Universitätsklinikum Ulm

Klinik für Innere Medizin I –

Schwerpunkt Endokrinologie, Diabetes und Stoffwechsel

Sektionsleiter Endokrinologie: Prof. Dr. med. B. Böhm

Ärztlicher Direktor der Klinik für Innere Medizin I:

Prof. Dr. Thomas Seufferlein

Einflussnahme von proteaseresistenten Peptidliganden auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort im Kontext des Typ 1 Diabetes Mellitus

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

Nadine Mochar

Donaueschingen

2014

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1.Berichterstatter:	PD Dr. Timo Burster
2.Berichterstatter:	Prof. Dr. Uwe Knippschild
Tag der Promotion:	30.10.2015

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III
1. Einleitung 1
1.1. Das Immunsystem 1
1.1.1. Angeborenes Immunsystem 1
1.1.2. Adaptives Immunsystem 1
1.1.3. Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) 2
1.1.3.1. MHC Klasse I 3
1.1.3.2. MHC Klasse II 4
1.1.3.3. MHC Klasse III 5
1.1.3.4. Antigenprozessierung und Antigenpräsentation 5
1.2. Autoimmunerkrankungen 7
1.3. Klassifikation des Diabetes mellitus 8
1.3.1. Ätiologie des Diabetes mellitus Typ 1 8
1.3.2. Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 10
1.3.2.1. T-Zellen und β-Zell Apoptose 12
1.3.2.2. T-Zell-Epitope 14
1.3.3. Klinik und Komplikationen des Diabetes mellitus Typ 1 14
1.3.4. Insulin in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 1 15
1.4. Therapieansätze: 17
1.5. Fragestellung 17
2. Material und Methode 18
2.1. Material 18
2.1.1. Materialien für den Cathepsinverdau und *in vitro* Prozessierung 18
2.1.2. Materialien für die Identifizierung der Prozessierungsprodukte 18
2.1.3. Materialien für die Peptidsynthese 18
2.1.4. Materialien für den Peptidbindungs-Assay 18
2.1.5. Materialien für den T-Zellassay 19
2.1.6. Materialien für den ELISA 21
2.1.7. Verwendete Geräte: 23
2.2. Methoden 24
2.2.1. *In vitro* Prozessierung 24

2.2.2. Identifizierung der Prozessierungsprodukte 24
2.2.3. Peptidsynthese 24
2.2.4. Peptidbindungs-Assay 25
2.2.5. T-Zellassay 25
2.2.6. ELISA: TNF-α, IL-17, IFN-γ, IL-6, TGF-β1 26
2.2.7. Statistische Analyse 28
3. Ergebnisse 29
3.1. Generierung von proteaseresistenten Peptidliganden (prAPLs) 29
3.2. PrAPLs binden an HLA-DRB1*0401 32
3.3. T-Zell Assay 33
3.3.1. TNF-α 33
3.3.2. IFN-γ 37
3.3.3. IL-6 40
3.3.4. IL-17 43
3.3.5. TGF-β1 46
3.4. Ergebniszusammenfassung 49
3.4.1. T1DM-Donoren 49
3.4.2. Kontrollprobanden 51
4. Diskussion 53
4.1. Generierung von P21 basierenden prAPLs 54
4.2. Funktioneller T-Zellassay 56
4.2.1. Zusammenfassung: prAPLs induzieren bzw. hemmen die Zytokinsekretion 57
4.3. Ergebnisse im Genotypenvergleich 61
4.4. Sequenzvergleich von P21 und P17- Mutanten 63
4.5. Schlussfolgerung und Perspektive 64
5. Zusammenfassung 66
6. Literaturverzeichnis 67
Anhang 86
Lebenslauf 95

Abkürzungsverzeichnis

A:	Alanin
ADA:	*engl.*American Diabetes Association (Amerikanische Diabetes Gesellschaft)
AK:	Antikörper
AMCA-HA:	7-Amino-4-Methylcoumarin-3-Acetatsäure gekoppeltes Hämagglutinin-Peptid
APCs:	Antigenpräsentierende Zellen
AS:	Aminosäure
Bf:	Komplementfaktor Faktor B
BSA:	*engl.*Bovine serum albumin (Bovines Serumalbumin)
B-Zellen:	B-Lymphozyten
B-Zelllinie BSM:	Epstein-Barr virus-transformed B-cell line
CatB:	Cathepsin B
CatG:	Cathepsin G
CD4+ T-Zellen:	T-Helferzellen
CD8+ T-Zellen bzw. CTL:	zytotoxische T-Zellen
CS-DAS:	*engl.* cleavage-site-directed amino acid substitution
CTLA-4:	*engl.*cytotoxic T lymphocyte associated-4
DCs:	Dendritische Zellen
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DTT:	Dithiothreitol
ELISA:	*engl.* enzyme-linked immunosorbent assay (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
ER:	Endoplasmatisches Retikulum
ERAP1 und 2: aminopeptidase	*engl.* endoplasmic reticulum (endoplasmatische Aminopeptidase)

FCS:	Fetal Bovine Serum
Fmoc:	p-Fluorenylmethoxycarbonyl
GAD:	Glutaminsäure Decarboxylase
GADA:	Glutamatdecarboxylase-Antikörper
H_2O_2:	Wasserstoffperoxid
H_2SO_4:	Schwefelsäure
HCL:	Chlorwasserstoff
HEPES:	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA:	humanes Leukozytenantigen
HOBt:	Hydoxybenzotriazol
HPLC:	*engl.*high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie)
HPSEC:	*engl.* high performance size exclusion chromatography
HRP:	*engl.* horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HSP:	Hitzeschockprotein
IA-2:	Tyrosinphosphatase IA-2 Molekül
IAA:	*engl.* Insulin autoantibodies (Insulin-Autoantikörper)
ICA:	*engl.* Islet cell antibodies (Inselzell-Antikörper)
IFN-γ:	Interferon gamma
IgG:	Immunglobulin G
IL-1:	Interleukin 1
IL-17:	Interleukin 17
IL-5:	Interleukin 5

IL-6:	Interleukin 6
KCl:	Kaliumchlorid
KH_2PO_4:	Kaliumdihydrogenphosphat
KHK:	Koronare Herzkrankheit
LAP:	Latenz-assoziiertes Peptid
LCMV-GP:	*engl.* lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein
LT:	Lymphotoxin
MADGC:	Multiple Autoimmune Disease Genetics Consortium
MALDI-TOF:	matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight Massenspektrometrie
MHC:	*engl.* major histocompatibility complex (Hauptgewebeverträglichkeitskomplex)
n.s.:	nicht signifikant
Na_2HPO_4:	Dinatriumhydrogenorthophosphat
NaCl:	Natriumchlorid
NaOH:	Natriumhydroxid
NBI-6024: Epitopes	altered peptide ligand des Insulin B
NMM:	N-Methylmorpholin
NOD:	Non-Obese Diabetic Mouse
P:	Prolin
P21 Mu:	P21 Mutante
P21+Mu:	P21+ P21 Mutante
PAA:	*engl.* proinsulin autoantibodies (Proinsulin Autoantikörper)
PAS:	polyglanduläres Autoimmunsyndrom
pAVK:	periphere arterielle Verschlusskrankheit

PBMCs:	*engl.*peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS:	*engl.* phosphate buffer solution (Isotonische Phosphatpufferlösung)
PBS-T, PBS Tween20:	phosphate buffered saline with Tween 20
PLN:	pankreatische Lymphknoten
prAPLs:	*engl.*protease resistant altered peptide ligands (proteaseresistente Peptidliganden)
PTPN22:	lymphoide Tyrosinephosphatase Non-Receptor Type 22
RIP:	*engl.* rat insulin promoter
RIP-GP mice:	transgener Mäusestamm
RPMI-1640:	Hydrogencarbonat-Puffersystem
RT:	Raumtemperatur
T1DM:	Diabetes mellitus Typ 1
T2DM:	Diabetes mellitus Typ 2
TAP:	*engl.* transporter associated with antigen processing (Transporterprotein)
TBTU:	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TCR:	*engl.* T-cell receptor (T-Zell-Rezeptor)
TGF-β1:	*engl.*transforming growth factor beta 1 (transformierender Wachstumsfaktor β1)
Th1-Zellen:	T-Helferzellen Typ1
Th2-Zellen:	T-Helferzellen Typ 2
TNF-α:	Tumornekrosefaktor alpha
TNF-β:	Tumornekrosefaktor beta
Tregs:	T-regulatorische Zellen
Tris:	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

T-Zellen:	T-Lymphozyten
WHO:	*engl.* World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
WT51:	Epstein-Barr virus-transformed B-cell line
β-Zellen:	beta-Zellen

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen besteht aus einer Organisation von Zellen und Molekülen, die für die Verteidigung gegen eine Vielzahl von pathogenen Erregern in unserer Umwelt verantwortlich ist (Kumar V, 2007). Zum Schutz vor Infektionen bedient sich das Immunsystem zweier unterschiedlicher Systeme: einer angeborenen bzw. unspezifischen Immunantwort und einer adaptiven bzw. selektiven Immunantwort (Löffler G, 2007), (Abb.: 1).

1.1.1. Angeborenes Immunsystem

Diese natürliche Komponente des Immunsystems ist angeboren. Bestandteile dieses Systems sind Kontaktflächen wie die Schleimhäute, Zellen wie neutrophile Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen und natürliche Killerzellen ebenso wie humorale Elemente (beispielsweise Komplement oder C-reaktives Protein). Sie bildet die erste Phase der Infektabwehr, besitzt aber keine Spezifität, d.h. die Zellen besitzen keinen für sie spezifischen Antigenrezeptor und entwickelt kein Gedächtnis (Löffler G, 2007; Rink L et al.; 2012).

1.1.2. Adaptives Immunsystem

Die adaptive Immunität dient dem Schutz gegen Pathogene, die das unspezifische Immunsystem überwunden haben. T-Lymphozyten (T-Zellen) und antigenpräsentierende Zellen (APCs) wie Makrophagen, B-Lymphozyten (B-Zellen) und dendritische Zellen (DCs) bilden hierbei die zelluläre Komponente. Die aus B-Zellen entstandenen Plasmazellen bilden hierbei Antikörper. T-Zellen bzw. APCs sezernieren inflammatorische bzw. antiinflammatorische Zytokine. Im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort ist dieses Stadium spezifisch gegen die eindringenden Erreger, differenziert zwischen Selbst und Nicht-Selbst und weist die Fähigkeit zur Bildung eines Gedächtnisses auf (Kumar V, 2007, Löffler G, 2007).

Für die Funktionsfähigkeit des Immunsystems wird sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunität benötigt. Die unspezifische Phase kontrolliert beispielsweise die Aktivierung der adaptiven Immunantwort. Dies geschieht durch Regulation von costimulatorischen Molekülen, durch Freisetzung von Effektorzytokinen und Instruktion

von bestimmten Effektorantworten. Ebenso ist die Expression von Rezeptoren auf Lymphozyten abhängig von der ersten Abwehrreaktion. (Medzhitov R et al., 1997).

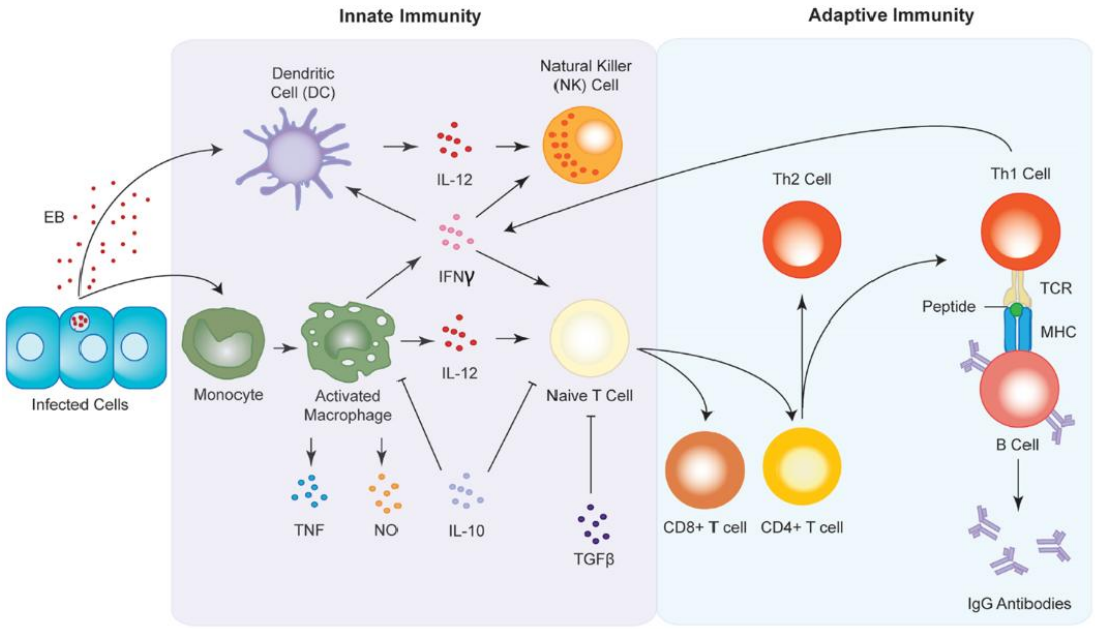


Abbildung 1: Angeborenes und erworbenes Immunsystem aus Redgrove KA and McLaughlin, Front. Immunol, Volume 5, October 2014: 1-22.
Copyright: © 2014 Redgrove and McLaughlin.

1.1.3. Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)

Im Blut zirkulierende Antigene können von T-Zellen nicht direkt detektiert werden. Hierfür benötigen T-Zellen eine Bindung bzw. Präsentation von Bruchstücken bzw. Fragmente (Peptide) dieser Antigene einen Antigenrezeptor: major histocompatibility complex (Abk. MHC, Hauptgewebeverträglichkeitskomplex) auf der Oberfläche von Zellen. Die Expression der MHC I, II und III- Moleküle erfolgt durch eine Gruppe von verschiedenen Genen, welche auf Chromosom 6 kodiert sind. Die Bezeichnung Haupthistokompatibilitätskomplex ist Spezies-unabhängig, wohingegen die MHC-Systeme der unterschiedlichen Spezies verschiedene Namen besitzen. Die humane Betitelung Humanes Leukozytenantigen (HLA), geht auf die erstmalige Beschreibung auf Leukozyten zurück (Dausset J et al., 1958). Die Nomenklatur, welche bei einer Konferenz im Jahr 1989 festgesetzt wurde (The Primate MHC; November 19-22, 1989; Oegstgeest, The Netherlands), stellt eine genaue und einheitliche Bezeichnung des MHC-Systems sicher. Die Abkürzung HLA wird durch einen Bindestrich vom Lokus-Symbol getrennt. Hierbei kennzeichnen die Großbuchstaben A,B,C den Klasse I Lokus, der Großbuchstabe D wird zur Bezeichnung des Klasse II Lokus benutzt. Ein auf D folgender zweiter Großbuchstabe

steht für Klasse II Loki-Familien (DP, DQ, DR), ein folgender dritter Buchstabe für die Subklasse (entweder A oder B, entsprechend dem α- oder β- Kettenkodierungs-Lokus). Die Kennzeichnung des Allels erfolgt in arabischen Ziffern. Bsp.: HLA-DRB*0401 (Kumar V, 2007, Löffler G, 2007, Rood van JJ et al., 1963, Klein J et al., 1990)

1.1.3.1. MHC Klasse I

MHC Klasse I werden von allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert und präsentieren hauptsächlich endogene Peptidantigene. Sowohl Selbst- als auch Fremdantigene (z.B. Viren) werden auf MHC I präsentiert und ermöglichen dadurch die Erkennung von infizierten Zellen durch zirkulierende zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) bzw. $CD8^+$ T-Zellen (Ackerman AL et al., 2004). Unterschieden werden 3 verschiedene humane HLA-Klasse I-Moleküle, HLA-A, -B und –C (kodominante Expression der mütterlichen und väterlichen Moleküle), mit jeweils einer schweren membranständigen α-Kette, die in α1-, α2- und die α3-Domäne unterteilt ist und die leichte, nicht kovalent gebundene β_2m-Kette (Bjorkman PJ et al., 1987; Hof H, 2005), (Abb.: 2).

Die Bindung von Antigenen an die MHC-Moleküle wird für die Erkennung und Aktivierung von T-Zellen benötigt und wird als MHC-Restriktion bezeichnet. Der Begriff MHC-Restriktion wurde erstmals 1974 von Zinkernagel und Doherty eingeführt und ihre Arbeit später mit dem Nobelpreis ausgezeichnet (Zinkernagel RM and Doherty PC, 1974).

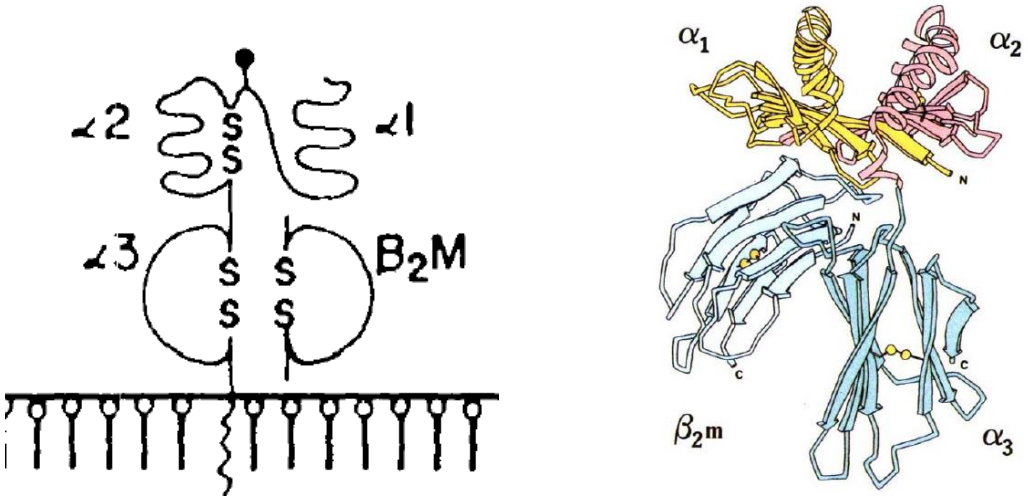


Abbildung 2: MHC Klasse I Molekül.

a) Schematische Darstellung des MHC Klasse I-Moleküls. Aus Kappes D and Strominger JL, Ann. Rev. Biochem, 1988, 57: 991- 1028.
(Lizenz nicht erforderlich)

b) Molekulare Struktur des MHC Klasse I-Moleküls mit der schweren α-Kette (gegliedert in die α_1, α_2 und α_3-Domäne) und der leichten, nicht kovalenten β_2m-Kette. Antigenbindungsstelle zwischen der α_1- und α_2-Domäne. Aus Bjorkman PJ et al., Nature, Vol. 329, 8 October 1987: 506-512.
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature, Copyright 1987.

1.1.3.2. MHC Klasse II

MHC Klasse II Moleküle befinden sich auf der Oberfläche von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) wie B-Lymphozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen und binden hauptsächlich exogene Antigene, die durch Endozytose aufgenommen wurden. Diese Peptide werden von $CD4^+$ T-Helferzellen erkannt (Ackerman AL et al., 2004). Das humane Molekül besteht aus einer transmembranen α- und einer ebenfalls membranständigen β-Kette. Die Unterklassen DR, DQ und DP werden auf allen APCs exprimiert (Kappes D and Strominger JL, 1988), (Abb.: 3).

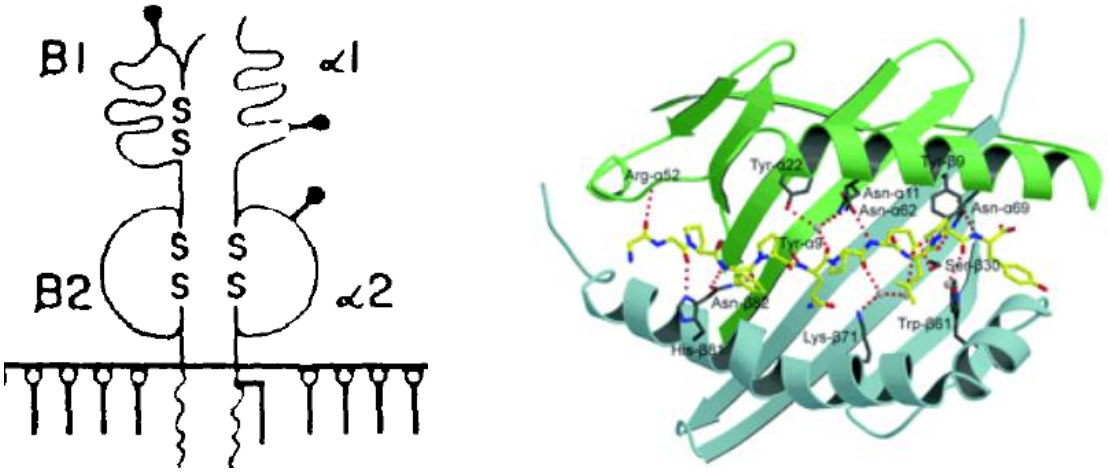


Abbildung 3: MHC Klasse II Moleküle.

a) Schematische Darstellung des MHC Klasse II-Moleküls. Aus Kappes D and Strominger JL, Ann. Rev. Biochem, 1988, 57: 991- 1028.
(Lizenz nicht erforderlich)

b) Molekulare Struktur des MHC Klasse II-Moleküls DQ2-αI-Gliadin Komplex mit den beiden α- und β-Ketten (grün und blau dargestellt). Peptidbindungsstelle bilden die α1 und β1-Domäne, Peptid α-Gliadin ist gelb dargestellt. Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen. Aus Kim C-Y, Quarsten H, Bergseng E, Khosla C and Sollid LM: Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. PNAS, 2004, vol. 101, no.12: 4175- 4179.
Copyright (2004) National Academy of Sciences, U.S.A.

1.1.3.3. MHC Klasse III

Nonaka M et al. publizierten 1994 eine Übersicht von bereits veröffentlichten MHC Klasse III Genen, die für Faktoren der unspezifischen Immunantwort kodieren. Hierzu gehören die Komplementfaktoren Faktor B (Bf), C2 und C4A/ C4B (Chaplin DD et al., 1983; Caroll MC et al., 1984), die Zytokine TNF-α und -β (Müller et al., 1987; Carroll MC et al., 1987), die Steroid-21-Hydroxylase (Carroll MC et al., 1985; White PC et al., 1985) und drei Gene des Hitzeschockproteins HSP70 (Millner CM et al., 1990). Im Gegensatz zu MHC Klasse I und II spielt MHC Klasse III keine Rolle in der Antigenpräsentation.

1.1.3.4. Antigenprozessierung und Antigenpräsentation

T-Zellen können Pathogene bzw. deren Antigene nur detektieren, wenn sie an MHC gebunden sind. Endogene, von der Zelle selbst synthetisierte bzw. virale Proteine im Cytosol werden durch das Proteasom hydrolisiert. Von dort aus werden die prozessierten Antigene mittels transporter associated with antigen processing (TAP) ins Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert, durch ERAP 1 und ERAP 2 gekürzt (sog.

Trimming), auf MHC Klasse I Moleküle beladen und an der Zelloberfläche präsentiert. Dadurch können die Peptidantigene durch $CD8^+$-T-Zellen erkannt werden und im Falle einer viralen Infektion, die entsprechende Zelle zerstören.

Bei der Kreuzpräsentation engl. cross-presentation werden bei bestimmten APCs, insbesondere DCs, durch Endozytose bzw. Phagozytose aufgenommene exogene Antigene nach Transport ins ER an MHC Klasse I gebunden und an der Oberfläche präsentiert. Hierdurch erfolgt eine Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen durch exogene Antigene.

Exogene, durch Phagozytose, Makropinozytose oder Endozytose aufgenommene Antigene, werden proteolytisch durch Cathepsine gespalten. Hierbei gelangen die Antigene über die frühen und späten Endosomen zu den Lysosomen. Die Kompartimente unterscheiden sich durch die unterschiedliche Säure- und Enzymkonzentration. Im MHC-II Beladungskompartiment, welches dem späten Endosom entspricht, werden gespaltene Antigene (Peptide) auf MHC Klasse II beladen. Der MHC II-Peptidkomplex wird an der Zelloberfläche präsentiert und bewirkt eine Inspektion durch T-Helferzellen ($CD4^+$-T-Zellen). (Blum JS et al., 2012; Burgdorf S et al., 2008; Abb.: 4).

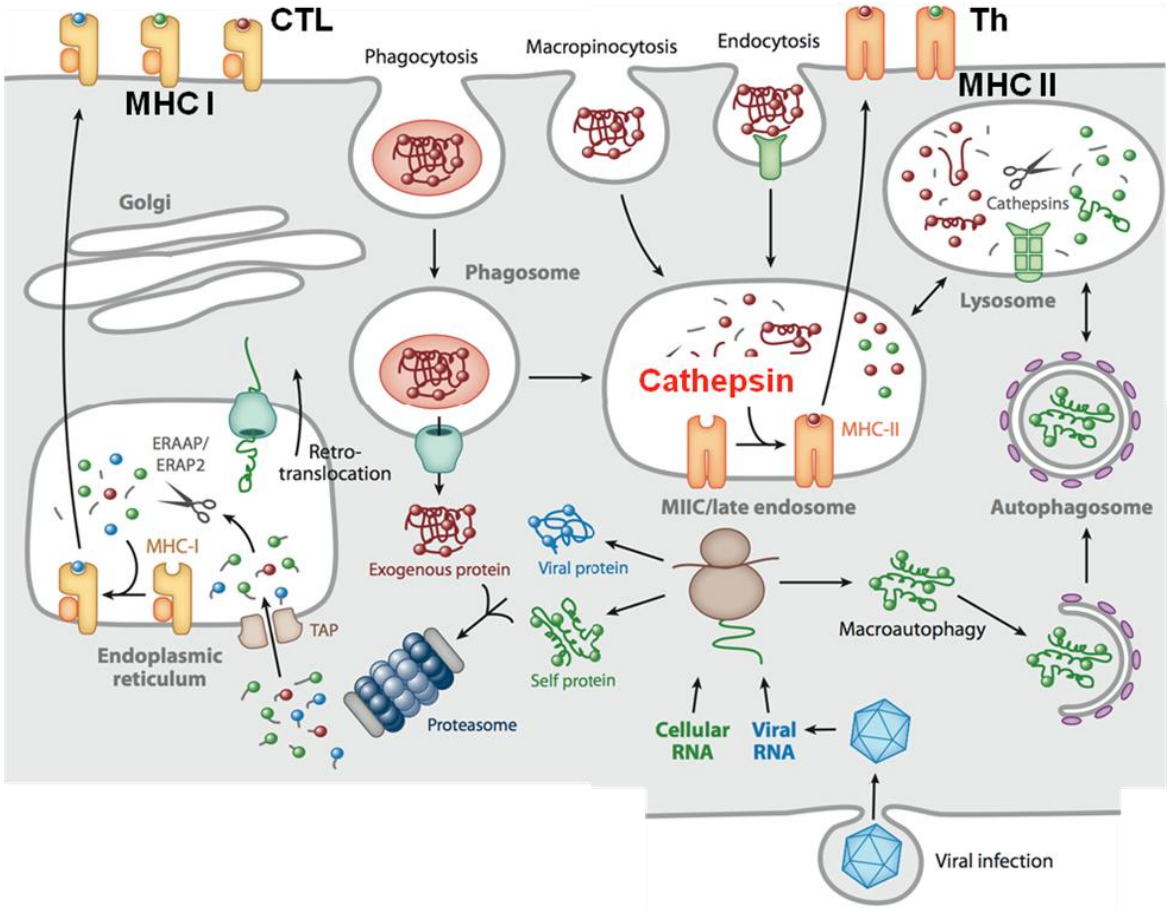


Abbildung 4: Antigenpräsentation. Unterschiedliche Wege der Aufnahme, der Prozessierung und der Präsentation von endogenen bzw. exogenen Antigenen. Aus Blum JS et al., Annu. Rev. Immunol., Vol. 31, 2013: 443- 473.
(Lizenz nicht erforderlich)

1.2. Autoimmunerkrankungen

Autoimmunerkrankungen sind definiert als Erkrankungen, die auf pathogenen Effekten von Autoantikörpern und autoreaktiven T-Zellen beruhen und Entzündungen, Funktionsstörungen oder anatomische Läsionen verursachen. Folgende obligatorische Kriterien müssen zudem erfüllt sein: 1) Auslösung der Krankheit bzw. des Krankheitszustandes durch Übertragung von Patienten-Antikörper oder T-Zellen und 2) eine Verlangsamung oder Prophylaxe des Erkrankungsverlaufes durch immunsuppressive Therapie. Weitere wesentliche Charakteristika sind 3) die gegen das Zielorgan gerichtete Manifestation der humoralen oder zellvermittelten Autoimmunität und 4) die experimentell induzierte Erkrankung durch Sensibilisierung gegen das bekannte Autoantigen im Zielorgan. Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM) erfüllt Kriterium 1-3 und Nummer 4 indirekt

im Tierversuch, daher handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung (Rose NR and Bona C, 1993; Bach JF, 1994). Zum Nachweis einer Autoimmunerkrankung stehen drei Verfahren zur Wahl. Nachweis von Autoantikörpern z.B. Antikörper GAD 65 Insulin beim T1DM, indirekte Evidenz durch Reproduktion der zell-vermittelten Autoimmunerkrankung im Versuchstier und detaillierte Belege durch die Klinik. Der direkte Nachweis einer willentlich übertragenen Immunerkrankung auf den Menschen besteht lediglich in wenigen Selbstversuchen (z.B. Harrington, 1990), wohingegen es von der Natur selbst den Nachweis mittels vertikaler Transmission von IgG-Autoantikörpern von der betroffenen Mutter auf den Fetus gibt (Rose NR and Bona C, 1993). Beispiele hierfür sind der neonatale Lupus erythematodes (Callen JP et al., 1985) oder der Morbus Basedow (Graves´ disease) (Perelman AH and Clemons RD, 1992).

1.3. Klassifikation des Diabetes mellitus

Die Klassifikation des Diabetes mellitus erfolgt anhand einer von der WHO und der Amerikanischen Diabetes-Gesellschaft (ADA) 1997 neu vorgestellten Einteilung (Kerner W, 1998):

- Diabetes mellitus Typ 1
  - Immunologisch bedingt
  - Idiopathisch bedingt
- Diabetes mellitus Typ 2
- Andere Diabetestypen mit bekannten Ursachen
- Gestationsdiabetes

1.3.1. Ätiologie des Diabetes mellitus Typ 1

Die Ätiologie der Zerstörung der β-Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas, welche letzten Endes zum Diabetes mellitus führt, ist im Detail nicht geklärt. (Belle van TL et al., 2011).

Postuliert ist neben multiplen Non-HLA T1DM Loki hauptsächlich das Risiko von MHC Klasse II- Merkmalen (Steck AK and Rewers MJ, 2011). Zu den Allelen, die gehäuft bei T1DM Patienten vorkommen, gehören HLA-DRB1*0301 (DR3), HLA-DRB1*0401

(DR4), HLA-DQB1*0201, HLA-DQB1*0302, HLA-DQA1*0301 und HLA-DQA1*0501 (Caillat-Zucman S et al., 1992). Das höchste Risiko zur Entwicklung eines T1DM wurde für die Genotypen HLA-DR4DQ8/ HLA-DR8DQ4, gefolgt von HLA-DR4DQ8/ HLA-DR17DQ2 und HLA-DR9DQ9/ HLA-DR17DQ2 beschrieben, wohingegen HLA-DR7DQ9 und HLA-DR15DQ6 mit einem Schutz vor der Krankheit assoziiert sind (Schipper RF et al., 2001). Studien ergaben zudem, dass > 90% der weißen Bevölkerung mit diagnostiziertem T1DM den Haplotyp HLA-DR3 oder HLA-DR4 bzw. 51% beide Allele besitzen (Wolf E et al., 1983; Rotter JI et al., 1983).

Allerdings entwickelt nur ein kleiner Anteil der Population (< 10%) mit entsprechendem Haplotyp einen klinischen Diabetes (Knip M and Siljander H, 2008). Dies legt die Überlegung nahe, dass neben genetischen Faktoren vermutlich Umwelteinflüsse als Auslöser für einen T1DM eine Rolle spielen (Belle van TL et al., 2011). Solche Faktoren sind Hygiene, Lebensbedingungen und Impfstrategien in den Industrieländern, welche durch veränderte Exposition mit infektiösen Erregern Einfluss auf Autoimmunerkrankungen haben (Cooke A, 2009). Filippi CM and Herrath von MG publizierten 2008 eine Übersicht von Pathogenen, die mit Diabetes mellitus Typ 1 assoziiert sind. Hierzu gehören v.a. die zu den Enteroviren gehörenden Spezies Coxsackie A und B und die Echoviren (Oikarinen S et al., 2014; Hyöty H und Taylor KW, 2002; Lönnrot M et al., 2000) bzw. die kongenitale Röteln-Infektion (Menser M et al., 1987; Hyöty H und Taylor KW, 2002) und vermutlich Mumps-Viren (Hyöty H et al., 1988), Rotaviren (Honeyman MC et al., 1998 und 2000) und die persistierende Cytomegalievirus-Infektion (Pak CY et al., 1988). Neben Viren stellen auch Bakterien in der Krankheitsentstehung vermutlich einen Risikofaktor dar. Eine Studie an Diabetes mellitus Typ 1 Patienten und gesunden Kontrollen wies bei den Diabetikern ein signifikant erhöhtes Vorkommen von Antikörpern gegen das Bakterium Mycobacterium avium aubsp. paratuberculosis nach, welches auf eine Assoziation mit diesem Bakterium hinweist (Sechi LA et al., 2008; Sechi LA et al., 2008). Als weitere mögliche „Trigger“ wurden bestimmte Nahrungsmittel/ Ernährungsfaktoren wie die frühe Kuhmilchgabe im Vergleich zur verlängerten Stillzeit (Dahlquist G et al., 1992; Mayer EJ et al., 1988; Atkinson MA et al., 1993; Bodington MJ et al., 1994), Weizenproteine wie Gluten (MacFarlane AJ et al., 2003; Klemetti P et al., 1998; Catassi C et al., 1987), Vitamin D Mangel bzw. niedrige Blutkonzentrationen von 2,5-Hydroxyvitamin D (Mathieu C et al., 2005; Littorin B et al., 2006), Medikamente wie beispielsweise Pentamidin oder Streptozotocin (Bouchard P et

al., 1982) und Stress (Surwit RS et al., 1992) kontrovers diskutiert. Einen weiteren Hinweis auf Relation mit bestimmten Umweltfaktoren geben Studien, die ein saisonales Auftreten der Erkrankung nachweisen. So zeigte sich eine verminderte Inzidenz von Diabetes in den warmen Monaten Mai, Juni und Juli bzw. doppelt so viele gemeldete Fälle im Herbst und Winter (im Vergleich zu Frühjahr und Sommer) (Christau B et al., 1977; Cudworth AG et al., 1977).

Die Vielfalt der oben genannten möglichen auslösenden Faktoren macht deutlich, dass nicht nur ein Auslöser die Entstehung eines T1DM fördert, sondern die Ursache komplexer ist. Vermutlich ist es eine Aneinanderreihung von Ereignissen, die bei prädisponierten Personen zur Autoimmunität führt. Außerdem lässt der Inhalt der bis heute vorgeschlagenen Punkte vermuten, dass es noch weitere, bis heute nicht bekannte Umweltfaktoren gibt und es aus diesem Grund momentan noch nicht möglich ist, den letztendlich verursachenden Faktor zu vermeiden.

1.3.2. Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1

An der Pathogenese des T1DM spielen neben Autoantikörpern v.a. autoreaktive T-Zellen eine Rolle. Zu den mit der Erkrankung assoziierten Antikörper, die das erste detektierbare Indiz darstellen, gehören die klassischen Inselzell-Antikörper (ICA), die Insulin-Autoantikörper (IAA) aber auch Autoantikörper gegen eine Isoform der Glutamatdecarboxylase (GADA), gegen das Protein Tyrosinphosphatase IA-2 Molekül (IA-2) und gegen den Zinktransporter ZnT8 (Slc30A8). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Anzahl von detektierbaren Autoantikörpern in eindeutigem Zusammenhang mit dem Risiko einer Progression des T1DM steht. Der Nachweis eines einzigen Antikörpers stellt in den meisten Fällen eine harmlose, nicht fortschreitende β-Zell-Autoimmunität dar. Im Vergleich bedeutet die Anwesenheit von ≥ zwei Autoantikörpern einen schwer aufhaltbaren fortschreitenden Prozess (Zhang L and Eisenbarth GS, 2011; Knip M and Siljander H, 2008; Wenzlau JM et al., 2007).

Laut Roep und Kollegen spielen T-Lymphozyten in der Zerstörung der Insulin-produzierenden β-Zellen eine entscheidende Rolle. Gestützt wird diese Annahme durch die Tatsachen, dass die Histologien des Pankreasgewebes von Diabetikern spezifische entzündliche Infiltrate aufweisen (Gepts W, 1965), die hauptsächlich aus autoaggressiven bzw. diabetogenen, zytotoxischen Zellen bestanden (Bottazzo GF et al., 1985). Ein zusätzlicher Fakt zur Insulitis ist die Möglichkeit, zu Beginn der Symptome zirkulierende

autoreaktive T-Zellen zu detektieren (Roep BO et al., 1990). Des Weiteren die Fähigkeit zur Remission einer Insulinabhängigkeit bzw. zur Verzögerung des Krankheitsverlaufes durch v.a. gegen T-Lymphozyten gerichtete immunsuppressive Therapie (Bougneres PF et al., 1988).

Zur Aktivierung dieser autoaggressiven bzw. autoreaktiven T-Zellen ist die Präsentation von Auto-Antigenen über MHC Moleküle notwendig. Der initiale Ort hierfür ist nicht geklärt. Sehr wahrscheinlich findet die Erkennung von Auto-Antigenen, die von MHC-Klasse II auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs) insbesondere DCs präsentiert werden, durch naive T-Zellen in den pankreatischen Lymphknoten statt (Abb.: 5). Anschließend erfolgt eine Einwanderung in das Pankreas und Re-Aktivierung durch verwandte β-Zell-Autoantigene mit dem Resultat einer Insulitis (Knip M and Siljander H, 2008). Laut Knip M and Siljander ist die Vorstellung, dass die naiven T-Zellen direkt in den Inselzellen aktiviert werden, ebenfalls eine Alternative. Bei β-Zellen, die *in vivo* normalerweise keine MHC Klasse II-Moleküle aufweisen (Baekkeskov S et al., 1981; Parr EL, 1979), konnten Pujol-Borrell et al. durch die kombinierte Gabe von IFN-γ und TNF bzw. IFN-γ und Lymphotoxin (LT) mittels *in vitro* Experimenten eine Expression von MHC Klasse II auf diesen Zellen induzieren.

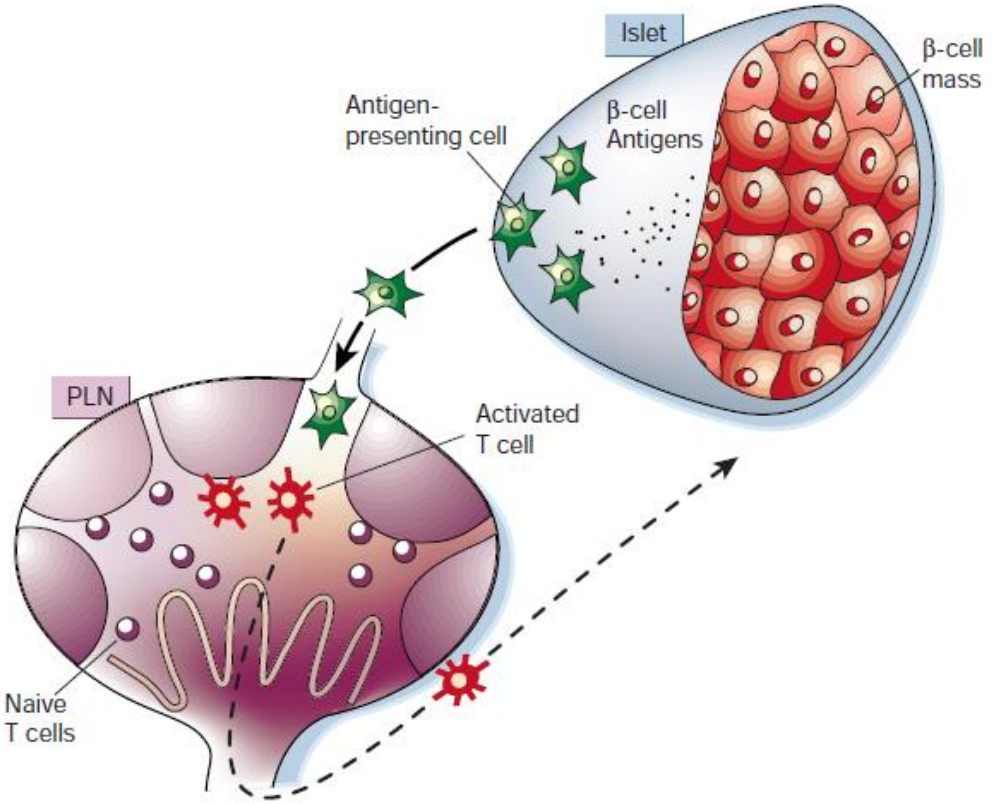


Abbildung 5: Schematische Darstellung der T-Zell-Aktivierung in den pankreatischen Lymphknoten (PLN). APCs treten in den Inselzellen mit Auto-Antigenen in Kontakt und präsentieren Peptide mittels MHC II auf ihrer Oberfläche. Naive T-Zellen zirkulieren im Blut und den lymphoiden Organen, einschließlich Lymphknoten. In den PLN treffen diese mit den APCs zusammen und es erfolgt eine Aktivierung der T-Zellen. Aus Mathis D et al., Nature, Vol. 414, 13 December 2001: 792- 798.
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature, Copyright 2001.

1.3.2.1. T-Zellen und β-Zell Apoptose

Die T-Zellpopulation, welche an der Zerstörung der Inselzellen direkt oder indirekt beteiligt sind, wird kontrovers diskutiert (Tisch R and McDevitt H, 1996). Verschiedene Studien zeigten eine Zerstörung der Inselzellen nach Transfer von $CD4^+$-T-Zellen ohne den Nachweis von zytotoxischen T-Zellen und schlugen deshalb lediglich $CD4^+$-Zellen als autoreaktive T-Zellen vor (Brenda JB et al., 1992; Wang Y et al., 1991). Andererseits wurden auch $CD8^+$-T-Zellen als essentiell in der Entwicklung eines T1DM beschrieben. Zum einen zerstören sie direkt β-Zellen durch Perforine, zum anderen rekrutieren sie u.a. $CD4^+$-T-Zellen. Durch die Ausschüttung von Zytokinen bewirken sie zudem eine Verstärkung der Immunantwort gegen β-Zellen (Wicker LS et al., 1994). Diese Hypothese

wird durch Experimente, bei denen $CD8^+$-T-Zellen die erste Zellpopulation in der Inselzellinfiltration von Non-obese-diabetic mouse sind, unterstützt (Jarpe AJ et al., 1991).

Zum jetzigen Zeitpunkt ist eine entscheidende Rolle von $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen in der Entstehung der Insulitis durch Inselzellinfiltration und folglich des Diabetes mellitus Typ I durch β-Zell-Zerstörung anerkannt (Wong FS and Janeway CA, 1997; Kay TWH et al., 1997).

Zur Zerstörung der β-Zellen des Pankreas führenden zellulären Mechanismen, schlugen Mathis et al. den „recognition-linked" und den „activation-linked" Mechanismus als die zwei verschiedenen Mechanismen vor. Der „recognition-linked" Mechanismus, der durch direkte zytotoxische T-Zellerkennung von MHC Klasse I präsentierten Autoantigenen zum β-Zelluntergang führt, benötigt den direkten Kontakt von $CD8^+$ T-Zellen mit der Zielzelle. Als molekularer Mechanismus wird in diesem Fall die Apoptose als wahrscheinlichste Variante diskutiert. Im Gegensatz hierzu führt im „activation-linked" Mechanismus die Aktivierung von $CD8^+$ bzw. $CD4^+$-T-Zellen durch Präsentation von Autoantigenen durch MHC Klasse I bzw. II Molekülen auf APCs zum Untergang von umliegenden β-Zellen. Dieser indirekte Mechanismus entsteht durch den Kontakt von T-Zellen und APCs. Cytokine wie beispielsweise IFN-γ, TNF-α, IL-1 und IL-6 und Stickstoffmonoxid bilden die molekularen Mediatoren (Abb.: 6).

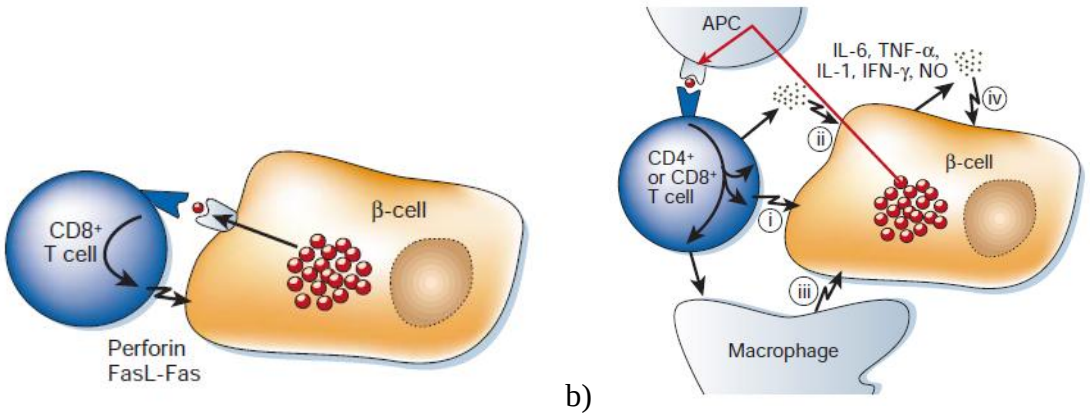


Abbildung 6: Zellulärer Mechanismus der β-Zell Zerstörung. A) „Recognition-linked" Mechanismus. Zerstörung der β-Zellen durch Zell/Zell Kontakt. $CD8^+$-T-Zellen werden direkt durch Antigene auf Inselzellen aktiviert. B) „Activation-linked" Mechanismus. $CD4^+$- oder $CD8^+$-T-Zellen erkennen durch APCs präsentierte β-Zell Antigene. Die indirekte Aktivierung führt zur Ausschüttung von löslichen Mediatoren, die den Inselzelltod verursachen. Aus Mathis D et al., Nature, Vol. 414, 13 December 2001: 792- 798.
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature, Copyright 2001.

1.3.2.2. T-Zell-Epitope

$CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen erkennen bestimmte Abschnitte eines Autoantigens (T-Zell-Epitope bzw. Peptide), die mittels MHC präsentiert werden. Lorenzo et al. veröffentlichten 2007 die bekannten Humanen und Maus- T-Zell-Epitope und verfassten eine Liste von mehr als 150 Peptiden (Lorenzo Di et al., 2007).

1.3.3. Klinik und Komplikationen des Diabetes mellitus Typ 1

Dem Auftreten der ersten Symptome geht eine latente Phase voraus. Zwischen dem Beginn der Autoimmunität und dem Auftreten der ersten Symptome liegt eine latente Phase, die charakterisiert ist durch das Vorhandensein von Diabetes spezifischen Autoantikörpern im peripheren Blut. Diese Phase ist sehr variabel und kann zwischen wenigen Monaten und Jahren dauern (Knip M, 2002). Die spezifische Zerstörung der β-Zellen des Pankreas durch diese Antikörper und diabetogenen T-Zellen führt erst zu Symptomen des T1DM, wenn ca. 90 % der Zellen betroffen sind und zeigt den Endzustand der Insulitis an (Hanafusa T et al., 1990; Elias D et al., 1990; Knip M, 2002). Der hieraus resultierende absolute Insulinmangel führt durch mangelnde Glukoseutilisation zum Anstieg der Blutglukosekonzentration und zur Glukosurie mit osmotischer Diurese. Die Patienten bemerken häufig Anfangssymptome wie Polydipsie, Polyurie und starken Gewichtsverlust bzw. unspezifische Beschwerden wie beispielsweise Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Leistungsminderung. Nicht selten wird die Erkrankung erst wegen einer diabetischen Ketoazidose bedingten Bewusstseinsstörung, die bis zum Coma diabeticum reichen kann, diagnostiziert. Ein jahrelang bestehender oder schlecht bzw. unbehandelter Diabetes mellitus bringt weitere Komplikationen wie die Makro- bzw. Mikroangiopathie mit sich. Diese Hauptkomplikationen treten bei der Mehrzahl der an DMT1-Erkrankten auf. Die Schäden der großen Gefäße können sich in Form einer koronaren Herzkrankheit (KHK), einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) bzw. einer Verschlusskrankheit hirnversorgender Arterien oder einem Apoplex äußern. Die Mikroangiopathie kann zum Auftreten des Morbus Kimmelstiel-Wilson, einer Glomerulosklerose der Nieren mit der gefürchteten Progression zur terminalen Niereninsuffizienz, einer Retinopathie oder einer Neuropathie, die häufig auch aufgrund der zusätzlich bestehenden pAVK in der Amputation von Gliedmaßen v.a. der unteren Extremität endet, führen. Des Weiteren besteht eine Beeinflussung der Makro- durch die Mikroangiopathie. So stellt die Nephropathie durch die reduzierte glomeruläre Filtrationsrate, einen enormen Risikofaktor

für makrovaskuläre Komplikationen wie den Herzinfarkt oder den ischämischen Insult dar. Diese sind nur einige der möglichen Komplikationen der Erkrankung (Herold G, 2009, Forbes JM and Cooper ME, 2013).

Dies macht deutlich, dass der unbehandelte bzw. schlecht eingestellte Diabetes mellitus zu einer lebensbedrohlichen Erkrankung werden kann, die entweder durch akute Komplikationen wie die diabetische Ketoazidose bzw. das Coma diabeticum oder durch chronische Schäden an Endorganen wie den Nieren oder dem Herz bedingt ist. Aus diesem Grund ist eine sorgfältige Therapie unerlässlich.

1.3.4. Insulin in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 1

Die Erkrankung, die seit dem Altertum mit den Symptomen Polydipsie und Polyurie (griechisch *διαβήτης* für Diabetes „hindurchfließen“ (PONS.eu/ Online-Wörterbuch)) und seit Mitte des 17. Jahrhunderts zusätzlich mit dem Merkmal der Zuckerausscheidung (lateinisch *mellitus* für „honigsüß“ (PONS.eu/ Online-Wörterbuch)) bekannt ist, ließ die Betroffenen kaum das Erwachsenenalter erreichen. Dies änderte sich schlagartig durch die Forschung des jungen Arztes Frederick Grant Banting und seinen Assistenten Charles Best. 1922 waren sie bereits in der Lage, ein von ihnen von Hunden gewonnenes Präparat an einem 14-jährigen Diabetes-Patienten und darauf an weiteren Betroffenen mit großem Erfolg zu testen (Pliska V et al., 2005). Für die Entdeckung des Insulins erhielt Banting und John Macleod 1923 den Nobelpreis (Nobelprize.org).

Insulin wird in vivo in den β-Zellen des Pankreas als Prä-Proinsulin gebildet. Das hierfür kodierende Gen liegt auf Chromosom 11. Prä-Proinsulin (Signalpeptid – B-Kette – C-Peptid – A-Kette) gelangt aufgrund des Signalpeptides in das Lumen des rauen Endoplasmatischen Retikulums, wo durch Abspaltung eben dieses Signalpeptides Proinsulin entsteht (Abb.: 7). Das entstandene Proinsulin wird daraufhin zum Golgi-Apparat transportiert. Dort durch eine Endoprotease zwischen der A-Kette und dem C-Peptid und zwischen der B-Kette und dem C-Peptid gespalten und am C-Terminus mittels einer Carboxypeptidase H um zwei AS gekürzt. Dieser Vorgang führt zur Entstehung von reifem Insulin (A- und B- Kette) und eines C-Peptides. Einige Proinsulinmoleküle entgehen dieser Spaltung und gelangen ebenfalls in den Blutstrom (Halban PA, 1991; Löffler G, 2007).

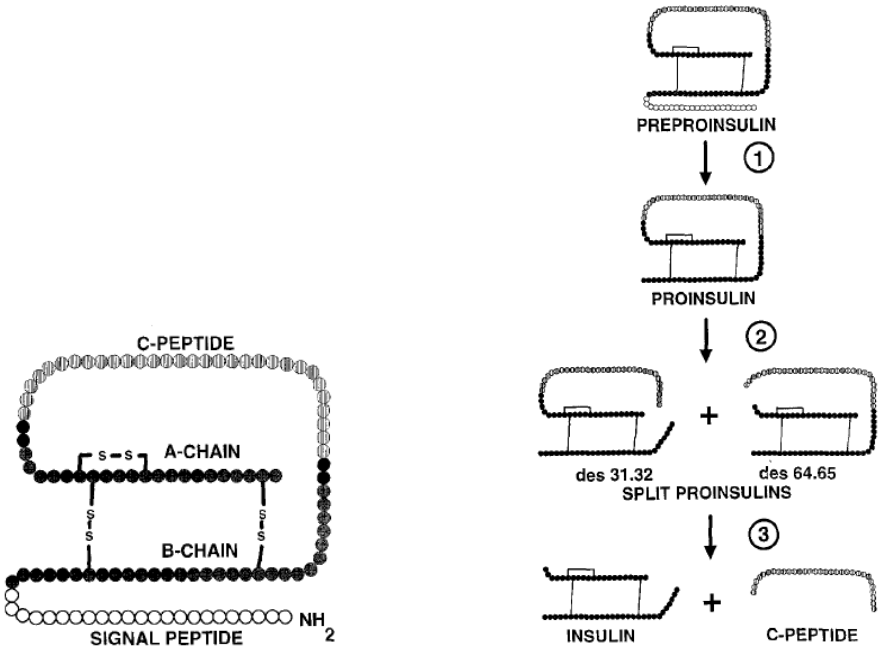


Abbildung 7: Generierung von Insulin. a) Primärstruktur des Prä-Proinsulins mit A- und B-Kette, C-Peptid und Signalpeptid. b) Prozessierung des Prä-Proinsulin → Proinsulin → Insulin + C-Peptid.
Springer and the original publisher Diabetologia, 34, 1991, 768, Structural domains and molecular lifestyles of insulin and ist precursors in the pancreatic Beta cell, Halban PA, Fig. 2 and 3, Springer-Verlag 1991 is given to the publication in which the material was originally published with kind permission from Springer Science and Business Media.

Zum Diagnosezeitpunkt sind nur noch etwa 10- 20% der β-Zellen zur Produktion von Insulin fähig (Knip M and Siljander H, 2008). Dies macht die Wichtigkeit der exogenen Insulinzufuhr deutlich, die momentan die einzige therapeutische Maßnahme zur Sicherstellung des Überlebens eines an Diabetes mellitus Typ 1 Erkrankten ist.

Insulin, welches heute zur Behandlung in einer kurz-, mittel- und langwirksamen Variante bzw. als Human- oder Insulinanalogon (genau an Patient angepasst) erhältlich ist, hat v.a. Einfluss auf den Glukose- aber ebenso auf den Aminosäure- und Fettsäurenstoffwechsel. Der bei an Diabetes mellitus Erkrankten verminderte bzw. aufgehobe Haupteffekt von Insulin ist die Senkung der Glukosekonzentration im Blut. Zum einen über die Förderung der Glykogensynthese in der Leber bzw. die Aufnahme von Glukose in die Muskel- und Fettzellen, andererseits durch Hemmung der Glykogenolyse und der Glukoneogenese. Insulin hat weitere Effekte auf den Stoffwechsel. So unterstützt es die Lipid- und Proteinsynthese und hat Einfluss auf den Katabolismus wie die Proteolyse und die Lipolyse. Alle Wirkungen beruhen auf Bindung an Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität (Karow T, 2009).

1.4. Therapieansätze:

Momentan ist der einzige sichere Therapieansatz eines manifesten T1DM die exogene Zufuhr von Insulin. Die Herstellung von Immunmodulatoren stellt einen neuen Therapieansatz dar. Zum Beispiel könnten bestimmte T-Zellepitope durch Austausch von Aminosäuren „altered peptide ligands“ (APLs) eine veränderte Immunantwort bzw. eine verminderte Aktivierung von diabetogenen T-Zellen bewirken, um eine Zerstörung von β-Zellen zu vermeiden. Des Weiteren könnte durch Zugabe von Inhibitoren die Aktivität von Cathepsinen, die die intrazelluläre Prozessierung von Antigenen bewirken, die Generieung von T-Zellepitopen unterbunden werden.

1.5. Fragestellung

Die Autoimmunerkrankung Diabetes mellitus Typ I ist zum jetzigen Zeitpunkt nur mittels repetitiver lebenslanger Insulingaben therapierbar. Der Inselzelluntergang beginnt mit der Einwanderung von multiplen Zellen wie beispielsweise autoaggressiver $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen und führt durch unterschiedliche Mechanismen, zum Teil zytokinabhängig, zur Zerstörung dieser Zellen des Pankreas. Der Mangel an Insulin führt zur Entstehung eines Diabetes mellitus Typ I. Autoantigene werden von APCs aufgenommen, in Lysosomen von Cathepsinen gespalten und auf MHC Klasse II geladen und aktivieren $CD4^+$-T-Zellen. Die daraufhin sezernierten proinflammatorischen Zytokine führen letztendlich zur Zerstörung von β-Zellen. Die Einwanderungsphase von diabetogenen T-Zellen bzw. frühe Phase des Prädiabetes ist sehr dynamisch und bildet hierdurch ein geeignetes Ziel für Immunmodulatoren zur Verzögerung oder Prävention der Zerstörung von β-Zellen und eventuell des klinischen Diabetes (Knip M, 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob der spezifische Austausch von Aminosäuren eines T-Zellepitops (P21) vor Zerstörung durch Cathepsine schützt und in PBMCs ein verändertes Zytokinprofil induziert. Hierbei wurde versucht, durch P21 Mutanten die Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen zu senken bzw. die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen zu erhöhen und hierdurch zukünftig die Möglichkeit zu haben, eine Zerstörung der β-Zellen zu verhindern bzw. hinauszuzögern.

2. Material und Methode

2.1. Material

2.1.1. Materialien für den Cathepsinverdau und *in vitro* Prozessierung

Lysosomale Proteasen aus der B-Zelllinie WT51:	(Hergestellt von Dr. T. Burster)
CatB:	(R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)
CatG:	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Substratsolution:	0,2 µg/µl Peptid; 0,1 M Natriumcitrat pH 5,0 (Roth, Karlsruhe, Deutschland); 2,5 mM DTT (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

2.1.2. Materialien für die Identifizierung der Prozessierungsprodukte

Reverse-phase HPLC,	
C8 Trennsäule 150x2mm:	(Wicom, Heppenheim, Deutschland)
Acetonitril:	(VWR, Darmstadt, Deutschland)

2.1.3. Materialien für die Peptidsynthese

HOBt:	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
NMM:	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
TBTU:	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Fmoc-Aminosäure:	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Reversed-phase HPLC,	
C18 Trennsäule 125x8mm:	(Grom, Herrenberg, Deutschland)

2.1.4. Materialien für den Peptidbindungs-Assay

AMCA-HA:	(Hergestellt von Dr. H. Kalbacher)
HLA-DRB1*0401:	(Isoliert aus B-Zelllinie BSM von Dr. H. Kalbacher)
P21:	(Synthetisiert von Dr. H. Karlbacher)

P21 Mu-Peptide: (Synthetisiert von Dr. H. Karlbacher)

2.1.5. Materialien für den T-Zellassay

PBMCs von T1DM-, T2DM-Patienten und gesunden Kontrollprobanden, die im Universitätsklinikum Ulm, Klinik für Innere Medizin I rekrutiert wurden. PBMCs wurden in FCS (Fetal Bovine Serum) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mit 10% DMSO (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) im Stickstofftank bei -196°C gelagert.

Die genauen Patienteninformationen (mit Einwilligung) der verwendeten Donoren liegen in der Inneren Medizin I des Universitätsklinikums Ulm.

Tabelle 1: Genotypen der untersuchten Probanden
Abkürzungen: T1DM= Typ 1 Diabetes mellitus, T2DM= Typ 2 Diabetes mellitus, HLA= Humanes Leukozyten Antigen

T1DM

Donor	HLA-Typ
458A	DRB1*0401, DRB1*1501
482A	DRB1*0401, DRB1*0301
693A	DRB1*0401, DRB1*1301
871A	DRB1*0401, DRB1*0404
875A	DRB1*0401, DRB1*1102

T2DM

Donor	HLA-Typ
460A	DRB1*0401, DRB1*1301

Kontrolle

Donor	HLA-Typ
867A	DRB1*0401, DRB1*1501
879A	DRB1*0401, DRB1*1301
881A	DRB1*0401, DRB1*0301
891A	DRB1*0401, DRB1*0301

Medium: 10% Fetal Bovine Serum (FCS) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

0,2% Normocin (Amaxa Biosystems, Köln, Deutschland) in RPMI 1640

(Invitrogen, Carlsbad, CA,USA)

Zellkulturplatte: Tissue Culture Plate, 48 Vertiefungen, Polystyrol (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)

2.1.6. Materialien für den ELISA

ELISA Mikrotiterplatte: ELISA Platte, Half-Area, 96 well, F-Form (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)

Coating-Antikörper: Maus Anti-human IL-6, IL-17, IFN-γ, TNF-α, TGF-β1-Antikörper (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

Detektion-Antikörper: Biotinylierter Ziegen Anti-human IL-6, IL-17, IFN-γ, TNF-α, TGF-β1-Antikörper (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

Standard-Antikörper: Rekombinantes humanes IL-6, IL-17, IFN-γ, TNF-α, TGF-β1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

Tabelle 2: Liste der beim ELISA verwendeten Lösungsmittelkonzentrationen in Abhängigkeit vom Zytokin. Abkürzungen: ELISA= enzyme linkes immunosorbent assay, HRP= horseradish peroxidase, IFN= Interferon, IL= Interleukin, PBS= phosphate buffer saline, TGF= tumor growth factor, TNF= tumor nekrose factor.

Zytokin	Coating-AK-Konzentration [µg/ml] in PBS	Detektions-AK-Konzentration [ng/ml]	Standard-Konzentration [pg/ml]	Streptavidin-HRP Verdünnung	Reagenz-Verdünnungs-mittel
IL-6			1000 - 30	1/200	A
IL-17	4	200	1000 – 30	1/200	B
IFN-γ	4	175	1000 – 30	1/200	B
TNF-α	4	250	1000 – 30	1/200	B
TGF-β1	2	300	1000 – 30	1/200	C

PBS:	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na_2HPO_4; 1,5 mM KH_2PO_6, pH 7,2; 0,2 µm filtriert (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
Reagenz-verdünnungsmittel A:	0,1% BSA; 0,05% Tween20 (SERVA, Heidelberg, Deutschland) in Tris gepuffertem Salz (20 mM Trizma Base (Roth, Karlsruhe, Deutschland); 150 mM NaCl), pH 7,4; 0,2 µm filtriert
Reagenz-verdünnungsmittel B:	1% BSA in PBS
Reagenz-verdünnungsmittel C:	0,05% Tween20 in PBS; 1,4% entlipidiziertes bovines Serum (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)
Waschpuffer:	0,05% Tween20 in PBS, pH 7,4 (R&D Systems, Minneapolis, MN USA)
Blockierungspuffer:	1% BSA (Albumin Bovine Fraktion V (SERON, Minooka, IL, USA) in PBS
TGF-β1-Aktivierungslösung:	1 N HCL (Riedel de Haën, Seelze, Deutschland)
TGF-β1-Neutralisierungslösung:	1,2 N NaOH; 0,5 M HEPES (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
Streptavidin-HRP:	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Substratlösung:	1:1 Mischung der Farbreagenzien A (H_2O_2) und B (Tetramethylbenzidin) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)
Stopp-Solution:	H_2SO_4 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

2.1.7. Verwendete Geräte:

Stickstofftank	Chronos 400 (Messer, Sulzbach, Deutschland)
Wasserbad	3043 (Köttermann, Hänigsen, Deutschland)
Sterilbank	Lamin Air HA2448 (Heraeus, Hanau, Deutschland)
Zentrifuge	Multifuge 3S-R (Heraeus, Hanau, Deutschland)
Pipette 20 µl	Eppendorf Reference (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Pipette 200µl	Eppendorf Reference (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Pipette 1000µl	Eppendorf Reference (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Multipipette	Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Inkubator	BBD 6220 (Heraeus, Hanau, Deutschland)
Kühlschrank	(Bosch, Gerlingen, Deutschland)
ELISA-Lesegerät	EL 808 (BioTek, Winooski, Vermont, USA)
Gefrierschrank	(Liebherr, Bulle, Schweiz)
MALDI-TOF Massenspektrometrie:	(Reflex IV, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland)
Multiple peptide synthesizer Syro II:	(MultiSynTech, Witten, Deutschland)
HPLC	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
HPSEC	(Merck, Darmstadt, Deutschland)

2.2. Methoden

2.2.1. *In vitro* Prozessierung

Zunächst wurde für den Peptidverdau die Substratlösung (0,2 µg/µl P21-Peptid, 0,1 M Natriumcitrat pH 5,0 und 2,5 mM Dithiothreitol (DTT) in einem Endvolumen von 50 µl) und Cathepsin G (2 ng/µl, pH 7,2) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte der Verdau von P21 Mu1 mit Cathepsin G und Cathepsin B ebenfalls wie zuvor beschrieben. Für die *in vitro* Prozessierung von P21 und P21 Mu1-3 wurde die Substratlösung mit lysosomalen Proteasen (2,6 µg des Gesamtproteins) bei 37°C für 6 Stunden inkubiert.

2.2.2. Identifizierung der Prozessierungsprodukte

Die Auftrennung der Spaltprodukte wurde durch reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) unter Verwendung einer C8 (150x2mm) Trennsäule und die Identifizierung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie erreicht (durchgeführt von Dr. T.Burster, gemeinsame Auswertung in Ulm). Das Prinzip der reversed-phase HPLC besteht darin, dass die Spaltprodukte mit einem Eluent durch die stationäre Phase in der Trennsäule gepumpt werden, wobei die Zusammensetzung der mobilen Phase schrittweise geändert wurde, was eine Auftrennung der Spaltprodukte nach Größe möglich machte. Für die Identifizierung mittels MALDI-TOF wurden die Spaltprodukte zur Ionisierung mit einer Matrix vermischt, getrocknet und mit einem Laserstrahl beschossen. Die Flugzeit wurde zur Identifizierung der Molekülmasse benutzt, in dem eine automatische Datenanalyse durchgeführt wurde. Die Ergebnisse der Experimente wurden in eine Verdaukarte eingetragen, wobei die Balken der Molekülmasse (Spaltprodukt, Peptid) und die Pfeile den Schnittstellen entsprechen.

2.2.3. Peptidsynthese

Die Peptidsynthese wurde mittels der solid-phase 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) Strategie durch den multiple peptide synthesizer Syro II durchgeführt. Für die Aktivierung und Kopplung wurden 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluroniumtetrafluoroborate (0,2 mM TBTU), Hydroxybenzotriazole (eine Spatelspitze HOBt) und N-Methylmorpholine (0,4 mM NMM) verwendet. Als Schutzgruppe diente Fmoc. Die Peptide wurden durch reversed-phase HPLC unter

Verwendung einer C18 (125x8 mm) Trennsäule gereinigt, danach mittels Massenspektrometrie analysiert (die Peptidsynthese wurde durch Dr. Kalbacher, Tübingen durchgeführt).

2.2.4. Peptidbindungs-Assay

Für den Peptidbindungs-Assay wurden lösliche HLA-DRB1*0401 Moleküle mit N-terminal 7-Amino-4-Methylcoumarin-3-Acetatsäure gekoppelten Hämagglutinin-Peptid (AMCA-HA, 0,01 µg/µl) bei pH 7,0 inkubiert. Anschließend wurden P21 bzw. die P21 Mu-Peptide (0,1 µg/ µl) als Kompetitoren um die Bindungsstelle zugegeben und die Proben mittels high performance size exclusion chromatography (HPSEC) analysiert (durchgeführt von Dr. T. Burster in Tübingen, gemeinsame Auswertung in Ulm).

2.2.5. T-Zellassay

Für dieses Experiment wurden im flüssigen Stickstoff gefrorene (Dimethylsulfoxid (DMSO), FCS) gelöste mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) verwendet. PBMCs wurden im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Die weiteren Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden mit 10 ml RPMI 1640 + GlutaMax-Medium + 10% FCS-Medium resuspendiert und für 5 min bei 1700 rpm zentrifugiert, um das DMSO auszuwaschen. Der so entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut mit 10 ml Medium resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Danach wurde das Pellet mit 400 µl Medium resuspendiert. Die benötigte Peptidmenge pro Ansatz errechnet sich wie folgt:

Peptidmenge = (Absolutvolumen pro Ansatz x Endkonzentration)/

(gegebene Konzentration)

= (400 µl x 10 µl /ml) / (1 mg/ml) = 4 µl

Die berechnete Peptidmenge wurde in die Wells verteilt, mit 400 µl Medium mit PBMCs gemischt und für 5 Tage bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Überstände geerntet. Dazu wurden 350 µl des Überstandes abgenommen und für die spätere Zytokindetektion eingefroren.

Eine Bewertung der Ethikkommission zur Antrags-Nr. 244/09- Proinsulin-derived “altered piptide ligands“ (prAPL) as immuntherapeutics, a possible treatment of Type 1 Diabetes mellitus- liegt vor (siehe Anhang).

2.2.6. ELISA: TNF-α, IL-17, IFN-γ, IL-6, TGF-β1

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (engl: enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) wurde zur Analyse der produzierten Zytokinmenge verwendet. Zur Vorbereitung wurde eine 96 Well-Platte „gecoatet“. Dazu wurde die benötigte Antikörperkonzentration wie folgt berechnet:

Antikörperkonzentration = (Absolutvolumen x Endkonzentration) / (Stockkonzentration)

= (10000 µl x 4 µg/ml) / (720 µg/ml) = 55,56 µl

Die berechnete Antikörperkonzentration wurde in 10 ml PBS-Puffer gelöst und je 100 µl pro Well zugegeben. Die Platte wurde entweder eine Stunde lang bei RT oder über Nacht im Kühlschrank bei +4°C inkubiert. Um die nicht gebundenen Antiköper zu entfernen, wurde die Platte dreimal mit 200 µl PBS + 0,1% Tween 20 (PBS-T) pro Vertiefung gewaschen. Danach wurde zum Blockieren, um unspezifisch, falsch positive Bindungen an die Gefäßwand zu vermeiden, 200 µl des Blockierungspuffers pro Well zugegeben und bei RT für eine Stunde inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der Überstand des T-Zell-assays aufgetaut. Für das Experiment mit TGF-β1 musste das latente Zytokin im Überstand zuerst aktiviert werden. Das inaktive Zytokin ist an ein Latenz-assoziiertes Peptid (LAP) gebunden. Die Aktivierung von TGF-β1 durch Dissoziation dieses LAP erfolgte durch Ansäuerung von 50 µl Überstand mit 10 µl 1 M HCl für 10 Minuten bei RT. Zur Neutralisation wurden 10 µl 1,2 M NaOH und 0,5 M 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) zugegeben. Die anderen Zytokine mussten vorher nicht aktiviert werden, da sie in aktiver Form vorlagen. Um den nicht gebundenen Blockierungspuffer zu entfernen, wurde die Platte, dreimal mit PBS-T gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Überstände des T-Zell-assays auf die vorbereitete Platte jeweils in Doppelbestimmung pipettiert. Dadurch resultierte eine Vierfachbestimmung, da der T-Zell Assay bereits in Doppelbestimmung vorlag. Zur quantitativen Bestimmung der Zytokin-Konzentrationen wurde pro Platte ein Standard, bestehend aus einer nach dem unten angegebenen Schema berechneten Konzentration des jeweiligen Zytokins, aufgetragen. Dazu wurden in die letzten beiden Reihen der Platte pro Well 50 µl PBS (siehe Tabelle 2) und in die obersten zwei noch zusätzlich für die Titration 50 µl des Puffers zugegeben.

Der Standard berechnet sich wie folgt:

AK-Konzentration für TNF-α = (100 µl x 1000 pg/ml) / (145 ng/ml) = 0,69 µl

AK-Konzentration für IL-17 = (100 µl x 1000 pg/ml) / (120 ng/ml) = 0,83 µl

AK-Konzentration für IFN-γ = (100 µl x 1000 pg/ml) / (120 ng/ml) = 0,83 µl

AK-Konzentration für TGF-β1 = (100 µl x 1000 pg/ml) / (72,5 ng/ml) = 1,38 µl

AK-Konzentration für IL-6 = (100 µl x 1000 pg/ml) / (58,5 ng/ml) = 1,71 µl

Diese Konzentration wurde jeweils in die beiden obersten Ansätze zugegeben, vermischt, 50 µl in das darunter liegende Well pipettiert, dort vermischt, erneut 50 µl entnommen und in das nächste Well gegeben. So wurde verfahren bis zum zweitletzten Ansatz. Die 50 µl aus diesem wurden verworfen, so dass das letzte Well ohne Standard blieb.
Die Inkubation der Überstände und des Standards betrug 90 Minuten bei RT. Nach dieser Zeit wurde die Platte dreimal mit 200 µl PBS-T gewaschen. Anschließend wurde der Biotin-gekoppelte Detektions-Antikörper pipettiert. In 10 ml Blockierungspuffer (PBS+1% BSA, pH 7,2) wurden die Antikörper (siehe Tabelle 2) pipettiert. Je 100 µl pro Well wurden auf die Platte pipettiert und für eine Stunde bei RT inkubiert.
Antikörper für IL-17 = (10000µl x 200 ng/ml) / (36 µg/ml) = 55,56 µl

Antikörper für TNF-α = (10000 µl x 250 ng/ml) / (45 µg/ml) = 55,56 µl

Antikörper für IL-6 = (10000 µl x 200 ng/ml) / (36 µg/ml) = 55,56 µl

Antikörper für IFN-γ = (10000 µl x 175 ng/ml) / (31,5 µg/ml) = 55,56µl

Antikörper für TGF-β1 = (10000 µl x 300 ng/ml) / (54 µg/ml) = 55,56 µl

Danach wurde die Platte dreimal mit PBS-T gewaschen und 100 µl Streptavidin-Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP)-Lösung, in einer Verdünnung von 1:200 Streptavidin HRP in 10 ml Blockierungspuffer, pro Vertiefung zugegeben. Während der 20 minütigen Inkubation, die aufgrund der Photosensitivität der HRP in Dunkelheit erfolgte, konnte das Streptavidin an das Biotin des Detektions-Antikörpers binden. Danach wurde die Platte dreimal gewaschen und 100 µl der Substratlösung zugegeben. Während der erneuten 20 minütigen Inkubation, die in Dunkelheit bei RT erfolgte, entstand durch die katalytische Aktivität der HRP ein sichtbarer Farbumschlag zu blau. Als letzter Schritt wurde die Reaktion mit 50 µl Stopp-Solution (H_2SO_4) pro Ansatz abgestoppt, sichtbar

durch einen erneuten Farbumschlag zu gelb. Die optische Dichte konnte im ELISA-Lesegerät bei 450 nm bestimmt werden.

2.2.7. Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Programms one-way ANOVA, post test Dunnett (GraphPad Prism3, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Ein Wert von $p > 0.05$ wurde als nicht signifikant, ein Wert von $p < 0.05$ als signifikant, ein Wert von $p < 0.01$ als sehr signifikant und ein Wert von $p < 0.001$ als hoch signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Generierung von proteaseresistenten Peptidliganden (prAPLs)

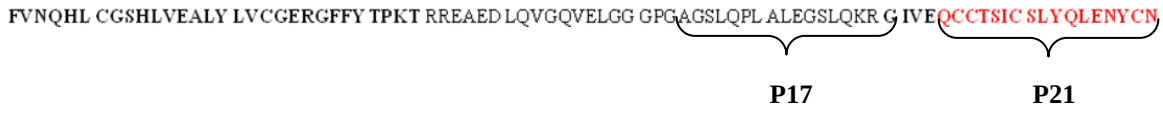


Abbildung 8: Sequenz von Proinsulin. Zwei exemplarische T-Zell-Epitope. P21 (rot dargestellt) und P17 (blau dargestellt). Minimales T-Zell-Epitop: CTSICSLYQ.

Proinsulin, ein bekanntes T1DM Autoantigen, wird von Cathepsinen in Proteinbruchstücke (Peptide) gespalten. Diese Peptide werden auf MHC Klasse II Moleküle geladen, zur Zelloberfläche transportiert und dort von $CD4^+$-T-Zellen inspiziert. Im Falle einer Antigenerkennung, durch $CD4^+$-T-Zellen, kommt es zu einer Immunantwort. P21 (^{94}QCCTSICSLYQLENYCN^{110}), welches dem Präproinsulin 94-110 (PPI 94 - 110) entspricht, umfasst die Aminosäuresequenz der alpha-Kette des Proinsulins und wurde als eines von mehreren humanen T-Zell Epitopen zur Aktivierung von T-Zellen in T1DM Patientenblut (diabetogene T-Zellen) postuliert (Endl J et al., 2006). Zur Generierung von „protease-resistant altered peptide ligands (prAPLs)“ wurde P21 ausgewählt, um eine mögliche Inhibierung von diabetogenen T-Zellen bzw. eine Immunmodulation mit dieser Strategie zu bewirken. Zukünftig könnten solche prAPLs therapeutisch zur Verhinderung eines T1DM eingesetzt werden. Die Generierung von proteaseresistenten P21 Peptiden (Mu-Peptide P21 Mu1- Mu3) erfolgte mittels cleavage-site-directed amino acid substitution (CS-DAS). Dafür wurden verschiedene Aminosäuren, die als potentielle Schnittstellen für Cathepsine bekannt sind, durch natürlich vorkommende Aminosäuren ersetzt. Die so generierten prAPLs wurden weniger von Proteasen verdaut (siehe Abbildung 11, unverdautes Peptid in %) und sind deshalb in der Lage eine erhöhte Halbwertszeit im endozytischen Kompartiment und vermutlich im Serum bzw. Blut aufzuweisen.

Als erstes wurden die potentiellen Schnittstellen der Proteasen ermittelt. Hierfür wurde P21 mit Cathepsin G (CatG), einer Protease der Antigenprozessierungsmaschinerie von antigenpräsentierenden Zellen, inkubiert und das so entstandenen Verdauprodukt mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography, HPLC) und der Massenspektrometrie analysiert (siehe Abbildung 9). Dabei sind folgende Schnittstellen entstanden: zwischen ^{102}LY^{103} und ^{103}YQ^{104}. Basierend auf diesen Daten

wurden jene Aminosäuren, nach denen CatG spaltet, durch andere Aminosäuren z.B. Prolin ausgetauscht. Danach wurde P21 Mu1 mit gereinigtem CatG oder CatB inkubiert und die entstandenen Fragmente analysiert (siehe Abbildung 10). Schnittstellen wurden am C-terminalen Ende zwischen ^{108}YC^{109} und bei CatB zusätzlich zwischen ^{96}CT^{97} detektiert. Vermutlich ist das käuflich erworbene CatB mit einer weiteren Protease kontaminiert, da CatB bei pH 5 in der Regel nur eine Peptidyl-Dipeptidase Aktivität aufweist (zwei Aminosäuren am C-terminalen Ende abspaltet). Der Mittelteil des Peptids wurde nicht verdaut und ist daher vor Verdau geschützt. Um eine noch höhere Proteaseresistenz dieses Peptides zu erreichen, wurde die C-terminal gelegene Aminosäure Cystein (C^{109}) in den Peptid-Mutanten 2b und 3 durch die D-Aminosäure Threonin ersetzt (siehe Abbildung 11). In den Lysosomen der Zelle befindet sich die höchste Anreicherung von unterschiedlichen Proteasen, daher wurde P21 und P21 Mu1-Mu3 mit lysosomalen Proteasen von B-Zellen inkubiert und die entstandenen Fragmente mittels HPLC und Massenspektrometrie analysiert. Die Inkubation von P21 mit lysosomalen Proteasen führte zu einem kompletten Verdau des Peptids (siehe Abbildung 11A). Die Proteasen spalteten P21 Mu1 N-terminal nach C^{95}, C^{96} und T^{97} und C-terminal zwischen N^{107} und Y^{108}, ebenso zwischen Y^{108} und C^{109}. Das Mittelstück der Peptidmutante P21 Mu1 blieb unverdaut. Der Verdau von P21 Mu2b zeigte eine N-terminale Spaltung zwischen S^{95} und C^{96} und zwischen C^{96} und T^{97}. Der Einbau von D-Threonin verhinderte die Degradierung von P21 Mu2b und schützte das C-terminale Ende als auch den Kern des Peptides. Die Analyse von P21 Mu3 nach Inkubation mit lysosomalen Proteasen ergab nur eine N-terminale Spaltung zwischen C^{96} und T^{97}, zwischen T^{97} und P^{98} und zwischen I^{99} und P^{100}. Ebenso für P21 Mu2b. Die Ergebnisse zeigen, dass das Mittelstück und das C-terminale Ende des Peptides durch den Einbau von Prolin, Alanin oder D-Threonin geschützt wurde. Obwohl bestimmte Aminosäuren am N-terminalen Ende ausgetauscht wurden, konnte in diesem Bereich kein endgültiger Schutz vor proteolytischer Spaltung erzielt werden, jedoch für P21 Mu3 eine ca. 30%ige Proteaseresistenz. Zusammenfassend dargestellt: durch den selektiven Austausch von Aminosäuren konnte der Mittelteil der Peptide vor Verdau geschützt werden und insgesamt wurde eine Proteaseresistenz von bis zu ca. 30% erreicht, Mu1 < Mu2 < Mu3; (siehe Abbildung 11B, unverdautes Peptid in %).

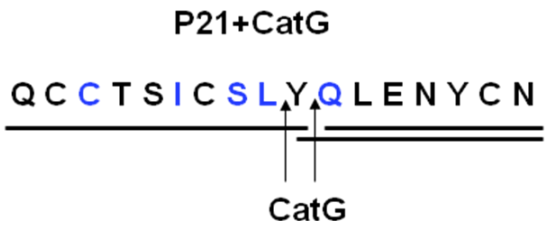


Abbildung 9: Schnittstellen von P21 nach Verdau mit CatG. P21 wurde für eine Stunde bei pH 7,2 mit CatG inkubiert und anschließend mittels HPLC und Massenspektrometrie analysiert.

Erklärung: ↑= Schnittstelle der Protease CatG, ─ = entstandene Fragmente

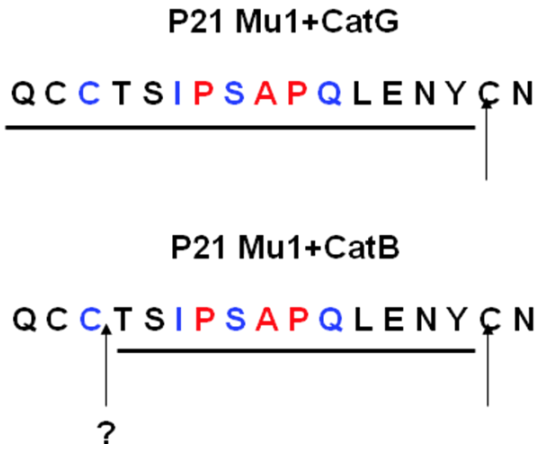


Abbildung 10: Schnittstellen von P21 Mu1 nach Verdau mit CatG und CatB. P21 Mu1 wurde mit CatG (pH 7,2) bzw. CatB (pH 5,0) inkubiert und anschließend mittels HPLC und Massenspektrometrie analysiert.

Erklärung: ↑= Schnittstellen der Proteasen, ─ = entstandene Fragmente, ?= vermutlich keine CatB Schnittstelle

A) B)

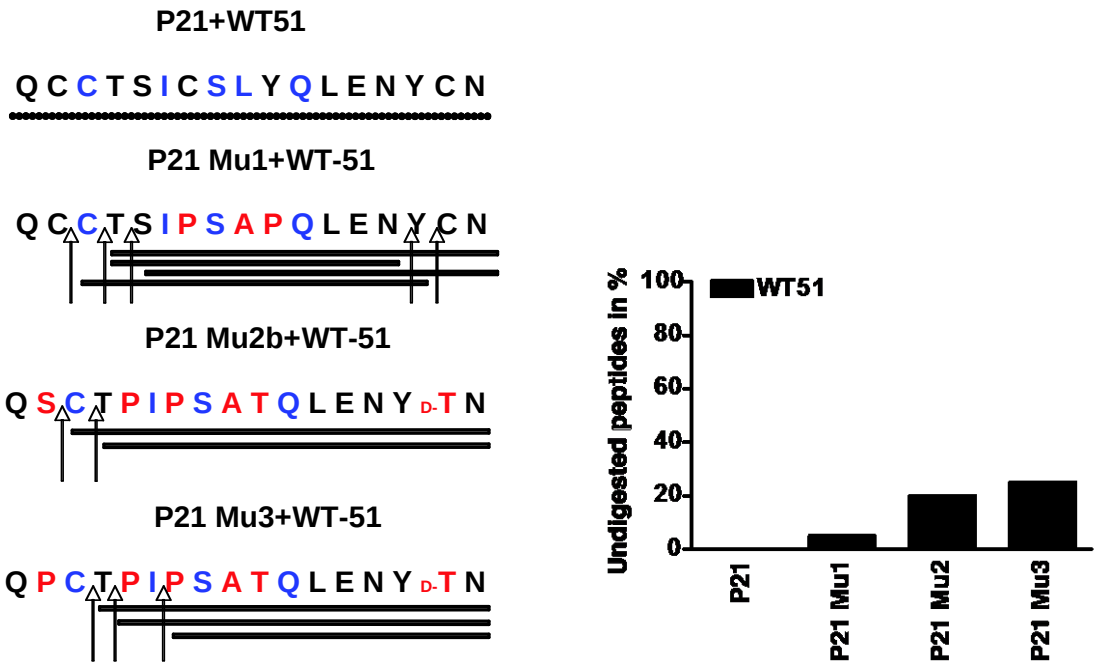


Abbildung 11: A) Generierung von Protease-resistenten Peptiden durch cleavage-site-directed amino acid substitution (CS-DAS). P21Mu Peptide wurden für 6 h bei pH 5,0 mit lysosomalen Proteasen von B-Zellen inkubiert und anschließend mittels HPLC und Massenspektrometrie analysiert. Blaue Aminosäuren: theoretische Bindungsstellen (HLA-DRB1*0401), rote Aminosäuren: ausgetauschte Aminosäuren, D-: D-Aminosäure.

Erklärung: WT-51= Lysosomen der B-Zelllinie WT-51, ↑= Schnittstelle der Proteasen, ─ = entstandene Fragmente durch Verdau,

…= kompletter Verdau

Quantifizierung des unverdauten Peptides mittels HPLC.

3.2. PrAPLs binden an HLA-DRB1*0401

Die spezifische Bindung der Mu-Peptide an HLA-DRB1*0401 ist entscheidend für die Interaktion mit T-Zellen. Daher wurde ein Peptidbindungs-Assay durchgeführt, um diese Voraussetzung zu prüfen. HLA-DRB1*0401 Moleküle wurden mit N-terminal 7-Amino-4-Methylcoumarin-3-Acetatsäure gekoppelten Hämagglutinin-Peptid (AMCA-HA) beladen, P21 bzw. P21 Mu1-Mu3 kompetitiv zugegeben und die Bindung mittels des high-performance size exclusion chromatography (HPSEC) analysiert. Wie in Abbildung 12 zu sehen, waren P21 Mu1-Mu3 in der Lage an HLA-DRB1*0401 zu binden. P21 Mu1 und P21 Mu3 verdrängten AMCA-HA jedoch effizienter von der Bindungsstelle des HLA-DRB1*0401 als P21 Mu2. Die Bindungskapazität von P21 Mu1-Mu3 war jedoch niedriger als die von P21.

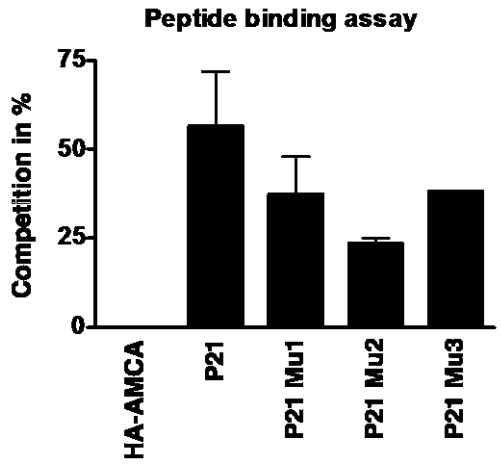


Abbildung 12: Peptidbindungs-Assay zur Detektion der Bindungskapazität von P21 und P21 Mu1-Mu3 an HLA-DRB1*0401. Die Zugabe P21 bzw. P21 Mu1-Mu3 erfolgte in äquimolarer Konzentration. Die Analyse der Bindungskapazität wurde mittels HPSEC durchgeführt. Das Verhältnis P21 Mu1-Mu3 zu AMCA-HA war 1:10.

3.3. T-Zell Assay

In den folgenden funktionellen T-Zell Assay Experimenten soll untersucht werden, ob die P21 Mu Peptide in der Lage sind, die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (TNF-α, IFN-γ, IL-6 und IL-17) zu reduzieren bzw. die Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins TGF-β1 zu induzieren. Daher wurden peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) von T1DM-Patienten (n=5), T2DM-Patienten (n=1) oder gesunde Kontrollprobanden (n=4) mit P21, welches diabetogene T-Zellen aktiviert, oder P21 mit P21 Mu1, -Mu2 oder -Mu3 für fünf Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und die Zytokinsekretion mittels ELISA detektiert. Zur Analyse wurden die P21 Mu Peptide jeweils in Bezug auf P21 ausgewertet. Alle Probanden wiesen das gemeinsame HLA-DRB1*0401/x Merkmal auf.

3.3.1. TNF-α

In den Zellkulturüberständen der mit P21 stimulierten PBMCs von T1DM-Patienten ließen sich mit Ausnahme der Donoren 458A und 482A höhere TNF-α Werte als bei den Kontrollgruppen detektieren (siehe Abbildung 13). Zur Vereinfachung wird im Folgenden die Inkubation von P21 mit P21 Mu Peptiden im T-Zell Assay verkürzt als P21+Mu Peptide bezeichnet. Donor 458A zeigte lediglich mit P21+Mu3 eine TNF-α Sekretion (siehe Abbildung 13A). Die PBMCs des Donors 482A reagierten auf P21+Mu1 und P21+Mu2 mit einer verminderten bzw. auf P21+Mu3 mit einer vermehrten Freisetzung

von TNF-α, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Bei den Donoren 693A, 871A und 875A waren signifikante Ergebnisse zu beobachten, jedoch nicht bei allen verwendeten Mutanten gleichermaßen. Verglichen mit P21 führte P21+Mu1 bei den Donoren 871A und 875A zu einer Reduktion von TNF-α. Die Stimulation der PBMCs mit P21+Mu2 ergab im Vergleich zu P21 bei den Donoren 693A und 871A eine Senkung der TNF-α Konzentration. Das Resultat von P21+Mu3 war bei Donor 875A eine verminderte Produktion von TNF-α und lediglich bei Donor 693A eine vermehrte Produktion von TNF-α im Vergleich zu P21. Nicht signifikant verringerte TNF-α Konzentrationen wurden bei Donor 871A mit P21+Mu3 und bei Donor 875A mit P21+Mu2 detektiert. Mit einer nicht signifikant erhöhten Produktion von TNF-α reagierten die PBMCs des Donors 693A auf P21+Mu1.

Die Auswertung des TNF-α Zytokinprofils des T2DM-Patienten 460A ergab ähnlich hohe Werte wie die der T1DM-Donoren (Abbildung 13B). Im Vergleich zu P21 bewirkte die Stimulierung mit P21+Mu1 und P21+Mu3 eine vermehrte Freisetzung von TNF-α und die Stimulation mit P21+Mu2 eine verminderte TNF-α Sekretion, die Unterschiede waren allerdings nicht signifikant.

Die TNF-α Detektion in den T-Zell Assays mit PBMCs von gesunden Kontrollprobanden zeigte bis auf den Donor 879A lediglich geringe TNF-α Werte (Abbildung 13C). Für den Donor 881A ließ sich ausschließlich für P21+Mu3 und für den Donor 891A nur für P21+Mu2 und P21+Mu3 eine TNF-α Produktion nachweisen. Aussagekräftige Ergebnisse hingegen waren bei den Donoren 867A und 879A zu beobachten. PBMCs dieser Donoren reagierten auf P21+Mu2, im Vergleich zu P21, mit einer signifikant erhöhten TNF-α Ausschüttung. Bei Donor 867A zeigte sich darüber hinaus eine hoch signifikante Erhöhung der TNF-α Konzentration nach Stimulierung mit P21+Mu3. Im Vergleich zu P21 ergab sich eine TNF-α Reduzierung bei dem Donor 867A durch P21+Mu1 und eine Zunahme von TNF-α bei dem Donor 879A durch Aktivierung mit P21+Mu1 und P21+Mu3, allerdings waren diese Veränderungen statistisch nicht signifikant.

A)

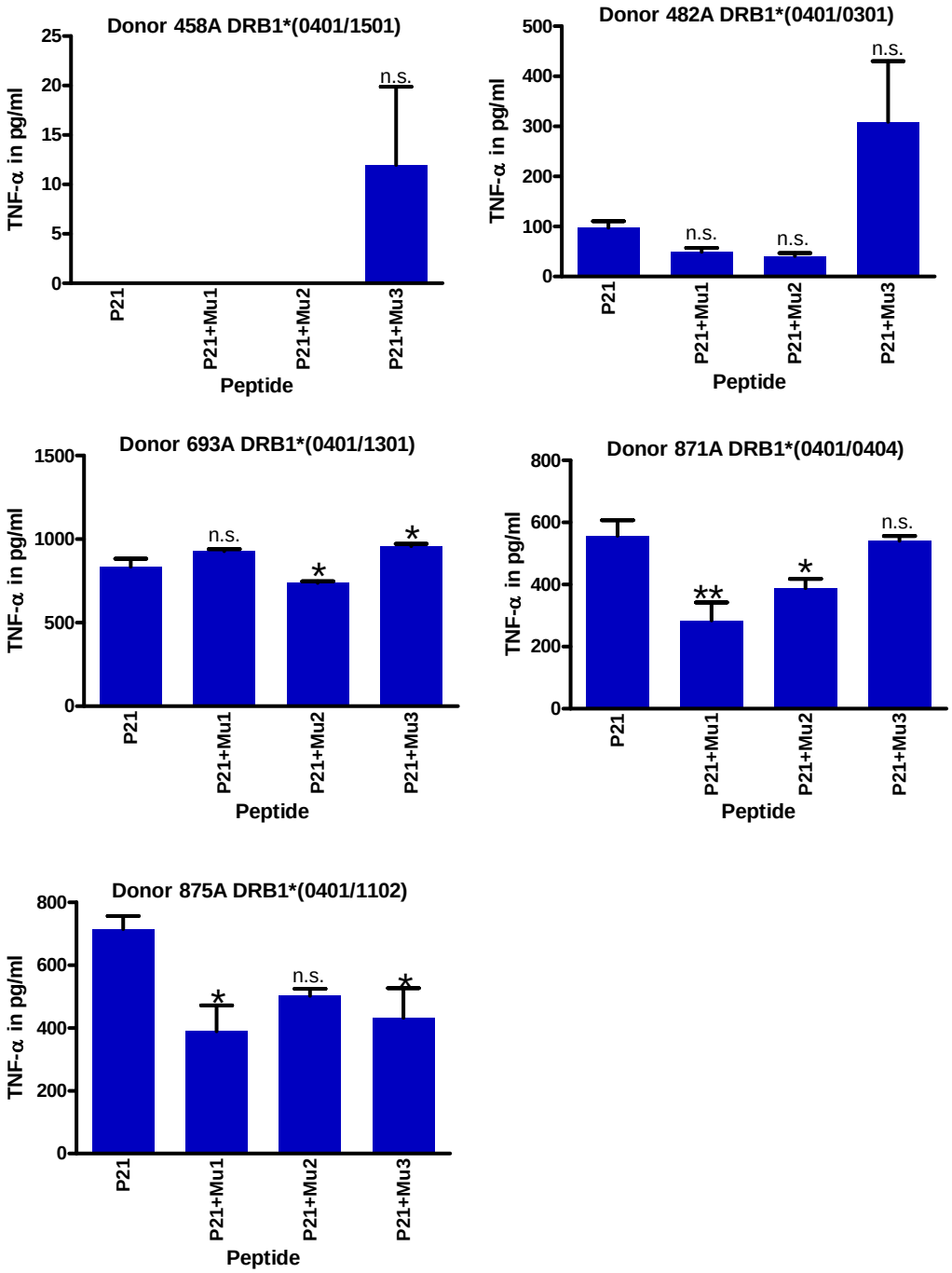
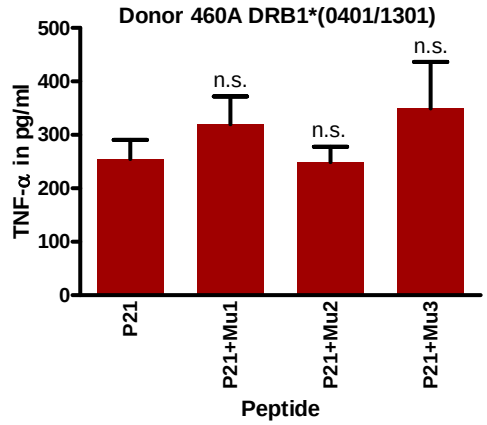


Abbildung 13 A): Detektion von TNF-α in Zellkulturüberständen von T1DM-Patienten durch einen TNF-α spezifischen ELISA. Die Analyse erfolgte durch Vierfachbestimmung.

Erklärung: n.s.= nicht signifikant ($p > 0,05$), *= signifikant ($p < 0,05$), **= sehr signifikant ($p < 0,01$), ***= hoch signifikant ($p < 0,001$) im Vergleich zu P21. Abkürzungen: TNF-α= Tumornekrosefaktor α, Mu= Mutante

B)



C)

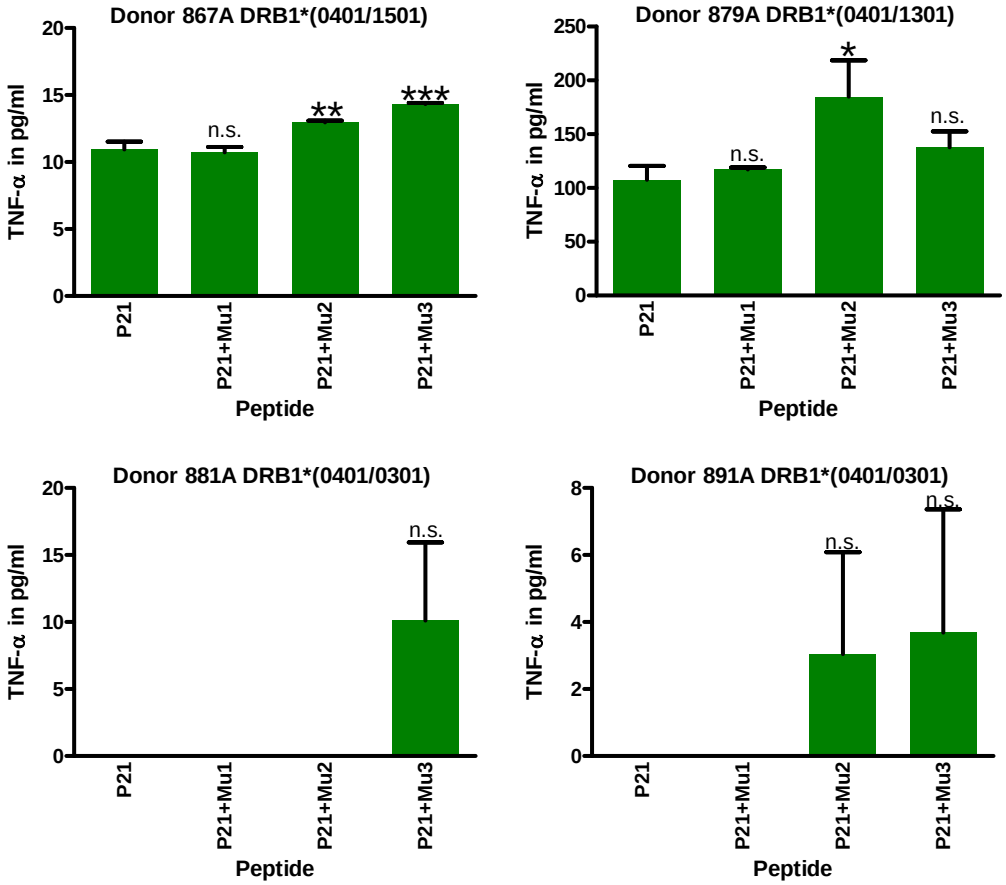


Abbildung 13 B und C): Detektion von TNF-α in Zellkulturüberständen von B) T2DM-Patient und C) Kontrollprobanden durch einen TNF-α spezifischen ELISA. Die Analyse erfolgte durch Vierfachbestimmung.

Erklärung: n.s.= nicht signifikant ($p > 0,05$), *= signifikant ($p < 0,05$), **= sehr signifikant ($p < 0,01$), ***= hoch signifikant ($p < 0,001$) im Vergleich zu P21. Abkürzungen: TNF-α= Tumornekrosefaktor α, Mu= Mutante

3.3.2. IFN-γ

Die IFN-γ Detektion in den Zellkulturüberständen der T1DM-Patienten ergab ähnliche Werte wie bei den Kontrollprobanden (Abbildung 14). Ausnahmen mit höherer IFN-γ Produktion als die gesunden Probanden bildeten hier die T1DM-Donoren 871A und 875A, jedoch erreichten die Ergebnisse dieser beiden Donoren keine statistische Signifikanz (Abbildung 14A). Im Vergleich zu P21 zeigte der Donor 871A nach Stimulierung mit P21+Mu1 und P21+Mu2 und der Donor 875A nach Stimulation mit P21+Mu1 verminderte bzw. der Donor 871A mit P21+Mu3 und der Donor 875A mit P21+Mu2 und P21+Mu3 vermehrte Freisetzungen von IFN-γ. Signifikante Ergebnisse hingegen waren bei den Donoren 458A, 482A und 693A zu beobachten. Bei Donor 482A führte die Inkubation der PBMCs mit P21+Mu1, verglichen mit P21, zu einer deutlichen Reduktion von IFN-γ. Eine gesteigerte IFN-γ Sekretion zeigten die Donoren 458A und 693A mit P21+Mu2. Im Vergleich zu P21 bewirkte die Verwendung von P21+Mu3 für Donor 482A eine sehr signifikant bzw. für die Donoren 458A und 693A eine hoch signifikant gesteigerte IFN-γ Produktion. Durch Aktivierung mit P21+Mu1 reagierten die PBMCs der Donoren 458A und 693A mit einer reduzierten bzw. die PBMCs des Donors 482A auf P21+Mu2 mit einer unwesentlich erhöhten IFN-γ Ausschüttung.

Die Analyse des IFN-γ Zytokinmusters des T2DM-Patienten 460A ergab vergleichbare Werte wie die der T1DM-Patienten und die der Kontrollen (Abbildung 14B). Im Vergleich zu P21 bewirkte die Stimulation mit P21+Mu1 und P21+Mu2 eine signifikant reduzierte Produktion von IFN-γ, die Zugabe von P21+Mu3 führte jedoch nur zu einer unwesentlichen IFN-γ Reduktion.

Durch den IFN-γ spezifischen ELISA wurden für die gesunden Kontrollprobanden, verglichen mit den T1DM-Patienten, ähnlich hohe Werte von IFN-γ nachgewiesen (Abbildung 14C). Bei Donor 867A konnte ausschließlich mit P21+Mu2 und P21+Mu3 und bei Donor 891A nur mit P21, P21+Mu2 und P21+Mu3 IFN-γ detektiert werden. Allerdings reagierten die PBMCs des Donors 891A, im Vergleich zu P21, auf P21+Mu2 und P21+Mu3 mit einer hoch signifikant erhöhten IFN-γ Sekretion. Ebenfalls in Bezug auf P21, zeigte sich bei Donor 881A für P21+Mu2 eine signifikant bzw. für P21+Mu3 eine hoch signifikant gesteigerte IFN-γ Freisetzung. Die Reduzierung von IFN-γ durch P21+Mu1 war bei diesem Donor nicht signifikant, ebenso die Ergebnisse des Donors 879A. Bei Donor 879A konnte im Vergleich zu P21 für P21+Mu1 eine verminderte bzw. für P21+Mu2 und P21+Mu3 eine vermehrte Ausschüttung von IFN-γ beobachtet werden.

A)

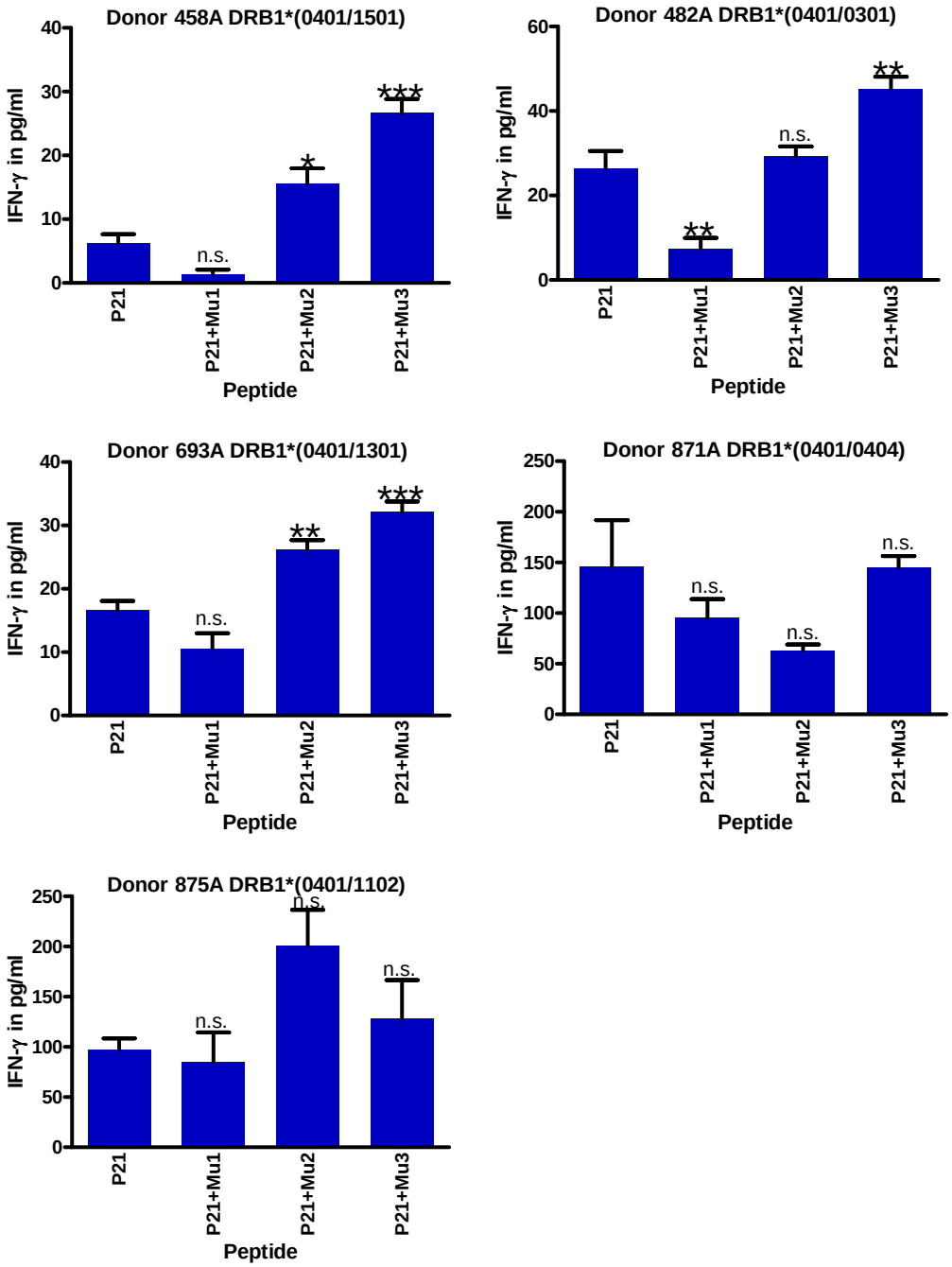
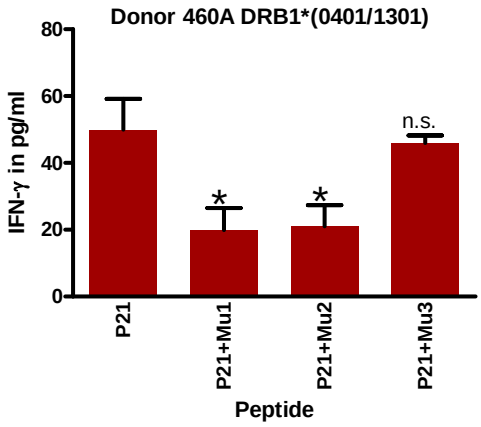


Abbildung 14 A): Detektion von IFN-γ in Zellkulturüberständen von T1DM-Patienten durch einen IFN-γ spezifischen ELISA. Die Analyse erfolgte durch Vierfachbestimmung.

Erklärung: n.s.= nicht signifikant ($p > 0,05$), *= signifikant ($p < 0,05$), **= sehr signifikant ($p < 0,01$), ***= hoch signifikant ($p < 0,001$) im Vergleich zu P21. Abkürzungen: IFN-γ= Interferon γ, Mu= Mutante

B)



C)

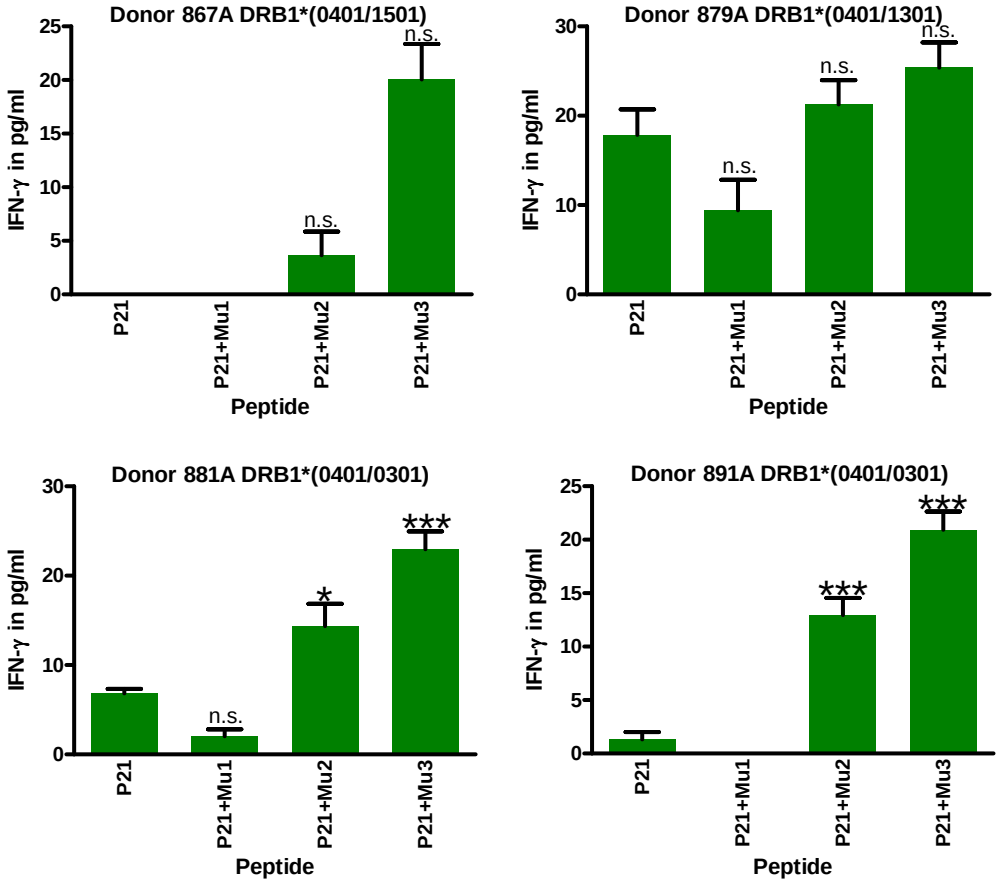


Abbildung 14 B und C): Detektion von IFN-γ in Zellkulturüberständen von B) T2DM-Patient und C) Kontrollprobanden durch einen IFN-γ spezifischen ELISA. Die Analyse erfolgte durch Vierfachbestimmung.

Erklärung: n.s.= nicht signifikant ($p > 0,05$), *= signifikant ($p < 0,05$), **= sehr signifikant ($p < 0,01$), ***= hoch signifikant ($p < 0,001$) im Vergleich zu P21. Abkürzungen: IFN-γ= Interferon γ, Mu= Mutante

3.3.3. IL-6

IL-6 konnte bei allen T1DM-Probanden detektiert werden (Abbildung 15). Die PBMCs des Donors 871A reagierten auf die unterschiedlichen Mutanten mit einer nicht signifikanten Veränderung in der IL-6 Sekretion (Abbildung 15A). P21+Mu1 und P21+Mu2 reduzierten und P21+Mu3 erhöhte IL-6 unwesentlich. Die Analyse des IL-6 Zytokinprofils ergab für die Donoren 458A, 482A, 693A und 875A folgende signifikante Ergebnisse. Im Vergleich zu P21 bewirkte die Stimulierung mit P21+Mu1 bei Donor 875A eine erhöhte IL-6 Konzentration. Durch P21+Mu2 zeigte sich bei den Donoren 482A und 693A eine vermehrte bzw. für Donor 875A eine verminderte IL-6 Sekretion. Auf P21+Mu3 reagierten die PBMCs der Donoren 482A und 693A mit einer Zunahme von IL-6, die Donoren 458A und 875A zeigten eine hoch signifikant gesteigerte IL-6 Ausschüttung. Nicht signifikante Ergebnisse wurden bei den Donoren 458A, 482A und 693A erzielt. Das Resultat von P21+Mu1 war bei den Donoren 458A und 482A eine Reduktion von IL-6, bei Donor 693A ergab sich eine IL-6 Erhöhung. Im Vergleich zu P21 bewirkte die Inkubation mit P21+Mu2 lediglich bei Donor 458A einen Anstieg der IL-6 Produktion, der statistisch nicht signifikant war.

Die Auswertung des T-Zellassays der PBMCs des T2DM-Patienten ergab ebenfalls für die verwendeten Peptidmutanten IL-6 Werte (Abbildung 15B). Durch Stimulation mit P21+Mu1 konnte eine signifikante Reduktion und nach Stimulierung mit P21+Mu3 eine signifikante Erhöhung der IL-6 Konzentration festgestellt werden. Durch Zugabe von P21+Mu2 zeigte sich eine Senkung der IL-6 Sekretion, die allerdings keine statistische Signifikanz erreichte.

Die Analyse des IL-6 spezifischen ELISA ergab für die getesteten Kontrollprobanden 867A, 879A, 881A und 891A IL-6 Werte in unterschiedlicher Konzentration. Donor 867A zeigte die geringste Konzentration des Zytokins IL-6. Im Vergleich zu P21 ließen sich mit allen Peptidmutanten signifikante Ergebnisse nachweisen. Die Inkubation mit P21+Mu1 bewirkte bei Donor 891A eine Reduktion von IL-6. Durch Aktivierung mit P21+Mu2 zeigte sich bei Donor 879A eine vermehrte bzw. bei Donor 891A eine verminderte IL-6 Freisetzung. Durch P21+Mu3 ließ sich bei den Donoren 867A und 881A eine IL-6 Erhöhung und bei Donor 891A eine IL-6 Senkung beobachten. Statistisch nicht signifikante Resultate zeigten sich wie folgt bei den gesunden Kontrollprobanden 867A, 879A und 881A: die Zugabe von P21+Mu1 bewirkte bei den Donoren 867A und 881A eine verminderte und bei Donor 879A eine vermehrte Ausschüttung des untersuchten

Zytokins. Die Stimulierung mit P21+Mu2 ergab bei Donor 881A eine verringerte bzw. bei Donor 867A eine vermehrte Produktion von IL-6. Durch P21+Mu3 reagierten lediglich die PBMCs des Donors 879A mit einem erhöhten IL-6 Wert.

A)

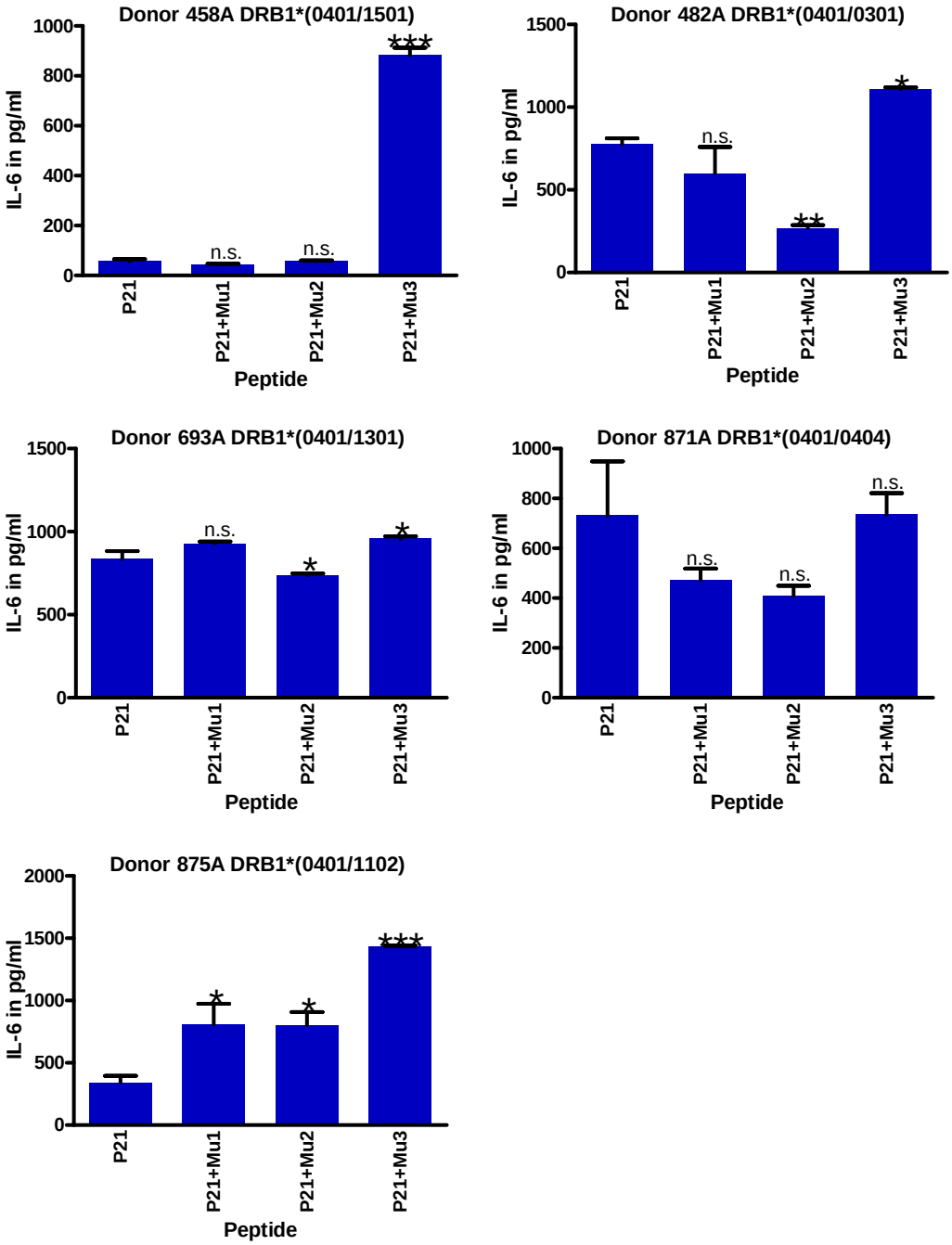
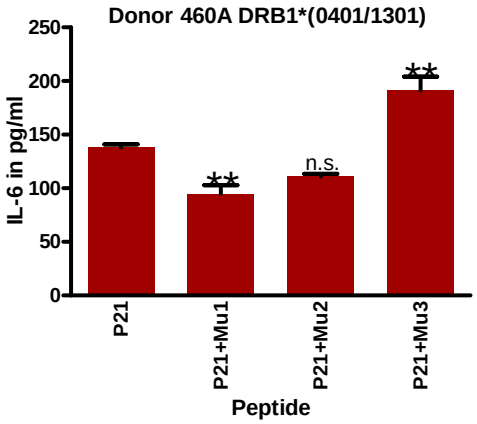


Abbildung 15 A): Detektion von IL-6 in Zellkulturüberständen von T1DM-Patientenndurch einen IL-6 spezifischen ELISA. Die Analyse erfolgte durch Vierfachbestimmung.

Erklärung: n.s.= nicht signifikant ($p > 0,05$), *= signifikant ($p < 0,05$), **= sehr signifikant ($p < 0,01$), ***= hoch signifikant ($p < 0,001$) im Vergleich zu P21, Abkürzungen: IL-6= Interleukin 6, Mu= Mutante

B)



C)

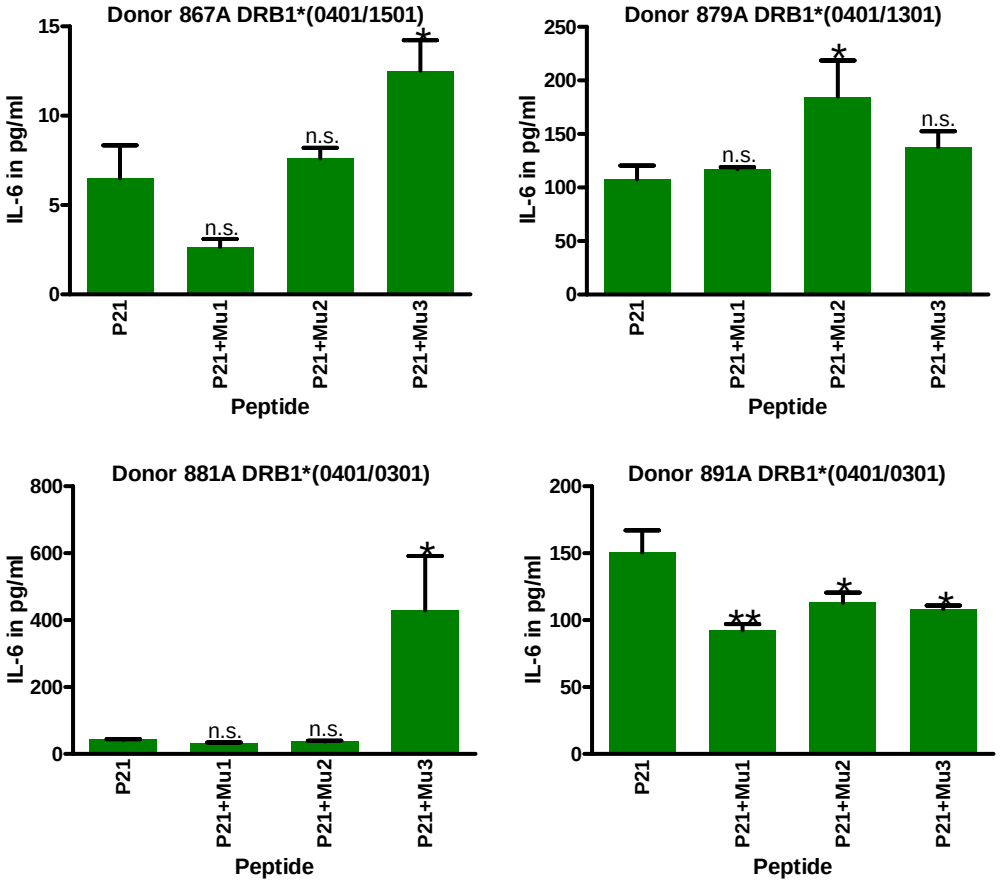


Abbildung 15 B und C): Detektion von IL-6 in Zellkulturüberständen von B) T2DM-Patient und C) Kontrollprobanden durch einen IL-6 spezifischen ELISA. Die Analyse erfolgte durch Vierfachbestimmung.

Erklärung: n.s.= nicht signifikant ($p > 0,05$), *= signifikant ($p < 0,05$), **= sehr signifikant ($p < 0,01$), ***= hoch signifikant ($p < 0,001$) im Vergleich zu P21, Abkürzungen: IL-6= Interleukin 6, Mu= Mutante

Extrapolierte Daten mit dem Faktor 2 bei den Donoren 482 A (P21+Mu3), 871 A (P21) und 875 A (P21+Mu1, P21+Mu2, P21+Mu3).

3.3.4. IL-17

In den weiteren T-Zellassays konnte mittels des IL-17 spezifischen ELISA bei den T1DM Donoren 458A, 482A, 693A, 871A und 875A durch die Stimulation mit P21, P21+Mu1, P21+Mu2 und P21+Mu3 IL-17 detektiert werden (Abbildung 16A). Ausnahme bildeten hier die PBMCs von Donor 458A, die durch Stimulation mit P21+Mu1 kein IL-17 sezernierten. Die nachgewiesenen IL-17 Konzentrationen der T1DM-Probanden lagen über den Werten der gesunden Kontrollprobanden. Signifikante Ergebnisse, verglichen mit P21, ließen sich bei den Donoren 482A und 871A für P21+Mu1, P21+Mu2 und P21+Mu3 und bei den Donoren 458A und 875A lediglich für P21+Mu3 wie folgt beobachten: bei den Donoren 482A und 871A führte die Stimulation mit P21+Mu1 zu einer deutlichen IL-17 Reduktion, die Zugabe von P21+Mu2 bewirkte eine ebenfalls deutliche IL-17 Senkung und die Inkubation mit P21+Mu3 ergab bei Donor 871A eine erniedrigte und bei Donor 482A eine erhöhte Ausschüttung von IL-17. Die PBMCs der Donoren 458A und 875A reagierten auf P21+Mu3 mit einer hoch signifikanten Induktion der IL-17 Sekretion. Nicht signifikante Resultate zeigte hingegen der Donor 693A. Verglichen mit P21 ließ die Stimulation der PBMCs dieses Donors mit P21+Mu1 eine verminderte bzw. die Stimulation mit P21+Mu2 und P21+Mu3 eine vermehrte Freisetzung von IL-17 beobachten. Ebenfalls statistisch nicht signifikant erhöhte IL-17 Produktionen ergaben sich bei den Donoren 458A und 875A für P21+Mu2 und darüber hinaus bei Donor 875A für P21+Mu1.

Die Auswertung des IL-17 Zytokinmusters des T2DM-Patienten 460A ergab höhere Werte als in der Kontrollgruppe (Abbildung 16B). Im Vergleich zu P21 bewirkte die Stimulierung mit P21+Mu1 eine signifikante Reduktion von IL-17. Die Zugabe von P21+Mu2 führte zu einer leichten Senkung, die Inkubation der PBMCs mit P21+Mu3 ergab eine unwesentliche Erniedrigung der Konzentration von IL-17.

Die IL-17 Detektion in den T-Zellassays mit PBMCs von gesunden Kontrollprobanden zeigte geringere IL-17 Werte als die T1DM-Patienten (Abbildung 16C). Durch Stimulation mit P21, P21+Mu1, P21+Mu2 und P21+Mu3 ließen sich bei den Donoren 867A und 879A und durch Stimulierung mit P21+Mu2 und P21+Mu3 bei Donor 891A IL-17 nachweisen. Die PBMCs des Donors 881A reagierten auf keines der verwendeten Peptide. Ein signifikantes Ergebnis zeigte sich jedoch bei Donor 879A durch die Zugabe von P21+Mu3, die eine erhöhte Sekretion von IL-17 bewirkte. Die restlichen Resultate waren insgesamt nicht signifikant und zeigten sich wie folgt: Im Vergleich zu P21 führte P21+Mu1 bei den

Donoren 867A und 879A zu einer IL-17 Senkung, P21+Mu2 und P21+Mu3 bei Donoren 867A zu einer Erhöhung von IL-17 und P21+Mu3 bei Donor 879A ebenfalls zu einer vermehrten IL-17 Ausschüttung.

A)

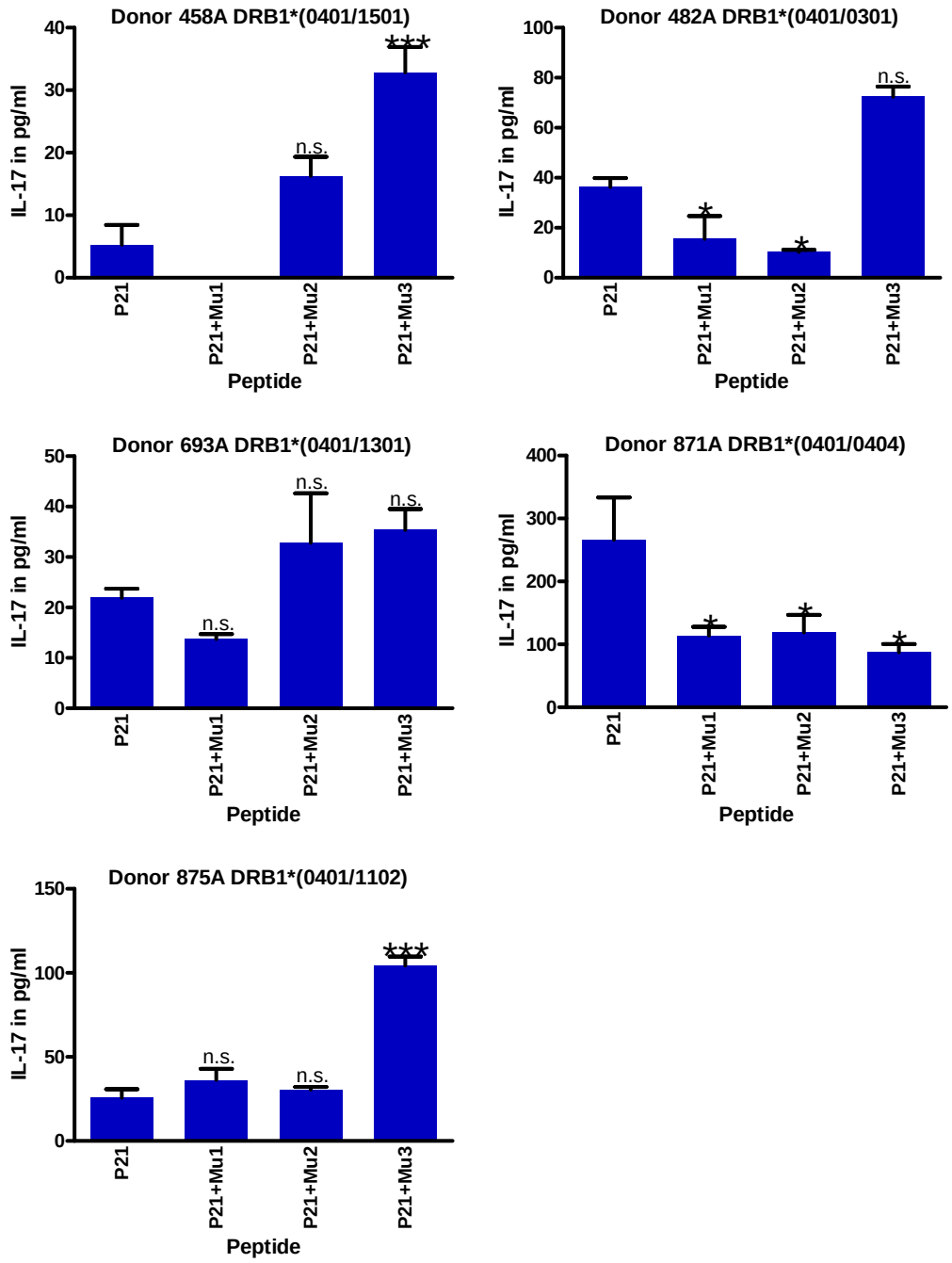
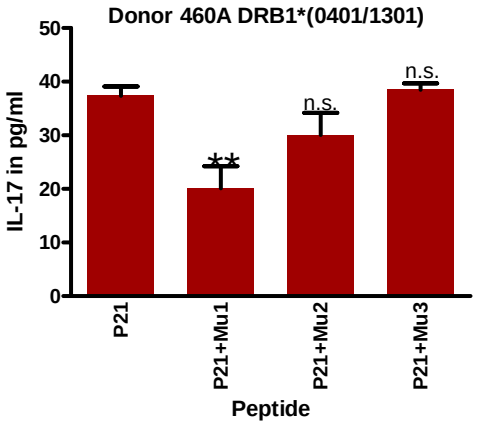


Abbildung 16 A): Detektion von IL-17 in Zellkulturüberständen von A) T1DM-Patienten durch einen IL-17 spezifischen ELISA. Die Analyse erfolgte durch Vierfachbestimmung.

Erklärung: n.s.= nicht signifikant ($p > 0,05$), *= signifikant ($p < 0,05$), **= sehr signifikant ($p < 0,01$), ***= hoch signifikant ($p < 0,001$) im Vergleich zu P21, Abkürzungen: IL-17= Interleukin 17, Mu= Mutante

B)



C)

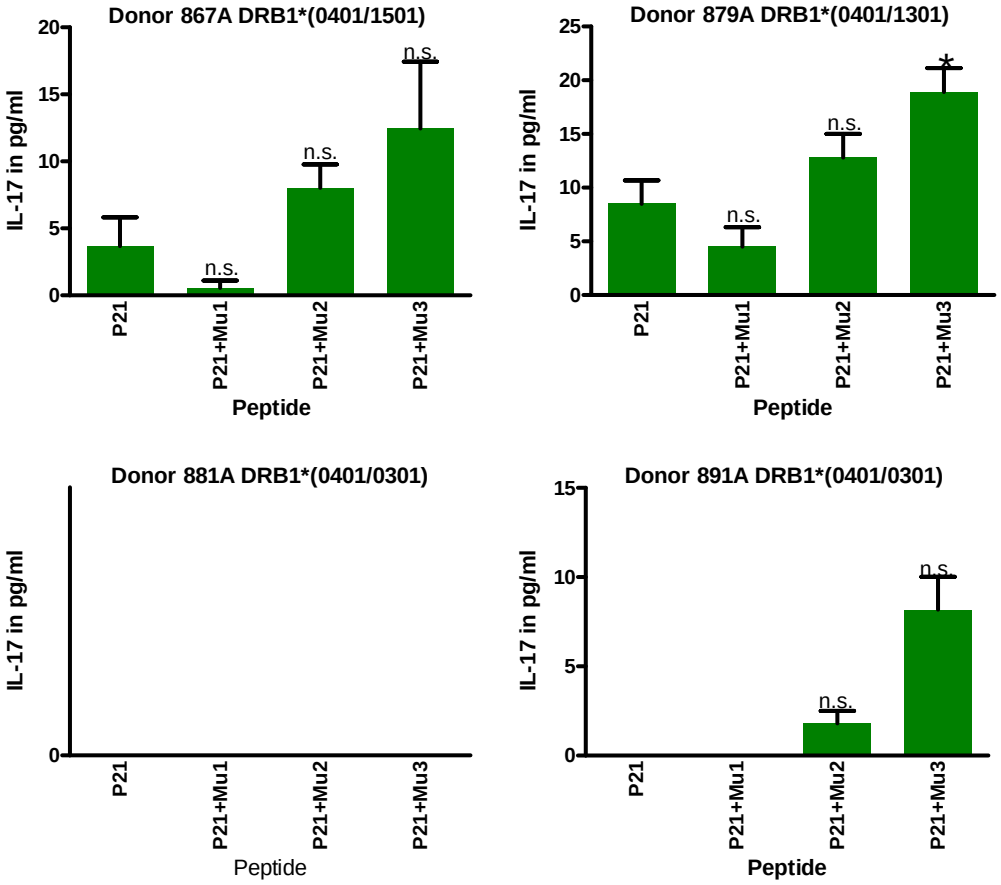


Abbildung 16 B und C): Detektion von IL-17 in Zellkulturüberständen von B) T2DM-Patient und C) Kontrollprobanden durch einen IL-17 spezifischen ELISA. Die Analyse erfolgte durch Vierfachbestimmung.

Erklärung: n.s.= nicht signifikant ($p > 0,05$), *= signifikant ($p < 0,05$), **= sehr signifikant ($p < 0,01$), ***= hoch signifikant ($p < 0,001$) im Vergleich zu P21, Abkürzungen: IL-17= Interleukin 17, Mu= Mutante

3.3.5. TGF-β1

Die Analyse der Konzentration des antiinflammatorischen Zytokins TGF-β1 ergab bei allen T1DM-Probanden ähnliche Werte (Abbildung 17A). Ein signifikantes Ergebnis ließ sich lediglich bei Donor 482A nachweisen. Im Vergleich zu P21 reagierten die PBMCs des Donors 482A auf P21+Mu1 mit einer Reduktion der TGF-β1 Sekretion. Die Stimulation mit P21+Mu2 und P21+Mu3 bewirkte bei diesem Donor nur eine statistisch nicht signifikant verminderte TGF-β1 Freisetzung. Die Resultate der T1DM-Patienten 458A, 693A, 871A und 875A waren ausnahmslos statistisch nicht signifikant.

PBMCs des T2DM-Patienten 460A zeigten eine höhere TGF-β1 Produktion als die T1DM-Patienten (Abbildung 17B). Im Vergleich zu P21 bewirkte die Aktivierung mit P21+Mu1, P21+Mu2 und P21+Mu3 bei dem Donor 460A eine vermehrte Detektion der TGF-β1 Konzentration, jedoch zeigten diese Ergebnisse keine statistische Signifikanz.

In den T-Zellassays mit PBMCs von gesunden Kontrollprobanden zeigte sich ebenfalls eine TGF-β1 Detektion mit ähnlichem Zytokinprofil wie bei den T1DM-Patienten (Abbildung 17C). Die Ergebnisse der Donoren 867A, 879A, 881A und 891A waren insgesamt statistisch nicht signifikant.

A)

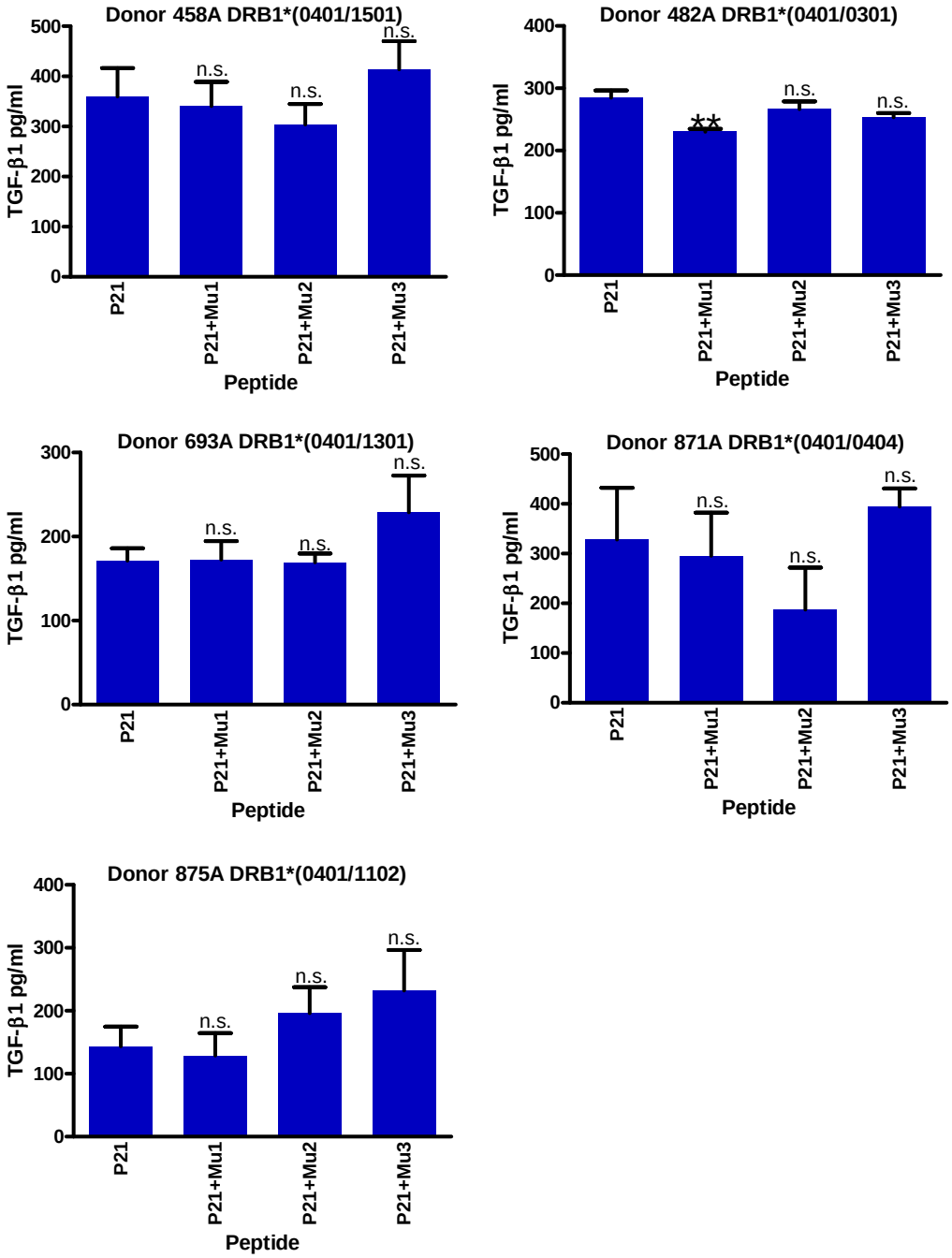
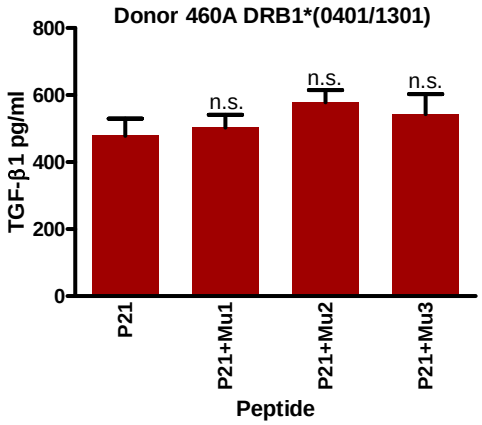


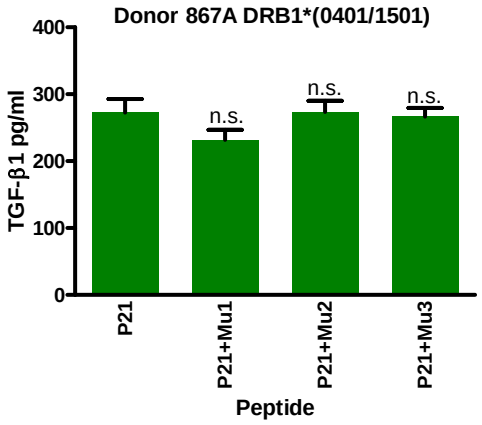
Abbildung 17 A): Detektion von TGF-β1 in Zellkulturüberständen von A) T1DM-Patienten durch einen TGF-β1 spezifischen ELISA. Die Analyse erfolgte durch Vierfachbestimmung.

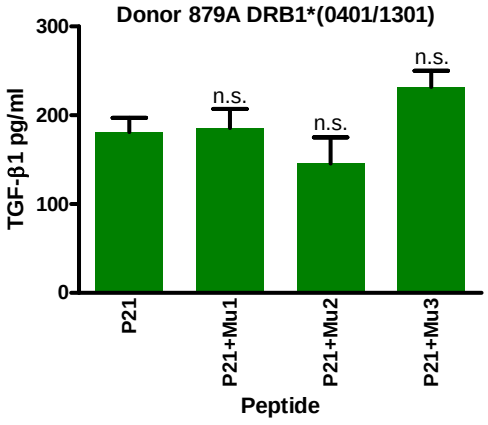
Erklärung: n.s.= nicht signifikant ($p > 0,05$), **= sehr signifikant ($p < 0,01$) im Vergleich zu P21. Abkürzungen: TGF-β1= Tumor growth factor-β1, Mu= Mutante

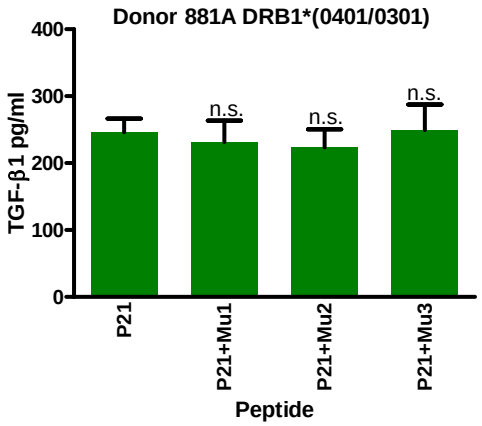
B)



C)







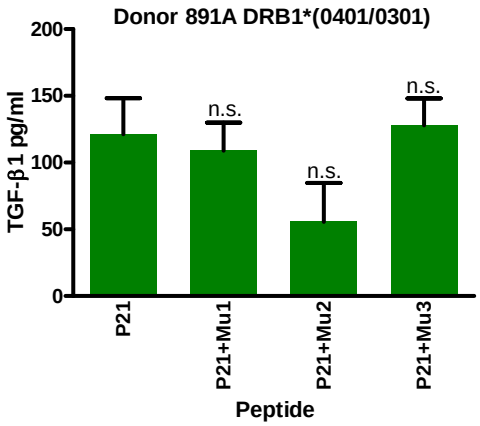


Abbildung 17 B und C): Detektion von TGF-β1 in Zellkulturüberständen von B) T2DM-Patient und C) Kontrollprobanden durch einen TGF-β1 spezifischen ELISA. Die Analyse erfolgte durch Vierfachbestimmung.

Erklärung: n.s.= nicht signifikant ($p > 0,05$), **= sehr signifikant ($p < 0,01$) im Vergleich zu P21. Abkürzungen: TGF-β1= Tumor growth factor-β1, Mu= Mutante

3.4. Ergebniszusammenfassung

3.4.1. T1DM-Donoren

Im folgenden Abschnitt wurden die Donoren zusammenfassend in einem Diagramm dargestellt. Hierfür wurden alle Einzeldaten in das Programm one-way ANOVA GraphPad Prism eingegeben und eine Signifikanzanalyse durchgeführt. Das TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-17 und TGF-β1 Gesamtergebnis der T1DM-Patienten 458A, 482A, 693A, 871A und 875A zeigte keine statistische Signifikanz (Abbildung 18).

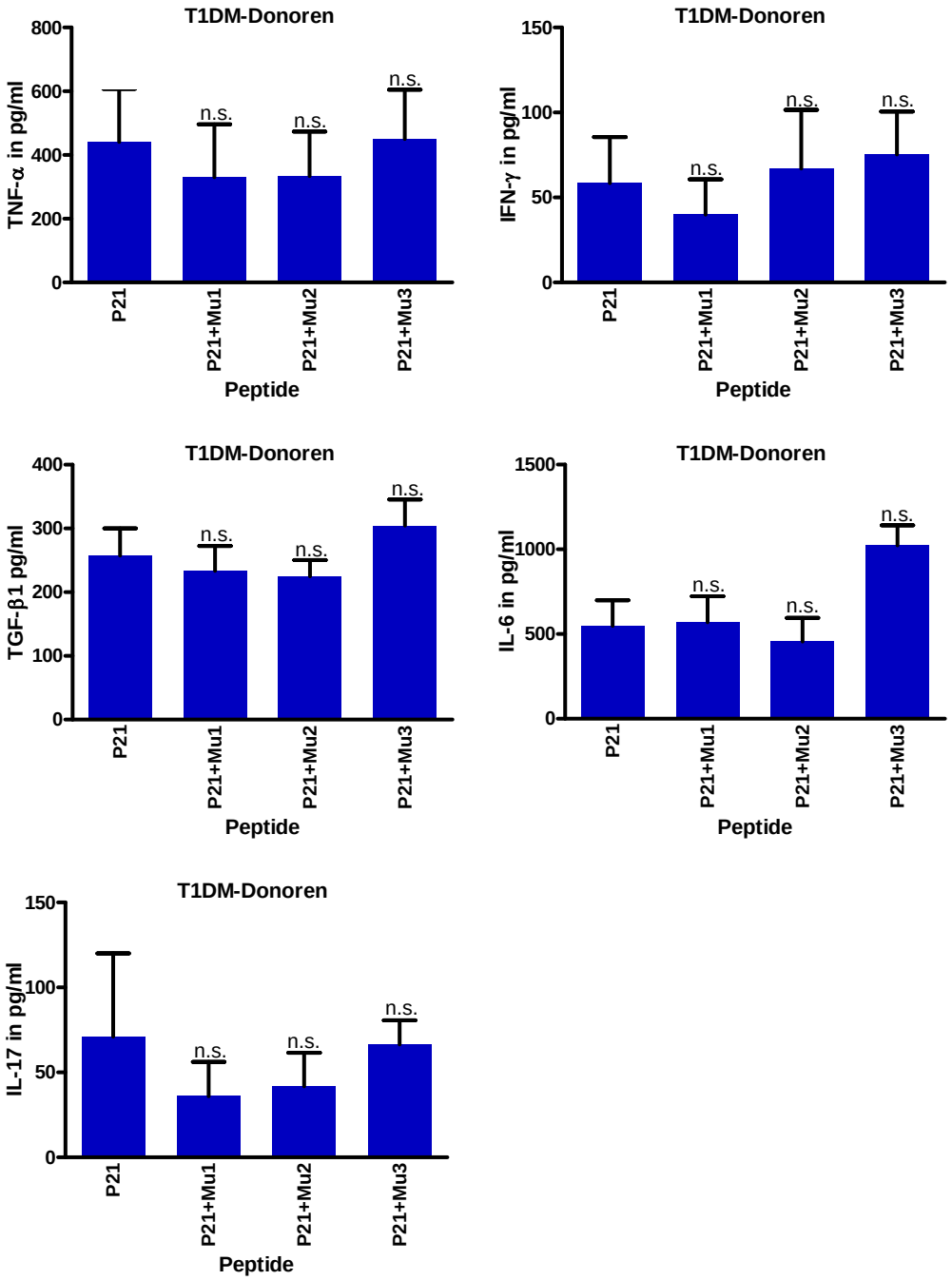


Abbildung 18: Zusammenfassung der TNF-α, IFN-γ, TGF-β1, IL-6 und IL-17 spezifischen ELISA-Ergebnisse der T1DM-Patienten 458A, 482A, 693A, 871A und 875A.

Erklärung: n.s.= nicht signifikant ($p > 0,05$) im Vergleich zu P21

3.4.2. Kontrollprobanden

Die Zusammenfassung der ELISA-Ergebnisse der Kontrollprobanden 867A, 879A, 881A und 891A zeigte für die Zytokine TNF-α, IL-6, IL-17 und TGF-β1 keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 19).

Die Analyse des IFN-γ Zytokinmusters ergab für die Zusammenfassung der Kontrollgruppe ein signifikantes Ergebnis. Auffallend war, dass die PBMCs durch Zugabe von P21+Mu3 mit einer deutlich vermehrten Ausschüttung von IFN-γ reagierten. Die Inkubation mit P21+Mu1 und P21+Mu2 führte hingegen zu einer nicht signifikanten Reduktion bzw. Erhöhung der IFN-γ Sekretion.

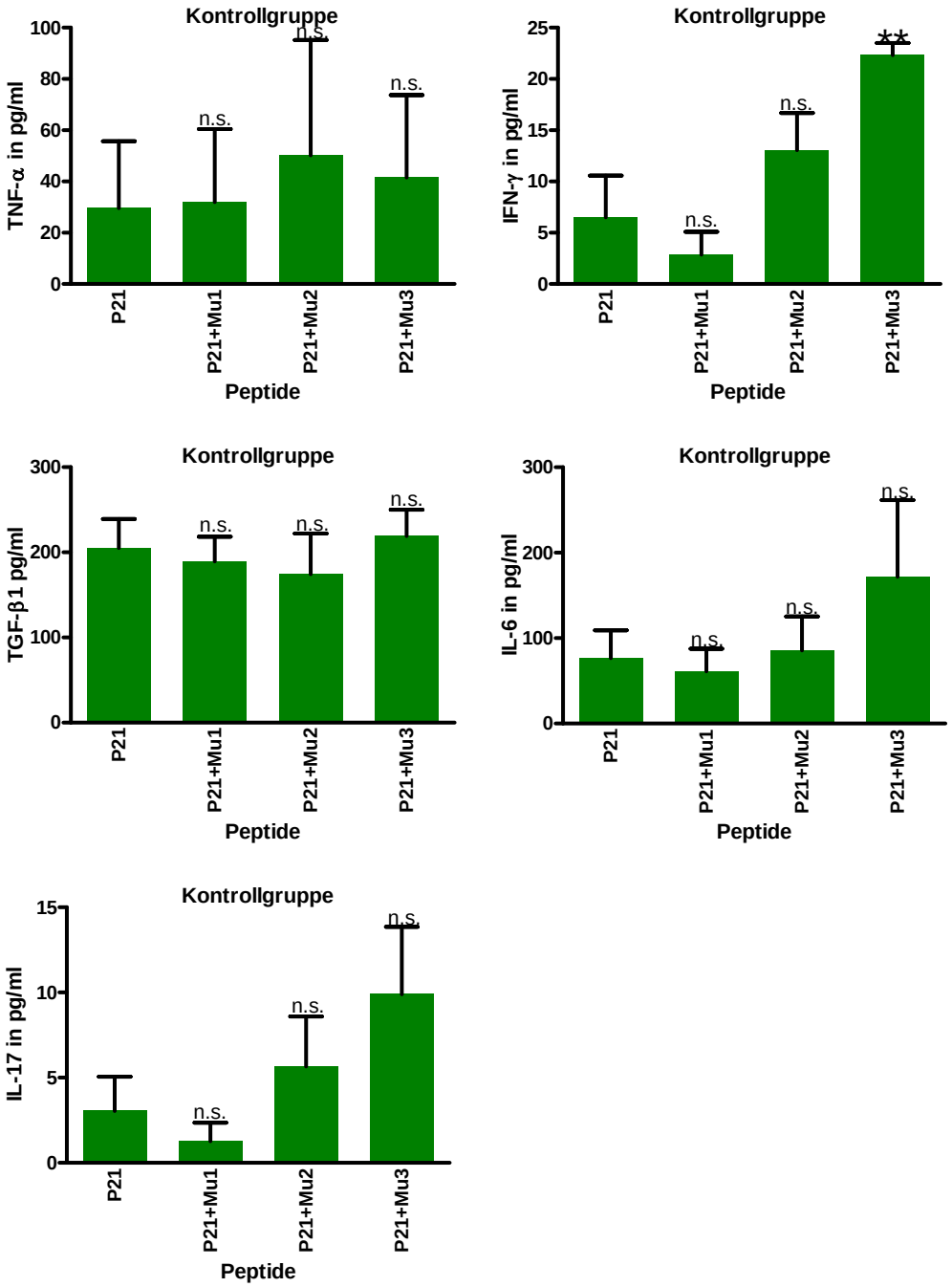


Abbildung 19: Zusammenfassung der TNF-α, IFN-γ, TGF-β1, IL-6 und IL-17 spezifischen ELISA-Ergebnisse der Kontrollgruppe 867A, 879A, 881A und 891A.

Erklärung: n.s.= nicht signifikant ($p > 0,05$), **= sehr signifikant ($p < 0,01$) im Vergleich zu P21

4. Diskussion

Typ I Diabetes mellitus (T1DM) ist eine Autoimmunerkrankung, bei der es durch $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen zu einer selektiven Zerstörung der im Pankreas liegenden insulinproduzierenden β-Zellen kommt. Als Autoantigene, die eine Immunantwort hervorrufen können, sind bereits einige humane T-Zell Epitope bekannt bzw. es wurden bereits verschiedene Antikörper nachgewiesen. Erstmals ließen sich 1974 pankreatische Insel-Antikörper (IgG-ICA) nachweisen (Bottazzo GF et al., 1974; Knip M, 2002). Des Weiteren wurden bei einigen neu diagnostizierten, jedoch unbehandelten Typ 1 Diabetikern 1983 Autoantikörper gegen Insulin (IgG-IAA) (Palmer JP et al., 1983) und 1988 bei Patienten ohne IgG-IAAs Autoantikörper gegen dessen Vorstufe Proinsulin (IgG-PAA) (Kuglin B et al., 1988) detektiert. Durch weitere Forschung wurde eine höhere Prävalenz dieser Proinsulin-Antikörper im Vergleich zu Insulin-Antikörpern und daher eine Assoziation dieser Proinsulin-Antikörper zu T1DM beschrieben (Böhmer K et al., 1991). Aus Proinsulin wurden spezielle Abschnitte, wie beispielsweise die Aminosäuresequenz proinsulin 24-36 (FFYTPKTRREAED) und proinsulin 74-90 (AGSLQPLALEGSLQKRG, P17), ebenso das Peptid Glutaminsäure Decarboxylase (GAD) 506-518 (FWYIPPSLRTLED), publiziert (Rudy G et al., 1995; Durinovic-Belló I et al., 2006). Diese wenigen beispielhaften Peptide zeigen wie im Laufe der letzten Dekaden durch Forschung eine genauere Identifizierung der Auto-Antigene möglich war. Diese Spezifizierung und die genaue Kenntnis dieser T-Zell-Epitope sind für das Verständnis der Erkrankung und damit für die Entwicklung neuer präventiver und therapeutischer Maßnahmen unerlässlich.

Abbildung 20 (siehe Anhang) zeigt, dass proinsulin 94-110 (QCCTSICSLYQLENYCN, P21) ebenso wie das bereits publizierte T-Zell-Epitop P17 in der Lage ist, eine T-Zell-Antwort, welche durch die Sekretion von TNF-α dargestellt ist, zu induzieren (Aalst van D et al., 2010). In weiteren Experimenten mit prAPLs des Peptides P17 ließ sich gemäß dieser Veröffentlichung eine Modulation von Immunzellen (höchstwahrscheinlich T-regulatorische Zellen) durch eine erhöhte Ausschüttung des antiinflammatorischen Zytokins (TGF-β1) erreichen. Antiinflammatorische Zytokine können autoaggressive T-Zellen regulieren und eventuell einen T1DM verhindern.

Im Rahmen dieser Arbeit soll basierend auf den P17 Daten, das bekannte und bereits publizierte T-Zell Epitop P21 moduliert werden, um eine Immunmodulation zu bewirken. Hierfür wurde zuerst das Peptid P21 mit einzelnen Cathepsinen bzw. mit einem Gemisch

von lysosomalen Cathepsinen einer B-Zelllinie verdaut, anschließend mittels reversed-phase HPLC aufgetrennt und die Verdauprodukte durch MALDI-TOF Massenspektrometrie identifiziert. Bestimmte Aminosäuren des Peptids P21, nach denen Cathepsine spalten, wurden ausgetauscht, um dieses Peptid vor proteolytischem Verdau zu schützen. Die Bindung des Peptids an HLA-DRB1*0401 wurde mittels HPSEC überprüft und die T-Zellaktivierung über einen T-Zell Assay bestimmt.

4.1. Generierung von P21 basierenden prAPLs

Die Abbildungen 9, 10 und 11 im Ergebnisteil (Seite 31-32) zeigen die Schnittstellen, die von gereinigtem CatG, CatB und von den aus einer B-Zelllinie stammenden lysosomalen Cathepsinen verursacht wurden. Bei der Analyse fiel auf, dass die durch gereinigtes GatG entstandenen Schnittstellen bei P21 zwischen ^{102}LY^{103} und ^{103}YQ^{104} bei der Mutante P21 Mu1 fehlen. Allerdings zeigte sich bei der Auswertung der Inkubation von P21 Mu1 mit CatG und CatB eine neue Schnittstelle zwischen den Aminosäuren ^{96}CT^{97}. CatB hydrolisiert, wie durch seine Peptidyl-Dipeptidase Aktivität bei pH 5 zu erwarten, zwei Aminosäuren am C-terminalen Ende. Jedoch zeigte sich eine weitere Spaltstelle zwischen ^{96}CT^{97}, was eventuell auf eine Kontamination der käuflichen CatB mit einer weiteren Protease hindeutet. Dennoch lässt sich hieraus keine Aussage bezüglich des Verdaus in der Zelle machen, da sich nicht nur CatB bzw. CatG sondern ein Gemisch von unterschiedlichen Proteasen in den Lysosomen der Zelle befindet. Deshalb wurde P21 zusätzlich mit lysosomalen Cathepsinen einer B-Zelllinie verdaut. Die Zugabe der lysosomalen Cathepsine zu P21 zeigte eine komplette Spaltung des Peptides, welches sich in der Quantifizierung des unverdauten Peptides (0%) mittels HPLC zeigte. Im Vergleich hierzu wiesen die hergestellten prAPLs verschiedene Verdaufragmente auf und P21 Mu3 zeigte eine Proteaseresistenz von bis zu ~ 30%.

APLs in der Diabetesforschung sind schon länger im Einsatz, allerdings nur bedingt erfolgreich. Wie bereits oben erwähnt, ist ein auf P17 basierendes prAPL in der Lage, durch Erhöhung der TGF-β1 Sekretion immunmodulatorisch zu wirken (Aalst van D et al., 2010). NBI- 6024, ein APL des Insulin B (9-23)Epitopes, welches sich durch Austausch von Alanin an Position 16 und 19 unterscheidet, verzögert durch subkutane Injektion bei NOD-Mäusen wesentlich den Beginn und reduziert die Inzidenz von Diabetes (Alleva DG et al., 2001 und 2002). Eine klinische Phase-I-Studie dieses APL´s (NBI-6024) deutete

ebenfalls nach subkutaner Gabe eine siknifikante, jedoch dosisabhängige Verschiebung der pathogenen Th1-Antwort (IFN-γ) zu Gunsten einer protektiven Th2- Reaktion (IL-5) an (Alleva DG et al., 2006). Walter et al. postulierten jedoch in der zur Testung des pharmakologischen Potentials des APL durchgeführten Phase-II-Studie keinen Schutz vor der beta-Zell-Zerstörung. Des Weiteren zeigten sich keine signifikanten Veränderungen im Insulin-Bedarf, in metabolischen Kontrollen, bei hypo- und hyperglykämischen Ereignissen, der Antikörperkonzentrationen oder der CD4 und CD8-T-Zell-Konzentration. Altered peptide ligands werden ebenfalls in der Forschung weiterer Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Tierische Experimente im Rahmen der Rheumatoiden Arthritis zeigten reduzierte inflammatorische Zytokinsekretionen und eine effiziente Inhibierung der Progression der Erkrankung (Dominguez MDC et al., 2011; Lorenzo N et al., 2012). In einer klinischen Phase-II-Studie beschrieben Bielekova et al. durch das enzephalopathische Potential des APL´s CGP77116 bei einigen Probanden eine Exazerbation der Erkrankung Multiple Sklerose. Die Resultate der verschiedenen APLs bei den unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen zeigen erneut, dass die Verwendung zur Modulation des Immunsystems möglich ist, jedoch mit unterschiedlichem Erfolg. Des Weiteren weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Experimente mit Tieren zwar wichtig sind, jedoch nicht immer exakte Rückschlüsse auf Patienten ermöglichen. Dies macht deutlich, warum wir humane Zellen für die Experimente mit APLs verwendet haben.

Serreze et al konnten 1996 in Experimenten mit „ B lymphocyte-deficient“ NOD Mäusen (B lymphocyte NOD.Igμ^{null} mice; NOD = engl. für Non-Obese Diabetic Mouse) die essentielle jedoch bis dahin nicht anerkannte Rolle der B-Zellen in der initialen Entwicklung und Aktivierung von beta-Zell autoreaktiven T-Zellen zeigen. Dieser Stamm wies zudem eine normale Konzentration von T-Lymphozyten auf, zeigte jedoch keine T1DM ähnliche Erkrankung und war insulitisresistent (Serreze DV et al., 1996). Hieraus und durch die Tatsache, dass B-Zellen, die bei T1DM detektierbare Autoantikörper bilden und deshalb mit der Erkrankung assoziiert sein müssen, ergibt sich die Notwendigkeit, initial die Proteasen aus B-Zellen zur Testung der prAPLs zu verwenden.

Allerdings wird Proinsulin nicht ausschließlich durch lysosomale Proteasen in B-Zellen, sondern auch in Lysosomen verschiedener professionell antigenpräsentierender Zellen wie Dendritische Zellen (DCs) und Makrophagen prozessiert.

DCs selbst können durch Initiation Inselzellen zerstören. Dies konnte durch Ludewig et al. mittels transgenem Mäusestamm (RIP-GP mice) gezeigt werden. Beta-Zellen dieser Mäuse bilden ein LCMV-GP (engl. lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein, Expression kontrolliert durch RIP; engl. rat insulin promoter) und werden nach repetitiven Injektionen von LCMV-Antigen-exprimierenden DCs durch zytotoxische T-Zellen zerstört (Ludewig B et al., 1998). In weiteren Experimenten sollten deshalb nach erfolgreichen B-Zellresultaten zusätzlich DCs zur Annäherung an Patienten untersucht werden.

4.2. Funktioneller T-Zellassay

Diabetogene T-Zellen spielen nach Infiltration in das Pankreas eine wesentliche Rolle in der Entwicklung einer Insulitis (Miyazaki A et al., 1985). Experimente mit NOD Mäusen, einem Stamm mit einem hohen Auftreten von spontanem Diabetes mellitus Typ 1, demonstrierten zusätzlich diese T-Zellabhängigkeit. Athymische Tiere dieses Stammes entwickelten keine Insulitis bzw. T1DM ähnliche Erkrankung. Des Weiteren zeigte sich nach Transfer von T-Zellen erkrankter Tiere auf junge bestrahlte NOD Mäuse die Entwicklung eines Diabetes (Yagi H et al., 1992; Wicker LS et al., 1986). Diese Resultate belegen die Notwendigkeit der Untersuchung von autoreaktiven T-Zellen.
Kent et al. postulierten nach Untersuchung von T-Zellklonen von einer aus pankreatischen Lymphknoten stammenden T-Zelle, bereits eine T-Zellantwort mit dem T-Zellepitop insulin A1-15, jedoch nicht für das hier untersuchte P21 (A5-21 ≙ PPI94-110). Ein Grund könnte das Fehlen des für dieses Epitop passenden T-Zell-Rezeptors auf den geklonten T-Zellen sein, welcher durch natürliche V(D)J Rekombination (Oettinger MA et al., 1990) und die natürliche Mutationrate (Fritz-Niggli H, 1957) *in vivo* vorhanden sein könnte. Die Vielfalt der im Menschen vorkommenden T-Zell Rezeptormöglichkeiten beträgt schätzungsweise 10^{15} (Löffler G, 2007). Ferner könnten die für die Erkennung notwendigen Co-Rezeptoren auf den T-Zellen bzw. die costimulatorischen Moleküle auf den für die Antigenpräsentation notwendigen zugegebenen B-Zellenlinien fehlen. Um diese Ursachen auszuschließen und um möglichst humane *in vivo* Verhältnisse zu schaffen, entschieden wir uns zur Verwendung von primären Zellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde experimentell die Möglichkeit untersucht, immunmodulatorisch durch prAPLs die Aktivierung von primären diabetogenen T-Zellen zu hemmen bzw. antiinflammatorische Zytokine (TGF-β1) zu induzieren. Hierfür wurde die Aktivierung dieser diabetogenen T-Zellen über die Zytokinsekretion ermittelt. Durch

diese Experimente konnte die Hypothese untersucht werden, ob T1DM-Patienten durch vorherige Aktivierung *in vivo* ein höheres proinflammatorisches Zytokinprofil als die gesunden Kontrollen aufweisen. Zudem könnten die prAPCs in unterschiedlicher Weise diabetogene T-Zellen hemmen bzw. eventuell T-regulatorische Zellen (Tregs) aktivieren. Um die Resultate besser vergleichen zu können, wurden im Anhang (Tabellen 3-5) die signifikanten Ergebnisse noch einmal zusammengestellt.

4.2.1. Zusammenfassung: prAPLs induzieren bzw. hemmen die Zytokinsekretion

Eine Immunmodulation zur Inhibierung von diabetogenen T-Zellen durch Einsatz von prAPL ließ sich nicht bewirken. Die Zusammenfassung der Ergebnisse macht deutlich, dass die Mu-Peptide nicht in der Lage waren, die T-Zellaktivität zu inhibieren bzw. die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen zu senken. Ebenso wenig ließ sich die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins TGF-β1 steigern. P21 induziert die T-Zellaktivität von primären T-Zellen, dargestellt durch eine erhöhte TNF-α Sekretion (Seite 86, Anhang). Allerdings wird P21 *in vitro* von CatG (Seite 31, Ergebnisteil) gespalten. Dies könnte darauf hindeuten, dass P21 kein natürlich vorkommendes T-Zell-Epitop ist, da es im endozytischen Kompartiment vermutlich nicht generiert sondern zerstört wird. Aus diesem Grund lassen sich vermutlich die Zytokinmuster von TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-17 und TGF-β1 durch die prAPLs dieses Epitops alleine nicht modulieren. Ein weiterer Therapieansatz wäre eine Inhibierung lysosomaler Cathepsine. Dadurch könnte die Generierung von T-Zell-Epitopen zur Aktivierung von diabetogenen T-Zellen verhindert werden. Zur Modulation dieser Cathepsine könnte Vitamin D eingesetzt werden, da z.B. Vitamin D CatG in DCs von gesunden Donoren inhibiert (Zou F et al., 2011). Zusätzlich zur bekannten Rolle des 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 in der Regulation des Kalzium- und Phosphatstoffwechsels besitzt das Hormon weitere „nicht-klassische“ Wirkungen, darunter eine Regulation des Immunsystems z.B. MHC-Moleküle (Pietschmann P et al., 2003). Laut dieser Veröffentlichung hat Vitamin D verschiedene Funktionen auf die Komponenten/Zellen des Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen, T- und B-Lymphozyten. Des Weiteren konnte die Gabe von 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 in mehreren Tiermodellen bereits die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus verhindern. Eine finnische Studie aus dem Jahre 2001 wies an einer 10.821 großen Neugeborenen-Kohorte mit einem Ein-Jahres Follow-up, die eine an mehreren Kriterien

angepasste Vitamin D Gabe erhielten, ein vermindertes Auftreten eines T1DM nach (Hyppönen E et al., 2001). Allerdings ergab eine longitudinale Kohortenstudie (DAISY, USA, 1993-2011) an 2644 Kindern mit erhöhtem Diabetesrisiko keine Assoziation zwischen der Vitamin D-Aufnahme oder dem 25-Hydroxyvitamin D-Spiegel und dem Risiko für Insel-Immunität oder der Entwicklung eines T1DM (Simpson M et al., 2011). Ebenso wenig zeigte eine während der Schwangerschaft durchgeführte mütterliche Vitamin D-Aufnahme eine Assoziation mit dem Risiko einer beta-Zell-Autoimmunität oder eines T1DM bei den Kindern (Marjamäki L et al., 2010). Diese unterschiedlichen Resultate der Studien machen deutlich, dass es einen möglichen Zusammenhang zwischen Vitamin D und der Regulation des Immunsystem gibt, dieser aber noch nicht hinreichend untersucht bzw. Vitamin D alleine zur Verhinderung von Autoimmunerkrankungen wie T1DM nicht ausreichend ist. Deshalb könnte in weiteren Untersuchungen Vitamin D in Kombination mit prAPL zur Inhibierung von diabetogenen T-Zellen und damit zur Verhinderung eines Diabetes eingesetzt werden. So könnte Vitamin D die Spaltung und hierdurch die Generierung von möglichen Antigenen reduzieren und die prAPLs als kompetitive Bindungsblockade am antigenpräsentierenden Rezeptor (MHC II) besser wirken.

Bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse im Ergebnisteil ab Seite 35 fällt zusätzlich auf, dass die sezernierten Konzentrationen der unterschiedlichen Zytokine im Probandenvergleich und innerhalb eines Probanden variieren. Dies kann auf eine unterschiedliche T-Zellanzahl in den untersuchten Proben hindeuten. Eine unterschiedliche T-Zellkonzentration könnte auch zu einer unterschiedlich ausgeschütteten Zytokinkonzentration führen.
Die insgesamt niedrige Zytokinausschüttung kann auch darauf hindeuten, dass die *in vivo* vorhandene Sekretion nicht korrekt widergespiegelt wurde, da T-Zellen eventuell die Isolierung, den Temperaturwechsel, die Lagerung mit DMSO im N_2-Tank oder die Inkubation nicht ohne Schädigung überstanden haben. Zur Überprüfung wären neue, umfangreichere Experimente indiziert.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse der Kontrollgruppe zeigt, dass das Immunsystem gesunder Probanden durch die prAPLs nicht moduliert werden konnte. Hierfür wäre es nötig, eine Reduktion der Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen bzw. eine Erhöhung des antiinflammatorischen Zytokins zu erreichen. Die Gesamtergebnisse zeigen

aber bei den PBMCs der gesunden Donoren eine signifikant vermehrte Sekretion des Zytokins IFN-γ, die T1DM Donoren reagierten im Vergleich lediglich nicht signifikant. Allerdings zeigte sich bei der Kontrollgruppe trotz der signifikant erhöhten Ausschüttung von IFN-γ nach Inkubation mit P21+Mu3 eine insgesamt niedrigere (Gesamt-) Konzentration des Zytokins als *in vivo* zu erwarten wäre und als bei den T1DM Patienten nachgewiesen werden konnte.

Dies könnte sicherlich auf eine bereits *in vivo* stattgefundene Aktivierung der T-Zellen mit einer bereits vermehrten und so nicht mehr signifikant zu steigernden IFN-γ Sekretion der PBMCs der an T1DM-erkrankten Probanden hindeuten. Rabinovitch A et al. zeigten bei Experimenten mit isolierten aus pankreatischen Inselzellen stammenden mononukleären Leukozyten von vier verschiedenen Mäusestämmen eine progrediente Erhöhung der IFN-γ Konzentration während des Fortschrittes der Krankheit und schlugen eine „intra-islet" Abhängigkeit der IFN-γ Produktion von Mononukleären Zellen und der beta-Zell Zerstörung und Diabetes mellitus ähnliche Erkrankung in weiblichen „Nonobese diabetic mice" vor. Bekräftigt wird der Einfluss von IFN-γ auf die Erkrankung T1DM durch Untersuchungen von „Ifngr-null mutation" auf NOD-Mäusen. Mäuse mit dieser Mutation in der IFN-γRα Kette und folglich mit Zellen, welche durch einen fehlenden Zelloberflächenrezeptor nicht sensitiv für das Zytokin sind, zeigten deutlich seltener eine Insulitis und keine Diabetes mellitus ähnliche Erkrankung (Wang B et al., 1997).

Des Weiteren könnte dies aber auf eine Immunmodulation der PBMCs der gesunden Probanden hindeuten. Wie bereits oben erwähnt, könnte es zwischen einer erhöhten IFN-γ Konzentration und der Entwicklung eines Diabetes mellitus eine Korrelation geben. Eine weitere beschriebene Funktion von IFN-γ oder Exposition von IFN-γ in Kombination mit TNF-α ist die Induktion von MHC Klasse I Molekülen auf Inselzellen (IFN-γ plus TNF-α > IFN-γ > TNF-α) (Campbell IL et al., 1989). Hohe MHC Klasse I Expression konnte bei beta-Zellen von T1DM-Patienten nachgewiesen werden (Itoh N et al., 1993), ein direkter Zusammenhang zwischen der gesteigerten MHC- Expression und der Progression zum Diabetes mellitus konnte nicht gezeigt werden bzw. β-Zellen wurden als Target von IFN-γ beim T1DM ausgeschlossen (Thomas HE et al., 1998).

Die gesteigerte IFN-γ Ausschüttung der gesunden Probanden deutet auf eine T-Zellaktivierung hin und zeigt, dass die von uns verwendeten proteaseresistenten Peptidliganden immunmodulatorisch wirken, z.B. wie bereits oben beschrieben durch die Induktion der MHC Klasse I Moleküle. Durch Austausch von weiteren Aminosäuren

könnte ein prAPL generiert werden, welches das antiinflammatorische Zytokin TGF-β1 induziert bzw. als passendes Epitop zur protektiven Immunmodulation fungiert.

Wie bereits oben beschrieben ist ein Erklärungsversuch, dass die in dieser Arbeit verwendeten P21 Peptid-Mutanten nicht in der Lage sind, eine T-Zellantwort zu unterdrücken bzw. eine vermehrte Produktion von TGF-β1 zu bewirken. Eine andere Erklärung wäre bei den Donoren selbst zu suchen. So erfolgte bei den Probanden lediglich die Blutabnahme mit Autoantikörperbestimmung ohne eine zusätzliche Erhebung der Anamnese, welche deshalb nicht mit in die Interpretation der Ergebnisse einbezogen werden kann. Aus diesem Grund ist nicht bekannt, in welchem Gesundheitszustand sich die Probanden zum Zeitpunkt der Blutspende befanden. Diese Information wäre aber durchaus interessant, da ältere Menschen/Patienten oft multimorbide sind. Das heißt, sie leiden neben ihrem Diabetes mellitus noch an anderen Erkrankungen, welche ebenfalls Einfluss auf die Zytokinsekretion haben könnten. Außerdem ist nicht ersichtlich, ob bei den Spendern noch weitere Autoimmunerkrankungen bekannt sind. Im Rahmen einer Studie des Multiple Autoimmune Disease Genetics Consortium (MADGC) ließen sich bei 265 Familien jeweils mindestens 2 von 9 Autoimmunerkrankungen gleichzeitig nachweisen. Hierbei zeigte der Single-Nukleotid Polymorphismus (rs2476601, encoding R620W) der Tyrosinphosphatase (PTPN22)/ PTPN22 620W Allel eine Assoziation mit T1DM, Rheumatoider Arthritis, Systemischem Lupus erythematodes und Hashimoto Thyreoiditis (Criswell LA et al., 2005). Als polyglanduläres Autoimmunsyndrom (PAS) wird das Vorkommen von Autoimmunendokrinopathien mehrerer endokriner Systeme mit nichtendokrinen Autoimmunerkrankungen bezeichnet (Hunger-Battefeld W et al., 2009), 1980 von Neufeld in drei Syndrome klassifiziert (Neufeld M et al., 1980). Informationen zur Insulintherapie, Verhaltens- bzw. Essgewohnheiten (beispielsweise Bewegung, Gewicht etc.), Schwere und Verlauf der Erkrankung sind ebenfalls unbekannt, könnten aber durch ein von eingewanderten Immunzellen sezerniertes und verändertes Zytokinprofil/ Zytokinkonzentrationen (Pham MN et al., 2011; Eizirik DL et al.,2009) bzw. durch eine metabolische Dysregulation, welche einer Autoimmunität bei T1DM vorausgeht (Orešič M et al., 2008), und deren Produkte, welche imstande sind, proinflammatorische Mediatoren zu sein (Mehta D, 2005), durch unterschiedliche exogene Insulinzufuhr und die Entwicklung von Insulin-Antikörpern (Palmer JP et al., 1983) oder durch einen Epitopwechsel in der frühen Phase (Knip M, 2002) Einfluss auf die Resultate nehmen. Des Weiteren ist die Jahreszeit, in der die Blutabnahme erfolgte oder der

physische (z.B. ein Infekt) und psychische Zustand der Probanden nicht mit einbezogen worden. Dies sind allerdings ebenfalls Faktoren, die die zu untersuchenden T-Zellen beeinflussen und so zu einem von vornherein veränderten Zytokinprofil führen könnten. Deshalb muss bedacht werden, dass die Experimente mit Zellen von Patienten mit realen Erkrankungen und einer komplexen Anamnese durchgeführt wurden, weshalb andere Ergebnisse zu erwarten sind, als mit Zelllinien bzw. T-Zellklone, die keinen Umwelteinflüssen ausgesetzt waren.

4.3. Ergebnisse im Genotypenvergleich

Genetische Faktoren sind stark mit der Erkrankung T1DM verknüpft; hierbei machen MHC Klasse II Allele (hauptsächlich Gene auf Chromosom 6p21) je nach Literatur etwa 40- 60% der Prädisposition aus (Stayoussef M et al., 2009; Qiao et al., 2007; Todd et al., 2007). Neben der MHC-Region wurden bisher > 40 Non-HLA Loki identifiziert, jedoch mit geringerem Effekt (Concannon P et al., 2009, Grant SF et al, 2009). Hierzu zählt beispielsweise das Gen für Insulin INS auf Chromosom 11p15 (Bell GI et al., 1984), PTPN22 auf Chromosom 1p13, welches die lymphoide Tyrosine-Protein Phosphatase Non-Receptor Type 22, ein Suppressor der T-Zell-Aktivierung, kodiert (Bottini N et al., 2004) oder CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte associated-4 auf Chromosom 2q33), eine Genregion für einen T-Zellrezeptor, welcher T-Zell-Apoptose und negative Regulation der T-Zell-Aktivierung vermittelt (Nisticò L et al., 1996). Abbildung 21 im Anhang zeigt eine Veröffentlichung des genetischen Risikos der Loki, dargestellt durch Odds Ratios (Concannon P et al., 2009).

Aufgrund der Hauptprädisposition der HLA-Region und einem mehrfach beschriebenen erhöhten Risiko bzw. Protektion bei Individuen mit bestimmten Haplotypen (Hierarchie von Allelen auf HLA-DRB1 und DQB1 Loki mit DR-DQ Haplotypen) (Erlich H et al., 2008; Barker JM et al., 2008), wurden auch die vorliegenden Ergebnisse auf einen Zusammenhang mit bestimmten Genotypen und auf die Möglichkeit bzw. die Stärke der Modulation von Zytokinen bei den unterschiedlichen Haplotypen/Allelen untersucht. Auch hier wurden zum übersichtlicheren Vergleich die Resultate tabellarisch dargestellt (siehe Anhang).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich bei den Probanden mit dem Genotyp DRB1*0401/0301 mit der Mutante P21 Mu3 eine signifikante Erhöhung der IFN-γ Ausschüttung erreichen ließ, unabhängig ob T1DM-Patienten oder gesunde Kontrollprobanden untersucht wurden. Ebenso verhielten sich die PBMCs der DRB1*0401/1501-Donoren in der IL-6 Produktion auf Stimulation mit P21 Mu3. Die restlichen, oben gezeigten Resultate zeigten keine komplette Übereinstimmung der Ergebnisse bzw. waren nicht signifikant.

P21 Mu3 ist in der Lage, bei gesunden Kontrollen aller Genotypen und bei T1DM-Patienten mit dem Genotyp DRB1*0401/0301 T-Zellen um das 4-fache gegenüber P21 zu stimulieren. Des Weiteren ist P21 Mu3 zumindest für 30% nicht durch Proteasen abbaubar und kann somit die Basis für weitere Peptidmutanten sein. Hierfür müssen lediglich durch Austausch anderer Aminosäuren weitere prAPL hergestellt werden, die eine Aktivierung diabetogener T-Zellen verhindern oder T-regulatorische Zellen fördern. Ferner könnte P21 Mu3 zumindest für die weitere Untersuchung von diabetogenen T-Zellen einsetzt werden, da dieses Peptid T-Zellen um ein vielfaches stimuliert.

Bekannt ist der Zusammenhang zwischen bestimmten Genotypen und dem Risiko der Entwicklung eines T1DM (Schipper RF et al., 2001). Die Resultate des Genotypenvergleichs konnten die Hypothese nicht bestätigen, dass es ebenso eine steigende Korrelation der Immunmodulation bei bestimmten Genotypen gibt. Vielmehr weisen die Ergebnisse auf die bereits vorgeschlagene Coexistenz von genetischen und Umweltfaktoren in der Ätiologie des Diabetes mellitus hin (Belle van TL et al., 2011). Des Weiteren zeigen die Daten erneut die Wichtigkeit der Einbeziehung von weiteren zum Teil eventuell noch unbekannten Faktoren in die Analyse. So konnte bereits gezeigt werden, dass es ein erhöhtes Risiko für Individuen mit einem Hochrisiko-Genotyp gibt, trotzdem aber nur < 10% mit passendem Haplotyp einen manifesten T1DM entwickeln (Knip M and Siljander H, 2008). Dies wirft die Frage auf, ob Umweltfaktoren eine größere Rolle als genetische Grundlagen spielen?!
Im weiteren Verlauf sollte deshalb die individuelle Forschung weiter in den Mittelpunkt treten. Da dies zum momentanen Zeitpunkt nicht möglich ist, sollte mit Kohortenstudien (möglichst gleiche Umweltfaktoren und Expositionen im gleichen Lebensraum) begonnen werden.

Neben Polygenie und einer hohen Mutationsrate trägt v.a. der Polymorphismus zur Vielfalt der MHC Moleküle im Individuum und in der Population bei (Murphy K, 2012; Messaoudi I et al. 2002; Fritz-Niggli H, 1957) und beeinflusst eventuell ebenfalls die Ergebnisse. So kann es bei Patienten mit passendem Haplotyp zur Antigenpräsentation und Stimulation von diabetogenen T-Zellen kommen, während dies bei anderen Personen mit dem gleichen Haplotyp nicht der Fall ist.

Diese Möglichkeit und das eventuelle Auftreten einer Antigenkonkurrenz lassen Spielraum zur Spekulation von bis heute nicht bekannten Mechanismen. So ließ sich bis heute nicht nachweisen, wie es beispielsweise durch mögliche Diabetes-Trigger (Bakterien, Viren oder Parasiten) zu einem paradoxen Schutz vor der Erkrankung T1DM kommen kann (Bach JF, 2001). Auch hier wären weitere Experimente mit PBMCs von Personen verschiedener Herkunft und mit unterschiedlichem Lebensraum wichtig.

4.4. Sequenzvergleich von P21 und P17- Mutanten

Wie bereits oben erwähnt, können die Peptide P21 und P17 eine T-Zellantwort über die TNF-α Sekretion induzieren (Abb. 20, Anhang). Durch Austausch einzelner Aminosäuren von P17 (Abb. 22**,** Anhang) ließ sich eine gesteigerte Ausschüttung von TGF-β1 im T-Zellassay nachweisen (Aalst van D et al., 2010). Der Austausch einer einzigen Aminosäure (Alanin (A) durch Prolin (P)) könnte der erhöhten TGF-β1 Sekretion zuzuordnen sein, welche möglicherweise eine wichtige T-Zellrezeptor Erkennungsstelle darstellt (Burster B and Boehm BO, 2010; Abb. 23, Anhang). In der Veröffentlichung wurden vergleichbare Resultate in der TGF-β1 Ausschüttung nach Austausch einer Aminosäure bei Multiple Sklerose und Myasthenia gravis assoziierten prAPLs erwähnt (Windhagen et al., 1995; Paas-Rozner M et al., 2001). Ebenso wie bei P17 wurde durch Austausch einzelner Aminosäuren, ein auf P21 basierendes prAPL hergestellt. Ein Vergleich der Sequenzen (Abb. 22) zeigt einzelne übereinstimmende Aminosäuren, v.a. auch die Aminosäure Prolin (P) an derselben Stelle des Peptides. Trotzdem ließ sich durch die so entstandene Mutante P21 Mu3 mit der vorhandenen fraglichen TCR Kontaktstelle keine Induktion des antiinflammatorischen Zytokins TGF-β1 bewirken. Ein möglicher Grund könnte der Austausch einer weiteren Aminosäure sein, welche als Erkennungsstelle gedient hat bzw. welche eine wichtige Funktion hatte. Dies zeigt, dass die P17 Mu5 Strategie nicht für alle T-Zellepitope gilt. Alle genannten Daten machen erneut deutlich, wie wichtig jede einzelne Aminosäure an einer bestimmten Peptidstelle sein kann und wie durch Austausch einzelner

Aminosäuren trotz Ähnlichkeit zu anderen Peptiden eine andere, unvorhersehbare Wirkung verursacht werden kann. Deutlich wird hier erneut die Wichtigkeit weiterer Experimente mit neuen Mutanten.

4.5. Schlussfolgerung und Perspektive

Diese Arbeit setzte sich verschiedene Ziele. Die erste Anforderung war die Synthese von proteaseresistenten Peptidliganden, die durch Austausch einzelner Aminosäuren erfolgte und eine längere Halbwertszeit im Blut/Serum aufweisen könnten. Die hergestellten prAPLs mussten zunächst an HLA-DRB1*0401 binden. Nach Zugabe zu bereits isolierten PBMCs von T1DM-Patienten sollten sie in der Lage sein, proinflammatorischen Zytokine TNF-α, IFN-γ, IL-6 und IL-17 zu reduzieren und eventuell die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins TGF-β1 zu erhöhen.

Die Herstellung von prAPL (P21 Mu3) mit einer Stabilität von ca. 30% wurde erreicht (Abb. 11). Dies alleine reicht allerdings nicht aus, da die Bindung an HLA-DRB1*0401 zusätzlich gewährleistet sein muss. Auch dies konnte in dieser Arbeit erfolgreich umgesetzt werden (Abb. 12). Jedoch konnte weder eine Reduktion der proinflammatorischen Zytokine noch eine Induktion des antiinflammatorischen Zytokins TGF-β1 erreicht werden. Interessanterweise und von Bedeutung ist die Tatsache, dass mit der hier verwendeten, zu etwa 30% prAPL P21 Mu3 bei den gesunden Kontrollprobanden eine signifikant vermehrte Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IFN-γ erreicht werden konnte, wenn auch in niedriger Konzentration. IFN-γ stellt ein Zytokin dar, welches neben Eigenschaften wie die Beschränkung der T-Zell Proliferation und die Förderung der Kontraktionsphase von CD8+-T-Zellen vor allem proinflammatorische Wirkungen wie die Induktion der Expression von MHC-Molekülen besitzt (Evaristo C and Alegre ML, 2013; Boehm U et al., 1997). Die Tatsache der verstärkten Ausschüttung dieses Zytokins zeigt, dass die Verwendung von proteaseresistenten Peptidliganden grundsätzlich zur Immunmodulation geeignet ist. Weitere Experimente sind notwendig, um immunmodulatorische Peptide zu generieren. Diese prAPLs zur kompetetiven Rezeptorblokade zur Inhibierung von autoaggressiven T-Zellen zur Protektion von beta-Zellen und T1DM könnten dann mit Vitamin D kombiniert werden, welches Cathepsin G inhibiert (Zou F et al., 2011).

Die unterschiedlichen Ergebnisse, auch in Hinblick auf den Genotypenvergleich machen deutlich, dass noch weitere Forschung auch in Richtung Umweltfaktoren und individuelle Anpassung nötig wäre, was leider noch in weiterer Zukunft liegt, aber nicht außer Acht gelassen werden darf.

5. Zusammenfassung

Proinsulin, ein wichtiges Autoantigen für die Entstehung des Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM), wird von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) aufgenommen und in Lysosomen von Proteasen, den Cathepsinen, gespalten. Die dadurch resultierenden Peptide werden auf Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) II geladen, zur Oberfläche transportiert und dort bestimmten T Helfer Zellen, sogenannte diabetogene T Zellen, präsentiert. Die Aktivierung dieser diabetogenen T-Zellen führt zur Sekretion von Zytokinen, welche mitursächlich für die Zerstörung von ß-Zellen im Pankreas und der Entstehung eines T1DM sind. P21 (QCCTSICSLYQLENYCN), ein Peptid des Proinsulins, ist bereits als ein humanes T-Zell-Epitop beschrieben, welches diabetogene T-Zellen aktiviert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob der spezifische Austausch von Aminosäuren dieses T-Zell-Epitops vor Zerstörung durch Cathepsine schützt. Hergestellt wurden diese veränderten Peptidliganden (APLs), indem potentielle Cathepsin-Schnittstellen durch bestimmte Aminosäuren ausgetauscht wurden. Anschließend wurden die so generierten proteaseresistente APLs (prAPLs) mit Hilfe eines spezifischen T-Zell-Assays getestet, um festzustellen, ob diese prAPLs in der Lage wären, das Zytokinprofil (TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-17, TGF-β1) zu verändern. Dabei wurden periphere mononucleären Zellen des Blutes (PBMCs) von T1DM-, T2DM-Patienten oder gesunden Kontrollprobanden mit verschiedenen prAPLs inkubiert und die Zytokinsekretion über ELISA detektiert. Die Sekretion der Zytokine variierte abhängig von den Donoren, jedoch konnte keine gemeinsame signifikante Veränderung im Zytokinprofil festgestellt werden. Besonders auffallend war, dass eines der prAPLs (P21 Mu3) die Sekretion von IFN-γ von PBMCs der Kontrollprobanden induzierte, welches zumindest für die Aktivierung von diabetogenen T-Zellen und daher zur Untersuchung deren Eigenschaften Verwendung finden könnte. Des Weiteren war P21 Mu3 zu 30 % vor proteolytischem Verdau geschützt und kann somit die Basis für weitere prAPLs dienen.

6. Literaturverzeichnis

1 Aalst van D, Kalbacher H, Palesch D, Zou F, Spyrantis A, Rosinger S, Boehm BO, Burster T (2010): A proinsulin 74-90-derived protease-resistant, altered peptide ligand increases TGF-β1 secretion in PBMC from patients with type 1 diabetes mellitus. J Leukoc Biol 87: 943-948.

2 Ackerman AL, Cresswell P (2004): Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. Nat Immunol 5: 678- 684.

3 Alleva DG, Crowe PD, Jin L, Kwok WW, Ling N, Gottschalk M, Conlon PJ, Gottlieb PA, Putnam AL and Gaur A (2001): A disease-associated cellular immune response in type 1 diabetics to an immunodominant epitope of insulin. J Clin Invest 107: 173- 180.

4 Alleva DG, Gaur A, Jin L, Wegmann D, Gottlieb PA, Pahuja A, Johnson EB, Motheral T, Putnam A, Crowe PD, Ling N, Boehme SA and Conlon PJ (2002): Immunological Characterization and Therapeutic Activity of an Altered-Peptide Ligand, NBI-6024, Based on the Immunodominant Type 1 Diabetes Autoantigen Insulin B-Chain (9-23) Peptide. Diabetes 51: 2126- 2134.

5 Alleva DG, Maki RA, Putnam AL, Robinson JM, Kipnes MS, Dandona P, Marks JB, Simmons DL, Greenbaum CJ, Jimenez RG, Conlon PJ, Gottlieb PA (2006): Immunomodulation in Type 1 Diabetes by NBI-6024, an Altered Peptide Ligand of the Insulin B (9-23) Epitope. Scand J Immunol 63: 59- 69.

6 Atkinson MA, Bowman MA, Kao KJ, Campbell L, Dush PJ, Shah SC, Simell O, Maclaren NK (1993): Lack of immune responsiveness to bovine serum albumin in insulin-dependent diabetes. N Engl J Med 329: 1853- 1858.

7 Bach Jean-Francois (1994): Insulin-Dependent Diabetes Mellitus as an Autoimmune Disease. Endocr Rev, 15: 516- 542.

8 Bach Jean-Francois (2001): Protective Role of Infections and Vaccinations on Autoimmune Diseases. J Autoimmun 16: 347- 353.

9 Baekkeskov S, Kanatsuna T, Klareskog L, Nielsen DA, Peterson PA, Rubenstein AH, Steiner DF, Lernmark A (1981): Expression of major histocompatibility antigens on pancreatic islet cells. Proc Natl Acad Sci U S A 78: 6456- 6460.

10 Barker JM, Triolo TM, Aly TA, Baschal EE, Babu SR, Kretowski A, Rewers MJ, and Eisenbarth GS (2008): Two Single Nucleotide Polymorphismus Identify the Highest-Risk Diabetes HLA Genotype. Diabetes 57: 3152- 3155.

11 Bell GI, Horita S and Karam JH (1984): A Polymorphic Locus Near the Human Insulin Gene Is Associated with Insulin-dependent Diabetes Mellitus. Diabetes 33: 176- 183.

12 Belle van TL, Coppieters KT, Herrath von MG (2011): Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies. Physiol Rev 91: 79- 118.

13 Bielekova B, Goodwin B, Richert N, Cortese I, Kondo T, Afshar G, Gran B, Eaton J, Antel J, Frank JA, McFarland HF and Martin R (2000): Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83- 99) in multiple sclerosis: Results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. Nature Medicine 6: 1167- 1175.

14 Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL and Wiles DC (1987): Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. Nature 329: 506- 512.

15 Blum JS, Wearsch PA and Peter Cresswell (2013): Pathways of Antigen Processing. Annu Rev Immunol 31: 443- 473.

16 Bodington MJ, McNally PG, Burden AC (1994): Cow´s Milk and Type 1 Childhood Diabetes: No Increase in Risk. Diabetic Med 11: 663- 665.

17 Boehm U, Klamp T, Groot M and Howard JC (1997): Cellular responses to interferon-γ. Annu Rev Immunol 15: 749-795.

18 Böhmer K, Keilacker H, Kuglin B, Hübinger A, Bertrams J, Gries FA, Kolb H (1991): Proinsulin autoantibodies are more closely associated with Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus than insulin autoantibodies. Diabetologia 34: 830-834.

19 Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, MacKay EH, Swift PGF, Gamble DR (1985): In Situ Characterization of Autoimmune Phenomena and Expression of HLA Molecules in the Pancreas in Diabetic Insulitis. N Engl J Med 313: 353-360.

20 Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D (1974): Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. Lancet 304: 1279-1283, originally published as 2 (7892).

21 Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, MacMurray J, Meloni GF, Lucarelli P, Pellecchia M, Eisenbarth GS, Comings D and Mustelin T (2004): A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. Nat Genet 36: 337- 338.

22 Bouchard P, Sai P, Reach G, Caubarrère I, Ganeval D and Assan R (1982): Diabetes Mellitus Following Pentamidine-induced Hypoglycemia in Humans. Diabetes 31: 40- 45.

23 Bougneres PF, Carel JC, Castano L, Boitard C, Gardin JP, Landais P, Hors J, Mihatsch MJ, Paillard M, Chaussain JL, Bach JF (1988): Factors Associated with Early Remission of Type I Diabetes in Children Treated with Cyclosporine. N Engl J Med 318: 663- 670.

24 Brenda JB, Haskins K, La Rosa FG and Lafferty KJ (1992): CD8 T Cells Are Not Required for Islet Destruction Induced by a $CD4^+$ Islet-Specific T-Cell Clone. Diabetes 41: 1603- 1608.

25 Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL and Wiley DC (1993): Three- dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. Nature 364: 33- 39.

26 Burgdorf S, Schölz C, Kautz A, Tampé R and Kurts C (2008): Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. Nature Immunol 9: 558- 566.

27 Burster T and Boehm BO (2010): Processing and presentation of (pro)-insulin in the MHC class II pathway: the generation of antigen-based immunomodulators in the context of type 1 diabetes mellitus. Diabetes Metab Res Rev 26: 227- 238.

28 Caillat-Zucman S, Garchon HJ, Timsit J, Assan R, Boitard C, Djilali-Saiah I, Bougnères P and Bach JF (1992): Age-dependent HLA Genetic Heterogeneity of Type 1 Insulin-dependent Diabetes Mellitus. J Clin Invest 90: 2242- 2250.

29 Callen JP, Fowler JF, Kulick KB, Stelzer G, Smith SZ (1985): Neonatal lupus erythematosus occurring in one fraternal twin. Serologic and immunogenetic studies. American College of Rheumatology, Arthritis & Rheumatism 28: 271-275.

30 Campbell IL, Cutri A, Wilkinson D, Boyd AW, and Harrison LC (1989): Intercellular adhesion molecule 1 is induced on isolates endocrine islet cells by cytokines but not by reovirus infection. Proc Natl Acad Sci U S A 86: 4282- 4286.

31 Carroll MC, Campbell D, Bentley DR and Porter RR (1984): A molecular map of the human major histocompatibility complex class III region linking complement genes C4, C2 and factor B. Nature 307: 237- 241.

32 Carroll MC, Campbell RD and Porter RR (1985): Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. Proc Natl Acad Sci U S A 82: 521-525.

33 Carroll MC, Katzman P, Alicot EM, Koller BH, Geraghty DE, Orr HT, Strominger JL and Spies T (1987): Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. Proc Natl Acad Sci U S A 84: 8535- 8539.

34 Catassi C, Guerrieri A, Bartolott E, Coppa GV, Giorgi PL (1987): Antigliadin antibodies at onset of diabetes in children. Lancet 330: 158; originally published as 2 (8551).

35 Chaplin DD, Woods DE, Whitehead AS, Goldberger G, Colten HR, Seidman JG (1983): Molecular map of the murine S region. Proc Natl Acad Sci U S A 80: 6947- 6951.

36 Christau B, Kromann H, Ortved Andersen O, Christy M, Buschard K, Arnung K, Hojland Kristensen I, Peitersen B, Steinrud J, Nerup J (1997): Incidence, Seasonal and Geographical Patterns of Juvenile-Onset Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in Denmark. Diabetologia 13: 281-284.

37 Concannon P, Rich SS and Nepom GT (2009): Genetics of Type 1A Diabetes. N Engl J Med 360: 1646- 1647.

38 Cooke A (2009): Infection and autoimmunity. Blood Cells Mol Dis 42: 105-107.

39 Criswell LA, Pfeiffer KA, Lum RF, Gonzales B, Novitzke J, Kern M, Moser KL, Begovich AB, Carlton VEH, Li W, Lee AT, Ortmann W, Behrens TW, and Gregersen PK (2005): Analysis of Families in the Multiple Autoimmune Disease Genetics Consortium (MADGC): the PTPN22 620W Allele Associates with Multiple Autoimmune Phenotypes. Am J Hum Genet 76: 561- 571.

40 Cudworth AG, White GBB, Woodrow JC, Gamble DR, Lendrum R, Bloom A (1997): Etiology of juvenile-onset diabetes. A Prospective Study. Lancet 309: 385- 388.

41 Dahlquist G, Savilahti E and Landin-Olsson M (1992): An increased level of antibodies to β-lactoglobulin is a risk determinant for early-onset Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus independent of islet cell antibodies and early introduction of cow´s milk. Diabetologia 35: 980- 984.

42 Dausset J et al.(1958): Iso-leuco-anticorps: Acta Haematol (Basel): 20, 156.

43 Dominguez MDC, Lorenzo N, Barbera A, Darrasse-Jeze G, Hernández MV, Torres A, Hernándes I, Gil R, Klatzmann D, Padrón G (2011): An altered peptide ligand corresponding to a novel epitope from heat-shock protein 60 induces regulatory T cells and suppresses pathogenic response in an animal model of adjuvant-induced arthritis. Autoimmunity 44: 471- 482.

44 Durinovic-Belló I, Rosinger S, Olsen JA, Congia M, Ahmad RC, Rickert M, Hampl J, Kalbacher H, Drijfhout JW, Mellins ED, Al Dahouk S, Kamradt T, Maeurer MJ, Nhan C, Roep BO, Boehm BO, Polychronakos C, Nepom GT, Karges W, McDevitt HO, Sonderstrup G (2006): DRB1*0401-restricted human T cell clone specific for the major proinsulin 73-90 epitope expresses a down-regulatory T helper 2 phenotype. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 11683- 11688.

45 Eizirik DL, Colli ML and Ortis F (2009): The role of inflammation in insulitis and β-cell loss in type 1 diabetes. Nat Rev Endocrinol 5: 219- 226.

46 Eisenbarth GS (2010): Banting Lecture 2009: An Unfinished Journey: Molecular Pathogenesis to Prevention of Type 1A Diabetes. Diabetes 59: 759- 774.

47 Elias D, Markovits D, Reshef T, Zee van der R, Cohen IR (1990): Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. Medical Sciences 87: 1576- 1580.

48 ElSemellawy HF, Badr A, Aziem MA (2012): Predicting MHC Class II Epitopes Using Separated Constructive Clustering Ensemble. American Journal of Bioinformatics Research 2: 1-10.

49 Endl J, Rosinger S, Schwarz B, Friedrich S-O, Rothe G, Karges W, Schlosser M, Eiermann T, Schendel DJ and Boehm BO (2006): Coexpression of CD25 and OX40 (CD134) Receptors Delineates Autoreactive T-cells in Type 1 Diabetes. Diabetes 55: 50- 60.

50 Erlich H, Valdes AM, Noble J, Carlson JA, Varney M, Concannon P, Mychaleckyj JC, Todd JA, Bonella P, Fear AL, Lavant E, Louey A, and Moonsamy for the Type 1 Diabetes Genetics Consortium (2008): HLA DR-DQ Haplotypes and Genotypes and Type 1 Diabetes Risk. Diabetes 57: 1084- 1092.

51 Evaristo C and Alegre ML (2013): IFN-γ: The Dr. Jekyll and Mr. Hyde of Immunology? Am J Transplant 13: 3057- 3058

52 Filippi CM and Herrath von MG (2008): Viral Trigger for Type 1 Diabetes Pros and Cons. Diabetes 57: 2863- 2871.

53 Forbes JM and Cooper ME (2013): Mechanisms of Diabetic Complications. Physiol Rev 93: 137- 188.

54 Fritz-Niggli H (1957): Die experimentellen Grundlagen zur Schätzung der Strahlengefährdung der menschlichen Erbmasse. RöFo, 87: 427- 443.

55 Gepts W (1965): Pathologic Anatomy of the Pancreas in Juvenile Diabetes Mellitus. Diabetes 14: 619- 633.

56 Grant SF, Qu HQ, Bradfield JP, Marchand L, Kim CE, Glessner JT, Grabs R, Taback SP, Frackelton EC, Eckert AW, Annaiah K, Lawson ML, Otieno FG, Santa E, Shaner JL, Smith RM, Skraban R, Imielinski M, Chiavacci RM, Grundmeier RW, Stanley CA, Kirsch SE, Waggott D, Paterson AD and Monos DS, DCCT/EDIC Research Group, Polychronakos C and Hakonarson H (2009): Follow-up analysis of genome-wide association data identifies novel loci for type 1 diabetes. Diabetes 58: 290- 295.

57 Halban PA (1991): Structural domains and molecular lifestyles of insulin and its precursors in the pancreatic Beta cell. Diabetologia 34: 767- 778.

58 Hanafusa T, Miyazaki A, Miyagawa J, Tamura S, Inada M, Yamada K, Shinji Y, Katsura H, Yamagate K, Itoh N, Asakawa H, Nakagawa C, Otsuka A, Kawata S, Kono N, Tarui S (1990): Examination of islets in the pancreas biopsy specimens from newly diagnosed Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. Diabetologia 33: 105- 111.

59 Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, Moore CV (1990): Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. 1951. J Lab Clin Med 115: 636-645.

60 Herold G und Mitarbeiter: IX. Endokrinologie, Diabetes Mellitus. In Herold G: Innere Medizin 2009, Gerold Herold, Köln 2009: 672- 699.

61 Hof H und Dörries R (2005): 3.2 Antigenerkennung durch T-Lymphozyten. In: Duale Reihe: Medizinische Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, 3.Auflage: 83-90.

62 Honeyman MC, Coulson BS, Stone NL, Gellert SA, Goldwater PN, Steele CE, Couper JJ, Tait BD, Colman G, Harrison LC (2000): Association Between Rotavirus Infection and Pancreatic Islet Autoimmunity in Children at Risk of Developing Type 1 Diabetes. Diabetes 49: 1319- 1324.

63 Honeyman MC, Stone NL, Harrison LC (1998): T-Cell Epitopes in Type 1 Diabetes Autoantigen Tyrosine Phosphatase IA-2: Potential for Mimicry with Rotavirus and Other Environmental Agents. Mol Med 4: 231- 239.

64 http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1923/ (04.02.2013).

65 http://en.pons.com/translate?q=%CE%B4%CE%B9%CE%B1%CE%B2%CE%AE%CF%84%CE%B7%CF%82+&l=deel&in=&lf=el (04.02.2013)

66 http://en.pons.com/translate?q=mellitus&l=dela&in=&lf=la (04.02.2013)

67 Hunger-Battefeld W, Fath K, Mandecka A, Kiehntopf M, Kloos C, Müller UA, Wolf G (2009): Prävalenz eines polyglandulären Autoimmunsyndroms bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1. Medizinische Klinik 104: 183-91.

68 Hyöty H, Leinikki P, Reunanen A, Ilonen J, Surcel HM, Rilya A, Käär ML, Huupponen T, Hakulinen A, Mäkelä AL (1988): Mumps infections in the etiology of type 1 (insulin-dependent) diabetes. Diabetes Res 9:111- 116.

69 Hyöty H, Taylor KW (2002): The role of viruses in human diabetes. Diabetologia 45: 1353- 1361.

70 Hyppönen E, Läärä E, Reunanen A, Järvelin MR, Virtanen SM (2001): Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. Lancet 358: 1500- 1503.

71 Itoh N, Hanafusa T, Miyazaki A, Miyagawa J, Yamagata K, Yamamoto K, Waguri M, Imagawa A, Tamura S, Inada M, Kawata S, Tarui S, Kono N, and Matsuzawa Y (1993): Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. J Clin Invest 92: 2313- 2322.

72 Jarpe AJ, Hickman MR, Anderson JT, Winter WE and Peck AB (1991): Flow cytometric enumeration of mononuclear cell populations infiltrating the islets of Langerhans in prediabetic NOD mice: development of a model of autoimmune insulitis for type I diabetes. Reg Immunol 3: 305- 317.

73 Kappes D and Strominger JL (1988): Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. Annu Rev Biochem 57: 991- 1028.

74 Karow T und Lang-Roth R: 8.1 Diabetes mellitus. In: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Thomas Karow Verlag (2009) 17. Auflage: 620- 649.

75 Kay TWH, Chaplin HL, Parker JL, Stephens LA and Thomas HE (1997): CD4+ and CD8+ T lymphocytes: clarification of their pathogenic roles in diabetes in the NOD mouse. 70th Forum in Immunology: 320- 327.

76 Kent SC, Chen Y, Bregoli L, Clemmings SM, Kenyon NS, Ricordi C, Hering BJ and Hafler DA (2005): Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. Nature 435: 224- 228.

77 Kerner W (1998): Klassifikation und Diagnose des Diabetes mellitus. Dt Ärztebl 1998; 95: A- 3144-3148.

78 Kim C-Y, Quarsten H, Bergseng E, Khosla C and Sollid LM (2004): Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. Proc Natl Acad Sci USA 101:4175- 4179.

79 Klein J, Bontrop RE, Dawkins RL, Erlich HA, Gyllensten UB, Heise ER, Jones PP, Parham P, Wakeland EK, Watkins DI (1990): Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: a proposal. Immunogenetics 31: 217- 219.

80 Klemetti P, Savilahti E, Ilonen J, Akerblom HK, Vaarala O (1998): T-Cell Reactivity to Wheat Gluten in Patients with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. Scand J Immunol 47: 48- 53.

81 Knip M (2002): Natural Course of Preclinical Type 1 Diabetes. Horm Res 57 (suppl 1): 6- 11.

82 Knip M and Siljander H (2008): Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. Autoimmun Rev 7: 550- 557.

83 Kuglin B, Gries A and Kolb H (1988): Evidence of IgG Autoantibodies Against Human Proinsulin in Patients With IDDM Before Insulin Treatment. Diabetes 37: 130- 132.

84 Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN: Robbins Basic Pathology. Saunders Elsevier (2007) 8th edition: 107-172.

85 Littorin B, Blom P, Schölin A, Arnqvist HJ, Blohmé G, Bolinder J, Ekbom-Schnell A, Eriksson JW, Gudbjörnsdottir S, Nyström L, Östman J, Sundkvist G (2006): Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: results from the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). Diabetologia 49: 2847- 2852.

86 Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC: Biochemie und Pathobiochemie. Springer (2007) 8. Auflage: 1104-1140.

87 Lönnrot M, Korpela K, Knip M, Ilonen J, Simell O, Korhonen S, Savola K, Muona P, Simell T, Koskela P, Hyöty H (2000): Enterovirus Infection as a Risk Factor for β-Cell Autoimmunity in a Prospectively Observes Birth Cohort The Finish Diabetes Prediction and Prevention Study. Diabetes 49: 1314- 1318.

88 Lorenzo Di TP, Peakman M and Roep BO (2007): Translational Mini-Review Series on Type 1 Diabetes: Systemic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes. Clin Exp Immunol 148: 1- 16.

89 Lorenzo N, Barberá A, Dominguez MDC, Torres AM, Hernándes MV, Hernándes I, Gil R, Ancizar J, Garay H, Reyes O, Altruda F, Silengo L, Padrón G (2012): Therapeutic effect of an altered ligand derived from heat-shock protein 60 by suppressing of inflammatory cytokines secretion in two animal models of rheumatoid arthritis. Autoimmunity 45: 449- 459.

90 Ludewig B, Odermatt B, Landmann S, Hengartner H and Zinkernagel RM (1998): Dendritic Cells Induce Autoimmune Diabetes and Maintain Disease via De Novo Formation of Local Lymphoid Tissue. J Exp Med 188: 1493- 1501.

91 MacFarlane AJ, Burghardt KM, Kelly J, Simell T, Simell O, Altosaar I, Scott FW (2003): A Type 1 Diabetes-related Protein from Wheat (Triticum aestivum) cDNA clone of a wheat storage globulin, Glb1, linked to islet damage. J Biol Chem 278: 54- 63.

92 Marjamäki L, Niinistö S, Kenward MG, Uusitalo L, Uusitalo U, Ovaskainen ML, Kronberg-Kippilä C, Simell O, Veijola R, Ilonen J, Knip M, Virtanen SM (2010): Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of advanced beta cell autoimmunity and type 1 diabetes in offspring. Diabetologia 53: 1599-1607.

93 Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R (2005): Vitamin D and diabetes. Diabetologia 48: 1247- 1257.

94 Mathis D, Vence L and Benoist C (2001): β-Cell death during progression to diabetes. Nature 414: 792- 798.

95 Mayer EJ, Hamman RF, Gay EC, Lezotte DC, Savitz DA, Klingensmith GJ (1988): Reduced Risk of IDDM Among Breast-Fed Children The Colorado IDDM Registry. Diabetes 37: 1625- 1632.

96 Medzhitov R, Janeway Jr CA (1997): Innate immunity: impact on the immune response. Curr Opin Immunol 9: 4-9.

97 Mehta D (2005): Lysophosphatidylcholine: an enigmatic lysolipid. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 289: L174- L175.

98 Menser M, Forrest JM, Bransey RD (1978): Rubella infection and diabetes mellitus. Lancet 311 (8055): 57- 60; originally published as 1 (8055).

99 Messaoudi I, Guevara Patino JA, Dyall R, LeMaoult J, Nikolich-Zugich J (2002): Direct Link Between mhc Polymorphism, T Cell Avidity, and Diversity in Immune Defense. Science 298: 1791- 1800.

100 Millner CM and Campbell RD (1990): Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. Immunogenetics 32: 242- 251.

101 Miyazaki A, Hanafusa T, Yamada K, Miyagawa J, Fujino-Kurihara H, Nakajima H, Nonaka K und Tarui S (1985): Predominance of T lymphocytes in pancreatic islets and spleen of pre-diabetic non-obese diabetic (NOD) mice: a longitudinal study. Clin Exp Immunol 60: 622- 630.

102 Müller U, Jongeneel CV, Nedospasov SA, Lindahl KF und Steinmetz M (1987): Tumor necrosis factor and lymphotoxin genes map close to H-2D in the mouse major histocompatibility complex. Nature 325: 265- 267.

103 Murphy K (2012): Immunobiology, 8th Edition, Garland Science: 217- 234

104 Neufeld M, Maclaren N, and Blizzard R (1980): Autoimmune Polyglandular Syndromes. Pediatr Ann 9: 43- 53.

105 Nisticò L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C, Bosi E, Martinez Larrad MT, Rios MS, Chow CC, Cockram CS, Jacobs K, Mijovic C, Bain SC, Barnett AH, Vandewalle CL, Schuit F, Gorus FK, Belgian Diabetes Registry, Tosi R, Pozzilli P and Todd JA (1996): The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Hum Mol Genet 5: 1075- 1080.

106 Nonaka M, Takahashi M and Sasaki M (1994): Molecular Cloning of a Lamprey Homologue of the Mammalian MHC Class III Gene, Complement Factor B. J Immunol 152: 2263- 2269.

107 Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D (1990): RAG-1 and RAG-2, Adjacent Genes That Synergistically Activate V(D)J Recombination. Science, New Series 248 (4962): 1517- 1523.

108 Oikarinen S, Tauriainen S, Hober D, Lucas B, Vazeou A, Sioofy-Khojine A, Bozas E, Muir P, Honkanen H, Ilonen J, Knip M, Keskinen P, Saha MT, Huhtala H, Stanway G, Bartsocas C, Ludvigsson J, Taylor K, Hyöty K and the VirDiab Study Group (2014): Virus Antibody Survey in Different European Populations Indicates Risk Association Between Coxsackievirus B1 and Type 1 Diabetes. Diabetes, 63: 446-455.

109 Orešič M, Simell S,Sysi-Aho M,Näntö-Salonen K, Seppänen-Laakso T, Parikka V, Katajamaa M, Hekkala A, Mattila I, Keskinen P, Yetukuri L, Reinikainen A, Lähde J, Suortti T, Hakalax J, Simell T, Hyöty H, Veijola R, Ilonen J, Lahesmaa R, Knip M and Simell O (2008): Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes islet autoimmunity in children who later progress to type 1 diabetes. J Exp Med, 205: 2975- 2984

110 Paas-Rozner M, Sela M and Mozes E (2001): The nature of the active suppression of responses associated with experimental autoimmune myasthenia gravis by a dual altered peptide ligand administered by different routes. Proc Natl Acad Sci USA 98: 12642- 12647.

111 Pak CY, McArthur RG, Eun HM, Yoon JW (1988): Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. Lancet 332: 1-4; originally published as 2 (8601).

112 Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL (1983): Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. Science 222: 1337-1339.

113 Parr EL (1979): The absence of H-2 antigens from mouse pancreatic β-cells demonstrated by immunoferritin labeling. J Exp Med 150: 1- 9.

114 Perelman AH, Clemons RD (1992): The Fetus in Maternal Hyperthyroidism. Thyroid 2: 225- 228.

115 Pham MN, Hawa MI, Pfleger C, Roden M, Schernthaner G, Pozzilli P, Buzzetti R, Scherbaum W, Seissler J, Kolb H, Hunter S, Leslie RDG, Schloot NC (2011): Pro- and anti-inflammatory cytokines in latent autoimmune diabetes in adults, type 1 and type 2 diabetes patients: Action LADA 4. Diabetologia 54: 1630-1638.

116 Pietschmann P, Willheim M, Peterlik M (2003): Bedeutung von Vitamin D im Immunsystem. Journal für Mineralstoffwechsel 10: 13-15.

117 Pliska V, Folkers G, Eberle AN (2005): Insulin – eine Erfolgsgeschichte der modernen Medizin. BioFokus, Forschung für Leben, Mitteilungsblatt Nr. 69.

118 Pujol-Borrell R, Todd I, Doshi M, Bottazzo GF, Sutton R, Gray D, Adolf GR, Feldmann M (1987): HLA class II induction in human islet cells by interferon-γ plus tumor necrosis factor or lymphotoxin. Nature 326: 304- 306.

119 Qiao Q, Österholm AM, He B, Pitkäniemi J, Cordell HJ, Sarti C, Kinnunen L, Tuomilehto-Wolf E, Tryggvason K and Tuomilehto J (2007): A genome-wide scan for type I diabetes susceptibility genes in nuclear families with mulitple affected siblings in Finland. BMC Genetics 8: 1-9.

120 Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Sorensen O, Bleackley RC and Power RF (1995): IFN-gamma gene expression in pancreatic islet-infiltrating mononuclear cells correlates with autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. J Immunol 154: 4874-4882.

121 Redgrove KA and McLaughlin (2014): The role of the immune response in Chlamydia trachomatis infection of the male genital tract: a double-edged sword. Front. Immunol. 5: 1-22.

122 Rink L, Kruse A, Haase H (2012): Das angeborene Immunsystem. Immunologie für Einsteiger, 2012: 39- 58.

123 Roep BO (2003): The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: From cause to cure. Diabetologia 46: 305- 321.

124 Roep BO, Arden SD, Vries de RRP and Hutton JC (1990): T-cell clones from a type-1 diabetes patient respond to insulin secretory granule proteins. Nature 345: 632- 634.

125 Rood van JJ, Leeuwen van A (1963): Leukocyte grouping, a method and its application. J Clin Invest 42: 1382- 1390.

126 Rose NR, Bona C (1993): Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky´s postulates revisited). Immunol Today 14: 426- 430.

127 Rotter JI, Anderson CE, Rubin R, Congleton JE, Terasaki PI and Rimoin DL (1983): HLA Genotypic Study of Insulin-dependent Diabetes The Excess of DR3/DR4 Heterozygotes Allows Rejection of the Recessive Hypothesis. Diabetes 32: 169- 174.

128 Rudy G, Stone N, Harrison LC, Colman PG, McNair P, Brusic V, French MB, Honeyman MC, Tait B, Lew AM (1995): Similar Peptides from Two β Cell Autoantigens, Proinsulin and Glutamic Acid Decarboxylase, Stimulate T Cells of Individuals at Risk for Insulin-Dependent Diabetes. Mol Med 1: 625-633.

129 Schipper RF, Koeleman BPC, Bruining GJ, Schreuder GMTh, Verduijn W, Vries de RRP, Roep BO (2001): HLA class II associations with Type 1 diabetes mellitus: a multivariate approach. Tissue Antigens 57: 144- 150.

130 Sechi LA, Paccagnini D, Salza S, Pacifice, Ahmed N and Zanetti S (2008): Mycobacterium avium Subspecies paratuberculosis Bacteremia in Type 1 Diabetes Mellitus: An infectious Trigger? Clin Infect Dis 46: 148- 149.

131 Sechi LA, Rosu V, Pacifico A, Fadda G, Ahmed N and Zanetti S (2008): Humoral Immune Responses of Type 1 Diabetes Patients to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Lend Support to the Infectious Trigger Hypothesis. Clin Vaccine Immunol 15: 320- 326.

132 Serreze DV, Chapman HD, Varnum DS, Hanson MS, Reifsnyder PC, Richard SD, Fleming SA, Leiter EH and Shultz L (1996): B Lymphocytes Are Essential for the Initiation of T Cell-mediated Autoimmune Diabetes: Analysis of a New "Speed Congenic" Stock of NOD.Igμ^{null} Mice. J Exp Med 184: 2049- 2053.

133 Simpson M, Brady H, Yin X, Seifert J, Barriga K, Hoffman M, Bugawan T, Barón AE, Sokol RJ, Eisenbarth G, Erlich H, Rewers M, Norris JM (2011): No association of vitamin D intake or 25-hydroxyvitamin D levels in childhood with risk of islet autoimmunity and type 1 diabetes: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). Diabetologia 54: 2779-2788.

134 Surwit RS, Schneider MS, Feinglos MN (1992): Stress and Diabetes Mellitus. Diabetes Care 15: 1413- 1422.

135 Stayoussef M, Benmansour J, Al-Irhayim AQ, Said HB, Rayana CB, Mahjoub T, and Almawi WY (2009): Autoimmune Type 1 Diabetes Genetic Susceptibility Encoded by Human Leukocyte Antigen DRB1 and DQB1 Genes in Tunisia. Clin Vaccine Immunol 16: 1146- 1150.

136 Steck AK and Rewers MJ (2011): Genetics of Type 1 Diabetes. Clinical Chemistry 57: 176- 185.

137 Thomas HE, Parker JL, Schreiber RD, and Kay TWH (1998): IFN-γ Action on Pancreatic Beta Cells Causes Class I MHC Upregulation but Not Diabetes. J Clin Invest 102: 1249- 1257.

138 Tisch R and McDevitt H (1996): Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. Cell 85: 291- 297.

139 Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, Bailey R, Nejentsev S, Field SF, Payne F, Lowe CE, Szeszko JS, Hafler JP, Zeitels L, Yang JHM Vella A, Nutland S, Stevens HE, Schuilenburg H, Coleman G, Maisuria M, Meadows W, Smink LJ, Healy B, Burren OS, Lam AAC, Ovington NR, Allen J, Adlem E, Leung HT, Wallace C, Howson JMM, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, GET1FIN, Simmonds MJ, Heward JM, Gough SCL, The Welcome Trust Case Control Consortium, Dunger DB, Wicker LS and Clayton DG (2007): Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. Nat Genet 39: 857- 864.

140 Wang B, André I, Gonzalez A, Katz JD, Aguet M, Benoist C and Mathis D (1997): Interferon-γ impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 13844- 13849.

141 Walter M, Philotheou A, Bonnici F, Ziegler A-G, Jimenez R (2009): No Effect of the Altered Peptide Ligand NBI-6024 on β-Cell Residual Function and Insulin Needs in New-Onset Type 1 Diabetes. Diabetes Care 32: 2036- 2040.

142 Wang Y, Pontesilli O, Gill RG, La Rosa FG and Lafferty KJ (1991): The role of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in the destruction of islet grafts by spontaneously diabetic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 527- 531.

143 Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, Rewers M, Eisenbarth GS, Jensen J, Davidson HW and Hutton JC (2007): The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 17040- 17045.

144 White PC, New MI and Dupont B (1985): Adrenal 21-Hydroxylase Cytochrome P-450 Genes within the MHC Class III Region. Immunol Rev 87: 123- 150.

145 Wicker LS, Leiter EH, Todd JA, Renjilian RJ, Peterson E, Fischer PA, Podolin PL, Zijlstra M, Jaenisch R and Peterson LB (1994): β2-Microglobulin-Deficient NOD Mice Do Not Develop Insulitis or Diabetes. Diabetes 43: 500- 504.

146 Wicker LS, Miller BJ and Mullen Y (1986): Transfer of Autoimmune Diabetes Mellitus With Splenocytes From Nonobese Diabetic (NOD) Mice. Diabetes 35: 855- 860.

147 Windhagen A, Schooz C, Höllsberg P, Fukaura H, Sette A, Hafler DA (1995): Modulation of cytokine patterns of human autoreactive T cell clones by a single amino acid substitution of their peptide ligand. Immunity 2: 373- 380.

148 Wolf E, Spencer KM and Cudworth AG (1983): The Genetic Susceptibility to Type 1 (Insulin-Dependent) Diabetes: Analysis of the HLA-DR Association. Diabetologia 24: 224- 230.

149 Wong FS and Janeway CA (1997): The role of CD4 and CD8 T cells in type I diabetes in the NOD mouse. 70^{th} Forum in Immunology: 327- 332.

150 Yagi H, Matsumoto M, Kunimoto K, Kawaguchi J, Makino S, Harada M (1992): Analysis of the roles of CD4+ and CD8+ T cells in autoimmune diabetes of NOD mice using transfer to NOD athymic nude mice. Eur J Immunol 22: 2387- 2393.

151 Zhang L and Eisenbarth GS (2011): Prediction and prevention of Type 1 diabetes mellitus. J Diabetes 3: 48- 57.

152 Zinkernagel RM and Doherty PC (1974): Immunological surveillance against altered self components by sensitized T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. Nature 251: 547- 548.

153 Zinkernagel RM and Doherty PC (1974): Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngenic and semiallogeneic system. Nature 248: 701-702.

154 Zou F, Schäfer N, Palesch D, Brücken R, Beck A, Sienczyk M, Kalbacher H, Sun Z, Boehm BO, Burster T (2011): Regulation of Cathepsin G Reduces the Activation of Proinsulin-Reactive T-Cells from Type 1 Diabetes Patients. PLOS ONE 6: 1-10.

Anhang

TNF-α Sekretion durch P17 und P21

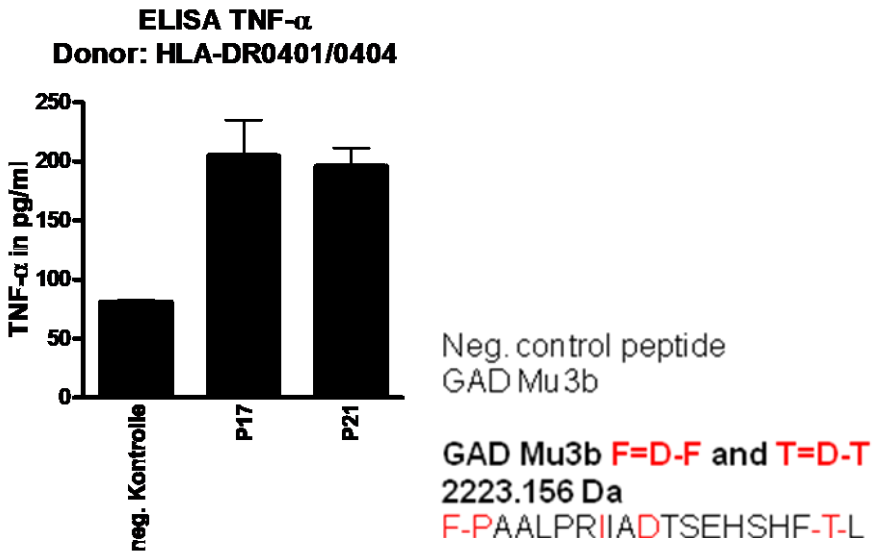


Abbildung 20: Die T-Zell Epitope P17 und P21 aktivieren T Zellen zur TNF-α Sekretion. Als Negativkontrolle diente GAD Mu3b. Rote Aminosäuren = ausgetauschte Aminosäuren. Abkürzungen: GAD = Glutaminsäure-Decarboxylase

Genetisches Risiko verschiedener Loki

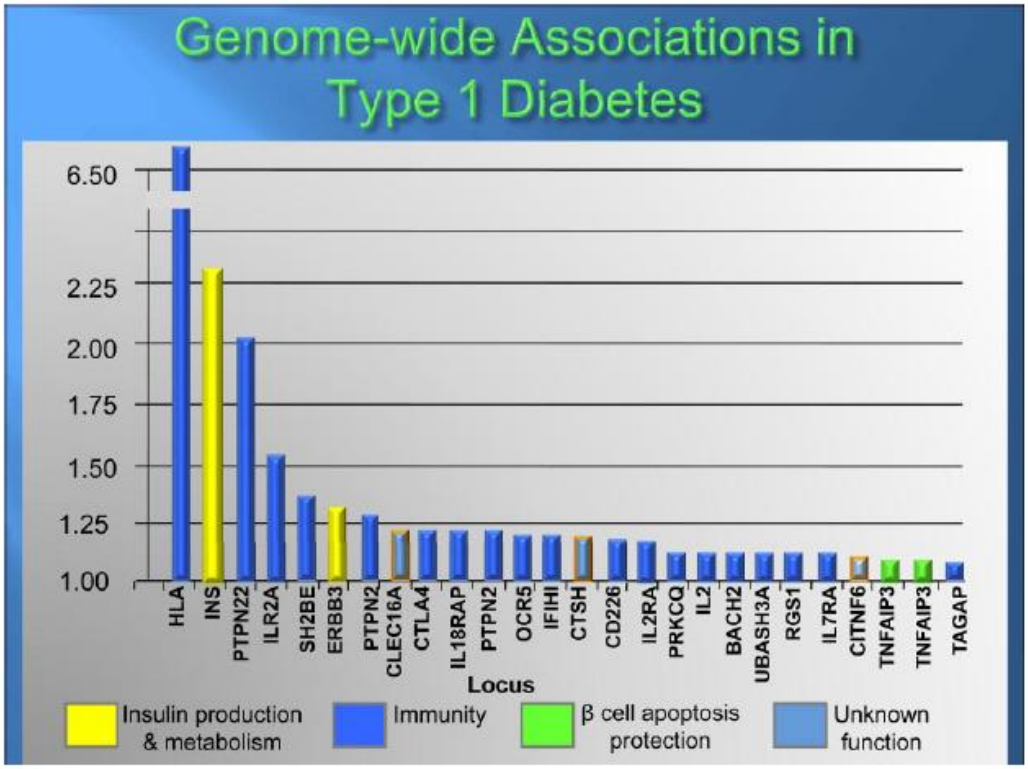


Abbildung 21: Ergebnisse von genome wide association studies in T1DM. Modifiziert und neu herausgegeben von Eisenbarth GS 2010, nach Genehmigung des New England Journal of Medicine 2009; 360: 1646- 1654.

American Diabetes Association, Banting Lecture 2009: An Unfinished Journey: Molecular Pathogenesis to Prevention of Type 1A Diabetes, American Diabetes Association, 2010. Copyright and all rights reserved. Material from this publication has been used with the permission of American Diabetes Association.

Zusammenfassung der signifikanten Ergebnisse

T1DM-Patienten

Tabelle 3: Zusammenfassung der signifikanten Ergebnisse der T1DM-Patienten 458A, 482A, 693A, 871A und 875A.

Donor	Mutante	TNF-α	IFN-γ	IL-6	IL-17	TGF-β1
458A	P21+Mu1					
	P21+Mu2		↑			
	P21+Mu3		↑	↑	↑	
482A	P21+Mu1		↓		↓	↓
	P21+Mu2			↓	↓	
	P21+Mu3		↑	↑	↑	
693A	P21+Mu1					
	P21+Mu2	↓	↑	↓		
	P21+Mu3	↑	↑	↑		
871A	P21+Mu1	↓			↓	
	P21+Mu2	↓			↓	
	P21+Mu3				↓	
875A	P21+Mu1	↓		↑		
	P21+Mu2			↑		
	P21+Mu3	↓		↑	↑	

T2DM-Patient

Tabelle 4: Zusammenfassung der signifikanten Ergebnisse des T2DM-Patienten 460A.

Donor	Mutante	TNF-α	IFN-γ	IL-6	IL-17	TGF-β1
460A	P21+Mu1		↓	↓	↓	
	P21+Mu2		↓			
	P21+Mu3			↑		

Kontrollgruppe

Tabelle 5: Zusammenfassung der signifikanten Ergebnisse der gesunden Probanden 867A, 879A, 881A und 891A.

Donor	Mutante	TNF-α	IFN-γ	IL-6	IL-17	TGF-β1
867A	P21+Mu1					
	P21+Mu2	↑				
	P21+Mu3	↑		↑		
879A	P21+Mu1					
	P21+Mu2	↑		↑		
	P21+Mu3				↑	
881A	P21+Mu1					
	P21+Mu2		↑			
	P21+Mu3		↑	↑		
891A	P21+Mu1			↓		
	P21+Mu2		↑	↓		
	P21+Mu3		↑	↓		

Ergebnisse im Genotypenvergleich

TNF-α

Tabelle 6: Genotypenvergleich von T1DM-, T2DM- und Kontrolldonoren im TNF-α spezifischen ELISA. Abkürzungen: n.s.= nicht signifikant, *= signifikant, **= sehr signifikant, ***= hoch signifikant, ↓= Hemmung, ↑= Induktion, k.D.= keine Daten vorhanden

DRB1*0401/1501		P21 vs P21+Mu1	P21 vs P21+Mu2	P21 vs P21+Mu3
T1DM-Patient	Donor 458A	k.D.	k.D.	k.D.
Kontrolle	Donor 867A	n.s.	** (↑)	*** (↑)

DRB1*0401/0301		P21 vs P21+Mu1	P21 vs P21+Mu2	P21 vs P21+Mu3
T1DM-Patient	Donor 482A	n.s.	n.s.	n.s.
Kontrolle	Donor 881A	k.D.	k.D.	k.D.
Kontrolle	Donor 891A	k.D.	k.D.	k.D.

DRB1*0401/1301		P21 vs P21+Mu1	P21 vs P21+Mu2	P21 vs P21+Mu3
T1DM-Patient	Donor 693A	n.s.	* (↓)	* (↑)
T2DM-Patient	Donor 460A	n.s.	n.s.	n.s.
Kontrolle	Donor 879A	n.s.	* (↑)	n.s.

IFN-γ

Tabelle 7: Genotypenvergleich von T1DM-, T2DM- und Kontrolldonoren im IFN-γ spezifischen ELISA. Abkürzungen: n.s.= nicht signifikant, *= signifikant, **= sehr signifikant, ***= hoch signifikant, ↓= Hemmung, ↑= Induktion, k.D.= keine Daten vorhanden

DRB1*0401/1501		P21 vs P21+Mu1	P21 vs P21+Mu2	P21 vs P21+Mu3
T1DM-Patient	Donor 458A	n.s.	* (↑)	*** (↑)
Kontrolle	Donor 867A	k.D.	k.D.	k.D.

DRB1*0401/0301		P21 vs P21+Mu1	P21 vs P21+Mu2	P21 vs P21+Mu3
T1DM-Patient	Donor 482A	** (↓)	n.s.	** (↑)
Kontrolle	Donor 881A	n.s.	* (↑)	*** (↑)
Kontrolle	Donor 891A	k.D.	*** (↑)	*** (↑)

DRB1*0401/1301		P21 vs P21+Mu1	P21 vs P21+Mu2	P21 vs P21+Mu3
T1DM-Patient	Donor 693A	n.s.	** (↑)	*** (↑)
T2DM-Patient	Donor 460A	* (↓)	* (↓)	n.s.
Kontrolle	Donor 879A	n.s.	n.s.	n.s.

IL-6

Tabelle 8: Genotypenvergleich von T1DM-, T2DM- und Kontrolldonoren im IL-6 spezifischen ELISA. Abkürzungen: n.s.= nicht signifikant, *= signifikant, **= sehr signifikant, ***= hoch signifikant, ↓= Hemmung, ↑= Induktion

DRB1*0401/1501		P21 vs P21+Mu1	P21 vs P21+Mu2	P21 vs P21+Mu3
T1DM-Patient	Donor 458A	n.s.	n.s.	*** (↑)
Kontrolle	Donor 867A	n.s.	n.s.	* (↑)

DRB1*0401/0301		P21 vs P21+Mu1	P21 vs P21+Mu2	P21 vs P21+Mu3
T1DM-Patient	Donor 482A	n.s.	** (↓)	* (↑)
Kontrolle	Donor 881A	n.s.	n.s.	* (↑)
Kontrolle	Donor 891A	** (↓)	* (↓)	* (↓)

DRB1*0401/1301		P21 vs P21+Mu1	P21 vs P21+Mu2	P21 vs P21+Mu3
T1DM-Patient	Donor 693A	n.s.	* (↓)	* (↑)
T2DM-Patient	Donor 460A	** (↓)	n.s.	** (↑)
Kontrolle	Donor 879A	n.s.	* (↑)	n.s.

IL-17

Tabelle 9: Genotypenvergleich von T1DM-, T2DM- und Kontrolldonoren im IL-17 spezifischen ELISA. Abkürzungen: n.s.= nicht signifikant, *= signifikant, **= sehr signifikant, ***= hoch signifikant, ↓= Hemmung, ↑= Induktion, k.D.= keine Daten vorhanden

DRB1*0401/1501		P21 vs P21+Mu1	P21 vs P21+Mu2	P21 vs P21+Mu3
T1DM-Patient	Donor 458A	k.D.	n.s.	*** (↑)
Kontrolle	Donor 867A	n.s.	n.s.	n.s.

DRB1*0401/0301		P21 vs P21+Mu1	P21 vs P21+Mu2	P21 vs P21+Mu3
T1DM-Patient	Donor 482A	* (↓)	* (↓)	** (↑)
Kontrolle	Donor 881A	k.D.	k.D.	k.D.
Kontrolle	Donor 891A	k.D.	k.D.	k.D.

DRB1*0401/1301		P21 vs P21+Mu1	P21 vs P21+Mu2	P21 vs P21+Mu3
T1DM-Patient	Donor 693A	n.s.	n.s.	n.s.
T2DM-Patient	Donor 460A	** (↓)	n.s.	n.s.
Kontrolle	Donor 879A	n.s.	n.s.	* (↑)

TGF-β1

Tabelle 10: Genotypenvergleich von T1DM-, T2DM- und Kontrolldonoren im TGF-β1 spezifischen ELISA. Abkürzungen: n.s.= nicht signifikant, **= sehr signifikant, ↓= Hemmung

DRB1*0401/1501		P21 vs P21+Mu1	P21 vs P21+Mu2	P21 vs P21+Mu3
T1DM-Patient	Donor 458A	n.s.	n.s.	n.s.
Kontrolle	Donor 867A	n.s.	n.s.	n.s.

DRB1*0401/0301		P21 vs P21+Mu1	P21 vs P21+Mu2	P21 vs P21+Mu3
T1DM-Patient	Donor 482A	** (↓)	n.s.	n.s.
Kontrolle	Donor 881A	n.s.	n.s.	n.s.
Kontrolle	Donor 891A	n.s.	n.s.	n.s.

DRB1*0401/1301		P21 vs P21+Mu1	P21 vs P21+Mu2	P21 vs P21+Mu3
T1DM-Patient	Donor 693A	n.s.	n.s.	n.s.
T2DM-Patient	Donor 460A	n.s.	n.s.	n.s.
Kontrolle	Donor 879A	n.s.	n.s.	n.s.

Sequenzvergleich von P21 und P17- Mutanten

P17	A	G	S	L	Q	P	L	A	L	E	G	S	L	Q	K		R	G
P17 Mu5	A	**P**	S	L	Q	**P**	**I**	**P**	L	E	P	S	**L**	A	K		**$_{D}$T**	G
P21	Q	C	C	T		S	I	C	S	L	Y	Q	L	E	N	Y	C	N
P21 Mu3	Q	**P**	C	T		**P**	**I**	**P**	S	A	T	Q	**L**	E	N	Y	**$_{D}$T**	N

Abbildung 22: Aminosäuresequenz von P21- und P17-Peptiden und deren Mutanten. Fett: übereinstimmende Aminosäuresequenz der Mutanten, rot: ausgetauschte Aminosäuren.

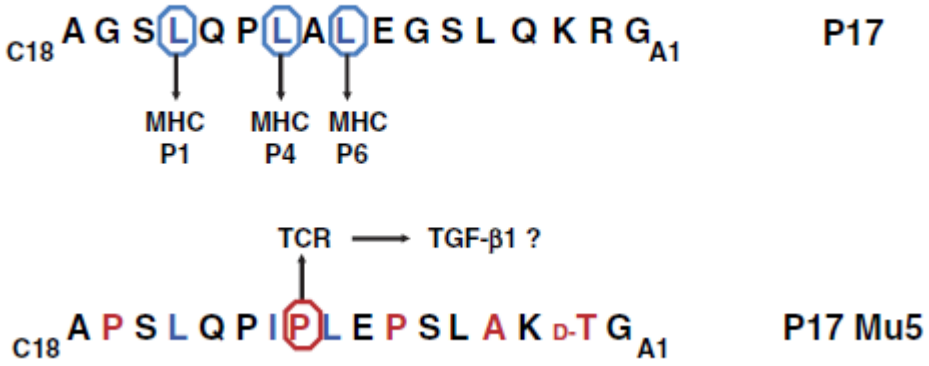


Abbildung 23: Aminosäuresequenz von P17 und dem darauf basierten prAPL P17 Mu5. Blaue Kreise: MHC Klasse II Bindungsstellen, roter Kreis: TCR Kontaktstelle.
Aus Burster T and Boehm BO, Diabetes Metab Res Rev, Processing and presentation of (pro)-insulin in the MHC class II pathway: the generation of antigen-based immunomodulators in the context of type 1 diabetes mellitus, 2010, 26: 227-238. Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Danksagung

Großer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Timo Burster für die tolle Betreuung, die viele konstruktive Kritik und dafür, dass er immer erreichbar war.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei dem ganzen Team der Inneren Medizin I unter Leitung von Prof. Dr. Böhm für die Unterstützung im Labor.

Ein ganz großer Dank an meine Mutter Christa Mochar für die Unterstützung, nicht nur finanziell sondern auch emotional. Danke, dass du mich immer unterstützt, motiviert und aufgebaut hast, wenn es einmal nicht wie gewollt lief und dafür, dass du immer für mich da bist.

Außerdem danke ich meinem kleinen Bruder Patrick für die Beratung, die Hilfe und die Beantwortung meiner Fragen, wenn der Laptop einmal wieder etwas anderes wollte als ich.

Ein weiterer Dank gilt meinen Großeltern Gertrud und Rolf Eppler für die finanzielle Unterstützung und meinem Freund Steffen für alles, was er während meines Studiums und meiner Doktorarbeit für mich getan hat.

Ich danke euch allen!

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.