei diesen T-Zellen vorkommende Th2 Antwort [40,182,69]. Die Differenzierung zu Th1 oder Th2 folgt einem ähnlichen Schema, wie bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen: Il-12 und INF- $\gamma$  induzieren eine Differenzierung zu Th1, Il-4 die zu Th2. Die CD8<sup>+</sup> Zellen scheinen vor allem in der initialen Immunreaktion eine Rolle zu spielen und eine Art Helferfunktion einzunehmen, indem sie CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aktivieren, die dann die eigentlichen Effektorzellen darstellen [97]. Die im Rahmen der frühen Autoimmunreaktion aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten produzieren hohe Konzentrationen an IFN- $\gamma$ , wodurch die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten ihrerseits zur Produktion von IFN- $\gamma$  und Il-2 stimuliert werden [111].

### **2.4.3 Zuordnung von IgG-Antikörper Subklassen zu einer Th1- bzw. Th2-Immunantwort**

Aktiviert T-Helferzellen schütten Zytokine aus und veranlassen dadurch die B-Lymphozyten zur Produktion von Antikörpern (Immunglobulin G). Je nachdem, welche T-Helferzellen dominieren, werden von den B-Zellen unterschiedliche Antikörpersubklassen produziert.

Beim Menschen stellt Immunglobulin G etwa 75% des gesamten Serum-Immunglobulins dar. Es wird nach seiner Konzentration im Serum in 4 Unterklassen geteilt: IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4. Dabei entfällt der höchste Anteil auf IgG1. Die klinische Bedeutung der IgG-Subklassen besteht in ihrer unterschiedlichen Fähigkeit an die Fc-Rezeptoren von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten zu binden und das Komplementsystem zu aktivieren.

Die Zuordnung von Antikörpersubklassen zu einer bestimmten, Th1- oder Th2-dominierten Immunantwort ist schwer zu treffen. Das humane Th2-assoziierte Zytokin Il-4 scheint eine Produktion von IgG4 und IgE zu induzieren, so dass IgG4 und IgE als Th2 assoziiert angesehen werden [112]. Die Th1 Antwort beim Menschen erscheint dagegen inhomogen. Das Th1 assoziierte INF- $\gamma$  induziert die Produktion von IgG1 und IgG3 [221]. Ng et al. beobachten bei 41 chinesischen Typ 1 Diabetikern, dass die Immunantwort gegen GAD IgG1 dominiert ist und mit der Produktion der Th1 assoziierten Zytokine, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-2 assoziiert ist [140]. Die spontane Autoimmunantwort gegen GAD- und IA2-A ist IgG1 dominiert, andere Subklassen sind in der Regel nicht nachweisbar [31].

Auch in der NOD-Maus ist eine Assoziation von Antikörpersubklassen mit einer Th1- bzw. Th2- dominierten Immunantwort zu beobachten. 1987 zeigten Snapper et al, dass das Th1 assoziierte Zytokin IFN- $\gamma$  in der Maus eine IgG2a Antikörper-Antwort induziert und gleichzeitig die Produktion von IgG3, IgG1,

IgG2b und IgE hemmt. Il-4 ist ein Th2-assoziiertes Zytokin. Es induziert die Produktion von IgG1- und IgE- und hemmt die Produktion IgM-, IgG3-, IgG2a- und IgG2b-Antikörpern [189]. Tian et al. konnten bei der Analyse von Zytokinen und Antikörpersubklassen in der NOD Maus diese Zuordnung bestätigen. Sie untersuchten die Zytokinproduktion von isolierten T-Lymphozyten der Milz und bestimmten gleichzeitig die Konzentration von Antikörper-Subklassen im peripheren Blut. Im Verlauf der spontanen Diabetesentwicklung lies sich eine Korrelation zwischen der Produktion von IFN- $\gamma$  und der Konzentration von IgG2a-Antikörpern im peripheren Blut feststellen. In der mit Insulin behandelten Gruppe dominierten dagegen IgG1 Antikörper im peripheren Blut, sowie Il-4 und Il-5 in den T-Lymphozyten [200].

Vereinfacht könnte man im Tiermodell IgG2a einer Th1-dominierten, IgG1 einer Th2-dominierten Immunantwort, beim Menschen dagegen IgG1 einer Th1-dominierten und IgG4 einer Th2-dominierten Immunantwort zuordnen. Das streng dichotome Bild der Th1- oder Th2-dominierten Immunantwort wird allerdings mehr und mehr verlassen. Man geht mittlerweile eher von regulativen T-Helferzell-Modellen aus, in denen auch Th0 und Th3 eine Rolle spielen [232]. Trotzdem können bestimmte IgG Antikörpersubklassen als Marker für das Vorherrschen einer Th1- bzw. Th2-dominierten Immunantwort genutzt werden. Sie eignen sich zum Monitoring der Autoimmunreaktion bei Immunintervention besser, als das jeweilige Zytokinmuster, da sie im peripheren Blut in ausreichender Konzentration nachweisbar und daher leichter zugänglich sind.

## **2.5 Die Rolle der Zytokine in der Pathogenese des IDDM**

1995 konnten Muir et al in einer Studie bei NOD-Mäusen eine Reduktion der Diabetesinzidenz nach Behandlung mit subkutanem Insulin zeigen (s.1.1.6.4). Sie verglichen die pankreatischen Infiltrate der behandelten Mäuse mit denen einer unbehandelten Kontrollgruppe und stellten fest, dass das Ausmaß der

Insulinitis bei den behandelten NOD Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht reduziert war, allerdings war die Konzentration von IFN- $\gamma$  innerhalb der pankreatischen Inseln im Gegensatz zur Kontrollgruppe deutlich reduziert war [138].

In vitro zeigen die Zytokine IL-1, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  (=LT), IFN- $\gamma$  direkte Zytotoxizität gegenüber pankreatischen  $\beta$ -Zellen. Da diese Zytokine neben anderen in den entzündeten Inseln in hoher Konzentration nachzuweisen sind, werden sie als Mediatoren in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes angesehen. So führt die transgene Expression von IFN- $\gamma$  in gesunden Mäusen zu einer lymphozytären Infiltration der Pankreasinseln, zur  $\beta$ -Zell Destruktion und zum manifesten Diabetes mellitus [173,174]. TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  sind, wie oben bereits ausgeführt, mit einer Th1 dominierten Immunantwort assoziiert.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass sowohl die orale, als auch die subkutane Gabe von Insulin bei NOD-Mäusen den Charakter der Immunantwort verändern kann. So führte die Immunintervention mit Insulin zu einem „shift“ der Immunantwort weg von einer Th1 dominierten, destruktiven Insulinitis hin zu einer „protektiven“ Th2 dominierten Insulinitis. Tian et al bestimmten die Anzahl von IFN- $\gamma$ -produzierenden insulinspezifischen Th1-Zellen, bzw. IL-4 und IL-5 produzierenden Th2-Zellen vor und nach Behandlung von NOD Mäusen mit s.c. Insulin oder der metabolisch inaktiven B-Kette des Insulin. Die Autoren konnten zeigen, dass die spontane destruktive Autoimmunreaktion, die zur Zerstörung der  $\beta$ -Zellen führt, Th1, also IFN- $\gamma$  dominiert ist. Die Immunintervention mit Insulin oder der inaktiven B-Kette des Insulins hatte wenig Einfluss auf die Anzahl der Th1-Zellen, rief aber eine starke Th2 Antwort hervor, angezeigt durch das Vorherrschen von IL-4 und IL-5 produzierenden T-Lymphozyten [198].

Die Th2 assoziierten Zytokine zeigen *in vitro* einen anti-inflammatorischen Effekt, der vor allem durch Hemmung der proinflammatorischen Th1 Zytokine zustande kommt. So wirken sie protektiv auf die  $\beta$ -Zellen des Pankreas [152]. Katz et al.

zeigten in Studien an NOD Mäusen, dass bei einem Transfer von Th1- und Th2-Zellen mit identischem T-Zell Rezeptor, zwar beide T-Zell-Populationen die Pankreasinseln der NOD Mäuse infiltrieren, jedoch nur die Th1-Zellen einen manifesten Diabetes hervorrufen [106]. Ein Transfer von Th2-Lymphozyten zusammen mit Th1-Lymphozyten, scheint jedoch keinen Schutz vor  $\beta$ -Zell Destruktion zu bedeuten [36].

Diese Beobachtungen zogen unterschiedliche Überlegungen über den möglichen Krankheitsverlauf des Typ 1 Diabetes in der prädiabetischen Phase nach sich. Zum einen wurde die Hypothese vertreten, dass eine nicht destruktive, latente Th2 dominierte Immunantwort während der präklinischen Phase vorherrscht, die erst später in eine destruktive Th1 Dominanz übergeht [116]. Von anderen Autoren wurde dagegen die These vertreten, dass von Anfang an eine Th1 vermittelte Immunreaktion dominiert [85], die sich erst auf ein Antigen beschränkt, im weiteren Verlauf jedoch einem „spreading“ unterliegt, also auf andere Antigene übergreift. Tian et al publizierten 1997, dass die spontane Autoimmunantwort bei der NOD Maus primär gegen GAD gerichtet und Th1 dominiert ist. In ihrer Studie weitete sich die primäre Immunreaktion, die gegen ein bestimmtes GAD-Peptid (GADp35) gerichtet war, im Alter von 12 Wochen auf GADp6 und GADp15 aus. Nach diesem intramolekularen spreading kam es dann auch zu einem intermolekularen spreading hin zu anderen  $\beta$ -Zell Antigenen. Auch die durch Immunintervention induzierte Th2 Antwort soll nach Tian et al einem derartigen spreading unterliegen. Bei Immunisierung mit einem  $\beta$ -Zell Antigen, also z.B. GADp35, kommt es auch hier zu einem erst intramolekularen, dann intermolekularen spreading, welches mit einer Diabetesprotektion verbunden ist [200,201].

Wenn die Immunintervention mit Autoantigenen, z.B. auch die mit Insulin, in der präklinischen Phase eine Th2 dominierte Immunantwort induziert, hieße das, dass sie entweder eine schon bestehende latente Th2 dominierte Reaktion

aufrecht erhält und bewirkt eine Expansion von Th2 Zellen bewirkt, oder aber einen „switch“ von Th1 zu Th2 induziert.

## **2.6 Immunintervention**

### **2.6.1 Immunsuppression mit CyclosporinA und Azathioprin**

Verschiedene Versuche einer Immunintervention sind bisher beim Menschen unternommen worden. Die erste größere Immuninterventionsstudie überhaupt wurde 1988 mit Cyclosporin A durchgeführt [66,132,39,151]. Der „Canadian-European randomized control trial“ ist eine randomisierte, doppelt verblindete Studie, in der Patienten mit neu diagnostiziertem Typ 1 Diabetes (recent onset Diabetiker) während des 1. Jahres nach Diagnosestellung mit CyA behandelt wurden, um die Häufigkeit einer insulin-unabhängigen Remissionsphase im Vergleich zur Placebogruppe zu untersuchen [50]. Zwar war die Anzahl der Remissionen in der mit CyA behandelten Gruppe unerwartet hoch, und es konnte eine verbesserte  $\beta$ -Zell Funktion anhand von metabolischen Parametern (wie nüchternes und stimuliertes C-Peptid und HbA1c) gemessen werden, doch ging der protektive Effekt bei den meisten Patienten schon in den ersten Wochen nach Absetzen des CyA wieder verloren.

Auch in der prädiabetischen Phase wurden Versuche der Immunintervention mit Cyclosporin A unternommen. So wurden 1996 in Paris und Denver 6 ICA positive Verwandte ersten Grades von Typ 1 Diabetikern mit gestörtem oralen Glucosetoleranztest mit niedrigen CyA Dosen behandelt. Im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe war die Diabetesmanifestation in der mit CyA behandelten Gruppe deutlich verzögert [39]. In einer Studie, in der Hochrisikopersonen in der präklinischen Phase CyA ohne Insulin erhielten, konnte jedoch keine verbesserte  $\beta$ -Zell Funktion nachgewiesen werden. Nach 5-

36 Monaten wiesen alle der 7 behandelten Patienten einen manifesten Typ 1 Diabetes auf [155].

Auch Azathioprin (AZA) wurde bei manifesten Typ 1 Diabetikern zur Immunsuppression eingesetzt. Der immunmodulierende Effekt besteht hier in einer unspezifischen Hemmung der T-Zellproliferation. Zwar konnte auch hier eine verlängerte Remission im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielt werden, der immunsuppressive Effekt scheint aber schwächer ausgeprägt zu sein, als bei CyA, das die Zytotoxizität von humanen T-Lymphozyten von Typ 1 Diabetikern gegen Pankreasgewebe *in vitro* besser unterdrücken kann [94]. Jedoch wurden CyA unter anderem wegen der erheblichen Langzeit-Nebenwirkungen, vor allem der Nephrotoxizität [38], auch in der prädiabetischen Phase nicht weiter zur Immunsuppression beim Typ 1 Diabetes verwendet.

### **2.6.2 Weitere nicht-selektive und semi-selektive Immunmodulatoren**

Neben den oben beschriebenen nicht-selektiven Immunmodulatoren CyA und AZA wurden noch anderen Versuche mit nicht-selektiven und semi-selektiven Immunmodulatoren vor allem im Tiermodell des Typ 1 Diabetes untersucht, z.B. die Infektion von NOD-Mäusen mit Viren, Bakterien oder complete Freund's adjuvant (CFA) [170,185,141]. Durch Transfer von Lymphozyten diabetischer NOD-Mäuse auf junge, prädiabetische NOD-Mäuse kann die Erkrankung auf die Empfängertiere übertragen werden. Sind die Spendertiere jedoch mit einem lymphotropen Virus infiziert, scheinen die Lymphozyten die Krankheit nicht mehr übertragen zu können. Shehadeh et al. veröffentlichten 1988 eine Studie, in der sie prädiabetische NOD Mäuse mit BCG oder CFA impften. In beiden Versuchsgruppen lag die Diabetesinzidenz unter der einer unbehandelten Kontrollgruppe [185]. Durch die Impfung mit Heat shock protein (HSP) [63,64] wurde das Erreichen einer verminderten Diabetesinzidenz beschrieben. HSP wurde als ein Antigen in der Autoimmunreaktion beim Typ 1 Diabetes diskutiert.

Elias et al. impften junge NOD Mäuse mit HSP und IFA, um eine Immuntoleranz in den behandelten NOD Mäusen zu induzieren. Sie stellten eine verstärkte Reaktivität der T-Lymphozyten der immunisierten NOD Mäuse fest. Diese Mäuse entwickelten innerhalb der nächsten Tage einen manifesten Typ 1 Diabetes. Die Erkrankung dieser Tiere war allerdings transient. Sie erholten sich wieder und wiesen danach eine stark reduzierte Diabetesinzidenz auf [63].

Auch die Gabe von Nicotinamid (NA), ein Vitamin der B Klasse, soll bei der NOD-Maus einen protektiven Effekt in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes haben. In mit NA behandelten NOD-Mäusen wurde eine schwächer ausgeprägte Insulinitis und im weiteren Verlauf eine verbesserte Glucosetoleranz beschrieben [228]. *In vitro* wirkt NA protektiv auf Inselzellen. Es soll über Zwischenschritte die Genexpression der MHC Klasse II hemmen und erste Schritte der Apoptose blockieren [114].

In der weltweit ersten prospektiven Immuninterventionsstudie mit NA wurden in Deutschland 55 Kinder zwischen 3 und 12 Jahren behandelt (Deutsche Nicotinamid InterventionsStudie = DENIS). Diese Kinder hatten ein oder zwei Elternteile mit Typ 1 Diabetes. Einschlusskriterium waren mindestens 2 Blutproben mit ICA  $\geq$  20 JDF-U im Laufe der letzten 6 Monate, gemessen im Abstand von mindestens 3 Monaten. Die Diabetesmanifestation bei diesen Kindern war innerhalb der nächsten 3 Jahre zu erwarten. Sie wurden in zwei Gruppen randomisiert und doppelt verblindet mit NA oder Placebo behandelt. Nach einer maximalen Beobachtungsdauer von 3 Jahren konnte in dieser Studie zwischen beiden Gruppen kein Unterschied in der Diabetesinzidenz oder der Dauer bis zur Diabetesmanifestation beobachtet werden. Die Studie wurde daraufhin abgebrochen. Diese Beobachtungen schließen zwar nicht aus, dass die Behandlung mit NA in einem früheren Krankheitsstadium einen protektiven Effekt haben könnte [151,121,150], legen aber den Schluss nahe, dass die Behandlung mit NA zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt keinen protektiven Effekt auf die Entwicklung des Typ 1 Diabetes hat.

Daraufhin wurde europaweit eine weitere prospektive NA-Interventionsstudie mit größeren Fallzahlen entworfen, deren Einschlusskriterien weiter gefasst sind und auch Personen mit niedrigerem Diabetesrisiko mit einschließen (ENDIT = european nicotinamide diabetes intervention trial). Über 40.000 Verwandten ersten Grades von Typ 1 Diabetikern wurden auf ICA untersucht. Die 552 ICA positiven ( $\geq 20$  JDF-U) Probanden wurden in 2 Gruppen randomisiert und entweder mit NA oder mit Placebo behandelt. Ergebnisse dieser Studie werden im Jahre 2003 erwartet [177].

Zu der semi-selektiven Immunintervention zählt in erster Linie die Gabe von monoklonalen Antikörpern gegen bestimmte Zellpopulationen. Für die Gabe von monoklonalen Antikörpern gegen CD4-Zellen [187] und gegen CD3, einer Komponente des T-Zell Rezeptors (TCR)[43], wurde bei NOD Mäusen ein protektiver Effekt, sowohl in der prädiabetischen Phase, als auch bei Gabe nach Manifestation des Diabetes, beschrieben. Die Gabe von monoklonalen Antikörpern ist allerdings mit einer T-Zell Aktivierung verbunden. Bei NOD Mäusen führte die Gabe von monoklonalen CD3-Antikörpern zu Gewichtsverlust, Teilnahmslosigkeit und einem kranken Gesamteindruck [91]. Schließlich wurde in verschiedenen Arbeiten beschrieben, dass auch mit monoklonalen Antikörpern gegen Zytokine, die mit einer Th1 Immunantwort assoziiert sind (anti- $\text{INF-}\gamma$ , anti- $\text{TNF-}\alpha$  und anti-IL-12) bei der NOD Maus eine Protektion erreicht werden konnte [152].

### **2.6.3 Selektive Immunintervention**

Unter selektiver Immunintervention versteht man die Intervention mit antigenspezifischen Immunmodulatoren. Durch Immunisierung mit einem spezifischen Inselzell-Antigen wird versucht, eine Toleranz des Immunsystems gegenüber diesem Antigen zu erreichen. Sowohl durch die Gabe von GAD

[141,109,203,157], als auch von Insulin (s.u.) konnte bei der NOD-Maus eine deutliche Verzögerung der  $\beta$ -Zell Destruktion und eine Verminderung der DM-Inzidenz erreicht werden.

1990 impften Atkinson et al. erstmals prädiabetische junge NOD Mäuse mit täglichem subkutanem Schweineinsulin [7]. Die Behandlung begann im Alter von 4 Wochen und wurde bis zum 180. Lebenstag fortgesetzt. Die Diabetesinzidenz konnte bei den weiblichen Tieren von 65% auf 8% gesenkt werden (eine Woche nach Ende der täglichen Impfungen). Der protektive Effekt einer solchen Behandlung könnte darin bestehen, dass die Gabe von exogenem Insulin die noch intakten  $\beta$ -Zellen vom „metabolischen Stress“ entlastet („ $\beta$ -cell rest“). Metabolisch inaktive  $\beta$ -Zellen exprimieren weniger Antigene an der Zelloberfläche [1] und sind somit weniger empfindlich gegenüber autoreaktiven T-Zellen [4]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass weniger aktive, also „ruhende“,  $\beta$ -Zellen weniger empfindlich gegenüber zytotoxischen Noxen, wie z.B. gegenüber Streptozotozin [149] und bestimmten Zytokinen sind [145].

Diese These des „ $\beta$ -cell rest“ [110,1,22] kann allerdings nicht der einzige Grund für den protektiven Effekt durch Insulin sein. Schon 1991 behandelten Zhang et al NOD-Mäuse mit oralen Insulingaben [231]. Diese wurden während der ersten 5 Wochen 2x pro Woche mit 1 mg Schweineinsulin behandelt, daraufhin wurde die Dosis reduziert und die Behandlung bis zum Alter von einem Jahr fortgesetzt. Wie bei der Gabe von subkutanem Insulin konnte auch hier eine verringerte Diabetesinzidenz und eine verzögerte Manifestation nachgewiesen werden. Wie erwartet hatte jedoch das oral verabreichte Insulin keinen metabolischen Effekt auf die Stoffwechsellage der Tiere. Ein „ $\beta$ -cell rest“ kann hier also nicht vorgelegen haben. Wahrscheinlicher ist, dass durch die frühe Gabe des Antigens eine aktive Immuntoleranz gegenüber diesem Antigen induziert wurde. Diese These wird durch folgende Beobachtung unterstützt: die durch prophylaktische Insulingabe induzierte Protektion kann bei NOD-Mäusen durch Splenozytentransfer auf andere Mäuse übertragen werden [231,17,19]. Von Muir

et al wurde 1995 weiterhin gezeigt, dass auch durch die s.c.-Impfung mit der metabolisch unwirksamen B-Kette des Insulin in dem Immunadjuvans IFA (incomplete Freund's Adjuvans), eine dem gesamten Insulinmolekül vergleichbare protektive Wirkung bei NOD Mäusen in der prädiabetischen Phase erzielt werden kann [138]. Selbst bei bereits ausgeprägter lymphozytärer Infiltration der pankreatischen Inseln konnte die tägliche s.c Gabe von Insulin oder einem metabolisch unwirksamen rekombinanten monomeren humanem Insulin-Analogon bei jungen erwachsenen NOD Mäusen das Ausbrechen eines Diabetes verhindern [105].

Auch beim Menschen wurden Versuche der Immunintervention mit Insulin unternommen. 1989 behandelten Shah et al. 12 neu diagnostizierte Typ 1 Diabetiker 2 Wochen mit einer kontinuierlichen Hoch-Dosis-Insulininfusion. Die Gruppe erhielt in dieser Zeit 4x soviel Insulin, wie die mit täglicher subkutaner Insulintherapie behandelten Kontrollgruppe. Nach zwei Wochen wurden beide Gruppen weiter mit täglicher subkutaner Insulintherapie behandelt. Es konnte gezeigt werden, dass nach einem Jahr die C-Peptid-Spiegel in der mit Hochdosis i.v. Therapie behandelten Gruppe deutlich höher waren, als in der Kontrollgruppe [184].

In einer ähnlichen im Krankenhaus München Schwabing durchgeführten Studie, wurden dagegen widersprechende Ergebnisse erzielt. Die Studie schloss ebenfalls neu-manifestierte (max. 2 Wochen) Typ 1 Diabetiker ein, die in eine Gruppe mit Hoch-Dosis-i.v.-Insulin-Therapie und eine Kontrollgruppe mit intensivierter subkutaner Insulintherapie über 2 Wochen randomisiert wurden. Anschließend wurden beide Gruppen ein Jahr lang mit intensivierter s.c. Insulintherapie behandelt. In beiden Gruppen waren die Plasmawerte für C-Peptid in diesem Jahr nicht gesunken. Im Gegensatz zu der von Shah et al. beschriebenen Studie konnte hier jedoch kein Unterschied in der metabolischen Aktivität der  $\beta$ -Zellen bei Hoch-Dosis-i.v. Therapie im Gegensatz zur intensivierten Insulintherapie festgestellt werden [178]. Der Hauptunterschied

zwischen den beiden Studien war, dass die Kontrollgruppe in der Studie von Shah et al. eine konventionelle Insulintherapie mit 2 subkutanen Insulininjektionen pro Tag erhalten hat, die HbA1c Werte lagen hier bei 10.8%. Die Kontrollgruppe in der Münchener Studie hingegen erhielt eine intensivierete Insulintherapie mit 4 Injektionen pro Tag. Die HbA1c Werte der Kontrollgruppe lagen in der Münchener Studie bei 6.4%. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Studien könnte auch das Alter der Probanden sein. Die Münchener Studie schloss Erwachsene Typ 1 Diabetiker mit ein, der Altersdurchschnitt lag hier deutlich über der von Shah et al.

In der prädiabetischen Phase wurden beim Menschen bisher 2 prospektive Immuninterventionsstudien mit Insulin durchgeführt. So behandelten Keller et al. 1993 erstmals Verwandte ersten Grades von Typ 1 Diabetikern, die aufgrund einer verminderten Insulinsekretion in der frühen Phase nach IVGTT (FPI=first phase insulin) und erhöhten ICA und IAA als Hochrisikopatienten eingestuft wurden, durch kombinierte intravenöse und subkutane Insulingaben [110]. Es zeigte sich nach ca. 3 Jahren eine verringerte Diabetesinzidenz in der behandelten gegenüber der nicht behandelten Gruppe. Eine ähnliche prospektive Studie mit Hochrisikopatienten wurde ab 1990 am Schwabinger Diabetes Forschungsinstitut durchgeführt: in der SIP (Schwabinger Insulin Prophylaxis Pilot Trial) Studie wurden 14 Hochrisikopatienten (ICA $\geq$ 20 JDF-U, vermindertes FPI) in eine Versuchs- und eine Kontrollgruppe randomisiert. Die Versuchsgruppe erhielt kontinuierliche intravenöse Insulininfusionen über 7 Tage, danach wurden sie über 6 Monate mit täglichen subkutanen Insulininjektionen behandelt. Die 7-tägigen Insulininfusionen wurden alle 12 Monate wiederholt (siehe 2.1.6). Nach 7 Jahren war in der Kontrollgruppe eine höhere Diabetesinzidenz als in der behandelten Gruppe zu beobachten. Die klinische Manifestation war in der mit kombinierter i.v. und s.c. Insulintherapie behandelten Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe verzögert [68].

Diese beiden Studien dienten als Wegbereiter für das DTP-1 Trial (The Diabetes Prevention Trial-Type 1 Diabetes). In dieser amerikanisch-kanadischen Studie wurden ab 1994 fast 90000 Verwandte ersten und zweiten Grades von Typ 1 Diabetikern auf ICA untersucht. Ungefähr 3,5% der untersuchten Personen waren ICA positiv. Sie wurden anhand von genetischen, immunologischen und metabolischen Parametern in Gruppen mit unterschiedlichem Diabetesrisiko unterteilt. In der Hochrisikogruppe lag die Wahrscheinlichkeit, in den nächsten 5 Jahren einen manifesten Typ 1 Diabetes zu entwickeln bei  $\geq 50\%$ . In der Gruppe mit mittlerem Risiko zwischen 25 und 50%, in der Gruppe mit niedrigem Risiko  $<25\%$ . Die Hochrisikogruppe bestand aus 339 Probanden zwischen 4 und 45 Jahren, die in eine experimentelle und eine Kontrollgruppe randomisiert wurden. Die experimentelle Gruppe erhielt zweimal täglich subkutane low-dose Insulininjektionen. Zusätzlich erfolgten einmal im Jahr 4-tägige kontinuierliche intravenöse low-dose Insulininfusionen. Das Ergebnis dieses „Insulin Injection Trials“, welches die Personen der Hochrisikogruppe beinhaltet, wurden nach -jähriger Beobachtung im Sommer 2001 veröffentlicht. Es bestand kein Unterschied in der Diabetesinzidenz zwischen der behandelten und der Kontrollgruppe. Die Injektionen von low-dose Insulin in dieser Studie konnten die Diabetesmanifestation weder verzögern noch verhindern [147]. In der Gruppe mit mittlerem Diabetesrisiko werden weiterhin Probanden rekrutiert. Sie werden ebenfalls in 2 Gruppen randomisiert, wovon die eine Gruppe täglich orales Insulin, die andere ein Placebo erhält.

## **2.7 Unterschiedliche Testverfahren zum Ermitteln von Insulinantikörpern**

Insulin(auto)antikörper (I(A)A) wurden in früheren Arbeiten mit Hilfe unterschiedlicher Testmethoden aus dem Serum ermittelt: 1989 entwickelten Kurtz et al einen Radioimmunoassay (RIA) zum Messen von IAA und IA [118,113]. Dieser Test benötigt relativ viel Serum, um die Antikörper in ausreichend hoher Sensitivität erfassen zu können. Er wurde im Laufe der Zeit

von verschiedenen Beschreibern modifiziert. 1997 entwickelten William et al einen neuen Mikro-RIA zum Ermitteln der IAA und IA, der nur noch 5 µl Serum benötigt und den ursprünglichen Tests vergleichbare Sensitivität und Spezifität aufweist [226].

Eine billige und leicht durchzuführende Testmethode stellt der ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) dar. Er wurde 1985 erstmals von Wilkin et al beschrieben [224] und seitdem in vielen Studien zur Bestimmung von Insulin(auto)antikörpern verwendet. Aufgrund der Ergebnisse von Internationalen Workshops zum Vergleich der beiden Testmethoden ist die Bestimmung der I(A)A mittels ELISA jedoch inzwischen obsolet. Sowohl beim Menschen, als auch im Tiermodell der NOD-Maus weist der Radioimmunoassay eine höhere Sensitivität und Spezifität beim Ermitteln der I(A)A auf [80,126,28].

### **3 KOLLEKTIVE UND METHODEN**

#### **3.1 Probanden-Kollektive**

##### **3.1.1 BABYDIAB. Beobachtung antikörperpositiver Kinder von Geburt an**

Um den natürlichen Verlauf der humoralen Immunantwort in der prädiabetischen Phase zu evaluieren, wurde am Institut für Diabetesforschung in München Schwabing die BABYDIAB Studie die weltweit erste prospektive Studie dieser Art, eingerichtet. Die 1989 begonnene Studie schloss Kinder ein, von denen mindestens ein Elternteil an Typ 1-, oder an Gestationsdiabetes erkrankt war. Den Kindern wurde erstmalig bei Geburt aus der Nabelschnur Blut abgenommen, weitere Blutentnahmen erfolgten im Alter von 9 Monaten, 2, 5 und 8 Jahren. Von 1989 bis zur Auswertung der vorliegenden Studie 1999 waren 2079 Neugeborene in BABYDIAB rekrutiert (1598 Kinder von Elternteilen mit Typ 1 Diabetes und 481 Kinder von Müttern mit Gestationsdiabetes). Bei 1391 Probanden wurden follow-up Untersuchungen im Alter von 9 Monaten, bei 1019 im Alter von 2 Jahren und 298 im Alter von 5 Jahren vorgenommen. Die Blutproben der Kinder wurden auf Inselzellantikörper (ICA), Insulinautoantikörper (IAA), GAD Antikörper (GADA) und Antikörper gegen IA-2 (IA2-A) untersucht. Von allen 1391 Kindern, die in die Studie rekrutiert wurden und von denen mindestens eine Nachuntersuchung im Alter von 9 Monaten vorlag, entwickelten 26 Kinder nach Geburt im Laufe des follow up persistierende Autoantikörper gegen mehr als ein Antigen. Diesen 26 Kindern wurden weiterhin jährlich Blutproben entnommen, und der Antikörperverlauf bis hin zur Manifestation des Diabetes oder bis zum heutigen Zeitpunkt verfolgt. Im Rahmen dieser Arbeit testeten wir diese 26 Kinder auf Autoantikörper- und Autoantikörper-Subklassen und deren Verlauf hin zur Diabetesmanifestation. Tabelle 3 des Ergebnisteils zeigt Autoantikörper-Subklassen und –Isotypen der 26 Kinder und das Alter des ersten Auftretens von Autoantikörpern (Median für das Auftreten der ersten Antikörper lag bei einem Alter von 1,4 Jahren, Spanne: 0,5 - 5,4 Jahre). So war

Kind 11 beim ersten Auftreten von Autoantikörpern 2,1 Jahre alt. Bei diesem Kind 11 waren im Laufe des follow up IAA, GADA und IA-2A nachweisbar (alle Kinder waren auch ICA-positiv), das Kind entwickelte mit 7,1 Jahren einen manifesten Typ-1- Diabetes (IDDM).

11 der 26 Kinder, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, entwickelten bis zum heutigen Zeitpunkt einen manifesten Diabetes (medianes Alter 4,5 Jahre, Spanne:1,3 - 8,5 Jahre), die anderen Kinder werden weiterhin mit jährlichen Blutentnahmen nachverfolgt. Bei allen autoantikörperpositiven Kindern über 3 Jahren wurde jährlich ein oraler Glukosetoleranztest (OGTT) durchgeführt. Die Diagnose der Diabetesmanifestation wurde nach WHO Kriterien gestellt.

### **3.1.2 Patienten mit neumanifestem Typ 1 Diabetes**

#### **3.1.2.1 Patienten mit neumanifestem Typ 1 Diabetes unter verschiedenen Regimen einer Insulinbehandlung**

Wir untersuchten hier Seren von 29 Autoantikörper-positiven Patienten mit neumanifestem Typ-1-Diabetes prospektiv über einen Zeitraum von 18 Monaten nach Diabetesmanifestation auf Insulin-, GAD- und IA2-Antikörper-Subklassen. Die 29 Patienten wurden im Rahmen einer Immuninterventionsstudie stationär mit Insulin behandelt, 17 Erwachsene in der III. Med. Abteilung des Krankenhaus München Schwabing und 12 Kinder an der Kinder-Universitätsklinik im Ospedale San Raffaele in Mailand, Italien.

Die 17 erwachsenen neu-manifesten Typ-1-Diabetiker wurden in zwei Gruppen randomisiert. Die experimentelle Gruppe (n=8, medianes Alter: 29, Spanne 19 - 36 Jahre, HbA1c  $10,5 \pm 2,0\%$ ) erhielt über 2 Wochen eine hochdosierte intravenöse Insulininfusion ( $1,2 \pm 0,4$  U/kg/d), die Kontrollgruppe (n=9, medianes

Alter: 31, Spanne: 24 – 37 Jahre, HbA1c  $12,3 \pm 3,0\%$ ) wurde in der gleichen Zeit mit subkutanen Insulingaben ( $0,4 \pm 0,1$  U/kg/d) im Rahmen einer intensivierten Insulintherapie (4x/Tag) behandelt. Die experimentelle Gruppe erhielt dadurch 3x soviel Insulin, wie die Kontrollgruppe. Ab der dritten Woche wurden auch die Patienten der experimentellen Gruppe mit einer intensivierten Insulintherapie (4 s.c. Injektionen pro Tag) eingestellt und in dreimonatigen Abständen über den Zeitraum eines Jahres beobachtet [178].

Die 12 Kinder mit neu-manifestiertem Typ-1-Diabetes teilen sich ebenfalls in 2 Gruppen mit unterschiedlichen Behandlungsschemata auf. Die experimentelle Gruppe (n=6, Altersmedian=7 Jahre, Spanne: 2-12 Jahre) sind Kinder, die im Ospedale San Raffaele in Mailand stationär eine hochdosierte kombinierte i.v. und s.c. Insulintherapie erhielten. Nach einer einwöchigen intravenösen Insulininfusion wurden sie auf eine intensivierte s.c. Insulintherapie umgestellt und in 3-monatigen Abständen über ein Jahr beobachtet. Die zweite Gruppe (n=6, Altersmedian=11 Jahre, Spanne 3-17 Jahre) wurde ausschliesslich mit subkutanen Insulingaben nach Diabetesmanifestation behandelt. 5 Kinder davon waren im Rahmen der BABYDIAB-Studie von Geburt an beobachtet worden.

Wir bestimmten die Höhe der Insulinantikörper (IA) und Insulinantikörper Subklassen bei Manifestation (Insulinautoantikörper (IAA)) und zum Zeitpunkt von 3, 6 und 12 Monaten nach Beginn der Insulintherapie. Die Antikörper gegen GAD und IA2, sowie deren Subklassen wurden bei 14 bzw. 10 antikörperpositiven Patienten bei Diabetesmanifestation, nach einem und 2-3 Jahren nach Behandlungsbeginn bestimmt.

### **3.1.2.2 Immunintervention mit Cyclosporin A**

In einer 1988 publizierten doppelt-verblindeten randomisierten Studie der Canadian-European randomized control trial group wurde bei 188 Patienten mit

neu-manifestiertem Typ 1 Diabetes der Effekt einer Immunintervention mit Cyclosporin A (CyA) auf die Erhaltung der  $\beta$ -Zell Funktion untersucht [50]. Einschlusskriterium für die Studie war eine nicht länger als 6 Wochen durchgeführte Insulintherapie. Die Insulindosen der Patienten wurden so gewählt, dass die präprandiale Blutglukosewerte nicht über 140 mg/dl lagen. Die Probanden erhielten täglich orales CyA in einer Dosis von ca. 10 mg/kg Körpergewicht, die Dosis war auf 2 Gaben im Abstand von 12 Stunden verteilt. Die Behandlung wurde über 12 Monate fortgeführt, wobei die genauen CyA Dosen an einen aufrecht zu erhaltenden Blut CyA Spiegel von 400-800 ng/ml angepasst wurden. Auch die III. Med. Abteilung des Krankenhaus München Schwabing nahm an der kanadisch - europäischen Studie teil. 10 Patienten konnten im Krankenhaus München Schwabing in die Studie mit eingeschlossen werden. 5 der Patienten (Altersmedian:18 Jahre, Spanne: 17-28 Jahre) wurden in die experimentelle Gruppe randomisiert, die anderen 5 bildeten die Kontrollgruppe, sie wurde mit den entsprechenden s.c. Insulindosen zusammen mit einem Placebo behandelt. Wir bestimmten Insulinantikörper (IA) und IA-Subklassen bei Diabetesmanifestation und zu verschiedenen Zeitpunkten bis zu 34 Monaten nach Therapiebeginn (medianes Zeitintervall: 23,4 Monate, Spanne: 17-34 Monate).

### **3.1.3 Prädiabetische Verwandte 1. Grades von Typ 1 Diabetikern: Die Schwabinger Insulin Prophylaxe (SIP) Pilot-Studie**

Um den Erfolg einer intravenösen Insulintherapie in der prädiabetischen Phase von Typ 1 Diabetikern zu untersuchen, wurden von Januar 1989 bis Oktober 1995 am Krankenhaus München Schwabing 1736 Verwandte von Typ 1 Diabetikern auf ICA untersucht. Einschlusskriterien für die Studie waren positive ICA (>20 JDF-U, juvenile diabetes foundation units), eine reduzierte Insulinsekretion in der frühen Phase des IVGTT (first phase insulin = FPI; unterhalb der 5. Perzentile der Kontrollpatienten, <65  $\mu$ U/ml), ein Alter über 4

Jahren und ein normaler oraler Glukosetoleranztest (OGTT). Von 64 ICA positiven Probanden wiesen 17 einen vermindertes FPI auf und waren älter als 4 Jahre. 14 Probanden, bzw. bei Minderjährigen deren Erziehungsberechtigte, stimmten zu, in die Studie aufgenommen zu werden und erfüllten gleichzeitig die Einschlusskriterien. Sie wurden in eine experimentelle und eine Kontrollgruppe randomisiert. Die experimentelle Gruppe (n=7), erhielt kontinuierliche i.v. Insulininfusion über 7 Tage, gefolgt von täglichen s.c. Insulin Injektionen über 6 Monate. Alle 12 Monate wurden die einwöchigen intravenösen Insulininfusionen wiederholt. Die i.v. Behandlung wurden maximal bis zu 5 Jahren nach Therapiebeginn wiederholt (0,6 – 5 Jahre). Die Nachbeobachtung dieser Patienten erfolgte bis zu 8,6 Jahre nach Eintritt in die Studie. Die 7 Patienten der Kontrollgruppe erhielten keine Therapie. Bei ihnen wurde zum gleichen Zeitpunkt, wie in der Kontrollgruppe Blutproben entnommen, sowie in regelmässigen Abständen ein IVGTT durchgeführt.

Fünf der mit Insulin behandelten Probanden aus der experimentellen Gruppe entwickelten im Verlauf der Beobachtung Insulinantikörper und wurden in die hier vorliegende Studie eingeschlossen (Alter = 4, 4, 6, 13 und 17 Jahre). In der Kontrollgruppe entwickelten 6 Probanden Antikörper gegen Insulin (Alter = 4, 8, 13, 13, 24 und 55 Jahre). Bei diesen insgesamt 11 IA- oder IAA-positiven Probanden bestimmten wir Antikörper und IgG-Subklassen gegen Insulin vor der Insulingabe und in regelmässigen Abständen bis hin zu 36 Monaten nach Therapiebeginn. Bei allen 5 IA-positiven Patienten der experimentellen Gruppe konnten auch GADA nachgewiesen werden. 4 dieser 5 Probanden waren zudem auch IA-2-positiv. Wir bestimmten GADA bzw. IA-2A sowie deren Subklassen bei diesen Patienten bei Diabetesmanifestation, während des ersten Jahres, sowie 3 Jahre nach Beginn der Insulinprophylaxe.

### 3.2 Tiermodelle

Die non-obese diabetic mouse (NOD-Maus) stellt in vielerlei Hinsicht ein ideales Tiermodell des menschlichen Typ-1-Diabetes mellitus dar, da sie viele Merkmale der Pathogenese des humanen Typ 1 Diabetes aufweist. Die Autoimmunreaktion in der prädiabetischen Phase ähnelt dem menschlichen Prädiabetes. Die NOD-Maus entwickelt eine spontane Autoimmunreaktion gegen pankreatische  $\beta$ -Zellen [128,102,133]. Es kommt zu einer entzündlichen Infiltration der endokrinen Inseln. Schon im Alter von 4-6 Wochen kann bei der NOD Maus ein periduktales und perivaskuläres T-Zell Infiltrat nachgewiesen werden (Periinsulitis). Im Alter von 6-8 Wochen werden die Pankreasinseln infiltriert (Insulitis) und es folgt eine selektive Zerstörung der  $\beta$ -Zellen. Wie auch beim Menschen können während der prädiabetischen Phase Autoantikörper gegen Insulin, nicht jedoch gegen die  $\beta$ -Zell-Antigene GAD und IA-2 im Serum der NOD-Maus nachgewiesen werden [240]. Im Alter von 7 Monaten weisen mindestens 70% der weiblichen NOD-Mäuse einen manifesten Diabetes auf. Die Inzidenz bei den männlichen Tieren liegt bei ca. 40% [220]. Obwohl alle NOD Mäuse eine Insulitis zeigen, entwickeln also nicht alle Tiere einen manifesten Diabetes. Die NOD Maus ist ein gutes Modell, um mögliche Therapien des Typ 1 Diabetes beim Menschen zu erforschen. Sowohl in der prädiabetischen Phase, als auch nach Diabetesmanifestation konnte die Diabetesinzidenz bei der NOD-Maus durch Immunintervention gesenkt werden (siehe Einleitung).

Die genetische Form unserer Zucht am Institut für Diabetesforschung in München entspricht NOD X C57BL/10. Von dieser Form entwickeln 70% der weiblichen Tiere innerhalb der ersten 150 Tage einen manifesten Typ 1 Diabetes, bei den männlichen Tieren liegt die Inzidenz nur bei ca. 30%.

### **3.2.1 Unbehandelte NOD Mäuse**

29 unbehandelten NOD Mäusen aus unserer Zucht (Gruppe 1a) wurde jeweils eine Blutprobe entnommen. Die Blutentnahme erfolgt unabhängig von Alter und Geschlecht der Maus, sowie unabhängig von der Diabetesmanifestation. Die Gruppe 1a sollte als Kontrollkollektiv dienen, um die Prävalenz und die Titer der Insulinautoantikörper (IAA) und IAA-Subklassen in unbehandelten NOD-Mäusen zu bestimmen. Das Alter der Mäuse lag zwischen 2,5 und 38,5 Wochen (siehe Tabelle 3).

In einer weiteren Gruppe von 17 unbehandelten NOD-Mäusen (Gruppe 1b) wurden jeder Maus mehrere Blutproben entnommen, um den Verlauf der Insulinautoantikörper und IAA-Subklassen in der prädiabetischen Phase der NOD-Maus bestimmen zu können (siehe Tabelle 3).

### **3.2.2 Immunintervention mit Insulinvaccinierung im Tiermodell der NOD-Maus**

#### **3.2.2.1 Dosierung des Impfstoffes**

Um die eine tolerable Dosis von subkutanen DT-Injektionen für junge NOD-Mäuse zu ermitteln, wurden 6 NOD-Mäuse im Alter von 5 Tagen mit DT (Diphtherie-Tetanus-Adsorbat-Impfstoff für Kinder, Chiron-Behring, Marburg) in unterschiedlichen Konzentrationen geimpft. Zwei (n=2) Mäuse erhielten 0,05 ml DT 1/80 in 0,9%NaCl, n=2 0,05 ml DT 1/40 in NaCl und n=2 erhielten 0,05 ml DT 1/20 in NaCl. Die zwei Mäuse mit der höchstkonzentrierten Dosis überlebten die Impfung nicht.

Neugeborene NOD-Mäuse wurden daraufhin mit DT 1/20 geimpft, die älteren (> 2 Wochen) mit DT 1/45.

Die Konzentrationen des IFA legten wir entsprechend früherer Studien bei 50 % IFA in sterilem Wasser fest. Jeder Maus wurden pro Impfung 60 µl Gesamtvolumen injiziert.

In der Konzentration des Insulin richteten wir uns nach der 1990 von Atkinson et al. veröffentlichten Studie, in der die maximal tolerable Insulindosis bei NOD-Mäusen verschiedenen Alters ermittelt worden war. Sie lag bei NOD-Mäusen im Alter von 4 – 5 Wochen bei 0,25 IE Insulin pro Tag [7]. Die Gruppe der neugeborenen NOD-Mäuse (Gruppe 5) erhielten subkutane Injektionen mit 0,1 IE Insulin. In einer Studie von Muir et al. wurden 4 Wochen alte NOD-Mäuse allerdings mit höheren Insulindosen zusammen mit IFA behandelt. Angelehnt an diese Studie impften wir eine weitere Gruppe von NOD-Mäusen (Gruppe 4) mit 4 IE Insulin.

### **3.2.2.2 Insulin und Immunstimulans**

Neugeborene NOD Mäuse aus unserer Zucht wurden in verschiedene Versuchsgruppen eingeteilt, die in unterschiedlichem Alter mit unterschiedlichen Insulinkonzentrationen und in Kombination mit 2 verschiedenen Immunadjuvantien geimpft (siehe Tabelle 1). Die Impfung erfolgte subkutan, bei älteren Mäusen (>2 Wochen) inguinal, bei jüngeren Mäusen über dem Sternum.

Die Mäuse der Gruppe 2 wurden nur mit Immunadjuvans behandelt. 10 Mäuse erhielten DT, 11 Mäuse IFA jeweils im Alter von 4, 8, 12 und 24 Wochen. Wie in Tabelle 1 aufgeführt, wurde den Mäusen dieser Gruppe Blut im Alter von 10, 14 und 30 Wochen entnommen.

Gruppen 3 und 4 wurden mit Insulin und Adjuvans ab dem Alter von 4 Wochen behandelt. Dabei unterschieden sich die beiden Gruppen in der Gesamtdosis des erhaltenen Insulins. Die Gruppe 3 bestand aus Mäusen, die mit 4 und 8

Wochen mit 0,25 IE Insulin (Humaninsulin U40 von Lilly) und Adjuvans geimpft wurden. Gruppe 4 erhielt 4 IE Insulin s.c. im Alter von 4, 8, 12 und 24 Wochen zusammen mit den o.g. Immunadjuvantien. Den Mäusen der Gruppe 3 wurden im Alter von 6, 8, 10, 12 und 14 Wochen, den Mäusen der Gruppe 4 im Alter von 10, 14 und 30 Wochen Blutproben entnommen (siehe Tabelle 1).

Gruppe 5 bestand aus neugeborenen NOD-Mäusen. Sie erhielten im Alter von 5 Tagen ihre erste Impfung mit der maximal verträglichen Insulindosis (0,1 IE Humaninsulin U40 von Lilly). Mit 14 Tagen wurde ihnen dann eine Boosterimpfung mit der selben Insulindosis injiziert. Diesen Mäusen wurde im Alter von 4, 6, 8, 12 und 16 Wochen Blut entnommen (Tabelle 1).

*Tabelle 1: Gruppen der NOD-Mäuse, die im Rahmen dieser Arbeit auf I(A)A und I(A)A-Subklassen untersucht wurden. \*bedeutet das Alter in Wochen, in denen die Mäuse subkutane Insulin-Injektionen erhielten. Ø erhielten kein Insulin/Adjuvans.*

<b>Gruppe</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Impfalter *</b>	<b>Insulin</b>	<b>Adjuvans</b>	<b>BE (Wochen)</b>
1a	n=30	Ø	Ø	Ø	2,5 – 38,5
1b	n=17	Ø	Ø	Ø	mind. 3 Blutentnahmen im Alter von 5 - 38 Wo.
2a	n=10	4, 8, 12, 24	Ø	DT 1/45 in NaCl	10, 14, 30
2b	n=11	4, 8, 12, 24	Ø	50%iges IFA in H2O	10, 14, 30
3a	n=15	4, 8	0,25IE	DT 1/45 in NaCl	6,8,10,12,14
3b	n=13	4, 8	0,25IE	50%iges IFA in H2O	6,8,10,12,14
4a	n=10	4,8,12,24	4 IE	DT 1/45 in NaCl	10,14,30
4b	n=11	4,8,12,24	4 IE	50%iges IFA in H2O	10,14,30
5a	n=11	0.7, 2	0,1 IE	DT 1/20 in NaCl	4, 6, 8, 12, 16
5b	n=7	0.7, 2	0,1 IE	50%iges IFA in H2O	4, 6, 8, 12, 16

### **3.2.3 Blutentnahme**

Wie in Tabelle 1 aufgeführt, wurde den Gruppen je nach Impftermin zu unterschiedlichen Zeitpunkten Blut entnommen. Hierzu wurden die Mäuse in Äther betäubt, indem sie für ca. 5 – 10 Sekunden in ein geschlossenes Gefäß gesetzt wurden, in dem sich gleichzeitig ein mit Äther getränkter Wattebausch befand. Den betäubten Mäusen wurden daraufhin mit Hilfe einer Pasteurpipette ca. 200 µl Blut retrobulbär entnommen.

## **3.3 Methoden**

### **3.3.1 Analyse der humoralen Immunantwort gegen Insulin**

#### **3.3.1.1 Mikro-Radioimmunoassay zum Nachweis von Insulinantikörpern**

Wir verwendeten den von William et al 1997 beschriebenen Radioimmunoassay, bei dem Insulinantikörper durch Präzipitation der Antigen-Antikörper-Komplexe durch Protein A-Sepharose nachgewiesen werden [226]. 5µl Serum wurden zusammen mit 15.000 cpm A14-125J-markiertem humanem Insulin (>2000 Ci/mmol)(Amersham International plc, Little Chalfont, Bucks, UK) in 25 µl TBT Puffer (50mM Tris, 1% Tween 20, pH 8,0) in doppeltem Ansatz in deep-well Microtiter Platten (Beckman Instruments (UK) Ltd, High Wycombe, Bucks, UK) gegeben. Zu einem weiteren dem ersten entsprechenden Ansatz wurden 8 units/ml nicht-radioaktives Insulin (Huminulin, Lilly, Basingstoke, Hants, UK) hinzugefügt. Die Platten wurden bei 500xg kurz zentrifugiert, danach geschüttelt, um den Inhalt zu vermischen, und für 72h bei 4°C inkubiert. Die Präzipitation erfolgte durch die Zugabe von 10 µl Protein A-Sepharose, die vorher in TBT aufgequollen war (entsprach 2,5 mg trockener Sepharose)(Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden). Nach der Inkubation von 90 min bei 4°C auf einem Orbital-Schüttler wurden die Proben 5x mit 600 µl eiskaltem TBT-Puffer

gewaschen. Zwischen den Waschgängen wurden die Platten jeweils 3 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand über den Immunkomplexen abgesaugt. Nach dem letzten Waschgang wurden zu jeder Probe 100 µl TBT hinzugegeben und der Inhalt der wells in 1,2 ml Rundröhrchen übertragen. Die Radioaktivität der Präzipitate wurde in einem Gamma-Zähler (NE1600, Nuclear Enterprises Ltd, Reading, Berks, UK) für 10 min gemessen. Die cpm, die in dem Ansatz mit nicht-radioaktivem Insulin gemessen wurden, wurden vom anderen Ansatz, zu dem ausschließlich radioaktiv-markiertes Insulin hinzu gegeben worden war, abgezogen, um die cpm des spezifisch präzipitierten Insulins zu ermitteln. Die Menge des präzipitierten Insulins wurde im Bezug auf die aktuelle Strahlung des radioaktiven Insulins (cpm/Unit) errechnet und in Nanounits gebundenes Insulin pro Milliliter Serum (nU/ml) angegeben.

### **3.3.1.2 Protein A/G - Sepharose RIA zur Bestimmung der IAA beim Menschen**

Für die Bestimmung der Insulinantikörper beim Menschen wurde der von Williams beschriebene Test in etwas abgewandelter Form angewandt. Bei der Immunpräzipitation wurde neben Protein A- auch Protein G- Sepharose verwendet. Die Inkubation erfolgte mit 20.000 cpm A14-125J-markiertem Insulin in einem Gesamtvolumen von 60 µl. Durch Zugabe von in 50 µl TBT gequollener 10%iger Protein A - Sepharose und 5%iger Protein G - Sepharose wurden bei einstündiger Inkubation auf dem Orbital-Schüttler die Immunkomplexe bei 4°C präzipitiert. Nach 4 Waschschrinen mit je 1,5 ml eiskaltem TBT, die in Rundröhrchen erfolgen, wurde die Radioaktivität in einem Gamma-Zähler (COBRA II Auto-Gamma Counting System, Packard Instrument Company, Meriden USA) gemessen. Für jede Probe wird die Radioaktivität des spezifisch präzipitierten Insulin ( $\Delta$ cpm) wie beim ursprünglichen Mikro-Assay durch Abzug der unspezifischen Werte aus dem Ansatz mit nicht-radioaktivem Insulin ermittelt und in Units ausgedrückt. Allen Proben, bei denen sich ein negatives  $\Delta$ cpm ergibt, wurde der Wert 0,0 units zugeordnet. Die Ergebnisse der anderen Proben

wurden anhand einer geometrischen Standardkurve (1:2) aus neun Verdünnungen eines Positivserums in Negativserum in units umgerechnet. Dem unverdünnten Positivserum wurden 200 units willkürlich zugeordnet. Die Untergrenze für die Positivität der IAA wurde anhand der Normalverteilung der Werte eines gesunden Kontroll-Kollektivs errechnet. Werte oberhalb der 99. Perzentile wurden als positiv definiert. Die Grenze für Positivität liegt bei 4,4 units (99. Perzentile).

### **3.3.1.3 Radioimmunoassay zur Bestimmung der Insulinantikörper bei Mäusen**

Zur Bestimmung der Insulinantikörper bei Mäusen wurde die Testmethodik des Mikro-Assays nochmals modifiziert. 2,5 µl Serum wurden im doppelten Ansatz zusammen mit 20.000 A14-125J-markiertem humanen Insulin in 25 µl TBT-Puffer 72 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Immunpräzipitation erfolgte analog dem humanen IA-Assay durch Zugabe von in 50 µl TBT gequollener Protein A- und 5%iger Protein-G-Sepharose. Nach einstündiger Inkubation auf dem Orbital-Schüttler wurden auch hier die präzipitierten Immunkomplexe 4x gewaschen, und die Radioaktivität in einem Gamma-Zähler ermittelt. Die gemessenen cpm gaben wir als  $\Delta\text{cpm}$  durch Abzug des gemessenen Negativserums einer nicht-NOD Maus an. Aus einer in jedem Ansatz parallel gemessene Standardkurve eines humanen Positivserums wurde eine Umrechnung in units vorgenommen.

Die Grenze der Positivität der units im modifizierten MIAA wurde anhand eines QQ-Diagramms festgelegt. Abbildung 2 zeigt das trendbereinigte QQ-Diagramm der Insulinautoantikörper bei unbehandelten NOD-Mäusen (Kontrollen). Das QQ-Diagramm ist eine Methode, mittels der man ohne Kontrollkollektiv einen positiven Grenzwert aus einem Probandenkollektiv ermitteln kann. Der positive Grenzwert ist durch den Punkt gekennzeichnet, an dem der beobachtete Wert von der Normalverteilung abweicht. Die Grenze für Positivität konnten wir anhand unseres NOD-Maus Kontrollkollektivs bei 150 units festlegen.

Abb.2

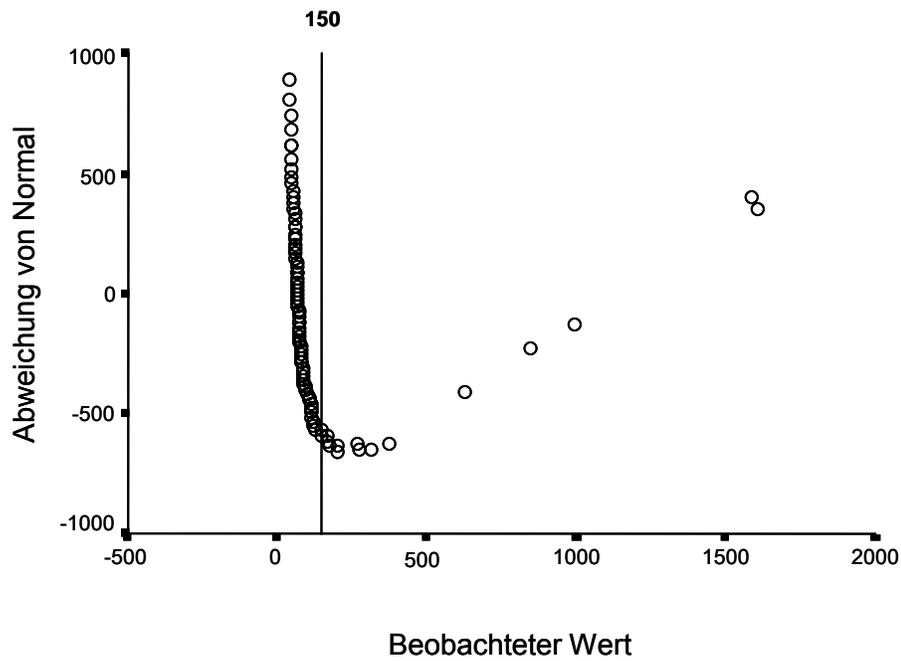


Abb. 2 zeigt das trendbereinigte QQ-Diagramm der im Radioimmunoassay gemessenen murinen Insulinantikörper. Die Grenze der Positivität wird durch den Punkt gekennzeichnet, an dem der beobachtete Wert von der Normalverteilung abweicht. Anhand unseres NOD-Maus Kollektivs konnten wir diese Grenze bei 150 units festlegen, gekennzeichnet durch die schwarze senkrechte Linie.

### **3.3.2 Bestimmung der IAA-Subklassen mittels Mikro-RIA**

Die Bestimmung der Insulin-Antikörper-Subklassen erforderte eine weitere Modifikation des Insulin Antikörper-Assays. Statt der Protein A- und -G-Sepharose wurde Sepharose 4B Streptavidin zum Ausfällen der Immunkomplexe verwendet. Die Sepharose wurde vorher mit monoklonalen Antikörpern beschichtet, die gegen die einzelnen Antikörper Subklassen gerichtet sind.

#### **3.3.2.1 IAA Subklassen beim Menschen**

Zur Charakterisierung der humanen Immunantwort gegen Insulin wurden die Subklassen IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM und IgE in den Blutproben bestimmt, in denen im MIAA Insulinantikörper nachzuweisen waren. Dazu wurden wiederum 5 µl Serum mit 20.000 cpm A14-125J-markiertem Insulin (Höchst, Frankfurt) in 25 µl TBT 72 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Beschichtung der Sepharose-Kugeln erforderte eine Inkubation von 18 Stunden: Sepharose 4B Streptavidin (ZYMED, San Francisco, USA) wurde 2x in eiskaltem PBS-Puffer (50 mM Phosphatpuffer, 150 mM NaCl, pH 7,4) gewaschen, indem ca. 10 ml Puffer hinzu gegeben wurden, die Sepharose wurde für 4 min bei 2400 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Pro Röhrchen mit 10 µl gewaschener Sepharose wurden 10 µl (5 µg) monoklonale Maus-Antikörper gegeben. Folgende biotinylierte Maus-Antikörper wurden verwendet (Pharmingen, San Diego, USA):

Anti-human IgG1 biotin labelled cat no 35052D

Anti-human IgG2 biotin labelled cat no 35072D

Anti-human IgG3 biotin labelled cat no 35082D

Anti-human IgG4 biotin labelled cat no 35092D

Anti-rat IgM biotin labelled cat no 10062D

Mit Hilfe der Anti-Ratten Igm Antikörper ermittelten wir die unspezifisch gemessenen Bindungen.

Nach Inkubation über 18 Stunden bei 4°C unter langsamer Rotation wurde die beschichtete Sepharose dann 2x in PBS und 1x in eiskaltem TBT-Puffer gewaschen, die Röhrchen mit je 1,5 ml eiskaltem Puffer aufgefüllt, mit 2400U/min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die beschichteten Sepharose-Kugeln wurden nach dem letzten Waschgang in TBT resuspendiert und 50 µl zur Präzipitation in die Ansatzröhrchen gegeben. Das Ausfällen der Immunkomplexe erfolgte während einer einstündigen Inkubation auf dem Orbital-Schüttler bei Zimmertemperatur. Die Immunkomplexe wurden 4x wie oben beschrieben in TBT gewaschen und nach dem letzten Absaugen die Radioaktivität in einem Gamma-Zähler (COBRA II) ermittelt. Für jede Probe wurde parallel ein Ansatz mit Anti-Ratten IgM Antikörpern inkubiert, um unspezifischen Bindungen zu erfassen. Die spezifischen Bindungen ( $\Delta$ cpm) jeder Probe ergaben sich durch die Subtraktion der unspezifischen Bindungen von den gemessenen cpm der jeweiligen Probe. Die spezifischen Antikörper Subklassen-Titer wurden entsprechend folgender Formel in mU/ml angegeben:

$(\text{IgG Subklassen spezifisch cpm} - \text{anti-Ratten cpm}) / \text{Radioaktivität des Insulin pro Röhrchen anhand von cpm} \times 1,159 \times 200.$

Dabei entspricht die Zahl 1,159 der Gesamtradioaktivität, die zu jeder Probe hinzugegeben wurde. Die Zahl 200 entspricht dem Verdünnungsfaktor. Alle Blutproben von einer Person wurden gemeinsam in einem Testansatz gemessen. In diesem Testansatz wurden gleichzeitig alle Subklassen bestimmt. Für die Verteilung der Antikörper-Subklassen ergaben sich 2 Populationen: in der einen ergab sich eine Normalverteilung der Subklassen um 0 (Spanne von -250 bis +250 nU/ml), in der zweiten lagen die Werte über +250 nU/ml. Aus diesem Grund wurde die Grenze der Positivität bei 250 nU/ml gesetzt.

### 3.3.2.2 IAA Subklassen bei der Maus

Die Bestimmung der murinen Insulinantikörper Subklassen erfolgte analog der Bestimmung der menschlichen Insulin-Antikörper Subklassen. Unabhängig von Alter, Geschlecht oder Diabetesmanifestation ermittelten wir IgG1, IgG2a/c und IgG2b- Insulinantikörper-Subklassen bei NOD-Mäusen in Blutproben mit positiven I(A)A im modifizierten MIAA. Statt 5 µl Serum wurden hier 2,5 µl Serum mit radioaktiv markiertem Insulin inkubiert. 5 µl Sepharose 4B Streptavidin wurden dann mit 5 µl monoklonalen Anti-Rattenantikörpern beschichtet. Folgende biotinylierte Antikörper wurden verwendet (Pharmingen, San Diego, USA):

Anti-mouse IgG1 biotin labelled cat no 02232D

Anti-mouse IgG2a/c biotin labelled cat no 02012D

Anti-mouse IgG2b biotin labelled cat no 02032D

Anti-mouse IgG3 biotin labelled cat no 02062D

Anti-human IgE biotin labelled cat no 34612D

Mit Hilfe der Anti-human IgE Antikörper ermittelten wir die unspezifischen Bindungen.

Die spezifischen Bindungen wurden hier als Prozentsatz von der Gesamtmenge radioaktiven Insulins pro Ansatz (totalcounts) ausgedrückt:

Spezifische Bindung [Prozent] =  $(\text{cpm der spezifischen IgG-Subklasse}) * 100 /$   
Pro Röhrchen hinzugefügte Radioaktivität (total counts).

Die Grenze für Positivität wurde wiederum mit Hilfe eines QQ-Diagramms ermittelt. Die Punkt an dem der beobachtete Wert von der Normalverteilung abwich, lag hier bei 1% gebundenes Insulin, dementsprechend lag die Positivitätsgrenze, gemessen in unserem NOD-Kollektiv bei 1% gebundenes Insulin.

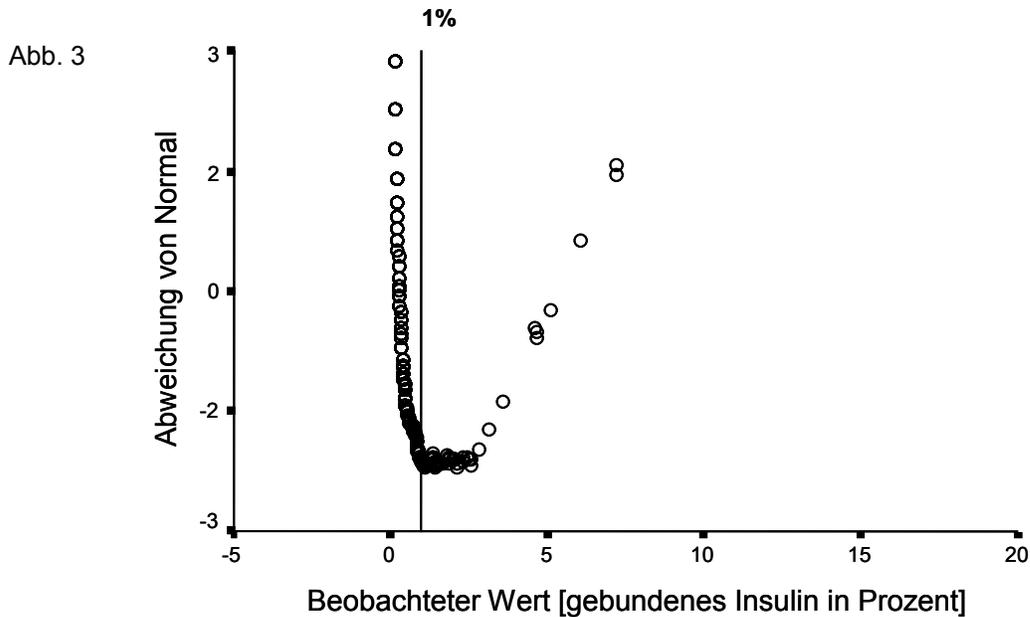


Abb. 3 zeigt das trendbereinigte QQ-Diagramm der im Radioimmunoassay gemessenen murinen Insulinantikörper-Subklassen. Die Grenze der Positivität wird durch den Punkt gekennzeichnet, an dem der beobachtete Wert von der Normalverteilung abweicht. Anhand unseres Mauskollektivs konnten wir diese Grenze bei 1% gebundenem Insulin festlegen, gekennzeichnet durch die schwarze senkrechte Linie

### 3.3.3 Bestimmung der GADA- und IA-2A-Subklassen mit Hilfe eines Radioimmunoassays

#### 3.3.3.1 Herstellung von <sup>35</sup>S-markiertem Antigen

Mit Hilfe des „TNT SP6 Coupled Reticulocyte Lysate Kits“ wurden die cDNA der Antigene (GAD und IA2) in vitro transkribiert und translatiert. Die radioaktive Markierung erfolgte dabei durch den Einbau von <sup>35</sup>S-Methionin. Der Reaktionsansatz wurde mit 2 µl für 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Danach wurde die Probe in 100 µl TBST Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Tween 20, pH 7,4) aufgenommen und das unverbrauchte <sup>35</sup>S-Methionin auf Massengewichtssäulen abgetrennt. Ein Aliquot (2 µl) wurde in 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Optifluor) gelöst und die inkorporierte Radioaktivität in einem Beta-Zähler gemessen. Das markierte Antigen wurde portioniert und bei -20°C gelagert.

### 3.3.3.2 Radioimmunoassay

Der oben beschriebene IA2- und GAD- Antikörper-RIA wurde für die Bestimmung der zugehörigen Subklassen in modifizierter Form angewendet. 2  $\mu$ l Serum, 1:4 in TBST-Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Tween 20, pH 7,4) verdünnt, wurden mit 25.000 cpm <sup>35</sup>S-Methionin-markiertem Antigen (IA-2 oder GAD) in 25  $\mu$ l TBST bei 4°C über Nacht inkubiert. Das zur Präzipitation der Antigen-Antikörper-Komplexe genutzte Sepharose 4B Streptavidin wurde folgendermaßen vorbereitet: 10  $\mu$ l Sepharose pro Röhrchen wurden einmal in eiskaltem PBS -Puffer (50 mM Phosphatpuffer, 150 mM NaCl, pH 7,4) gewaschen, die Sepharose bei 4°C mit 2400U/min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Durch Inkubation für 18 Stunden bei 4°C wurde die gewaschene Sepharose unter langsamer Rotation mit 5  $\mu$ l monoklonalen Antikörpern pro Röhrchen beschichtet. Nach dreimaligem Waschen der beschichteten Sepharose (2xPBS, 1xTBST, siehe IAA-Subklassen), wurden die Sepharose Kugeln in TBST resuspendiert. Das Ausfällen der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte durch Zugabe von 50  $\mu$ l resuspendierter Sepharose bei einstündiger Inkubation auf dem Orbital-Schüttler bei Raumtemperatur. Nach 5-maligem Waschen mit eiskaltem TBST-Puffer, wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe in Filterplatten transferiert, und jede Probe mit 150  $\mu$ l Szintillationsflüssigkeit 40 min bei 4°C in Dunkelheit auf dem Orbital-Schüttler inkubiert. Die Radioaktivität wurde in einem Beta-Zähler ermittelt. Für jede Probe massen wir parallel einen Ansatz mit Maus anti-Ratten IgM Antikörper, um die unspezifischen Bindungen zu ermitteln. Die spezifischen Bindungen ( $\Delta$ cpm) durch Abzug der unspezifischen Bindungen errechnet. Die Grenze der Positivität wurde festgelegt durch Bestimmung des Mittelwertes der  $\Delta$ cpm plus 3 Standardabweichungen von 44 Kontrollpersonen. Für GADA lag diese Grenze bei: IgG1 71, IgG2 47, IgG3 41, IgG455, für IA-2A: IgG1 47, IgG2 33, IgG3 46, IgG4 106.

## **4. ERGEBNISSE**

### **4.1 BABYDIAB. Entwicklung der Autoantikörper-Subklassen gegen Insulin, GAD und IA-2 in der prädiabetischen Phase beim Menschen**

Im Rahmen der BABYDIAB-Studie untersuchten wir 26 Kinder, die im Verlauf der ersten Lebensjahre persistierende Inselautoantikörper gegen mehr als ein Antigen entwickelt haben (siehe unter Probanden 3.1.1, Seite 28) auf Insulinautoantikörper-Subklassen mit Hilfe eines neu entwickelten Radioimmunoassays (siehe unter Methoden 3.3.1.2). Gleichzeitig wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch GAD- und IA-2- Antikörper-Subklassen der Kinder ebenfalls mit Hilfe eines Radioimmunoassays bestimmt.

#### **4.1.1 Starke Inselautoantikörperproduktion in den ersten Lebensjahren**

Die Autoantikörper gegen Insulin, GAD und IA-2 der 26 BABYDIAB-Kinder zeigten keinen linearen Anstieg im Verlauf der ersten Lebensjahre, sondern waren starken Schwankungen unterworfen. Bei jedem der Kinder stiegen die Inselautoantikörper schon bald nach ihrem erstmaligen Nachweis auf einen Spitzenwert („peak titer“) an. In den meisten Fällen fielen sie sofort nach dem Erreichen dieses "peaks" wieder deutlich ab. In Abb. 4A sind beispielhaft die Verläufe der Inselantikörper von 4 Kindern dargestellt. Jede der 4 Spalten zeigt die Antikörper-Verläufe eines Kindes. Kind Nr. 10 ist in Abb. 4 in der ersten Spalte dargestellt. Zum Zeitpunkt der Geburt (0 auf der x-Achse) wies dieses Kind keine messbaren Autoantikörper gegen Insulin, GAD oder IA-2 auf (Abb 4A). Im Alter von ca. 2 Jahren kam es zu einem deutlichen Anstieg der GADA auf einen Spitzenwert, von dem die GADA danach wieder deutlich abfielen. Dagegen waren im Alter von ca. 3 Jahren IAA auf einen Spitzenwert angestiegen, fielen jedoch ebenfalls kurz darauf wieder deutlich ab. Im Alter von ca. 7 Jahren kam es bei diesem Kind (Nr.10) zu einem erneuten starken IAA-

Anstieg. Zeitgleich mit diesem zweiten IAA-Anstieg entwickelte das Kind einen manifesten Typ-1-Diabetes (IDDM). Abb. 4B-D zeigt den Verlauf der Inselantikörper-Subklassen, wobei in jedem Fall die Antikörper-Spitzenwerte hauptsächlich einem Anstieg der IgG1-Antikörper entsprachen. Bei Kind Nr. 10 entsprach der frühe Spitzenwert gegen GAD einem Anstieg der IgG1-GADA (siehe 4C). Auch der Anstieg der IAA war durch den ausschließlichen Anstieg der IgG1-IAA bestimmt (siehe 4B). Diese Ergebnis der IgG1-Dominanz war bei allen Kindern und für alle Antikörper-Spezifitäten zu finden.

Abb. 4

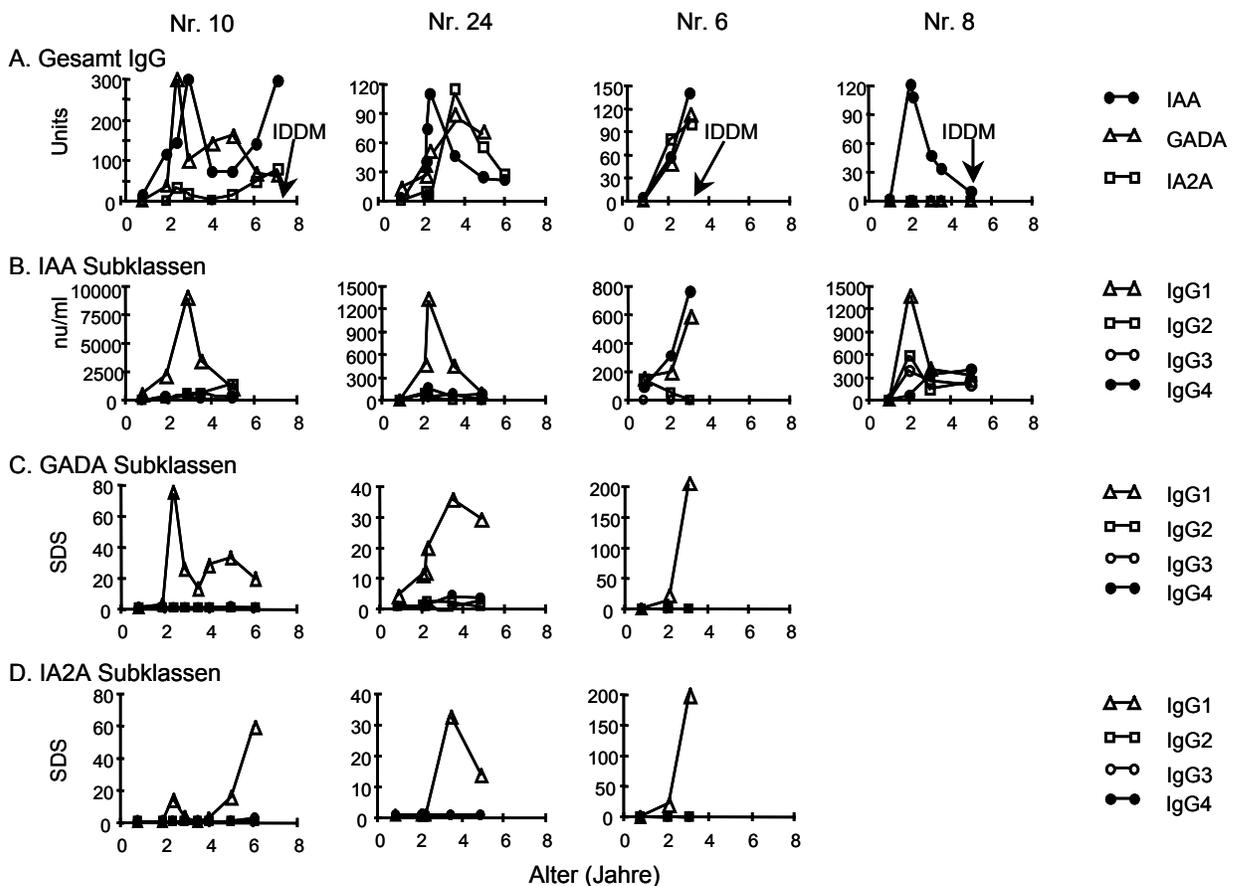


Abb. 4 zeigt beispielhaft den Verlauf von Insel-Antikörpern (A) und Inselantikörper-Subklassen (B-D) bei 4 Kindern der BABYDIAB-Studie. Jede Spalte stellt die Antikörper- und Subklassen eines Kindes dar. Auf der x-Achse ist das Alter der Kinder in Jahren dargestellt. Die y-Achse in A entspricht den Inselantikörpern für GADA (Δ) und IA-2A (□) in units, für IAA (●) in nU/ml. Zeile B entspricht dem Verlauf der IAA-Subklassen in nU/ml, Zeile C und D dem Verlauf der GADA- und IA-2A-Subklassen in Standardabweichungen. IDDM kennzeichnet den Zeitpunkt der Diabetesmanifestation.

Bei jedem Kind und bei allen Inselantikörper-Spezifitäten war ein Antikörperanstieg hauptsächlich durch einen Anstieg der IgG1-Subklasse bestimmt. Abbildung 5 zeigt den Zeitpunkt und die Antikörper-Spezifität von IgG1-Antikörper-Spitzenwerten bei allen 26 Kindern der BABYDIAB-Studie, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Jede Zeile der Abb. 5 entspricht einem der 26 Kinder. Die schwarze Linie entspricht der Zeit, in der bei diesem Kind Autoreaktivität anhand von Inselantikörpern nachgewiesen werden konnte. Die gestrichelte Linie entspricht der Zeit, in der die Kinder nach der letzten Antikörper-Detektion nachbeobachtet wurden. Die Dreiecke kennzeichnen IgG1-Inselantikörper-Spitzenwerte (schwarz für IgG1-IAA, grau für IgG1-GADA und weiß für IgG1-IA-2A). Bei Kind 1 waren also IAA die erste Autoantikörper-Spezifität, die auf einen Spitzenwert ansteieg. Kurze Zeit später stiegen GADA und IA-2A gleichzeitig auf einen Spitzenwert, zum gleichen Zeitpunkt entwickelte das Kind einen manifesten Typ-1-Diabetes (IDDM).

Das Auftreten der Autoantikörper erfolgte meist sequentiell, wobei die Insulinautoantikörper (IAA) häufig als erstes detektiert wurden. Bei 13/26 Kindern ging ein IgG1-IAA-Spitzenwert dem Anstieg von anderen Inselantikörperspezifitäten voraus. Bei zwei Kindern mit sequentiell auftretender IgG1-Autoantikörper-Produktion konnten parallel zum erstmaligen Auftreten von IgG1-IAA weitere Inselantikörper nachgewiesen werden. Bei beiden Kindern fielen die frühen Inselantikörper wieder ab und es kam erst Monate bis Jahre später zu einem erneuten Anstieg von Inselantikörpern. Bei Kind 11 richtete sich der frühe IgG1-Inselantikörper-Anstieg im Alter von 2,1 Jahren gegen Insulin und GAD. Der erneute Autoantikörper-Anstieg erfolgte erst mit 7,5 Jahren und war wieder gegen GAD gerichtet. Im weiteren Verlauf waren bei diesem Kind keine Inselautoantikörper mehr nachweisbar (gestrichelte Linie) und es kam ca. ein Jahr später ohne einen erneuten Anstieg einer Inselantikörper-Spezifität zur Diabetesmanifestation. Bei Kind Nr. 17 wurde der frühe IgG1-IAA-Spitzenwert vom Anstieg der (IgG1-)IA-2A begleitet. Bei diesem Kind erfolgte der zweite Inselantikörperanstieg gegen ein neues Antigen (GAD). Auch diese Antikörper

fielen danach wieder deutlich ab, bis zum heutigen Tag im Alter von 3 Jahren hat das Kind keinen manifesten Typ-1-Diabetes entwickelt.

Das mediane Alter für das Auftreten der ersten IgG1-IAA-Spitzenwerte lag bei 2,2 Jahren (Interquartile Spanne = 2 – 2,9 Jahre). Oft folgte auf den frühen Anstieg der IAA ein Anstieg der anderen Inselantikörper. In Fall 25, 22 und 19 z.B. ließen sich GADA als zweite Inselantikörper nachweisen. Bei Nr. 21 und 18 folgte ein synchrones Auftreten von IA2A und GADA dem ersten IAA Anstieg. Dagegen waren nur 6 in Fällen ( $p < 0,01$ ) GAD-Antikörper-Spitzenwerte und nur in 3 Fällen ( $p < 0,001$ ) IA2-Antikörper-Spitzenwerte vor dem Auftreten der IAA nachweisbar. Bei einem Kind (Nr. 10) z.B. wurden nacheinander IgG1-Antikörper gegen GAD, Insulin und IA2 gemessen. Im einem anderen (Kind Nr.3) folgte den IgG1-GADA ein simultaner Anstieg von IgG1-IAA und -IA2A.

Abb.5

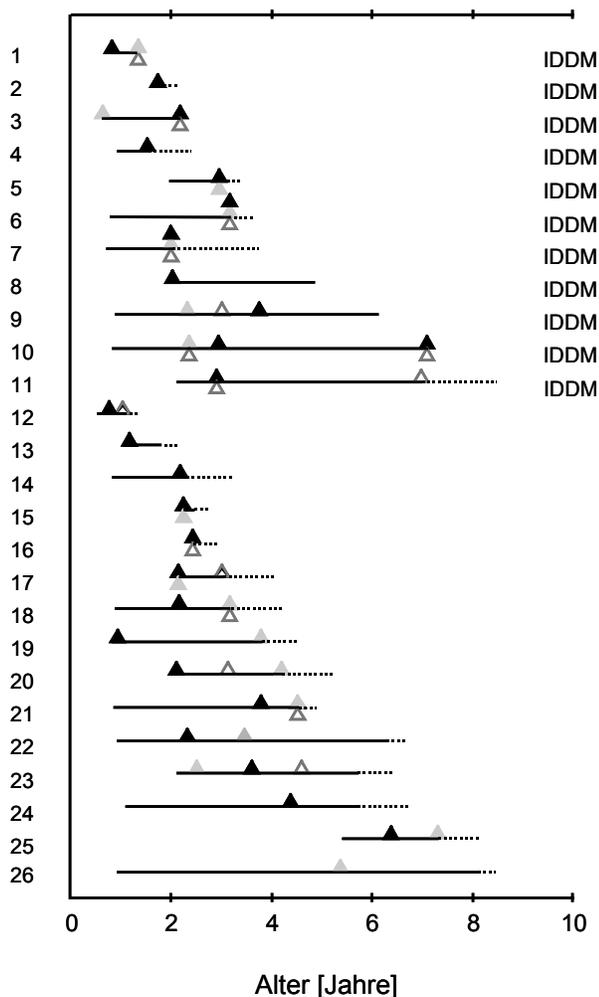


Abb. 5: Schematische Darstellung des Auftretens und der Antikörper-Spezifität von IgG1-Antikörper-Spitzenwerten von 26 BABYDIAB Kindern mit mehreren Autoantikörpern. Bei jedem der Kinder entspricht die schwarze Linie dem Zeitraum, in dem Inselantikörper entdeckt werden konnten. Die gestrichelte Linie entspricht der Zeit, in der die Kinder nach der letzten Antikörpermessung beobachtet wurden. Die Dreiecke stellen den Zeitpunkt (Alter in Jahren) dar, zu dem der jeweilige höchste (peak) IgG1 Antikörper-Spitzenwerte gemessen wurde. IAA=schwarzes Dreieck, GADA=graues Dreieck und IA-2A=weißes Dreieck dar.

Bei zwei Kindern (Nr. 6, Nr. 7) zeigte sich bald nach dem ersten Auftreten von Antikörpern eine starke gleichzeitige Antikörperproduktion gegen alle drei Antigene. Diese 2 Kinder entwickelten parallel zu diesem starken Anstieg aller Inselantikörper einen manifesten Diabetes. Bei Nr. 6 kam es nach dem Anstieg aller Antikörper rasch zur Diabetesmanifestation, bei Nr. 7 erst nach dem ersten "peak". In den meisten Fällen ging der Diabetesmanifestation ein Anstieg von Antikörpern gegen mindestens ein Autoantigen voraus. Nur bei 2 von 11 Kindern (8, 9), die bisher einen manifesten Diabetes entwickelten, war kein Anstieg der Antikörper vor Diabetesmanifestation nachweisbar.

#### **4.1.2 Verteilung der Inselantikörper-Subklassen – IgG1 als dominante Subklasse**

Bei jedem Kind und für jede Inselantikörper-Spezifität war der Antikörper-Anstieg IgG1 dominiert (siehe Abb. 4 B-D). Abb. 4 zeigt den Verlauf der Inselautoantikörper und deren Subklassen IgG1 – IgG4. Es zeigte sich, in Abb. 4 beispielhaft bei 4 Kindern dargestellt, dass bei jeder gemessenen Inselantikörper-Spezifität der Verlauf der IgG1-Antikörper parallel zum Verlauf der Gesamt-IgG verlief. Dabei lag die Höhe der IgG1-Antikörpertiter deutlich über den anderen gemessenen Antikörper-Subklassen-Titern. Die Titer für IgG1-IAA lagen zwischen 184 und 7773 nU/ml, IgG1-GADA zwischen 5 und 67 Standardabweichungen IgG1-IA-2A und zwischen 3 und 124 Standardabweichungen. Sowohl bei Insulin- als auch bei Antikörpern gegen GAD und IA-2 korrelierte die Höhe der Inselantikörpertiter stark mit der Höhe der jeweiligen IgG1-Antikörper-Subklasse. Eine Korrelation mit den anderen gemessenen Antikörper-Subklassen, IgG2, -3, -4, ließ sich nicht erkennen.

Tabelle 2 zeigt Autoantikörper-Subklassen und Isotypen bei 26 Kindern der BABYDIAB-Studie, die persistierende Autoantikörper gegen mehr als ein Antigen aufwiesen. Es wird das Alter der Kinder aufgezeigt, zu dem Zeitpunkt, an dem

bei ihnen erstmals Autoreaktivität anhand von Inselantikörpern festgestellt werden konnte. Der Median für das Auftreten der ersten Inselantikörper lag bei einem Alter von 1,4 Jahren, Spanne: 0,5 - 5,4 Jahre. So war Kind 11 beim ersten Auftreten von Autoantikörpern 2,1 Jahre alt. Bei diesem Kind 11 waren im Laufe des follow up IAA, GADA und IA-2A nachweisbar (alle Kinder waren auch ICA-positiv), das Kind entwickelte mit 7,1 Jahren einen manifesten Typ-1- Diabetes (IDDM). Weiterhin beschreibt Tabelle 3 das Auftreten von Antikörper-Subklassen gegen Insulin, GAD und IA-2. Wiederrum wird deutlich, dass die Immunreaktion gegen alle 3 Antigene IgG1 dominiert ist. Vor allem bei der Immunantwort gegen GAD und IA-2 waren IgG1-Antikörper oft die einzige nachzuweisende Antikörper-Subklasse.

Tabelle 2: Autoantikörper-Subklassen und Isotypen bei 26 Kindern der BABYDIAB-Studie, die persistierende Autoantikörper gegen mehr als ein Antigen aufwiesen.

Kind Nr.	Alter bei 1. AK*	Gemessene Autoantikörper**	IAA	IgG Subklassen GADA	IA2A	Alter bei Diabetesmanifestation, bzw. letzte Blutprobe
1	0,8	IAA, GADA, IA2A	IgG1	IgG1,2,4,IgA	IgG1	1,3 IDDM
2	1,7	IAA, GADA, IA2A	IgG1	keine	keine	1,8 IDDM
3	0,6	IAA, GADA, IA2A	IgG1,2,3	IgG1,2,3,4,IgE	IgG1	2,2 IDDM
4	0,9	IAA	IgG1,2,3,4			2,4 IDDM
5	2,0	IAA, GADA, IA2A	IgG1,3	IgG1	IgG1	3,2 IDDM
6	0,8	IAA, GADA, IA2A	IgG1,4	IgG1,4	IgG1	3,3 IDDM
7	2,0	IAA, GADA, IA2A	IgG1,4	IgG1	IgG1	3,8 IDDM
8	2,0	IAA	IgG1,2,3,4			4,9 IDDM
9	0,9	IAA, GADA, IA2A	IgG1,2,3,4	IgG1	IgG1	5,9 IDDM
10	0,8	IAA, GADA, IA2A	IgG1,2,3,4	IgG1	IgG1	7,1 IDDM
11	2,1	IAA, GADA, IA2A	IgG1	keine	IgG1,2,3	8,5 IDDM
12	0,5	IAA, GADA, IA2A	IgG1,3	keine	IgG1,2,3,IgM	1,0
13	1,0	IAA	IgG1,2,3,4			2,0
14	0,8	IAA, GADA	IgG1,4	keine		2,2
15	2,2	IAA, GADA	IgG1,4	IgG1		2,4
16	2,4	IAA, GADA	IgG1	keine		2,7
17	2,1	IAA, GADA, IA2A	IgG1,2	IgG1, 3, IgE	IgG1,2,3,E	3,0
18	0,9	IAA, GADA, IA2A	IgG1,2,3,4	IgG1,2,4,IgM	IgG1,2	3,2
19	0,8	IAA, GADA	IgG1	IgG1,2,3,IgA		3,8
20	2,1	IAA, GADA, IA2A	IgG1,4	IgG1	IgG1,3,IgE	4,2
21	2,1	IAA, GADA, IA2A	IgG1,4,2	IgG1,2	IgG1,2,3	4,5
22	1,1	IAA, IA2A	IgG1		IgG1	5,6
23	2,1	IAA, GADA, IA2A	IgG1,2, 3,4	IgG1	IgG1, IgE	5,7
24	0,9	IAA, GADA, IA2A	IgG1	IgG1,4	IgG1	6,3
25	5,4	IAA, GADA	IgG1	IgG1, IgE, IgA		7,3
26	0,9	IAA, GADA	keine	IgG1		8,1

\* : Alter, in dem das erste Mal Autoantikörper beim Kind nachweisbar waren

\*\* : alle Kinder waren auch ICA-positiv. IDDM: Diabetes-Manifestation, keine: keine Subklassen oder Isotypen nachweisbar.

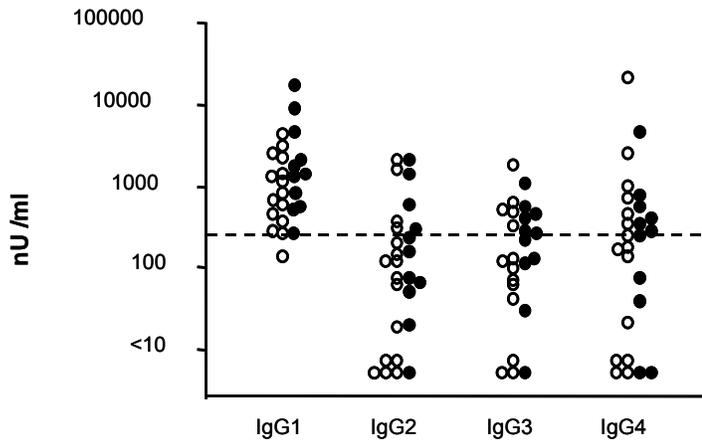
Abb. 6 zeigt die Spitzenwerte der Antikörper-Subklassen IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 sowie der Isotypen IgM, IgE, IgG und IgD. Es zeigte sich, dass IgG1 bei jeder gemessenen Autoantikörper-Spezifität die dominierende Subklasse war. Andere Subklassen ließen sich nur selten nachweisen.

Eine bemerkenswerte Ausnahme waren die IgG4-IAA. Im Gegensatz zu der Immunantwort gegen GAD und IA-2 waren bei der Immunantwort gegen Insulin häufig (bei 13/26 Kindern) neben IgG1-IAA auch IgG4-IAA nachweisbar. Bei 4 Kindern überstiegen IgG4-IAA sogar die Höhe der IgG1-IAA.

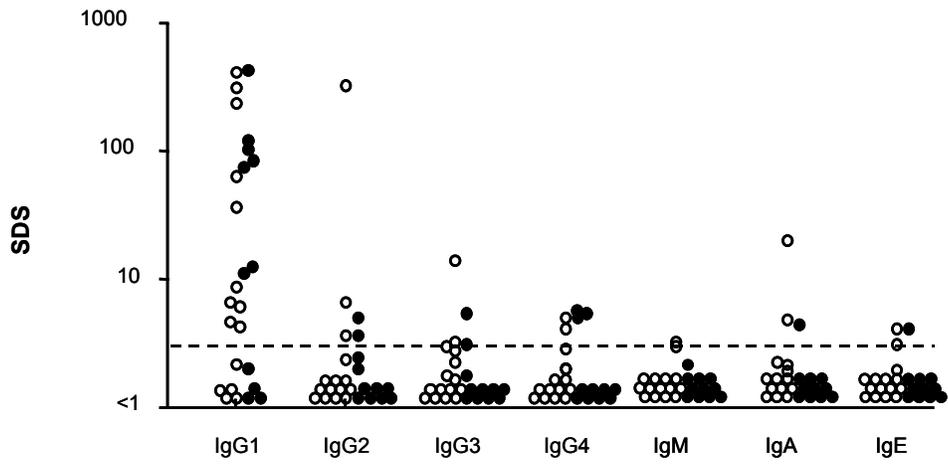
Trotz der deutlichen Dominanz der IgG1-Ak-Subklasse, wies keiner der Kinder eine ausschließliche IgG1 Antwort zu allen drei Antigenen auf. Bei mindestens einem der gemessenen Inselantikörper waren ausser IgG1 noch andere Inselantikörper-Subklassen zu finden. Neben den dominanten IgG1-Ak fand sich allerdings keine Parallelität in der Verteilung der anderen Subklassen der einzelnen Inselantikörper. Eine Ausnahme stellt der Fall Nr. 4202 dar. Bei diesem Kind wurden IgG1, IgG3 und IgE Antikörper gegen GAD gemessen und gleichzeitig wies es IgG1, IgG2, IgG3 und IgE Antikörper gegen IA2 auf.

A. IAA

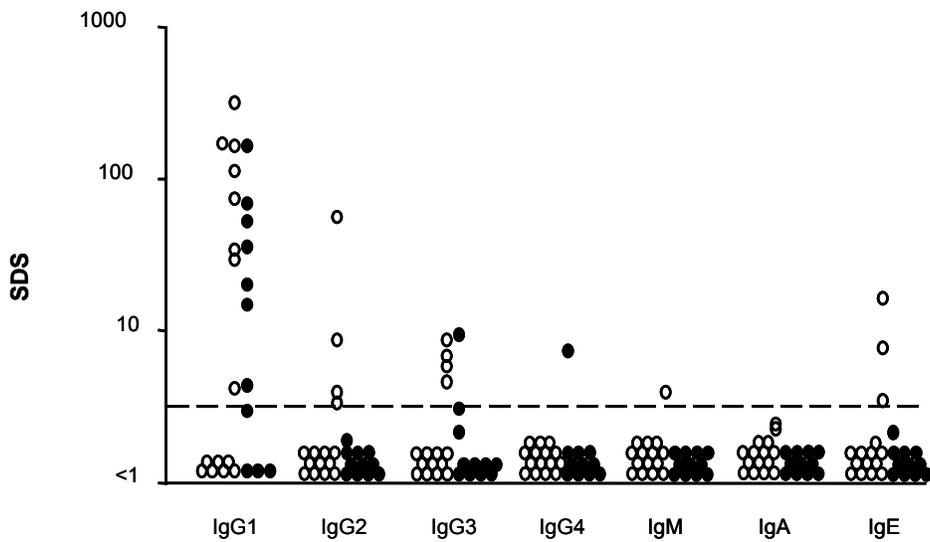
Abb.6



B. GADA



C. IA2A



*Abb. 6 zeigt Spitzenwerte der Autoantikörper-Subklassen und -Isotypen gegen Insulin (A), GAD (B) und IA-2 (C) bei Kindern, der BABYDIAB Studie, die Inselantikörper zu mehr als einem Antigen aufwiesen. Die schwarzen Punkte entsprechen Kinder, die bereits einen manifesten Typ 1 Diabetes entwickelt haben, die weißen Kreise Kinder, die noch keinen Diabetes entwickelt haben. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze für Positivität.*

IAA-Subklassen: Auffallend bei der Immunantwort gegen Insulin war, dass der Anstieg der IgG1-IAA häufig (17/25) verbunden mit oder gefolgt von einem Anstieg der anderen Antikörper Subklassen war. Im Vergleich zu den anderen gemessenen Antikörper-Spezifitäten waren neben IgG1- häufig IgG4-Antikörper in der Immunantwort gegen Insulin nachzuweisen (siehe Abb.6). In vier Fällen (Nr.6, 14, 18, 21) lagen die IgG4-IAA sogar genauso hoch, oder höher, als die IgG1-IAA (siehe Abb. 6). IgG4-IAA gegen Insulin blieben bei manchen Kindern auch nach dem Abfall der IgG1 Antikörper bestehen, oder traten erst nach deren Abfall auf (z.B. 6). IgG2-IAA und IgG3-IAA, ließen sich hauptsächlich parallel zu den Spitzenwerten der Gesamt-IAA nachweisen. Für IgG2-IAA konnte bei manchen Kindern ein ähnlicher Verlauf, wie für IgG4-IAA beobachtet werden. Auch sie blieben nach dem Abfall der IgG1-IAA teilweise bestehen, oder traten erst dann auf. 8 Kinder wiesen in der Immunantwort gegen Insulin ausschließlich IgG1 Antikörper auf.

GADA/IA2A-Subklassen: Im Gegensatz zu der Immunantwort gegen Insulin, war die Immunantwort gegen GAD und IA2 stark IgG1 dominiert. Der Anstieg der Gesamtantikörper, bzw. IgG1-Antikörper war hier nicht mit einem Anstieg der anderen Antikörper assoziiert. Nur bei 5 Kindern war eine schwache IgG4 Antwort gegen GAD nachzuweisen, während eine IgG4 Antwort gegen IA2 bei keinem der Kinder zu erkennen war. Zwei Fälle (NR. 18 und 21), welche eine extrem starke IgG4-Immunantwort gegen Insulin aufwiesen, hatten parallel relativ hohe IgG2 Titer gegen GAD und IA2. Nur ein Kind (Nr. 3) wies GAD-Antikörper aller gemessenen Subklassen auf, keines der Kinder produzierte alle Subklassen-Antikörper gegen IA2. Dagegen wiesen 8 Kinder eine ausschließliche IgG1 Antwort gegen GAD und 9 Kinder eine ausschließliche IgG1-Antwort gegen IA2 auf.

#### **4.1.3 Verteilung der Inselantikörper-Subklassen im Verlauf – kein Wechsel in der Dominanz**

Die Dominanz der IgG1-Subklassen-Antikörper gegen Insulin, GAD und IA-2 war über den gesamten Beobachtungszeitraum bei den BABYDIAB Kindern konstant. Meist war IgG1 die einzige messbare AK-Subklasse, oder die anderen Subklassen erschienen, wenn die Gesamt- und IgG1- Autoantikörperlevel einen Spitzenwert erreicht hatten, wobei sie dann in ihrem Titer-Verlauf dem der IgG1-Antikörper ähnelten. Meist waren die anderen Subklassen jedoch nicht mehr nachweisbar, sobald IgG1 Antikörpertiter abfielen.

Tabelle 3 zeigt den Verlauf von Inselantikörper-Subklassen bei Kindern, bei denen es während des Beobachtungszeitraums noch zum Auftreten von anderen Antikörper-Subklassen kam. Kind Nr. 13 z.B. wies im Alter von 1 Jahr eine starke IgG1-Antikörper-Produktion gegen Insulin auf. Zu diesem Zeitpunkt waren die anderen IAA-Subklassen zwar nachweisbar, jedoch waren die Titer deutlich niedriger, als der der IgG1-IAA. Im Alter von 1,8 Jahren waren die IgG1-IAA deutlich abgefallen, IgG2-IAA dagegen weiter angestiegen und bildeten nun die dominante Subklasse. Mit 2 Jahren waren IgG2-IAA weiterhin die dominante Subklasse, IgG1-IAA und IgG4-IAA zu niedrigen Titern nachweisbar, IgG3-IAA nicht nachweisbar.

Insgesamt kam es bei 6 Kindern nach dem Auftreten von IgG1-Antikörper noch zum Anstieg von anderen Antikörper-Subklassen. Die Höhe der neu aufgetretenen Subklasse war dann nicht parallel zur Höhe der IgG1-Titer. Am bemerkenswertesten war hier das Auftreten der IgG4-IAA nach den IgG1-IAA. In 5 Fällen blieben IgG4-IAA nachweisbar, nachdem die IgG1-IAA wieder deutlich abgefallen waren (10, 8, 23, 15, 13).

Ein ähnlicher Shift war in drei Fällen auch für IgG2-IAA zu beobachten (10, 17, 13). Auch hier waren IgG2-IAA erst nach dem ersten Auftreten von IgG1-IAA

nachweisbar, blieben jedoch auch nach Abfall der IgG1 Antikörper bestehen. In diesen drei Fällen ähnelte die IgG2-IAA Antwort der IgG4-IAA Antwort, während der Verlauf der IgG3-IAA mit dem Titerverlauf der IgG1-IAA assoziiert war.

Dieser Shift von IgG1-Ak zu IgG4-Ak konnte jedoch weder für GADA, noch für IA-2A beobachtet werden. Bemerkenswert ist, dass die Verteilung der Antikörper Subklassen sowohl gegen GAD als auch gegen IA2 bei allen Kindern konstant war. Diese Konstanz bestand über den gesamten Beobachtungszeitraum und zeigte eine deutliche Dominanz der IgG1-Autoantikörper.

Tabelle 3: Autoantikörper-Subklassen bei 6 BABYDIAB-Kindern, bei denen es nach den IgG1-Antikörpern zum Auftreten von anderen Antikörper-Subklassen kam

Kind Nr.	Alter	IAA				GADA		IA-2A	
		IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgG1	Andere	IgG1	Andere
10	0,8	+	-	-	-	-		-	
	1,9	+++	-	-	+	+		-	
	2,4					+++		++	
	2,9	++++	+	+	+	++		+	
	3,5	+++	+	-	+	++		-	
	5,0	++	++	-	+	++		++	
	6,1	++	++	++	+	++		+++	
8	2,0	++	+	+	-	-		-	
	3,0	+	-	+	+	-		-	
	5,0	+	-	-	+	-		-	
23	2,1	++	-	+	-	-		-	
	3,6	+++	-	+	+	+		++	
	4,6	-	-	-	+	-		++	
	5,7	+	-	-	-				
13	1,0	+++	+	+	+	-		-	
	1,8	+	++	-	+	-		-	
	2,0	+	++	-	+	-		-	
15	2,2	+	-	-	-	-		-	
	2,4	-	-	-	-	-		-	
	2,7								
17	2,1	++	-	-	-	+++	IgG3	+++	
	3,0	+	+	-	-	++		++++	IgG2,3

IAA: -: <250. +:250-1000, ++:1001-2000, +++: 2001-5000, ++++ >5000 nU/ml. GADA und IA-2A: -:<3, +:3-10, ++:10,1-50, +++:50,1-100, ++++>100 Standardabweichungen.

#### 4.1.4 Inselantikörper-Subklassen und Manifestation des Diabetes mellitus

Die Entwicklung eines klinisch manifesten Diabetes war nicht mit dem Vorhandensein einer bestimmten Inselantikörper-Subklasse assoziiert. 11 der 26 Kinder entwickelten bisher einen manifesten Diabetes. Meist trat die Diabetesmanifestation im Rahmen eines Anstiegs der Autoantikörper-Titer gegen ein oder mehrere Antigene auf. Fünf Kinder entwickelten einen Diabetes, zu einem Zeitpunkt, als alle gemessenen Inselantikörper auf ihre höchsten Werte angestiegen waren. Bei diesen Kindern manifestierte sich der Diabetes im Alter von 1,8, 2,4, 3,2, 3,3 und 3,8 Jahren. Bei 4 weiteren Kindern fielen die Antikörper gegen ein oder mehrere Antigene nach einem frühen Spitzenwert in der prädiabetischen Phase wieder ab, stiegen aber bei Diabetesmanifestation erneut an. Dieser erneute Autoantikörperanstieg war bei 2 Kindern gegen andere Antigene gerichtet, als beim ersten Anstieg: bei Nr. 1 richtete sich der erste Anstieg gegen Insulin, der zweite gegen GAD und IA-2, bei Nr. 3 richtete sich die erste Antikörperproduktion gegen GAD, die zweite gegen Insulin und IA-2. Bei einem Kind (Nr. 11) richteten sich die erneut ansteigenden Autoantikörper gegen das selbe Antigen, nämlich gegen GAD, nachdem sich die Immunantwort des ersten Spitzenwertes gegen GAD und Insulin gerichtet hatte. Bei einem weiteren Kind (10) waren die wieder steigenden Antikörper sowohl gegen das erste Antigen (GAD und IA-2), als auch zusätzlich noch gegen ein neues Antigen (Insulin) gerichtet.

Nur bei 2 Patienten (8, 9) manifestierte sich der Typ 1 Diabetes ohne Anstieg der Autoantikörper. Nach einem frühen Spitzenwert der Autoantikörper gegen Insulin bei Nr. 1872 und nacheinander gegen GAD, IA2 und Insulin bei Nr. 9 waren die Antikörper bei beiden bis zur Manifestation des Diabetes deutlich abgefallen.

Weder die Titer, oder die Dominanz einer Autoantikörper-Subklasse, noch die Antikörper-Spezifität, war mit dem Auftreten eines Typ 1 Diabetes assoziiert. Das Auftreten von IgG4 Autoantikörpern hatte keinen Schutz vor der Manifestation

des Typ 1 Diabetes zur Folge. Bei Kind Nr. 6 und Nr. 8 waren die IgG4-IAA sogar vor Diabetesmanifestation stark angestiegen und wiesen höhere Werte auf, als IgG1-IAA. Nr. 10 und Nr. 7 entwickelten Diabetes mit steigenden, und Nr. 4 mit konstant persistierenden IgG4-IAA. Abb.7 zeigt das kumulative Diabetesrisiko bei BABYDIAB-Kindern, bei denen IgG4 in der Immunantwort gegen Insulin nachweisbar waren im Gegensatz zu Kindern, bei denen keine IgG4-IAA nachzuweisen waren.

Abb.7

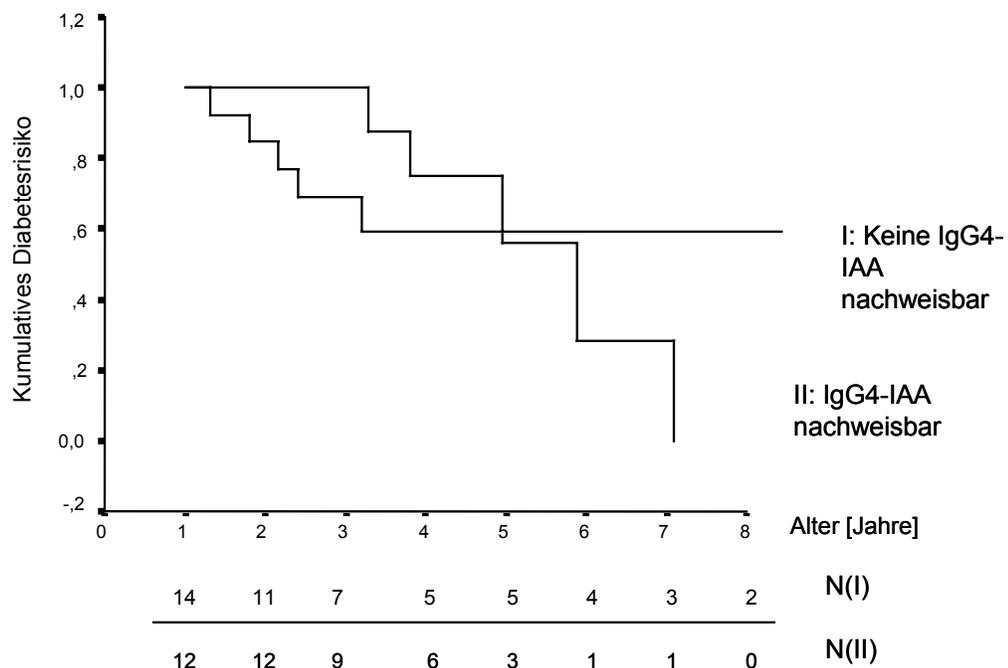


Abb. 7 zeigt das kumulative Diabetesrisiko (y-Achse) der BABYDIAB-Kinder bei Immunreaktivität gegen Insulin. I: kennzeichnet eine Insulinantwort, bei der keine IgG4-IAA nachweisbar waren. II kennzeichnet eine Immunantwort mit IgG4-IAA. Auf der x-Achse ist das Alter der Kinder in Jahren aufgeführt. N(I) und N(II) kennzeichnen die Anzahl der Kinder, die zum entsprechenden Zeitpunkt noch pro Gruppe beobachtet werden.

Nur die ausschließliche IgG1-Immunantwort gegen IA-2 war mit einem erhöhten Risiko, einen manifesten Typ 1 Diabetes zu entwickeln, assoziiert. Abb. 8A zeigt das kumulative Risiko bei Kindern, bei denen in der Immunantwort gegen IA-2 nur IgG1-Antikörper nachzuweisen waren, gegenüber einer Immunantwort gegen

IA-2, bei denen mehrere Subklassen zu detektieren waren. Das Diabetesrisiko im Alter von 6 Jahren bei ausschließlicher IgG1-IA-2A 70,37% im Vergleich zu 30,77% bei anderen Subklassen,  $p=0.03$ ). Die ausschließliche IgG1-Antwort gegen GAD oder Insulin war nicht mit einem erhöhten Risiko der Diabetesmanifestation verbunden. Abb. 8B zeigt das kumulative Diabetesrisiko in der Immunantwort gegen GAD.

Abb. 8A

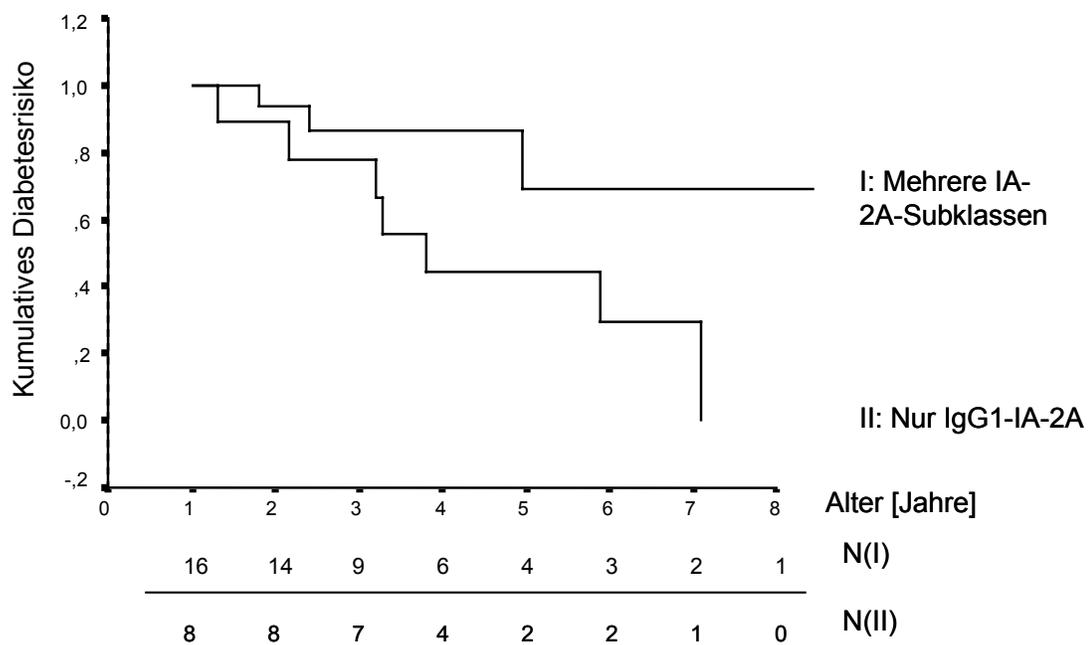


Abb. 8A zeigt das kumulative Diabetesrisiko (y-Achse) der BABYDIAB-Kinder bei Immunreaktion gegen IA-2A. I: kennzeichnet eine Immunantwort mit IgG1- und/oder anderen IgG-Subklassen (IgG2, IgG3, IgG4), II kennzeichnet eine Immunantwort, bei der IgG1-IA-2A die einzigen nachzuweisenden Subklasse war. Auf der x-Achse ist das Alter in Jahren aufgeführt. N(I) und N(II) kennzeichnen die Anzahl der Kinder die zum entsprechenden Zeitpunkt noch in der Gruppe beobachtet werden.

Abb. 8B

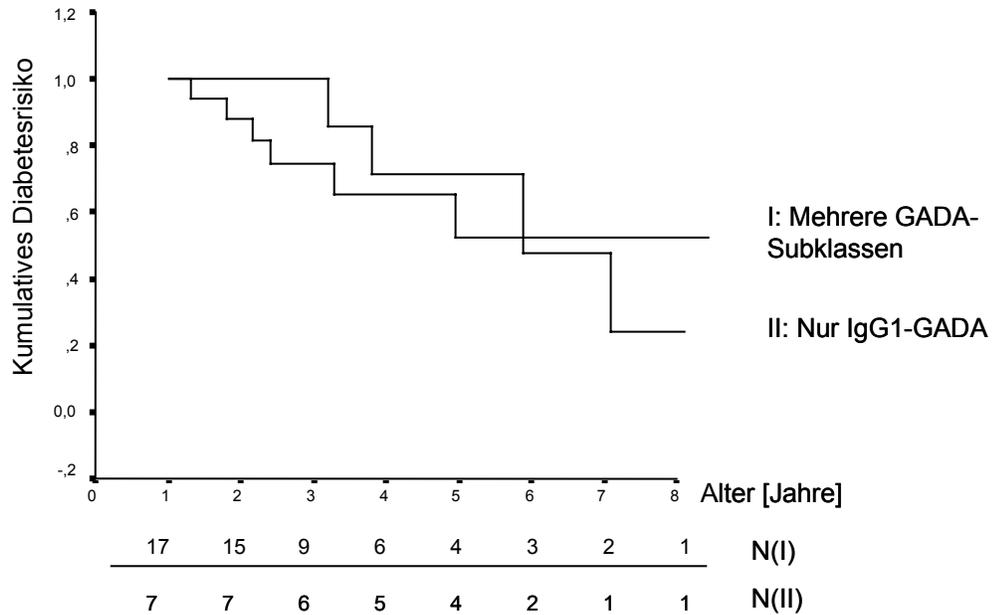


Abb. 8B zeigt das kumulative Diabetesrisiko (y-Achse) der BABYDIAB-Kindern bei Subklassen-Antwort gegen GAD. I: kennzeichnet eine Immunantwort mit IgG1- und/oder anderen IgG-Subklassen (IgG2, IgG3, IgG4), II kennzeichnet eine Immunantwort, bei der IgG1-IA-2A die einzigen nachzuweisenden Subklasse war. Auf der x-Achse ist das Alter in Jahren aufgeführt. N(I) und N(II) kennzeichnen die Anzahl der Kinder die zum entsprechenden Zeitpunkt noch in der Gruppe beobachtet werden.

## 4.2 Entwicklung von Inselantikörper-Subklassen bei Immunintervention nach Diabetesmanifestation

### 4.2.1 Insulinautoantikörper (IAA) bei Diabetesmanifestation

*Tabelle 4: Entwicklung der Insulinautoantikörper-Subklassen bei 17 Erwachsenen mit neu-manifestem Typ 1 Diabetes, von denen 8 Patienten über 12 Monate mit i.v. + s.c. und 9 Patienten über den gleichen Zeitraum nur mit s.c. Insulingaben als Kontrollen behandelt wurden. Die fettgedruckte ist die zum jeweiligen Zeitpunkt dominierende Subklasse.*

Patient Nr.	Alter bei DM (Jahre)	IAA-Subklassen bei DM-Manifestation	Insulingabe	Antikörper nach 12 Monaten Follow up
E1	22	-	i.v. + s.c.	IgG <b>1</b> , 4
E2	36	-	i.v. + s.c.	-
E3	20	-	i.v. + s.c.	IgG <b>1</b> , 2, <b>4</b>
E4	11	-	i.v. + s.c.	IgG <b>1</b> , <b>4</b>
E5	19	n.b.	i.v. + s.c.	IgG <b>1</b> , 4
E6	29	IgG <b>1</b>	i.v. + s.c.	IgG <b>1</b> , 2, 3, 4
E7	30	-	i.v. + s.c.	-
E8	28	-	i.v. + s.c.	IgG <b>1</b> , 4
E9	31	-	s.c.	IgG <b>1</b> , 2, 4
E10	34	-	s.c.	IgG <b>1</b> , 2, <b>4</b>
E11	31	-	s.c.	IgG <b>1</b> , 2, 3, 4
E12	27	-	s.c.	-
E13	28	-	s.c.	IgG <b>1</b> , 2, 3, <b>4</b>
E14	37	-	s.c.	IgG <b>1</b> , 2, 3, 4
E15	33	IgG <b>1</b> , 4	s.c.	IgG <b>1</b> , 2, 3, <b>4</b>
E16	31	-	s.c.	IgG <b>1</b> , 3
E17	24	-	s.c.	IgG <b>1</b>

Tabelle 4 zeigt 17 erwachsene von insgesamt 29 autoantikörper-positiven Patienten mit neu-manifestem Typ-1-Diabetes, die im Rahmen einer Immuninterventionsstudie stationär mit Insulin behandelt und deren Seren prospektiv über einen Zeitraum von 18 Monaten nach Diabetesmanifestation auf Insulin-, GAD- und IA2-Antikörper-Subklassen untersucht wurden. Die 17 hier

aufgeführten Erwachsene nahmen an einer Immuninterventionsstudie in der III. Med. Abteilung des Krankenhaus München Schwabing teil. Sie wurden in zwei Gruppen randomisiert. Die experimentelle Gruppe (n=8, medianes Alter: 29, Spanne 19 - 36 Jahre, HbA1c  $10,5 \pm 2,0\%$ ) erhielt über 2 Wochen eine hochdosierte intravenöse Insulininfusion ( $1,2 \pm 0,4$  U/kg/d), die Kontrollgruppe (n=9, medianes Alter: 31, Spanne: 24 – 37 Jahre, HbA1c  $12,3 \pm 3,0\%$ ) wurde in der gleichen Zeit mit subkutanen Insulingaben ( $0,4 \pm 0,1$  U/kg/d) 4x/Tag behandelt. In der Tabelle ist das Alter der Patienten bei Diabetesmanifestation aufgeführt, sowie die gemessenen Insulin(auto)antikörper-Subklassen bei Manifestation, bzw. nach einem follow up von 12 Monaten.

*Tabelle 5: Entwicklung der Insulinantikörper-Subklassen bei 12 Kinder mit neu-manifestem Typ 1 Diabetes, von denen 6 Kinder 12 Monate lang mit i.v. + s.c. und 6 Kinder nur mit s.c. Insulingaben als Kontrollen behandelt wurden. Die fettgedruckte ist die zum jeweiligen Zeitpunkt dominierende Subklasse.*

Patient Nr.	Alter bei DM (Jahre)	IAA-Subklassen bei DM-Manifestation	Insulingabe	Antikörper nach 12 Monaten Follow up
K1	1,2	-	i.v. + s.c.	IgG 1, 2, <b>4</b>
K2	4,1	IgG1	i.v. + s.c.	IgG 1, 2, <b>4</b>
K3	2	IgG 1, 2	i.v. + s.c.	IgG <b>1</b> , 2, 3, 4
K4	9,8	IgG 1, <b>4</b>	i.v. + s.c.	IgG 1, 2, <b>4</b>
K5	4,8	IgG 1, 4	i.v. + s.c.	IgG <b>1</b> , 2, 3, 4
K6	11	-	i.v. + s.c.	IgG 1, 2, 3, <b>4</b>
K7	7,3	IgG 1, 4	s.c.	IgG <b>1</b> , 4
K8	17	-	s.c.	IgG 1, 3, <b>4</b>
K9	14	IgG3	s.c.	IgG 1, 2, 3, <b>4</b>
K10	3,15	IgG 1, <b>4</b>	s.c.	IgG <b>1</b> , 4
K11	14	IgG1	s.c.	IgG 1, <b>4</b>
K12	2,1	IgG1	s.c.	IgG 1, <b>4</b>

Tabelle 5 zeigt die 12 Kinder mit neu-manifestem Typ-1-Diabetes, die Rahmen einer Immuninterventionsstudie mit Insulin behandelt wurden. Die experimentelle Gruppe (n=6, Altersmedian=7 Jahre, Spanne: 2-12 Jahre) erhielt im Ospedale

San Raffaele in Mailand eine hochdosierte kombinierte i.v. und s.c. Insulintherapie. Nach einer einwöchigen intravenösen Insulininfusion wurden sie auf eine intensiviertere s.c. Insulintherapie umgestellt und in 3-monatigen Abständen über ein Jahr beobachtet. Als Kontrollen dienten hier 6 Kinder, die nach Diabetesmanifestation ausschließlich mit subkutanen Insulingaben behandelt wurden (n=6, Altersmedian=11 Jahre, Spanne 3-17 Jahre), (n=5 davon waren im Rahmen der BABYDIAB Studie von Geburt an beobachtet worden, siehe auch Kollektive und Methoden).

Von den insgesamt 29 neu-manifesten Typ-1-Diabetikern, die im Rahmen dieser Immuninterventionsstudien mit Insulin behandelt wurden, wiesen 12 Patienten bei Diabetesmanifestation Autoantikörper gegen Insulin auf. 10 dieser IAA-positiven Diabetiker gehörten zu der Gruppe der 12 Kinder (mittleres Alter 9 Jahre, Spanne: 2-17 Jahre). Von den 17 Erwachsenen (mittleres Alter: 30 Jahre, Spanne: 19-37 Jahre) waren dagegen bei Diabetesmanifestation nur 2 IAA-positiv. Von den gemessenen IAA-Subklassen waren hauptsächlich IgG1- und IgG4- IAA nachweisbar. In 10 Fällen waren IgG1 Autoantikörper nachzuweisen, davon waren 3 Patienten ausschließlich IgG1-IAA, fünf Patienten wiesen IgG1-plus IgG4- Antikörper auf, und zwei Patienten hatten IgG1- und IgG2-IAA. Insgesamt waren die Titer der IgG1 und IgG4 Antikörper, sobald beide vorhanden waren, in ihrer Höhe ähnlich stark ausgeprägt. IgG2-IAA und IgG3-IAA Titer waren deutlich niedriger, meist sogar negativ bei Diabetesmanifestation.

## 4.2.2 Insulinantikörper nach Insulintherapie

12 Monate nach Therapiebeginn wiesen 26 der 29 (89,7%) Patienten Antikörper gegen Insulin auf. Ähnlich der spontanen Immunantwort gegen endogenes Insulin, war die Immunantwort wiederum hauptsächlich durch die Produktion von IgG1- und IgG4-IA bestimmt (siehe Abb. 9). 12 Monate nach Beginn der Insulintherapie konnten IgG1-IA bei 25 (86,2%) der 29 Patienten gemessen werden. 23 Patienten hatten IgG4-IA (79,3%). IgG2- und IgG3-IA waren in allen Fällen dagegen deutlich schwächer ausgeprägt. Nur bei 16 Patienten (55,1%) war überhaupt eine IgG2 Antwort nachzuweisen, bei 12 Patienten (41,3%) eine IgG3 Antwort.

Abb. 9

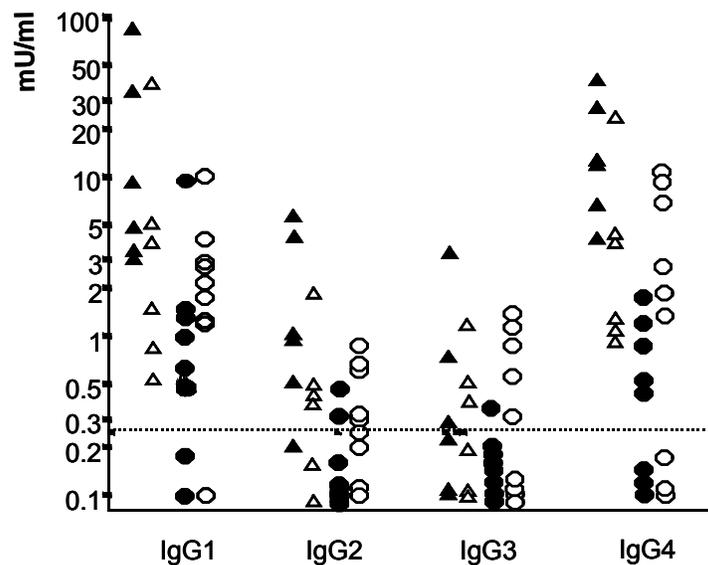


Abb. 9 zeigt die IgG-IA-Subklassen bei neumanifestierten Typ 1 Diabetikern 12 Monate nach Beginn der Insulintherapie. ▲: Kinder, die mit s.c. plus i.v. Insulin behandelt wurden (n=6), △: Kinder, die nur mit s.c. Insulin behandelt wurden (n=6), ●: Erwachsene, die mit s.c. plus i.v. Insulin behandelt wurden (n=8), ○: Erwachsene, die nur mit s.c. Insulin behandelt wurden (n=9). Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze für Positivität, die y-Achse zeigt die Höhe der IA-Subklassen in mU/ml auf einer logarithmischen Skala.

Abb. 9 zeigt IgG-IA-Subklassen bei neu manifestierten Typ 1 Diabetikern 12 Monaten nach Beginn einer Insulintherapie nach unterschiedlichen Regimen. Die 12 Kinder sind in Abb. 9 durch Dreiecke symbolisiert, die 17 Erwachsenen durch Kreise. Schwarz entspricht einer Insulintherapie mit s.c. und i.v. Insulin, weiße Symbole kennzeichnen Patienten, die nur mit s.c. Insulin behandelt wurden. Es wird deutlich, dass die Antikörperproduktion auf exogenes Insulin bei den Kindern stärker ausgeprägt war als bei den Erwachsenen ( $p < 0,01$ ). Die Gesamt-IA in der Gruppe der Kinder lagen bei einem Median von 296 units, die IgG1 bei einem Median von 15,4 mU/ml, IgG2 bei einem Median von 1 mU/ml und IgG4 bei 9,9 mU/ml, während die entsprechenden Werte bei den Erwachsenen bei 80 units (Gesamt-IA), 2,5 mU/ml (IgG1), 0,2 mU/ml (IgG2), 2,3 mU/ml (IgG4) lagen. Die Immunreaktion der erwachsenen Patienten von den Kindern unterschied sich vor allem in der Gruppe, die sowohl mit s.c., als auch mit i.v. Insulin behandelt wurde. Die Kinder hatten eine relativ ausgeprägte Immunantwort gegen Insulin, unabhängig davon ob sie i.v. plus s.c., oder nur s.c. Insulin erhalten hatten. Bei den erwachsenen Patienten dagegen lagen die Gesamt-IA- und IgG1-IA-Titer in der Gruppe, die i.v. plus s.c. Insulin erhielt, deutlich niedriger (Ges.-IAA:  $p = 0,06$ , IgG1-IA:  $p = 0,09$ ), als in der Gruppe, die nur mit s.c. Insulin behandelt wurde. In der Gruppe, die nur subkutan Insulin erhielt, konnte kein Unterschied der Immunantwort gegen Insulin zwischen Erwachsenen und Kindern beobachtet werden.

Abb. 10

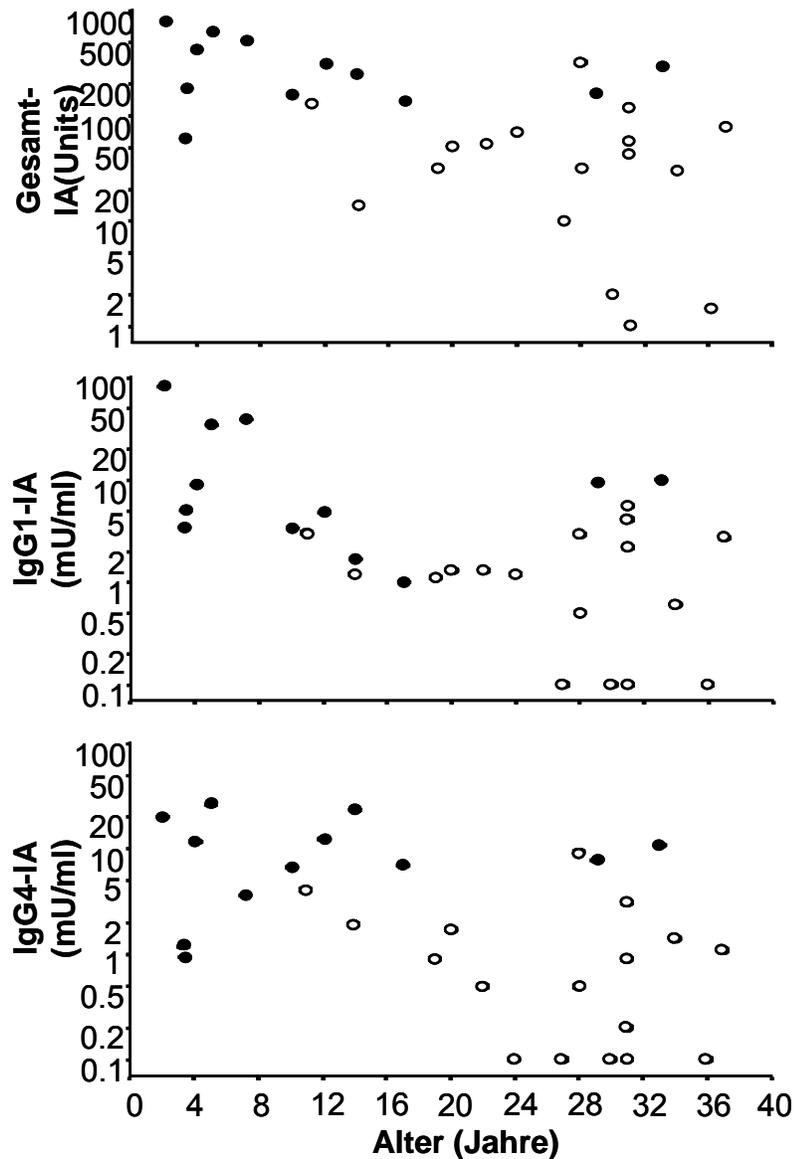


Abb. 10 : Korrelationen der Gesamt-IA (A), IgG1-IA (B) und IgG4-IA (C)-Titer nach 12-monatiger Insulintherapie bei neu-diagnostizierten Typ 1 Diabetikern (n=29). IA und IA-Subklassen in Units pro ml sind logarithmisch abgebildet. Die schwarzen Punkte kennzeichnen Patienten, die bei Diabetesmanifestation IAA-positiv waren, die weißen Kreise Patienten, die bei Diabetesmanifestation IAA-negativ waren.

Abb. 10 zeigt die Korrelationen der I(A)A, IgG1-I(A)A und IgG4-I(A)A. Insgesamt waren die Gesamt-IA und die IgG1-, IgG2- und IgG4-IA –Titer positiv mit dem Alter der Patienten korreliert ( $p < 0,01$  für Gesamt- und IgG1;  $p < 0,03$  für IgG4). Ein

wesentlicher Befund war, dass alle Patienten, die schon bei Diabetesmanifestation Autoantikörper gegen Insulin aufwiesen (schwarze Kreise in Abb.10), nach exogener Insulingabe höhere Gesamtantikörpertiter gegen Insulin sowie höhere IgG1, IgG2 und IgG- IA-Subklassentiter aufwiesen ( $p < 0,002$ ), als Patienten, die bei Diabetesmanifestation keine IAA aufwiesen (weiße Kreise in Abb. 10). Bei allen Patienten war der Verlauf der Gesamt-IA hauptsächlich durch einen Anstieg der IgG1 Antikörper bestimmt. Abb.11 zeigt den Verlauf der Gesamt-IA im Vergleich zu den Subklassen IgG1-IgG4.

Abb. 11

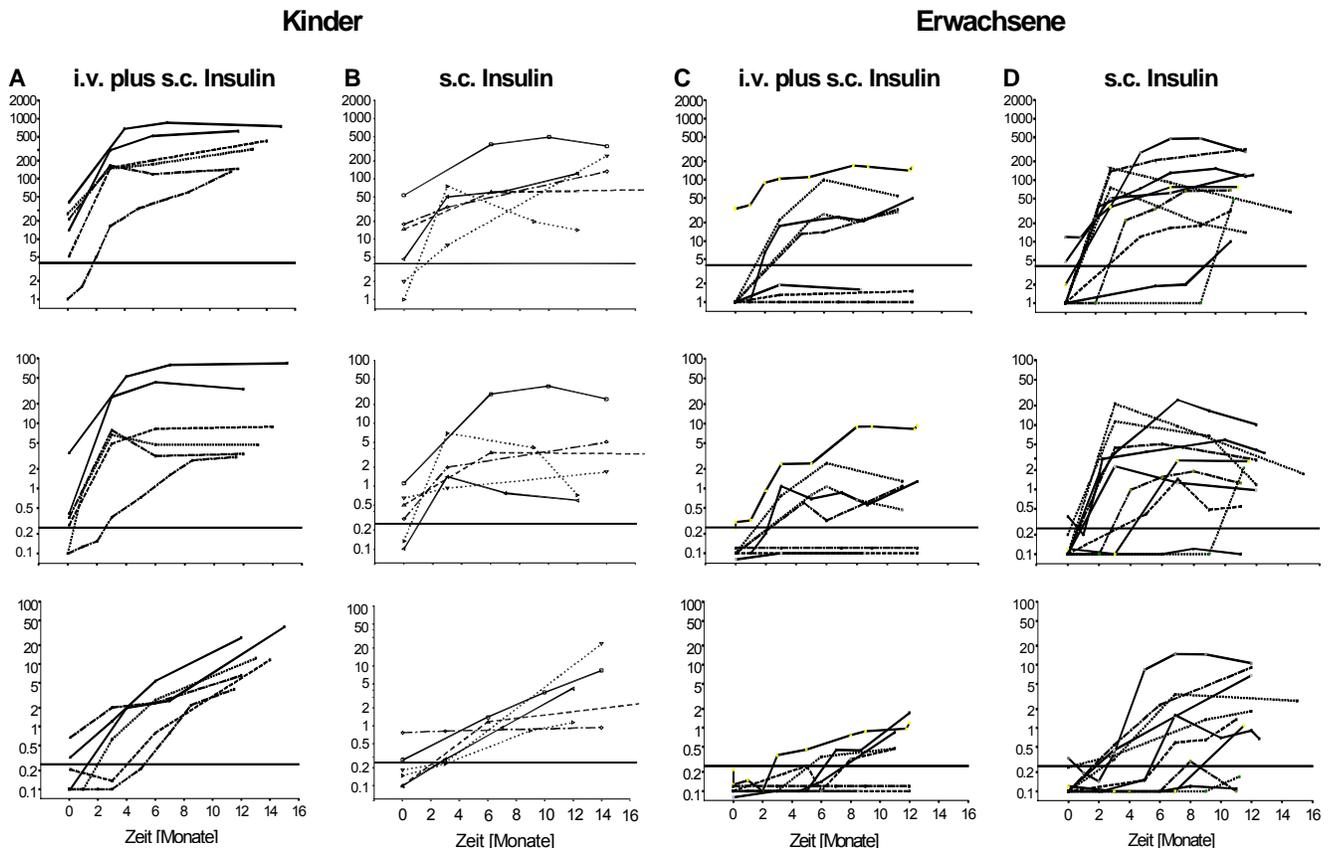


Abb. 11 zeigt den Verlauf von IA (oben), IgG1-IA (Mitte), IgG4-IA (unten) bei 29 neumanifestierten Typ 1 Diabetikern, die mit s.c. plus i.v. Insulin, oder nur mit s.c. Insulin behandelt wurden. Spalte A und B zeigt 12 Kinder (mittleres Alter 9 Jahre), Spalte C und D 17 Erwachsene (mittleres Alter 30 Jahre). In der oberen Zeile sind Gesamt-IA in units, in der mittleren und unteren Zeile die IgG1-IA und IgG4-IA in Prozent gebundenes Insulin dargestellt. Die horizontale Linie kennzeichnet die Grenze der Positivität.

### 4.2.3 Verlauf der IA-Subklassen nach Insulintherapie

Abb. 11 zeigt den Verlauf der Insulinantikörper, IgG1-IA und IgG4-IA bei 29 neu manifestierten Typ 1 Diabetikern, die nach Diabetesmanifestation mit s.c. plus i.v., oder nur mit s.c. Insulin behandelt wurden. Die Abb.11 verdeutlicht, dass bei den meisten Patienten (26/29=89,6%) der Titer der Insulinantikörper im Verlauf der Immunintervention mit Insulin deutlich anstieg. Die Ausnahme bildeten 3 Patienten aus der Gruppe der Erwachsenen, die mit s.c. plus i.v. Insulin behandelt wurden (Abb 11C, oben), bei ihnen war über den gesamten Beobachtungszeitraum kein Anstieg der IA zu messen. In der Regel ähnelte der Verlauf der IgG1 Antikörper dem der Gesamt-IgG-IA. Bereits nach 3 Monaten lagen die IgG1-IA-Titer bei 24 Patienten (85,7%) höher als bei Diabetesmanifestation. Durchschnittlich 6 Monate nach Therapiebeginn (Spanne:3-12 Monate) erreichten die IgG1 Antikörper einen Spitzenwert. Danach kam es 7 Patienten (26,9%) zu einem deutlichen Abfall der IgG1-IA, bei 19 Patienten (73%) blieben die IgG1-IA auf einem Plateau relativ konstant. Es bestand hier ein deutlicher Unterschied zwischen dem Verlauf der IgG1-IA bei Kindern und bei Erwachsenen. In der Gruppe der Kinder stabilisierten sich die IgG1-IA in 11 von 12 Fällen (91,6%) (Abb11A+B, Mitte) auf dem erreichten Plateau, bei nur einem Kind war ein deutlicher Abfall der IgG1-IA zu beobachten, aber auch bei diesem Kind stabilisierten sich die IgG1-IA nach anfänglichem Abfall auf einem niedrigeren Niveau. In der Gruppe der Erwachsenen kam es bei 42,8% zu einem Abfall der IgG1-IA (Abb 11 C+D, Mitte) und zu einer Stabilisierung auf einem niedrigeren Niveau, bei den anderen Erwachsenen stabilisierten sich die IgG1-IA nach Erreichen eines Spitzenwertes auf diesem Niveau.

Im Gegensatz dazu zeigten die IgG4-IA (Abb. 11, unten) einen langsamen, späteren Anstieg. Während 3 Monate nach Therapiebeginn schon bei 85,7% der Patienten erhöhte IgG1-IA aufwiesen (s.o.), waren die IgG4-IA zu diesem Zeitpunkt nur bei 13 Patienten (44,8%) gestiegen, wobei in der Gruppe der

Kinder 7 Patienten (58,3%), in der Gruppe der Erwachsenen 6 Patienten (35,3%) erhöhte IgG4-IA aufwiesen. Auffallend war hierbei wiederum, dass die Gruppe der Erwachsenen, die mit sc. plus i.v. Insulin behandelt wurde, eine deutlich schwächere Immunreaktion gegen Insulin aufwies, als die Gruppe der Erwachsenen, die nur mit s.c. Insulin behandelt wurde. In der Gruppe der Erwachsenen, die mit s.c. plus i.v. Insulin behandelt wurden, waren nur bei einem Patienten (12,5%) IgG4-IA zu messen (Abb.11C, unten). Die IgG4-IA-Titer nahmen durchschnittlich erst 6 Monate nach Therapiebeginn deutlich zu. Bei 20 Patienten stiegen die IgG4-IA auch nach 12 Monaten noch weiter an. In 11 Fällen waren sie zu diesem Zeitpunkt sogar höher, als die IgG1-IA Titer. Generell stieg die IgG4-IA-Antwort bei den Patienten schneller an, die bei Diabetesmanifestation Insulinautoantikörper aufgewiesen hatten. 10 der 12 Patienten, die vor Therapiebeginn IAA-positiv waren, wiesen schon 3 Monate nach Therapiebeginn IgG4-IA auf, während nur 3 der 17 IAA-negativen Patienten zu diesem Zeitpunkt IgG4-IA hatten ( $p=0,001$ ). Bei über der Hälfte der bei Diabetesmanifestation IAA-negativen Patienten waren sogar nach 6 Monaten noch keine IgG4-IA messbar. Die IgG2-IA und IgG3-IA-Antworten waren in der Regel sehr viel geringer ausgeprägt (nicht graphisch dargestellt). IgG2-IA und IgG3-IA waren nur bei gleichzeitig hochpositiven Gesamt-IgG und IgG1-Insulinantikörper-Titern nachweisbar. Ihr Verlauf war dann parallel zu dem der IgG1-IA.

#### **4.2.4 Humorale Immunantwort gegen Insulin bei Immunintervention mit Cyclosporin A**

Patienten mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes wurden hier neben einer intensivierten Insulintherapie 12 Monate mit Cyclosporin A behandelt (siehe Kollektive und Methoden 2.1.5.2). Der Gesamt-IA Verlauf, sowie der Verlauf der IA-Subklassen wurde mit einer Gruppe von 5 Patienten verglichen, die für den gleichen Zeitraum mit Placebo und s.c. Insulin behandelt wurden, sowie mit der

oben besprochenen Gruppe der Patienten, die kurz nach Diabetesmanifestation mit s.c. Insulin behandelt wurden (siehe 2.1.5.1).

Abb. 12

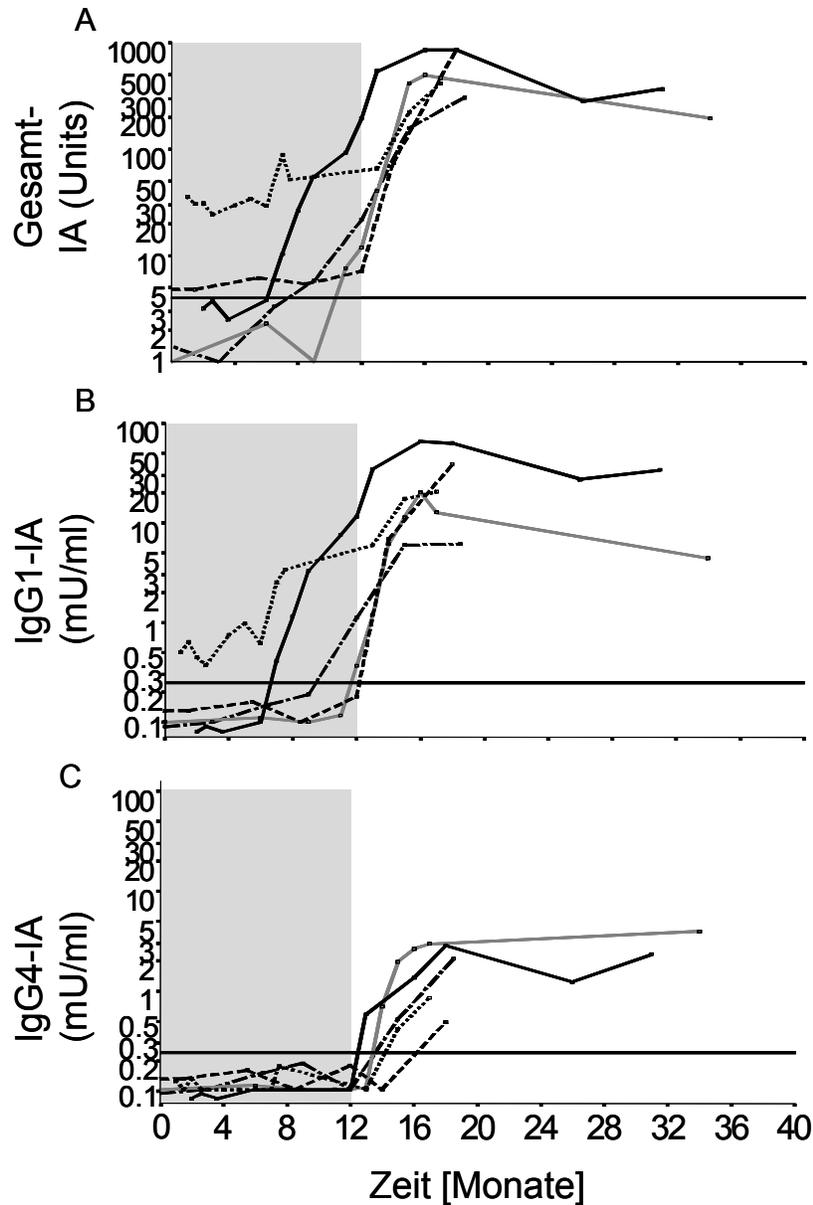


Abb.12 zeigt den Verlauf der Insulinantikörper (A) und IA-Subklassen IgG1 (B) und IgG4 (C) bei 5 neu manifestierten Typ 1 Diabetikern, die neben einer intensivierten Insulintherapie während der ersten 12 Monate nach Manifestation mit Cyclosporin A behandelt wurden. Der grau unterlegte Bereich kennzeichnet die Zeit, in der die Patienten mit Cyclosporin A behandelt wurden, die horizontale Linie kennzeichnet die Grenze für Positivität. Die Höhe der IA- und IA-Subklassen auf der y-Achse ist logarithmisch dargestellt.

Abbildung 12 zeigt den Verlauf der IA- und IA-Subklassen bei 5 mit Cyclosporin A behandelten Patienten. Die 12 Monate, in denen die Patienten CyA erhielten sind grau unterlegt. Im Gegensatz zu der Gruppe der mit s.c. Insulin behandelten Patienten (Abb 9, Spalte B und D), stiegen bei keinem der 5 Patienten, die mit Cyclosporin A behandelt wurden, Gesamt-IA oder IgG1-IA-Titer innerhalb der ersten 6 Monate. Die Fälle (n=2), die schon bei Diabetesmanifestation Autoantikörper gegen Insulin aufwiesen, zeigten keinen weiteren Antikörperanstieg, die Fälle (n=3), die bei Einschluss in die Studie IAA-negativ waren, blieben auch während der Behandlung mit CyA für die ersten 6 Monate IA-negativ. Nach 12 Monaten waren die Gesamt-Insulinantikörper-Titer der mit Insulin plus CyA behandelten Patienten den IA-Titern der nur mit Insulin behandelten Patienten vergleichbar. Gesamt-IgG konnte bei allen 5 mit CyA behandelten Patienten nachgewiesen werden, IgG1-IA bei 4 dieser 5 Patienten. (Median der IA-IgG: 22 units, der IgG1-IA: 3 mU/ml bei CyA behandelten, im Vergleich zu 54 units und 1,5 mU/ml bei der Placebogruppe bzw. 113 units und 3 mU/ml bei den Erwachsenen, die nur mit s.c. Insulin behandelt wurden). Ein Patient der CyA Gruppe wies gegen Ende des ersten Jahres auch IgG2- und IgG3-IA auf.

Überraschend war der Befund, dass sich IgG4-IA bei keinem der mit CyA behandelten Patienten während der ersten 12 Monate nachweisen ließen. Das unterschied die experimentelle Gruppe erheblich von der Placebo Gruppe, in der während des ersten Jahres 4 von 5 Patienten IgG4-Insulinantikörper entwickelten (Median 3,1 mU/ml,  $p < 0,02$ ). Nach Absetzen des CyA stiegen die Insulinantikörper jedoch schlagartig an. Bereits 3 Monate nach Ende der Behandlung mit CyA (d.h. 15 Monate nach Diabetesmanifestation) stiegen die Gesamt-IA-Titer der 5 Patienten auf Werte zwischen 74 und 852 units/ml. Die Werte nahmen auch im weiteren Verlauf noch deutlich zu. Dieser Anstieg der Gesamt-IgG nach Ende der Immunsuppression war hauptsächlich durch einen Anstieg der IgG1-IA bedingt. IgG1-IA wiesen im Vergleich zu anderen Subklassen die höchsten Werte auf (Median nach 3 Monaten: 11 mU/ml,

Spanne: 6 – 65 mU/ml). Auch im Laufe der weiteren Beobachtung bis zu einem Jahr nach Ende der CyA Gaben blieben die IgG1-IA die dominante Subklasse. IgG4-IA waren ebenfalls bei 4 der 5 Patienten nach 3 Monaten angestiegen (Median: 0,6 mU/ml, Spanne 0,1 – 2,3 mU/ml). Diese Werte waren allerdings deutlich niedriger, als die der IgG1-IA und auch als die IgG4 Antwort in der Gruppe der mit Insulin behandelten Vergleichsgruppen. IgG2- und IgG3-IA wiesen deutlich niedrige Titer auf und stiegen auch nach Ende der CyA Therapie nicht weiter an.

### **4.3 Immunantwort gegen Insulin bei prädiabetischen Verwandten 1. Grades von Typ 1 Diabetikern**

#### **4.3.1 Verlauf der Insulinantikörper nach Beginn der Insulinprophylaxe**

Von 7 Inselantikörper-positiven Verwandten 1. Grades von Typ 1 Diabetikern, die im Rahmen der SIP Studie mit prophylaktischer Insulintherapie behandelt wurden (siehe Kollektive und Methoden 2.1.6), entwickelten 5 Probanden Antikörper gegen exogenes Insulin. Abb. 13 zeigt den zeitlichen Verlauf der IA- und IA-Subklassen beispielhaft bei 4 dieser 7 antikörperpositiven Verwandten 1. Grades von Typ 1 Diabetikern, die vor Diabetesmanifestation prophylaktisch mit Insulin behandelt wurden. Diese mit Insulin behandelten prädiabetischen Probanden wiesen alle sehr hohe Insulinantikörpertiter auf. Die IA-Titer stiegen im Laufe der 6 monatigen Behandlung mit täglichen subkutanen Insulingaben stetig an und erreichten am Ende der 6 Monate einen Höhepunkt (55 – 726 units für Gesamt – IA). Nach Beendigung der 6-monatigen s.c. Insulin-Therapie wurden alle 12 Monate 6-tägigen Perioden mit täglichen i.v. Insulininfusionen gegeben, die alle 12 Monate wiederholt wurden. Die IA fielen nach Ende der s.c. Insulin-Therapie deutlich ab, und erreichten dann ein Plateau, auf dem sich die Werte stabilisierten.

Abb. 13

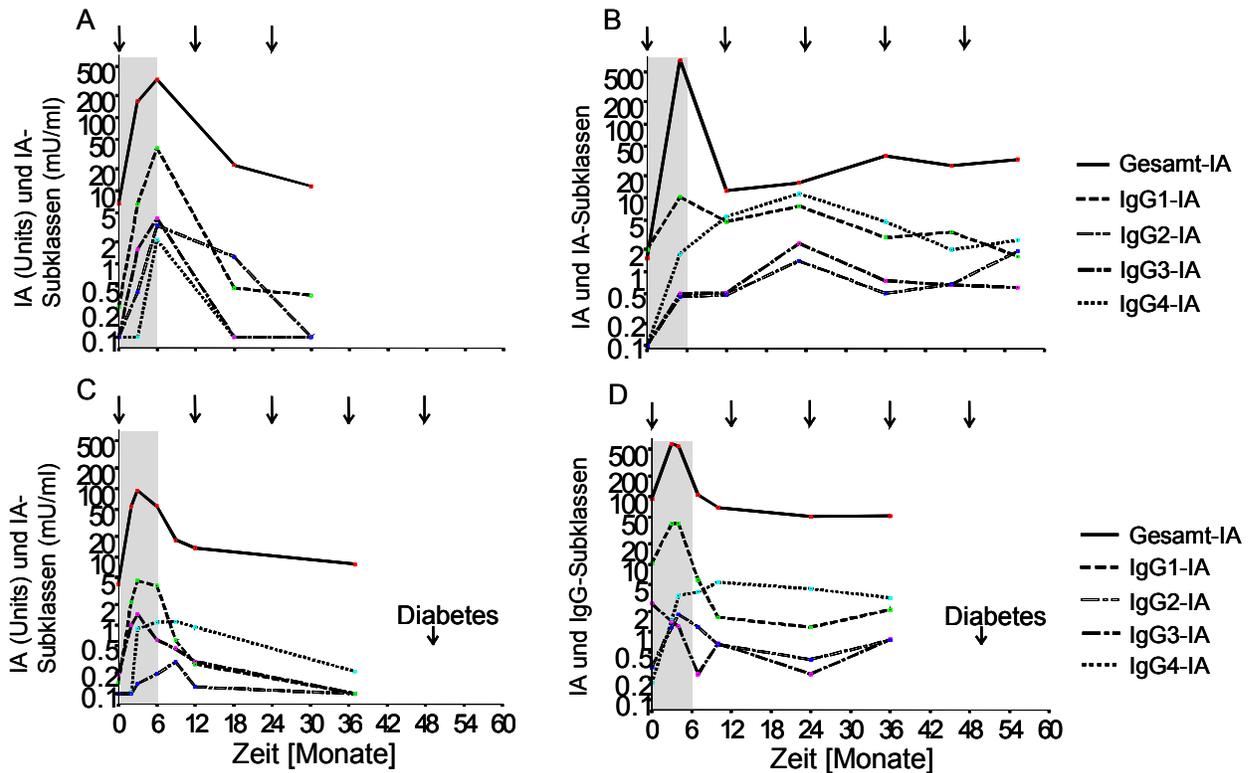


Abb. 13 zeigt den zeitlichen Verlauf der IA- und IA-Subklassen bei 4 Probanden, die im Rahmen der SIP-Studie prophylaktisch mit Insulin behandelt wurden. Die Probanden erhielten 7 Tage i.v., danach für 6 Monate tägliche s.c. Insulingaben (gekennzeichnet durch den grau unterlegten Bereich). Die 7-tägigen i.v. Insulingaben (gekennzeichnet durch die senkrechten Pfeile) wurden alle 12 Monate wiederholt. Zwei Probanden entwickelten einen manifesten Diabetes (C,D), gekennzeichnet durch einen Pfeil. IA- und IA-Subklassen auf der y-Achse sind logarithmisch dargestellt.

#### 4.3.2 Verteilung der IA Subklassen

Wie in Abb. 13 anhand der 4 Beispiele dargestellt, verlief die Höhe der IgG1-Insulinantikörper bei jedem der beobachteten Probanden parallel zur Höhe der Gesamt-IA. Auch waren für IgG1 Antikörper wiederum die höchsten Werte im Vergleich zu den anderen gemessenen Subklassen zu beobachten (Median: 38 mU/ml, Spanne: 3.8 – 63 mU/ml). Die Werte für IgG2-, IgG3- und IgG4-IA waren deutlich niedriger, stiegen jedoch auch im Verlauf der 6 monatigen s.c.

Insulintherapie (in Abb 13 grau unterlegter Bereich) kontinuierlich an. Nach Ende der subkutanen Insulintherapie fielen die IgG1-IA, entsprechende dem Verlauf der Gesamt-IA deutlich ab. Auch IgG2 und IgG3 Antikörper sanken schnell wieder auf sehr niedrige Werte. Die IgG4 Antikörper hingegen stiegen bei 3 der 5 IA+ Probanden auch nach dem Ende der täglichen s.c. Insulintherapie weiter an (siehe Abb.13). In diesen 3 Fällen wurden die IgG4 Antikörper im Laufe der ersten 6 Monate nach Ende der subkutanen Insulintherapie die dominierende Subklasse. Sie erreichten dann nach 6 Monaten ein Plateau, das deutlich über dem der IgG1 Antikörper lag.

#### **4.3.3 Muster der IA-Antwort unter prophylaktischer Insulintherapie im Hinblick auf die Diabetesentwicklung**

Bei der Entwicklung hin zur Diabetesmanifestation lässt sich keine Konstanz im Muster der Immunantwort gegen Insulin oder der Verteilung der Subklassen erkennen. 4 der 7 Probanden, die mit Insulin prophylaktisch behandelt worden waren, entwickelten bis August 1999 keinen klinisch manifesten Diabetes. Das entspricht einem Zeitpunkt von 5,3, 6, 6, und 8,6 Jahren nach Beginn der Insulinbehandlung. Zwei dieser Probanden zeigten überhaupt keine Antikörperproduktion auf die exogenen Insulingaben. Ein Proband, der bis August 1999 keinen Diabetes entwickelte, zeigte dagegen eine starke Antikörperproduktion aller Subklassen im Rahmen der täglichen s.c. Insulingaben. Nach Ende dieser ersten 6 Monate fielen alle IA- Subklassen deutlich ab (Abb. 13C). 18 Monate nach Ende der s.c. Insulintherapie waren IgG2-IA und IgG3-IA unter die Nachweisgrenze gesunken, die IgG4-IA-Titer waren zu diesem Zeitpunkt höher, im Vergleich zu IgG1-IA, fielen jedoch im weiteren Verlauf bis unter die Nachweisgrenze ab. Der vierte bis Nov. 2001 nicht-diabetische Proband wies ebenfalls am Ende der täglichen s.c. Insulintherapie hohe Werte für Gesamt-IA und für alle gemessenen Subklassen auf. Diese fielen allerdings nach dem Ende der s.c. Behandlung nur wenig und

haben sich in den ersten 6 Monaten nach Ende der s.c. Behandlung auf relativ hohe Werte eingependelt. In diesem Fall liegt die Höhe der IgG4 Antwort ebenfalls über der der IgG1 Antwort (siehe Abb 13,B).

Bei den 3 Probanden, die einen klinisch manifesten Diabetes entwickelten, trat dieser 0,6, 4,1 und 4,2 Jahre nach Beginn der prophylaktischen Insulintherapie auf. Auch hier war kein konstantes Muster im Verlauf der Antikörper und der Verteilung der Subklassen zu beobachten. Einer dieser Probanden entwickelte nach 6 Monaten, also am Ende der täglichen s.c. Insulintherapie einen klinisch manifesten Diabetes mellitus. Zu diesem Zeitpunkt waren alle Insulinantikörper-Subklassen hochtitrig nachweisbar (Verlauf nicht graphisch dargestellt). Bei dem zweiten diabetischen Probanden fielen die IA und deren Subklassen nach dem Ende der s.c. Insulintherapie kontinuierlich ab. Die einzelnen Subklassen waren bei Diabetesmanifestation nicht mehr nachweisbar, die Gesamt-IA Konzentration war noch relativ hoch, fiel jedoch weiterhin ab (siehe Abb.13,C). Der dritte Proband (Abb. 13D) entwickelte Diabetes zu einem Zeitpunkt, da alle IA-Subklassen nachweisbar waren. In der Gesamt-IA Konzentration war vor der Manifestation keine Änderung aufgetreten. IgG4-IA stiegen bei diesem Probanden am Ende der s.c. Insulintherapie weiter und waren bereits nach 6 Monaten die dominierende Subklasse.

#### **4.3.3 Muster der IA und deren Subklassen bei 7 unbehandelten Kontrollen**

Sieben nicht mit Insulin behandelte ICA-positive Verwandte ersten Grades von Typ1 Diabetikern dienten in der SIP-Studie als Kontrollen. Bei Eintritt in die Studie waren von diesen 7 Kontrollen 4 IAA-positiv. Zwei dieser Probanden entwickelten im Verlauf der Beobachtung eine schwache Autoimmunantwort gegen Insulin, und einer blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum IAA negativ. Alle 7 Kontrollpersonen entwickelten einen klinisch manifesten Diabetes mellitus zwischen 0,4 und 6,5 Jahren nach Eintritt in die Studie (nach 0,4, 0,4,

0.7, 2.6, 3.7, 4.2 und 6.5 Jahren). Die Verteilung der IAA Subklassen bis hin zur Diabetesmanifestation war bei den IAA-positiven Kontrollen inkonstant. Zwei wiesen bei Eintritt in die Studie IgG1-IAA und IgG4-IAA auf, die bis zur Diabetesmanifestation kontinuierlich fielen. Bei einer Person waren nur IgG1 Antikörper nachweisbar, die über den gesamten Beobachtungszeitraum in ihrer Höhe relativ konstant blieben. Bei einer weiteren Person waren bis hin zur Diabetesmanifestation IgG3-IAA die einzigen Autoantikörper, die auftraten. Von den beiden Kontrollpersonen, die erst im Laufe des Beobachtungszeitraums IAA entwickelten, produzierte eine erst kurz vor Diabetesmanifestation IgG1-IAA, der andere IgG4-IAA, ebenfalls kurz vor Diabetesmanifestation.

#### **4.4 GADA und IA2A und deren Subklassen bei Immunintervention mit Insulin bei neumanifestierten Typ 1 Diabetikern und bei Insulinprophylaxe bei prädiabetischen Verwandten 1. Grades von Typ 1 Diabetikern**

Um den Effekt einer Insulintherapie auf die Verteilung der Subklassen anderer Inselantikörper bei neumanifestierten Typ 1 Diabetikern zu evaluieren, untersuchten wir hier auch die IgG-Subklassen der GAD- und IA2-Antikörper bei Diabetesmanifestation und bis zu 41 Monate nach Insulintherapie. Wir untersuchten den Verlauf der Subklassen bei 14 GADA-positiven (6 Kinder und 8 Erwachsene) und bei 10 IA2A-positiven Patienten (7 Kinder und 3 Erwachsene). Weder bei Diabetesmanifestation, noch im Verlauf der Beobachtungszeit war eine typisches Antikörper-Subklassenmuster auszumachen. Von den 14 GADA+ Patienten wiesen 9 bei Diabetesmanifestation eine Autoimmunantwort auf, die hauptsächlich durch IgG1-Autoantikörper bestimmt war. Nach Manifestation fielen die Gesamt IgG und IgG1 bei 4 dieser 9 Patienten deutlich ab, wobei die IgG1 Antikörper im Verlauf dem der Gesamt-GADA ähnelten. Diese Beobachtung entspricht dem Verlauf der IAA bei unbehandelten BABYDIAB Kindern. Abb. 14 zeigt den Verlauf der IgG4-GADA bei 14 GADA+ neumanifestierten Typ 1 Diabetikern, die nach Diabetesmanifestation mit Insulin

behandelt wurden. Bei 3 der primär GADA+ Patienten waren von Anfang an IgG4 Autoantikörper gegen GAD primär GADA+ Patienten waren von Anfang an IgG4-GADA nachzuweisen (Abb.14A). Im weiteren Verlauf fielen bei diesen 3 Patienten die IgG4 unter die Nachweisgrenze. Auch bei diesen 3 IgG4-GADA+ Patienten sanken die Gesamt-IgG- und IgG1-GADA nach Diabetesmanifestation deutlich ab. Bei 2 anderen GADA+ Patienten wurden die IgG4 Antikörper erst im Verlauf der Beobachtung schwach positiv (Abb. 14A), während IgG1 Antikörper schon bei Diabetesmanifestation bestanden und in ihrer Höhe während des Beobachtungszeitraums relativ konstant bleiben.

Die Autoimmunantwort der IA-2A-positiven Patienten war in allen 10 Fällen ebenfalls durch die IgG1-Subklassen dominiert. Auch hier war das Muster der Immunantwort im weiteren Verlauf inkonstant. Bei 5 der 10 IA2A-positiven Patienten fielen Gesamt- und IgG1-GADA nach Diabetesmanifestation ab, bei 4 Patienten blieb die Höhe der Gesamt- und IgG1-IA2A über den Beobachtungszeitraum relativ konstant. Nur bei einer Person war ein Anstieg der Gesamt- und IgG1-IA2A zu beobachten. Nur ein Patient wies IgG4-IA2A bei Diabetesmanifestation auf (Abb.14C). Diese Antikörper fielen aber im weiteren Verlauf unter die Nachweisgrenze, während auch IgG1 und Gesamt-IA2A deutlich abfielen. Keiner der beobachteten Patienten entwickelte IgG4-IA2A.

Bei den Autoantikörper positiven Verwandten ersten Grades von Typ 1 Diabetikern, die während der prädiabetischen Phase mit Insulin behandelt wurden, bestand die Immunantwort gegen GAD und IA2 fast ausschließlich aus IgG1-Antikörpern. Nur ein Proband wies IgG4-IA2A (Abb.14D) auf, die von Anfang an bestanden und über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant blieben. Bei den Subklassen der GADA waren bis 3 Jahren nach dem Start der Insulinprophylaxe keine IgG4-GADA messbar (Abb.14B).

Abb. 14

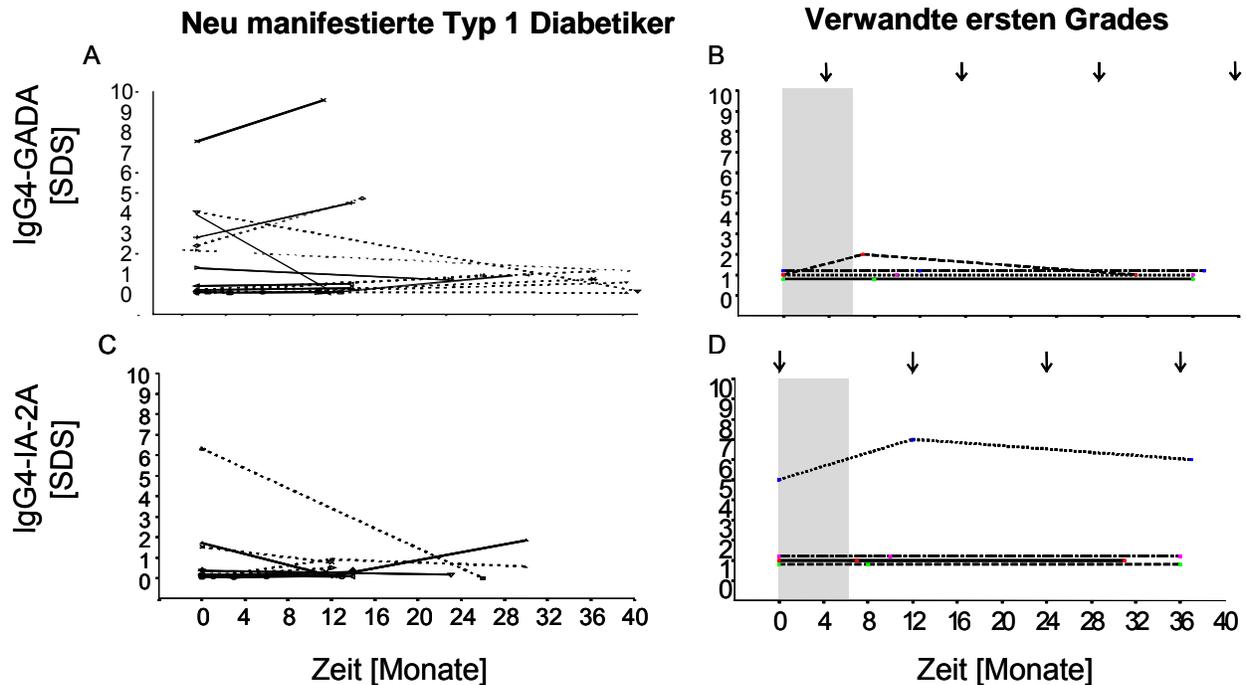


Abb. 14 zeigt den Verlauf von IgG4-GADA (A,B) und IgG4-IA2A (C,D) bei Patienten mit neu manifestem Diabetes mellitus (A,C), die mit i.v. plus s.c., oder nur mit s.c. Insulin behandelt wurden und bei Verwandten ersten Grades von Typ 1 Diabetikern (B,D), die alle 12 Monate mit 7 tägigen i.v. Insulingaben (Pfeile) und mit 6 monatigen s.c. Insulingaben (grau unterlegt) behandelt wurden. Die IgG4-Antikörper Subklassen in Standardabweichungen sind auf der y-Achse logarithmisch aufgetragen.

## 4.5 Entwicklung der spontanen humoralen Autoimmunantwort gegen Insulin bei unbehandelten NOD-Mäusen

### 4.5.1 Verteilung der Insulinautoantikörper

In der vorliegenden Arbeit wurde die spontane humorale Autoimmunantwort gegen Insulin in der NOD-Maus mit Hilfe eines neuen Radioimmunoassays untersucht. Zunächst wurde die Prävalenz und Höhe der IAA und IAA-Subklassen in 30 unbehandelten NOD-Mäusen bestimmt, denen unabhängig von Alter, Geschlecht und Diabetesmanifestation je eine Blutprobe entnommen

wurde (Gruppe 1a). Zum Zeitpunkt der Blutentnahme waren diese Mäuse zwischen 2,5 und 31,4 Wochen alt. Abbildung 15 zeigt die Prävalenz und Höhe der IAA bei unbehandelten NOD-Kontrollmäusen der Gruppe 1a. Auf der x-Achse ist das Alter der NOD-Mäuse bei Blutentnahme aufgetragen, auf der y-Achse die Höhe der IAA-Titer in units. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze für Positivität. Von 30 unbehandelten NOD-Mäusen der Gruppe 1a wiesen 33,3% (n=10) Insulinautoantikörper (IAA) auf. Die IAA-Titer variierten stark und lagen bei manchen Tieren extrem hoch (173 bis 3026 units, siehe Abb. 15).

Abb.15

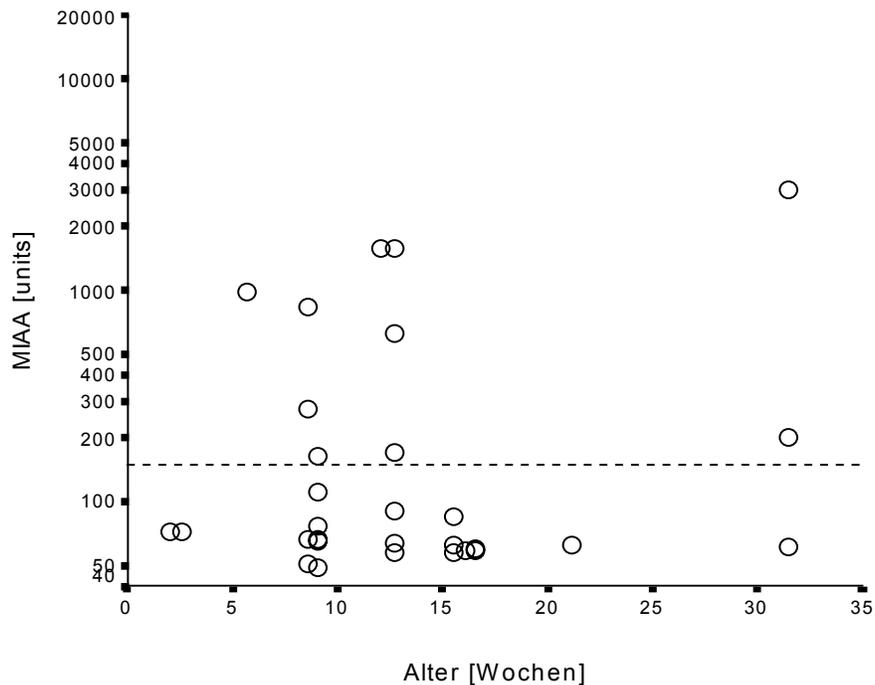


Abb. 15 zeigt Prävalenz und Höhe der IAA bei unbehandelten NOD-Kontrollmäusen der Gruppe 1a. Jeder Kreis kennzeichnet eine Maus. Allen Mäusen wurde unabhängig von Alter, Geschlecht und Diabetesmanifestation einmalig Blut entnommen. Auf der y-Achse sind die IAA-Titer in units logarithmisch angegeben. Die x-Achse zeigt das Alter der Mäuse in Wochen linear. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze für Positivität der IAA.

Teilt man die Gruppe 1a in Abhängigkeit vom Alter der Mäuse in 2 Gruppen, eine von 0 - 13,9 Wochen, eine von 14 - 38 Wochen und betrachtete die IAA getrennt

nach diesen Altersgruppen, ergab sich für die Mäuse < 14 Wochen eine Prävalenz von 40% (8 IAA+ von n=20). In der Gruppe der  $\geq 14$  Wochen alten Mäusen ergab sich eine Prävalenz von 20% (2 IAA+ von n=10). Die jüngste IAA-positive Maus (Nr. 10) dieser Gruppe war 5,6 Wochen alt und wies sehr hohe IAA-Titer auf (996 units). Allerdings wies auch eine Maus im Alter von 32 Wochen sehr hohe IAA- Titer auf (3026 units).

Weiterhin wurde der Verlauf, die Prävalenz und die Höhe der IAA und IAA-Subklassen bei 17 unbehandelten NOD-Mäusen im Alter von 5 bis 38 Wochen (Gruppe 1b) ermittelt. Jeder Maus dieser Gruppe wurde in diesem Zeitraum 4x Blut entnommen. Die Abbildung 16 zeigt die Höhe der IAA-Spitzenwerte bei 17 unbehandelten NOD-Mäusen der Gruppe 1b. Auf der y-Achse ist die Höhe der IAA-Titer in units dargestellt. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze für Positivität. Bei 29,4% (n=5) dieser 17 NOD-Mäuse der Gruppe 1b konnten in mindestens einer Blutprobe Insulinautoantikörper nachgewiesen werden. Die Höhe der IAA reichte hier von 165 bis 3644 units. Wiederrum ist bemerkenswert, dass bei einzelnen Mäusen sehr hohe Insulinautoantikörper gefunden wurden.

Abb.16

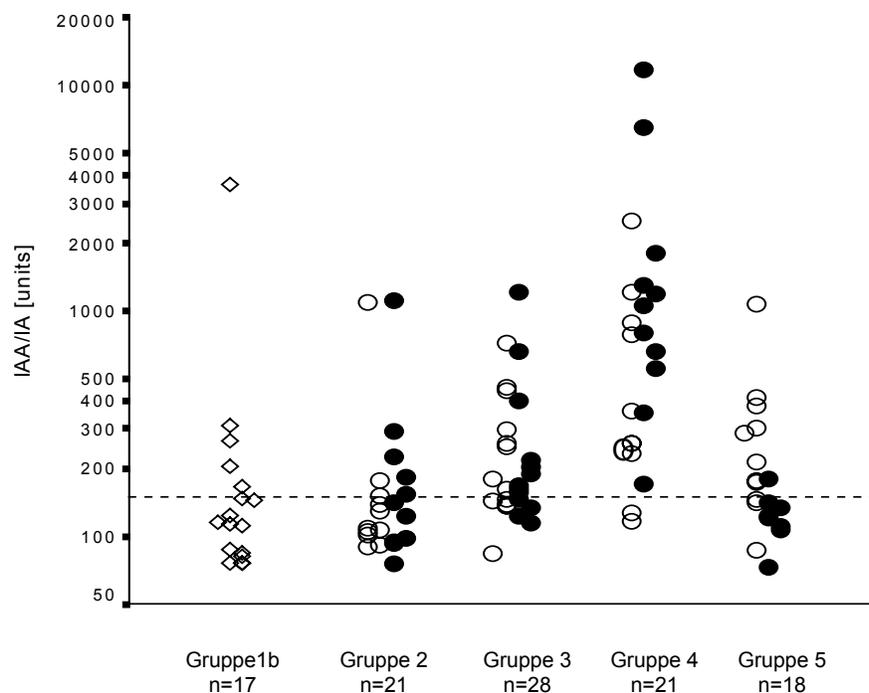


Abb. 16 zeigt IAA/IA-Spitzenwerte. Gruppe 1b: unbehandelte NOD-Kontrollmäusen. Die Gruppe 2 erhielt Impfungen mit Adjuvans, Gruppe 3 mit Adjuvans und 0,25 IE Insulin, Gruppe 4 mit Adjuvans und 4 IE Insulin. Die Gruppe 5: neugeborene NOD-Mäusen, die mit 0,1 IE Insulin und Adjuvans behandelt wurden. Jeder Maus wurde innerhalb des Beobachtungszeitraums mind. 3x Blut entnommen. Die Mäuse waren bei der ersten Blutentnahme mindestens 4 Wochen, bei der letzten Blutentnahme höchstens 38 Wochen alt. Bei den Gruppen 2-5 kennzeichnen die leeren Kreise Mäuse bei denen DT, die schwarzen Punkte Mäuse, bei denen IFA als Adjuvans genutzt wurde. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze für Positivität der IA-/IAA. Auf der y-Achse sind die I(A)A in units logarithmisch dargestellt.

Abb. 17 zeigt den Verlauf der IAA bei 5/17 NOD-Mäusen der Gruppe 1b, die während des Beobachtungszeitraums Autoantikörper gegen Insulin entwickelten. n=2 (11,8%) waren bei Erstmanifestation der IAA jünger als 14 Wochen. Die 3 anderen (12,6%) waren bei erstmaliger IAA-Manifestation  $\geq$  14 Wochen. Die jüngste Maus mit positiven IAA war in dieser Gruppe 5 Wochen alt (IAA= 203 units). Bei 8 Mäusen der Gruppe 1b wurde eine späte Blutprobe ( $\geq$  30 Wochen) entnommen, von diesen wies keine positive IAA auf. Der Verlauf der IAA variierte sehr stark. 4/5 Mäuse, die IAA innerhalb des Beobachtungszeitraums von 4 – 40 Wochen entwickelten, wiesen schon sehr früh (5 – 12 Wochen) IAA auf. In Abbildung 14 zeigt, dass bei einer Maus (Nr. 813) ein starker und plötzlicher IAA-Anstieg auf einen Spitzenwert (3644 units) im Alter von 12 Wochen auftrat, gefolgt von einem deutlichen IAA-Abfall. Kurz darauf stiegen die IAA wieder an und erreichten einen weiteren Spitzenwert im Alter von 18 Wochen. Die Maus verstarb bei dieser Blutentnahme, so dass der weitere IAA-Verlauf nicht mehr zu bestimmen war. Eine andere Maus (Nr. 378), zeigte ebenfalls einen frühen starken Autoantikörperanstieg. Die IAA erreichten im Alter von 14 Wochen einen Spitzenwert, fielen danach wieder ab und waren im Alter von 38 Wochen nicht mehr nachweisbar. Eine Maus (Nr. 809) wies schon in der ersten Blutprobe im Alter von 5 Wochen IAA in Höhe von 203 units auf. Die IAA fielen danach ab und waren im Alter von 10 Wochen nicht mehr nachweisbar.

Nur eine Maus (Nr. 795) entwickelte erst sehr spät messbare IAA. In den beiden ersten entnommenen Blutproben waren noch keine IAA nachzuweisen, in der dritten Blutprobe im Alter von 27 Wochen konnten wir schwach positive IAA (165

units) messen. Diese Maus war die einzige NOD-Maus aus dieser Gruppe, bei der wir im Alter > 20 Wochen noch Autoantikörper gegen Insulin nachweisen konnten (Abb. 17).

Abb.17

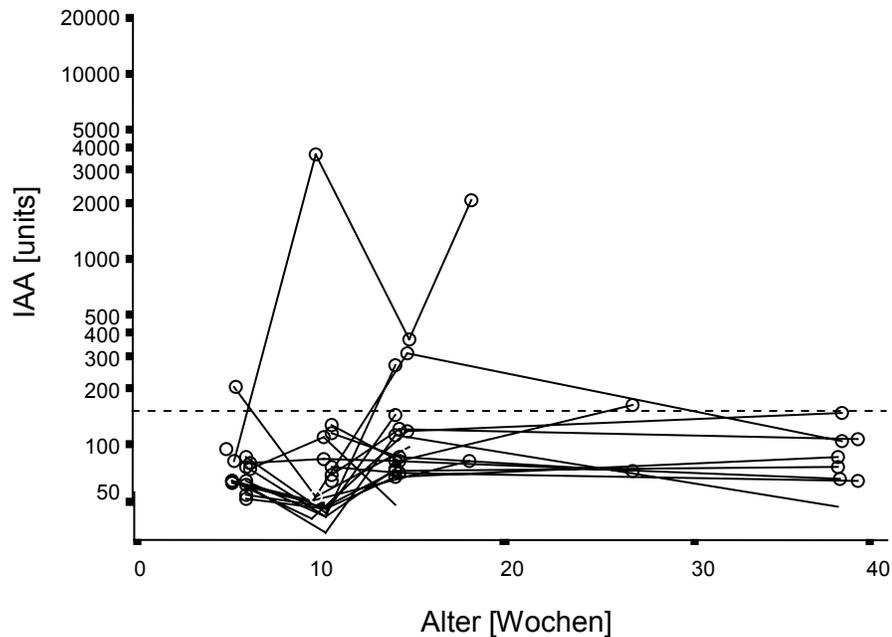


Abb. 17 zeigt den Verlauf der Insulinautoantikörper bei unbehandelten NOD-Mäusen der Gruppe 1b (n=17), denen im Alter zwischen 4 und 38 Wochen mindestens 3 Blutproben entnommen wurden. Auf der y-Achse sind die IAA in units logarithmisch dargestellt, die gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze für Positivität bei 150 units.

#### 4.5.2 Verteilung der Insulin IgG-Antikörper-Subklassen bei unbehandelten NOD-Mäusen

Unabhängig von Alter, Geschlecht oder Vorhandensein eines manifesten Diabetes bestimmten wir IgG-Antikörper-Subklassen gegen Insulin in den Blutproben, bei denen im Radioimmunoassay Insulinautoantikörper (> 150 units) nachzuweisen waren. Abb. 16 zeigt IgG-Subklassen der IAA bei IAA-positiven NOD-Mäusen der Gruppe 1a. Von 10 IAA-positiven NOD-Mäusen der Gruppe 1a wiesen 4 (40%) Autoantikörper der Subklasse IgG1 auf. Nur eine IAA-positive

Maus wies im Alter von 12 Wochen Insulinantikörper der Subklassen IgG2a/c auf, diese Maus hatte keine messbare IgG1-Antwort gegen Insulin.

Abb.18

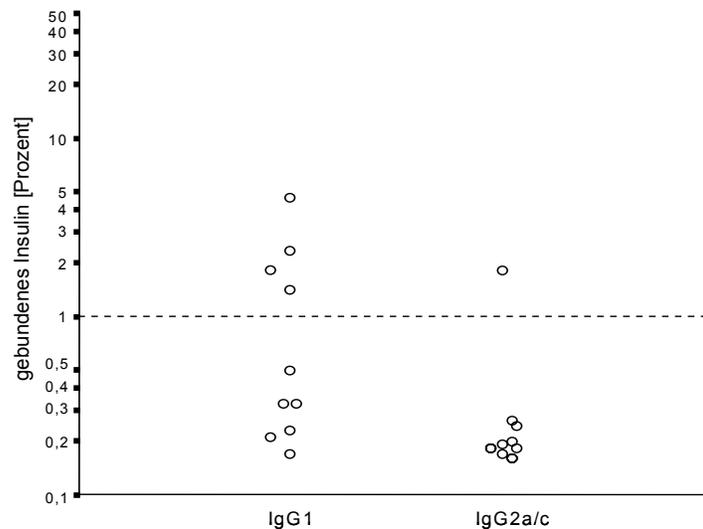


Abb. 18: Darstellung der IAA-Subklassen bei 10 IAA-positiven Mäusen der Gruppe 1a (Kontrollen), denen unabhängig von Alter, Geschlecht oder Diabetesmanifestation eine Blutprobe entnommen wurde. Auf der y-Achse ist die Höhe der IgG-Subklassen logarithmisch dargestellt. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze für Positivität bei 1% gebundenes Insulin

Abbildung 19 zeigt die Verteilung der IgG-Subklassen gegen Insulin bei 5/17 IAA-positiven NOD-Mäusen der Gruppe 1b, denen mehrere Blutproben im Verlauf entnommen wurden. Hier sind die IgG-Subklassen der Blutprobe mit dem höchsten Gesamt-IAA-Titer dargestellt. 2 der 5 IAA-positiven Mäuse wiesen IAA der Subklasse IgG1 auf. Bei beiden Mäusen war zu diesem Zeitpunkt eine starke Gesamt-IAA Produktion vorhanden. Bei einer Maus waren zusätzlich IAA der Subklasse IgG2b (Nr. 813) zu messen. Diese Maus hatte zu diesem Zeitpunkt eine extrem hohe Gesamt- und IgG1-IAA Produktion.

Keine Maus der Gruppe 1b wies Antikörper-Subklassen der Gruppe IgG2a/c gegen Insulin auf.

Die spontane humorale Immunantwort gegen Insulin in der gesamten Gruppe 1 war IgG1 dominiert. 6 der 15 (40%) IAA-positiven NOD-Mäuse der Gruppen 1a

und 1b wiesen Antikörper der Subklasse IgG1 auf. IgG2b waren in 1 von 5 IAA-positiven Mäusen (20%) nachweisbar. Diese Maus (Nr. 813) zeigte eine frühe, starke Gesamt-IgG Produktion, die IgG1 dominiert war. Die Gesamt-IAA und IAA-Subklassen fielen danach deutlich ab und stiegen im Alter von 18 Wochen auf einen zweiten Spitzenwert an. Dieser zweite IAA-Anstieg war IgG1- und IgG2b-IAA dominiert.

Abb.19

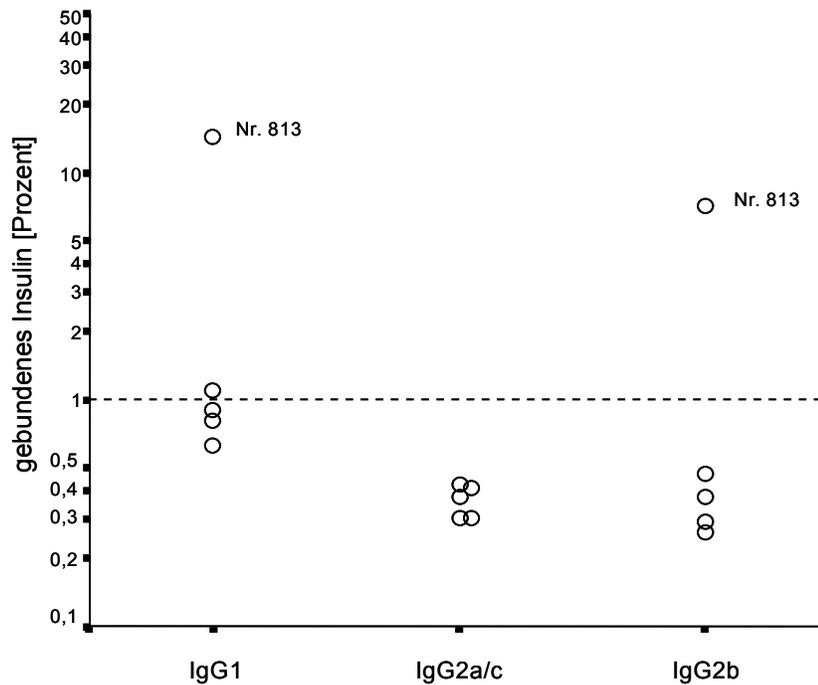


Abb. 19: Darstellung der IAA-Subklassen bei den 5 IAA-positiven NOD-Mäusen der Gruppe 1b (Kontrollen). Den Mäusen der Gruppe 1b wurden im Verlauf der Studie mind. 3 Blutproben entnommen. Bei positiven Gesamt-IAA wurden in der Blutprobe IAA-Subklassen bestimmt. Bei Mäusen mit mehreren positiven Blutproben im Verlauf der Beobachtung, wurden die Subklassen der Blutprobe mit den höchsten Gesamt-IAA abgebildet. Auf der y-Achse ist die Höhe der IgG-Subklassen logarithmisch dargestellt. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze für Positivität bei 1% gebundenem Insulin.

## **4.6 Humorale Immunantwort gegen Insulin nach Immunintervention**

In dieser Arbeit wurden (Auto)antikörper gegen Insulin nach prophylaktischer Immunintervention bestimmt und mit der Verteilung der IAA bei unbehandelten NOD-Mäusen verglichen. Abb. 16 zeigt I(A)A-Spitzenwerte bei unbehandelten, bzw. mit Adjuvans allein und Adjuvans plus Insulin behandelten NOD-Mäusen. Gruppe 1b beinhaltet unbehandelte NOD-Mäuse, Gruppe 2 erhielt Impfungen mit Adjuvans alleine (IFA oder Diphtherie-Tetanus-Toxoid), Gruppe 3 erhielt Impfungen mit 0,25 IE Insulin und Adjuvans, Gruppe 4 mit 4IE Insulin und Adjuvans und Gruppe 5 bestand aus neugeborenen NOD-Mäusen, die mit 0,1IE Insulin und Adjuvans behandelt wurden. Jeder Punkt kennzeichnet den I(A)A-Spitzenwert einer Maus. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze für Positivität. 29,4% der unbehandelten NOD-Mäuse der Gruppe 1b (5/17) wiesen Autoantikörper gegen Insulin auf. In der Gruppe 2 der nur mit Adjuvans behandelten NOD-Mäuse waren bei 36,4% (8/25) Mäusen IAA nachweisbar, in der Gruppe 3 61,5% (16/28). In der Höhe der I(A)A-Titer war bei Gruppe 1 – 3 kein Unterschied auszumachen. Die maximal gemessenen I(A)A-Titer lagen in der Gruppe 1b der unbehandelten NOD-Mäuse sogar über den höchsten Titern der Gruppe 2 und 3. Der höchste gemessene I(A)A-Titer lag in der Gruppe 1b bei 3644 units, in der Gruppe 2 bei 1120 units, in Gruppe 3 bei 1231 units). Auch in Gruppe 5 der neugeborenen NOD-Mäuse unterschied sich die Prävalenz und Höhe der IA nicht wesentlich von der Gruppe 1b. 9/18 (50%) NOD-Mäusen der Gruppe 5 entwickelten messbare Antikörper gegen Insulin, der höchste gemessene Antikörper-Spitzenwert dieser Gruppe lag bei 1075 units.

### **4.6.1 IAA- und IAA-Subklassen bei Immunintervention mit Adjuvans alleine**

21 NOD-Mäuse dieser Studie wurden mit Injektionen von Immunadjuvans alleine behandelt. Davon erhielten 10 NOD-Mäuse (Gruppe 2a) subkutanen Injektionen von DT (Diphtherie-Tetanus-Toxoid) und 11 (Gruppe 2b) Injektionen von

Incomplete Freund's Adjuvans (IFA) (siehe Methoden). 8/21 mit Immun-Adjuvans behandelten NOD-Mäusen (36,4%) wiesen bis zum Alter von ca. 40 Wochen Insulinautoantikörper in mindestens einer Blutprobe auf. In der mit DT behandelten Gruppe wurden bei 3/10 Mäusen (27,3%) IAA gemessen, in der mit IFA behandelten Gruppe bei 5/11 Mäusen (45,5%). Die Höhe der Insulinautoantikörper variierte in der mit Adjuvans behandelten Gruppe stark und reichte von 151,7 units bis 1120 units in den IAA-positiven NOD-Mäusen (Abb. 15).

Abb. 20 zeigt den Verlauf der Insulinautoantikörper in der Gruppe 2 der mit Immun-Adjuvans behandelten NOD-Mäuse. Auch in dieser Gruppe waren die gemessenen Insulinautoantikörper transient (siehe Abb.18). Oft zeigten die IAA einen starken und raschen Anstieg auf einen Spitzenwert und fielen danach wieder unter die Nachweisgrenze. Auffallend war in dieser Gruppe, dass 4/6 Mäusen mit deutlicher Autoimmunantwort gegen Insulin einen Spitzenwert bei 14 Wochen aufwiesen. Die Höhe der IAA in diesen Blutproben lag zwischen 177 und 1094 units. Die IAA fielen danach wieder deutlich ab und waren in der nächsten Blutprobe im Alter von 19 bis 24 Wochen in allen 4 Mäusen nicht mehr nachweisbar. Bei 2 weiteren Mäusen aus dieser Gruppe, bei denen IAA nachweisbar waren, stiegen die Autoantikörper erst später und sehr viel schwächer an. Sie wurden bei der einen Maus erst im Alter von 22 Wochen, bei der anderen im Alter von 38 Wochen messbar und lagen zwischen 154 und 185 units.

Abb.20

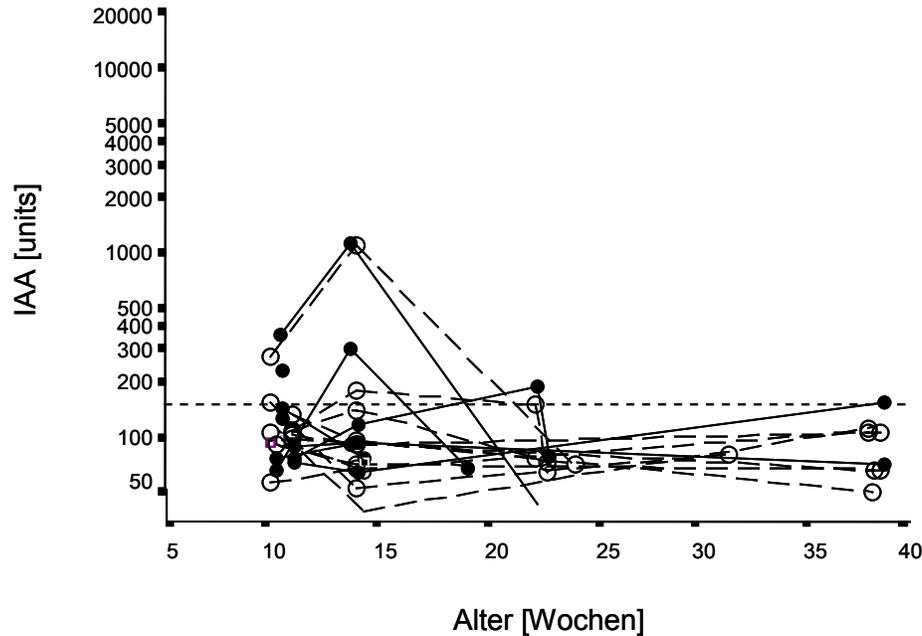


Abb. 20 zeigt den Verlauf der Insulinautoantikörper bei NOD-Mäusen der Gruppe 2 (n=21), die mit 4 subkutanen Injektionen im Alter von 4, 8, 12 und 24 Wochen mit Immunadjuvans behandelt wurden. Auf der y-Achse sind die IAA in units logarithmisch dargestellt, die gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze für Positivität bei 150 units. Die schwarzen Kreise kennzeichnen Mäuse, die mit IFA (n=11), die weißen Kreise Mäuse, die mit DT (n=10) behandelt wurden.

Abb. 21 zeigt die IAA-Subklassen bei mit Adjuvans alleine behandelten NOD-Mäusen (Gruppe 2) mit positiven Gesamt-IAA. Zwei Mäuse aus der mit Adjuvans behandelten Gruppe 2 entwickelten messbare IgG-Subklassen gegen Insulin. Eine Maus war mit DT und eine mit IFA behandelt worden. Beide Mäuse waren mit 10 Wochen leicht IAA-positiv, zeigten dann einen starken IAA Anstieg und erreichten mit 14 Wochen einen Spitzenwert. Dieser starke IAA Anstieg war IgG1 und IgG2b dominiert. Bei einer der beiden Mäuse lagen die IgG2b Titer über den IgG1, bei der anderen dominierten IgG1. Bei beiden Mäusen fielen die IAA und IAA-Subklassen im Laufe der Beobachtung wieder deutlich ab und waren in der folgenden Blutprobe nicht mehr nachweisbar. IgG2a/c war in keiner der mit Adjuvans behandelten Gruppe messbar.

Abb 21

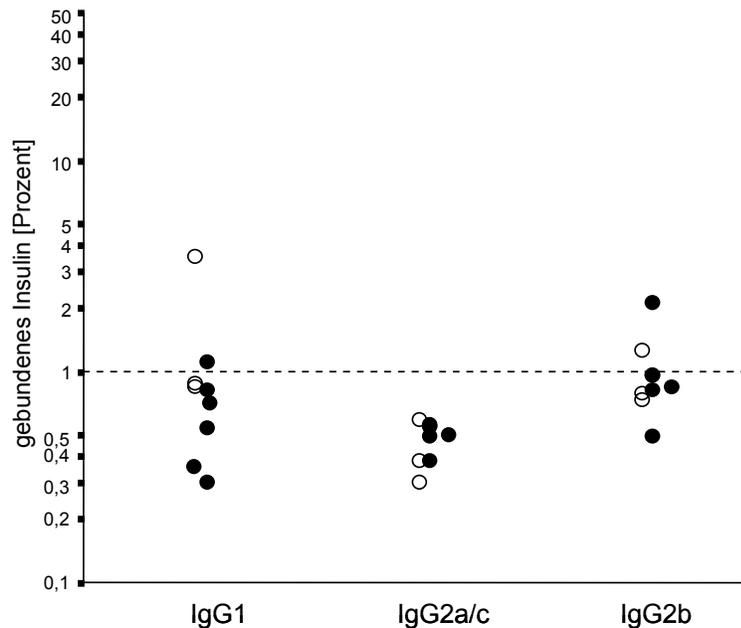


Abb. 21: Darstellung der I(A)A- Subklassen bei MI(A)A-positiven NOD-Mäusen der Gruppen 2 (n =8 IAA+). Die Mäuse der Gruppe 2 erhielten jeweils 4 Impfungen mit Immunadjuvans. Jeder Maus wurden mindestens 4 Blutproben entnommen. Bei jeder Maus, die innerhalb des Beobachtungszeitraumes IAA entwickelte, bestimmten wir IAA-IgG-Subklassen. Die Subklassen der Blutprobe mit der höchsten Gesamt-IAA Konzentration sind hier abgebildet. Die weißen Kreise kennzeichnen Mäuse, bei denen DT als Immunadjuvans verwendet wurde, die schwarzen Kreise Mäuse, bei denen IFA als Immunadjuvans verwendet wurde. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze für Positivität der I(A)A-IgG-Subklassen. Die Höhe der I(A)A-Subklassen in Prozent gebundenes Insulin ist logarithmisch dargestellt.

#### 4.6.2 Insulinantikörper nach Immunintervention mit Insulin

Achtundzwanzig NOD-Mäuse unserer Studie wurden im Alter von 4 und 8 Wochen mit 0,25 IE Insulin in Kombination mit Immunadjuvans behandelt (Gruppe 3). Von diesen 28 Mäusen erhielten 15 DT und 13 IFA als Immunadjuvans. 16/28 (61,53%) Mäuse entwickelten im Verlauf Antikörper gegen Insulin (57,1% in der Gruppe mit DT, 66,7% in der Gruppe mit IFA) (siehe Abb. 17). Weitere 21 NOD-Mäuse wurden im Alter von 4, 8, 12 und 24 Wochen mit 4 IE subkutanem Insulin in Kombination mit Immunadjuvans behandelt, davon 10 mit DT und 10 mit IFA). Aus dieser Gruppe (Gruppe 4) entwickelten 19

Mäuse (90%) Insulinantikörper (77,8% in der Gruppe mit DT, 100% in der Gruppe mit IFA). Die Höhe der IA in Gruppe 4 lag deutlich über der in Gruppe 3 (Median= 163,3 units, Spanne: 48,3 – 1230,5 units in Gruppe 3, Median = 792,2 units, Spanne: 116,8 – 11921,1 units).

Der zeitliche Verlauf der Insulinantikörper über den gesamten Beobachtungszeitraum war vor allem in der Gruppe 3 (0,25 IE Insulin) sehr inhomogen. Bei Mäusen, die bereits kurz nach der ersten Impfung IA entwickelten, waren diese oft transient und fielen Verlauf wieder unter die Nachweisgrenze. Bei anderen Mäusen zeigten sie erst einen langsamen Anstieg und wurden zu einem späteren Zeitpunkt nachweisbar.

Abb.22

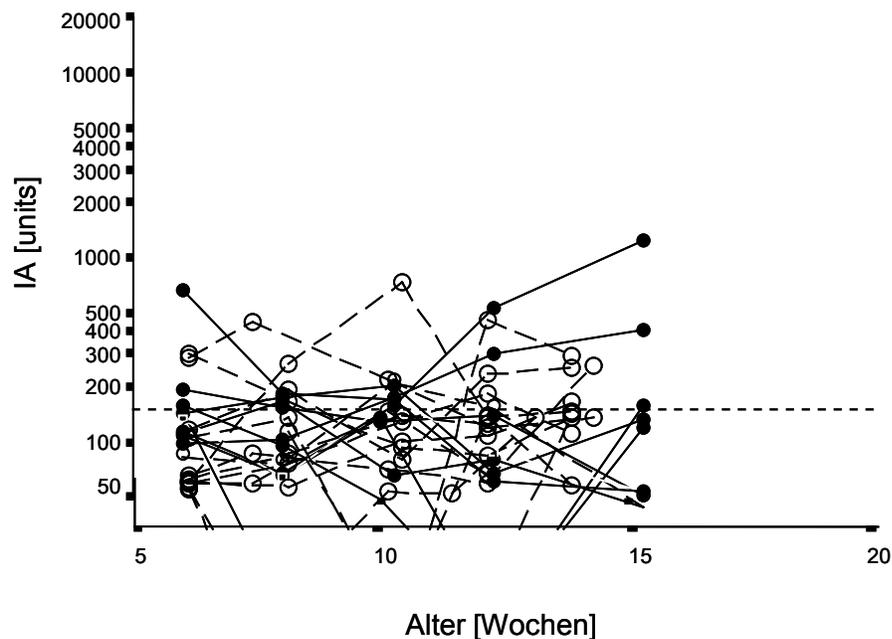


Abb. 22 zeigt den Verlauf der Insulinantikörper bei NOD-Mäusen der Gruppe 3 (n=28), die mit subkutanen Injektionen von 0,25 IE Insulin und Immunadjuvans behandelt wurden. Im Alter zwischen 4 und 38 Wochen wurden ihnen mindestens 3 Blutproben entnommen. Auf der y-Achse sind die IAA in units logarithmisch dargestellt, die gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze für Positivität bei 150 units. Die schwarzen Kreise kennzeichnen Mäuse, die mit IFA (n=13), die weißen Kreise Mäuse, die mit DT (n=15) behandelt wurden.

Wie schon bei den oben beschriebenen Gruppen, war auch in Gruppe 4 (Abb. 23), bei Immunintervention mit 4 IE Insulin und Adjuvans, der Verlauf der Insulinantikörper variabel und starken Schwankungen unterworfen. So zeigte eine Maus im Alter von 12 Wochen (erste Blutprobe) extrem hohe IA-Titer (11921,1 units). Diese fielen danach stark ab, um auf einem deutlich niedrigeren Niveau (400 – 500 units) relativ stabil zu bleiben. Bei 11 Mäusen der Gruppe 4 (55%) war ein früher Antikörperanstieg zu beobachten. In diesen Mäusen waren die IA in der ersten Blutprobe mit 10 Wochen schwach positiv oder negativ, sie erreichten im Alter von 14 - 15 Wochen einen Spitzenwert (Median: 792 units, Spanne: 170,7 – 2547 units). Von diesem Spitzenwert aus fielen sie in 6 Mäusen (6/9 = 66,7%) trotz weiterer Impfungen wieder ab und waren in 4 Mäusen (44,4%) in der folgenden Blutprobe im Alter von 22 – 38 Wochen nicht mehr nachweisbar. In 2 weiteren Mäusen stiegen die IA weiter leicht an und erreichten im Alter von 22 Wochen Werte von 359 und 670 units.

Abb.23

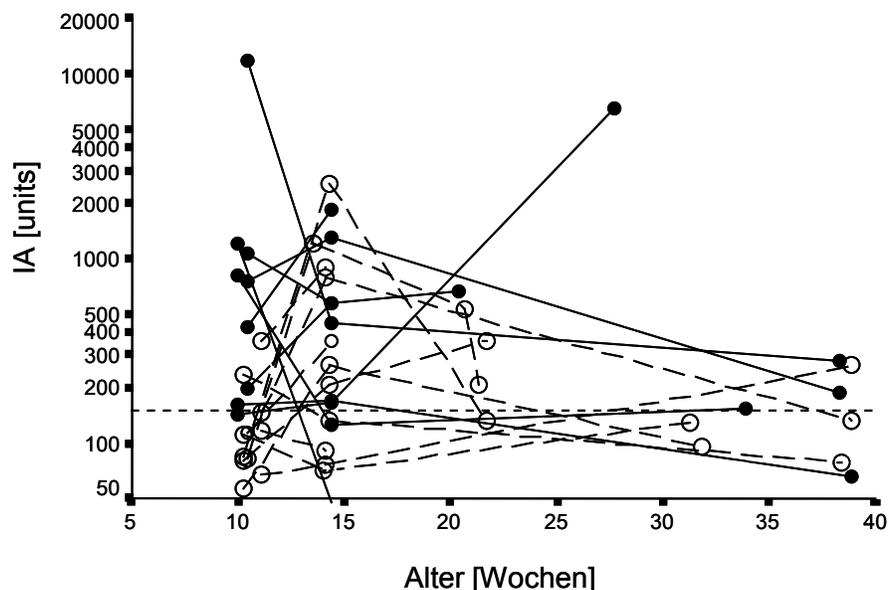


Abb. 23 zeigt den Verlauf der Insulinantikörper bei NOD-Mäusen der Gruppe 4 (n=21), die mit subkutanen Injektionen von 4 IE Insulin und Immunadjuvans behandelt wurden. Im Alter zwischen 4 und 38 Wochen wurden ihnen mindestens 3 Blutproben entnommen. Auf der y-Achse sind die IAA in units logarithmisch dargestellt, die gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze für Positivität bei 150 units. Die schwarzen Kreise kennzeichnen Mäuse, die mit IFA (n=11), die weißen Kreise Mäuse, die mit DT (n=10) behandelt wurden.

#### 4.6.3 IA-Subklassen bei Immunintervention mit Insulin

In den mit 0,25 IE Insulin plus Adjuvans (Gruppe 3) behandelten NOD-Mäusen war die Immunantwort gegen Insulin IgG1-IA dominiert. 6 von 17 IA-positiven NOD-Mäusen wiesen IgG1-IA auf (35,3%). Keine dieser 17 NOD-Mäuse hatte Antikörper der Subklasse IgG2a/c. Dagegen war bei keiner von 8 IA-positiven NOD-Mäusen, bei denen IgG2b Antikörper bestimmt wurden, IgG2b-IA nachweisbar (siehe Abb. 22A). Auch die Verteilung der IgG-Subklassen in IA-positiven NOD-Mäusen, die mit höheren Insulindosen (4 IE) plus Adjuvans behandelt wurden (Gruppe 4) war hauptsächlich IgG1-IA dominiert (siehe Abb. 24B). 14 von 18 IA-positiven NOD-Mäusen (77,8%) wiesen IgG1-IA in mindestens einer Blutprobe im Laufe des Follow-up auf. Die Höhe der IgG1 war sehr variabel und lag zwischen 1,02 und 20,23 % gebundenes Insulin. In den Mäusen, die in mehreren Blutproben IgG1-IA gegen Insulin aufwiesen, ähnelte der Verlauf der IgG1-IA dem der Gesamt-IA.

Betrachtet man die IgG1-IA in der Gruppe 4 abhängig vom Immunadjuvans, waren 5/8 IA-positiven NOD-Mäusen (62,5%), die mit Insulin und DT behandelt wurden, IgG1-IA positiv. Von 11 IA-positiven NOD-Mäusen, die mit Insulin und IFA behandelt wurden, wiesen 8 Mäuse (72,7%) IgG1-IA auf. Analog dem Verlauf der Gesamt-IA lagen in dieser Gruppe auch die IgG1-IA Titer bei mit IFA behandelten Mäusen höher, als bei mit DT behandelten Mäusen. Der Median der IgG1-IA in den mit DT behandelten Mäusen lag bei 1,4% gebundenes Insulin (Spanne: 1,0% – 6,1%), in den mit IFA behandelten bei 4,6% (Spanne: 1,6% – 20,3%). 15,79% der IA-positiven NOD-Mäuse der Gruppe 4 wiesen IgG2b-IA auf. Die Höhe lag zwischen 2,8% (DT + Insulin) und 1,4% (IFA + Insulin) gebundenes Insulin (siehe Abb. 22B). Nur eine Maus der 19 IA-positiven NOD-Mäuse, bei denen die Subklassen gegen Insulin gemessen wurden, wies Antikörper der Subklasse IgG2a/c-IA auf (5,3%). Diese Maus war mit 4 IE Insulin und IFA behandelt worden. Sie wies im Alter von 10 Wochen bereits schwach positive Gesamt-IA auf, die Subklassen waren zu diesem Zeitpunkt nicht messbar. Im

Laufe des Follow-ups stiegen ihre Gesamt-IAA weiter an, die IgG1-IAA ähnelten im Verlauf den Gesamt-IAA. Mit 14 Wochen zeigte diese Maus allerdings eine starke IgG2a/c-IAA Antwort, die die IgG1-IAA überstiegen und in dieser Blutprobe die dominierende Subklasse darstellten. In der darauf folgenden Blutprobe (Alter = 20 Wochen) waren die IgG2a/c-IAA dieser Maus wieder unter die Nachweisgrenze gesunken, die IgG1-IAA waren weiter angestiegen und stellten die dominierende Subklasse dar. Diese Maus zeigte über den gesamten Zeitraum keine messbaren IgG2b-IAA.

Abb. 24A

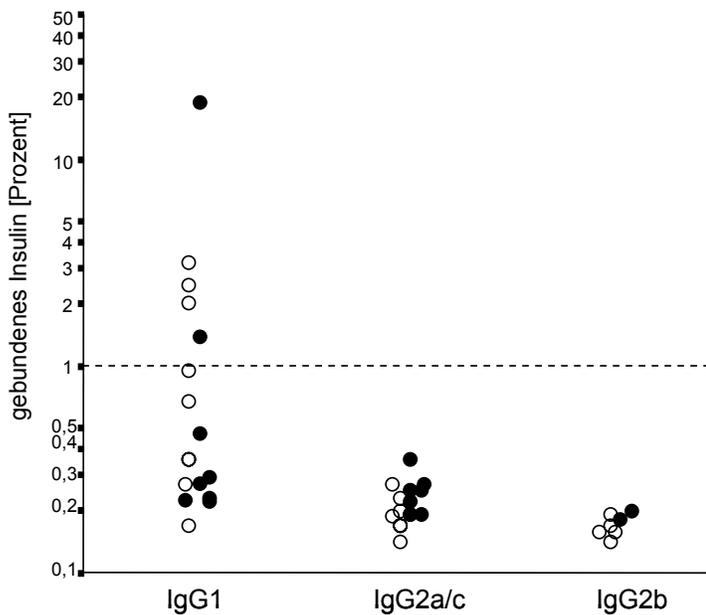
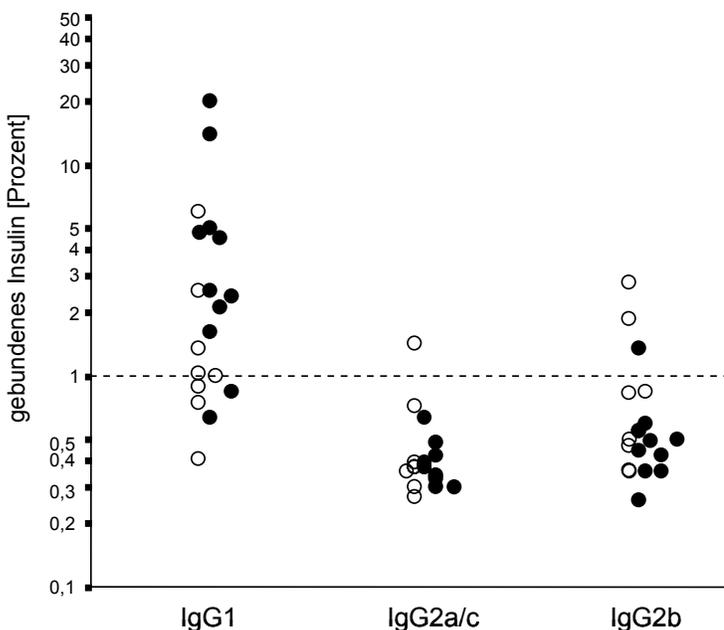


Abb. 24A+B: Darstellung der I(A)A-Subklassen bei MI(A)A-positiven NOD-Mäusen der Gruppen 3-4. Gruppe 3 (n = 16 IAA+) erhielt je 2 Impfungen mit Adjuvans und 0,25 IE Insulin. Abb. 24B: Gruppe 4 (n = 19 IAA+) erhielt je 4 Impfungen mit Adjuvans und 4 IE Insulin. Jeder Maus wurden mind. 4 Blutproben entnommen. Bei jeder Maus, die innerhalb des Beobachtungszeitraumes IAA entwickelte, bestimmten wir IAA-IgG-Subklassen. Die Subklassen der Blutprobe mit der höchsten Gesamt-IAA Konzentration sind hier abgebildet. Die weißen Kreise kennzeichnen Mäuse, bei denen DT als Immunadjuvans verwendet wurde, die schwarzen Kreise Mäuse, bei denen IFA als Immunadjuvans verwendet wurde. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze für Positivität der I(A)A-IgG-Subklassen.

Abb. 24B



#### 4.6.4 Verteilung der IA- und IA-Subklassen in neugeborenen NOD-Mäusen

In der Gruppe der neugeborenen NOD-Mäuse, die ab dem 5. Lebenstag mit subkutanen Insulininjektionen in Kombination mit IFA oder DT als Immunadjuvans behandelt wurden, wiesen 9 von 18 (50%) NOD-Mäusen messbare Antikörper gegen Insulin im Laufe des Follow-up auf (siehe Abb. 15 und 23). Eine (14,3%) dieser IA-positiven Mäuse gehörte zu der Gruppe von 7 neugeborenen NOD-Mäusen, die mit 0,1 IE Insulin und IFA behandelt wurden. Von den 11 mit Insulin und DT behandelten NOD-Mäusen wiesen 8 Mäuse messbare IA auf (72,7%). Im Gegensatz zu den älteren Mäusen der Gruppe 4, die eine stärkere Immunantwort auf die Impfung mit Insulin und IFA zeigten, war die Immunantwort bei Neugeborenen bei der Impfung mit Insulin und DT stärker ausgeprägt, als bei der Impfung mit Insulin und IFA.

Die IA-Spitzenwerte der Gruppe 5 lagen im Median bei 298,5 units (Spanne: 210 – 1075 units).

Betrachtet man den Verlauf der IA in der Gruppe der neugeborenen NOD-Mäuse (Abb. 25), fällt eine sehr inhomogene Immunantwort auf die exogenen Insulingaben auf. Bei 4/9 NOD-Mäusen, die im Verlauf I(A)A entwickelten, waren diese schon im Alter von 4 - 6 Wochen nachweisbar (Median: 187 units, Spanne: 165 – 380 units), fielen jedoch danach bei 3/4 wieder unter die Nachweisgrenze, ohne bis zu einem Alter von 16 Wochen noch einmal anzusteigen. Bei 6/9 NOD-Mäusen, die im Verlauf I(A)A entwickelten, waren I(A)A im Alter von 16 Wochen nachweisbar (Median: 260 units, Spanne: 175 – 1175 units). Von diesen 6 Mäusen wiesen 2 bereits im Alter von 6 und 10 Wochen messbare I(A)A auf. Diese waren bis zum Alter von 12 Wochen konstant, im Alter von 16 Wochen jedoch deutlich angestiegen. Bei 3/6 Mäusen mit I(A)A im Alter von 16 Wochen, waren die I(A)A erst kurz davor angestiegen, die Mäuse wiesen in der Blutprobe mit 16 Wochen erstmals messbare I(A)A auf. Eine Maus wies ab dem Alter von 9

Wochen leicht positive IAA auf, die bis zum Alter von 16 Wochen konstant blieben.

Im Gegensatz zu anderen beschriebenen Gruppen war in der Gruppe der neugeborenen NOD-Mäuse also selten ein früher Antikörperpeak zu finden, sondern die Antikörperproduktion schien im Verlauf zuzunehmen. Vor allem im Alter zwischen 12 und 16 Wochen war bei den NOD-Mäusen, die als Neugeborenen mit Insulin und Adjuvans behandelt worden waren ein I(A)A-Anstieg messbar.

Nur bei einer Maus der mit Insulin und IFA behandelten neugeborenen NOD-Mäuse konnten wir I(A)A nachweisen. Diese Maus zeigte im Alter von 6 Wochen schwach positive I(A)A (182 units), die danach wieder abfielen und schon in der darauf folgenden Blutprobe im Alter von 9 Wochen nicht mehr nachweisbar waren. Abb. 25

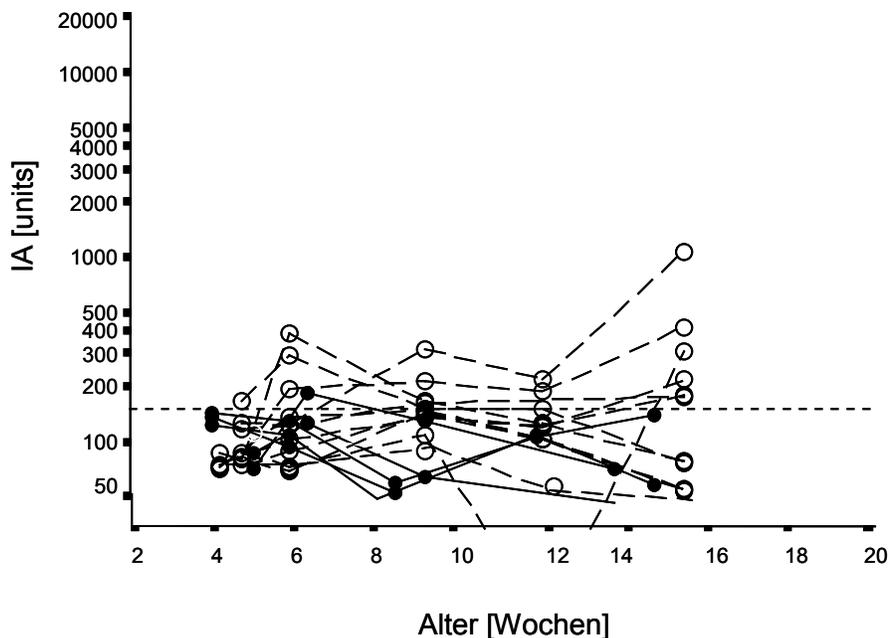


Abb. 25 zeigt den Verlauf der Insulinantikörper bei neugeborenen NOD-Mäusen der Gruppe 5 ( $n=18$ ), die mit subkutanen Injektionen von 0,1 IE Insulin und Immunadjuvans behandelt wurden. Im Alter zwischen 2 und 16 Wochen wurden ihnen mindestens 3 Blutproben entnommen. Auf der y-Achse sind die IAA in units logarithmisch dargestellt, die gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze für Positivität bei 150 units. Die schwarzen Kreise kennzeichnen Mäuse, die mit IFA ( $n=7$ ), die weißen Kreise Mäuse, die mit DT ( $n=11$ ) behandelt wurden.

Die Verteilung der Subklassen für die Gruppe der neugeborenen NOD-Mäuse ist in Abb. 24 dargestellt. Die Subklassen waren in dieser Gruppe ebenfalls IgG1 dominiert. Wir bestimmten IgG1, IgG2a/c und IgG2b-I(A)A-Subklassen in 8 von 9 IAA+ NOD-Mäusen (aus technischen Gründen konnten die Subklassen in einer Maus nicht bestimmt werden). 3 von 8 (37,5%) IAA-positiven NOD-Mäusen wiesen IA der Subklasse IgG1 auf (Median: 2,15% geb. Insulin, Spanne: 1,01% – 2,33% gebundenes Insulin). Von diesen Mäusen waren 2 mit Insulin und DT, eine mit Insulin und IFA behandelt worden. IgG2b-IA war in keiner Mäuse nachweisbar. Nur eine Maus zeigte messbare IgG2a/c-IA (Abb. 26). Diese Maus wies zu diesem Zeitpunkt, im Alter von 16 Wochen, hohe Gesamt-IA (1075 units) auf, die IgG1-IA dominiert waren (2,33% geb. Insulin). Die IgG2a/c-IA lagen bei 1,88 % gebundenes Insulin, IgG2b waren in dieser Blutprobe nicht nachweisbar.

Abb. 26

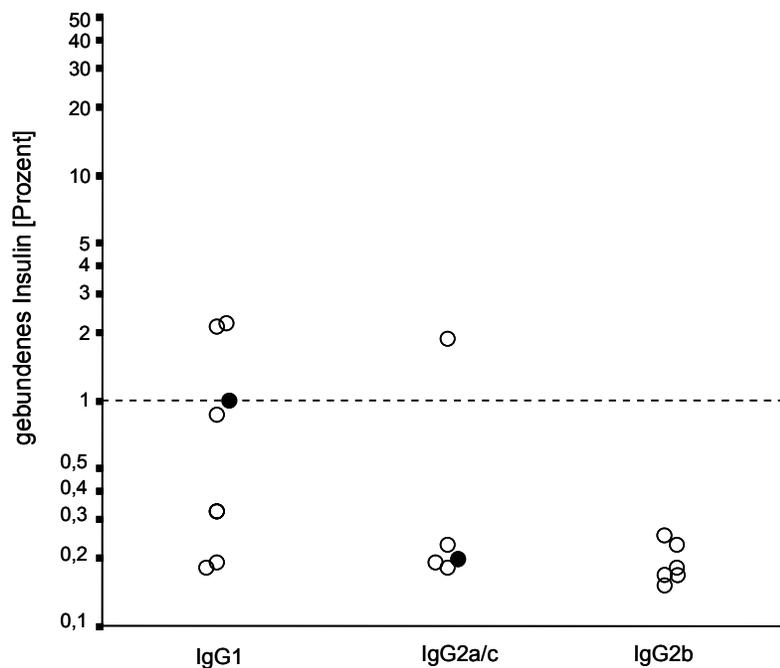


Abb. 26: Darstellung der IAA-IgG-Subklassen bei 8 I(A)A-positiven NOD-Mäusen der Gruppe 5. Gruppe 5: neugeborene NOD-Mäuse, die im Alter von 5 und 14 Tagen mit 0,1 IE Insulin und Adjuvans behandelt wurden. Jeder Maus wurde im Alter von 4 – 16 Wochen mind. 4x Blut entnommen. Bei IAA-positiven 8 IAA-positiven NOD-Mäusen bestimmten wir die I(A)A-IgG-Subklassen. Die Subklassen der Blutprobe mit dem höchsten Gesamt-I(A)A-Titer sind hier graphisch dargestellt.

Die weißen Kreise kennzeichnen Mäuse, bei denen DT als Immunadjuvans verwendet wurde, die schwarzen Punkte kennzeichnen Mäuse, bei denen IFA als Immunadjuvans verwendet wurde. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze für Positivität für I(A)A-IgG-Subklassen.

## **5. DISKUSSION**

### **5.1. BABYDIAB. Entwicklung der Autoimmunantwort in unbehandelten antikörper-positiven Kindern**

#### **5.1.1 Verlauf der Autoantikörper in der prädiabetischen Phase**

In der präklinischen Phase des Typ 1 Diabetes sind die im Blut messbaren Inselantikörper indirekte Marker des Autoimmunprozesses. Schon Jahre vor Ausbruch der Erkrankung lässt sich hier die Autoreaktivität des Immunsystems verfolgen (siehe 1.1.3). 1976 wurde erstmals das Auftreten von Autoantikörpern im Blut von prädiabetischen Patienten und Hochrisikopatienten beschrieben. Auch damals wurden bereits bei einigen Patienten Schwankungen in der Höhe der Autoantikörpertiter während der präklinischen Phase beobachtet, während bei anderen Patienten der Verlauf der ICA konstant war [168,98]. Die Schwankungen in der Höhe der Inselautoantikörper wurden als Schwankungen der Stärke und der Aktivität der Autoimmunreaktion während der prädiabetischen Phase interpretiert [116,186](siehe auch 1.2). Handelte es sich dagegen um einen kontinuierlichen, in seiner Aktivität gleichmäßig zunehmenden Autoimmunprozess, würde man einen linearen Anstieg der Inselantikörper in der prädiabetischen Phase erwarten. So haben manche Forscher einen linearen Autoimmunprozess beschrieben, in dem die Antikörper ansteigen, ein gewisses Level erreichen und auf diesem relativ konstant bleiben sollen, um dann nach Diabetesmanifestation wieder abzufallen [59].

Die Beobachtung der humoralen Autoimmunantwort in der BABYDIAB Studie zeigte jedoch, dass die Entwicklung der Autoantikörper nicht linear erfolgt. Schon bald nach ihrem ersten Auftreten kam es bei den meisten Kindern zu einem starken Anstieg der Autoantikörper. Sie erreichten frühzeitig einen ersten Spitzenwert („peak“), um dann meist deutlich wieder abzufallen. Dieser erste starke Autoantikörperanstieg war IgG1 dominiert und in 14/26 Kindern erfolgte

der Anstieg der Autoantikörper gegen die spezifischen Antigene sequentiell. Es war ein überraschendes Ergebnis, bei einer so großen Anzahl der Kinder eine derart frühe Immunantwort zu finden, in der die ersten Antikörper-Spitzenwerte schon in einem Alter von zwei bis drei Jahren (Median 2,2 Jahre) gemessen werden konnten. Diese zeitliche Konstanz war um so interessanter, als sie mit der physiologischen Reife des Immunsystems eines Neugeborenen zusammenfällt. Neugeborene Kinder besitzen ein noch nicht vollständig ausgereiftes Immunsystem, und entwickeln nach Abfall der von der Mutter übertragenen IgG eine relative Hypogammaglobulinämie [117]. Erst nach ungefähr einem Lebensjahr ist das Immunsystem zu effektiver Antikörperproduktionen in der Lage. Das relativ zeitgleiche, homogene Auftreten der ersten Inselantikörper lässt eher eine spontan auftretenden Autoimmunreaktion vermuten, die nicht auf eine erworbene, sondern eher auf eine genetisch bedingte, fehlerhafte Reifung im Immunsystem zurückzuführen ist. Diese fehlerhafte Entwicklung des Immunsystems würde dann tatsächlich erst mit der Reifung des Immunstatus erkennbar werden.

Die initiale Immunantwort bei den BABYDIAB Kindern war IgG1 dominiert. Eine frühe IgM Antwort war gegen keines der 3 gemessenen Autoantigene zu finden. IgM Antikörper sind in der menschlichen Immunantwort einer frühen Phase bei erstmaligem Kontakt mit einem fremden Antigen zugeordnet und sind deswegen Indikatoren für eine neu aufgetretene Immunreaktion. Das Fehlen der IgM Antikörper in der frühen Autoimmunreaktion der BABYDIAB Kinder könnte auf einen zu großen Abstand der Serumproben oder die kurze Halbwertszeit der IgM im Serum zurückzuführen sein. Ein Fehlen von IgM spräche gegen eine direkte Induktion der Autoreaktivität durch zerstörte  $\beta$ -Zellen und für einen primären Defekt in der Toleranz des Immunsystems gegenüber bestimmten körpereigenen Antigenen.

### **5.1.2 Die Reihenfolge der aufgetretenen Inselantikörper und Antikörper-Subklassen-Muster**

Im Gegensatz zum überwiegend frühen Auftreten der Inselantikörper in den ersten beiden Lebensjahren, war eine bestimmte Reihenfolge der auftretenden Antikörper gegen spezifische Insel-Antigene nicht zu beobachten. Bei manchen war ein akuter Anstieg aller gemessenen Antikörper gleichzeitig zu beobachten. Diese Kinder entwickelten schon sehr früh im Leben einen manifesten Diabetes mellitus. Diese akute Autoreaktivität weist auf eine ungerichtete, verselbständigte, extrem destruktive Autoimmunreaktion hin. Dabei wiesen nur wenige dieser Kinder den genetischen Hochrisiko-Haplotypen HLA DR B1\*03/DR B1\*04 auf.

Die meisten Kinder zeigten dagegen eine Autoreaktivität, die in Wellen auftrat, mit einem initialen Spitzenwert von Antikörpern einer bestimmten Spezifität, gefolgt von Antikörpern gegen andere Inselantigene. Im überwiegenden Teil der Fälle war die erste Immunreaktion gegen Insulin gerichtet und mit einem starken Anstieg der IAA verbunden. Weiterhin bestand dieser erste Anstieg meist hauptsächlich aus IgG1-IAA. Sehr selten waren auch IgG1-GADA die ersten nachweisbaren Autoantikörper. IgG1 Antikörper gegen IA-2 traten jedoch immer erst später auf (mit Ausnahme der Fälle, in denen sie zusammen mit anderen Antikörpern auftraten). Dies lässt vermuten, dass es sich bei dem IA-2-Antigen eher um ein sekundäres Ziel der Autoimmunreaktion handelt.

Das primäre Ziel der spontanen Autoimmunreaktion scheint meist Insulin zu sein. In der vorliegenden Arbeit konnten wir, vor allem bei starker Gesamt- und IgG1-IAA Produktion, auch IgG4- und, schwächer ausgeprägt, auch IgG2- und IgG3-IAA messen. Bei der Immunantwort gegen GAD und IA2 hingegen waren IgG1 die fast ausschließlich produzierte Antikörper-Subklasse. Die Antikörpertiter in der prädiabetischen Phase zeigten dabei keinen konstanten Verlauf. Bei allen Kindern, bei denen es während des ersten starken Antikörperanstiegs nicht zur

Diabetesmanifestation kam, fielen die Autoantikörper wieder deutlich ab. Diese stark schwankende Aktivität der Autoimmunreaktion könnte entweder auf eine wechselnde Ausprägung der Antigenexpression bzw. – präsensation hinweisen, oder aber auf vorhandene Regulationsmechanismen, die in den Autoimmunprozess eingreifen. Im Rahmen eines Antikörperpeaks war die Immunreaktion meist nur gegen eine Antigen-Spezifität gerichtet. Später auftretende Inselantikörper richteten sich in der Regel gegen andere Inselantigene, während die Antikörpertiter gegen das erste Inselantigen wieder abgefallen waren.

Interessanterweise zeigte sich in einem Fall [Nr. 1032], bei dem sich im Verlauf zweimal ansteigende Antikörpertiter gegen IA-2 nachweisen liessen, dass diese Antikörper sich gegen unterschiedliche Epitope des Antigens richteten. Diese Beobachtungen sprechen für eine induzierte antigenspezifische Regulation des Immunsystems, welche ein Übergreifen der Autoreaktivität zu anderen Antigenen in einer geradezu infektiösen Art nach sich zieht („spreading“). Außerdem sprechen diese Befunde gegen den Einfluss anderer Regulationsmechanismen, wie z.B. ein graduelles Entstehen einer Th2-Immunantwort. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine fehlende Kompetenz des Immunsystems besteht, eine Th2 Antwort zu generieren. Dadurch könnte eine destruktive Immunantwort in manchen Fällen exazerbieren und zu einer schnellen Manifestation des Diabetes führen.

### **5.1.3 IgG-Antikörper-Subklassen und Zuordnung zu einer Th1- und Th2-Immunantwort**

Die NOD Maus entwickelt eine dem menschlichen Typ 1 Diabetes ähnliche Form der spontanen Autoimmunerkrankung. Bislang gibt es im Wesentlichen zwei unterschiedliche Konzepte zur Regulation der Immunglobulindominanz im Verlauf der prädiabetischen Phase:

Manchen Autoren postulieren eine nicht destruktive, latente Th2 dominierte Immunantwort während der präklinischen Phase, die erst später in die destruktive Th1 dominierte Immunantwort übergeht [116].

Andere Autoren gehen davon aus, daß von Anfang an eine Th1 vermittelte Immunreaktion vorherrschend ist [85], die sich erst auf ein Antigen beschränkt, im weiteren Verlauf jedoch auch auf andere Antigene übergreift. Die  $\beta$ -Zell Destruktion in der präklinische Phase des Typ1 Diabetes ist durch Th1-Dominanz charakterisiert. Diese destruktive Autoimmunantwort wird als Th1 dominiert angesehen. Die Diabetesmanifestation fiel bei 9/11 Kindern der BABYDIAB Studie, die im Verlauf einen manifesten Diabetes mellitus entwickelten, mit einem Anstieg der Inselantikörper der Subklasse IgG1 zusammen. Man kann demnach vermuten, dass die IgG1-Inselantikörper bei diesen Kindern eine destruktive Immunantwort anzeigen.

Wir beobachteten bei den BABYDIAB Kindern außerdem, dass das Muster der Subklassenverteilung während der frühen Immunreaktion, also während des ersten starken Antikörperanstiegs in allen Fällen IgG1 dominiert war und somit dem Subklassenmuster bei Diabetesmanifestation entsprach, welches ebenfalls IgG1 dominiert war. Diese Beobachtung weist auf einen von Anfang an destruktive, Th1 dominierte Autoimmunreaktion in der prädiabetischen Phase der BABYDIAB Kinder hin.

Die am besten belegte Assoziation von Antikörper-Subklassen mit einer Th1- bzw. Th2-Immunantwort beim Menschen besteht für die Subklasse IgG4 und Th2: Das Th2-Zytokin Il-4 induziert die Produktion von IgG4-Antikörpern [112], die Antikörper der Subklasse IgG4 scheint daher Th2-assoziiert zu sein. IgG4 Antikörper konnten wir in dieser Studie vor allem bei der Immunantwort gegen Insulin beobachten. Fast 50% der BABYDIAB Kinder wiesen IgG4-IAA auf. In manchen Fällen folgten die IgG4-IAA dem Verlauf der Gesamt- und IgG1-IAA, und waren vor allem dann messbar, wenn diese ihren Spitzenwert erreicht

hatten, in anderen Fällen war der Verlauf der IgG4 jedoch völlig unabhängig vom Verlauf der Gesamt-IgG. Dieses könnte bedeuten, daß die Entstehung von IgG4-IA Subklassen von anderen Faktoren beeinflusst werden, als die Entstehung der IgG1-IA Subklassen. Bei vier Kindern waren IgG4-IAA von Anfang an die dominierende Subklasse. Bei diesen Kindern könnte also eine initiale Th2 Antwort vorgelegen haben. Die Beobachtung, dass bei manchen Kindern die IgG4-IAA erst nach den IgG1-IAA auftraten und auch dann teilweise bestehen blieben, als IgG1-IAA-Titer bereits wieder abgefallen waren, könnte einen „shift“ von einer initialen Th1 Antwort zu einer Th2 Antwort bedeuten. Allerdings war weder das Auftreten von IgG4-IAA, noch deren Dominanz über IgG1-IAA mit einer verringerten Diabetesinzidenz, oder einer verzögerten Manifestation verbunden.

In keinem Fall war das Auftreten von IgG4-IAA von einer IgG4-Antikörper Produktion gegen GAD oder IA2 gefolgt. Wenn also die IgG4-IAA einer Th2 Antwort bei diesen Kindern entsprechen, dann weist diese Th2 Antwort eine Antigenspezifität auf.

Bei den BABYDIAB Kindern traten IAA in der Mehrzahl der Fälle als erste Inselantikörper auf, bei den Subklassen zunächst IgG1-IAA und dann IgG4-IAA. Antikörper gegen GAD und IA2 waren erst später detektierbar, hier fehlte die Produktion von IgG4 Antikörpern, die Immunantwort gegen GAD und IA2 war ausschließlich IgG1 dominiert. Geht man davon aus, dass IgG1 Antikörper einer Th1 Antwort und IgG4 Antikörper einer Th2 Antwort zuzuordnen sind, würde das bedeuten, dass auf eine primäre Phase der destruktiven Immunreaktion eine sekundäre regulatorische Immunantwort folgt, also ein "switch" zu einer Th2-dominierten Immunantwort möglich ist. Bei den darauf folgenden Immunreaktionen gegen andere Inselantigene bleibt dieser „shift“ von der destruktiven Th1 hin zu einer eher protektiven Th2 Antwort aber aus.

IgG2 und IgG3 Antikörper konnten gegen alle drei Antigene gemessen werden, wiesen jedoch in der Regel sehr niedrige Titer auf. Vor allem IgG3 war meist nur dann zu messen, wenn die IgG1 Antikörper auf sehr hohe Werte angestiegen waren. Der Verlauf der IgG3 Subklassen ähnelt generell dem der IgG1 Antikörper, während die gemessenen IgG2 Antikörper teilweise synchron mit den IgG4 Ak verliefen. Diese Beobachtung unterscheidet sich von den Ergebnissen früherer Studien, in denen GADA und GADA-Subklassen bei 34 neudiagnostizierte Typ 1 Diabetiker und 28 Verwandte ersten Grades von Typ 1 Diabetikern mit Hilfe eines ELISA gemessen wurden. In dieser Studie von Couper et al. konnten IgG4- und IgG2-GADA häufig gemessen werden, wenn IgG1-GADA negativ waren. Bei den neu-diagnostizierten Typ 1 Diabetikern waren vor allem IgG1 und IgG3 messbar, während IgG2 und IgG4-GADA vor allem bei Hochrisikopatienten, die keinen manifesten Diabetes mellitus entwickelt haben, messbar waren [48]. Obwohl diese unterschiedlichen Beobachtungen darin begründet sein könnte, dass die Kohorten sich hinsichtlich des Alters unterscheiden (in der von Couper et al durchgeführten Studie lag das Alter der Pat. deutlich über dem der BABYDIAB Kinder), als auch die Methode zur Ermittlung der Antikörper (ELISA), könnte es ebenfalls darauf hindeuten, dass die Verteilung der Antikörper Subklassen und somit der Charakter der Immunantwort sich im Laufe des Lebensalters ändern könnte, von einer Th1-dominierten, destruktiven Immunantwort hin zu einer Th2 dominierten Immunantwort. In unserer Studie konnten wir allerdings keinen Hinweis auf eine Verlagerung der IgG1 dominierten Immunantwort in Richtung auf ein Auftreten anderer Subklassen bei höherem Lebensalter beobachten.

#### **5.1.4 Verteilung der Autoantikörper bei Diabetesmanifestation**

Die meisten Kinder der BABYDIAB Studie entwickelten einen manifesten Typ 1 Diabetes während ihre Antikörper gegen mindestens ein Autoantigen auf sehr hohe Werte angestiegen waren. Weder Änderungen im Muster der Verteilung

der Autoantikörper Subklassen, noch die Art der dominierenden Subklasse spielten eine Rolle bei der Entwicklung eines Typ 1 Diabetes. Es ist vor allem bemerkenswert, dass wir keine verzögerte Manifestation bei hohen IgG4 Titern feststellen konnten. Manche Kinder entwickelten einen manifesten Typ 1 Diabetes zeitgleich mit steigenden, oder bereits hochtitrigen IgG4-IAA. Auch das Vorliegen von IgG2 Antikörpern war nicht mit einer verzögerten Diabetesmanifestation verbunden. Die einzige Korrelation mit der Manifestation des Diabetes, die wir beobachten konnten, war eine signifikant höhere Diabetesmanifestation bei Kindern, die nur IgG1 Antikörper gegen IA2 aufwiesen. Antikörper gegen dieses Antigen treten erst relativ spät auf. Die, auf diese eine Subklasse beschränkte, wahrscheinlich Th1 dominierten Autoimmunreaktion gegen ein sekundäres, also späteres Zielantigen, könnte entweder eine Autoimmunreaktion darstellen, die an Aggressivität zugenommen hat, oder einen Verlust der regulatorischen Prozesse bedeuten. In Zusammenhang mit den oben gemachten Beobachtungen, dass bei früh auftretenden Insulinautoantikörpern eine im Verlauf viel inhomogenere Autoimmunreaktion vorliegt, bei der sowohl Antikörper der Subklasse IgG1, als auch IgG4-IAA gemessen werden konnte, sprechen unsere Ergebnisse eher für eine mit dem Alter zunehmende Aggressivität der Immunantwort und eine abnehmende Fähigkeit zu einer protektiven Immunregulation.

Zusammenfassend zeigt die Studie der BABYDIAB Kinder eine sehr aktive und dynamische Autoimmunreaktion schon in der frühen präklinischen Phase des Typ 1 Diabetes. Der homogene Zeitpunkt des Auftretens der ersten Autoantikörper spricht für eine spontane Entwicklung der Autoreaktivität, deren primäres Antigen genetisch festgelegt zu sein scheint. Die initiale Immunreaktion scheint destruktiv zu sein und führt entweder zur baldigen Diabetesmanifestation, oder setzt sich in eine chronische Autoimmunerkrankung fort, in der latente Phasen sich mit aktiveren Phasen abwechseln. Dass die humorale Immunantwort bei Diabetesmanifestation die gleichen Subklassenprofile

aufweist, wie beim initialen Autoantikörper-peak, spricht für eine von Beginn an bestehende Th1-Dominanz.

## **5.2 Antikörper-Subklassen-Profile nach Immunintervention**

Sowohl bei der Behandlung von neu manifesten Typ 1 Diabetikern, als auch als prophylaktische Maßnahme bei Inselantikörper positiven Verwandten 1. Grades von Typ 1 Diabetikern in der präklinischen Phase wurde beschrieben, dass eine intensivierete Insulintherapie die Stoffwechselfunktionen der pankreatischen  $\beta$ -Zellen verbessert und die autoimmune Zerstörung der pankreatischen  $\beta$ -Zellen verlangsamt (siehe Einleitung). Dieses scheint sich zum einen in der verminderten Aktivität der  $\beta$ -Zellen ( $\beta$ -cell rest) zu begründen [110,68]: durch die herabgesetzte Stoffwechselaktivität befinden sich die Zellen in einem weniger aktiven Zustand, exprimieren somit weniger Antigene und sind weniger angreifbar durch den zerstörerischen Autoimmunprozess [1,22]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit exogenem Insulin zu einem veränderten Muster des entzündlichen Infiltrats innerhalb der pankreatischen Inseln führt [7]. Es konnten mehr IL-4 und weniger INF- $\gamma$  produzierende Zellen nachgewiesen werden. Diese Tiere wiesen eine verringerte Diabetesinzidenz, als Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe auf. Der Schutz vor Diabetes kann durch den Transfer von CD4+ Zellen auf andere Tiere übertragen werden [179]. So liegt der Schluss nahe, dass der protektive Effekt der Insulintherapie hauptsächlich den Th2 assoziierten regulatorischen CD4+-T-Zellen zugeschrieben werden kann. Diese These wird außerdem noch durch das Vorherrschen von Th2 assoziierten IgG1 und IgG2b in der humoralen Immunantwort bei Mäusen nach Intervention mit exogenem Insulin unterstützt. Wir untersuchten hier Antikörper und Antikörper Subklassen gegen Insulin, um zu überprüfen, ob es, wie bei der NOD-Maus, auch bei Menschen im Rahmen einer intensivierten Insulintherapie zu einer Th2 dominierten Immunantwort kommt.

### 5.2.1 Immunintervention mit Insulin

In früheren Studien wurde beschrieben, dass beim Menschen die Produktion von Antikörpern der Subklasse IgG4 mit einer Th2 Antwort assoziiert ist. Dabei lassen sich die Zytokine Il-4 und Il-13 beim Menschen im Rahmen einer Th2 Immunantwort nachweisen. In vitro stimulieren diese Zytokine menschliche Immunzellen zur Produktion von IgG4 Antikörpern [112]. Obwohl wir in dieser Studie keine Zytokine gemessen haben, scheinen unsere Ergebnisse die Hypothese zu unterstreichen, dass exogene Insulingaben auch beim Menschen eine Th2 dominierte Immunantwort induzieren können. Anders als bei den unbehandelten Typ 1 Diabetikern der BABYDIAB Studie folgten hier auf eine initiale IgG1-IA Dominanz auch IgG4-IA, die in manchen Fällen die IgG1-IA überstiegen.

Die exogene Gabe von Insulin rief sowohl bei neu manifestierten Typ 1 Diabetikern, als auch bei ICA+ Verwandten 1. Grades von Patienten mit Typ 1 Diabetes eine starke Antikörperproduktion gegen Insulin hervor. Sowohl in der Gruppe der neu-manifesten Typ 1 Diabetiker, als auch bei den prophylaktisch mit Insulin behandelten Verwandten 1. Grades war diese Immunreaktion IgG1 und IgG4 dominiert. In beiden Gruppen war ein früher starker IgG1-IA Anstieg kennzeichnend. Die IgG4 Antwort trat im Vergleich dazu verzögert auf. In der Gruppe der neu-manifestierten Typ 1 Diabetiker überstiegen die IgG4-IA teilweise die IgG1-IA und stiegen in der Gruppe der prophylaktisch mit Insulin behandelten Verwandten ersten Grades in der Regel nachdem IgG1 und Gesamt-IA wieder gefallen waren. In beiden Gruppen, sowohl bei prophylaktischer, als auch bei interventioneller Gabe von exogenem Insulin nach Diabetesmanifestation, induzierte die intensivierete Insulintherapie eine starke Antikörperproduktion, die sowohl ein Th1-, als auch ein Th2-Kompartiment mit einschliesst, wobei letzteres durch die Behandlung mit exogenen Insulin verstärkt zu werden scheint.

Das Th1 assoziierte INF- $\gamma$  induziert beim Menschen die Produktion von IgG1- und IgG3- Antikörper-Subklassen [221]. Viele Typ 1 Diabetiker weisen im Rahmen ihrer spontanen humoralen Autoimmunantwort während der präklinischen Phase eine frühe Produktion von IgG1 Autoantikörpern auf. Diese frühen IgG1 Ak steigen in der Regel auf einen Spitzenwert an, von dem sie im weiteren Krankheitsverlauf wieder abfallen und sich der Höhe der anderen Antikörper angleichen. Einen ähnlichen Verlauf zeigten auch die IA bei neu manifestierten Typ 1 Diabetikern nach Beginn einer intensivierten Insulintherapie. Auch hier stiegen die IgG1-IA in der frühen Phase deutlich an, um dann wieder abzusinken oder sich auf einem relativ stabilen Niveau zu halten. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass auch die spontane Insulin-Autoimmunität auf einer dauerhaften oder wiederholten Antigenexposition beruht. Dieser Autoimmunprozess scheint Anteile einer Th1 und Th2 Antwort zu beinhalten.

Passend zu den Ergebnissen bei den antikörperpositiven BABYDIAB Kindern war die Beobachtung, dass die humorale Autoimmunantwort beim Menschen auch IgG4 Antikörper beinhaltet, die bei manchen Patienten sogar dominant gegenüber den anderen Antikörper Subklassen waren. Bei 50% der Patienten, die vor Therapiebeginn Insulinautoantikörper aufwiesen, konnten wir zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation IgG4-IAA nachweisen. Die IgG4-IA Titer der spontanen humoralen Autoimmunantwort lagen jedoch deutlich unterhalb der IgG4-IA-Titer nach exogener Insulinexposition. Auch die Prävalenz der IgG4-Insulinautoantikörper der spontanen Autoimmunantwort gegen Insulin war deutlich niedriger, als die Prävalenz der IgG4-IA nach exogener Insulingabe. Im Verlauf induzierte die intensivierte Insulintherapie, nach einem frühen Anstieg von IgG1-IA, mit Verzögerung hauptsächlich die Produktion von IgG4-IA. Die Gabe von exogenem Insulin scheint das Verhältnis der beiden Immunantworten zueinander zu verschieben und die Dominanz der IgG1-IA während des Autoimmunprozesses in eine Dominanz der IgG4-IA zu verwandeln.

Im Hinblick auf die oben genannte Zuordnung von IgG4 zu einer Th2 Antwort scheint also die Therapie mit exogenem Insulin zu einer Th2 dominierten Immunantwort zu führen. Insulin ist allerdings nicht das einzige Autoantigen, das eine IgG4-Antwort induziert, wenn es subkutan gegeben wird. Auch Patienten, die mit Faktor VIII (Protein der Gerinnungskaskade) behandelt wurden, entwickelten eine IgG1 und IgG4 dominierte Immunantwort gegen Faktor VIII [70]. Ob diese Art von Immunantwort typisch ist für die Gabe von körpereigenen Proteinen ist unklar.

Verschiedene Faktoren scheinen das Muster der Immunantwort gegenüber exogenem Insulin zu beeinflussen. Interessant war die Beobachtung, dass Kinder in der Regel eine stärker ausgeprägte Immunantwort aufwiesen als Erwachsene. Die Höhe der Insulinantikörpertiter korrelierte positiv mit dem Alter der Patienten. Weiterhin wiesen diejenigen Patienten eine stärkere Immunantwort auf, bei denen schon vor Beginn der Therapie Autoantikörper gegen Insulin nachweisbar waren. Diese Beobachtungen legen folgende Schlüsse nahe:

Eine Therapie im Sinne einer Immunmodulation mit exogenen Insulingaben, die sehr früh im Leben begonnen wird, könnte auf ein Immunsystem stoßen, welches, noch wenig differenziert, in der Lage ist, auf die Behandlung mit exogenen Antigengaben zu reagieren. Damit wäre der Effekt, die Immunantwort zu modulieren und einen shift von einer destruktiven hin zu einer protektiven Immunreaktion zu induzieren umso größer, je früher im Leben man mit der Therapie beginnt. Diese Abhängigkeit vom Alter bzw. der Reife des Immunsystems wurde auch im Tiermodell der NOD-Maus nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass NOD-Mäuse, die bereits bei Beginn der Inselzellentzündung (2-4 Wochen postpartum) eine Immunintervention erhielten, vor einer Diabetesmanifestation besser geschützt waren. Bei NOD Mäusen mit schon bestehender und teilweise ausgeprägter Insulinitis (10 Wochen) war dieser protektive Effekt nicht mehr nachzuweisen [204,123,124].

Eine weitere erstaunliche Beobachtung war, dass die humorale Immunantwort gegen Insulin in der Gruppe der Erwachsenen deutlich schwächer war, die vor der Behandlung mit subkutanem Insulin auch intravenös Insulin erhalten hatten. Dagegen war weder bei Kindern, noch bei Erwachsenen, die Insulin ausschließlich subkutan erhielten, dieser Effekt zu beobachten. Diese Beobachtung zeigt, dass die intravenöse Gabe eines Antigens eine Art Immuntoleranz gegenüber dem verabreichten Antigen vermitteln könnte.

Dazu passt der Befund, dass die jährlichen i.v. Insulinbehandlungen in der experimentellen Gruppe der Immunprophylaxestudie keine weitere humorale Immunantwort gegen Insulin mehr induziert. Bekannt ist, dass die intravenöse Gabe eines Antigens bei T-Zellen eine Immuntoleranz hervorrufen kann, indem sie diese inaktiviert [98]. In unserer Studie konnte diese Form der Immuntoleranz auf humoraler Ebene jedoch nur in der Gruppe der beobachtet werden. In der Gruppe der Kinder war kein Unterschied in der Höhe der humoralen Immunantwort zwischen s.c. Gabe und Gabe von i.v. + s.c. Insulin auszumachen. Da jedoch fast alle Kinder bei Therapiebeginn IAA aufwiesen, liegt der Schluss nahe, dass bei voll aktiviertem Autoimmunprozess die Inaktivierung des Immunsystems mit i.v. Insulingaben im Sinne einer Immuntoleranz ineffektiv wird. Darauf weist auch die Tatsache hin, dass bei dem Erwachsenen in der i.v. Gruppe, der schon zu Beginn der Therapie IAA+ aufwies, die Antikörper 3 – 7 mal so hoch waren, wie bei den anderen Patienten der i.v. Gruppe, die keine IAA zu Beginn der Insulintherapie aufwiesen. Auch waren alle Fälle, bei denen keine Antikörper gegen Insulin nachzuweisen war, schon bei Eintritt in die Studie IAA-negativ gewesen.

### **5.2.2 Immunintervention mit Cyclosporin A**

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Cyclosporin A (CyA) bei Patienten mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes zu einer erhöhten

Anzahl an Remissionsphasen gegenüber unbehandelten Vergleichsgruppen führte [50]. Schon 1985 wurde beschrieben, dass die Prävalenz und die Höhe der ICA bei neu-diagnostizierten Typ 1 Diabetikern, die mit CyA und subkutanen Insulingaben behandelt wurden, deutlich schneller fielen, als bei einer Kontrollgruppe, die nur Insulin erhielten [130]. Der Verlauf der Gesamt-IA in dieser Studie entsprach im Wesentlichen diesen früheren Beobachtungen.

12 Monate nach Beginn der Behandlung mit CyA und Insulin hatten alle Patienten IA entwickelt, die höher waren, als bei Eintritt in die Studie. Zu Beginn der Behandlung lagen IgG1-IA-Titer am höchsten. 4 der 5 Patienten wiesen zu diesem Zeitpunkt bereits IgG1-IA auf. Die Immunantwort war hauptsächlich durch IgG1-IA bestimmt. Dagegen war die Produktion von IgG4-IA während der gesamten Behandlung mit CyA supprimiert. Nach Ende der Immunsuppression mit CyA kam es zu einem starken Anstieg der humoralen Immunantwort gegen Insulin, die ebenfalls IgG1-IA dominiert war. Auch IgG4-IA waren 3 Monate nach Ende der Behandlung bei 4 der 5 Patienten nachzuweisen. Bemerkenswerter Weise lagen die IgG4-IA-Titer in der CyA Gruppe jedoch 3 Monate nach der Behandlung deutlich niedriger, als die IgG4-IA-Titer der Vergleichsgruppe. Auch 12 Monate nach Ende der CyA-Behandlung, erreichten sie, im Gegensatz zu den Kontrollen, bei keinem der mit CyA behandelten Patienten die gleichen Titer, wie IgG1-IA.

Die Behandlung mit CyA hatte also nach Ende der Behandlung keinen anhaltenden Effekt auf die Höhe der IA-Titer, diese glichen sich sehr schnell wieder denen der Kontrollgruppe an. Dennoch waren Veränderungen im Muster der IA-Subklassen zu beobachten. Die IgG4 Antwort war auch ein Jahr nach Ende der Behandlung noch deutlich schwächer ausgeprägt, als jene der Vergleichsgruppen. Bei keinem Probanden lagen die IgG4-IA Titer im Verlauf über den IgG1-IA-Titer.

### 5.2.3 GADA- und IA2-A- Subklassen nach Immunintervention mit Insulin

Es wird berichtet, dass die Behandlung mit der metabolisch inaktiven B-Kette des Insulin bei der NOD Maus eine Th2 Antwort gegen Insulin hervorruft, die auch auf andere Antigene übergreift [198]. So konnten Tian et al. nach der Immunisierung mit der B-Kette des Insulin auch Th2 Immunität gegen GAD und HSP nachweisen [200]. In unserer Arbeit konnten wir durch Insulinbehandlung deutliche Veränderungen im Muster der Subklassenverteilung der Insulinantikörper beobachten. Diese bestanden vor allem in einer Induktion der IgG4-IA Produktion. Im Gegensatz dazu waren im Muster der Subklassen gegen GAD und IA2 keine Änderungen zu finden. Die Immunantwort gegen GAD und IA2 bestand fast ausschließlich in der Produktion von IgG1-Subklassen. Bei der Behandlung der prädiabetischen Verwandten 1. Grades von Typ 1 Diabetikern konnte bis zu 3 Jahren nach Beginn der täglichen Insulingaben sowohl in der Gruppe der s.c., als auch in der Gruppe der i.v. plus s.c. Therapie keine Induktion von IgG4 Antikörpern beobachtet werden. In der Gruppe der neu manifestierten Typ 1 Diabetiker, entwickelten von den 14 getesteten GADA-positiven Patienten nur zwei im Laufe der Behandlung IgG4-GADA, deren Titer jedoch deutlich niedriger, als die IgG1-GADA-Titer lagen. Keiner der nach Manifestation behandelten Patienten entwickelte IgG4 Antikörper gegen IA2. Im Gegensatz zur NOD-Maus, bei der ein spreading der Th2 Antwort auf andere Antigene induziert werden konnte, konnten wir also in unserer Arbeit beim Menschen kein Übergreifen ("spreading") der induzierten Th2 Antwort von Insulin auf andere Antigene beobachten. Dieser Beobachtung könnte folgende Gründe haben:

Erstens ist es denkbar, dass die Immunmodulation von einer Th1 zu einer Th2 Antwort nicht auf B-Zell-Ebene nachweisbar ist. Ohne eine Untersuchung der T-Zell-Antwort in unseren Patienten können wir die Induktion einer GAD- oder IA2-spezifischen Th2-Antwort nicht ausschließen. Weiterhin wurde schon früher beschrieben, dass die Fähigkeit des Immunsystems, die induzierte Th2 Antwort

auf andere Antigene auszuweiten, mit der Dauer des Autoimmunprozesses abnimmt [201]. Diese Befunde zeigen, dass möglicherweise nur bei früherer Intervention mit Insulin eine Induktion einer Th2 Antwort auch gegen andere Antigene induzierbar ist.

Eine weitere Erklärung wäre, dass bei Immunintervention in der NOD-Maus Insulin immer zusammen mit einem potenten Th2 induzierenden Immunstimulans gegeben wurde. Die alleinige Gabe von s.c. oder i.v. Insulin könnte möglicherweise nicht ausreichend sein, um einen T-Zell-modulatorischen Effekt zu erzielen, der ausreichend ist, um eine Th2-Antwort auch auf andere Insel-Antigene auszudehnen.

#### **5.2.4 Bedeutung der Th2 Antwort für die Manifestation des Typ 1 Diabetes**

Im Gegensatz zur spontanen Autoimmunantwort gegen Insulin bei Prädiabetikern und bei Manifestation führten exogene Insulingaben bei Diabetesmanifestation nach 12 Monaten meist zu einer Dominanz von IgG4-IA über die IgG1-IA Produktion, also zu einer Verschiebung des IA-Subklassen-Musters. Das Vorliegen von IgG4 Antikörpern war jedoch, auch wenn sie die dominante Subklasse gegenüber IgG1 waren, nicht mit einem Schutz vor Diabetes assoziiert. Dies könnte darauf hinweisen, dass eine späte Immunintervention mit Insulin nach Diabetesmanifestation nicht mehr in der Lage ist die Entwicklung manifesten Diabetes mellitus zu verhindern.

Der protektive Effekt einer prophylaktischen Behandlung mit Insulin war in unserer Pilot-Studie nicht mit der Höhe der IgG4-Insulinantikörper assoziiert. Obwohl wir davon ausgehen, dass IgG4-IA als Marker einer Th2 Antwort geeignet sind, lassen unsere Befunde den Schluss zu, dass die Beobachtung der humoralen Immunantwort auf Subklassenebene ein nicht ausreichend

aussagekräftiger Marker für den Erfolg einer Intervention mit Insulin bei einzelnen Personen ist.

### **5.3 Entwicklung der spontanen humoralen Autoimmunantwort gegen Insulin bei unbehandelten NOD-Mäusen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei 30 unbehandelten NOD-Mäusen der Gruppe 1a im Alter von 2,5 bis 31,4 Wochen unabhängig von Alter und Geschlecht jeder Maus je eine Blutprobe entnommen. Bei 10 dieser 30 NOD-Mäuse (33,3%) konnten wir Autoantikörper gegen Insulin nachweisen. Außerdem betrachteten wir den Verlauf der IAA bei 17 unbehandelten NOD-Mäusen der Gruppe 1b, denen im Alter zwischen 4 und 38 Wochen mindestens 3 Blutproben entnommen wurden. In dieser Gruppe konnten wir bei 5/17 Mäusen (29,4%) IAA in mindestens einer Blutprobe nachweisen. Zusammen genommen traten also in den beiden Gruppen der unbehandelten NOD-Mäuse in ca. 30% messbare Autoantikörper gegen Insulin auf.

Betrachtet man die Prävalenz der IAA bei Mäusen der Gruppe 1a im Alter von 5 bis 13 Wochen waren in 8/18 (44,4%) IAA-positiv, im Alter von 15 - 35 Wochen 2/10 (20%) IAA-positiv. In der Gruppe 1b, in der wir den IAA-Verlauf bei unbehandelten NOD-Mäusen betrachteten, waren im Alter von 5 -15 Wochen bei 4/17 Mäusen (23%) IAA nachweisbar, im Alter von 15 - 35 Wochen bei 1/17 Mäusen (5,9%). Die Höhe der gemessenen Insulinautoantikörper war sehr variabel und erreichte vor allem bei den jüngeren NOD-Mäusen (< 15 Wochen) zum Teil extrem hohe Werte. Diese Beobachtung stimmt mit Ergebnissen aus Denver überein, die eine sehr heterogene Expression von Insulinautoantikörpern bei unbehandelten NOD-Mäusen beschreiben. Eisenbarth et al. beobachteten bei unbehandelten NOD-Mäusen ebenfalls einen frühen starken IAA-Anstieg und beschrieben, dass einen IAA-Spitzenwert im Alter von 8 bis 16 Wochen [230].

Unsere Beobachtungen zeigten also, dass die humorale Autoimmunität bei der NOD-Maus schon sehr früh im Leben auftritt, parallel zur Peri-/Insulinitis, die bei NOD-Mäusen schon im Alter von 4-6 Wochen nachweisbar ist [207,220]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass nur 30% der unbehandelten NOD-Mäuse nachweisbare IAA entwickelten, diese waren allerdings in ihrer Höhe sehr variabel und erreichten zum Teil sehr hohe Werte. Im Verlauf kam es dann eher bei zu einem Abfall der IAA-Titer, bei den älteren NOD-Mäusen waren seltener IAA nachweisbar, die dann auch in der Regel niedriger lagen, als die IAA-Titer der jüngeren Mäuse.

Betrachtet man die Verteilung der Subklassen während dieser frühen IAA-Produktion, fällt auf, dass die Autoimmunantwort in der unbehandelten NOD-Maus IgG1 dominiert war. Bei 15 unbehandelten Mäusen der Gruppe 1a und 1b konnten wir Autoantikörper gegen Insulin nachweisen. Bei diesen 15 IAA-positiven NOD-Mäusen bestimmten wir die IgG-Antikörper-Subklassen gegen Insulin. 6/15 (40%) IAA+ NOD-Mäuse konnten IgG1-IAA nachgewiesen werden, nur bei 1/15 (7%) Mäusen IgG2a/c. Diese Maus war zu diesem Zeitpunkt 12,4 Wochen alt und wies hohe Gesamt-IAA-Titer auf. Sie zeigte keine Th2 assoziierten IgG1- oder IgG2b-IAA.

Im Tiermodell wurden in früheren Studien zwei Thesen über den Verlauf der Autoimmunantwort während der präklinischen Phase des Typ 1 Diabetes diskutiert:

Kolb et al. zeigten anhand von Zytokinstudien, dass die präklinische Phase des Typ 1 Diabetes Th2 dominiert war. Sie bestimmten Th1 und Th2 assoziierte Zytokine im peripheren Blut von NOD-Mäusen und sahen in der präklinischen Phase eine Dominanz der nicht-destruktiven, Th2 dominierten Immunantwort. Entsprechend dieser Beobachtungen wäre die präklinische Phase von einer latenten, nicht-destruktiven Th2 assoziierten Immunantwort geprägt, die erst später in eine destruktive, Th1 dominierte Immunreaktion übergeht [116].

Andere Autoren bestimmten ebenfalls Zytokine bei NOD-Mäuse. Sie beschreiben jedoch von Anfang an eine Th1 dominierte destruktive Immunantwort [85]. Tian et al. bestimmten die Zytokinproduktion von antigenspezifischen Milzzellen bei NOD-Mäusen und sahen eine initiale Th1 dominierte Immunantwort, die sich erst auf ein Antigen beschränkte, im weiteren Verlauf jedoch einem „spreading“ unterlag, sich also auch auf andere Antigene ausweitete [200, 201].

Über die Zuordnung von Antikörper-Subklassen zu einer Th1- und Th2 dominierten Immunantwort wurden ebenfalls viele Studien im Tiermodell durchgeführt. Man geht davon aus, dass bestimmte Antikörper-Subklassen als indirekte Marker für die Dominanz einer Th2- oder Th1-Immunreaktion dienen können. So werden IgG1- und IgG2b-Antikörper in der NOD-Maus als Marker für eine Th2 dominierte Immunreaktion angesehen [200,189]. Als Marker für eine Th1 assoziierte Autoimmunantwort in der NOD-Maus werden Antikörper der Subklasse IgG2a/c betrachtet [200,189]. In unserer Studie waren IgG2a/c in der unbehandelten NOD-Maus bis auf eine Ausnahme nicht messbar. Die spontane humorale Autoimmunantwort gegen Insulin in der NOD-Maus war hier dominiert durch ein Th2 assoziiertes IAA-Subklassenmuster.

In dieser Arbeit wurden erstmals IgG-Subklassen gegen Insulin in der NOD-Maus gemessen. Wir beobachteten auf Subklassenebene eine Th2-Dominanz in der präklinischen Phase der NOD-Maus, was gut mit den Beobachtungen von Kolb auf Zytokinebene übereinstimmt. Zwar können wir keine sicheren Aussagen über den Verlauf der IAA-Subklassen machen, unsere Ergebnisse zeigten aber ein frühes Auftreten von IAA in der NOD-Maus, sowie eine Dominanz der Th2 assoziierten IgG1-IAA. Dies könnte bedeuten, dass die spontane Autoimmunreaktion gegen Insulin in der NOD-Maus eine primär nicht-destruktive, latente Autoimmunreaktion ist, die erst später in eine destruktive Th1 dominierte Immunreaktion übergeht. Dies widerspricht dem bisherigen Konzept mancher Forscher, wonach in der NOD-Maus zunächst IgG2a/c, also eine Th1

dominierte Autoimmunantwort, auftritt, die durch Immunintervention in Richtung einer Th2 Antwort mit Ausbildung von IgG1-IA verschoben werden kann.

#### **5.4 Verschiebung der murinen Immunantwort gegen Insulin nach Immunintervention**

Im Tiermodell der NOD-Maus konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung von prädiabetischen NOD-Mäusen mit Insulin eine reduzierte Diabetesinzidenz im Vergleich zu nicht behandelten NOD-Mäusen hervorgerufen wird (siehe 1.1.6). Dies könnte einerseits an der verminderten Aktivität der  $\beta$ -Zellen ( $\beta$ -cell rest) liegen [110,68], wonach durch die herabgesetzte Stoffwechselaktivität die  $\beta$ -Zellen weniger Antigene exprimieren und somit weniger immunogen sind [1,22]. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit exogenem Insulin in der NOD-Maus zu einem veränderten Muster des entzündlichen Infiltrats innerhalb der pankreatischen Inseln führt [7]. Es konnten nach Insulingabe mehr IL-4 und weniger INF- $\gamma$  produzierende Zellen nachgewiesen werden. Diese Tiere wiesen eine verringerte Diabetesinzidenz auf, als die Tiere in einer unbehandelten Kontrollgruppe. Der Schutz vor Diabetes kann durch den Transfer von CD4+ Zellen auf andere Tiere übertragen werden [179]. So liegt der Schluss nahe, dass der protektive Effekt der Insulintherapie hauptsächlich den Th2 assoziierten CD4+-Regulatorzellen zugeschrieben werden kann. Diese These wird außerdem noch durch das Vorherrschen von Th2 assoziierten IgG1 und IgG2b in der humoralen Immunantwort bei Mäusen nach Intervention mit exogenem Insulin unterstützt. Auch die alleinige Gabe von verschiedenen Immunadjuvantien wie z.B. BCG oder CFA als nicht-selektive Immunmodulatoren führt zu einer Reduktion der Diabetesinzidenz bei NOD-Mäusen (siehe 1.1.6, [170,185,141]). Dabei sollen Immunstimulantien wie IFA oder BCG eine Immuntoleranz der T-Lymphozyten hervorrufen [63].

Ohne die Diabetesinzidenz der Mäuse zu bestimmen, untersuchten wir hier Antikörper und Antikörper Subklassen gegen Insulin bei NOD-Mäusen, die mit Insulin plus Immunadjuvans, bzw. nur mit Immunadjuvans behandelt wurden. Unser Ziel war es, auf Subklassenebene zu überprüfen, ob es in der Maus im Rahmen einer Immunintervention in der prädiabetischen Phase zur Induktion einer Th2 dominierten Immunantwort kommt. Dabei sollte die Th1 bzw. Th2 Antwort nach Immunintervention mit Immunadjuvans und Immunadjuvans plus Insulin untersucht werden.

#### **5.4.1 IAA- und IAA-Subklassen nach alleiniger Impfung mit Adjuvans**

Sowohl nach Impfung der prädiabetischen NOD-Mäuse mit IFA, als auch mit DT, ergab sich kein Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens von Insulinautoantikörpern im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Auch der Verlauf der IAA- und IAA-Subklassen ähnelte dem der unbehandelten Kontrollgruppe. Es zeigte sich bei den mit Adjuvans behandelten NOD-Mäusen ein früher starker Autoantikörperanstieg, der zeitlich sehr homogen war.

Die IAA stiegen bald nach ihrem ersten Auftreten deutlich an und erreichten im Alter von 14 Wochen einen Spitzenwert. Die Höhe der IAA bei diesem frühen Anstieg war sehr variabel.

Auch die Verteilung der Subklassen ähnelte in der mit Adjuvans (DT oder IFA) behandelten Gruppe der bei unbehandelten NOD-Mäusen. Der frühe IAA-Anstieg war IgG1 und IgG2b dominiert. Auch die Titerhöhe der gemessenen IAA-Subklassen unterschied sich nicht von der Kontrollgruppe.

In früheren Studien konnte bei Impfung von NOD-Mäusen mit Immunadjuvans ein protektiver Effekt beobachtet werden. So untersuchten Shehadeh et al. die Diabetesinzidenz bei NOD-Mäusen, die mit BCG oder CFA behandelt worden

waren und stellten eine verringerte Diabetesinzidenz bei behandelten gegenüber nicht behandelten Kontrollmäusen fest [185]. Aufgrund von histologischer Untersuchung der Pankreata stellten sie ausserdem fest, dass die Immunreaktion in den Inseln der behandelten NOD-Mäuse mit verringerter Diabetesinzidenz nicht verringert war, der Charakter der Immunreaktion jedoch einen weniger destruktiven Charakter angenommen hatte. Pozzilli et al. zeigten in einer Studie eine verringerte Diabetesinzidenz bei NOD-Mäusen, die mit subkutanen Injektion von IFA behandelt worden waren [127]. Sie konnten ausserdem nachweisen, dass antigenspezifischen Milzzellen (v.a. gegen GAD und Insulin der mit IFA behandelten NOD-Mäusen eine Immunsuppression gegen die spezifischen Antigene hervorgerufen worden war und auf Zytokinebene in der behandelten Gruppe ein Th2 assoziiertes Zytokinmuster vorherrschte, während die unbehandelte Kontrollgruppe ein Th1 assoziiertes Zytokinmuster aufwies.

Entgegen diesen früheren Beobachtungen konnten wir auf Subklassenebene keine Veränderung im Subklassenmuster oder in der Titerhöhe durch Impfung mit Immunadjuvans beobachten. Die Autoimmunreaktion der mit Immunadjuvans behandelten NOD-Mäuse zeigte in dieser Studie ebenso wie die der unbehandelten NOD-Mäuse eine Th2 Dominanz. Th1 assoziierte IgG2a/c waren bei keiner Maus in dieser Gruppe messbar.

Die in früheren Arbeiten beschriebene Protektion durch die Impfung von NOD-Mäusen mit Immunadjuvans konnten wir auf Subklassenebene nicht nachvollziehen. Da wir jedoch bei unseren Mäusen keine Diabetesinzidenzen bestimmten, konnten wir anhand unserer Ergebnisse keine Aussagen über einen eventuellen protektiven Effekt machen, der sich nicht auf Subklassenebene manifestiert.

#### 5.4.2 IAA- und IAA-Subklassen nach Impfung mit Insulin und Adjuvans

28 NOD-Mäuse der Gruppe 3 wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit 0,25 IE Insulin und Adjuvans behandelt (13 IFA und 15 mit DT). Von diesen Mäusen konnten wir bei 16/28 (61%) Antikörper gegen Insulin im Blut nachweisen. Sowohl die Prävalenz, als auch die Höhe der gemessenen IA unterschied sich nicht von der Prävalenz und Höhe der IAA bei unbehandelten oder mit alleinigem Adjuvans behandelten NOD-Mäuse. Das Auftreten der IA in der Gruppe 3 war sehr zeitlich sehr inhomogen, auch in dieser Gruppe waren die IA häufig transient.

21 NOD-Mäuse der Gruppe 4 wurden mit 4IE Insulin und Adjuvans behandelt (11 mit IFA und 10 mit DT). Von diesen 21 Mäusen entwickelten 19/21 (90%) im Blut messbare Antikörper gegen Insulin. Auch die Höhe der gemessenen IA lag in der Gruppe 4 deutlich über der der Kontrollgruppen. Auch in dieser Gruppe war das Auftreten der Insulinantikörper war zeitlich inhomogen und die Titerhöhe stark schwankend. Wie bei den unbehandelten oder mit Adjuvans behandelten NOD-Mäusen bereits beschrieben, war bei den mit 4IE Insulin behandelten häufig ein früher peak zu beobachten. Die Antikörper waren häufig transient und fielen nach dem oft frühen Spitzenwert wieder ab, teilweise sogar unter die Nachweisgrenze.

Die Verteilung der IgG-Subklassen in der Gruppe 3 und 4 unterschied sich nicht von der Verteilung bei den unbehandelten oder mit Adjuvans behandelten NOD-Mäusen. Auch in den mit Insulin und Adjuvans behandelten Mäusen der Gruppe 3 und 4 bestand die Immunantwort fast ausschließlich aus der Produktion von IgG1 und IgG2b Antikörpern. In der Regel waren IgG1-IAA die dominierende Subklasse. Nur bei einer Maus konnten wir Insulinantikörper der Klasse IgG2a/c in einer Blutprobe nachweisen. In dieser Blutprobe lagen die IgG2a/c über den IgG1. In der darauffolgenden Blutprobe waren die IgG2a/c wieder unter die Nachweisgrenze gesunken, IgG1 dagegen angestiegen und bildeten dann die dominierende Subklasse.

Bei der NOD-Maus scheint die Produktion von Antikörpern der Klasse IgG1 und IgG2b mit einer Th2 Antwort assoziiert zu sein. IgG2a/c werden in der NOD-Maus als Th1 assoziiert angesehen [200,189]. Unsere Beobachtungen unterstützen die These, dass eine vorbestehende spontane Autoimmunantwort in der präklinischen Phase bei der NOD-Maus durch Immunintervention mit Insulin aufrecht erhalten wird, aber eine zusätzliche Expansion von Th2 Zellen induziert wird. Die von uns beobachtete Dominanz und Expansion der Th2 assoziierten Insulinantikörper-Subklassen stimmt gut mit anderen Studien überein, die zeigen, dass die Immunintervention mit Insulin vor allem Einfluss auf die Th2 Zellen nimmt, sie zur Proliferation anregt und eine Th2 dominierte Immunreaktion nach sich zieht. So bestimmten Tian et al. die Anzahl von INF- $\gamma$ -produzierenden insulinspezifischen Th1-Zellen, bzw. Il-4 und Il-5 produzierenden Th2-Zellen vor und nach Behandlung von NOD Mäusen mit s.c. Insulin oder der metabolisch inaktiven B-Kette des Insulin. Die Autoren konnten zeigen, dass die spontane destruktive Autoimmunreaktion, die zur Zerstörung der  $\beta$ -Zellen führt, Th1, also INF- $\gamma$  dominiert ist. Die Immunintervention mit Insulin oder der inaktiven B-Kette des Insulins hatte wenig Einfluss auf die Anzahl der Th1-Zellen, rief aber eine starke Th2 Antwort hervor, angezeigt durch das Vorherrschen von Il-4 und Il-5 produzierenden T-Lymphozyten [198].

Der Verlauf der Autoimmunantwort gegen Insulin während der prädiabetischen Phase und nach Immunintervention scheint bei der NOD-Maus nicht linear, sondern von stark wechselnder Aktivität zu sein. Im Gegensatz zu früheren Thesen herrschte bei unserer Arbeit eine Th2 dominierte Immunantwort bei unbehandelten NOD-Mäusen vor, die durch die Immunintervention mit Insulin noch verstärkt wurde.

Vor allem die Höhe der IgG1-IA, weniger die Höhe der IgG2b-IA ähnelten im Verlauf dem der Gesamt-IA und stieg nach Insulingabe deutlich an. Als Th2-assozierte Antikörper-Subklasse scheinen also vor allem IgG1-IA eine Expansion der Th2-dominierten Immunantwort zu verdeutlichen und könnten als

Marker für eine Th2-dominierte Immunantwort genutzt werden. Die Antikörper-Subklassen eignen sich zum Monitoring des Erfolges bei Immunintervention wahrscheinlich besser, als das jeweilige Zytokinmuster, da sie im peripheren Blut in ausreichender Konzentration nachweisbar und leicht zugänglich sind. Ob die von uns gemessene Th2 dominierte Immunantwort mit einer Diabetesprotektion assoziiert ist, und ob die Messung der Subklassen einen ausreichenden Marker für eine erfolgreiche Immunintervention darstellen, ist aufgrund unserer Ergebnisse nicht zu beantworten.

In der vorliegenden Arbeit verglichen wir auch die Immunintervention mit Insulin und DT mit der Immunintervention mit Insulin und IFA. Es wurde beschrieben, dass durch die Impfung mit der metabolisch unwirksamen B-Kette des Insulin in IFA eine dem gesamten Insulinmolekül vergleichbare protektive Wirkung bei NOD-Mäusen in der prädiabetischen Phase erzielt werden kann [164]. Das Adjuvans hat einen stimulierenden Effekt auf das Immunsystem und erhöht somit seine Reagibilität. IFA ist jedoch für den Menschen infektiös und somit in der Immunintervention beim menschlichen Typ 1 Diabetes nicht einsetzbar. Hier sollte untersucht werden, ob DT (Diphtherie und Tetanustoxoid) dem IFA vergleichbare Effekte erzielt, und beim Menschen als Immunstimulans verwendet werden kann. DT wird als Impfstoff bei Kindern eingesetzt, die Impfung von Kindern mit DT ist von der STIKO empfohlen, so dass die Verwendung von DT als Immunadjuvans keine zusätzliches Medikament für die Kinder bedeuten würde.

In der Gruppe der NOD-Mäuse, die mit 4IE Insulin plus Adjuvans behandelt wurden, war ein deutlicher Unterschied zwischen der Impfung mit IFA und mit DT auszumachen. Bei der Impfung mit Insulin und IFA wiesen 100% der Mäuse eine Antikörperantwort auf Insulin auf, bei der Impfung mit Insulin und DT 78%. Die Höhe der Antikörper war bei Impfung mit Insulin und IFA deutlich höher, als bei der Impfung mit Insulin und DT (Median von 359 units bei den mit DT behandelten NOD-Mäusen, Median von 1197 units bei den mit IFA behandelten

NOD-Mäusen, siehe 3.2). Betrachtet man die Verteilung der Subklassen im Hinblick auf die unterschiedlichen Immunstimulantien, lässt sich jedoch kein Unterschied feststellen. Sowohl bei den mit Insulin und IFA, als auch bei den mit Insulin und DT geimpften NOD-Mäusen, war die Antikörperproduktion IgG1 dominiert. Man könnte also daraus schließen, dass die Impfung mit Insulin zusammen mit DT als Adjuvans einen ähnlichen Effekt auf die Immunreaktion bei NOD-Mäusen in der prädiabetischen Phase hat. Ob auch die Häufigkeit und Höhe der Antikörperantwort im Rahmen der Immunintervention mit höherer Dosierung des DT zu steigern wäre, bleibt offen. Hinweis darauf gibt jedoch die Betrachtung der Gruppe der neugeborenen NOD-Mäuse. Überraschenderweise war dies die einzige Gruppe, in der die Impfung mit Insulin und DT zu einer deutlich stärkeren Antikörperproduktion geführt hat, als die Impfung mit Insulin und IFA. Hier zeigte nur eine Maus, die mit Insulin und IFA behandelt wurde, Antikörper gegen Insulin. Das bessere Ansprechen der neugeborenen NOD-Mäuse auf die Impfung mit Insulin und DT könnte darauf zurückzuführen sein, dass die neugeborenen NOD-Mäuse eine im Verhältnis zu ihrem Gewicht größere Menge an DT, als an IFA tolerieren. Um den Effekt der unterschiedlichen Dosierung des DT auf die Antikörperproduktion im Rahmen einer Immunintervention mit Insulin beurteilen zu können, werden allerdings weiterführende Studien nötig sein.

#### **5.4.3 IA- und IA-Subklassen nach Immunintervention bei neugeborenen NOD-Mäusen**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erstmals 18 neugeborene NOD-Mäuse im Sinne einer Immunintervention mit Insulin und Adjuvans behandelt. 7/18 NOD-Mäusen erhielten 0,2 IE Insulin plus IFA im Alter von 5 und 14 Tagen. 11/18 NOD-Mäusen erhielten 0,2 IE Insulin plus DT im gleichen Alter.

Von diesen 18 neugeborenen NOD-Mäusen entwickelten 9 Mäuse im Verlauf messbare Antikörper gegen Insulin. 4/9 I(A)A<sup>+</sup> Mäuse zeigten schon im Alter von 4 – 6 Wochen positive I(A)A (Median 187 units, Spanne: 165 – 380 units). Bei 3 dieser 4 NOD-Mäuse, bei denen schon in dieser frühen Blutprobe I(A)A nachweisbar waren, fielen die I(A)A danach jedoch wieder unter die Nachweisgrenze. Im Alter von 16 Wochen waren bei 6/9 NOD-Mäusen dieser Gruppe I(A)A nachweisbar (Median: 260 units, Spanne: 175 – 1175 units). Davon zeigten 3 Mäuse in dieser Blutprobe im Alter von 16 Wochen erstmals positive I(A)A, bei 2 weiteren Mäusen waren schon in früheren Blutproben I(A)A nachzuweisen, es kam jedoch im Alter zwischen 12 und 16 Wochen zu einem deutlich I(A)A-Anstieg.

Antikörper der Klasse IgG sind Immunglobuline mit einem spezifischen Gewicht von 150 kD. Diese Antikörper sind plazentagängig, werden also von der Mutter auf das Kind übertragen. Die Halbwertszeit von IgG im Serum beträgt 23 Tage [86]. Bei 4/9 NOD-Mäusen, die im Neugeborenen-Alter mit Immunintervention behandelt worden waren, konnten wir im Alter von 4 – 6 Wochen IgG gegen Insulin nachweisen. Bei 3 dieser 4 Mäuse fielen die I(A)A danach wieder ab und waren in der darauf folgenden Blutprobe nicht mehr nachweisbar. Die in dieser frühen Blutprobe gemessenen I(A)A scheinen also von der Mutter transplazentar übertragene Insulinautoantikörper zu sein, die im weiteren Verlauf vom Immunsystem des Nachkommen abgebaut wurden. Bis zum Ende des follow-up mit 16 Wochen konnten wir bei keinem dieser 3 NOD-Mäuse erneut Antikörper gegen Insulin nachweisen, sie scheinen also keine eigene Antikörperproduktion bis zu diesem Zeitpunkt aufzuweisen.

Bei 5 der 9 NOD-Mäuse, bei denen nach Immunintervention im Neugeborenen-Alter im Verlauf I(A)A nachzuweisen waren, war im Alter von 16 Wochen ein deutlicher Anstieg der I(A)A festzustellen. 3 dieser 5 Mäuse wiesen sogar erstmals in dieser Blutprobe I(A)A auf. Diese Antikörper scheinen also nicht transplazentar von der Mutter übertragene IAA zu sein, sondern auf einer

eigenen Antikörperproduktion der jeweiligen NOD-Maus zu beruhen. Der Anstieg der I(A)A lag relativ homogen bei 16 Wochen und könnte mit der Reifung des murinen Immunsystems zusammenhängen.

Betrachtet man die Immunantwort in Zusammenhang mit den verschiedenen Immunadjuvantien, fällt auf dass 8/9 NOD-Mäusen, bei denen nach Immunintervention im Neugeborenen-Alter I(A)A nachweisbar waren, Insulin zusammen mit DT erhalten hatten. Nur eine Maus entwickelte I(A)A nach Immunintervention mit Insulin und IFA. Bei dieser Maus waren I(A)A im Alter von 6 Wochen schwach nachweisbar. Sie fielen daraufhin wieder unter die Nachweisgrenze, so dass man nach oben genannten Überlegungen davon ausgehen könnte, dass diese frühen I(A)A von der Mutter transplazentar übertragene IAA sind. Somit wäre bei keiner der mit Insulin und IFA behandelten neugeborenen NOD-Mäuse eine Immunreaktion auf Insulin nachweisbar. Ob es bei einer höheren Dosierung des IFA oder des Insulin zu einer messbaren Immunantwort auf Insulin kommen würde, müsste in späteren Studien untersucht werden, die Mäuse schienen allerdings höhere IFA Dosen schlecht zu vertragen. Die Verteilung der IgG-Subklassen gegen Insulin in der Gruppe der neugeborenen NOD-Mäuse mit Immunintervention ähnelte der Verteilung in den anderen Gruppen. Die Immunantwort war hier ebenfalls IgG1 dominiert. IgG2b war in keiner Blutprobe nachweisbar. Nur bei einer Maus konnten wir in einer Blutprobe im Alter von 16 Wochen Antikörper der Subklasse IgG2a/c nachweisen. Diese Maus wies mit 16 Wochen eine hohe Gesamt-I(A)A Produktion auf, die IgG1 (2,33%gebundenes Insulin) dominiert war. IgG2a/c waren deutlich schwächer nachweisbar (1,88%gebundenes Insulin). Wie oben beschrieben, scheint die Produktion von Antikörpern der Klasse IgG1 und IgG2b bei der NOD-Maus mit einer Th2 Antwort assoziiert zu sein, während IgG2a/c einer Th1-Antwort zugeordnet werden [200,189]. Bei der Gruppe der neugeborenen NOD-Mäuse war die Immunantwort gegen Insulin also in jeder Maus Th2 dominiert, was zu den oben genannten Beobachtungen einer Th2

Dominanz bei Immunintervention mit Insulin und Adjuvans in der NOD-Maus passt.

## **6 Zusammenfassung**

Über die Dynamik der  $\beta$ -Zellzerstörung im Verlauf des Autoimmunprozesses bei Typ1 Diabetes bestehen nur unzureichende Kenntnisse. Das klassische Modell von G.Eisenbarth [59] geht vereinfacht von einem linearen Verlust der  $\beta$ -Zell-Masse aus, wobei sich dieser Verlust proportional zur Aktivität des Autoimmunprozesses verhält, welche durch das Vorhandensein von zirkulierenden Inselantikörpern abgeschätzt werden kann. 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. Der Nachweis von CD4- und CD8-T-Zellen aus Insulitis-Läsionen prädiabetischer und akut diabetischer NOD-Mäuse, die selektiv Th1-assoziierte Zytokine wie IL1, TNF- $\beta$  und IFN- $\gamma$  sezernieren, zeigen, dass eine destruktive Autoimmunität Th1-dominiert ist. Erfolgreiche experimentelle Immuninterventionen bei der prädiabetischen NOD-Maus konnten eine Th-2 Antwort induzieren oder verstärken, angezeigt durch den vermehrten Nachweis antigenspezifischer CD4-T-Zellen aus Insulitis-Läsionen, die selektiv Th2-assoziierte Zytokine wie IL4, und IL13 sezernierten. In einer weiteren Studie war eine durch Insulingabe erzielte Protektion mit der Generierung von IgG1 im Sinne einer Th2-Antwort assoziiert.

Aufgrund dieser Befunde sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob sich durch Analyse von Inselantikörper-Subklassen ein indirekter Einblick in die Th1-/Th2-Balance im Verlauf des Autoimmunprozesses und nach Immunintervention beim Menschen und im Tiermodell möglich ist.

Es zeigte sich, dass das Auftreten von Antikörpern gegen Inselantigene bei Kindern des BABYDIAB-Kollektivs durch einen frühen (medianes Alter: 2,2 Jahre) IgG1-Anstieg gegen ein einzelnes oder mehrere Inselantigene und in der Mehrzahl gegen Insulin gerichtet, geprägt war. Bei fünf Kindern kam es im Zuge dieses initialen Antikörper-Peaks zu einer akuten  $\beta$ -Zelldestruktion und Diabetesmanifestation. Bei den übrigen Kindern fielen die initial beobachteten Antikörperanstiege deutlich ab, gefolgt von weiteren Antikörper-Peaks gegen andere Inselantigene. Diese sequentiellen Titerbewegungen verschiedener Inselantikörper zeigen damit eine Ausbreitung der Immunantwort ("spreading") an und deuten auf eine Regulation derselben hin. Eine IgG4-Immunantwort war nur gegen Insulin nachweisbar, wobei diese bei 4 Kindern gegenüber IgG1 dominant war und bei weiteren fünf Kindern erst nach Absinken von IgG1-IA nachweisbar waren bzw. persistierten. Der Nachweis der IgG4 Subklasse war nicht mit einer Diabetesprotektion assoziiert. Diese Befunde weisen auf eine frühe und akute destruktive Phase der Inselzell-Autoimmunität hin, die möglicherweise einer Regulation unterliegt und sich bis zur Diabetesmanifestation chronisch auszubreiten vermag.

Bei Manifestation des Typ 1 Diabetes fanden sich für die Insulinautoantikörper hauptsächlich IgG1 und, mit etwas niedrigeren Titern, IgG4. IgG2 und IgG3 waren nur vereinzelt nachweisbar. Nach Insulinexposition waren zunächst nur IgG1-IA nachweisbar, gefolgt von IgG4, die einen kontinuierlichen Anstieg zeigten und 12 Monate nach Insulintherapie bei 11 Patienten einen höheren Titer als IgG1-IA aufwiesen. Die Immunantwort war bei Kindern stärker ausgeprägt als bei Erwachsenen sowie stärker bei Personen, bei denen initial Insulinautoantikörper nachweisbar waren. Vergleichbare IA-Subklassenprofile zeigten sich auch nach prophylaktischer Insulintherapie bei prädiabetischen Verwandten ersten Grades. Dabei waren IgG4-IA nicht mit einem Schutz vor der Entwicklung eines manifesten Diabetes assoziiert. Neumanifeste Patienten, die mit Cyclosporin behandelt wurden, zeigten eine verzögerte Entwicklung von IA, wobei IgG4-IA über die Dauer der 12-monatigen Immunsuppression nicht

detektierbar waren, um nach Beendigung der CsA-Behandlung, wie auch IgG1-IA im Sinne eines Rebounds deutlich anzusteigen. Trotz der Induktion eines IgG4-assoziierten Th2-Kompartiments der Immunantwort gegen Insulin fand sich bis 3 Jahre nach Beginn der Insulintherapie bei neu manifesten Patienten und bei Verwandten kein Shift zu IgG4-antiGAD oder IgG4-anti-IA-2. Die Gabe von exogenem Insulin löste somit kein potentiell Th2-assoziiertes und auf andere Inselantigene übergreifendes Spreading aus.

Bei unbehandelten NOD-Mäusen ließen sich bei 30% der untersuchten 30 Tiere mit einem neuentwickelten RIA IAA nachweisen. Bei weiteren 17 im Verlauf untersuchten NOD-Mäusen fanden sich ebenso in 30% IAA. IAA waren überwiegend zu einem frühen Zeitpunkt nachweisbar, im Verlauf sehr variabel und durch ausgeprägte intra- und interindividuelle Titterschwankungen gekennzeichnet. Bei der überwiegenden Mehrzahl der IAA positiven NODs fanden sich Antikörper-Peaks zwischen der 8. und 16. Woche, gefolgt von einem Abfall der Titer unter die Nachweisgrenze. Die bei allen IAA positiven NODs gemessenen Subklassen zeigten bei 40% der Mäuse IgG1, aber nur bei jeweils einer Maus die Subklasse IgG2b, bzw. IgG2a/c. Von 21 NODs, die ausschliesslich mit Adjuvans (IFA oder DT) immunisiert wurden, entwickelten, ähnlich dem Spontanverlauf, etwa ein Drittel der Mäuse IAA. Dagegen nahm die Häufigkeit induzierter IA nach Immunisierung neugeborener NODs mit Adjuvans plus Insulin auf 50% (IFA), bzw. auf 72% (DT) zu. Die Th2- assoziierte Subklasse IgG1 wurde in 3 von 8 IA-positiven NODs nachgewiesen, dagegen fand sich nur bei einer Maus die Subklasse IgG2a/c. IgG2b waren bei keiner Maus nach Immunisierung nachweisbar.

Zusammenfassend zeigen die Befunde, dass die vereinfachende Hypothese, mittels der Subklassenanalyse von Inselantigenen als eine Art Surrogatparameter eine polarisierte Th1- bzw. Th2-Antwort präzise abbilden zu können, die mit einer Protektion vor der Entwicklung eines Diabetes im Spontanverlauf, als auch nach Immunintervention, und dies sowohl beim

humanen Typ1 Diabetes, als auch im Tiermodell der NOD-Maus, assoziiert ist, nicht gehalten werden kann.

Dennoch erlauben die Ergebnisse der vorliegenden Subklassenanalysen in Zusammenschau mit den Inselantikörper-Titerverläufen wesentliche Rückschlüsse auf Verlauf und Dynamik spontaner und induzierte Inselautoimmunität. Der relativ zeitgleich auftretende frühe Antikörper-Peak bei BABYDIAB-Kindern weist auf eine spontane, möglicherweise programmierte Insulinitis hin, wobei sich ein Diabetes und damit  $\beta$ -Zell-Destruktion oft während einer frühen oder nachfolgenden IgG1-dominierten Antikörper-Peak-Antwort entwickelte.  $\beta$ -Zelldestruktion bei diesen Kindern ist somit charakterisiert durch eine IgG1-dominierte Antikörperantwort. Da die humorale Immunantwort bei Diabetes-Manifestation das gleiche Subklassenprofil aufweist wie die initialen Antikörper-Peaks, kann vermutet werden, dass von Beginn an eine potentielle Th1-Autoreaktivität besteht. Die sequentiellen Antikörper-Peaks weisen auf eine sehr dynamische und aktive Autoimmunität während der frühen Phase hin. Die Beobachtung, dass bei einigen Kindern persistierende IgG4-IAA erst nach einem IgG1-IAA-Peak auftraten, legt nahe, dass IgG1- und IgG4 durch verschiedene Faktoren induziert werden, und eine Rekrutierung, bzw. ein Switch zu einer Th2-Immunität möglich ist. Der Nachweis eines IgG4-Kompartiments ist aber weder im Verlauf des spontanen Autoimmunprozesses beim Menschen noch bei der Maus, und ebenso wenig nach Immunintervention im Einzelfall mit einer Diabetesprotektion assoziiert.

Schließlich legt die Parallelität der Entwicklung ähnlicher Insulinantikörper-Subklassenprofile im prädiabetischen Spontanverlauf und unter exogener Insulingabe nach Manifestation nahe, dass die endogene Immunisierung gegen Insulin durch eine chronische Antigenexposition gekennzeichnet ist. Die Immunantwort gegen endogenes und exogenes Insulin ist im Vergleich zu anderen Inselantigenen exzeptionell und umfasst sowohl ein Th1- wie Th2-Kompartiment, wobei exogenes Insulin die Entwicklung einer Th2-antwort fördert.

Das bisherige Konzept anderer Forscher, wonach in der NOD-Maus zunächst spontan Insulinautoantikörper der Klasse IgG2a (gemessen mit ELISA), also eine Th1-dominierte Antwort auftritt, die durch verschiedene Immuninterventionen in Richtung einer Th2-Antwort mit Ausbildung von IgG1-IA verändert werden kann und protektiv ist, können wir nicht bestätigen. Im Gegenteil sehen wir unter Verwendung des spezifischeren und sensitiveren RIA von Anfang an und fast ausschliesslich IgG1-IA, also eine dominante Th2-Antwort, die nach Immunisierung mit Insulin und Adjuvans noch deutlich verstärkt wird. Deshalb vermuten wir, dass der beobachtete Th-2 -shift nach Immunisierung nicht die Ursache für eine mögliche Diabetesprotektion ist, sondern lediglich ein assoziiertes Phänomen darstellt.

## 7 Literaturangaben

1. Aaen K, Rygaard J, Josefsen K, Petersen H, Bogren CH, Horn T, Buschard K. Dependence of antigen expression on functional state of beta-cells. *Diabetes* 39:697-701, 1990
2. Aanstoot H-J, Sigurdsson E, Jaffe M, Shi Y, Christgau S, Grobbee D, Bruining GJ, Molenaar JI, Hofman A, Baekkeskov S. Value of antibodies to GAD65 combined with islet cell cytoplasmic antibodies for predicting IDDM in a childhood population. *Diabetologia* 37:917-924, 1994
3. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383:787-793, 1996
4. Appel MC, Dotta F, O'Neil J, Eisenbarth GS. Beta-cell activity regulates the expression of islet antigenic determinants. *Diabetologia* 32 (suppl 1A):46, 1989
5. Arslanian SL, Becker DJ, Rabin B, Atchison R, Eberhardt M, Cavender D, Dorman J, Drash AL. Correlates of insulin antibodies in newly diagnosed children with insulin-dependent diabetes before insulin therapy. *Diabetes* 34:926-930, 1985
6. Atkinson M, Holmes LH, Sharp DW, Lancy PE, Maclaren NK. No evidence for serological autoimmunity to islet cell heat shock proteins in insulin dependent diabetes. *J Clin Invest* 87:721-724, 1991
7. Atkinson MA, Maclaren NK, Luchetta R. Insulinitis and Diabetes in NOD mice reduced by prophylactic insulin therapy. *Diabetes* 39:933-937, 1990
8. Atkinson MA, Maclaren NK, Scharp DW, Lacy PE, Riley WJ. 64000 Mr Autoantibodies as Predictors of Insulin-dependent Diabetes. *Lancet* 335: 1357-1360, 1990
9. Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev* 15:516-542, 1994
10. Baekkeskov S, Aanstoot H, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, DeCamilli P. Identification of the 64K

- autoantigen in insulin dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347:151-156, 1990
11. Bain SC, Prins JB, Hearne CM, et al. Insulin gene region-encoded susceptibility to type 1 diabetes is not restricted to HLA-DR4-positive individuals. *Nature Genetics* 2:212-215, 1992
  12. Baisch JM, Week T, Giles R, Hoover M, Stastny P, Capra D. Analysis of HLA-DQ genotypes and susceptibility in insulin-diabetes mellitus. *N Engl J Med* 322:1836-1841, 1990
  13. Banatvala JE, Schernthaner G, Schober E, DeSilva LM, Bryant J, Borkenstein M, Brown D, Menser MA, Silink M, Coxsackie B, mumps, rubella and cytomegalie-virus specific IgM response in patients with juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus in Britain, Austria and Australia. *Lancet* 1:1409-1412, 1985
  14. Barnett AH, Spiliopoulos AJ, Pyke DA, Stubbs WA, Burrin J, Alberti KG. Metabolic studies in unaffected co-twins of non-insulin-dependent diabetics. *Br.Med J* 282:1656-1658, 1981
  15. Bell GI, Horita S, Karam JH. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 33:176-183, 1984
  16. Bendelac A, Carnaud C, Boitard C, Bach JF. Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement fro both L3T4+ and Lyt 2+ T-cells. *J Exp Med* 166:823-832, 1987
  17. Bergerot I, Fabien N, Maguer V, Thivolet C. Oral administration of human insulin to NOD mice generates CD4+ cells that suppress adoptive transfer of diabetes. *J Autoimmun* 7:655-663, 1994
  18. Bertrams J, Baur MP. Insulin-dependent diabetes mellitus. In: Albert ED, Baur MP, Mayr WR, eds. *Histocompatibility Testing 1984*. Berlin: Springer-Verlag;1984:348-358

19. Bertrand S, De Paepe M, Vigeant C, Yale JF. Prevention of adoptive transfer in BB rats by prophylactic insulin treatment. *Diabetes* 41:1273-1275, 1992
20. Bingley PJ, Bonifacio E, Gale EA. Antibodies to glutamic acid decarboxylase as predictors of insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 344:266-267, 1994
21. Bingley PJ, Christie MR, Bonifacio E, Bonifanti R, Shattock M, Fonte MT, Bottazzo GF, Gale EAM. Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. *Diabetes* 43:1304-1310, 1994
22. Björk E, Kämpe O, Grawe J, Hallberg A, Norheim L, Karlsson FA. Modulation of beta-cell activity and its influence on islet cell antibody (ICA) and islet cell surface antibody (ICSA) reactivity. *Autoimmunity* 16:181-188, 1993
23. Bleich D, Jackson RA, Soeldner JS, Eisenbarth GS. Analysis of metabolic progression to type 1 diabetes in islet cell antibody positive relatives of patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 13:111-118, 1990
24. Blom L, Nyström L, Dahlquist G. The swedish childhood diabetes study. Vaccinations and infections at risk determinants for diabetes in childhood. *Diabetologia* 34:176-181, 1991
25. Bodansky HJ, Staines A, Stephenson C, Haigh D, Cartwright R. Evidence for an environmental effect in the aetiology of insulin dependent diabetes in a transmigratory population. *BMJ* 304:1020-2, 1992
26. Bodington MJ, McNally PG, Hurden AC. Cow's milk and type 1 childhood diabetes: No increase in risk. *Diabetic Med* 11:663-665, 1994
27. Boitard C, Feutren G, Castano L, Debray-Sachs M, Assan R, Hors J, Bach JF. Effect of cyclosporin A treatment on the production of antibody in insulin-dependent (type 1) diabetic patients. *J Clin Invest* 80:1607-1612, 1987
28. Bonifacio E, Atkinson M, Eisenbarth G, Serreze D, Kay TW, Lee-Chan E, Singh B. International Workshop on Lessons from Animal Models for

- Human Type 1 Diabetes: identification of insulin but not glutamic acid decarboxylase or IA-2 as specific autoantigens of humoral autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 50:2451-8, 2001
29. Bonifacio E, Bingley PJ, Shattock M, Dean BM, Dunger D, Gale EAM, Bottazzo GF. Quantification of islet-cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 335:147-149, 1990
  30. Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E. Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (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
  31. Bonifacio E, Scirpoli M, Kredel K, Füchtenbusch M, Ziegler AG. Early autoantibody responses in prediabetes are IgG1 dominated and suggest antigen-specific regulation. *J Immunol* 163:525-532, 1999
  32. Borch-Johnsen K, Joner G, Mandrup-Poulsen T, Christy M, Zachau-Christiansen B, Kastrup K, Nerup J. Relations between breast-feeding and incidence rates of insulin-dependent diabetes mellitus. A hypothesis. *Lancet* 11/84:1083-1086, 1984
  33. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 2:1379-1383, 1974
  34. Bottazzo GF, Pujol-Borrell R, Gale E. Aetiology of diabetes: the role of autoimmune mechanisms. In: *The Diabetes Annual* /I. Alberti KGMM, Krall LP (eds.) Amsterdam, Elsevier, p16-52, 1985
  35. Bradley BJ, Haskins K, La Rosa FG, Lafferty KJ. CD8 T cells are not required for islet destruction induced by a CD4+ islet-specific T-cell clone. *Diabetes* 41:1603-1608, 1992
  36. Bradley LM, Asensio VC, Schoietz LK, Harbertson J, Krahl T, Patstone G, Woolf N, Campbell IL, Sarvetnick N. Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. *J Immunol* 162:2511-3520, 1999

37. Bruining GJ, Molenaar JL, Grobbee DE, Hofman A, Scheffer GJ, Bruining HA, de Bruyn AM, Valkenburg HA. Ten year follow-up study of islet cell antibodies and childhood diabetes mellitus. *Lancet* 1:1100-3, 1989
38. Calhe RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Pentlow BD, Rolles K. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 2:1323-7, 1987
39. Carel JC, Boitard C, Eisenbarth GS, Bach JF, Bougneres PF. Cyclosporin delays but does not prevent clinical onset in glucose intolerant pre-type 1 diabetic children. *J Autoimmun* 9:739-745, 1996
40. Castano L, Eisenbarth GS. Type 1 Diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse and rat. *Annu Rev Immunol* 8:647-679, 1990
41. Castano L, Russo E, Zhou L, Lipes MA, Eisenbarth GS. Identification and cloning of a granule autoantigen (carboxypeptidase-H) associated with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 73:1197-201, 1991
42. Chamsaur HF, Bottazzo GF, Bertrams J, Assan R, Bach C. Virologic, immunologic and genetic factors in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Pediatr*. 100:15-20, 1982
43. Chatenoud L, Thervet E, Primo J, Bach JF. Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:123-127, 1993
44. Child DF, Smith CJ, Williams CP. Heat shock protein and the double insult theory for the development of insulin dependent diabetes. *J R Soc Med* 86:217-219, 1993
45. Christie MR, Genovese S, Cassidy D, Bosi E, Brown TJ, Lai M, Bonifacio E, Bottazzo GF. Antibodies to islet 37k antigen, but not to glutamate decarboxylase, discriminate rapid progression to IDDM in endocrine autoimmunity. *Diabetes* 43:1254-9, 1994
46. Cohen IR. Autoimmunity to chaperonins in the pathogenesis of arthritis and diabetes. *Ann Rev Immunol* 9:567-589, 1991
47. Colman PG, Thomas DW, Zimmet PZ, Welborn TA, Garcia-Webb P, Moore MP. New classification and criteria for diagnosis of diabetes

- mellitus. The australasian working party on diagnostic criteria for diabetes mellitus. *NZ Med J* 112:139-141, 1999
48. Couper JJ, Harrison LC, Aldis JJ, Colman PG, Honeyman MC, Ferrante A. IgG subclass antibodies to glutamic acid decarboxylase and risk for progression to clinical insulin-dependent diabetes. *Hum Immunol* 59:493-499, 1998
  49. Croft M, Carter L, Swain SL, Dutton RW. Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations:reciprocal action of interleukin (II)-4 and II-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J Exp Med* 180:1715-1728, 1994
  50. Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention. Association of 1 yr of cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion. The Canadia-European randomized control trial group. *Diabetes* 37:1574-1582, 1988
  51. Davidson HW, Hutton JC. The insulin-secretory-granule carboxypeptidase H. *Biochem J* 245:575-582, 1993
  52. Del Prete GF, De Carli M, Mastromauro C, Biagiotti R , Macchina D, Falagiani P, Ricci M, Romagnani S. Purified protein derivated of mycobacterium tuberculosis and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest* 88:346-350, 1991
  53. Diaz JL, Wilkin T. Comparison of liquid phase radiobinding assay and solid phase ELISA for the measurement of insulin antibodies and insulin autoantibodies in serum. *Diabet Med* 3:316-321, 1986
  54. Dittler J, Seidel D, Schenker M, Ziegler AG. GADIA2-combi determination as first-line screening for improved prediction of type 1 diabetes in relatives. *Diabetes* 47: 592-7, 1998
  55. Dotta F, Colman PG, Nayak RC, et al. Ganglioside expression in human pancreatic islets. *Diabetes* 38:1478-1483, 1989

56. Dotta F, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes mellitus: a predictable autoimmune disease with inter-individual variations in the rate of beta-cell destruction. *Clin Immunol Immunopathol* 50:S85-S95, 1989
57. Dotta F, Previti M, Tiberti C, Lenti L, Pugliese G, DiMario U. Identification of the GM2-1 islet ganglioside: similarities with a major neuronal autoantigen. *Diabetes* 41:365A, 1992. Abstract.
58. Dryberg T, Schwimmbeck PL, Oldstone MB. Inhibition of diabetes in BB rats by virus infection. *J Clin Invest* 81:928-931, 1988
59. Eisenbarth GS, Gianani R, Yu L, Pietropaolo M, Verge CF, Chase HP, Redondo MJ, Colman P, Harrison L, Jackson RA. *Proc Assoc Am Physicians* 110:1-11, 1998
60. Eisenbarth GS, Lafferty KJ. Type 1 Diabetes. *Molecular, Cellular and Clinical Immunology*. Oxford University Press 1994 Chapter 11
61. Eisenbarth GS. Insulin-dependent diabetes mellitus: a chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 314:1360-1368, 1986
62. Elias D, Cohen I, Shechter Y, Spierer Z, Golander A. Antibodies to insulin receptor followed by anti-idiotypic. *Diabetes* 36:348-354, 1987
63. Elias D, Markovits D, Reshef T, Zee R, Cohen IR. Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65kDa heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1576-1580, 1990
64. Elias D, Reshef T, Birk OS, Zee R, Walker MD, Cohen IR. Vaccination against autoimmune mouse diabetes with a T-cell epitope of the human 65kDa heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3088-3091, 1991
65. Elliott et al 1994
66. Feutren G, Papoz L, Assan R, Vialettes B, Karsenty G, Vexiau P, Du Rostu H, Rodier M, Sirmaj J, Lallemand A. Cyclosporin increases the rate and length of remissions in insulin-dependent diabetes of recent onset. Results of a multicentre double-blind trial. *Lancet* 2:119-124, 1986
67. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cells. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170:2081-2095, 1989

68. Füchtenbusch M, Rabl W, Grassl B, Bachmann W, Standl E, Ziegler AG. Delay of type 1 diabetes in high-risk, first degree relatives by parenteral antigen administration: the Schwabinger Insulin Prophylaxis Pilot Trial. *Diabetes* 41:536-541, 1998
69. Füchtenbusch M, Ziegler AG. Umweltfaktoren in der Pathogenese des Typ-I-Diabetes. *Diabetes und Stoffwechsel* 4:454-462, 1995
70. Fulcher CA, de Graaf Mahoney S, Zimmerman TS: FVIII inhibitor IgG subclass and FVIII polypeptide specificity determined in immunoblotting. *Blood* 69:1475-80, 1987
71. Gepner P, Amor B, Fournier C. 1,25-dihydroxy-vitamin D3 potentiates the in vitro inhibitory effects of cyclosporin A on T-cells from rheumatoid arthritis patients. *Art Reum* 32:31-36, 1989
72. Gepts W, De Mey J. Islet cell survival determined by morphology. *Diabetes* 27:251-261, 1978
73. Gepts W, LeCompte PM. The pancreatic islets in diabetes. *Am J Med* 70:105-115, 1981
74. Gerling I, Chatterjee NK, Nejman c. Coxsackie B4-induced development of antibodies to 64000-Mr islet autoantigen and hyperglycemia in mice. *Autoimm* 10:49-56, 1991
75. Gerstein HC. Cow's milk exposure and type 1 diabetes mellitus. A critical overview of the clinical literature. *Diabetes Care* 17:13-19, 1994
76. Gillard BK, Thomas JM, Nell LJ, Marcus DM. Antibodies against ganglioside GT3 in the sera of patients with type 1 diabetes mellitus. *J Immunol Methods* 142:3826-3832, 1989
77. Ginsberg-Fellner F, Witt ME, Yagihashi S, Dobersen MJ, Taub F, Fedun M, McEvoy RC, Roman SH, Davies TF, Cooper LZ, Rubinstein P, Notkins AL. Congenital rubella syndrom as a model for type 1 diabetes mellitus: increased prevalence of islet cell surface antibodies. *Diabetologia* 27:87-89, 1984

78. Gorsuch AN, Spencer KM, Lister J, McNally JM, Dean BM, Bottazzo GF, Cudworth AG. Evidence for a long pre-diabetic period in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Lancet* 2:1363-1365, 1981
79. Green A, Gale EAM, Patterson CC, the Eurodiab ACE Study Group. Incidence of childhood onset insulin dependent diabetes mellitus: the EURODIAB ACE Study. *Lancet* 339:905-909, 1992
80. Greenbaum CJ, Palmer JP, Kuglin B, Kolb H. Insulin autoantibodies measured by radioimmunoassay methodology are more related to insulin-dependent diabetes mellitus than those measured by enzyme linked immunosorbent assay: results of the Fourth International Workshop on the Standardization of Insulin Autoantibody Measurement. *J Clin Endocrinol Metab* 74:1040-1044, 1992
81. Grubin CE, Daniels T, Toivola B, Landin-Olsson M, Hagopian WA, Li L, Karlsten AE, Boel E, Michelsen B, Lenmark A. A novel radioligand binding assay to determine diagnostic accuracy of isoform-specific Glutamic Acid Decarboxylase Antibodies in Childhood IDDM. *Diabetologia* 37:344-350, 1994
82. Hanenberg H, Kolb-Bachofen V, Kantwerk-Funke G, Kolb H. Macrophage infiltration precedes and is a prerequisite for lymphocytic insulinitis in pancreatic islets of prediabetic BB rats. *Diabetologia* 32:126-134, 1989
83. Harris HF: A case of diabetes mellitus quickly following mumps. *Boston Med Surg J* 140:465-469, 1899
84. Harrison LC, Campbell IL, Allison J, Miller JF. MHC molecules and beta-cell destruction. Immune and nonimmune mechanisms. *Diabetes* 38: 815-818, 1989
85. Hartemann AH, Richard MF, Boitard C. Absence of significant Th2 response in diabetes-prone non-obese diabetic(NOD) mice. *Clin Exp Immunol* 116:225-230, 1999
86. Haseman CA, Capra JD, *Fundamental Immunology*, 1989
87. Hashimoto L, Habita C, Beressi JP, Delpine M, Besse C, Cambon-Thomsen A, Deschamps J, Rotter JI, Djoulah S, James MR, et al. Genetic

- mapping of a susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus on chromosome 11q. *Nature* 371:104-105, 1994
88. Haskins K, McDuffie M. Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet-specific T cell clone. *Science* 249:1433-1436, 1990
89. Heeger PS, Forsthuber T, Shive C, Biekert E, Genain C, Hofstetter HH, Karulin A, Lehmann PV. Revisiting tolerance induced by autoantigen in incomplete Freund's adjuvans. *J Immunol* 164: 5771-5781, 2000
90. Helmke K, Otten A, Willems W. Islet cell antibodies in children with mumps-infection. *Lancet II*, 211-212, 1983
91. Herold KS, Bluestone JA, Montag AG, Parihar A, Wiegner A, Gress RE, Hirsch R. Prevention of autoimmune diabetes with nonactivating anti CD3 monoclonal antibodies. *Diabetes* 41:385-392, 1992
92. Hitman GA, Tarn AC, Winter RM, et al. Type 1 (insulin-dependent) diabetes and a highly variable locus close to the insulin gene on chromosome 11. *Diabetologia* 28:218-222, 1985
93. Honeyman MC, Cram DS, Harrison LC. Transcription factor jun-B is target of autoreactive T-cells in IDDM. *Diabetes* 42:626-630, 1993
94. Horvath M, Varsanyi M, Bandi E, Balazsi I, Romics L. The effect of azathioprine, cyclosporine A and insulin on the in vitro lymphocyte-mediated cytotoxicity in type 1 diabetic patients. *Exp Clin Endocrinol* 100:90-94, 1992
95. Hummel M, Fuchtenbusch M, Schenker M, Ziegler AG. No major association of breast-feeding, vaccinations, and childhood viral diseases with early islet autoimmunity in german BABYDIAB Study. *Diabetes Care* 23:969-974, 2000
96. Hutchings P, Rosen H, O'Reilly L, Simpson E, Gordon S, Cooke A. Transfer of diabetes in mice prevented by blockade of adhesion-promoting receptor on macrophages. *Nature* 348:639-642, 1990
97. Hutchings PR, Simpson E, O'Reilly LA, Lund T, Waldmann H, Cooke A. The involvement of Ly2+ T cells in beta cell destruction. *J Autoimmun* 3:101-109, 1990

98. Jacobs MJ, van den Hoek AE, van de Putte LB, van den Berg WB. Anergy of antigen-specific T lymphocytes is a potent mechanism of intravenously induced tolerance. *Immunology* 82:294-300, 1994
99. Jarrett RF. Breast-feeding and diabetes. *Lancet* 12/84:1283, 1984
100. Jones DB, Hunter NR, Duff GW. Heat shock protein 65 as a B-cell antigen of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 336:483-585, 1990
101. Julier C, Hyder RN, Davies J, et al. Insulin-IGF2 region encodes a gene implicated in HLA-DR4-dependent diabetes susceptibility. *Nature* 354:155-159, 1991
102. Kanazawa Y, Komeda K, Sato S, Mori S, Akanuma K, Takaku F. Non-obese-diabetic mice: immune mechanisms of pancreatic  $\beta$ -cell destruction. *Diabetologia* 27:113-115, 1984
103. Karjalainen J, Martin JM, Knip M, et al. A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 327:302-307, 1992
104. Karlsson Mg, Ludvigson J. Peptide from glutamic acid decarboxylase similar to coxsackie B virus stimulates INF- $\gamma$  mRNA expression in Th1-like lymphocytes from children with recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 35:137-144, 1998
105. Karounos DG, Bryson JS, Cohen DA. Metabolically inactive insulin analog prevents type 1 diabetes in prediabetic NOD mice. *J Clin Invest* 100:1344-1348, 1997
106. Katz JD, Benoist C, Mathis D. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science* 268:1185, 1995
107. Katz JD, Wang B, Haskins K, Benoist C, Mathis D. Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis. *Cell* 74:1089-1100, 1993
108. Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, Atkinson MA, Maclaren NK, Tobin AJ. Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 89:283-292, 1992
109. Kaufman et al 1993

110. Keller RJ, Eisenbarth GS, Jackson RA. Insulin prophylaxis in individuals at high risk of type 1 diabetes. *Lancet* 341:927-928, 1993
111. Kemeny DM, Noble A, Holmes BJ, Diaz-Sanchez D. Immune regulation: a new role for the CD8+ T cel. *Immunol Today* 15:107-110, 1994
112. King CL, Nutman TB. IgG and IgE subclass regulation by Il-4 and IFN-gamma in human helminth infection. Assessment by B cell precursor frequencies. *J Immunol* 151:458-465, 1993
113. Koch M, Sodoyez JC, Sodoyez-Goffaux F, Dozio N, Di Silvio LS, Kurtz AB. Is quantitative assessment of insulin-antibodies and autoantibodies feasible? *Diabetologia* 32:774-8, 1989
114. Kolb H, Burkhart V. Nicotinamide in type 1 diabetes. Mechanism of action revisited. *Diabetes Care* 22 Suppl 2: B16-20, 1999
115. Kolb H. Ätiopathogenese und Genetik
116. Kolb H. Benign versus destructive insulinitis. *Diabetes Metab Rev* 13: 139-146, 1997
117. Kovarik J, Siegrist C-A. Immunity in early life. *Immunology today* 19:150-2, 1998
118. Kurtz AB, Nabarro JD. Circulating insulin-binding antibodies. *Diabetologia* 19:329-34, 1980
119. La Porte RE, Orchard TJ, Kuller LH, Wagener DK, Drash AL, Schneider BB, Fishbein HA. The Pittsburgh insulin-dependent diabetes mellitus registry: the relationship of insulin-dependent diabetes mellitus incidence to social class. *Am J Epidemiol* 114:379-384, 1981
120. La Porte RE, Tajika N, Akerblom HK, Berlin N, Brosseau J, Christy M, Drash AL, Fishbein H, Green A, Hamman R, Harris M, King H, Laron Z, Neil A. Geographic differences in the risk of insulin dependent diabetes mellitus: The importance of registries. *Diabetes Care* 8, suppl 1,101-107, 1985
121. Lampeter EF, Klinghammer A, Scherbaum WA, Heinze E, Haastert B, Giani G, Kolb H. The Deutsche Nicotinamide Intervention Study: an

- attempt to prevent type 1 diabetes. DENIS Group. *Diabetes* 47:980-984, 1998
122. Lee KU, Kazuhiko A, Yoon JW. Evidence for initial involvement of macrophage in development of insulinitis in NOD mice. *Diabetes* 37:989-991, 1988
123. Lenschow D, Ho S, Sattar H, Rhee L, Gray G, Nabavi N, Herold K, Bluestone JA. Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J Exp Med* 181:1145-1155, 1995
124. Lenschow DJ, Herold KC, Rhee L, Patel B, Koons A, Qin HY, Fuchs E, Singh B, Thomson CB, Bluestone JA. CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. *Immunity* 5:285-293, 1996
125. Leslie RDG, Pyke DA. The genetics of diabetes. In: Alberti KGMM, Krall LP (eds.) *The Diabetes Annual* 3. Amsterdam, Elsevier p39-54, 1986
126. Levy-Marchal C, Bridel MP, Sodoyez-Goffaux F, Koch M, Tichet J, Czernichow P, Sodoyez JC. Superiority of radiobinding assay over ELISA for detection of IAA in newly diagnosed type 1 diabetic children. *Diabetes Care* 14:61-63, 1991
127. Liddi R, Beales PE, Rosignoli G, Pozzilli P. Incomplete Freund's Adjuvans reduces Diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Horm Metab Res* 32:201-6, 2000
128. Makino S, Kunitomo D, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Exp Anim (Tokyo)*. 29:1, 1980
129. Mandrup-Poulsen T, Helqvist S, Wogensen LD, Movig J, Pociot F, Johannesen J, Nerup J. Cytokines and free radicals as effector molecules in the destruction of pancreatic  $\beta$ -cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 164:169-193, 1990
130. Mandrup-Poulsen T, Nerup J, Stiller CR, Marnier B, Bille G, Heinrichs D, Martell R, Dupre J, Keown PA, Jenner MR. Disappearance and

- Reappearance of islet cell cytoplasmatic antibodies in cyclosporin-treated insulin-dependent (type 1) diabetic patients. *Lancet* 1:599-602, 1985
131. Martin S, Pawlowski B, Greulich B, Ziegler AG, Mandrup-Poulsen T, Mahon J. Natural course of remission in IDDM during 1st yr after diagnosis. *Diabetes Care* 15:66-73, 1992
  132. Martin S, Schernthaner G, Nerup J, Gries FA, Koivisto VA, Dupre J, Standl E, Hamet D, McArthur R, Tan MH. Follow-up of cyclosporin A treatment in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a lack of long-term effects. *Diabetologia* 34:429-434, 1991
  133. Maruyama T, Takei M, Kataoka K, Matsuki S. Immunological aspect of non-obese diabetic mice: immune islet cell-killing mechanism and cell-mediated immunity. *Diabetologia* 27:121-1233, 1984
  134. Maugendre D, Sonnet E, Derrien C, Le Golff MC, Grais MC, Allannic H, Delamaire M. Combined analysis of long-term anti-beta-cell humoral reactivity in type 1 diabetes with and without thyroid disease. *Diabetes Metab* 25:28-33, 1999
  135. Menser MA, Forrest JM, Bransby RD. Rubella infection and diabetes mellitus. *Lancet* 1:57-60, 1978
  136. Mosmann TR, Cherwinski HM, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-2357, 1986
  137. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17:138-146, 1996
  138. Muir A, Peck A, Clare-Salzler M, Song YH, Cornelius J, Luchetta R. Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulinitis characterized by diminished intraislet interferon gamma transcription. *J Clin Invest* 95:628-634, 1995
  139. Naserke HE, Dozio N, Ziegler AG, Bonifacio E. Comparison of a novel micro-assay for insulin autoantibodies with the conventional radiobinding assay. *Diabetologia* 41:681-683, 1998

140. Ng WY, Thai AC, Lui KF, Yeo PP, Chea JS. Systemic levels of cytokines and GAD-specific autoantibodies isotypes in Chinese IDDM patients. *Diabetes Res Clin Pract* 43:127-135, 1999
141. Oldstone MB. Prevention of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice by virus infection. *Science* 239:500-502, 1988
142. Olmos P, A'Hern R, Heaton DA, Millward BA, Risley D, Pyke DA, Leslie RD. The significance of the concordance rate for type 1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins. *Diabetologia* 31:747-750, 1988
143. Pak CY, McArthur RG, Eun HM, Yoon JW. Cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet* 1:1-14, 1988
144. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tapati O, Raghu PK, Paquette TL. Insulin Antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science* 222:1337-1339, 1983
145. Palmer JP, Helqvist S, Spinas GA, Molving J. Interaction of beta cell activity and I1 concentration and exposure time in isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes* 38:1211-1216, 1989
146. Patrick AW, Moy CS, LaPorte RE. The world of insulin-dependent diabetes mellitus: what international epidemiologic studies reveal about the ethiology and natural history of IDDM. *Diabetes Metab Rev* 5:571-8, 1989
147. Persönliche Mitteilung Dr. J. Skyler auf den 61. Scientific Sessions der American Diabetes Association, Philadelphia, Pennsylvania, USA, Juni 2001
148. Platz P, Jacobsen BK, Morling N, et al. H:A-D and DR antigens in genetic analysis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 21:108-115, 1981
149. Portha B, Picon L. Insulin treatment improves the spontaneous remission of neonatal streptozotocin diabetes in the rat. *Diabetes* 31:165-169, 1982
150. Pozzilli P, Visalli N, Boccumi ML, Baroni MG, Buzzetti R, Fioriti E, Signore A, Cavallo MG, Andreani D, Lucentini L. Randomized trial comparing nicotinamide and nicotinamide plus cyclosporin in recent onset insulin-

- dependent diabetes (IMDIAB). The IMDIAB Study Group. *Diabet Med* 11:98-104, 1994
151. Pozzilli P, Visalli N, Buzzetti R, Baroni MG, Boccuni ML, Fioriti E, Signore A, Mesturino C, Valente L, Cavallo MG. Adjuvant therapy in recent onset type 1 diabetes at diagnosis and insulin requirement after 2 years. *Diabetes Metab* 21 :47-49, 1995
  152. Rabinovitch A. Immunoregulatory and cytokine imbalance in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation?. *Diabetes* 43:613-621, 1994
  153. Rabinovitch A. Roles of cytokines in IDDM pathogenesis and islet  $\beta$ -cell destruction. *Diabetes Rev* 1:215-240, 1993
  154. Rabinowe SL, George KL, Laughlin R, Soeldner JS, Eisenbarth GD. Congenital rubella: monoclonal antibody defined T cell abnormalities in young children. *Am J Med* 81:779-782, 1986
  155. Rakotoambinina B, Timsit J, Deschamps I, Laborde K, Jos J, Boitard C, Assan R, Robert JJ. Cyclosporin A does not delay insulin dependency in asymptomatic IDDM patients. *Diabetes Care* 18:1487-1490, 1995
  156. Rakotoambinina B, Tinsit J, Deschamps I, Laborde K, Gautier D, Jos J, Boitard C, Robert JJ. Insulin response to intravenous glucose, intravenous arginine and a hyperglycaemic clamp in ICA positive subjects with different degrees of glucose tolerance. *Diabetes Metab* 23(1):43-50, 1997
  157. Ramiya VK, Shang XZ, Wasserfall CH, Maclaren NK. Effect of oral and intravenous insulin and glutamic acid decarboxylase in NOD mice. *Autoimmunity* 26:139-151, 1997
  158. Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D, Lazarus AH, Serreze DV, Leiter EH, Cyopick P, Danska JP, Delovitch TL. Interleukine 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 178:87-99, 1993
  159. Raum D, Alper CA, Stein R, Gabbay KH. Genetic marker for insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1:1208-10, 1979

160. Richter W, Mertens T, Schoel B, Muir P, Ritzkowsky A, Scherbaum WA, Boehm BO. Sequence of 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
161. Riley WJ, Maclaren NK, Krischer J, Spillar RP, Silverstein JH, Schatz DA, Schwartz S, Malone J, Shah S, Vadheim C, Rotter JI. A prospective study of the development of diabetes in relatives of patients with insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* 323:1167-1172, 1990
162. Roll U, Christie MR, Fuchtenbusch M, Ziegler AG. Antibodies to GAD are not the first to appear in life in offspring of diabetic mothers or fathers, but are of value for the prediction of type 1 diabetes. *Diabetes* 44 (suppl):77A, 1995
163. Roll U, Christie MR, Fuechtenbusch M, Payton MA, Hawkes J, Ziegler AG. Perinatal autoimmunity in offspring of diabetic parents: The German Multicenter BABY-DIAB Study: Detection of humoral immune response to islet antigens in early childhood. *Diabetes* 45:967-973, 1996
164. Roll U, Turck CW, Gitelman SE, Rosenthal SM, Nolte MS, Masharani U, Ziegler AG, Baekkeskov S. Peptide mapping and characterisation of glycation patterns of the glima 38 antigen recognised by autoantibodies in type 1 diabetic patients. *Diabetologia* 43:598-608, 2000
165. Roll U, Ziegler AG. Combined antibody screening for improved prediction of IDDM – Modern strategies. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105:1-14, 1997
166. Romagnani S, Maggi E, Del Prete G. An alternative view of the Th1/Th2 switch hypothesis in HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10, iii-ix, 1994
167. Rubinstein P, Walker ME, Fedun B, Witt ME, Cooper LZ, Ginsberg-Fellner F. The HLA system in congenital rubella patients with and without diabetes. *Diabetes* 31:1088-1091, 1982

168. Irvine WJ, Gray RS, McCallum CJ. Pancreatic islet-cell antibodies as a marker for asymptomatic and latent diabetes and prediabetes. *Lancet* 2:1097-102, 1976
169. Sad S, Marcotte R, Mosmann TR. Cytokine induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 2:271-279, 1995
170. Sadelein MWJ, Qin HJ, Lauzon J, Singh B. Prevention of type 1 diabetes in NOD mice by adjuvant immunotherapy. *Diabetes* 39:583-589, 1990
171. Sai P, Kremer M, Nambalais MF, Aillet G. Antibodies spontaneously bound to islet cells in type 1 diabetes. *Lancet* 2 :233-4, 1984
172. Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL, Bloom BR. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 254:279-282, 1991
173. Sarvetnick N, Liggitt D, Pitts SL, Hansen SE, Stewart TA. Insulin dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon- $\gamma$ . *Cell* 52:773-782, 1988
174. Sarvetnick N, Shizuru J, Liggitt D, Martin L, McIntyre B, Gregory A, Parslow T, Stewart T. Loss of pancreatic islet tolerance induced by  $\beta$ -cell expression of interferon- $\gamma$ . *Nature* 346:844-847, 1990
175. Savola K, Bonifacio E, Sabbah E, Kulmala P, Vahasalo P, Karjalainen J, Tuomilehto-Wolf E, Merilainen J, Akerblom HK, Knip M. IA-2-Antibodies - A sensitive marker of IDDM with clinical onset in childhood and adolescence. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetologia* 41:424-429, 1998
176. Scharon TM, Scott P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to leishmania major in mice. *J Exp Med* 178:567-577, 1993
177. Schatz DA, Bingley PJ. Update on major trials for the prevention of type 1 diabetes mellitus: the American diabetes prevention trial (DPT-1) and the European nicotinamide diabetes intervention trial (ENDIT). *J Pediatr Endocrinol Metab* 1:619-622, 2001

178. Schnell O, Eisfelder B, Standl E, Ziegler AG. High-dose intravenous insulin infusion versus intensive insulin treatment in newly diagnosed IDDM. *Diabetes* 46:1607-1611, 1997
179. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 12:635-673, 1994
180. Seißler J, Amann J, Mauch L, Haubruck H, Wolfahrt S, Bieg S, Richter W, Holl R, Heinze E, Northemann W, et al. Prevalence of autoantibodies to the 65-and 67 kD isoforms of glutamate decarboxylase in insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 92:1394-9, 1993
181. Seißler J, Bieg S, Yassin N, Mauch L, Northemann W, Boehm BO, Scherbaum WA. Association between antibodies to the MR 67,000 isoform of glutamate decarboxylase (GAD) and type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus with coexisting autoimmune polyendocrine syndrome type II. *Autoimmunity* 19:231-238, 1994
182. Serreze DV, Chapman HD, Varnum DS, Hanson MS, Reifsnyder PC, Richard SD, Fleming SA, Leiter EH, Shultz LD. B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new „speed congenic“ stock of NOD.Ig mu null mice. *J Exp Med* 184:2049-2053, 1996
183. Serreze DV, Leiter EH, Christianson GJ, Greiner D, Roopenian DC. Major histocompatibility complex class I-deficient NOD-B2mnull mice are diabetes and insulinitis resistant. *Diabetes* 43:505-509, 1994
184. Shah SC, Malone JI, Simpson NE. A randomized trial of intensive insulin therapy in newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 320:550-554, 1989
185. Shehadeh N, Calcinaro F, Bradley BJ, Bruchlim I, Vardi P, Lafferty K. Effect of adjuvant therapy on the development of diabetes in mouse and man. *Lancet* 343:706-707, 1994
186. Shimada A, Charlton B, Taylor-Edwards C, Fathman G. Beta-cell destruction may be a late consequence of autoimmune process in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 45:1063-1067, 1996

187. Shizuru JA, Taylor-Edwards C, Banks BA, Gregory AK, Fathman CG. Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T helper lymphocytes. *Science* 240:659-662, 1988
188. Siemiatycki J, Colle E, Campbell S, Dewar R, Aubert D, Belmonte MM. Incidence of IDDM in Montreal by ethnic group and by social class and comparisons with ethnic groups living elsewhere. *Diabetes* 37:1096-1102, 1988
189. Snapper CM, Paul WE. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236:944-947, 1987
190. Solimena M, Folli F, Aparisi R, Pozza G, DeCamilli P. Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrome. *N Engl J Med* 322:1555-60, 1990
191. Srikanta S, Ganda OP, Eisenbarth GS, Soeldner JS. Islet-cell antibodies and beta-cell function in monozygotic triplets and twins initially discordant for type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 308:322-327, 1983
192. Srikanta S, Ganda OP, Rabizadeh A, Soelner JS, Eisenbarth GS. First degree relatives of patients with type 1 diabetes mellitus: islet cell antibodies and abnormal insulin secretion. *N Engl J Med* 313:461-464, 1985
193. Stavnezer J. A touch of antibody class. *Science* 288: 984-985, 2000
194. Suarez-Pinzon W, Rajotte RV, Mosmann TR, Rabinovitch A. Both CD4+ and CD8+ T-cells in syngeneic islet grafts in NOD mice produce Interferon-gamma during B-cell destruction. *Diabetes* 45:1350-7, 1996
195. Sun B, Sun SH, Chan CC, Wiggert B, Caspi RR. Autoimmunity to a pathogenic retinal antigen begins as a balanced cytokine response that polarizes towards type 1 in a disease-susceptible and towards type 2 in a disease-resistant genotype. *International Immunology* 11: 1307-1312, 1999
196. Szopa TM, Titchener PA, Portwood ND, Taylor KW. Diabetes mellitus due to viruses-some recent developments. *Diabetologia* 36:687-695, 1993

197. Thomson B, Robinson WP, Kuhner MK, et al. Genetic heterogeneity, modes of inheritance, and risk estimates for a joint study of caucasians with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Hum Genet.* 43:700-816, 1988
198. Tian J, Chau C, Kaufman DL. Insulin selectively primes Th2 responses and induces regulatory tolerance to insulin in prediabetic mice. *Diabetologia* 41:237-240, 1998
199. Tian J, Clare-Salzler M, Herschenfeld A, Middleton B, Newman D, Mueller R, Arita S, Evans C, Atkinson MA, Mullen Y, Sarvetnik N, Tobin AJ, Lehmann PV, Kaufman DL. Modulating autoimmunoresponses to GAD inhibits disease progression and prolongs islet graft survival in diabetes-prone mice. *Nat. Med.* 2:1348-53, 1996
200. Tian J, Lehman PV, Kaufman DL. Determinant spreading of T helper cell 2 (Th2) responses to pancreatic islet autoantigens. *J Exp Med* 186:2039-2043, 1997
201. Tian J, Olcott AP, Hanssen LR, Zekzer D, Middleton B, Kaufman DL. Infectious Th1 and Th2 autoimmunity in diabetes-prone mice. *Immunol Rev* 164:119-127, 1998
202. Tilil H, Koebberling J. Age-corrected empirical genetic risk estimates for first-degree relatives of IDDM patients. *Diabetes* 36:93-99, 1987
203. Tisch et al 1993
204. Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85, 291-297, 1996
205. Tisch R, Yang XD, Singer SM, Liblau RS, Fugger L, McDevitt HO. Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature* 366:72-75, 1993
206. Tiwari et al, 1985
207. Tochino Y: The NOD mouse as a model of type 1 diabetes. *Crit Rev Immunol* 8:49-81, 1987
208. Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA-DQ beta gene contribution to susceptibility and resistance to insulin-dependent mellitus. *Nature* 329:599-604, 1987

209. Toyoda H, Formby B. Contribution of T-cells to the development of autoimmune diabetes in the NOD mouse model. *Bioessays* 20:750-757, 1998
210. Trinchieri G, Wysocka M, D'Andrea A, Rengaraju M, Aste-Amezaga M, Kubin M, Valiante NM, Chehimi J. Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) or interleukine-12 is a key regulator of immune response and inflammation. *Prog Growth Factor Res* 4:355-368, 1992
211. Tuomilehto J, Zimmet P, Mackay IR, Koskela P, Vidgren G, Toivanen L, Tuomilehto-Wolf E, Kohtamäki K, Stengard J, Rowley MJ. Antibodies to Glutamic Acid Decarboxylase as Predictors of Insulin-Dependent Diabetes mellitus before clinical onset of disease. *Lancet* 343:1383-1385, 1994
212. Vardi P, Crisa L, Jackson RA. Predictive value of intravenous glucose tolerance test insulin secretion less than or greater than the first percentile in islet cell antibody positive relatives of type 1 (insulin dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 34:93-102, 1991
213. Vardi P, Dib SA, Tuttleman M, Connelly JE, Grinbergs M, Radizabeh A, Riley WJ, Maclaren NK, Eisenbarth GS, Soeldner JS. Competitive insulin antibody RIA. Prospective evaluation of subjects at high risk for development of Type I diabetes mellitus. *Diabetes* 36:1286-1291, 1987
214. Vardi P, Ziegler AG, Mathews JH, Dib D, Keller RJ, Ricker AT, Wolfsdorf JI, Herkowitz RD, Rabizadeh A, Eisenbarth GS, Soeldner JS. Concentrations of insulin autoantibodies at onset of type I diabetes: inverse log.linear correlation with age. *Diabetes Care* 11:736-739, 1988
215. Varey AM, Hutchings P O'Reilly L, et al. The development of insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice: the role of CD4+ and CD8+ T cells. *Biochem Soc Trans* 19:187-191, 1991
216. Velazquez JM, Lindquist S. hsp70: nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmatic storage during recovery. *Cell* 36:655-62, 1984
217. Virtanen SM, Räsänen L, Aro A, Lindström J, Sippola H, Lounamaa R, Toivanen L, Tuomilehto J, Akerblom HK. Infant feeding in finnish children

- < 7 yr of age with newly diagnosed IDDM. *Diabetes Care* 14:415-417, 1991
218. Wang YO, Ponteselli RG, Gill RG, LaRosa FG, Lafferty, KJ. The role of CD4 and CD8 T cells in the destruction of islet grafts by diabetic NOD mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:527-531, 1991
219. Wicker LS, Leiter EH, Todd JA, Renjilian RJ, Peterson E, Fischer PA, Zijlstra M, Jalnisch R, Peterson LB. Beta 2-microglobulin-deficient NOD mice do not develop insulinitis or diabetes. *Diabetes* 43, 505-504, 1994
220. Wicker LS, Miller BJ, Cocker LZ, et al. Genetic control of diabetes and insulinitis in non-obese diabetic (NOD) mouse. *J Exp Med* 165:1639-1654, 1987
221. Widhe M, Ekerfelt C, Forsberg P, Bergstrom S, Ernerudt J. IgG subclasses in lyme borreliosis: a study of specific IgG subclass distribution in an interferon-gamma-predominated disease. *Scand J Immunol* 47:575-581, 1998
222. Wiest-Ladenburger U, Hartmann R, Hartmann U, Berling K, Bohm BO, Richter W. Combined analysis and single-step detection of GAD65 and IA2 autoantibodies in IDDM can replace the histochemical islet cell antibody test. *Diabetes* 46:565-571, 1997
223. Wilberz S, Partke HJ, Dagnaes-Hansen F, Herberg L. Persistent MHV (mouse hepatitis virus) infection reduces the incidence of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 34:2-5, 1991
224. Wilkin T, Nicholson S, Casey C. A micro enzyme linked immunosorbent assay for insulin antibodies in serum. *J Immunol Methods* 76:185-194, 1985
225. Wilkin TJ, Schoenfeld SL, Diaz JL, Kruse V, Bonifacio E, Palmer JP. Systematic variation and differences in insulin-autoantibody measurement. *Diabetes* 38:172-181, 1989
226. Williams AJK, Bingley PJ, Palmer JP, Gale EAM. A novel Micro-Assay for Insulin Autoantibodies. *J Autoimmun* 10:473-478, 1997

227. Wolf E, Spencer KM, Cudworth AG. The genetic susceptibility to type I (insulin-dependent) diabetes: analysis of the HLA-DR association. *Diabetologia* 24:224-230, 1983
228. Yamada K, Nanoka K, Hanafusa T, Miyazaki A, Toyoshima H, Tarui S. Preventive and therapeutic effects of large-dose nicotinamide injections on diabetes associated with insulinitis. An observation in nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes* 31:749-753, 1982
229. Yan XM, Guo J, Pichurin P, Tanaka K, Jaume JC, Rapoport B, McLachlan SM. Cytokines, IgG Subclasses and costimulation in a mouse model of thyroid autoimmunity induced by injection of fibroblasts co-expressing MHC class II and thyroid autoantigens. *Clin Exp Immunol* 122: 170-179, 2000
230. Yu L, Robles DT, Abiru N, Kaur P, Rewers M, Kelemen K, Eisenbarth GS. Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: Evidence for early determination of subsequent diabetes. *PNAS* 97:1701-12, 2000
231. Zhang JZ, Davidson L, Eisenbarth GS, Weiner HL. Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10252-10256, 1991
232. Zhu J, Mix E, Link H. Cytokine production and pathogenesis of experimental autoimmune neuritis and Guillain-Barre syndrome. *J Neuroimmunol* 84:40-52, 1998
233. Ziegler AG, Baumgartl HJ, Ede G, et al. Low pigment skin type and predisposition for development of type 1 diabetes? *Diabetes Care* 13:529-531, 1990
234. Ziegler AG, Eisenbarth GS. Immunology of Diabetes. In: *The Diabetes Annual/5*. (Alberti KGMM, Krall LP, eds.) Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p22-50, 1990
235. Ziegler AG, Erhard J, Lampeter EF, Nagelkerken LM, Standl E. Involvement of dendritic cells in early insulinitis of BB rats. *J Autoimmun* 5:571-579, 1992

236. Ziegler AG, Herskowitz R, Jackson RA, Soeldner JS, Eisenbarth GS,. Predicting type I diabetes. *Diabetes Care* 13:762-775, 1990
237. Ziegler AG, Hillebrand B, Rabl W, Mayrhofer M, Hummel M, Mollenhauer U, Vordemann J, Lenz A, Standl E. On the appearance of islet associated autoimmunity in offspring of diabetic mothers: a prospective study from birth. *Diabetologia* 36:402-408, 1993
238. Ziegler AG, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offsprings of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the german BABYDIAB study. *Diabetes* 48: 460-468, 1999
239. Ziegler AG, Standl E, Albert E, Mehnert H. HLA associated insulin autoantibody formation in newly diagnosed type 1 diabetic patients. *Diabetes* 40:1046-9, 1991
240. Ziegler AG, Vardi P, Ricker AT, Masakazu H, Soeldner JS, Eisenbarth GS. Radioassay determination of insulin autoantibodies in NOD mice. Correlation with increased risk of progression to overt diabetes. *Diabetes* 38:358-363, 1989
241. Ziegler AG, Ziegler R, Jackson RA, Eisenbarth GS. Testing the linear destruction hypothesis in type I diabetes: the Joslin Study. In: Andreani D, Kolb H, Pozzilli P (eds.). *Immunotherapy of type I diabetes*, Wiley & Sons, 1989

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten:

Katharina Kredel, geb. 16. Mai 1975 in Heidelberg

Vater: Dr. Ludwig Kredel, Internist

Mutter: Jutta Kredel, Psychologin

## Ausbildung:

- 1985 – 1989: *Odenwaldgrungschule* in Bad König
- 1989 – 1992: *Bunsen-Gymnasium* in Heidelberg
- 1992 – 1994: *Kurfürst-Friedrich-Gymnasium* in Heidelberg
17. Juni 1994: Allgemeine Hochschulreife. Durchschnittsnote: 1,8
- November 1994: Teilnahme am Medizinertest (98,2%)
- April 1995 – September 1997: Studium der Medizin an der *Ruprecht-Karls-Universität* in Heidelberg
- April 1997: Ärztliche Vorprüfung durch das Landesprüfungsamt Baden-Württemberg. Endnote: 2,6
- Oktober 1997 – November 2001: Studium der Medizin an der *Ludwig-Maximilians-Universität* in München
- April 1998: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Note: 2
- September 2000: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Endnote: 1,6
- Oktober 2000 – Mai 2001: PJ am Krankenhaus *München Schwabing in Chirurgie und Dermatologie*
- Juni 2001 – September 2001: 3. Tertial des Praktischen Jahres in der III. Medizinischen Abteilung des *Krankenhauses München Schwabing* und bei Prof. Dr. Edmond Ryan, *University of Alberta*, Edmonton, Kanada.
- November 2001: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Note: 2  
Endnote der ärztlichen Prüfung: 1,8
- Januar 2002 - Juni 2003: Ärztin im Praktikum im *Krankenhaus München Schwabing* in der III. Medizinischen Abteilung (Diabetologie, Endokrinologie, Gastro-Enterologie)
- Januar 2003 - April 2003: AIP im Schichtdienst der Zentralen Notaufnahme (Sektion Innere Medizin)

seit Juli 2003: Assistenzärztin im Krankenhaus *München-Harlaching in der III. Medizinischen Abteilung (Kardiologie, Intensivmedizin)*

**Dissertation und weiterführende wissenschaftliche Arbeit:**

Mai 1998: Beginn der Promotion am *Institut für Diabetesforschung* bei Prof. Dr. Anette Ziegler, München-Schwabing.

Thema: Charakterisierung von Isotypen und Subklassen der Antikörperantwort gegen Insulin bei Patienten mit Prädiabetes und während der Behandlung mit Insulin sowie beim Mausmodell des menschlichen Typ 1 Diabetes

Februar 1999: Vorveröffentlichung von Ergebnissen der Dissertation, *Journal of Immunology* 163:525-532

März – Juni 1999: Stipendium der *European Association for the Study of Diabetes* für einen 4-monatigen Aufenthalt im Labor von Dr. Ezio Bonifacio, *Ospedale San Raffaele*, Mailand, Italien.

Thema: Entwicklung eines neuen Radio-Immunoassays zum Messen von Insulinantikörpern und Subklassen in NOD-Mäusen

September 1999: Posterpräsentation von Ergebnissen meiner Dissertation auf dem *35th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes*

März 2000: Vorveröffentlichung von Ergebnissen meiner Dissertation in der Zeitschrift *Diabetes* 49:918-925

August – September 2001: Hospitation bei Prof. Dr. Edmont Ryan, *University of Alberta*, Edmonton, Kanada.

Thema: Inselzelltransplantation bei Typ-1 Diabetes

Februar 2003: Vorveröffentlichung von Ergebnissen meiner Dissertation in der Zeitschrift *Clinical Immunology* 106: 155-62

**Sprachen:**

Deutsch: Muttersprache  
Englisch: sehr gut  
Französisch: fließend  
Italienisch: gut

**Computerkenntnisse:**

MS-Office  
SPSS  
Powerpoint

## 8 Danksagungen

Zuallererst möchte ich meinen herzlichen Dank an Frau Prof. Dr. Anette-G. Ziegler richten, die mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit zu schreiben. Sie hat mir nicht nur alle Einrichtungen ihres Institutes zur Verfügung gestellt und mir die nötigen Testverfahren beigebracht, die ich für meine Experimente brauchte, sondern hat mir darüber hinaus eine Faszination an der Wissenschaft und der präzisen Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen vermittelt. Sie hat mir gezeigt, sich nicht mit schnellen oder vordergründigen Interpretationen zufrieden zu geben, sondern sich immer wieder selbst zu hinterfragen, um so zu logischen und klar strukturierten Ergebnissen zu gelangen.

Darüber hinaus möchte ich auch Dr. Ezio Bonifacio sehr danken, dass er mich in Mailand aufgenommen hat und mir die Möglichkeit gab, ein halbes Jahr im Ausland neue Erfahrungen zu sammeln, ein neues Land kennen zu lernen und in dieser Zeit Teil seiner Mailänder Arbeitsgruppe sein zu dürfen. Er hat mich in fachlicher Hinsicht mit der Entwicklung der Antikörper-Subklassentests für Mäuse in besonderem Maße unterstützt und mir für meine Arbeit sehr geholfen.

Diese Arbeit wäre nicht entstanden ohne die große Hilfe von Dr. Martin Füchtenbusch. Er hat mich von Anfang an betreut und mir durch seinen fachlichen Rat und seine konstruktive Kritik bei der Ausarbeitung und Formulierung der Arbeit sehr geholfen. Seine Unterstützung war unerlässlich bei der Durchführung meiner Experimente, vor allem bei den sehr aufwendigen Mauszüchtungen, Impfungen und Blutentnahmen.

Des weiteren gebührt mein Dank ebenso sehr Prof. Dr. Eberhard Standl, an dessen Institut ich meine Experimente durchführen konnte und in dessen Abteilung ich außerdem meine Ausbildung als Ärztin im Praktikum absolvieren durfte.

Danken möchte ich auch dem gesamten Team des Institutes für Diabetesforschung, die mir in wichtigen Fragen bereitwillig Auskunft gegeben haben und mich immer gerne unterstützen, allen voran Frau Anette Knopf, für die Überwachung mancher Experimente.

Das Entwerfen und Durchführen der wissenschaftlichen Testverfahren, die Interpretation der Ergebnisse und das Schreiben dieser Arbeit war für mich mit vielen neuen Erfahrungen verbunden, nicht zuletzt das Auftreten auf Kongressen oder der Aufenthalt in Mailand. Ich bin sehr stolz, dass ich diese Erfahrungen am Institut für Diabetesforschung in München und Mailand machen durfte und danke allen Beteiligten für die Zusammenarbeit und die unvergessliche Zeit.