

**Aus der Deutschen Diabetes-Klinik des Deutschen Diabetes Zentrum
-Leibniz-Institut-
an der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf**

Direktor: Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum

**Die Rolle von Zytokinen und Chemokinen in der
Prädiktion des Diabetes mellitus Typ 1**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktor der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Simon J.W. Schimmack

2007

* * *

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.: Prof. Dr. Nürnberg

Dekan

Referent:

PD Dr. Schloot

Korreferent:

Prof. Dr. Pfeffer

* * *

Meinen Eltern

1	DIABETES MELLITUS	7
<hr/>		
1.1	EINLEITUNG	7
1.2	EINTEILUNG	7
1.3	DIABETES MELLITUS TYP 1	8
1.3.1	EPIDEMIOLOGIE	8
1.3.2	ÄTIOLOGIE	8
1.3.3	PATHOGENESE	9
1.3.4	ZYTOKINE UND CHEMOKINE	10
1.3.4.1	Interleukin-13	11
1.3.4.2	Interleukin-8	13
1.3.4.3	Macrophage inflammatory protein-1 α	15
1.3.4.4	Macrophage Migration Inhibition Faktor	16
1.3.5	KLINISCHE VERLAUFSPHASEN DES DIABETES MELLITUS TYP 1	18
1.3.6	DIAGNOSTIK	19
1.3.7	THERAPIE DES DIABETES MELLITUS TYP 1	20
1.3.8	FOLGEN UND PROGNOSE DES DIABETES MELLITUS TYP 1	21
1.3.9	PRÄVENTIONSSTUDIEN BEI DIABETES MELLITUS TYP 1	23
1.4	NIKOTINAMID	24
1.5	ZIELE DER VORGELEGTEN ARBEIT	26
2	MATERIALIEN UND METHODEN	27
<hr/>		
2.1	MATERIALIEN	27
2.1.1	GERÄTE UND PIPETTEN	27
2.1.2	GEFÄßE	28
2.1.3	EINMALMATERIALIEN	28
2.1.4	CHEMIKALIEN	28
2.1.5	LÖSUNGEN	29
2.1.5.1	Waschpuffer	29
2.1.5.1.1	0,2 M Phosphate Buffered Saline (PBS)	29
2.1.5.1.2	0,2 M Phosphate Buffered Saline (PBS)	30
2.1.5.1.3	0,2 M Phosphate Buffered Saline 0.005%Tween 20 (PBS-Tween)	30
2.1.5.2	Coating Puffer	30
2.1.5.2.1	0,1 M Natriumcarbonat pH 9,6 (Coating Puffer 1)	30
2.1.5.2.2	0,2 M Natriumphosphat pH 6,5 (Coating Puffer 2)	30
2.1.5.3	Blocker-Lösung	31
2.1.5.3.1	Blocker-Puffer (CLB)	31
2.1.5.4	Verdünnungslösungen	31
2.1.5.4.1	Fötale Kälberserum-10% -PBS (FCS-PBS 10%)	31
2.1.5.4.2	Milchpulver-PBS (0,5%)	31

2.1.5.4.3	Verdünnungslösung von CLB (20%)	31
2.1.5.4.4	Stopp-Lösung 1,8 N Schwefelsäure	31
2.1.6	ANTIKÖRPER	32
2.1.7	STANDARDS	32
2.1.8	ELISA KITS	32
2.2	METHODEN	33
2.2.1	STUDIENDESIGN DES EUROPEAN NICOTINAMIDE DIABETES INTERVENTION TRIAL	33
2.2.1.1	Ein- und Ausschlusskriterien der Studienteilnehmer für ENDIT	33
2.2.1.2	Durchgeführte Tests an ENDIT-Teilnehmern	34
2.2.1.3	Probanden der ENDIT-Studie	35
2.2.1.4	Probandenkollektiv dieser Arbeit	35
2.2.2	ALIQOTIERUNG UND LAGERUNG DER SERUMPROBEN	36
2.2.3	ELISA-VERFAHREN	37
2.2.3.1	Allgemeine Grundlagen	37
2.2.3.2	Arbeitsprotokoll zur Messung von IL- 8, IL- 13, MIP-1 α und MIF	38
2.2.3.3	Arbeitsprotokoll zur Messung von TNF- α , TNF-R1, IL-1-RA, IL-1 β , IL-1-R1 und IA2A	42
2.2.4	QUALITÄTSSICHERUNG	43
2.2.4.1	falsch positiv kalkulierte Werte	43
2.2.4.2	falsch negativ kalkulierte Werte	44
2.2.4.3	Kontrollen und Statistik	45
3	ERGEBNISSE	47
3.1	UNTERSUCHUNGEN ZUM ZEITPUNKT VOR EINNAHME VON NIKOTINAMID (PRÄDIKTIVER WERT, T1)	47
3.1.1	VERGLEICH ZWISCHEN DER NIKOTINAMID- UND PLAZEBO-GRUPPE	47
3.1.2	VERGLEICH ZWISCHEN SPÄTEREN DIABETIKERN UND NICHT-DIABETIKERN	49
3.2	LONGITUDINALE VERLÄUFE DER ZYTOKIN- UND CHEMOKINSPIEGEL	50
3.2.1	ZYTOKINE UND CHEMOKINE	50
3.2.1.1	MIP-1 α	51
3.2.1.2	IL-8	52
3.2.1.3	IL-13	50
3.2.1.4	MIF	51
3.2.1.5	Der longitudinale Verlauf der Zytokin- und Chemokinspiegel -synchronisiert vor Manifestation des Diabetes mellitus Typ 1	54 54
3.2.2	ANTIKÖRPER	56
3.3	SONSTIGE ANALYSEN	57
3.3.1	ALTERS- UND GESCHLECHTSVERTEILUNG DER DIABETESENTWICKLUNG	57
3.3.2	EINFLUSS VON ALTER UND GESCHLECHT AUF IMMUNMEDIATOREN	58
3.3.3	ASSOZIATION DER IMMUNMARKER MIT DER INSULINPRODUKTION	59
3.3.4	ASSOZIATION VON KRANKHEIT UND IMMUNMARKERN MIT GENETISCHER DISPOSITION	60

4 DISKUSSION	61
4.1 SERUMMARKERKONZENTRATIONEN ZU STUDIENBEGINN	64
4.2 VERLAUFSANALYSEN	67
4.3 GENETIK	68
4.4 ZUSAMMENFASSUNG	69
LITERATURANGABEN	70
LEBENS LAUF	91
DANKSAGUNG	92

Abkürzungsverzeichnis:

BB	bio breeding
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ENDIT	European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial
FCS	foetal calf serum
HLA	human leucocyte antigen
IA2A	insulinoma associated antigen 2 antibody
IAA	insulin autoantibody
ICA	islet cell antibody
IL	Interleukin
kDA	kilo Dalton
MIF	macrophage migration inhibition factor
MIP	macrophage inflammatory protein
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	non obese Diabetes
PARP	poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	phosphate buffered saline
STZ	Streptozotoin
TNF	tumor necrosis factor
WHO	World Health Organisation

1 Diabetes mellitus

1.1 Einleitung

Der Diabetes mellitus, dessen Symptome erstmals in dem ägyptischen Papyrus Ebers 1550 v. Chr. Erwähnung fanden, ist eine chronische Störung des Kohlenhydratstoffwechsels, die mindestens 5 % der europäischen Bevölkerung betrifft und nüchtern und postprandial zu Hyperglykämie und Glukosurie führt. Letzteres verdankt die Krankheit seinen Namen „durchfließen mit Honig gesüßt“.

1.2 Einteilung

Vor zehn Jahren wurde von der ADA (American Diabetes Association) (ADA 1997), der WHO (World Health Organisation) (Alberti & Zimmet 1998) und 2001 von der DDG (Deutschen Diabetes Gesellschaft) eine Einteilung aufgrund neuerer Erkenntnisse über die Ätiologie veröffentlicht (Borg *et al.* 2003). Die Begriffe IDDM (insulin dependent diabetes mellitus) und juveniler Typ oder NIDDM (non insulin dependent diabetes mellitus) und Altersdiabetes sind nicht mehr gebräuchlich, da auch Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 insulinabhängig sein können (Turner *et al.* 1997), die Manifestation des „Altersdiabetes“ auch bei Jüngeren auftreten kann, umgekehrt der Diabetes mellitus Typ 1 auch im Erwachsenenalter auftritt (Horton *et al.* 1999) und auch nicht alle immun-mediert sind (Seissler *et al.* 1998).

Es wird unterschieden:

- I. Diabetes mellitus Typ 1: B-Zell-Zerstörung, die zum absoluten Insulinmangel führt
 - A. immunologisch vermittelt
 - B. idiopathisch
- II. Diabetes mellitus Typ 2: idiopathische Form des Diabetes mit Insulinresistenz und relativem Insulinmangel bis hin zum sekretorischen Defekt
- III. Andere spezifische Diabetes-Typen:
 - A. Genetische Defekte der B-Zell-Funktion, z.B. Chromosom 7, Glukokinase (früher MODY 2)
 - B. Pankreopriver wie nach Pankreatitis bzw. postoperativ
 - C. Endokrinopathien, z.B. Morbus Cushing
 - D. Medikamentös induziert, z.B. durch Vacor
 - E. Infektionen, z.B. CMV
- IV. Gestationsdiabetes

1.3 Diabetes mellitus Typ 1

1.3.1 Epidemiologie

In Deutschland sind ca. 8% der Bevölkerung an Diabetes mellitus erkrankt (Mehnert *et al.* 1998), davon die Mehrzahl an Diabetes mellitus Typ 2 (ca. 90%) und 10% an Diabetes mellitus Typ 1, dessen Inzidenzrate mindestens 12/100.000 Einwohner beträgt (Michaelis *et al.* 1993). In Europa schwankt die Inzidenzrate des Diabetes mellitus Typ 1 im Sinne eines Nord-Südgefälles zwischen 40,2/100.000 in Finnland und 3,2/100.000 in der Republik von Mazedonien (EURODIAB ACE Study Group 2000). Da in Sardinien die Inzidenz so hoch und in Kuwait bzw. Puerto Rico annähernd so hoch ist wie in Finnland, ist die Theorie des Nord-Süd-Gradienten (Green *et al.* 1992; LaPorte *et al.* 1985) nicht generalisierbar (Muntoni & Muntoni 1999). Weltweit steigt die Inzidenz des Diabetes mellitus Typ 1 in der Altersklasse der unter 16-Jährigen jährlich um 3% (Onkamo *et al.* 1999), in Europa um 3-4% (EURODIAB ACE Study Group 2000; Tuomilehto *et al.* 1999) an.

1.3.2 Ätiologie

Die Ursache des Diabetes mellitus Typ 1 ist nicht gänzlich bekannt. Bemerkenswert ist, dass, wenn ein eineiiger Zwilling am Diabetes mellitus Typ 1 erkrankt, der andere mit einer Wahrscheinlichkeit von 38% ebenfalls diabetisch wird (Verge *et al.* 1995). Diese Tatsache macht deutlich, dass sowohl das Erbmateriale, aber auch andere Einflüsse, die Umweltfaktoren, eine Rolle in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 spielen.

Es wurden mehrere Genloki identifiziert, die mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung des Diabetes mellitus Typ 1 und auch mit dessen Protektion korrelieren. Der Erbgang ist keiner einfachen mendelschen Dominanz oder Rezessivität zuzuordnen (Todd 1999). Die wichtigsten Gene liegen auf dem Chromosom 6p21, IDDM1 genannt (Buzzetti *et al.* 1998), und kodieren für HLA Klasse II Proteine, die für Antigenprozessierung und -präsentation von T-Lymphozyten zuständig sind. Patienten mit den Haplotypen DR3 und/oder DR4 bzw. DQ2 und/oder DQ8 des HLA-Systems haben das höchste Risiko, an Diabetes mellitus Typ 1 zu erkranken (Hermann *et al.* 2001). Die Haplotypen DR2, DR5 und DQ6 sind bei Typ 1 Diabetikern so selten, dass ihnen Protektion zugeschrieben wird (Sanjeevi 2000).

Mittlerweile sind über 20 weitere Prädispositionsgene bekannt (Lernmark & Ott 1998), wie das so genannte IDDM2 an der Insulinregion des Chromosom 11p55 (Bennett & Todd 1996) oder auf Chromosom 2q33 (=IDDM12) das CTLA-4, das beim Typ-1-Diabetes und Morbus Basedow eine signifikante Assoziation gezeigt hat (Nistico *et al.* 1996).

Mögliche Umweltursachen oder -trigger (Akerblom *et al.* 2002) für die Erkrankung sind Virusinfektionen (Jun & Yoon 2003), Hygieneverhalten, Nahrung und Toxine. Weitere

Faktoren könnten Impfungen, Stress oder Klima sein, die jedoch kontrovers diskutiert werden.

Die DAISY (Diabetes Autoimmunity Study in the Young) Studie und die BABYDIAB Studie finden keinen Effekt der genannten Faktoren auf die Entstehung des Diabetes mellitus Typ 1 (Graves *et al.* 1999; Hummel *et al.* 2000; Norris *et al.* 1996), während finnische Studien das Gegenteil berichten (Hypponen *et al.* 1999; Lonnrot *et al.* 2000; Virtanen *et al.* 2000).

1.3.3 Pathogenese

Heute wird davon ausgegangen, dass es sich beim Diabetes mellitus Typ 1 um eine chronische immunmedierte Erkrankung handelt, bei der die β -Zellen selektiv zerstört werden.

Es wurde vielfach beschrieben, dass über die Hälfte der Patienten mit frisch manifestem Diabetes mellitus Typ 1 eine Zellinfiltration in die Langerhans'schen Inseln des Pankreas aufwiesen (Gepts 1965; Hanninen *et al.* 1992; Itoh *et al.* 1993; Bazan & Rodriguez de Turco 1995; Doniach & Morgan 1973), allerdings bei allen Patienten eine Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen nachzuweisen war (Atkinson & Eisenbarth 2001). Sind 80-90% der β -Zellen zerstört, wird der Diabetes mit seinen Symptomen manifest.

Bisher wurden Proben aus Obduktionen (Foulis *et al.* 1986) und Biopsien von Prädiabetikern oder neu diagnostizierten Typ 1 Diabetikern (Imagawa *et al.* 1999; Moriwaki *et al.* 1999) untersucht. In diesen findet man eine Infiltration von $CD4^+T^-$, $CD8^+T^-$ und B-Lymphozyten sowie Makrophagen und dendritische Zellen mit einer Dominanz von $CD8^+T^-$ -Lymphozyten (Atkinson & Eisenbarth 2001; Imagawa *et al.* 2001). Im frühen Stadium der Insulitis bei nicht adipösen diabetischen Mäusen (NOD-Maus) und BioBreeding-Ratten (BB-Ratten) besteht das entzündliche Infiltrat hauptsächlich aus Makrophagen (Yoon *et al.* 1998). Werden Makrophagen durch Silica, ein selektives Makrophagentoxin, inaktiviert, sind die Tiere vor Insulitis und Diabetes fast komplett geschützt (Yoon & Jun 2001), was auf eine wichtige pathogenetische Funktion der Makrophagen hinweist. Grund dafür ist möglicherweise, dass die Makrophagen z.B. mit dem von ihnen sezernierten Interleukin-12 und einer Änderung in der Immunbalance eine essentielle Rolle in der Differenzierung und Aktivierung der β -zelltoxischen T-Zellen spielen (Jun *et al.* 1999b; Jun *et al.* 1999a). Ohne B-Lymphozyten entwickelt eine Maus keine Insulitis und keinen Diabetes (Noorchashm *et al.* 1997; Serreze *et al.* 1996). Die im Thymus gereiften T-Lymphozyten teilen sich in verschiedene Subgruppen ein: Die zytotoxischen T (T_C) -Zellen, die das Oberflächenmembranglykoprotein CD8 präsentieren, die T-Helfer (T_H) -Zellen, die das Oberflächenmembranglykoprotein CD4 exprimieren und die T-Regulator (T_R) -Zellen. Mäuse ohne Thymus sind vor Insulitis geschützt (Makino *et al.* 1986; Ogawa *et al.* 1985). Einige $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellklone

können die insulinproduzierenden β -Zellen ohne Hilfe von CD4 positiven T-Zellen zerstören (Wong *et al.* 1996), aber in den meisten Studien wurde für die Übertragung des Diabetes die Hilfe der T-Helfer-Zellen (CD4⁺) benötigt (Bendelac *et al.* 1987; Christianson *et al.* 1993; Nagata & Yoon 1992; Wong *et al.* 1996). Diese können auch, spezifisch gegen die Inselzellantigene Insulin (Daniel *et al.* 1995), Glutamatdecarboxylase (Zekzer *et al.* 1998) oder Hitzeschock Protein (HSP) (Elias *et al.* 1995), die Erkrankung auf gesunde Tiere übertragen. Die CD4 positiven Zellen können aufgrund der durch sie sezernierten Zytokine in T_{H1}- und T_{H2}-Zellen eingeteilt werden (Mosmann & Sad 1996). Bei der immun-medierten Erkrankung Diabetes mellitus Typ 1 zeigte sich, dass ein T_{H1}-Profil mit den charakteristischen Zytokinen IL-2, IL-8 oder INF- γ mit Destruktion der β -Zellen, ein T_{H2}-Profil mit IL-4, oder IL-13 dagegen mit Protektion verbunden ist (Kolb 1997).

1.3.4 Zytokine und Chemokine

Der Begriff „Zytokine“ umfasst Proteine mit einem Molekulargewicht unter 30 kDa, die von Lymphozyten sezerniert werden und Lymphokine heißen, und solche, die von Monozyten und Makrophagen sezerniert werden und Monokine heißen. Da es aber nicht ausschließlich die angesprochenen Zellarten sind, die diese Substanzen produzieren können, hat man sich auf den Begriff „Zytokine“ geeinigt.

Diese und ihre Rezeptoren besitzen eine solch hohe Affinität zueinander, dass pikomolare Konzentrationen (10^{-10} bis 10^{-12} M) einen biologischen Effekt haben können. Da zusätzlich die Halbwertszeiten kurz sind (wenige Stunden) wirken Zytokine in den meisten Fällen auf die sezernierende Zelle selbst (autokrin) oder auf benachbarte Zellen (parakrin). Selten wirken sie wie Hormone endokrin. Viele immunkompetente Zellen sind in der Lage, verschiedene Zytokine zu produzieren und diese wiederum wirken, allein oder in Kombination mit einem oder mehreren anderen Zytokinen, modulatorisch auf verschiedene Zellen des Immunsystems. Zu den Funktionen der Zytokine zählen die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten, die Regulation des Wachstums und Differenzierung anderer Leukozyten sowie der antigenspezifischen T-Zellimmunantwort und B-Zell-Stimulation, Vermittlung von Entzündungsreaktionen und Kontrolle der Hämatopoese durch Differenzierung von Stammzellen im Knochenmark.

Einige, leichtmolekulare Zytokine adressieren G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und besitzen im Bezug auf Neutrophile, Monozyten oder Lymphozyten chemotaktische Fähigkeiten (Baggiolini *et al.* 1997) und gehören einer Untergruppe der Zytokine an, den Chemokinen. Diese werden in vier Hauptgruppen eingeteilt, wobei die Zugehörigkeit zu einer Gruppe über die Position von Cystein – Resten, die für die tertiäre Struktur der Proteine

unerlässlich sind, definiert sind: C -, CC -, CXC – und CX₃C - Chemokine. Die meisten bekannten Chemokine werden den Gruppen CC und CXC zugeordnet. Sie werden von einer Vielzahl von Zellen produziert und können durch verschiedenste Stimuli wie andere Zytokine (z.B. IL-1 oder Tumor-Nekrose-Faktor-alpha), bakterielle Substanzen wie Lipopolysaccharide (LPS) oder virale Produkte (RNA) induziert werden.

In der Tabelle 1 werden die Zytokine IL-13 und MIF sowie die Chemokine MIP-1 α und IL-8 näher beschrieben, die von uns in dieser Arbeit untersucht wurden. Zur Komplettierung der Daten wurden die Rohdaten des Zytokins TNF- α und dessen Rezeptors TNF-R1 sowie der Monokine IL-1-RA, IL-1 β und IL-1-R1 aus einem dänischen Labor (Prof. Mandrup-Poulsen, Steno Diabetes Center, DK) zur Verfügung gestellt.

Tab. 1: Eigenschaften von in dieser Arbeit behandelten Zyto- und Chemokinen

Zyto-/Chemokin	produziert von	Zielzelle	Aktion	Th-Typ
IL-13	T-Zellen, Mastzellen	B-Zellen, Makrophagen, Monozyten, keine T-Zellen	B-Zell-Wachstum, Hemmung der proinflammatorischen Zytokine, Chemokine, Makrophagen und Th1-Zellen	Th ₂
MIF	T-Zellen, Mukosazellen Makrophagen	antigenpräsentierende Zellen	Hemmung der Makrophagenmigration Stimulation von Makrophagenaktivität	Th ₁ /Th ₂
MIP-1 α (CCL ₃)	Makrophagen Eosinophile T-Zellen,	Makrophagen/Monozyten, T-Zellen, dendritische Zellen Knochenmarkzellen	Th1-Zellrekrutierung, Chemotaxis Induktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, Granulozytenaktivierung	Th ₁
IL-8 (CXCL8)	den meisten Zellen, v.a. von Makrophagen, nicht v. T-Zellen	Neutrophile Basophile T-Zellen	Stimulierung von Neutrophilen (PMN) Chemotaxis, pleiotrop	Th ₁

1.3.4.1 Interleukin-13

1989 isolierten Brown et al. eine unbekannte cDNA aus T-Helfer1- und 2-Zellen und nannten sie p600. Nachdem die immunmodulierenden Effekte auf Betazellen und Monozyten bewiesen waren, wurde der Name Interleukin-13 (IL-13) akzeptiert (Zurawski & de Vries 1994).

Humanes IL-13 ist ein Protein mit einer molekularen Masse von 12 kDa, das aus 132 Aminosäuren besteht. Mit murinem IL-13 weist es eine 58%ige, mit humanem IL-4 eine 25%ige Nukleotidsequenzhomologie auf, wobei die dreidimensionale Struktur der beiden identisch ist (Bamborough *et al.* 1994; Zurawski *et al.* 1993) (Abb.1).

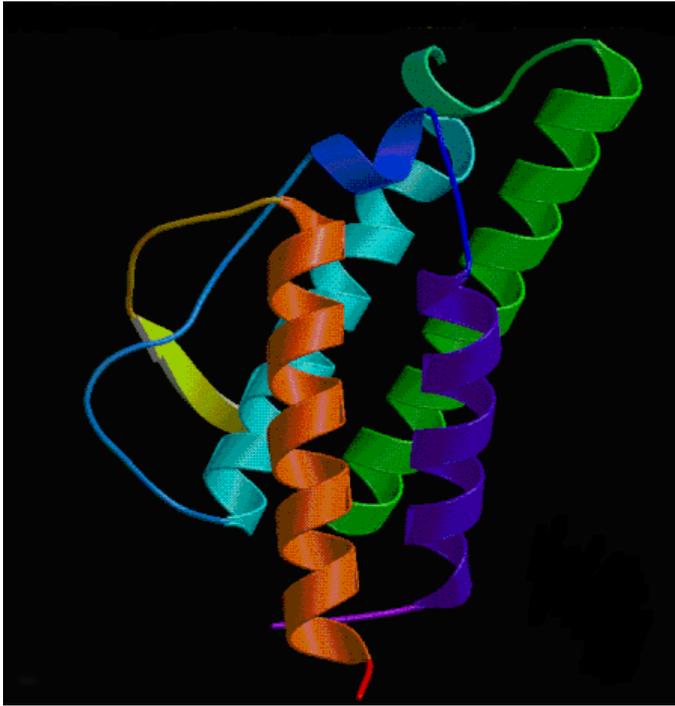


Abb. 1: Tertiärstruktur von IL-13 und IL-4 (nach Cytokines Web)

Es gibt verschiedene IL-13-Isoformen, die in Position 61 entweder ein Glycin oder ein Aspartat besitzen oder in Position 98 zusätzlich ein Glutaminrest. Das Gen, das IL-13 kodiert, liegt auf dem Chromosom 5q31 und zwar im gleichen 3000-kB-Bereich wie die Gene von IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 und GM-CSF (Morgan *et al.* 1992; Smirnov *et al.* 1995). Die mRNA von IL-13 ist 1280 Nukleotide lang und enthält vier Kopien von der Folge (A/T)ATTTA(A/T), welche in den meisten Zytokin-mRNA gefunden wurde, aber eine gewisse Instabilität zur Folge hat (GenBank accession no. L06801).

IL-13 wird von $CD4^+$ T_{H2} -Zellen, von T_{H0} -(Vorläufer-) und $CD8^+$ T-Zellen und in niedrigeren Konzentrationen von nativen $CD45RA^+$ - und T_{H1} -Zellen produziert (de Vries 1998). Ebenso kann es von Epstein-Barr-Virus-transformierten B-Zelllinien (de Waal *et al.* 1995; Fior *et al.* 1994) oder B-Zell-Lymphomen (Emilie *et al.* 1997) sezerniert werden. Daraus wird ersichtlich, dass IL-13 zwar mit einer T_{H2} -Immunantwort assoziiert sein kann, jedoch pleiotrope Funktionen aufweist (Zaccone *et al.* 1999).

Der IL-13-Rezeptor, der aus zwei Domänen (IL-13R α 1 und IL-13R α 2) besteht (Aman *et al.* 1996; Gauchat *et al.* 1997; Miloux *et al.* 1997), wird auf B-Zellen, Monozyten-Makrophagen, Basophilen, Mastzellen, Endothelialzellen und einigen Tumorzellen, nicht aber auf T-Zellen oder Maus-B-Zellen exprimiert (de Waal *et al.* 1995; Zurawski *et al.* 1993). Auf jeder Zelle werden gewöhnlicherweise zwischen 200 und 3000 Rezeptoren gefunden, die IL-13 mit einer hohen Affinität (K_d 30 pM) binden. Der Rezeptorkomplex funktioniert auch in Teilen als

IL-4-Rezeptor, wobei spezifisch für IL-4 ein Rezeptor mit der so genannten γc -Domäne ist. Wenn diese defekt ist, können beide Interleukine ihre biologischen Effekte über den IL-13-Rezeptor mediieren (Izuhara *et al.* 1996; Matthews *et al.* 1995; Matthews *et al.* 1997).

In $\gamma c^{-/-}$ -Mäusen antworteten die Makrophagen mit einer Hochregulation der MHC II und Inhibition der NO-Produktion sowohl auf IL-13- als auch auf IL-4-Reize. Bindet IL-13 nun an den Rezeptor, wird die Janus-Tyrosinkinase 1 (JAK1) und die Tyrosinkinase 2 (TYK2) aktiviert und es werden mehrere Kaskaden in Bewegung gesetzt, die im Zellkern enden. Dort kann es die Synthese der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, IL-12 und TNF- α sowie die der Chemokine IL-8 und MIP1- α durch Unterdrückung des nuclear factor (NF- κ B) und der Erhaltung des inhibitory protein κ B (IKB)- α hemmen (Lentsch *et al.* 1997; Muchamuel *et al.* 1997; Nicoletti *et al.* 1997). Diese Eigenschaft ist beim septischen Schock (Baumhofer *et al.* 1998; Muchamuel *et al.* 1997; Nicoletti *et al.* 1997), bei der Typ II kollageninduzierten Arthritis (Bessis *et al.* 1996) oder bei experimentellen allergischen Enzephalomyelitiden therapeutisch nützlich (Cash *et al.* 1994). Außerdem konnte gezeigt werden, dass sowohl IL-4 (Cameron *et al.* 1997; Rapoport *et al.* 1993) als auch IL-13 (Zaccone *et al.* 1999) Mäuse vor Insulinitis schützen und damit den autoimmunen Diabetes mellitus verhindern können. Hier sind mehrere mögliche Gründe zu nennen: Die Fähigkeit, durch Unterdrückung der Produktion und Hochregulierung eines Rezeptorantagonisten (Vannier *et al.* 1996) den Effekt des diabetogenen IL-1 β zu verhindern (Muchamuel *et al.* 1997), die Hemmung der NO-Produktion von Makrophagen (Rabinovitch 1994) und die Unterdrückung der TNF- α -induzierten Apoptose (Manna & Aggarwal 1998), die mit für den β -Zelltod im Diabetes mellitus Typ 1 verantwortlich ist (Mauricio & Mandrup-Poulsen 1998).

1.3.4.2 Interleukin-8

Interleukin-8 (IL-8) ist ein sehr stabiles Chemokin, dessen Aktivität in einem pH-Bereich von 2,0-9,0, bei 100°C oder unter milder Oxidation oder Reduktion nicht eingeschränkt ist (Wuyts *et al.* 1998). Es kann lediglich durch Kathepsin G, Elastase oder Proteinase 3 bei 37°C (Padrines *et al.* 1994; Schroder *et al.* 1987) oder durch eine Protease aus serösem Sekret (Ayesh *et al.* 1993) inaktiviert werden. Die IL-8 cDNA codiert für ein 99 Aminosäuren langes Vorläuferprotein. Ist die Signalsequenz abgetrennt, hat Interleukin-8 eine Länge von 77 Aminosäuren, ein Gewicht von 8 kDa und besitzt vier Cysteinreste in 2 Disulfidbrücken (Abb. 2). Das Gen, früher SCYB8, jetzt CXCL8 genannt (Zlotnik & Yoshie 2000), hat eine Länge von 5,1 kB und liegt auf dem Chromosom 4q12-q21.

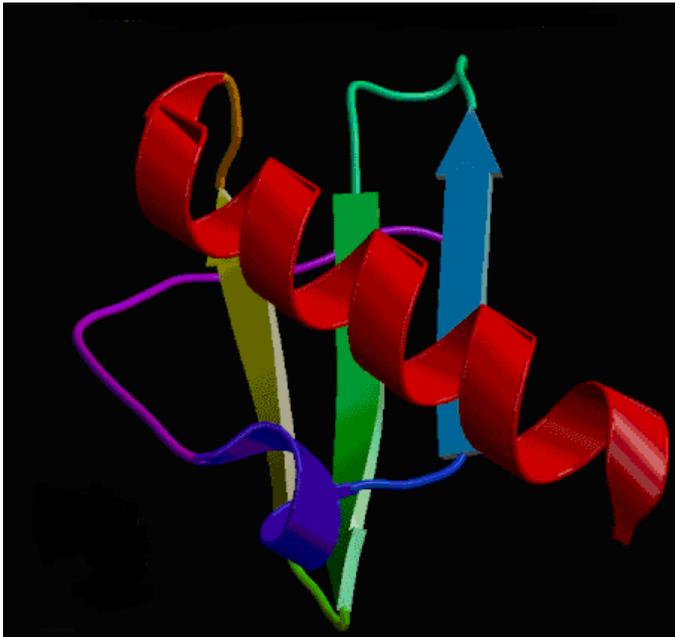


Abb. 2: Tertiärstruktur von IL-8 (nach Cytokines Web)

Es gibt 2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit einem Gewicht von 40 KDa, codiert auf dem Chromosom 2q53, die IL-8 mit unterschiedlicher Affinität binden. Der CXCR2 bindet mit einer Kd von 0,3-2 nM (CXCR1: Kd= 0,8-4 nM) und benötigt das COOH- α -Helix-Ende des Proteins (Wuyts *et al.* 1998). Die Rezeptoren werden in Neutrophilen, CD4⁺ T-Zellen (Moser *et al.* 1993) und zahlreichen anderen Zellen exprimiert (Norgauer *et al.* 1996; Schonbeck *et al.* 1995). Diese Expression kann von Zytokinen reguliert werden. Während eine Behandlung mit LPS oder TNF- α die Expression inhibiert, kann G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) in Neutrophilen die mRNA beider Rezeptoren vermehren. Auch das Protein selbst wird durch Zytokine reguliert, indem durch IL-2, IL-13 oder TNF- α die Expression induziert wird (Van Damme 1994). IL-8 wird durch hohe Glukosekonzentrationen stimuliert und aktiviert polymorphkernige Neutrophile (PMN) (Zozulinska *et al.* 1999), die beim Diabetes aktiviert sind und eine Rolle in der Pathogenese von diabetesbedingten Komplikationen spielen (Wierusz-Wysocka *et al.* 1993; Zozulinska *et al.* 1996). IL-8 kann von fast allen humanen Zellen produziert werden, jedoch nicht von T-Lymphozyten. Es spielt bei sehr vielen Erkrankungen eine Rolle wie in der Pathogenese der Psoriasis, rheumatoiden Arthritis, Asthma, Arteriosklerose (Wuyts *et al.* 1998) oder Retinopathie (Doganay *et al.* 2002; Hernandez *et al.* 2005). Einige Gruppen haben eine erhöhte IL-8-Konzentration bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 im peripheren Blut entdeckt (Glowacka *et al.* 2002; Zozulinska *et al.* 1999). Dabei scheint die Erhöhung der IL-8-Konzentration im Kindesalter eine Verbindung zum kardiovaskulären Risiko im Erwachsenenalter zu haben (Lo *et al.* 2004) und mit dem BMI positiv zu korrelieren (Erbagci *et al.* 2001).

1.3.4.3 Macrophage inflammatory protein-1 α

Macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) ist ein säurehaltiges Protein mit einer Länge von 69 Aminosäuren und einer Molekularmasse von 7,8 kDA. Es gibt zwei Varianten: MIP-1 α und MIP-1 β , beide auf Chromosom 17q lokalisiert (Irving *et al.* 1990). Es wurde beschrieben, dass chromosomale Aberrationen in den Gen-Abschnitten, die für MIP-1 α kodieren, häufig mit der Neurofibromatose von Recklinghausen und mit der akuten Promyelozyten-Leukämie assoziiert sind, wobei man sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt allerdings nicht sicher ist, welchen Stellenwert diesem Umstand bei der Krankheitsentwicklung zukommt. Obwohl diese beiden MIP-Formen unterschiedlich sind, zeigten Analysen eine hohe Sequenzhomologie auf Proteinbasis von ca. 60% auf (Sherry *et al.* 1988). Das entsprechende Gen-Symbol lautet SCYA3, jetzt umbenannt in CCL3 (Zlotnik & Yoshie 2000). MIP-1 α gehört in die Gruppe der CC-Chemokine, welches in der Lage ist an zwei verschiedene Rezeptoren zu binden: CCR1 und CCR5 (Gao *et al.* 1993; Raport *et al.* 1996).

MIP-1 α wird von Makrophagen, eosinophilen Zellen, T-Zellen und NK-Zellen sezerniert (Lee *et al.* 2000; Martin & Dorf 1991). Zielzellen von MIP-1 α sind Monozyten/Makrophagen, T-Zellen, NK-Zellen, basophile Zellen, dendritische Zellen und Knochenmarkzellen (Fahey, III *et al.* 1992; Graham *et al.* 1990; Loetscher *et al.* 1996). Wie auch bei anderen immunologischen Botenstoffen, hat die Sezernierung von MIP-1 α verschiedene biologische Wirkungen zur Folge (Pleiotropie). Es wurde gezeigt, dass MIP-1 α nicht nur chemotaktisch auf Monozyten/Makrophagen wirkt, sondern auch als ein Ko-Aktivator dieser Zellen fungiert und u.a. zusammen mit IFN- γ in einer T_{H1}-Zellrekrutierung resultiert (Dorner *et al.* 2002). Beide Formen von MIP-1 stimulieren die Produktion von Sauerstoffradikalen in neutrophilen Granulozyten und die Freigabe von lysosomalen Enzymen (Kapp *et al.* 1994; Ying *et al.* 2001). Die Freisetzung von MIP-1 α kann u.a. von LPS, IFN- γ , TNF- α , IL-1 und IL-10 stimuliert und getriggert werden (Guo *et al.* 1998; McManus *et al.* 1998), was letztlich zu einer T_{H1}-Zellrekrutierung führt. Es wurde gezeigt, dass MIP-1 α durch eine schnell induzierte Veränderung des zytosolischen Calciums, der Freisetzung von Histamin und Sulfido-Leukotrienen auch als potenter Agonist auf basophile Zellen wirkt (Bischoff *et al.* 1993; Rot *et al.* 1992). Verschiedene Arbeiten dokumentieren die Korrelation einer Überexpression von MIP-1 α oder deren Rezeptoren mit dem Ausbruch der Krankheit oder der akuten Phase einer Infektion sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen. Als Beispiel sei hier die Überexpression von CCR5 bei Patienten mit multipler Sklerose genannt (Zang *et al.* 2000), oder die T_{H1}-Zellantwort, ausgelöst durch MIP-1 α und andere proinflammatorische Botenstoffe bei akuter *Helicobacter pylori* Infektion (Mattapallil *et al.* 2000). Weiterhin zeigte

die Überexpression von CCR1 eine Verstärkung der Effektorphase bei Glomerulonephritis (Topham *et al.* 1999).

Die Rolle von MIP-1 α bei Entstehung und Verlauf vom Diabetes mellitus Typ 1 ist noch unzureichend untersucht. Studienergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass temporäre Sekretion von MIP-1 α eine wichtige Einflussnahme auf die Manifestation des Diabetes hat. Die MIP-1 α /MIP-1 β Ratio korreliert mit destruktiver Insulinitis und Progression zum manifesten Diabetes in NOD-Mäusen, wohingegen eine erniedrigte intrapankreatische MIP-1 α /MIP-1 β Ratio in NOR-Mäusen (nonobese diabetes-resistant) beobachtet wurde. Gleichzeitig wurde nachgewiesen, dass eine Behandlung mit IL-4, was einen Diabetes mellitus Typ 1 in NOD-Mäusen mittels T_{H2}-Zellpolarisierung verhindert, eine Herunterregulierung des MIP-1 α Rezeptors CCR5 in Inselzellen bewirkt (Cameron *et al.* 2000). Interessant sind auch Beobachtungen bei frisch manifesten Typ 1 Diabetikern mit erniedrigter Expression T_{H1}-assoziierter MIP-1 α -Rezeptoren (CCR5) auf peripheren Blutmonozyten, nicht jedoch bei Patienten mit schon länger bestehendem Diabetes (Lohmann *et al.* 2002). In dieser Studie zeigten zudem die Patienten mit frisch manifestem Diabetes erhöhte MIP-1 α und -1 β -Spiegel. Eine andere Arbeit macht auf den möglichen Entstehungsmechanismus des Typ 1 Diabetes in Zusammenhang mit der genetisch determinierten Variation des MIP-1 α -Rezeptors aufmerksam (Buhler *et al.* 2002).

1.3.4.4 Macrophage Migration Inhibition Faktor

Macrophage Migration Inhibition Faktor (MIF) ist ein multifunktionales, lösliches und meist extrazellulär sezerniertes Protein, das in der Lage ist, die Migration von Makrophagen z.B. aus Kapillaren zu hemmen. Es wird in der fetalen Nebennierenrinde (Jian & Parker, Jr. 2003) und in der Adenohypophyse (Arzt *et al.* 1999; Nishino *et al.* 1995), v.a. als Monomer (44%), ein Einfach-Ring von 15-Å-Diameter am offenen Ende, das für die Bindung von kleinen Molekülen verantwortlich ist (Sun *et al.* 1996), aber auch als Dimer (33%) und Trimer (23%) (Mischke *et al.* 1998), exprimiert.

Die natürlichen Substrate von MIF sind unbekannt, aber es sind enzymatische Aktivitäten als Tautomerase (Rosengren *et al.* 1996; Taylor *et al.* 1999; Rosengren *et al.* 1996) an L-DOPA (Kleemann *et al.* 1998; Zhang & Bucala 1999) und HLA-II-Peptiden beschrieben (Potolicchio *et al.* 2003). Ein MIF-spezifischer Rezeptor wurde noch nicht gefunden, aber die Interaktion mit HLA-II-Peptiden lässt die Überlegung zu, MIF könne über ein pan-CD91-Rezeptor-ähnliches Molekül nach intrazellulär gelangen (Basu *et al.* 2001).

Eine weitere enzymatische Aktivität ist die Funktion als Thiooxidoreduktase. Das molekulare Reaktionszentrum hat die für die Thiooxidoreduktasefamilie typische Sequenz CXXC (Cys-57-Ala-

Leu-Cys-60) (Kleemann *et al.* 1998). Die Sequenz 50-65 wird als ausschlaggebend für die Funktion, z.B. über Jab1 (Kleemann *et al.* 2000), und Aktivität von MIF angesehen und könnte zu therapeutischen Zwecken genutzt werden (Nguyen *et al.* 2003).

Ein anderes Enzym dieser Klasse ist die Interferon- γ -induzierte lysosomale Thiolreduktase. Dieses Enzym wird in antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und katalysiert Disulfidbrückenreaktionen bei einem niedrigen pH (Phan *et al.* 2002). Es ist mit HLA-DRw52 (Arunachalam *et al.* 1998) assoziiert und ist wichtig für die HLA-Klasse-II Peptidpräsentation. MIF wird von verschiedenen Zellen produziert, am meisten aber von aktivierten Makrophagen und Lymphozyten (Lue *et al.* 2002). Es kann als glukokortikoid-induzierter Immunmodulator (Nishihira 2004) proinflammatorisch fungieren, indem es die Dexamethason-mediierte Hemmung der Produktion von proinflammatorischen Proteinen, wie z.B. von TNF-alpha, unterdrückt (Calandra & Bucala 1997), die CD3-T-Zell-Proliferation beschleunigt (Bacher *et al.* 1996) und die antiinflammatorische Wirkung von Kortison hemmt (Calandra *et al.* 1995). MIF^{-/-}-Mäuse sind resistent gegen den endotoxischen Schock (Bozza *et al.* 1999; Calandra *et al.* 2000). Programmierter Zelltod ist ein wichtiger Faktor in der Regulation der Immunantwort (Grobmyer *et al.* 1999; Oberholzer *et al.* 2001) und ein Fehlen von MIF wird im Zusammenhang sowohl mit einer defizitären p53-abhängigen Apoptose-Kaskade in Makrophagen (Mitchell *et al.* 2002) und der genannten Resistenz als auch mit einer Downregulation des Toll-like-receptors 4 (TLR4) (Roger *et al.* 2001; Roger *et al.* 2003) diskutiert.

So spielt MIF bei entzündlichen Erkrankungen (Bernhagen *et al.* 1998; Calandra & Bucala 1997), wie bei Lungenerkrankungen (Donnelly *et al.* 1997; Yamada *et al.* 2002), beim septischen Schock (Calandra *et al.* 2000), bei der chronischen Kolitis (de Jong *et al.* 2001) und bei einigen autoimmunen Erkrankungen wie aus dem Formenkreis der rheumatoiden Arthritiden (Meazza *et al.* 2002; Onodera *et al.* 2000) oder der multiplen Sklerose (Nishihira & Ogata 2001) eine Rolle.

MIF hat des Weiteren Einfluss auf den Glukosestoffwechsel. Es induziert einerseits den Glukose-Katabolismus im Muskel und andererseits wird die MIF-Expression in insulinsezernierenden Zellen im Pankreas von der Glukose reguliert, dergestalt, dass bei einer Erhöhung der MIF-m-RNA die Insulinproduktion steigt (Plaisance *et al.* 2002; Sakae *et al.* 1999). Bei Mäusen wurde beschrieben, dass die MIF-mRNA-Expression in Lymphozyten aus der Milz während der Entwicklung eines autoimmunen Diabetes mellitus erhöht ist (Bojunga *et al.* 2003) und eine Hemmung der MIF-Aktivität eine therapeutische Möglichkeit wäre (Cvetkovic *et al.* 2005).

1.3.5 Klinische Verlaufsphasen des Diabetes mellitus Typ 1

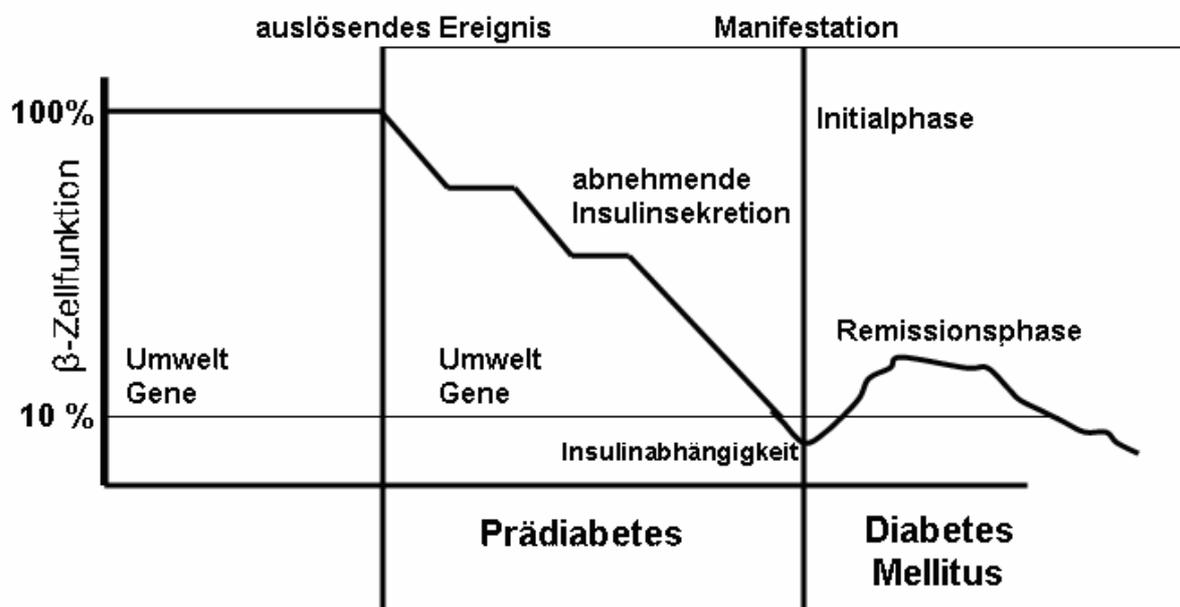


Abb. 3: Schematischer zeitlicher Verlauf der β -Zellfunktion bei Entwicklung des Diabetes mellitus Typ 1

Der klinischen Manifestation geht eine monate- bis jahrelange prädiabetische Phase voraus, während derer die chronische Zerstörung der β -Zellen voranschreitet, aber noch ausreichend Insulin vorhanden ist und somit keine klinischen Zeichen erkennbar sind.

Der klinische Verlauf des Diabetes mellitus Typ 1 ist durch mehrere Phasen gekennzeichnet, die in unterschiedlich klinischer Ausprägung auftreten (Abb. 3).

Initialphase:

Die Symptome sind nicht für den Diabetes mellitus spezifisch und hängen vom Grad des Insulinmangels und den daraus resultierenden Störungen im Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel sowie im Elektrolyt- und Wasserhaushalt ab (Hyperglykämie, Ketoazidose, Lipolyse und osmotische Diurese) oder fehlen sogar des Öfteren. Erste Anzeichen sind Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Abnahme der körperlichen und geistigen Leistungsfähigkeit und Gewichtsverlust.

Wenn es durch stärkere Hyperglykämie zum Überschreiten der renalen tubulären Rückresorptionskapazität kommt, ist Glykosurie mit Polyurie und Polydipsie die Folge. Die diabetische Ketoazidose ist häufig Ursache weiterer eindrucklicher klinischer Auffälligkeiten. Die ersten Anzeichen können Erbrechen, Dehydratation und Bauchschmerzen sein. Im fortgeschrittenen Zustand bestehen die Zeichen einer ketoazidotischen, tiefen Atmung (Kussmaul-Atmung), Azetonfötor und starke abdominelle Beschwerden, die gegen eine Appendizitis (Pseudoappendizitis diabetica) bzw. Peritonitis (Pseudoperitonitis diabetica) differentialdiagnostisch abgegrenzt werden müssen. Die Bewusstseinssebene kann von

Bewusstseinsstörungen bis zum Koma (Coma diabeticum) reichen, das vor Einführung der Insulintherapie 1922/23 bei nahezu allen Patienten zum Tode führte. Auch heute noch, wie z.B. im Staat Colorado (USA, 4 Mio. Einwohner) stirbt alle 2 Jahre ein Kind, weil die Diabetesdiagnose nicht oder verspätet gestellt wurde (Atkinson & Eisenbarth 2001). Die Todesrate bei Manifestation des Diabetes mellitus Typ 1 variiert zwischen verschiedenen Ländern und ist größtenteils abhängig von der Aufklärung in der Bevölkerung (Matsushima *et al.* 1997; Podar *et al.* 2000).

Remissionsphase:

Diese Phase („honeymoon phase“) ist seit über 60 Jahren bekannt (Brush 1944) und durch eine Verbesserung der Stoffwechselsituation im Rahmen einer erfolgreichen Erstbehandlung und Reduktion des Insulinbedarfs gekennzeichnet. Sie hält unterschiedlich lange an (Wochen bis Monate), korreliert invers mit dem Ausmaß der Stoffwechsellage bei Diagnosestellung (Vetter *et al.* 1980) und kann durch eine immunsuppressive Therapie wie Cyclosporin A oder α CD3 und normoglykämische Stoffwechsellage verlängert werden. Auch ein positiver Effekt von Nikotinamid auf die Dauer der Remissionsphase wurde von einer Arbeitsgruppe beschrieben (Pozzilli *et al.* 1996). Der Faktor der Insulinresistenz wird mit dem Krankheitsverlauf insgesamt und besonders in dieser Phase in Verbindung gebracht (Greenbaum 2002). Nicht alle Diabetes mellitus Typ 1-Patienten durchlaufen diese Remissionsphase.

Postremissionphase:

Es kommt wieder zu einem Anstieg und zur Stabilisierung des Insulinbedarfes.

Bei Manifestation im Kindesalter folgt noch die Pubertätsphase, in der durch Hormonwirkungen der Insulinbedarf teils starken und schwer zu kontrollierenden Schwankungen unterworfen ist. In der Adoleszenzphase stabilisiert sich der Stoffwechsel wieder.

1.3.6 Diagnostik

Anhand der oben beschriebenen Klinik, Anamnese und Blutzuckermessung wird die Diagnose eines Diabetes mellitus Typ 1 gestellt. Liegt die Konzentration der Glukose im Blut zu einem beliebigen Zeitpunkt über 200 mg/dl (11,1 mmol/l) oder nüchtern nach Wiederholungsmessung über 126 mg/dl (7,0 mmol/l), so kann die Diagnose Diabetes mellitus gestellt werden. Ein oraler Glucose-Toleranztest (oGTT) wird nicht zur Routinediagnostik eines Diabetes mellitus Typ 1 verwendet (ADA 1997). Zu einem typischen Muster von Laborparametern gehören weiterhin Glukos- und Azetonurie, metabolische Azidose, erhöhte Serumosmolarität, Hyponatriämie und Leukozytose.

Als diagnostisches Kriterium und besonders für die Prädiktion eignen sich die, mittlerweile standardisierten (Lernmark *et al.* 1991) Messungen von Autoantikörpern, die von B-Lymphozyten sezerniert werden und einen Marker für die Zerstörung der β -Zellen darstellen, nämlich ICA (islet cell antibodies) und IA-2A (insulinoma-associated antigen 2), GAD (glutamic acid decarboxylase)-Antikörper (Hatzigelaki *et al.* 1999; Leslie *et al.* 1999) und IAA (insulin autoantibodies) (Imagawa *et al.* 1999). In einer Studie wurden diese Antikörper an knapp 900 zu Diabetes mellitus Typ 1 erstgradig-verwandten Personen gemessen, wobei sich zeigte dass 98% dieser Personengruppe, die im Verlauf einen Diabetes entwickelten, mindestens einen der gemessenen Parameter aufwies, bei 80% sogar zwei oder mehr Antikörper vorgefunden wurden (Verge *et al.* 1998). Die Antikörper können häufig schon in den ersten Lebensmonaten bis –jahren und oft Jahre vor der Manifestation der Erkrankung nachgewiesen werden (Atkinson & Eisenbarth 2001). Sie scheinen außerdem assoziiert mit der systemischen Immunbalance, die durch Zytokinekonzentrationen charakterisiert ist (Hanifi-Moghaddam *et al.* 2003). 5-30% der Erwachsenen, bei denen ein Typ 2 Diabetes diagnostiziert wurde, haben ICA im Blut und damit eine Variante des Diabetes mellitus Typ 1A (Turner *et al.* 1997; Zimmet *et al.* 1994), den LADA (latent autoimmune diabetes mellitus in adults).

1.3.7 Therapie des Diabetes mellitus Typ 1

Das Ziel der Therapie des Diabetes mellitus Typ 1 ist eine möglichst optimale Regulation des Stoffwechsels, eine verbesserte Lebensqualität und Integration im familiären und sozialen Umfeld und die Verringerung der diabetesbedingten Folgeerkrankungen mit Erhöhung der Lebenserwartung.

Zur Therapie gehören diabetesgerechte Ernährung (Caputo *et al.* 1994), körperliche Aktivität und eine individuell angepasste Insulintherapie. Die beste Imitation der natürlichen Insulinsekretion bietet die intensivierete Insulintherapie, die durch Einführung des Humaninsulin durch verbesserte Pharmakokinetik (Vajo & Duckworth 2000) möglich gemacht wurde. Es wird basales Verzögerungsinsulin zur Deckung des basalen Insulinbedarfs und zusätzlich mahlzeitenbezogenes Normalinsulin gegeben. Die Verfügbarkeit des schnellverfügbaren Insulin trägt zur häufigeren Verwendung von Insulinpumpen bei (Boland *et al.* 1999; Catargi *et al.* 2000). Allerdings sind Disziplin und Motivation die Voraussetzung für eine solche Therapie.

Essentiell sind weiterhin regelmäßige Kontrollen der Blutglukosekonzentration, des glykolysierten Hämoglobins und anderer Organsysteme (s. u.) sowie gute Schulung der Patienten, bei Kindern zusätzlich der Eltern, auch unter dem Aspekt möglicher Komplikationen wie z.B. der Hypoglykämie.

Heilung kann prinzipiell mit einer Transplantation von Inselzellen (Berney *et al.* 2001; Shapiro *et al.* 2000) oder des Pankreas (Robertson 1999) erzielt werden, wobei hier eine lebenslange Immunsuppression notwendig ist und dies häufig mit ausgeprägten Nebenwirkungen assoziiert ist.

1.3.8 Folgen und Prognose des Diabetes mellitus Typ 1

Die Komplikationen, Spätfolgen und Lebenserwartung korrelieren mit der Qualität der Stoffwechseleinstellung (Onkamo *et al.* 1999; The Diabetes Control and Complications Trial Research Group 1993; The Diabetes Control and Complications Trial 2000). Bei gut eingestelltem Diabetes treten Folgeerkrankungen wie Polyneuropathie, Retinopathie, Nephropathie und Angiopathie später, seltener und in weniger starker Ausprägung auf.

Angiopathien sind mit über 75% Prozent die häufigste Todesursache für Patienten mit Diabetes mellitus. Sie werden in Makro- und Mikroangiopathien unterteilt. Während bei den Mikroangiopathien spezifische Veränderungen an den Arteriolen, Venolen und Kapillaren gefunden werden, handelt es sich bei der Makroangiopathie um nichtspezifische, vorwiegend arteriosklerotische Gefäßschäden, die in einem früheren Alter als bei Nichtdiabetikern auftreten, eine rasche Progredienz zeigen und das Risiko für Komplikationen wie Myokardinfarkt, zerebraler ischämischer Insult oder ischämische Fußgangrän mit Amputation erhöhen.

Klinische Ausprägung und Schwere der Gefäßveränderungen sind abhängig von ihrer Lokalisation (Koronararterien, Zerebralgefäße, periphere Gefäße) und dem Ausmaß der geschädigten Gefäßareale, wobei die kardiovaskuläre Beteiligung als Todesursache mit 53% überwiegt (Mehnert *et al.* 1998).

Diese besondere Anfälligkeit wurde in zahlreichen klinischen und epidemiologischen Untersuchungen (Stamler *et al.* 1993), Todesursachenstatistiken (Mehnert *et al.* 1998) und Autobiopsiestudien (BELL 1952) in allen Populationen nachgewiesen.

Ursachen und Pathogenese der Angiopathie sind nicht eindeutig geklärt, als gemeinsamer Faktor neben vielen diskutierten Faktoren wird die Glukose angesehen.

Praktisch alle bisher untersuchten Proteine werden von Glukose ohne enzymatische Vermittlung schon bei relativ kurzen Phasen von Hyperglykämie durch Bindung an die ϵ -Aminogruppe von Lysin glykosyliert (Baumgartl & Standl 1996; Mehnert *et al.* 1998; Vogt *et al.* 1982). Das bekannteste Beispiel dafür ist die vermehrte Bildung von HbA1c bei erhöhter Blutglukosekonzentration.

Aus diesen noch abbaubaren frühen Glykosylierungsprodukten (Amadori-Produkte) können durch weitere Umlagerung, wie durch Anlagerung eines weiteren Glukosemoleküls an die NH_2 -Gruppe, oder durch Oxidation und Dehydratation (Brownlee *et al.* 1988; Miyata *et al.*

1997) die nicht mehr reversiblen „advanced glykosylation end products“ (AGE) entstehen (Brownlee *et al.* 1988).

Diese können mit weiteren NH₂-Gruppen Querverbindungen zwischen extrazellulären Matrixproteinen eingehen, aber auch zwischen diesen und glykosyliertem Albumin oder Lipoproteinen. Solche Quervernetzungen führen z.B. zu einer Versteifung der Basalmembranproteine bzw. des Kollagens oder auch zu einer vermehrten Ansammlung und Fixierung von Lipoproteinen in den subendethelialen Gefäßwandabschnitten.

Eine Interaktion mit Makrophagen durch spezifische AGE-Rezeptoren führt dabei zu einer Lymphokinfreisetzung an der Gefäßintima mit endothelialer Schädigung. Daraufhin wird die Proteinkinase C aktiviert, was sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene zu einer Veränderung der Synthese der extrazellulären Matrix als auch Veränderung in der Freisetzung von endothelialen Faktoren, wie dem Willebrand-Faktor induziert (Aiello *et al.* 1997; Williams *et al.* 1997).

Kommt es zu diesen Veränderungen an Widerstandsgefäßen oder Kapillaren, so wird dies klinisch besonders an Nieren oder Augen auffällig. Die diabetische Retinopathie ist heute mit 4-8/100000 der fünft häufigste Grund einer Erblindung (Klein & Klein 1997). Nach drei bis vier Jahren entwickeln 19% der Typ 1 Diabetiker eine Retinopathie, nach 20 Jahren Erkrankung haben die Hälfte aller Patienten eine proliferative Retinopathie (Klein *et al.* 1984b; Klein *et al.* 1984a). Frühe Veränderungen der Durchmesser der retinalen Gefäße sind mit Makrohämaturie und renaler Insuffizienz (Wong *et al.* 2004) assoziiert. Unbehandelt kommt es zum Endstadium mit nachfolgender Dialyse oder Nierentransplantation. Die Therapie muss auch hier intensiv antihyperglykämisch sein (Feldt-Rasmussen *et al.* 1991; The Diabetes Control and Complications (DCCT) Research Group 1995). Zusätzlich hat sich eine Proteindiät (Pedrini *et al.* 1996) sowie eine antihypertensive Therapie (Mogensen 1976) mit ACE-Hemmern oder Angiotensin II-Blockern (Lewis *et al.* 1993) als nützlich erwiesen.

Obwohl heutzutage eine Stoffwechseleoptimierung mit Insulin möglich ist, treten trotzdem bei einem großen Teil der Patienten Folgeerkrankungen auf, die wahrscheinlich nur mit einer Prävention des Diabetes mellitus Typ 1 verhindert werden können.

1.3.9 Präventionsstudien bei Diabetes mellitus Typ 1

Die Prävention des Diabetes mellitus Typ 1 ist das Ziel zahlreicher, zum Teil groß angelegter Studien.

Man teilt jene in Primär-, Sekundär- und Tertiärprävention ein.

Die primäre Prävention ist zurzeit noch nicht möglich, da die Ätiologie noch nicht bis ins Detail geklärt ist und Umweltfaktoren, Viren oder genetische Dispositionen ausgeschaltet werden müssten.

Die Sekundärprävention beschäftigt sich mit der Identifikation von Hochrisikopatienten und dem Verzögern oder Verhindern der Krankheitsmanifestation. Solche Studien sind das „American Diabetes Prevention Trial“ (DPT-1) (DPT-1 Study Group 2002) oder das „European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial“ (ENDIT) (Gale 2003), die Insulin bzw. Nikotinamid einsetzten (Schatz & Bingley 2001). Beiden gingen mehrere viel versprechende Pilotstudien (Pozzilli *et al.* 1996; Elliott *et al.* 1996) bzw. Tierversuche voraus. Der positive klinische Effekt der jeweiligen Medikation konnte sich in den großen Studien am Menschen aber leider nicht bestätigen (DPT-1 Study Group 2002; Gale *et al.* 2004).

Die negativen Ergebnisse dieser Studien haben neben dem Lerneffekt (Philips & Scheen 2002) dazu geführt, dass derzeit die Frage im Raum steht, warum der Typ 1 Diabetes nicht zu verhindern ist, und ob andere Ansatzpunkte und Modelle benötigt werden (Schatz *et al.* 2003).

Die Tertiärprävention sucht nach effektiven Behandlungsmethoden einer frisch manifestierten Erkrankung und Verhinderung einer Progression.

Studien mit Cyclosporin A bei frisch manifestierten Typ 1 Diabetikern zeigten zwar eine prinzipielle Wirksamkeit des Immunsuppressivums (Canadian-European Randomized Control Trial Group 1988; Feutren *et al.* 1986), was die Beteiligung des Immunsystems an der Ätiologie des Diabetes mellitus Typ 1 erneut untermauert, die starken unerwünschten Wirkungen wie vor allem die Nephrotoxizität schränken jedoch die therapeutische Verwendbarkeit stark ein (Parving *et al.* 1999).

Weitere vielversprechende Ansatzpunkte werden derzeit geprüft, wie eine Therapie mit GAD65 (Agardh *et al.* 2005) und DiaPep277-hsp60 (Raz *et al.* 2001), deren Ergebnisse wir noch erwarten. 2005 wurde beschrieben, dass eine Kurzzeittherapie mit anti-CD3 (ChAglyCD3) die β -Zellfunktion der behandelten frischen Diabetiker, mit einer Reduktion des Insulinbedarf gegenüber der Placebogruppe, für mindestens 18 Monate schützt (Keymeulen *et al.* 2005).

1.4 Nikotinamid

Nikotinamid (Niactinamid) (Abb.4) ist ein wasserlösliches Amid der Nikotinsäure, eine Komponente des Vitamin B₃, und wird gut über die Schleimhäute des Magen-Darmtraktes resorbiert. Nikotinamid wird zu N-methyl-2-pyridon-5-carboxamid abgebaut und über Leber und Niere ausgeschieden (Knip *et al.* 2000). Außerdem kann Nikotinamid zum Oxid oxidiert werden, aber außer einem vernachlässigbaren Teil durch Bakterien z.B. in der Mundhöhle (Stratford *et al.* 1996), nicht weiter zur Nikotinsäure (Gillmor *et al.* 1999).

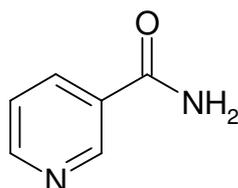


Abb. 4: Strukturformel von Nikotinamid

Ende der Vierziger Jahre wurde Nikotinamid erstmals erfolgreich genutzt, um die diabetogene Wirkung von Alloxan bzw. Streptozotocin (STZ), beide sind β -zelltoxisch, abzuschwächen bzw. zu verhindern (Lazarow 1947; Lazarow *et al.* 1950).

1982 verhinderten Yamada und andere bei Mäusen die Entstehung des Streptozotocin-induzierten Diabetes und reduzierten die Insulitisrate mit einer prophylaktischen Behandlung einer hohen Dosis von Nikotinamid (Yamada *et al.* 1982). Diese Beobachtungen wurden von anderen Gruppen bestätigt (Elliott *et al.* 1993; Yamamoto *et al.* 1997).

Weitere Gruppen unternahmen die gleichen Versuche mit BB-Ratten (Hermitte *et al.* 1989; Pan *et al.* 1995; Sarri *et al.* 1989). Obwohl hier viele Studien keinen signifikanten Effekt von Nikotinamid im Bezug auf die Verhinderung der Krankheit im Vergleich zu mit Placebo behandelten Ratten zeigten, waren doch Trends erkennbar und wurden als 35-45% Suppression der Diabetesinzidenz gedeutet (Kolb & Burkart 1999).

Auch die Pilotstudien am Menschen waren viel versprechend (Elliott & Chase 1991; Herskowitz *et al.* 1989; Manna *et al.* 1992), so dass das groß angelegte ENDIT durchgeführt wurde. Bei Patienten mit subklinischer autoimmuner Insulitis hatten andere Studien gezeigt, dass Nikotinamid die Antwort auf Insulin nach Glucosereiz senkt (Greenbaum *et al.* 1996; Lampeter *et al.* 1998), es bei Normalpersonen jedoch keinen derartigen Einfluss hat (Bingley *et al.* 1993; Paul *et al.* 1993).

Viele Arbeitsgruppen haben den Wirkmechanismus von Nikotinamid untersucht. Es wurde gezeigt, dass Nikotinamid durch Verbesserung der Mikrozirkulation positiven Einfluss auf die Tumorbekämpfung hat (Hirst *et al.* 1995; Horsman 1995; Peters *et al.* 1997; Price *et al.* 1995; Thomas *et al.* 1995) und durch neutrophile Chemotaxis anti-inflammatorische Wirkung (Berk & Lorincz 1986; Miesel *et al.* 1995) aufweist.

Es kann vor Sauerstoffradikalen schützen, ist aber im Gegensatz zu dem lipophilen Vitamin E kein potentes Antioxidantium und kann NO nicht abbauen (Andersen *et al.* 1994; Burkart *et al.* 1995).

In niedrigen Dosen wird Nikotinamid als Vitaminpräperat genutzt und aufgrund der protektiven Wirkung vor Radikalen sogar als lebensverlängernd dargestellt (Guarente 1999).

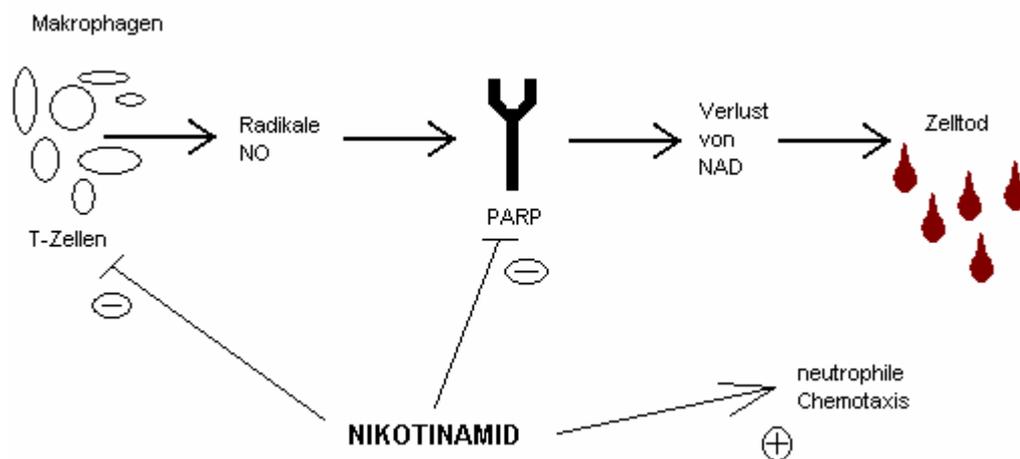


Abb. 5: Postulierter Wirkmechanismus von Nikotinamid

Die Beeinflussung der Krankheitsentstehung des Diabetes mellitus Typ 1 durch Nikotinamid wird dadurch erklärt, dass es in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 zur autoimmunen Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen im Pankreas durch zytotoxische T-Zellen und Makrophagen, unterstützt von proinflammatorischen Zytokinen, kommt. Es entstehen freie Radikale und Stickstoffmonoxid (NO), die die DNS der Zellen beschädigen. Dies ist ein Signal für das DNS-Reparatur-Enzym poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), die nukleär in den Zellen verfügbar ist und nach chemischen, physikalischen oder entzündlichen Reizen vermehrt exprimiert wird (de Murcia *et al.* 1994; Gillmor *et al.* 1999; Satoh & Lindahl 1992). Zur Reparatur benötigt das Enzym Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) um ADP-Ribose herzustellen, die ein Baustein der RNS ist. Dies hat allerdings zur Folge, dass die Konzentration von NAD intrazellulär stark abnimmt und damit eine verfügbare Energiequelle ausfällt, was zum Zelltod führen kann. Aufgrund der Carbamoylgruppe am aromatischen Ring ist Nikotinamid ein spezifischer Inhibitor der poly(ADP-Ribose)-Polymerase.

PARP wiederum spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 1, wie durch Arbeiten an Wild- und PARP-knockout-Mäusen gezeigt wurde. Diese wurden mit STZ behandelt (Kolb & Burkart 1999), das NO und andere Radikale freisetzt (Kolb & Kröncke 1993; Kroncke *et al.* 1995; Turk *et al.* 1993) und zum β -Zelltod und Diabetes führt (Like & Rossini 1976; RAKIETEN *et al.* 1963; Turk *et al.* 1993). Der Tod der Zellen wurde sowohl durch Nekrose als auch durch Apoptose verursacht.

Die Wildmäuse entwickelten nach einer hohen Dosis STZ (160mg/kg Körpergewicht) innerhalb von 3 Tagen eine akute Hyperglykämie. Verhindert werden konnte der Diabetes mit einer hohen Dosis Nikotinamid (500mg/kg Körpergewicht) 6 Stunden vor STZ-Injektion.

Bei den PARP-knockout-Mäusen hatte das STZ, sogar in doppelter Dosis gegeben, keinen Einfluss auf die Blutzuckerkonzentration. Auch histologisch konnte bei diesen Tieren ein signifikant höherer Anteil an insulinpositiven Arealen in den Langerhans'schen Inseln gezeigt werden.

Die Konzentration, um 50% der poly(ADP-Ribose)-Polymerase mit Nikotinamid zu inhibieren, beträgt beim Menschen 0,1 mmol/l (Banasik *et al.* 1992; Pociot *et al.* 1993; Rankin *et al.* 1989). Um die (mono)ADP-ribosyl-Transferase (ADPRT) zu hemmen, ist eine 110-fach höhere Konzentration notwendig (Rankin *et al.* 1989). Konzentrationen von über 10 mmol/l wären nötig, um mit Nikotinamid die Transkription einiger Gene, die auch für die NO-Synthase kodieren, zu beeinflussen (Pellat-Deceunynck *et al.* 1994). Ab einer Konzentration von 25 mmol/l wurde eine breitere Hemmung der Genexpression und Proteinsynthese beobachtet (Hauschildt *et al.* 1991).

Die im menschlichen Plasma maximal gemessenen Nikotinamid-Konzentrationen liegen nur bei 0,3-1,1 mmol/l (Petley *et al.* 1995; Pociot *et al.* 1993; Stratford *et al.* 1992).

1.5 Ziele der vorgelegten Arbeit

Die vorliegende Arbeit hatte drei primäre Ziele. Im ersten geht es um das eben beschriebene in dem ENDIT eingesetzte Medikament Nikotinamid. Obwohl es klinisch zu keiner Verzögerung oder gar Verhinderung der Diabetes-Manifestation gekommen ist, bleibt die Frage, ob nicht trotzdem das Immunsystem, das hier durch unsere gemessenen Chemo-, Zyto- und Monokine repräsentiert wird, durch Nikotinamid verändert wird, sich in einer charakteristischen Art und Weise verschiebt.

Die zweite ist eine wichtige und schon länger beobachtete Frage: Kann man andere Parameter als die bisher bekannten, wie z.B. Antikörper (wie ICA), bessere Marker, nutzen, um eine Erhöhung des Manifestationsrisikos zu beschreiben, ja, sogar das Stadium des Prädiabetes an diesen erkennen?

Der dritte Punkt beschäftigt sich mit dem prädiabetischen Verlauf der Immunparameter. Da der Diabetes mellitus Typ 1 eine immunmedierte Erkrankung ist, liegt die Vermutung nahe, dass sich das Immunsystem des Prädiabetiker oder Diabetiker, mit dem Gesunden verglichen, verändert, anders verhält und messbar gemacht werden kann durch unsere Immunparameter.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Pipetten

1-Kanal-Pipetten:	<p>eppendorf research 1000, 100, 10 μl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland</p> <p>pipetus-akku, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland</p>
8-Kanal-Pipetten:	<p>eppendorf research 300 μl, 100 μl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland</p> <p>Finnpipette 1500 μl, Labsystem, Los Angeles, USA</p>
ELISA reader:	Titertek Multiskan MCC type 341, Titertek, Huntsville, USA
Gefrierschränke:	<p>Comfort -32°C, Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland</p> <p>Forma Scientific -86°C Freezer, Marietta, USA</p>
Kühlschränke:	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Manuelle Plattenwäsche:	Wash 12, Dunn
PH-Meter:	pH-Meter 761 Calimatic, Knick, Berlin, Deutschland
Rührer:	<p>RS-9, Klein Feld Labortechnik, Gehrden, Deutschland</p> <p>IKAMAG RCT, Janke und Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland</p>
Schüttler:	Titramax 100, Heidolph, Chemnitz, Deutschland
Sterile Arbeitsbank:	HB2572 Lamin Air, Heraeus Instrument, Osterode, Deutschland
Vakuumpumpe:	Laboport, KNF, Freiburg, Deutschland
Vortex-Gerät:	VF2, Janke und Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Waagen:	Sartorius analytic, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasseraufbereitung:	Milli-Q, Milipore, Molsheim, Frankreich
Zeitnehmer:	3-zeilig, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugen:	<p>Centrifuge 5810, Eppendorf, Hamburg, Deutschland</p> <p>Centrifuge 5415, Eppendorf, Hamburg, Deutschland</p>

2.1.2 Gefäße

Erlenmeyer Kolben:	2000 ml, 1000 ml
Flaschen:	1000 ml, 500 ml, 250 ml
Kanister für Aqua destillata:	10000 ml, Kautex, Bonn, Deutschland
Messbecher:	500 ml, 200 ml, 100 ml, 50 ml
Messzylinder:	2000 ml, 1000 ml, 500ml, 250 ml, 100 ml, 50 ml, 20ml alle von Schott, Mainz, Deutschland
Reservoir:	V-Form, 60 ml, Labsystem, Los Angeles, USA

2.1.3 Einmalmaterialien

Abdeckfolien:	Sealing tape Parafilm M, American National Can, Greenwich
Einmalpipetten:	25 ml, 10 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf tubes:	1,5 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Matrix Röhrchen:	1,4 ml, Matrix, Hudson, USA
Mikrotiter-Platten:	F96-Maxisorp Nunc-Imunoplates, Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Röhrchen:	50 ml, 15 ml, Greiner Bio-one, Solingen, Deutschland
PCR-Röhrchen:	200 µl, Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen:	1500 µl, Labsystem, Los Angeles, USA 1000 µl, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland 300 µl, 100 µl, 20 µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.4 Chemikalien

Dinatriumhydrogenphosphat:	Na_2HPO_4 , Merck, Deisenhofen, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat:	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Merck, Deisenhofen, Deutschland
FCS:	fötales Kälberserum, getestet auf Viren, Mykoplasmen und Endotoxine, steril gefiltert, PAA Linz, Österreich,
HRP-Konjugat:	ELISA Grade Streptavidin, Biosource, Camarillo, USA
Milchpulver:	Glücksklee, Nestle, München, Deutschland
Natriumcarbonat:	NaHCO_3 , Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
Natriumchlorid:	NaCl , Merck, Deisenhofen, Deutschland
Natriumbikarbonat:	Na_2CO_3 , Merck, Deisenhofen, Deutschland
Natriumbikarbonathydrat:	$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

Natriumdihydrogenphosphat:	NaH_2PO_4 , Merck, Deisenhofen, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphatdihydrat:	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich, Laborchemikalien, Seelze, Deutschland
Natronlauge:	NaOH , Merck, Deisenhofen, Deutschland
Salzsäure:	HCl , Merck, Deisenhofen, Deutschland
Schwefelsäure:	H_2SO_4 95% - 97%, Merck, Deisenhofen, Deutschland
Thiomersal:	$\text{C}_9\text{H}_9\text{HgO}_2\text{SNa}$, Sigma Aldrich Laborchemikalien, Seelze, Deutschland
TMB:	TMB Plus gebrauchsfertig, KEM/EN/TEC NS, Kopenhagen, Dänemark
Tween 20:	$\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$, Merck, Deisenhofen, Deutschland

2.1.5 Lösungen

2.1.5.1 Waschpuffer

2.1.5.1.1 0,2 M Phosphate Buffered Saline (PBS)

als Grundlösung (20-fache Konzentration)

32	g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
6	g	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
164	g	NaCl
900	ml	Aqua destillata
20	μg	Thiomersal - als Konservierungsmittel hinzu

titrieren auf pH 6,8-6,9

Die Lösung kann bei $+4^\circ\text{C}$ bis zu 3 Monate aufbewahrt werden.

Vor Gebrauch müssen die nach 12 Stunden entstandenen Kristalle durch ein Wärmebad auf dem Rührer in Lösung gebracht werden.

2.1.5.1.2 0,2 M Phosphate Buffered Saline (PBS)

als Gebrauchslösung (einfache Konzentration)

100	ml	PBS (20-fach)
1900	ml	Aqua destillata

2.1.5.1.3 0,2 M Phosphate Buffered Saline 0.005%Tween 20 (PBS-Tween)

als Gebrauchslösung (einfache Konzentration)

100	ml	PBS (20-fach)
1900	ml	Aqua destillata
50	µl	Tween 20

Beide Lösungen können bei +4°C bis zu einer Woche aufbewahrt werden.

2.1.5.2 Coating Puffer**2.1.5.2.1 0,1 M Natriumcarbonat pH 9,6 (Coating Puffer 1)**

Lösung A

1,24	g	$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$
100	ml	Aqua destillata

Lösung B

1,68	g	NaHCO_3
200	ml	Aqua destillata

70 ml von Lösung A mit Lösung B auf pH 9,6 titrieren

Die Lösung kann bei +4°C bis zu einer Woche aufbewahrt werden.

2.1.5.2.2 0,2 M Natriumphosphat pH 6,5 (Coating Puffer 2)

2,96	g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
4,18	g	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
200	ml	Aqua destillata

auf pH 6,5 titrieren

Die Lösung kann bei +4°C bis zu einer Woche aufbewahrt werden.

2.1.5.3 Blocker-Lösung

2.1.5.3.1 Blocker-Puffer (CLB)

500	µl	Blocker-Reagenz (CLB PeliKine Compact kit)
25	ml	Phosphate buffered saline (1 fache Konzentration)

2.1.5.4 Verdünnungslösungen

2.1.5.4.1 Fötale Kälberserum-10% -PBS (FCS-PBS 10%)

10	ml	fötale Kälberserum (FCS)
90	ml	Phosphate buffered saline (1 fache Konzentration)

Diese Lösung wurde auch zum Blocken benutzt.

2.1.5.4.2 Milchpulver-PBS (0,5%)

0,5	g	Milchpulver
100	ml	Phosphate buffered saline (1 fache Konzentration)

Die Lösung kann bei -20°C eingefroren und vor Gebrauch wieder aufgetaut werden.

2.1.5.4.3 Verdünnungslösung von CLB (20%)

60	ml	Verdünnungslösung (CLB PeliKine Compact kit)
240	ml	Aqua destillata

Die Lösung kann bei +4°C bis zu einer Woche aufbewahrt werden.

2.1.5.4.4 Stopp-Lösung 1,8 N Schwefelsäure

37	ml	H ₂ SO ₄
363	ml	Aqua destillata

2.1.6 Antikörper

Macrophage inflammatory protein-1 α : Monoklonaler anti-human MIP-1 α /CXCL3 Antikörper,
Maus IgG_{2a}, Klon 14215,
0.5 mg/ml, R&D Systems, Minneapolis, USA
Biotinylierter anti-human MIP-1a Antikörper, Ziegen-
IgG, 0.05 mg/ml, R&D Systems, Minneapolis, USA

Macrophage migration inhibitory factor: Monoklonaler anti-human MIF Antikörper,
Maus IgG₁, Clone 12302.2, 0.5 mg/ml,
R&D Systems, Minneapolis, USA
Biotinylierter anti-human MIF Antikörper,
Ziegen-IgG, 0.05 mg/ml, R&D Systems, Minneapolis,
USA

2.1.7 Standards

Macrophage inflammatory protein-1 α : R&D Systems, Minneapolis, USA
Macrophage migration inhibitory factor: R&D Systems, Minneapolis, USA

2.1.8 ELISA kits

Interleukin 8: PeliKine Compact human IL-8 ELISA kit, CLB, Amsterdam,
Niederlande
Interleukin 13: PeliKine Compact human IL-13 ELISA kit, CLB, Amsterdam,
Niederlande

2.2 Methoden

2.2.1 Studiendesign des European nicotinamide diabetes intervention trial

Das ENDIT (European nicotinamide diabetes intervention trial) [1994-2002] ist eine doppelblinde, multizentrische, randomisierte, Plazebo-kontrollierte Studie, die durchgeführt wurde um zu testen, ob eine tägliche orale Gabe von Nikotinamid die Rate des Fortschreitens und der Entwicklung des Diabetes mellitus Typ 1 bei Verwandten mit erhöhtem Risiko senken kann. Seren von diesen Probanden wurden in der hier vorgelegten Arbeit analysiert.

Beim ENDIT wurde die Annahme zugrunde gelegt, dass Nikotinamid in einer Dosis von 1,2g/m² eine Reduktion von 35-40% in der Diabetesprogression innerhalb von 5 Jahren bewirkt (Nullhypothese), so dass geprüft werden konnte, ob unter Nikotinamideinnahme weniger Diabetesfälle auftreten als mit einer Plazebobehandlung (Gale 2003).

2.2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien der Studienteilnehmer für ENDIT

Die Einschlusskriterien der Studie beinhalten:

- Verwandtschaft ersten Grades zu einem Typ 1 Diabetiker, dessen Krankheit sich vor dem 20. Lebensjahr manifestiert hatte.
- Alter zwischen 3 und 60 Jahren (ab 1995 nur noch bis 40 Jahre, weil es sich gezeigt hat, dass das Inselzellantikörper (ICA) gekoppelte Risiko bei Verwandten über 40 Jahre gering ist (Bingley 1996))
- Inselzellantikörper (ICA) von mindestens 5 JDF Einheiten in zwei unabhängig durchgeführten Tests
- Inselzellantikörper (ICA) von mindestens 20 JDF Einheiten in einer Messung

Ausgeschlossen wurden:

- Personen, die mit einem oralen Glucosetoleranztest als Diabetiker diagnostiziert wurden
- Schwangere Frauen
- Patienten mit chronischen Erkrankungen
- Patienten, die Vitaminpräparate einnahmen, die Nikotinamid enthielten

2.2.1.2 Durchgeführte Tests an ENDIT-Teilnehmern

Um auszuschließen, dass bei den Studienteilnehmern schon ein Diabetes bestand, bzw. um eine mögliche Manifestation eines Diabetes mellitus Typ 1 während der Studie zu diagnostizieren, wurden ein oraler Glucose Toleranztest (oGTT) und intravenöser Glucose Toleranztest (ivGTT) durchgeführt (Gale 2003).

1. Oraler Glucose Toleranztest (oGTT):

Es wurden 1,75 g/kg Körpergewicht bis maximal 75 g Glukose nach mindestens 6 Stunden Fasten gegeben. Das venöse Blut wurde nach 0 und 120 Minuten entnommen, die Beurteilung erfolgte nach WHO-Kriterien, das heißt, dass Teilnehmer, die eine Glukoseplasmakonzentration nüchtern von über 126 mg/dl oder nach 120 Minuten von über 200 mg/dl hatten, ausgeschlossen wurden.

2. Intravenöser Glucose Toleranztest (ivGTT) und Insulinantwort:

Dieser Test wurde dem ICARUS Protokoll (Bingley *et al.* 1992) entsprechend durchgeführt. Es wurden 0,5 g/kg Körpergewicht bis maximal 35 g Glukose über 3 Minuten infundiert und Blutproben von -5, 0, 1, 3, 5 und 10 Minuten gewonnen.

Für die Messung der frühen Insulinantwort (First Phase Insulin Response (FPIR)), also die Konzentration des C-Peptid im Serum nach Glukosebelastung, wurden die Proben nach 1 und 3 Minuten verwendet. Das C-Peptid ist die Vorstufe des Insulin, wird nach Erhöhung der Glukosekonzentration im Blut innerhalb einiger Sekunden vom Pankreas sezerniert und stellt einen aussagekräftigen Parameter dar, mit dem die endogene Insulinsekretion beurteilt werden kann (Schatz *et al.* 2004). Eine FPIR unter 10 % der Norm wird als unzureichend eingestuft.

Ein Teil der Einschlusskriterien bezog sich auf Antikörper im Blut der Probanden:

3. Inselzellantikörper:

Der initiale ICA-Test wurde in lokalen Labors in 10 Ländern durchgeführt, die anderen und die Proben, deren Konzentration gleich oder über 5 JDF Einheiten betragen, wurden im zentralen Labor mit einem indirekten Immunofluoreszenztest (Williams *et al.* 2002) ausgewertet.

4. Glutamatdecarboxylase (GAD), IA-2 Autoantikörper und Insulinautoantikörper (IAA):

Diese Antikörper wurden mit radiobindenden Tests nachgewiesen (Bingley *et al.* 1997)

2.2.1.3 Probanden der ENDIT-Studie

Das ICA-Screening wurde bei ungefähr 30000 erstgradig Verwandten von Typ 1 Diabetikern durchgeführt, von denen 549 als Probanden eingeschlossen wurden (Gale 2003) (Tab. 2), von denen wiederum 87% 5 Jahre lang beobachtet werden konnten (Bingley & Gale 2006).

Tab. 2: Probanden der ENDIT-Studie

Behandlung	Plazebo	Nikotinamid
Anzahl	275	274
Entwicklung von Diabetes im Studienverlauf	77 (=28%)	82 (=30%)
Geschlecht	Männlich: 143 Weiblich: 132	Männlich: 144 Weiblich: 130
Verwandtschaft zur diabetischen Person	Mutter: 57 Vater: 29 Kind: 163 Geschwister: 26	Mutter: 47 Vater: 34 Kind: 171 Geschwister: 22

2.2.1.4 Probandenkollektiv dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit stand uns das Blut von 329 Probanden, die zufällig von der Studienleitung in Kopenhagen aus den insgesamt 549 Probanden des ENDIT ausgewählt wurden, zur Verfügung. Von jedem Probanden besaßen wir bis zu 5 Serumproben, die innerhalb von 5 Jahren Betreuung während der Studie abgenommen und der Einteilung t1 - t5 (Tab. 3) zugeordnet wurden.

Tab. 3: Einteilung der Serumproben

t1	Vor Einnahme der Medikation (Nikotinamid oder Plazebo)
t2	Ein Jahr nach erster Einnahme
t3	Zwei Jahre nach erster Einnahme
t4	Drei bzw. vier Jahre nach erster Einnahme
t5	Vier bzw. fünf Jahre nach erster Einnahme

Von 291 Probanden stand uns eine Serumprobe von dem Zeitpunkt des Erstkontaktes, also von t1, zur Verfügung. Da diese für die Mehrzahl unserer Analysen notwendig ist, beschreibt die folgende Tabelle (Tab. 4) nur diese Probanden:

Tab. 4: Probanden dieser Arbeit

Behandlung	Plazebo	Nikotinamid
Anzahl	143	148
Entwicklung von Diabetes im Studienverlauf	33 (=23%)	40 (=27%)
Geschlecht	Weiblich	Männlich
Anzahl	131	160
Entwicklung von Diabetes im Studienverlauf	25 (=19%)	48 (=30%)
Alter [Jahre]	3-50	3-50

2.2.2 Aliquotierung und Lagerung der Serumproben

Die Seren wurden während des ENDIT abgenommen und in Kopenhagen (Dänemark) gelagert. Die von dort gelieferten tiefgefrorenen Serumproben wurden in PCR-Röhrchen in kleine Serummengen aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die jeweiligen Serumvolumina für die durchzuführenden Tests berechneten sich aus den ermittelten optimalen Verdünnungsfaktoren für die Messungen der einzelnen Zytokine und Chemokine. Dieser Arbeitsschritt wurde nach dem Auftauen durchgängig unter Kühlung mit Trockeneis durchgeführt, um einen möglichen Einfluss von übermäßiger Erwärmung auf die Stabilität der zu messenden Substanzen zu vermeiden.

50-100 µl pro Patient wurden als Reserve in einem getrennten Eppendorf-Röhrchen aufbewahrt.

2.2.3 ELISA-Verfahren

2.2.3.1 Allgemeine Grundlagen

Sämtliche Untersuchungen wurden mit dem ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) gemessen, der zu den immunologischen Sandwich-Verfahren gehört. Folgende Bindungsschritte und Reaktionen laufen dabei ab:

Zuerst wird der erste spezifische Antikörper (capture antibody) auf die Messplatte aufgetragen und bindet innerhalb der Inkubationszeit fest am Plastik (coating). Nicht gebundene Antikörpermoleküle werden anschließend ausgewaschen.

Nach der Inkubationszeit werden die Messvertiefungen mit einer proteinreichen Blockierlösung gefüllt, um freie Bindungsstellen am Plattenmaterial mit unspezifischen Eiweißbindungen zu besetzen (blocking). Wiederum erfolgt nach der Inkubation das Auswaschen der nicht gebundenen Substanzen.

Die zu untersuchende Substanz wird danach ebenso wie die Standardlösungen mit definierter Konzentration der jeweils zu messenden Substanz - des Antigens - hinzugefügt und über eine bestimmte Zeit inkubiert. Dabei binden die Moleküle des Antigens (hier: native wie rekombinante Zytokine und Chemokine) an die im Überschuss vorhandenen, auf der Platte fest verankerten spezifischen Antikörpern. Es schließt sich abermals ein Waschvorgang an.

Der zweite spezifische Antikörper (detection antibody) wird nun inkubiert und besetzt nunmehr freie Bindungsstellen an den verankerten Molekülen der zu messenden Substanz. Dieser zweite Antikörper besitzt an seinem freien Ende eine Biotin-gruppe.

Es erfolgt wiederum das Auswaschen nicht gebundener Antikörpermoleküle.

Danach wird Streptavidin-HRP (polyhorse-radish-peroxidase, Meerrettich-Peroxidase) aufgetragen und es bildet sich eine stabile kovalente Bindung ihres Avidin-Restes mit der Biotin-gruppe des gebundenen zweiten Antikörpers aus.

Freie Peroxidase wird im Anschluss ausgewaschen.

TMB (Tetramethylbenzidin) wird jetzt hinzugefügt und durch die Peroxidase enzymatisch umgesetzt.

Nach einer vorbestimmten Dauer oder bei Erreichen der gewünschten Farbintensität im Hinblick auf die Standardmessung wird die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 1,8 normaler Schwefelsäure beendet (stoppen).

2.2.3.2 Arbeitsprotokoll zur Messung von IL- 8, IL- 13, MIP-1 α und MIF

Alle gefrorenen Reagenzien werden vor Gebrauch langsam auf Raumtemperatur gebracht.

Vorab werden folgende Lösungen hergestellt:

Waschlösungen:

0,2 M PBS als Grundlösung (20 fache Konzentration)

0,2 M PBS als Gebrauchslösung (einfache Konzentration)

0,2 M PBS-Tween 0,005% als Gebrauchslösung (einfache Konzentration)

Coating Puffer 1 für IL-8, IL-13 und MIP-1 α

0,1 M Natriumcarbonat, pH 9,6

Coating Puffer 2 für MIF:

0,2 M Natriumphosphat, pH 6,5

Blocking Puffer:

Blocking Puffer CLB (2%) für IL-8 und IL-13

FCS-PBS (10%) für MIP-1 α und MIF

Verdünnungslösungen:

Assay diluent CLB (20%) für IL-8 und IL-13

FCS-PBS (10%) für MIP-1 α und MIF

Milchpulver-PBS (0,5%) für MIP-1 α und MIF

Substratlösung:

TMB-Fertiglösung

Stopplösung:

1,8 N H₂SO₄

1. Bindung des primären Antikörpers:

Im ersten Schritt wird der erste Antikörper für eine 96-Loch-Platte hergestellt, indem x μ l des Antikörpers (stock capture antibody) und y ml des Puffers 1 oder 2 durch vorsichtiges Schwenken gemischt werden.

100 μ l des verdünnten Antikörpers werden dann pro Vertiefung mit einer Multipipette aufgetragen.

Die Platte wird mit einer Folie abgedeckt und über Nacht (ON) bei 4°C, alternativ eine Stunde bei Raumtemperatur (RT), auf einem Schüttler bei 4000 Umdrehungen pro Minute inkubiert.

IL-8: x=120, y=12

IL-13: x=120, y=12

MIP-1 α : x=48, y=12

MIF: x=24, y=12

2. Waschen:

Im Anschluss an die Inkubation wird die Flüssigkeit aus den Vertiefungen aspiriert und mit mindestens 350 μ l PBS (einfache Konzentration, ohne Tween) pro Vertiefung ausgewaschen. Dieser Vorgang wiederholt sich vier Mal. Danach wird die Messplatte sorgfältig auf absorbierendem Papier ausgeklopft, da die Vertiefungen vor jedem Arbeitsschritt trocken sein müssen.

3. Blockierung:

Daraufhin werden 250 μ l des Blocking-Puffers pro Vertiefung pipettiert, die Platte mit Folie abgedeckt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wird die Flüssigkeit wieder jeweils vier Mal aspiriert und mit mindestens 350 μ l PBS-Tween (einfache Konzentration) pro Vertiefung ausgewaschen.

Nach diesem Arbeitsschritt kann die Platte zum späteren Weitergebrauch bei -20°C eingefroren werden. Sie muss zuvor 15 Minuten trocknen, sehr sorgfältig mit Folie abgedeckt und vor dem weiteren Gebrauch langsam wieder aufgetaut werden.

4. Standards und Proben:

Die Erstellung der Standard-Reihen wird in separaten Matrix-Röhrchen vorgenommen. Standard-Duplikate müssen unabhängig voneinander erstellt werden.

Zuerst werden die Top-Standards (IL-8: 240 pg/ml, IL-13: 125 pg/ml, MIP-1 α : 1000pg/ml, MIF: 5000 pg/ml) vorbereitet und in die jeweils obersten Röhrchen, die gekühlt werden, pipettiert. Dann werden diese 7-mal seriell mit der Verdünnungslösung und dem Faktor 1:f verdünnt (f= IL-8: 2,5, IL-13: 2,5, MIP-1 α : 2,5, MIF: 2).

Jede Verdünnungsstufe muss gut mit dem Vortex gemischt werden und für jede wird eine neue Pipettenspitze verwendet; die Pipette darf aber nicht gewechselt werden.

Die Serum-Proben werden mit der Multipipette in den oben besprochenen aliquotierten PCR-Röhrchen ebenfalls mit der Verdünnungslösung verdünnt (IL-8: 1:5, IL-13: 1:2,1818, MIP-1 α : 1:3, MIF: 1:22). Die Positiven Kontrollen werden möglichst genau wie die Serumproben mit

der Verdünnungslösung verdünnt. Alle Lösungen sollten kurz auf dem Vortexer gemischt werden.

Ist alles vorbereitet, werden jeweils 50 µl pro Vertiefung von Standardlösungen, Proben, positiver Kontrolle, negativer Kontrolle und Blank-Kontrolle gemäß der Abbildung 6 auf die Messplatte pipettiert. Dieser Arbeitsschritt sollte nicht mehr als 5 Minuten dauern, um Unterschiede in der Inkubation durch den Faktor Zeit zu minimieren. Die Platte wird dann mit Folie abgedeckt und über Nacht bei +4 °C auf dem Schüttler inkubiert.

IL-8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	240.00	240.00	Probe	leer	leer							
B	96.00	96.00	Probe									
C	38.40	38.40	Probe									
D	15.36	15.36	Probe									
E	6.14	6.14	Probe	+ve	+ve							
F	2.46	2.46	Probe	-ve	-ve							
G	0.98	0.98	Probe	blank	blank							
H	0.39	0.39	Probe	leer	leer							

IL-13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	125.00	125.00	Probe	leer	leer							
B	50.00	50.00	Probe									
C	20.00	20.00	Probe									
D	8.00	8.00	Probe									
E	3.20	3.20	Probe	+ve	+ve							
F	1.28	1.28	Probe	-ve	-ve							
G	0.51	0.51	Probe	blank	blank							
H	0.20	0.20	Probe	leer	leer							

MIP-1α	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1000.0	1000.0	Probe	leer	leer							
B	400.00	400.00	Probe									
C	160.00	160.00	Probe									
D	64.00	64.00	Probe									
E	25.60	25.60	Probe	+ve	+ve							
F	10.24	10.24	Probe	-ve	-ve							
G	4.10	4.10	Probe	blank	blank							
H	1.64	1.64	Probe	leer	leer							

MIF	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5000.0	5000.0	Probe	leer	leer							
B	2500.0	2500.0	Probe									
C	1250.0	1250.0	Probe									
D	625.00	625.00	Probe									
E	312.50	312.50	Probe	+ve	+ve							
F	156.25	156.25	Probe	-ve	-ve							
G	78.13	78.13	Probe	blank	blank							
H	39.06	39.06	Probe	leer	leer							

Abb. 6: Beschichtung der ELISA-Platte für IL-8, IL-13, MIP-1α und MIF

A1-H1 und A2-H2: Standard-Verdünnungsreihen in pg/ml

E11 und E12: Positive Kontrolle (+ve)

F11 und F12: Negative Kontrolle (-ve) (erster Antikörper, geblockt, kein Standard/Serum, nur Verdünnungslösung, zweiter Antikörper, Avidin-Peroxidase, TMB und Stopplösung)

G11 und G12: Blank Kontrolle (erster Antikörper, geblockt, kein Standard/Serum, nur Verdünnungslösung, kein zweiter Antikörper, keine Avidin-Peroxidase, aber TMB und Stopplösung)

A11, A12, H11 und H12 aufgrund von Unterschieden in der Bindungsfähigkeit durch die Herstellung der Platte leer lassen!

5. Waschen:

Mit PBS-Tween (einfache Konzentration) wird in diesem Waschgang jede Vertiefung erst so verdünnt, dass nichts überläuft. Dann wird die Flüssigkeit aspiriert und mit mindestens 350 µl PBS-Tween pro Vertiefung ausgewaschen. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt und die Messplatte sorgfältig auf absorbierendem Papier ausgeklopft.

6. Sekundärer Antikörper:

Danach wird der zweite Antikörper hergestellt, indem x µl des Antikörpers (detection antibody) und y ml der Verdünnungslösung durch vorsichtiges Schwenken gemischt werden. 100 µl des verdünnten Antikörpers werden dann pro Vertiefung außer der Blank-Kontrolle mit einer Multipipette aufgetragen.

Die Platte wird mit einer Folie abgedeckt und eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) auf einem Schüttler bei 4000 Umdrehungen pro Minute inkubiert.

IL-8: $x=120$, $y=12$

IL-13: $x=120$, $y=12$

MIP-1 α : $x=24$, $y=12$

MIF: $x=24$, $y=12$

7. Waschen:

Im Anschluss wird die Flüssigkeit aus den Vertiefungen aspiriert und mit mindestens 350 µl PBS-Tween (einfache Konzentration) pro Vertiefung ausgewaschen. Dieser Vorgang wiederholt sich vier Mal. Danach wird die Messplatte sorgfältig auf absorbierendem Papier ausgeklopft.

8. Enzym-Konjugat-Lösung:

Jetzt wird x µl Streptavidin-PolyHorseRadish-Peroxidase mit y ml der Verdünnungslösung bzw. 0,5% Michpulver-PBS auf dem Vortex gemischt.

Dann werden 100 µl der Enzym-Konjugat-Lösung pro Vertiefung (außer Blank-Kontrolle) mit einer Multikanal-Pipette auftragen. Die Platte wird wiederum mit einer Folie abgedeckt und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

IL-8: $x=3$, $y=30$

IL-13: $x=3$, $y=30$

MIP-1 α : $x=3$, $y=12$

MIF: $x=6$, $y=12$

9. Waschen:

Im Anschluss wird die Flüssigkeit aus den Vertiefungen aspiriert und mit mindestens 350 µl PBS-Tween (einfache Konzentration) pro Vertiefung ausgewaschen. Dieser Vorgang muss sich diesmal sieben Mal wiederholen. Danach wird die Messplatte sorgfältig auf absorbierendem Papier ausgeklopft.

10. Substrat-Lösung:

Darauf werden 100 µl der kalten TMB-Lösung pro Vertiefung (inklusive Blank-Kontrolle) pipettiert. Die Messplatte soll ohne Folie bei Raumtemperatur im Dunkeln (Schrank oder Deckel) auf dem Schüttler inkubieren, wobei die Farbreaktion beobachtet werden muss. Die Umsetzung kann bis zu 30 Minuten dauern.

11. Stopp-Lösung:

Zuletzt werden 100 µl der Stopp-Lösung pro Vertiefung (inklusive Blank-Kontrolle) pipettiert. Nach fünf bis zehn Minuten kann die Platte gelesen werden.

12. Lesen der Platte:

Der ELISA-reader sollte einige Minuten vor Gebrauch eingeschaltet werden, damit dieser die Betriebstemperatur erreichen und die Software vorbereitet werden kann.

Die Platte wird mit dem Filter von 450 nm (mit Referenz-Filter OD 540 nm) gelesen.

13. Kalkulation der Konzentrationen

Zuerst wird in der Software die Zuordnung auf der Platte festgelegt. Die negative Kontrolle muss auf 0 pg/ml gesetzt und der Wert der Blank-Kontrolle von allen anderen Werten subtrahiert werden. Die Standardkurve wird nach der Formel für „Vier Parameter“ erstellt.

Es sollte immer geprüft werden, wie nah die kalkulierten Werte den erwarteten, in den Computer eingegebenen, kommen, um auf diese Weise die Qualität der Standardkurve zu sichern.

Einzelne Standard-Werte können aus der Kalkulation entfernt werden, um diese exakter zu gestalten, weil die beiden Standardreihen getrennt von einander pipettiert worden sind. Es müssen jedoch mindestens vier Messpunkte vorhanden sein, um bei einer „Vier Parameter“-Annäherung eine Standardkurve zu erstellen.

2.2.3.3 Arbeitsprotokoll zur Messung von TNF- α , TNF-R1, IL-1-RA, IL-1 β , IL-1-R1 und IA2A

Die Analysen wurden freundlicherweise vom Steno Diabetes Center in 2820 Gentofte, Dänemark nach dem zitierten Protokoll durchgeführt (Schloot *et al.* 2006).

2.2.4 Qualitätssicherung

2.2.4.1 falsch positiv kalkulierte Werte

1. Wenn andere Strukturen als die zu messende Substanz, für die die Antikörper spezifisch sind, ein Bindeglied zwischen dem auf der Platte fixierten und dem biotinverbundenen 2. Antikörper herstellen, so wird das TMB auch an diesen Stellen in der enzymatischen Farbreaktion umgesetzt und die OD (optische Dichte) erhöht sich.

Dieses Phänomen wird Kreuzreaktivität genannt und durch sogenannte heterophile Antikörper (Dietrich *et al.* 2001; Revelen *et al.* 2000) oder Rheumafaktoren verursacht (Abb. 7). Ursächlich hierfür ist die Tatsache, dass komplexe Proteinmoleküle wie Antikörper mehrere bindungsfähige Oberflächeneigenschaften besitzen.

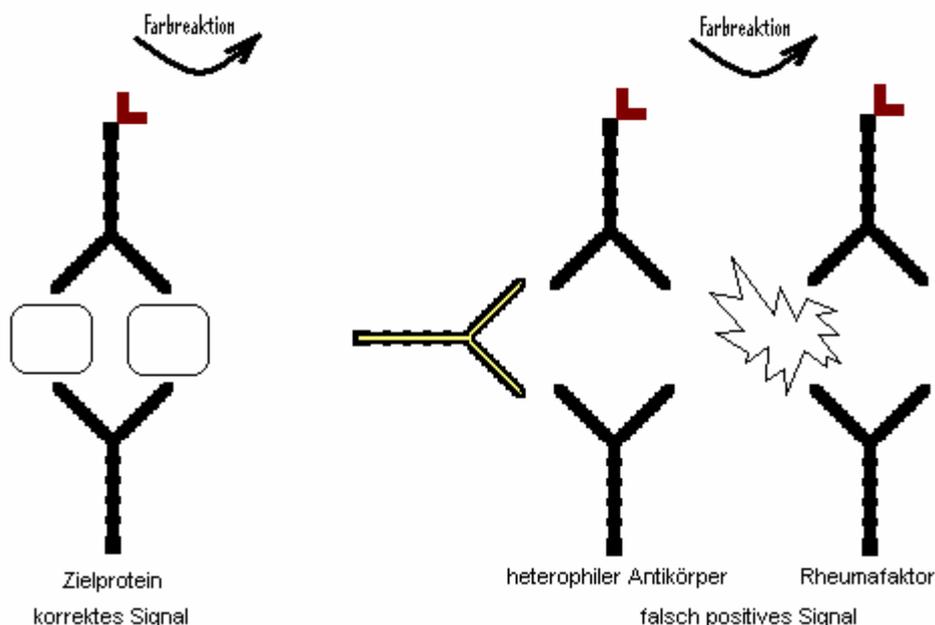


Abb. 7: Falsch positive Signale durch heterophile Antikörper und Rheumafaktoren, die ein Anlagern des mit Biotin gekoppelten zweiten Antikörpers verursachen, welches eine falsche, unspezifische Farbreaktion zur Folge hat.

Ebenso ist es denkbar, dass der zweite Antikörper direkt, d.h. ohne zwischengeschaltetes Antigen, an den ersten Antikörper bindet.

Es hat sich erwiesen, dass sich durch das Verwenden von FCS (10%) in den Verdünnungslösungen (She *et al.* 1999) und die Inkubation bei 4°C über Nacht auf einem Schüttler dieses Phänomen weitgehend verhindern lässt.

Als Kontrolle empfiehlt es sich, einige Proben mit einem für die zu messende Substanz unpassenden zweiten Antikörper zu messen. Läuft dennoch eine Farbreaktion ab, so werden die Signale nicht von der zu messenden Substanz verursacht, sondern von heterophilen Proteinen. Akzeptiert werden kann auch die Lösung durch die Messung der so genannten negativen Kontrolle, d.h. der reinen Verdünnungslösung. Die resultierende Farbreaktion der

negativen Kontrolle wird als falsch positiv erkannt und die entsprechende OD der Konzentration 0 pg/ml zugeordnet.

Dementsprechend werden alle jeweils ermittelten Konzentrationen von Test- und Standardlösungen korrigiert.

2. Zur Vermeidung des Anlagerns von Proteinen außer dem ersten Antikörper an der Wand der Platte dient der Vorgang des Blockens, bei dem durch Inkubation des reinen Trägermediums (z.B. FCS-PBS 10%) die nach dem Coating noch vorhandenen freien Bindungsmöglichkeiten am Kunststoff mit niedermolekularen unspezifischen Substanzen besetzt werden.

3. Bei Zugabe des TMB, das dunkel und kühl gelagert werden muss und nicht blau verfärbt sein darf, kann dieses mit freien, d.h. nicht an Antikörper-Antigen-Antikörper-Biotin-Komplexe gebundenen, Avidin-Peroxidase-Molekülen reagieren.

Um diese im Resultat sehr schwer wiegende Fehlreaktion zu vermeiden, ist vor allem bei diesem Arbeitsschritt ein sehr gründliches Auswaschen aller nicht gebundenen Substanzen unerlässlich.

2.2.4.2 falsch negativ kalkulierte Werte

Die meisten Fehler in diesem Bereich entstehen entweder aus falsch berechneten Antikörperkonzentrationen oder durch eine defekte Struktur der zu messenden Substanz oder Antikörper.

Um zu verhindern, dass Protein denaturiert, sollte man eine Serumprobe nicht mehr als drei mal auftauen und wieder einfrieren, sie nicht länger als fünf Sekunden vortexen und möglichst auf Eis pipettieren (Hanifi-Moghaddam 2003).

Wichtig ist auch die richtige Lagerung von Puffern, Antikörpern, rekombinantem Protein, der Streptavidin-Peroxidase und des TMB.

Weiterhin wichtig sind eine optimale Pufferzusammensetzung (Coating Puffer, Waschpuffer, Puffer für die Streptavidin-Peroxidase) im Hinblick auf pH-Wert und verwendete Salze (z.B. Phosphat oder Carbonat), eine ausreichend hohe Antikörperkonzentration im Puffer sowie sorgfältige Auswahl der Inkubationsdaten (Temperatur, Dauer).

Eine Kontrolle über die Größenordnung möglicher Fehler oder Interaktionen wird über die Durchführung des „spiking“ erlangt.

Dabei wird einem Untersuchungsgut (z.B. Serum), das keine messbare Konzentration des jeweiligen Zytokins enthält (also ein „negatives“ Medium) eine definierte Menge genau dieses Zytokins zugesetzt und ermittelt, zu welchem Anteil dieses nun noch nachweisbar bleibt.

2.2.4.3 Kontrollen und Statistik

Die Standardkurve wurde in Duplikaten, die Proben in Unikaten gemessen. 10% der Proben wurden wiederholt mit einer Abweichung unter 20%.

Die durchschnittliche Intra-Assay Variation lag unter 10%, die Inter-Assay Variation unter 11%. Unterschiede in den spiking-Experimenten zwischen erwarteten und gemessenen Konzentrationen ergaben weniger als 15%.

Die Detektionsgrenzen errechneten sich aus dem Mittelwert der Konzentrationen der niedrigsten Standards, die positiv waren. Dazu wurde die doppelte Standardabweichung addiert und das Ergebnis mit der Verdünnung multipliziert: $L = (\bar{x} + 2s) * f$.

L= Detektionslimit

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_n x_n, \text{ Mittelwert der niedrigsten Standardwerte}$$

$x_n \in \mathcal{R}^{>0}$, niedrigste Standardwerte, Einheit: pg/ml

n= Nummer der Platte des jeweiligen Assays

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_n (x_n - \bar{x})^2}, \text{ Streuung des Mittelwerts}$$

f= Verdünnungsfaktor

Damit lagen die Detektionsgrenzen für IL-8 bei 3 pg/ml, für IL-13 bei 5 pg/ml, für MIP1- α bei 7,5 pg/ml und für MIF bei 95 pg/ml.

Alle gemessenen Konzentrationen unterhalb dieses Limits wurden auf die Hälfte der Detektionsgrenze gesetzt.

Die Linearität des Signals der Standardkurve, die eine Voraussetzung für die Genauigkeit der Annäherung der Konzentrationen ist, war zwischen einer OD von 0,05 und 2 gegeben. Seren, die ein Signal über einer OD von 2,0 zeigten, wurden mit einer höheren Verdünnung wiederholt gemessen.

Alle 329 Probanden wurden in der statistischen Auswertung berücksichtigt. Es standen pro Proband zwischen zwei und fünf Serumproben in einem Abstand von mindestens einem Jahr zur Verfügung, so dass die Anzahl der Datenpunkte von Zeitpunkt zu Zeitpunkt variiert.

Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen, wie z.B. zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern, wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test untersucht. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als signifikant erachtet. Die Vergleiche der Serumkonzentrationen zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten (longitudinal) desselben Patienten wurden mit dem Wilcoxon signed rank Test gemacht. Für Korrelationen wurde die Spearman Rang Korrelation verwendet.

Bei binomial verteilten Daten nutzten wir Fischers exakten Test, bei multinomial verteilten den Chi-Quadrat-Test.

Um die Anzahl der nötigen statistischen Tests nicht zu erhöhen, wurde der Datensatz nicht nach Alter und Geschlecht adjustiert.

Für die statistischen Analysen wurden Excel (Microsoft, Seattle, USA), GraphPad Prism Version 3,0 und 4,0 für Windows (GraphPad Software, SanDiego, USA) und SAS 9,1 (SAS Institut Inc., Cary, NC, USA) genutzt.

Die Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit der Biometrie des DDZ, namentlich Dr. Strassburger, erstellt.

3 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es zu prüfen, ob

erstens die Zytokine IL-13 und MIF und die Chemokine IL-8 und MIP1- α sowie IA2A und TNF- α , TNF-R1, IL-1-RA, IL-1 β und IL-1-R1 die spätere Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 1 vorhersagen können (Prädiktion), zweitens, ob sich im Verlauf über 5 Jahre die Zyto- und Chemokin sowie die IA2A-Konzentration in charakteristischer Weise verändern und drittens, ob es Zusammenhänge zwischen genetischer Disposition, Alter, Geschlecht oder Art der Behandlung mit Zytokinen, Chemokinen oder Antikörpern gibt.

3.1 Untersuchungen zum Zeitpunkt vor Einnahme von Nikotinamid (prädiktiver Wert, t1)

3.1.1 Vergleich zwischen der Nikotinamid- und Plazebo-Gruppe

Da alle Probanden beim Eintritt in die Studie unbehandelt waren, war es wichtig darzustellen, dass sich die Aktivität des Immunsystem, objektivierbar gemacht anhand unserer gemessenen Zyto- und Chemokine, nicht zwischen den Gruppen der später mit Nikotinamid oder mit Plazebo Behandelten unterscheidet. Abbildung 8 A vergleicht die unterschiedlich Behandelten in der Gruppe der Gesunden, während Abbildung 8 B die späteren Diabetiker vergleicht.

Erwartungsgemäß unterschied sich die Gruppe, die später Plazebo erhielt, nicht von der Verumgruppe vor der Tabletteneinnahme (Mann-Whitney-Test). Diese Aussage ist Voraussetzung für eine korrekte Beurteilung des weiteren Verlaufs der Zyto- und Chemokinkonzentrationen bei den Studienteilnehmern.

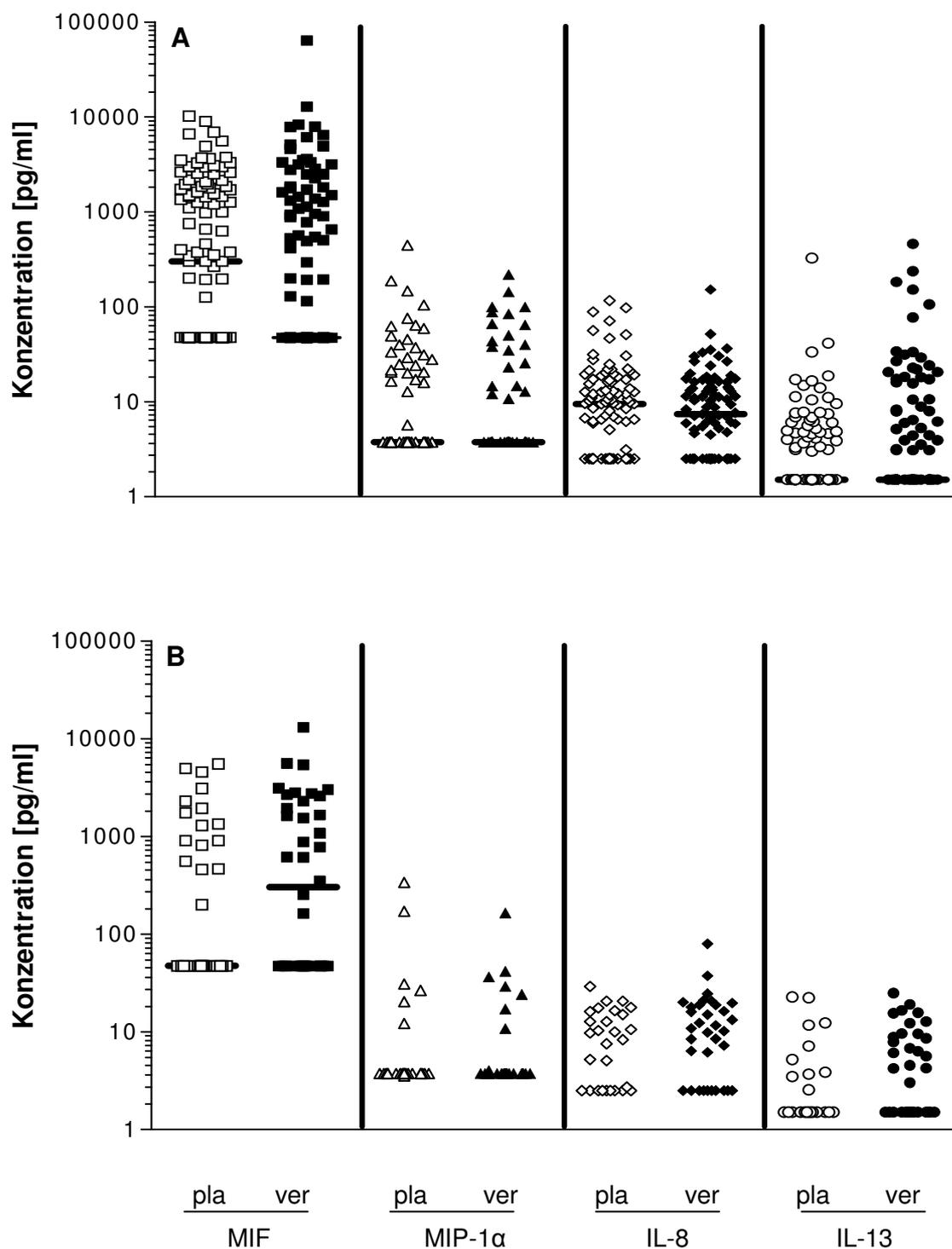


Abb. 8: Vergleich zwischen den Serumkonzentrationen von MIF, MIP-1 α , IL-8 und IL-13 der Probanden, die später mit Plazebo (pla, n=144) bzw. mit Verum (ver, n=148) behandelt wurden zum Zeitpunkt 1, getrennt in Nicht-Diabetiker (n=219, A) und spätere Diabetiker (n=73, B). Dargestellt sind individuellen Zytokin- bzw. Chemokinkonzentrationen und die Mediane derselben.

3.1.2 Vergleich zwischen späteren Diabetikern und Nicht-Diabetikern

Die erste Serumentnahme wurde vor der ersten Tablettengabe durchgeführt, also vor der iatrogenen Beeinflussung des Immunsystems. Damit stand eine objektive Ausgangsmessung zur Verfügung, die dem natürlichen Verlauf des Prädiabetes entspricht. Um einen Parameter für die Prädiktion nutzen zu können, sollte er bei den verschiedenen Gruppen unterschiedlich ausfallen. Es konnten mit dem Wilcoxon-Test jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Serumkonzentrationen der Zytokine, Chemokine und Monokine derer, die später einen Diabetes mellitus Typ 1 entwickelten („Progressors“) und derer, die über den beobachteten Zeitraum gesund blieben („non-Progressors“), nachgewiesen werden (Abb. 9).

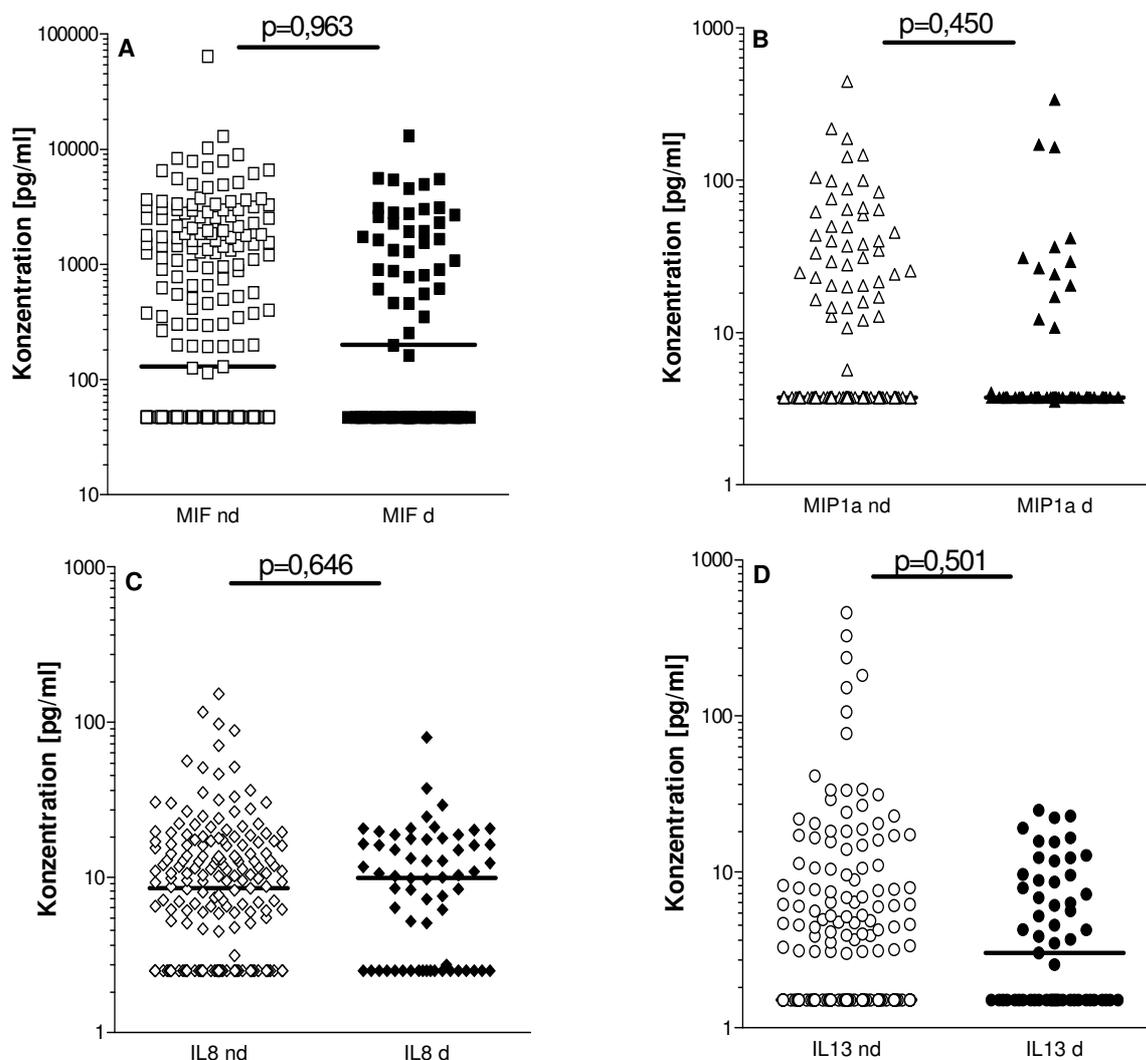


Abb. 9: Vergleich der Serumkonzentrationen von MIF (A), MIP-1α (B), IL-8 (C) und IL-13 (D) zwischen Nicht-Diabetikern (nd, n=219) und späteren Diabetikern (d, n=73) zum Zeitpunkt 1. Dargestellt sind die Einzelwerte und Mediane der individuellen Zytokin- bzw. Chemokinkonzentrationen.

Nicht graphisch dargestellt sind folgende auswärts bestimmte Zytokine und Monokine, die im Serum der Probanden, die später diabetisch werden und derer, die gesund blieben, ebenfalls keine Unterschiede zeigen (TNF- α ($p=0,301$), TNF-R1 ($p=0,331$), IL-1-RA ($p=0,120$), IL-1 β ($p=0,681$) und IL-1-R1 ($p=0,575$)).

Der auswärtig bestimmte Antikörper IA2A dagegen zeigt einen deutlichen signifikanten Unterschied in dessen Serumkonzentration von Nicht-Diabetikern im Vergleich zu späteren Diabetikern (Abb. 10).

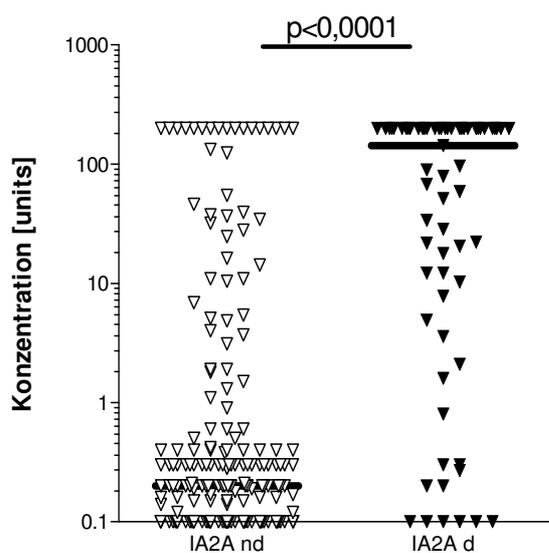


Abb 10: Vergleich der Serumkonzentrationen von IA2A zwischen Nicht-Diabetikern und späteren Diabetikern zum Zeitpunkt 1. Dargestellt ist zusätzlich der Median von IA2A. Der obere Grenzwert beträgt 200 units und ist experimentbedingt.
[Rohdaten: Steno Diabetes Center, DK]

3.2 Longitudinale Verläufe der Zytokin- und Chemokinspiegel

3.2.1 Zytokine und Chemokine

Bisher noch nicht bekannt waren die Verläufe von Zyto- und Chemokinkonzentrationen im Serum in den Jahren vor der Manifestation eines Diabetes mellitus Typ 1.

Die vier folgenden Kapitel stellen die longitudinalen Verläufe der Serumkonzentration der vier ausgewählten Immunmarker während der fünf Beobachtungsjahre dar.

Verglichen werden die Nicht-Diabetiker mit den späteren Diabetikern, da ein Unterschied als das entscheidene Merkmal eines Surrogatmarkers gewertet werden könnte. Zusätzlich werden die unterschiedlich Behandelten verglichen, um eine mögliche Differenz der Wirkung von Nikotinamid und Plazebo auf das Immunsystem darzustellen.

3.2.1.1 MIP-1 α

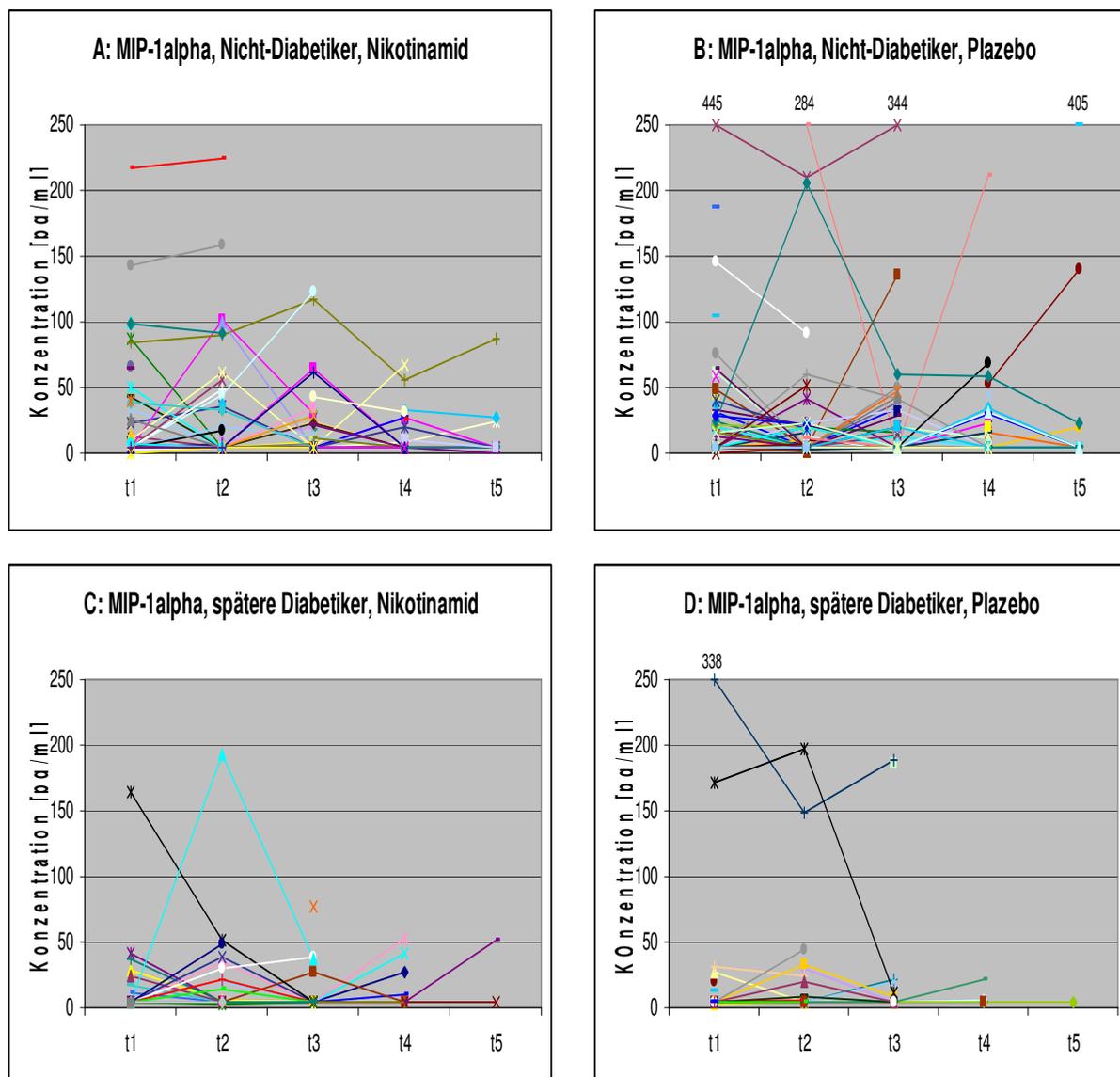


Abb. 11, A-D: Die Graphiken stellen die Serum-MIP-1 α -Konzentrationen in pg/ml in Abhängigkeit von der Zeit dar.

A= Gesunde, die mit Nikotinamid behandelt wurden (n=115), B= Gesunde, die mit Plazebo behandelt wurden (n=123)

C= spätere Diabetiker, die mit Nikotinamid behandelt wurden (n=47), D= spätere Diabetiker, die mit Plazebo behandelt wurden (n=36)

Die Darstellung der Daten zeigt, dass die MIP-1 α -Spiegel zwar individuell variieren, in der Gesamtheit jedoch konstant bleiben, die Mehrzahl der Datenpunkte im Bereich vom Detektionslimit bis 50 pg/ml. Sie besitzen weder optisch noch statistisch Ordnungen oder fass- bzw. beschreibbare Gesetzmäßigkeiten (Abb. 11).

Dabei machte es weder ein Unterschied, ob die Personen mit Nikotinamid oder Plazebo behandelt wurden oder ob die Personen gesund oder krank waren.

3.2.1.2 IL-8

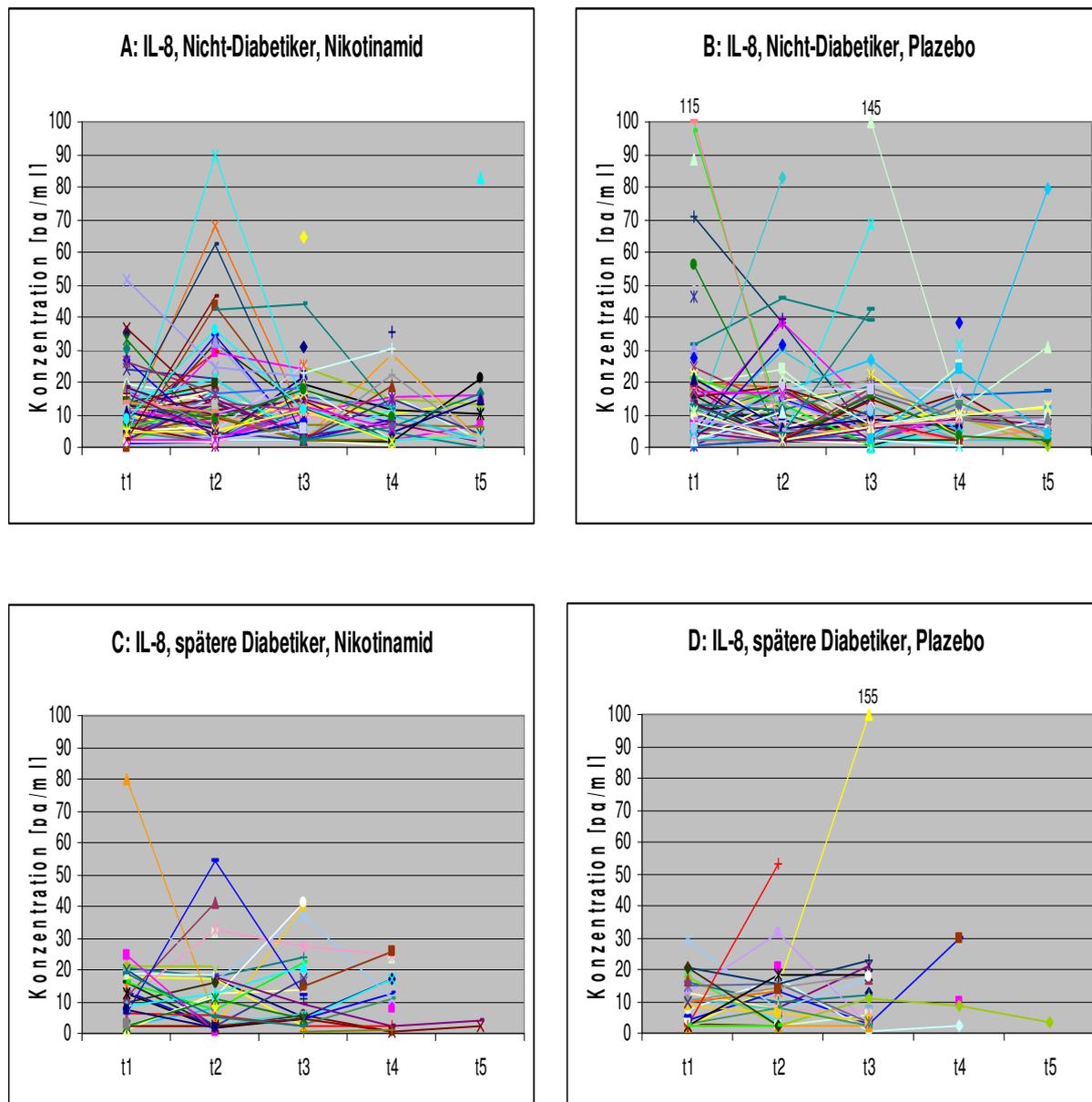


Abb. 12, A-D: Die Graphiken stellen die Serum-IL-8-Konzentrationen in pg/ml in Abhängigkeit von der Zeit dar.

A= Gesunde, die mit Nikotinamid behandelt wurden (n=116), B= Gesunde, die mit Plazebo behandelt wurden (n=125)

C= spätere Diabetiker, die mit Nikotinamid behandelt wurden (n=47), D= spätere Diabetiker, die mit Plazebo behandelt wurden (n=36)

Auch die Serumkonzentrationen von IL-8 verändern sich in ihrer Gesamtheit nicht systematisch, obwohl es optisch so wirkt, als sei die Konzentration bei den Gesunden, die mit Nikotinamid behandelt wurden, zum Zeitpunkt 2 erhöht. Statistisch gibt es keine signifikanten Unterschiede.

3.2.1.3 IL-13

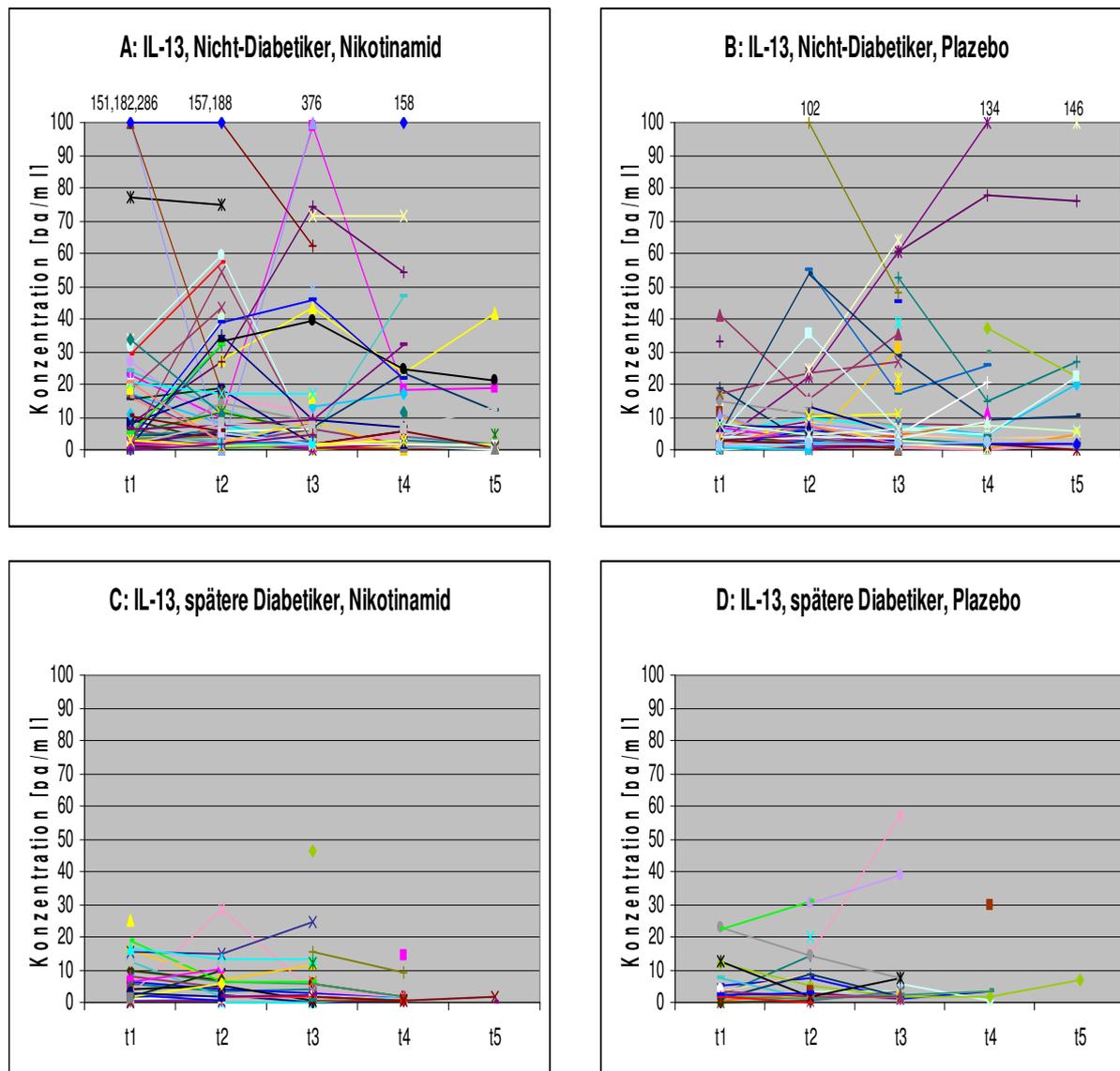


Abb. 13, A-D: Die Graphiken stellen die Serum-IL-13-Konzentrationen in pg/ml in Abhängigkeit von der Zeit dar.

A= Gesunde, die mit Nikotinamid behandelt wurden (n=116), B= Gesunde, die mit Plazebo behandelt wurden (n=124)

C= spätere Diabetiker, die mit Nikotinamid behandelt wurden (n=47), D= spätere Diabetiker, die mit Plazebo behandelt wurden (n=36)

Die IL-13-Serumkonzentrationen scheinen bei den späteren Diabetikern zwar erniedrigt zu sein, variieren auch individuell, zeigen aber keine statistisch signifikanten Unterschiede.

3.2.1.4 MIF

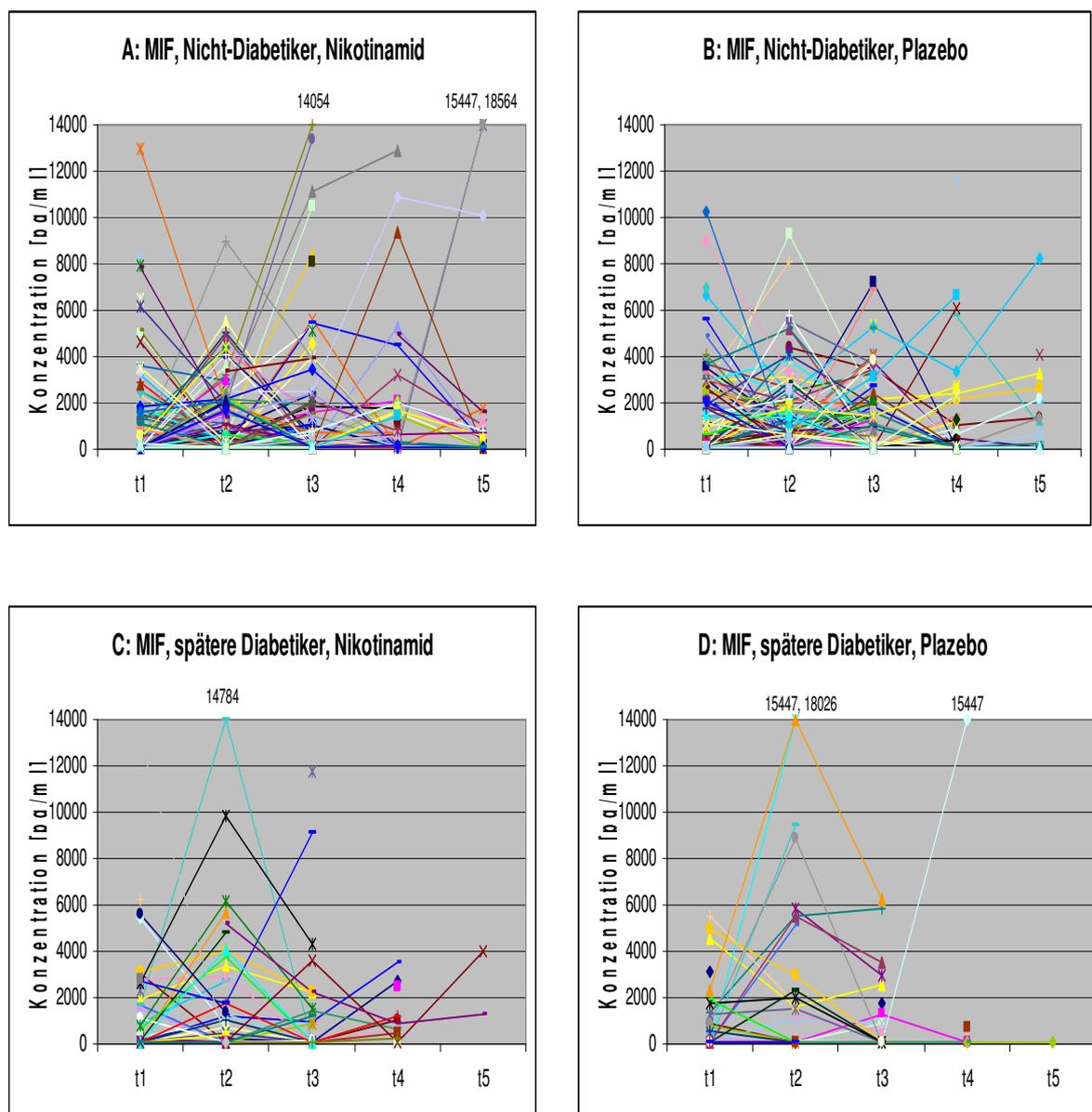


Abb. 14, A-D: Die Graphiken stellen die Serum-MIF-Konzentrationen in pg/ml in Abhängigkeit von der Zeit dar.

A= Gesunde, die mit Nikotinamid behandelt wurden (n=122), B= Gesunde, die mit Plazebo behandelt wurden (n=123)

C= spätere Diabetiker, die mit Nikotinamid behandelt wurden (n=47), D= spätere Diabetiker, die mit Plazebo behandelt wurden (n=36)

Optisch scheinen die MIF-Serumkonzentrationen zum Zeitpunkt t2, also ein Jahr nach Tabletteneinnahme, erhöht, so dass im Folgenden der longitudinale Verlauf im Detail besprochen wird.

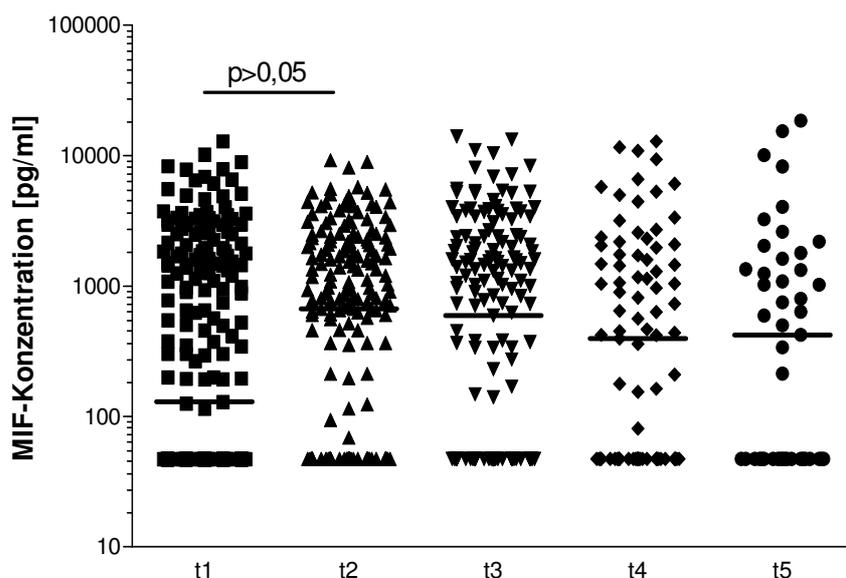


Abb. 15: Die MIF-Serumkonzentrationen im Verlauf bei allen Nicht-Diabetikern (n=247) über 5 Jahre

Der tendentielle Anstieg der MIF-Serumkonzentration bei den Nicht-Diabetikern (Abb. 14, A+B) ist statistisch nicht signifikant (Abb. 15), der Verlauf stellt sich also konstant dar.

Anders bei den Personen, die später einen Diabetes entwickelten:

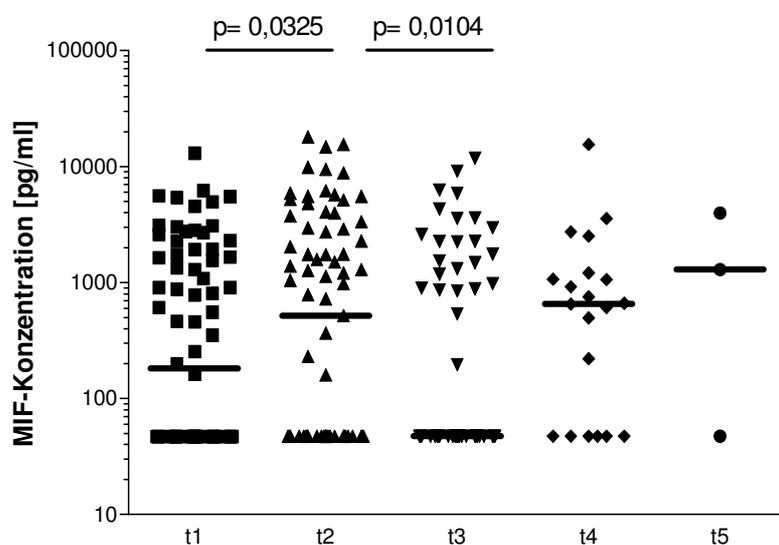


Abb. 16: Die MIF-Serumkonzentrationen im Verlauf bei allen späteren Diabetikern (n=85) über 5 Jahre

Ein Jahr nach Tabletteneinnahme (t2) zeigten sie einen signifikanten Anstieg der MIF-Serumkonzentration (Abb. 16), sowohl im Vergleich zum Zeitpunkt 1 ($p=0,0325$, Mann-Whitney-Test) als auch zum Zeitpunkt 3 ($p=0,0104$, Mann-Whitney-Test). Der Grund für diesen Anstieg ist nicht in der unterschiedlichen Behandlung zu finden, da sich die Verumvon der Plazebogruppe nicht wesentlich unterscheidet (Abb. 17).

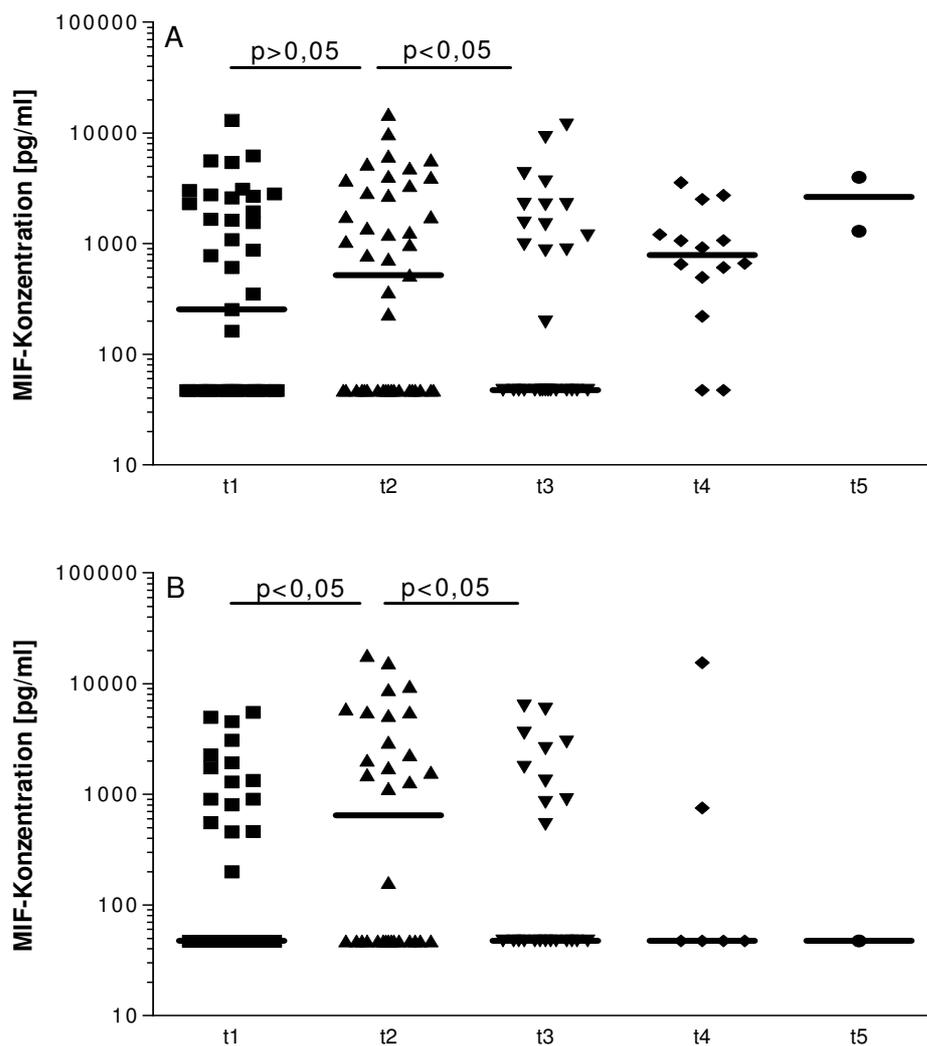
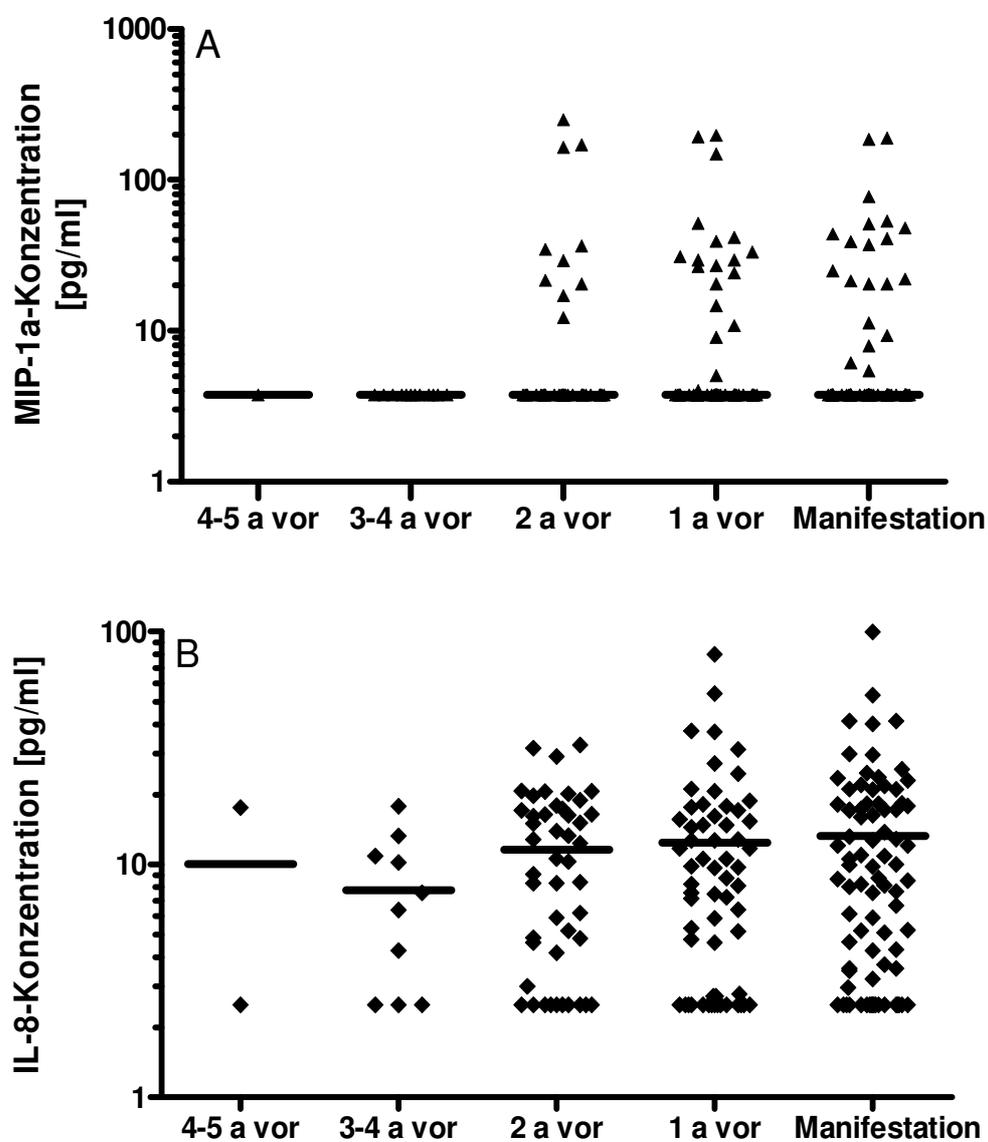


Abb. 17: Die MIF-Serumkonzentrationen bei Personen, die später Diabetes bekamen, im Verlauf der 5 Jahre, getrennt in die, die Nikotinamid bekommen haben (A, n=47) und die, die Plazebo bekommen haben (B, n=36).

3.2.1.5 Der longitudinale Verlauf der Zytokin- und Chemokinspiegel -synchronisiert vor Manifestation des Diabetes mellitus Typ 1

Um den Verlauf direkt vor der Diabetes mellitus Typ 1- Manifestation darzustellen, wurden die Daten auf den Zeitpunkt der Manifestation hin synchronisiert.

Auch in diesen Darstellungen zeigen sich keine optischen und statistischen signifikanten Veränderungen des Immunmarkerverlaufs, die Spiegel stellen sich vielmehr allesamt stabil dar (Abb. 18).



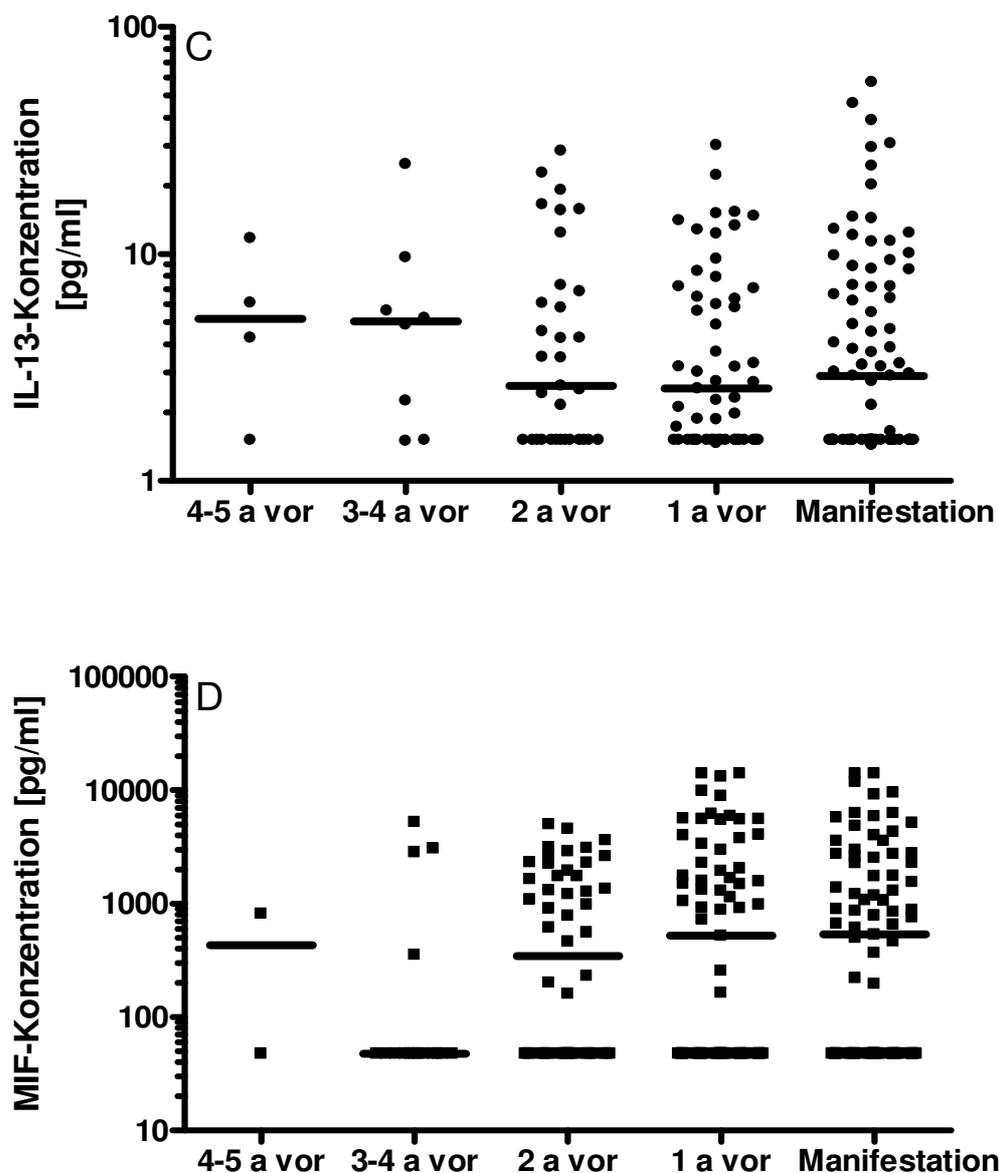


Abb. 18: Verlauf der Markerkonzentrationen, synchronisiert Jahre (a) vor Manifestation des Diabetes mellitus Typ 1
Dargestellt sind individuellen Zytokin- bzw. Chemokinkonzentrationen und die Mediane derselben.

A=Serumkonzentrationen von MIP-1 α im Verlauf vor Manifestation des Diabetes mellitus Typ 1 bei insgesamt 80 Patienten

B= Serumkonzentrationen von IL-8 im Verlauf vor Manifestation des Diabetes mellitus Typ 1 bei insgesamt 82 Patienten

C= Serumkonzentrationen von IL-13 im Verlauf vor Manifestation des Diabetes mellitus Typ 1 bei insgesamt 79 Patienten

D= Serumkonzentrationen von MIF im Verlauf vor Manifestation des Diabetes mellitus Typ 1 bei insgesamt 83 Patienten

Die optische Erniedrigung der MIF-Serumkonzentration im dritten bis vierten Jahr vor Manifestation des Diabetes mellitus Typ 1 ist statistisch nicht signifikant.

3.2.2 Antikörper

Unterschiede zwischen der Nikotinamid- und der Plazebogruppe finden sich bei den auswärtig bestimmten IA2-Antikörpern (Tab. 5). Gemäß dem Fishers exact test findet man bei denen, die mit Nikotinamid (Verum) behandelt wurden, im Gegensatz zur Plazebogruppe weniger positive Differenzen ($p=0,0036$), das heißt, dass der IA2A-Spiegel während des ersten Jahres bei Nikotinamid-Behandelten signifikant häufiger sinkt, wobei die Quantität, also das Ausmaß der Konzentrationsverringering keine Rolle spielt.

Tab. 5: Verlauf der IA2A-Serumkonzentrationen im ersten Jahr nach Tabeletteneinnahme von den Probanden, von denen beide Zeitpunkte zur Verfügung standen. [Rohdaten: Erhebung im Rahmen des ENDIT Trials]

<=: Der Serumspiegel sinkt oder bleibt gleich, >: Der Serumspiegel steigt.

-IA2A-	<=	>	total
Verum	73	29	102
Plazebo	50	48	98
total	123	77	200

Untersucht man diesen Sachverhalt, indem man die IA2A-Verläufe in abfallend, gleich bleibend und ansteigend klassifiziert (Chi-Square-Test, Tab. 6), so wird zusätzlich deutlich, dass der IA2A-Spiegel während des ersten Jahres bei Plazebo-Behandelten steigt ($p=0,009$).

Tab. 6: Verlauf der IA2A-Serumkonzentrationen im ersten Jahr nach Tabeletteneinnahme von den Probanden, von denen beide Zeitpunkte zur Verfügung standen. [Rohdaten: Erhebung im Rahmen des ENDIT Trials]

<: Der Serumspiegel sinkt, =: Der Serumspiegel bleibt gleich, >: Der Serumspiegel steigt.

-IA2A-	<	=	>	total
Verum	37	36	29	102
Plazebo	22	28	48	98
total	59	64	77	200

Eine Korrelation zwischen IA2A und den gemessenen Zyto-, Chemo- und Monokinen findet sich zu keinem Zeitpunkt.

Zum Alter korreliert die IA2A-Konzentration negativ ($r=-0,3798$), das heißt, je jünger die Probanden sind, desto höhere IA2A-Konzentrationen sind im Serum zu messen (Spearman, $p<0,0001$). Dies gilt für das Gesamtkollektiv zum Zeitpunkt t1.

Unterteilt man nun in Diabetiker und Nicht-Diabetiker, zeigt sich, dass die Korrelation nur in der Gruppe der Nicht-Diabetiker besteht (Spearman, $r=-0,2605$, $p=0,0002$), es in der Gruppe der Diabetiker jedoch keinen Zusammenhang zwischen Alter und IA2A-Serumkonzentration nachweisbar ist ($p=0,385$).

3.3 Sonstige Analysen

3.3.1 Alters- und Geschlechtsverteilung der Diabetesentwicklung

Um zu prüfen, ob andere Einflussgrößen wie Alter oder Geschlecht mit einer späteren Diabetesentwicklung einhergehen, wurden zum Zeitpunkt t1 diese möglichen Einflussgrößen zwischen späteren Diabetikern und Nicht-Diabetikern verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die Probanden, die später einen Diabetes mellitus Typ 1 entwickeln, jünger sind als die Gesunden ($p<0,0001$, Mann-Whitney, Abb. 19A). Ebenso scheinen die männlichen Probanden jünger als die weiblichen zu sein ($p=0,051$, Mann-Whitney, Abb. 19 B).

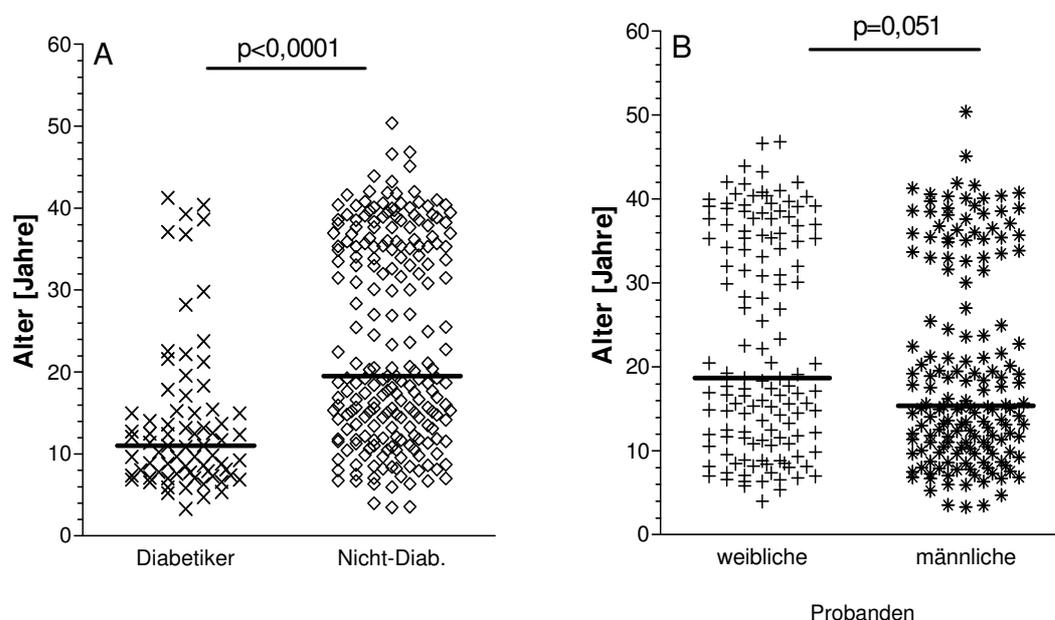


Abb. 19 A: Altersunterschied zwischen späteren Diabetikern (n=73) und Nicht-Diabetikern (n=219)

B: Altersunterschied zwischen weiblichen (n=132) und männlichen Probanden (n=160)

3.3.2 Einfluss von Alter und Geschlecht auf Immunmediatoren

Außer bei IL-13, dass bei den Nicht-Progressoren negativ ($r = -0,185$) mit dem Alter ($p = 0,0042$, Spearman Rang Korrelation) korreliert, findet sich kein Einfluss des Alters auf die gemessenen Zyto-, Chemo- und Monokine.

Alle gemessenen Immunparameter stellten sich unabhängig von Alter und Geschlecht dar, außer MIF, das bei diabetischen Frauen tendenziell höher zu sein scheint als bei den Männern, die Diabetes entwickelten ($p = 0,0511$, Mann-Whitney, Abb. 20).

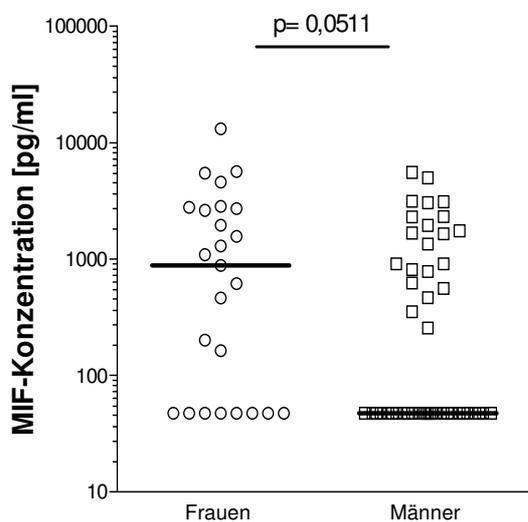


Abb. 20: Vergleich der MIF-Serumkonzentrationen zwischen diabetischen Frauen (n=25) und Männern (n=48)

3.3.3 Assoziation der Immunmarker mit der Insulinproduktion

Die folgende Abbildung veranschaulicht, dass die MIF-Serumkonzentration zum Zeitpunkt t1 signifikant höher ist ($p=0,0042$, Wilcoxon-Test), wenn die Probanden eine niedrige FPIR (First Phase Insulin Response) haben, das heißt, nach einem ivGTT eine Insulinproduktion besitzen, die unter der 10. Perzentile liegt.

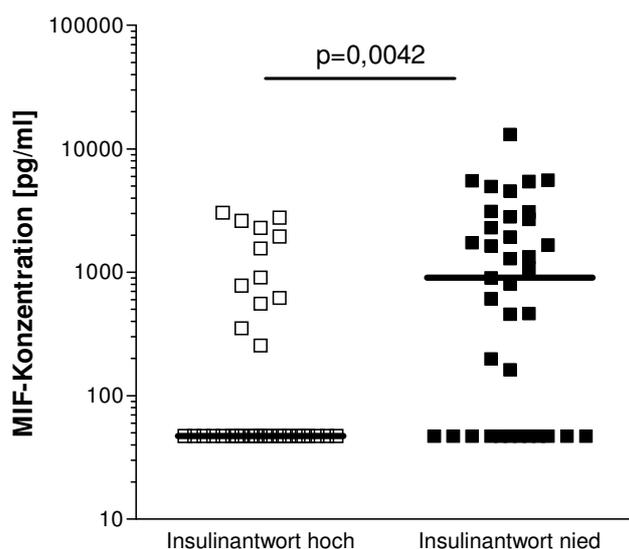


Abb. 21: Vergleich der MIF-Serumkonzentration zwischen späteren Diabetikern, die nach einem ivGTT eine niedrige frühe Insulinantwort (FPIR) haben ($n=37$) und denen, die auf den Glukosereiz mit einer adäquateren Insulinsekretion reagieren ($n=34$). [Rohdaten: Erhebung im Rahmen des ENDIT Trials]

Weitere Analysen des von uns bearbeiteten Subkollektivs der ENDIT-Probanden zeigen, dass die FPIR selbst prädiktiv einzuordnen ist, da eine Diabetes mellitus Typ 1-Manifestation hoch signifikant häufiger bei den Probanden auftritt, die eine inadäquate Insulinantwort besitzen ($p<0,0001$, Fishers exakter Test) (Tab. 7).

Tab. 7: Aufteilung der 90 Probanden mit niedriger und der 189 Probanden mit normaler FPIR in Gesunde und spätere Diabetiker zum Zeitpunkt t1. [Rohdaten: Erhebung im Rahmen des ENDIT Trials]

Insulinantwort	Nicht-Diabetiker	spätere Diabetiker	
niedrig	53	37	90
normal	155	34	189
total	208	71	279

3.3.4 Assoziation von Krankheit und Immunmarkern mit genetischer Disposition

Probanden mit dem Allel DQ8 bekommen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einen Diabetes mellitus Typ 1 ($p=0,0206$, exakter Fisher-Test, Tab. 8), während solche mit einem DQ6-Allel die Erkrankung signifikant seltener entwickeln ($p=0,0013$, exakter Fisher-Test, Tab 9)

Tab. 8: Zusammenhang zwischen dem HLA-Allel DQ8 und der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 1

-DQ8-	Kein DQ8	DQ8	Total
Nicht-Diabetiker	123	117	240
Diabetiker	29	51	80
total	152	168	320

Tab. 9: Zusammenhang zwischen dem HLA-Allel DQ6 und der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 1

-DQ6-	Kein DQ6	DQ6	Total
Nicht-Diabetiker	203	37	240
Diabetiker	78	2	80
total	281	39	320

[Rohdaten: Erhebung im Rahmen des ENDIT Trials]

Bei Probanden, die das HLA-Allel DQ2 besitzen, scheint IL-13 tendentiell niedriger zu liegen als bei denen ohne DQ2 ($p=0,066$, Mann-Whitney-Test, Abb. 22). Bei allen anderen untersuchten Parametern wurde eine solche Korrelation nicht gefunden.

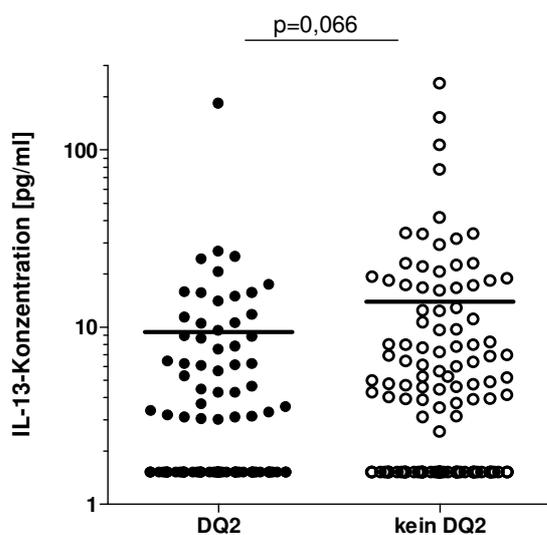


Abb. 22: Vergleich der IL-13-Serumkonzentrationen von Probanden mit und ohne das HLA-Allel DQ2

4 Diskussion

Autoantikörper wie ICA, GADA, IA2A und IAA haben sich als wertvolle Marker für ein mögliches Manifestationsrisiko des Diabetes mellitus Typ 1 erwiesen (Buczowska & Chobot 2003; Cesarini *et al.* 2003; Cosmescu *et al.* 2004), im ENDIT entwickelten 29 % der Probanden mit einem hohen ICA-Titer Diabetes mellitus Typ 1 (Bingley & Gale 2006). Mit dem Autoantikörpernachweis kann jedoch nicht vorausgesagt werden, wann sich die Erkrankung manifestiert (Decochez *et al.* 2000; Mrena *et al.* 1999; Seissler *et al.* 1998; Verge *et al.* 1998).

Ähnlich kann auch die HLA-Genotypisierung zur Abschätzung des Risikos, an Diabetes mellitus Typ 1 zu erkranken, beitragen (Buzzetti *et al.* 2004; Cerna *et al.* 2004), aber sie ist kein Verlaufsparemeter, der sich bei immunologischen Veränderungen im Körper entsprechend ändern kann oder anhand derer der Zeitpunkt der Manifestation bestimmt werden kann.

Daher werden Parameter gesucht, die charakteristisch sind für ein bestimmtes Stadium der Krankheitsprogression. Vorstudien haben gezeigt, dass möglicherweise verschiedene Zytokine und Chemokine dafür in Frage kommen (Shimada *et al.* 2001; Nicoletti *et al.* 2001; Berman *et al.* 1996; Winkler *et al.* 1998; Cavallo *et al.* 1991; Hussain *et al.* 1996).

Um geeignete Immunparameter zu identifizieren, sind Studienkollektive notwendig, die über ausreichende Patientenzahlen verfügen und bei denen ausreichend lange, das heißt mehrere Jahre, Nachuntersuchungen und –beobachtungen zur Verfügung stehen.

Das ENDIT verfügt über ein solches Kollektiv, das mit 549 Probanden, die aus 30000 erstgradig mit Diabetes mellitus Typ 1-Patienten Verwandten nach den in Kapitel 2.1 besprochenen Kriterien ausgewählt wurden, über eine ausreichende Größe und mit Nachkontrollen bis zu 5 Jahren über eine lange Beobachtungszeit verfügt, so dass statistisch eine große Aussagekraft besteht.

Weil Nikotinamid Mäuse vor dem autoimmunen Diabetes schützen kann (Kapitel 2.4), auch beim Menschen Vorstudien erfolgreich gewesen waren (Elliott & Chase 1991; Elliott *et al.* 1996; Gale 1996), waren die Erwartungen oder Hoffnungen bezüglich des protektiven Effekts von Nikotinamid hoch. Während die Studie noch lief, wurde die ein Jahr vor dem ENDIT begonnene kleinere Deutsche Nikotinamid Interventionsstudie (DENIS) (Lampeter 1993) abgebrochen, weil sie zeigte, dass Nikotinamid die Manifestation des Diabetes mellitus Typ 1 weder verzögern noch verhindern konnte (Lampeter *et al.* 1998). Da für die DENIS nur Probanden bis zum zwölften Lebensjahr rekrutiert wurden, für das ENDIT hingegen bis zum 50. und letztes größer angelegt war, entschied man sich, ENDIT fortzuführen.

Leider wurde aber das Ergebnis der DENIS im ENDIT bestätigt (Gale *et al.* 2004; Reimers *et al.* 2005).

Die Studie hat aber gezeigt, dass so große multizentrische, internationale und interkontinentale, über einen langen Zeitraum durchgeführte, Studien möglich und im Hinblick auf die Prädiktion und Evidence-Based Medicine (EBM) wichtig sind (Philips & Scheen 2002).

Außerdem scheint die Frage im Raum zu stehen, ob für eine Prävention die richtige Prädiktion existiert, weil das Risiko der Probanden, die wir zurzeit mit unseren Markern (Autoantikörper wie ICA oder IA2A) entdecken und für die Studien auswählen, schon sehr hoch, vielleicht schon zu hoch ist (Schatz *et al.* 2003). Gäbe es also sensitivere Marker für ein erhöhtes Diabetesrisiko, wäre die prädiabetische Phase noch nicht so fortgeschritten und es könnten immunologische Veränderungen und Zerstörung der β -Zellen in einem Stadium verhindert werden, die die Manifestation des Diabetes mellitus Typ 1 unwahrscheinlich bzw. unmöglich macht.

Die folgende Tabelle (Tab. 10) stellt Ursachen für das Versagen des Nikotinamids in der Prädiktion des Diabetes mellitus Typ 1 und mögliche Lösungsansätze dar:

Tab. 10: Aus dem ENDIT und anderen Präventionsstudien gelernte potentielle Fehler und deren mögliche Lösungen nach Schatz *et al.*, 2003

Potentielle Fehler	Lösungen
<ul style="list-style-type: none"> - keine Effekte wegen zu später Behandlung - kurzlebige Vorteile in der Prävention 	<ul style="list-style-type: none"> - frühere Behandlung des Prädiabetes - Vergleich von Pilotstudien, um das optimale Medikament zu finden; Identifizierung und Nutzen der längerwirksamen Effekte durch Reduktion der Nebenwirkungen
<ul style="list-style-type: none"> - Behandlung von Kindern, die keinen Diabetes entwickeln werden - potentielle Heterogenität der Erkrankung 	<ul style="list-style-type: none"> - besser und exaktere Methoden der Prädiktion - Bessere Definition des Diabetes mellitus Typ 1, die genetische, immunologische und metabolische Parameter mit einbezieht
<ul style="list-style-type: none"> - Mäuse sind zu einfach zu behandeln 	<ul style="list-style-type: none"> - Etablieren von höheren Standards und realistischen Anwendungen; Nutzen von dem Menschen ähnlicheren Tiermodellen
<ul style="list-style-type: none"> - Monotherapie ineffektiv 	<ul style="list-style-type: none"> - Versuch einer Kombinationstherapie

Obwohl Nikotinamid in der ENDIT-Studie keinen klinischen Effekt zeigte, ist dieses Kollektiv für die Arbeit interessant, weil so viele Prädiabetiker über einen langen Zeitraum bzw. bis zur Manifestation der Erkrankung beobachtet wurden. So könnten immunologisch schon Veränderungen auftreten, die klinisch nicht zur veränderten Krankheitsprogression führen und somit als prädiktiv gelten würden.

Weil der Diabetes mellitus Typ 1 eine immunmedierte Erkrankung ist (Atkinson & Eisenbarth 2001; Gale 2001), wollten wir untersuchen, ob sich das Immunsystem in Form unserer Zytokine und Chemokine also durch die Behandlung mit Nikotinamid verändern kann.

Ziel der Arbeit war herauszufinden, ob wir Zytokine und Chemokine zur Prädiktion nutzen können, ob es Immunmarker gibt, die die unterschiedlichen Phasen der Diabetesentwicklung kennzeichnen und sich im Verlauf vom Prädiabetes bis zur Manifestation der Erkrankung ändern. Letzteres ist eine Frage, die besonders interessiert, weil bisher keine Daten vorliegen.

In der vorliegenden Arbeit haben wir die Zytokine IL-13 und MIF sowie die Chemokine IL-8 und MIP-1 α untersucht. IL-8, MIP-1 α und MIF werden von Zellen des angeborenen Immunsystems sezerniert und haben in Vorstudien mehr Informationen geben können als die klassischen Zytokine wie INF-gamma oder TNF-alpha (Hanifi-Moghaddam 2003).

IL-13 zählt zu den klassischen T_{H2}-Zytokinen, die potentiell vor Diabetes mellitus Typ 1 schützen können (Kolb 1997). Es kann bei Mäusen eine Insulinitis verhindern (Zacone *et al.* 1999) und proinflammatorische Zytokine hemmen. IL-13 scheint bei Diabetes mellitus Typ 1-Risikopatienten mit Autoantikörpern im Serum erhöht zu sein (Hanifi-Moghaddam 2003). Dieser Parameter wurde ausgewählt, um einen Gegenpol zu den T_{H1}-Markern zu erhalten.

Über MIF wird bezüglich der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 kontrovers diskutiert. Bei Mäusen wird eine erhöhte MIF-Expression während der Manifestation des autoimmunen Diabetes mellitus gefunden (Bojunga *et al.* 2003), während beim Menschen eine Erniedrigung der MIF-Serumkonzentration erstens mit erhöhter Anzahl von Autoantikörpern (Hanifi-Moghaddam *et al.* 2003) und zweitens mit dem Stadium des Prädiabetes korreliert (Hanifi-Moghaddam 2003).

Von IL-8, das auf vielfältige Weise proinflammatorisch und diabetogen wirkt, ist berichtet worden, dass es im Serum von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1, sowohl von neu diagnostizierten als auch von älteren, erhöht ist (Erbagci *et al.* 2001; Glowacka *et al.* 2002; Harness *et al.* 2001; Zozulinska *et al.* 1999).

Wie MIP-1 α auf die Entstehung des Diabetes mellitus Typ 1 wirkt oder ob die Sezernierung dieses Markers eine Folge von Immunveränderungen ist, ist noch nicht ausreichend geklärt. Ist eine Maus nicht in der Lage, MIP-1 α zu produzieren, ist sie vor autoimmunem Diabetes geschützt (Cameron *et al.* 2000).

Vorstudien beim Menschen zeigen, dass die MIP-1 α -Serumkonzentration bei neu diagnostizierten, nicht aber bei langjährigen Diabetikern erhöht ist und die MIP-1 α -Rezeptoren herunterreguliert sind (Lohmann *et al.* 2002). Außerdem ist der Serumspiegel von MIP-1 α bei Diabetes mellitus Typ 1-Patienten mit Autoantikörpern im Serum erhöht (Hanifi-Moghaddam 2003).

4.1 Serummarkerkonzentrationen zu Studienbeginn

Der Zeitpunkt t1 ist der des Eintritts der Probanden in die Studie. Die Serumentnahme fand vor der Tablettengabe statt, vor der Beeinflussung des Immunsystems, aber bei jedem Probanden zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt, das heißt, in einer unterschiedlichen Phase des Prädiabetes bzw. bei fehlender Progression zum Diabetes mellitus Typ 1 im Beobachtungszeitraum, trotz der im Serum vorhandenen Autoantikörper, die Einschlusskriterium waren. Wir haben hier also einen Querschnitt von Hochrisikopatienten in Europa vorliegen.

Zu diesem Zeitpunkt unterscheiden sich die Gruppen der mit Verum oder Plazebo Behandelten in ihrer Serumkonzentration der gemessenen Zytokine, Chemokine und Monokine nicht voneinander.

Dies ist für die Aussagekraft der Studie eine unerlässliche Information und bestätigt die erwartete zufällige Verteilung der Studienteilnehmer.

Zu diesem Zeitpunkt unterscheiden sich die Prädiabetiker in ihren Immunparametern nicht von denen, die während des Studienzeitraumes gesund blieben. Dies heißt für die Prädiktion des Diabetes mellitus Typ 1, dass unsere vier - und die in Dänemark - gemessenen Parameter sich nicht dazu eignen, eine Aussage über das Stadium des Prädiabetes oder über eine Erkrankungswahrscheinlichkeit zu machen, wenn man Personen mit positiven Autoantikörpern im Serum und Verwandte ersten Grades von Diabetes mellitus Typ 1-Patienten aus der Bevölkerung untersucht.

Diese Ergebnisse stehen in Diskrepanz zu vorherigen kleineren Untersuchungen.

Erbagci sieht die IL-8 Produktion bei diabetischen im Vergleich zu gesunden Kindern erhöht und in Korrelation mit dem BMI, das heißt, abhängig von Fettzellenaktivität (Erbagci *et al.* 2001). Eine andere Arbeit hat erhöhte MIP-1 α (CCL3)-Serumkonzentrationen bei neu diagnostizierten Diabetikern gefunden (Lohmann *et al.* 2002). Auch in Hochrisikopatienten wurden Unterschiede bezüglich der Chemokinkonzentrationen im Vergleich zu Normalpersonen demonstriert (Hanifi-Moghaddam *et al.* 2006).

Die MIF-Serumkonzentration scheint bei den weiblichen Probanden zum Zeitpunkt der Rekrutierung höher zu liegen als bei den männlichen Teilnehmern, sodass zu vermuten ist, dass die MIF-sezernierenden Mukosazellen auch hormonell abhängig sind. Außerdem kann über Unterschiede in der MIF-Verteilung in Fett, Serum und andere Kompartimente durch die unetrschiedlichen Anteile von Muskel- und Fettgewebe der Geschlechter diskutiert werden.

Vergleicht man das Alter der Probanden, die später diabetisch werden mit denen, die gesund bleiben, zeigt sich, dass die Prädiabetiker mit einem Median von 11,02 Jahren jünger als die Gesunden (Median 19,5 Jahre) sind. Dies bestätigt Vorstudien, die beschreiben, dass der Diabetes mellitus Typ 1 bei jüngerem Manifestationsalter einen aggressiveren Verlauf nimmt. Allerdings kann retrospektiv nicht gesagt werden, ob die älteren Probanden schon länger positiv für die gemessenen Autoantikörper waren. Probanden über einem Alter von 25 Jahren mit Nachweis vom ICA gelten als Personen mit niedrigem Risiko (Bingley & Gale 2006), sodass es für die Rekrutierung von Probanden für Präventionsstudien sinnvoll ist, das Alter > 25 Jahren als Ausschlusskriterium zu nutzen.

Es ist bekannt, dass IA2A ein Marker für das Manifestationsrisiko des Diabetes mellitus Typ 1 ist. Dies bestätigt sich, da zum Zeitpunkt 1 im ENDIT-Kollektiv der IA2A-Spiegel bei denen, die später den Diabetes mellitus Typ 1 entwickeln, signifikant höher ist als bei denen, die gesund bleiben. Bilbao beschrieb, dass IA2A negativ mit dem Alter korreliert, bei jüngeren Probanden also erhöht ist (Bilbao *et al.* 2000). Die Probanden, die den Diabetes mellitus Typ 1 entwickeln, sind in diesem Kollektiv im Schnitt ja auch um mehr als 8 Jahre jünger als die Gesunden. Dennoch bestätigt sich die Korrelation nur im Gesamtkollektiv und bei den Nicht-Diabetikern. In der Gruppe der Diabetiker hat das Alter nachgewiesermaßen keinen Einfluss auf den IA2A-Spiegel, sodass IA2A hier als wertvoller und zuverlässiger prädiktiver Marker imponiert.

Interessant ist, dass sich IA2A aber durch Nikotinamid beeinflussen zu lassen scheint. Bei denen, die mit diesem Medikament behandelt wurden, sinkt der IA2A-Spiegel im Laufe des ersten Jahres im Gegensatz zu den mit Placebo Behandelten signifikant ab. Wenn wir also davon ausgehen, dass IA2A ein Maß für ein Manifestationsrisiko ist, was frühere Arbeiten demonstrierten (Borg *et al.* 2001; Seissler *et al.* 1998), ist der Rückschluss zumindest diskutabel, ob Nikotinamid nicht doch einen präventiven Einfluss haben könnte, obwohl klinisch in dieser Studie kein Effekt zu verzeichnen war, wobei die Fragen nach Dosierung und Applikationsform sowie Überwachungszeitraum oder Messbarkeit eines Vorteils aufkommen und unbeantwortet sind.

Korrelationen zwischen den in dieser Arbeit behandelten Immunmarkerkonzentrationen und denen des Autoantikörpers gegen IA2 bestehen in diesem Kollektiv nicht.

In einer aktuellen Studie konnte allerdings demonstriert werden, dass MIP-1 α (CCL3) und MIP-1 β (CCL4) bei Probanden, bei denen im Serum multiple Autoantikörper (ICA, GADA, IA2A) nachgewiesen wurden und sie daher als Risikopatienten gelten, signifikant erhöht ist im Vergleich zu den Probanden ohne Autoantikörper. MCP-1 (CCL2) ist im Serum letzterer hingegen höher (Hanifi-Moghaddam *et al.* 2006).

Zuvor war gezeigt worden, dass MIF in Risikopatienten mit Autoantikörpern erniedrigt zu sein scheint (Hanifi-Moghaddam *et al.* 2003).

Dass dies in unserer Arbeit nicht bestätigt werden konnte, kann zwei Gründe haben.

Erstens können die Fallzahlen anderer Studien zu niedrig sein, sodass sich deren Ergebnisse in größer angelegten Studien relativieren oder die von uns gemessenen Immunmarker sind nicht die entscheidenden für die Verbindung zwischen der Detektion eines Risikos (Autoantikörper) und der ausführenden Proteine (Zytokine/Chemokine), die zu einer destrukturierenden Insulinitis führen.

4.2 Verlaufsanalysen

329 Probanden mit erhöhtem Risiko für einen Diabetes mellitus Typ 1 wurden über bis zu fünf Jahre beobachtet und MIP-1 α , IL-13, MIF und IL-8 sowie TNF- α , TNF-R1, IL-1-RA, IL-1 β und IL-1-R1 aus den Serumproben von bis zu fünf verschiedenen Zeitpunkten analysiert. So existiert jetzt erstmals ein Verlauf von Immunparametern über einen Zeitraum von bis zu fünf Jahren bei einem so großen Kollektiv. Obwohl Insulin und Nikotinamid keinen klinischen Effekt auf die Manifestationswahrscheinlichkeit des Diabetes mellitus Typ 1 gehabt haben (DPT-1 Study Group 2002; Gale *et al.* 2004), richten wir unser Interesse auf den Verlauf der Immunparameter bei Hochrisikopatienten bzw. Prädiabetikern um festzustellen, ob der Diabetesmanifestation eine veränderte Konstellation der Immunparameter voraus geht.

Es zeigt sich, dass es bei IL-8, IL-13 und MIP-1 α keine Gesetzmäßigkeiten im Verlauf und keine Kombination der genannten Immunparameter gibt, die charakteristisch für ein prädiabetisches oder diabetisches Stadium wären. Das heißt, dass sich das Immunsystem nicht charakteristisch auf dem Boden der hier untersuchten sezernierten Zyto- und Chemokine verändert oder andere Faktoren bei der Freisetzung oder Herunterregulierung solcher Proteine eine Rolle spielen können, die verhindern, dass wir diese Marker zur Überwachung des Krankheitsverlaufs einsetzen können.

Im Verlauf der Serumkonzentrationen von MIF fällt allerdings auf, dass diese zum Zeitpunkt 2, also ein Jahr nach Studieneintritt, bei den späteren Diabetikern signifikant erhöht sind, wobei die Behandlungsart (Nikotinamid oder Plazebo) keine Rolle spielt. Bei denen, die gesund bleiben, ist eine leichte Erhöhung zum gleichen Zeitpunkt ebenfalls angedeutet ($p=0,0644$).

Über MIF-Spiegel im prädiabetischen Stadium beim Menschen ist bisher nichts bekannt.

Bei Mäusen ist während der Entwicklung des autoimmunen Diabetes mellitus eine erhöhte Expression von MIF-mRNA (Bojunga *et al.* 2003) und eine Erhöhung von MIF in Inselzellen festgestellt worden (Cvetkovic *et al.* 2005), so dass die Vermutung geäußert werden kann, dass eine Erhöhung der MIF-Konzentration eine Phase in der Manifestation des Diabetes mellitus Typ 1, als eine Reaktion des Körpers auf die immunologischen Veränderungen, darstellen könnte. Gründe könnten sein, dass MIF als Aktivator der T-Regulator-Zellen (Bacher *et al.* 1996) mit diesen zur Herunterregulierung oder Zerstörung der autoreaktiven T-Zellen beiträgt oder dass MIF, das in Mäusen die Zelllyse durch die natürlichen Killerzellen hemmt (Apte *et al.* 1998), als Immunsuppressor die β -Zellen vor der Zerstörung durch diese Zellen bewahren will.

In unserer Arbeit imponiert auch, wie oben beschrieben, dass es Unterschiede in der MIF-Serumkonzentration bei den Diabetikern zum Studienbeginn gibt. Solche nämlich, die im intravenösen Glukosetoleranztest (ivGTT) eine geringe FPIR, also eine niedrige, inadäquate Insulinantwort auf einen definierten Glukosereiz hatten, besitzen eine signifikant, im Vergleich zu denen mit einer normalen Antwort, erhöhte MIF-Serumkonzentration.

Es ist bekannt, dass MIF ein glukoseabhängiger positiver Regulator der Insulinsekretion ist (Plaisance *et al.* 2002; Sakaue *et al.* 1999; Waeber *et al.* 1997). Außerdem kann MIF über eine Erhöhung des Fruktose-2,6-Bisphosphats forciierend auf die Glykolyse wirken (Benigni *et al.* 2000). So könnte die Erhöhung der Expression von MIF ein Versuch des Organismus sein, gegen eine latente oder manifeste Hyperglykämie anzuarbeiten, indem er diesen Stimulator der Glykolyse und Insulinsekretion vermehrt bereitstellt. Dieser Vorgang könnte ein Zeichen für die Phase der Diabetes-Manifestation sein, in der das endokrine Pankreas durch die Zerstörung der β -Zellen so insuffizient geworden ist, dass die Insulinantwort auf Reiz fast ausbleibt (unter der 10. Perzentile).

Die durchgeführten Untersuchungen demonstrieren ebenso, dass die Insulinantwort per se prädiktiv ist. Demzufolge ist das Risiko eines Antikörper-positiven Probanden signifikant erhöht, einen Diabetes mellitus Typ 1 zu entwickeln, wenn die FPIR erniedrigt ist. Ob dieser Parameter allerdings einen Ersatz zu den Antikörpern darstellen könnte, ist fraglich, und er kann auch nicht dabei helfen, das prädiabetische Stadium eines Untersuchten darzustellen.

4.3 Genetik

Menschen mit dem HLA-Allel DQ2 und DQ8 haben ein höheres Risiko, den Diabetes mellitus Typ 1 zu entwickeln (Gorus *et al.* 2003; Hermann *et al.* 2001; Honeyman *et al.* 1995), DQ6 dagegen soll vor der Erkrankung schützen (Pociot & McDermott 2002; Rayner *et al.* 2002), was sich für die Allele DQ8 und DQ6 in unserer Studie bestätigt.

Nicht signifikant, aber tendenziell scheinen die Personen mit dem Allel DQ2 in unserem Kollektiv eine geringere IL-13-Serumkonzentration als die ohne dieses Allel zu haben, was bedeutet, dass erhöhtes genetisches Risiko mit einem geringeren IL-13-Spiegel einherginge. Bereits frühere Arbeiten zeigen, dass IL-13 vor dem Diabetes mellitus Typ 1 schützen könnte (Kolb 1997; Zaccane *et al.* 1999). Zusätzliche Arbeiten schreiben dem Zytokin IL-13 eine Rolle in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 zu, so dass man das anti-entzündliche Protein möglicherweise bei der Therapie einsetzen könnte (Kretowski *et al.* 2000).

4.4 Zusammenfassung

Der Diabetes mellitus Typ 1 ist eine chronische immun-medierte Erkrankung, bei der Immunmediatoren wie Zytokine, Chemokine und Monokine eine wichtige Rolle spielen. Bisher fanden sich keine Maßnahmen, mit denen der Ausbruch dieser häufig mit schwerwiegenden Folgeerkrankungen einhergehenden Erkrankung verhindert werden kann.

Im Rahmen der großen europäischen, prospektiven, longitudinalen, doppelt-blinden Präventionsstudie ENDIT wurde gezeigt, dass der Diabetes mellitus Typ 1 auch durch die Einnahme von Nikotinamid nicht verhindert werden kann, wenn es Kindern und Jugendlichen in der prädiabetischen Phase verabreicht wird. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu mehreren Vorstudien und Tierexperimenten, die einen therapeutischen Effekt gezeigt hatten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Einnahme von Nikotinamid trotz ausbleibenden klinischen Effekts zu Veränderungen der systemischen Immunantwort führt. Obwohl sich die Antikörperspiegel im beobachteten Zeitraum veränderten, gab es bei den analysierten Zytokinen (IL-13 und MIF), Chemokinen (IL-8 und MIP1- α) und bei den in Dänemark gemessenen Parametern (TNF- α , TNF-R1, IL-1-RA, IL-1 β , IL-1-R1) keine signifikanten Unterschiede im Vergleich von Personen mit und ohne Nikotinamidbehandlung. Im einem weiteren Ansatz konnte gezeigt werden, dass die genannten Immunmediatoren auch nicht in Bezug auf Prädiktion der später eintretenden Erkrankung eingesetzt werden können und erstaunlich stabil im longitudinalen Verlauf sind. Im Gegensatz dazu waren die Autoantikörper IA2A wie erwartet prädiktiv und veränderten sich unter Nikotinamidbehandlung.

Möglicherweise sind andere Immunmediatoren als die hier gemessenen besser mit der Krankheitsentwicklung assoziiert, wobei die Vermutung nahe liegt, dass nicht einzelne Marker, sondern Zytokinmuster sich im Laufe der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 verändern.

Literaturangaben

- ADA (1997). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 20, 1183-1197.
- Agardh, C. D., Cilio, C. M., Lethagen, A., Lynch, K., Leslie, R. D., Palmer, M., Harris, R. A., Robertson, J. A. & Lernmark, A. (2005). Clinical evidence for the safety of GAD65 immunomodulation in adult-onset autoimmune diabetes. *J.Diabetes Complications*, 19, 238-246.
- Aiello, L. P., Bursell, S. E., Clermont, A., Duh, E., Ishii, H., Takagi, C., Mori, F., Ciulla, T. A., Ways, K., Jirousek, M., Smith, L. E. & King, G. L. (1997). Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective beta-isoform-selective inhibitor. *Diabetes*, 46, 1473-1480.
- Akerblom, H. K., Vaarala, O., Hyoty, H., Ilonen, J. & Knip, M. (2002). Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *Am.J.Med.Genet.*, 115, 18-29.
- Alberti, K. G. & Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet.Med.*, 15, 539-553.
- Aman, M. J., Tayebi, N., Obiri, N. I., Puri, R. K., Modi, W. S. & Leonard, W. J. (1996). cDNA cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor alpha chain. *J.Biol.Chem.*, 271, 29265-29270.
- Andersen, H. U., Jorgensen, K. H., Egeberg, J., Mandrup-Poulsen, T. & Nerup, J. (1994). Nicotinamide prevents interleukin-1 effects on accumulated insulin release and nitric oxide production in rat islets of Langerhans. *Diabetes*, 43, 770-777.
- Apte, R. S., Sinha, D., Mayhew, E., Wistow, G. J. & Niederkorn, J. Y. (1998). Cutting edge: role of macrophage migration inhibitory factor in inhibiting NK cell activity and preserving immune privilege. *J.Immunol.*, 160, 5693-5696.
- Arunachalam, B., Pan, M. & Cresswell, P. (1998). Intracellular formation and cell surface expression of a complex of an intact lysosomal protein and MHC class II molecules. *J.Immunol.*, 160, 5797-5806.
- Arzt, E., Pereda, M. P., Castro, C. P., Pagotto, U., Renner, U. & Stalla, G. K. (1999). Pathophysiological role of the cytokine network in the anterior pituitary gland. *Front Neuroendocrinol.*, 20, 71-95.
- Atkinson, M. A. & Eisenbarth, G. S. (2001). Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*, 358, 221-229.
- Ayesh, S. K., Azar, Y., Babior, B. M. & Matzner, Y. (1993). Inactivation of interleukin-8 by the C5a-inactivating protease from serosal fluid. *Blood*, 81, 1424-1427.
- Bacher, M., Metz, C. N., Calandra, T., Mayer, K., Chesney, J., Lohoff, M., Gemsa, D., Donnelly, T. & Bucala, R. (1996). An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.*, 93, 7849-7854.
- Baggiolini, M., Dewald, B. & Moser, B. (1997). Human chemokines: an update. *Annu.Rev.Immunol.*, 15, 675-705.

- Bamborough, P., Duncan, D. & Richards, W. G. (1994). Predictive modelling of the 3-D structure of interleukin-13. *Protein Eng.*, 7, 1077-1082.
- Banasik, M., Komura, H., Shimoyama, M. & Ueda, K. (1992). Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. *J.Biol.Chem.*, 267, 1569-1575.
- Basu, S., Binder, R. J., Ramalingam, T. & Srivastava, P. K. (2001). CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*, 14, 303-313.
- Baumgartl, H.-J. & Standl, E. (1996). "Advanced glycosylation end products" und deren Rolle für die diabetischen Folgeschäden. *Diabet.Stoffw.*, 5, 177-182.
- Baumhofer, J. M., Beinhauer, B. G., Wang, J. E., Brandmeier, H., Geissler, K., Losert, U., Philip, R., Aversa, G. & Rogy, M. A. (1998). Gene transfer with IL-4 and IL-13 improves survival in lethal endotoxemia in the mouse and ameliorates peritoneal macrophages immune competence. *Eur.J.Immunol.*, 28, 610-615.
- Bazan, N. G. & Rodriguez de Turco, E. B. (1995). Platelet-activating factor is a synapse messenger and a modulator of gene expression in the nervous system. *Neurochem.Int.*, 26, 435-441.
- BELL, E. T. (1952). A postmortem study of vascular disease in diabetics. *AMA.Arch.Pathol.*, 53, 444-455.
- Bendelac, A., Carnaud, C., Boitard, C. & Bach, J. F. (1987). Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *J.Exp.Med.*, 166, 823-832.
- Benigni, F., Atsumi, T., Calandra, T., Metz, C., Echtenacher, B., Peng, T. & Bucala, R. (2000). The proinflammatory mediator macrophage migration inhibitory factor induces glucose catabolism in muscle. *J.Clin.Invest.*, 106, 1291-1300.
- Bennett, S. T. & Todd, J. A. (1996). Human type 1 diabetes and the insulin gene: principles of mapping polygenes. *Annu.Rev.Genet.*, 30, 343-370.
- Berk, M. A. & Lorincz, A. L. (1986). The treatment of bullous pemphigoid with tetracycline and niacinamide. A preliminary report. *Arch.Dermatol.*, 122, 670-674.
- Berman, M. A., Sandborg, C. I., Wang, Z., Imfeld, K. L., Zaldivar, F., Jr., Dadufalza, V. & Buckingham, B. A. (1996). Decreased IL-4 production in new onset type I insulin-dependent diabetes mellitus. *J.Immunol.*, 157, 4690-4696.
- Berney, T., Buhler, L., Caulfield, A., Oberholzer, J., Toso, C., Alejandro, R., Cooper, D. K., Ricordi, C. & Morel, P. (2001). Transplantation of islets of Langerhans: new developments. *Swiss.Med.Wkly.*, 131, 671-680.
- Bernhagen, J., Calandra, T. & Bucala, R. (1998). Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features. *J.Mol.Med*, 76, 151-161.
- Bessis, N., Boissier, M. C., Ferrara, P., Blankenstein, T., Fradelizi, D. & Fournier, C. (1996). Attenuation of collagen-induced arthritis in mice by treatment with vector cells engineered to secrete interleukin-13. *Eur.J.Immunol.*, 26, 2399-2403.
- Bilbao, J. R., Rica, I., Vazquez, J. A., Busturia, M. A. & Castano, L. (2000). Influence of sex and age at onset on autoantibodies against insulin, GAD65 and IA2 in recent onset type 1 diabetic patients. *Horm.Res.*, 54, 181-185.

Bingley, P. J. (1996). Interactions of age, islet cell antibodies, insulin autoantibodies, and first-phase insulin response in predicting risk of progression to IDDM in ICA+ relatives: the ICARUS data set. Islet Cell Antibody Register Users Study. *Diabetes*, 45, 1720-1728.

Bingley, P. J., Bonifacio, E., Williams, A. J., Genovese, S., Bottazzo, G. F. & Gale, E. A. (1997). Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes*, 46, 1701-1710.

Bingley, P. J., Caldas, G., Bonfanti, R. & Gale, E. A. (1993). Nicotinamide and insulin secretion in normal subjects. *Diabetologia*, 36, 675-677.

Bingley, P. J., Colman, P., Eisenbarth, G. S., Jackson, R. A., McCulloch, D. K., Riley, W. J. & Gale, E. A. (1992). Standardization of IVGTT to predict IDDM. *Diabetes Care*, 15, 1313-1316.

Bingley, P. J. & Gale, E. A. (2006). Progression to type 1 diabetes in islet cell antibody-positive relatives in the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial: the role of additional immune, genetic and metabolic markers of risk. *Diabetologia*, 49, 881-890.

Bischoff, S. C., Krieger, M., Brunner, T., Rot, A., von, T., V, Baggiolini, M. & Dahinden, C. A. (1993). RANTES and related chemokines activate human basophil granulocytes through different G protein-coupled receptors. *Eur.J.Immunol.*, 23, 761-767.

Bojunga, J., Kusterer, K., Bacher, M., Kurek, R., Usadel, K. H. & Renneberg, H. (2003). Macrophage migration inhibitory factor and development of type-1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Cytokine*, 21, 179-186.

Boland, E. A., Grey, M., Oesterle, A., Fredrickson, L. & Tamborlane, W. V. (1999). Continuous subcutaneous insulin infusion. A new way to lower risk of severe hypoglycemia, improve metabolic control, and enhance coping in adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 22, 1779-1784.

Borg, H., Arnqvist, H. J., Bjork, E., Bolinder, J., Eriksson, J. W., Nystrom, L., Jeppsson, J. O. & Sundkvist, G. (2003). Evaluation of the new ADA and WHO criteria for classification of diabetes mellitus in young adult people (15-34 yrs) in the Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetologia*, 46, 173-181.

Borg, H., Gottsater, A., Landin-Olsson, M., Fernlund, P. & Sundkvist, G. (2001). High levels of antigen-specific islet antibodies predict future beta-cell failure in patients with onset of diabetes in adult age. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, 86, 3032-3038.

Bozza, M., Satoskar, A. R., Lin, G., Lu, B., Humbles, A. A., Gerard, C. & David, J. R. (1999). Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J.Exp.Med.*, 189, 341-346.

Brownlee, M., Cerami, A. & Vlassara, H. (1988). Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N.Engl.J.Med.*, 318, 1315-1321.

Brush, J. (1944). Initial stabilization of the juvenile diabetic child. *Amer.J.Dis.Child*, 67, 429.

Buczkowska, E. O. & Chobot, P. J. (2003). [Immune markers of type-I diabetes mellitus in children with diabetes in their first-degree relatives. Part I]. *Przegl.Lek.*, 60, 580-584.

Buhler, M. M., Craig, M., Donaghue, K. C., Badhwar, P., Willis, J., Manolios, N., Tait, B. D., Silink, M., Bennetts, B. H. & Stewart, G. J. (2002). CCR5 genotyping in an Australian and New Zealand type 1 diabetes cohort. *Autoimmunity*, 35, 457-461.

Burkart, V., Gross-Eick, A., Bellmann, K., Radons, J. & Kolb, H. (1995). Suppression of nitric oxide toxicity in islet cells by alpha-tocopherol. *FEBS Lett.*, 364, 259-263.

Buzzetti, R., Galgani, A., Petrone, A., Del Buono, M. L., Erlich, H. A., Bugawan, T. L., Lorini, R., Meschi, F., Multari, G., Pozzilli, P., Locatelli, M., Bottazzo, G. & Di Mario, U. (2004). Genetic prediction of type 1 diabetes in a population with low frequency of HLA risk genotypes and low incidence of the disease (the DIABFIN study). *Diabetes Metab.Res.Rev.*, 20, 137-143.

Buzzetti, R., Quattrocchi, C. C. & Nistico, L. (1998). Dissecting the genetics of type 1 diabetes: relevance for familial clustering and differences in incidence. *Diabetes Metab.Rev.*, 14, 111-128.

Calandra, T., Bernhagen, J., Metz, C. N., Spiegel, L. A., Bacher, M., Donnelly, T., Cerami, A. & Bucala, R. (1995). MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*, 377, 68-71.

Calandra, T. & Bucala, R. (1997). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a glucocorticoid counter-regulator within the immune system. *Crit.Rev.Immunol.*, 17, 77-88.

Calandra, T., Echtenacher, B., Roy, D. L., Pugin, J., Metz, C. N., Hultner, L., Heumann, D., Mannel, D., Bucala, R. & Glauser, M. P. (2000). Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat.Med.*, 6, 164-170.

Cameron, M. J., Arreaza, G. A., Grattan, M., Meagher, C., Sharif, S., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Cook, D. N. & Delovitch, T. L. (2000). Differential expression of CC chemokines and the CCR5 receptor in the pancreas is associated with progression to type I diabetes. *J.Immunol.*, 165, 1102-1110.

Cameron, M. J., Arreaza, G. A., Zucker, P., Chensue, S. W., Strieter, R. M., Chakrabarti, S. & Delovitch, T. L. (1997). IL-4 prevents insulinitis and insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by potentiation of regulatory T helper-2 cell function. *J.Immunol.*, 159, 4686-4692.

Canadian-European Randomized Control Trial Group (1988). Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention. Association of 1 yr of cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion. The Canadian-European Randomized Control Trial Group. *Diabetes*, 37, 1574-1582.

Caputo, G. M., Cavanagh, P. R., Ulbrecht, J. S., Gibbons, G. W. & Karchmer, A. W. (1994). Assessment and management of foot disease in patients with diabetes. *N.Engl.J.Med.*, 331, 854-860.

Cash, E., Minty, A., Ferrara, P., Caputo, D., Fradelizi, D. & Rott, O. (1994). Macrophage-inactivating IL-13 suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *J.Immunol.*, 153, 4258-4267.

Catargi, B., Breilh, D., Roger, P. & Tabarin, A. (2000). Glucose profiles in a type 1 diabetic patient successively treated with CSII using regular insulin, lispro and an implantable insulin pump. *Diabetes Metab.*, 26, 210-214.

Cavallo, M. G., Pozzilli, P., Bird, C., Wadhwa, M., Meager, A., Visalli, N., Gearing, A. J., Andreani, D. & Thorpe, R. (1991). Cytokines in sera from insulin-dependent diabetic patients at diagnosis. *Clin.Exp.Immunol.*, 86, 256-259.

Cerna, M., Kolouskova, S. & Vavrinec, J. (2004). [Prediction of type 1 diabetes in the neonates of diabetic mothers or fathers]. *Ceska.Gynekol.*, 69 Suppl 1, 98-101.

- Cesarini, P. R., Mendonca, E., Fernandes, V., Silva, R. C., Morimitsu, L. K., Garcia, F. E., Vechiatti, S., Miranda, W. L. & Dib, S. A. (2003). [Prevalence of immunologic markers (Anti-GAD and Anti-IA2) in first-degree relatives of patients with type I diabetes in the greater area of Sao Paulo]. *Rev.Assoc.Med.Bras.*, 49, 395-400.
- Christianson, S. W., Shultz, L. D. & Leiter, E. H. (1993). Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes*, 42, 44-55.
- Cosmescu, A., Graur, M., Zlei, M., Matasaru, S., Felea, D., Petroaie, A., Slanina, A. M., Barbacariu, L. & Momanu, O. (2004). [The study of two immunological markers in patients with type-1 diabetes and in their first degree relatives]. *Rev.Med.Chir.Soc.Med.Nat.Iasi*, 108, 549-553.
- Cvetkovic, I., Al-Abed, Y., Miljkovic, D., Maksimovic-Ivanic, D., Roth, J., Bacher, M., Lan, H. Y., Nicoletti, F. & Stosic-Grujicic, S. (2005). Critical role of macrophage migration inhibitory factor activity in experimental autoimmune diabetes. *Endocrinology*, 146, 2942-2951.
- Daniel, D., Gill, R. G., Schloot, N. & Wegmann, D. (1995). Epitope specificity, cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T cell clones isolated from NOD mice. *Eur.J.Immunol.*, 25, 1056-1062.
- de Jong, Y. P., Abadia-Molina, A. C., Satoskar, A. R., Clarke, K., Rietdijk, S. T., Faubion, W. A., Mizoguchi, E., Metz, C. N., Alsahli, M., ten Hove, T., Keates, A. C., Lubetsky, J. B., Farrell, R. J., Michetti, P., van Deventer, S. J., Lolis, E., David, J. R., Bhan, A. K. & Terhorst, C. (2001). Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat.Immunol.*, 2, 1061-1066.
- de Murcia, G., Schreiber, V., Molinete, M., Saulier, B., Poch, O., Masson, M., Niedergang, C. & Menissier, d. M. (1994). Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol.Cell Biochem.*, 138, 15-24.
- de Vries, J. E. (1998). The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 102, 165-169.
- de Waal, M. R., Abrams, J. S., Zurawski, S. M., Lecron, J. C., Mohan-Peterson, S., Sanjanwala, B., Bennett, B., Silver, J., de Vries, J. E. & Yssel, H. (1995). Differential regulation of IL-13 and IL-4 production by human CD8+ and CD4+ Th0, Th1 and Th2 T cell clones and EBV-transformed B cells. *Int.Immunol.*, 7, 1405-1416.
- Decochez, K., Keymeulen, B., Somers, G., Dorchy, H., De Leeuw, I. H., Mathieu, C., Rottiers, R., Winnock, F., ver, E. K., Weets, I., Kaufman, L., Pipeleers, D. G. & Rottiers, R. (2000). Use of an islet cell antibody assay to identify type 1 diabetic patients with rapid decrease in C-peptide levels after clinical onset. Belgian Diabetes Registry. *Diabetes Care*, 23, 1072-1078.
- Dietrich, C. G., Stiegler, H., Gressner, A. M. & Matern, S. (2001). [Heterophile antibodies, lack of communication and the diagnostic dilemma]. *Med.Klin.(Munich)*, 96, 539-544.
- Doganay, S., Evereklioglu, C., Er, H., Turkoz, Y., Sevinc, A., Mehmet, N. & Savli, H. (2002). Comparison of serum NO, TNF-alpha, IL-1beta, sIL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus. *Eye*, 16, 163-170.
- Doniach, I. & Morgan, A. G. (1973). Islets of Langerhans in juvenile diabetes mellitus. *Clin.Endocrinol.(Oxf.)*, 2, 233-248.

- Donnelly, S. C., Haslett, C., Reid, P. T., Grant, I. S., Wallace, W. A., Metz, C. N., Bruce, L. J. & Bucala, R. (1997). Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nat.Med.*, 3, 320-323.
- Donner, B. G., Scheffold, A., Rolph, M. S., Huser, M. B., Kaufmann, S. H., Radbruch, A., Flesch, I. E. & Kroczeck, R. A. (2002). MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 99, 6181-6186.
- DPT-1 Study Group (2002). Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. *N.Engl.J.Med.*, 346, 1685-1691.
- Elias, D., Marcus, H., Reshef, T., Ablamunits, V. & Cohen, I. R. (1995). Induction of diabetes in standard mice by immunization with the p277 peptide of a 60-kDa heat shock protein. *Eur.J.Immunol.*, 25, 2851-2857.
- Elliott, R. B. & Chase, H. P. (1991). Prevention or delay of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in children using nicotinamide. *Diabetologia*, 34, 362-365.
- Elliott, R. B., Pilcher, C. C., Fergusson, D. M. & Stewart, A. W. (1996). A population based strategy to prevent insulin-dependent diabetes using nicotinamide. *J.Pediatr.Endocrinol.Metab.*, 9, 501-509.
- Elliott, R. B., Pilcher, C. C., Stewart, A., Fergusson, D. & McGregor, M. A. (1993). The use of nicotinamide in the prevention of type 1 diabetes. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 696, 333-341.
- Emilie, D., Zou, W., Fior, R., Llorente, L., Durandy, A., Crevon, M. C., Maillot, M. C., Durand-Gasselin, I., Raphael, M., Peuchmaur, M. & Galamaud, P. (1997). Production and roles of IL-6, IL-10, and IL-13 in B-lymphocyte malignancies and in B-lymphocyte hyperactivity of HIV infection and autoimmunity. *Methods*, 11, 133-142.
- Erbagci, A. B., Tarakcioglu, M., Coskun, Y., Sivasli, E. & Sibel, N. E. (2001). Mediators of inflammation in children with type I diabetes mellitus: cytokines in type I diabetic children. *Clin.Biochem.*, 34, 645-650.
- EURODIAB ACE Study Group (2000). Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. *Lancet*, 355, 873-876.
- Fahey, T. J., III, Tracey, K. J., Tekamp-Olson, P., Cousens, L. S., Jones, W. G., Shires, G. T., Cerami, A. & Sherry, B. (1992). Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J.Immunol.*, 148, 2764-2769.
- Feldt-Rasmussen, B., Mathiesen, E. R., Jensen, T., Lauritzen, T. & Deckert, T. (1991). Effect of improved metabolic control on loss of kidney function in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients: an update of the Steno studies. *Diabetologia*, 34, 164-170.
- Feutren, G., Papoz, L., Assan, R., Vialettes, B., Karsenty, G., Vexiau, P., Du, R. H., Rodier, M., Sirmai, J., Lallemand, A. & . (1986). Cyclosporin increases the rate and length of remissions in insulin-dependent diabetes of recent onset. Results of a multicentre double-blind trial. *Lancet*, 2, 119-124.
- Fior, R., Vita, N., Raphael, M., Minty, A., Maillot, M. C., Crevon, M. C., Caput, D., Biberfeld, P., Ferrara, P., Galanaud, P. & . (1994). Interleukin-13 gene expression by malignant and EBV-transformed human B lymphocytes. *Eur.Cytokine Netw.*, 5, 593-600.
- Foulis, A. K., Liddle, C. N., Farquharson, M. A., Richmond, J. A. & Weir, R. S. (1986). The histopathology of the pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year

review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia*, 29, 267-274.

Gale, E. A. (1996). Theory and practice of nicotinamide trials in pre-type 1 diabetes. *J.Pediatr.Endocrinol.Metab.*, 9, 375-379.

Gale, E. A. (2001). The discovery of type 1 diabetes. *Diabetes*, 50, 217-226.

Gale, E. A. (2003). Intervening before the onset of Type 1 diabetes: baseline data from the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT). *Diabetologia*, 46, 339-346.

Gale, E. A., Bingley, P. J., Emmett, C. L. & Collier, T. (2004). European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT): a randomised controlled trial of intervention before the onset of type 1 diabetes. *Lancet*, 363, 925-931.

Gao, J. L., Kuhns, D. B., Tiffany, H. L., McDermott, D., Li, X., Francke, U. & Murphy, P. M. (1993). Structure and functional expression of the human macrophage inflammatory protein 1 alpha/RANTES receptor. *J.Exp.Med.*, 177, 1421-1427.

Gauchat, J. F., Schlagenhaut, E., Feng, N. P., Moser, R., Yamage, M., Jeannin, P., Alouani, S., Elson, G., Notarangelo, L. D., Wells, T., Eugster, H. P. & Bonnefoy, J. Y. (1997). A novel 4-kb interleukin-13 receptor alpha mRNA expressed in human B, T, and endothelial cells encoding an alternate type-II interleukin-4/interleukin-13 receptor. *Eur.J.Immunol.*, 27, 971-978.

Gepts, W. (1965). Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes*, 14, 619-633.

Gillmor, H. A., Bolton, C. H., Hopton, M., Moore, W. P., Perrett, D., Bingley, P. J. & Gale, E. A. (1999). Measurement of nicotinamide and N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide in plasma by high performance liquid chromatography. *Biomed.Chromatogr.*, 13, 360-362.

Glowacka, E., Banasik, M., Lewkowicz, P. & Tchorzewski, H. (2002). The effect of LPS on neutrophils from patients with high risk of type 1 diabetes mellitus in relation to IL-8, IL-10 and IL-12 production and apoptosis in vitro. *Scand.J.Immunol.*, 55, 210-217.

Gorus, F. K., Weets, I., Decochez, K. & van der Auwera, B. J. (2003). [Preventative biology of type 1 diabetes: implications for clinical preventative studies]. *Verh.K.Acad.Geneeskd.Belg.*, 65, 203-229.

Graham, G. J., Wright, E. G., Hewick, R., Wolpe, S. D., Wilkie, N. M., Donaldson, D., Lorimore, S. & Pragnell, I. B. (1990). Identification and characterization of an inhibitor of haemopoietic stem cell proliferation. *Nature*, 344, 442-444.

Graves, P. M., Barriga, K. J., Norris, J. M., Hoffman, M. R., Yu, L., Eisenbarth, G. S. & Rewers, M. (1999). Lack of association between early childhood immunizations and beta-cell autoimmunity. *Diabetes Care*, 22, 1694-1697.

Green, A., Gale, E. A. & Patterson, C. C. (1992). Incidence of childhood-onset insulin-dependent diabetes mellitus: the EURODIAB ACE Study. *Lancet*, 339, 905-909.

Greenbaum, C. J. (2002). Insulin resistance in type 1 diabetes. *Diabetes Metab.Res.Rev.*, 18, 192-200.

Greenbaum, C. J., Kahn, S. E. & Palmer, J. P. (1996). Nicotinamide's effects on glucose metabolism in subjects at risk for IDDM. *Diabetes*, 45, 1631-1634.

Grobmyer, S. R., Armstrong, R. C., Nicholson, S. C., Gabay, C., Arend, W. P., Potter, S. H., Melchior, M., Fritz, L. C. & Nathan, C. F. (1999). Peptidomimetic fluoromethylketone rescues mice from lethal endotoxic shock. *Mol.Med.*, 5, 585-594.

Guarente, L. (1999). Mutant mice live longer. *Nature*, 402, 243, 245.

Guo, H., Jin, Y. X., Ishikawa, M., Huang, Y. M., van der Meide, P. H., Link, H. & Xiao, B. G. (1998). Regulation of beta-chemokine mRNA expression in adult rat astrocytes by lipopolysaccharide, proinflammatory and immunoregulatory cytokines. *Scand.J.Immunol.*, 48, 502-508.

Hanifi-Moghaddam, P. Immune Mediators in Type 1 Diabetes Mellitus. 2003. Ordering the Disorder.

Ref.-Type: Thesis/Dissertation

Hanifi-Moghaddam, P., Kappler, S., Seissler, J., Muller-Scholze, S., Martin, S., Roep, B. O., Strassburger, K., Kolb, H. & Schloot, N. C. (2006). Altered chemokine levels in individuals at risk of Type 1 diabetes mellitus. *Diabet.Med.*, 23, 156-163.

Hanifi-Moghaddam, P., Schloot, N. C., Kappler, S., Seissler, J. & Kolb, H. (2003). An association of autoantibody status and serum cytokine levels in type 1 diabetes. *Diabetes*, 52, 1137-1142.

Hanninen, A., Jalkanen, S., Salmi, M., Toikkanen, S., Nikolakaros, G. & Simell, O. (1992). Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J.Clin.Invest.*, 90, 1901-1910.

Harness, J., Pender, M. P. & McCombe, P. A. (2001). Cyclosporin A treatment modulates cytokine mRNA expression by inflammatory cells extracted from the spinal cord of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis induced by inoculation with myelin basic protein. *J.Neurol.Sci.*, 187, 7-16.

Hatziagelaki, E., Jaeger, C., Petzoldt, R., Seissler, J., Scherbaum, W. A., Federlin, K. & Bretzel, R. G. (1999). The combination of antibodies to GAD-65 and IA-2ic can replace the islet-cell antibody assay to identify subjects at risk of type 1 diabetes mellitus. *Horm.Metab.Res.*, 31, 564-569.

Hauschildt, S., Scheipers, P. & Bessler, W. G. (1991). Inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase suppress lipopolysaccharide-induced nitrite formation in macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 179, 865-871.

Hermann, R., Mijovic, C. H., Rayner, M., Croft, N., Kelly, M. A., Jenkins, D., Soltesz, G. & Barnett, A. H. (2001). HLA alleles and IDDM in children in Hungary: a comparison with Finland. *Hum.Immunol.*, 62, 391-398.

Hermitte, L., Vialettes, B., Atlef, N., Payan, M. J., Doll, N., Scheimann, A. & Vague, P. (1989). High dose nicotinamide fails to prevent diabetes in BB rats. *Autoimmunity*, 5, 79-86.

Hernandez, C., Segura, R. M., Fonollosa, A., Carrasco, E., Francisco, G. & Simo, R. (2005). Interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and IL-10 in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabet.Med.*, 22, 719-722.

Herskowitz, R. D., Jackson, R. A., Soeldner, J. S. & Eisenbarth, G. S. (1989). Pilot trial to prevent type I diabetes: progression to overt IDDM despite oral nicotinamide. *J.Autoimmun.*, 2, 733-737.

- Hirst, D. G., Kennovin, G. D., Tozer, G. M., Prise, V. E. & Flitney, E. W. (1995). The modification of blood flow in tumours and their supplying arteries by nicotinamide. *Acta Oncol.*, 34, 397-400.
- Honeyman, M. C., Harrison, L. C., Drummond, B., Colman, P. G. & Tait, B. D. (1995). Analysis of families at risk for insulin-dependent diabetes mellitus reveals that HLA antigens influence progression to clinical disease. *Mol.Med.*, 1, 576-582.
- Horsman, M. R. (1995). Nicotinamide and other benzamide analogs as agents for overcoming hypoxic cell radiation resistance in tumours. A review. *Acta Oncol.*, 34, 571-587.
- Horton, V., Stratton, I., Bottazzo, G. F., Shattock, M., Mackay, I., Zimmet, P., Manley, S., Holman, R. & Turner, R. (1999). Genetic heterogeneity of autoimmune diabetes: age of presentation in adults is influenced by HLA DRB1 and DQB1 genotypes (UKPDS 43). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Diabetologia*, 42, 608-616.
- Hummel, M., Fuchtenbusch, M., Schenker, M. & Ziegler, A. G. (2000). No major association of breast-feeding, vaccinations, and childhood viral diseases with early islet autoimmunity in the German BABYDIAB Study. *Diabetes Care*, 23, 969-974.
- Hussain, M. J., Peakman, M., Gallati, H., Lo, S. S., Hawa, M., Viberti, G. C., Watkins, P. J., Leslie, R. D. & Vergani, D. (1996). Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM. *Diabetologia*, 39, 60-69.
- Hyponen, E., Kenward, M. G., Virtanen, S. M., Piitulainen, A., Virta-Autio, P., Tuomilehto, J., Knip, M. & Akerblom, H. K. (1999). Infant feeding, early weight gain, and risk of type 1 diabetes. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetes Care*, 22, 1961-1965.
- Imagawa, A., Hanafusa, T., Itoh, N., Waguri, M., Yamamoto, K., Miyagawa, J., Moriwaki, M., Yamagata, K., Iwahashi, H., Sada, M., Tsuji, T., Tamura, S., Kawata, S., Kuwajima, M., Nakajima, H., Namba, M. & Matsuzawa, Y. (1999). Immunological abnormalities in islets at diagnosis paralleled further deterioration of glycaemic control in patients with recent-onset Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 42, 574-578.
- Imagawa, A., Hanafusa, T., Tamura, S., Moriwaki, M., Itoh, N., Yamamoto, K., Iwahashi, H., Yamagata, K., Waguri, M., Nanmo, T., Uno, S., Nakajima, H., Namba, M., Kawata, S., Miyagawa, J. I. & Matsuzawa, Y. (2001). Pancreatic biopsy as a procedure for detecting in situ autoimmune phenomena in type 1 diabetes: close correlation between serological markers and histological evidence of cellular autoimmunity. *Diabetes*, 50, 1269-1273.
- Irving, S. G., Zipfel, P. F., Balke, J., McBride, O. W., Morton, C. C., Burd, P. R., Siebenlist, U. & Kelly, K. (1990). Two inflammatory mediator cytokine genes are closely linked and variably amplified on chromosome 17q. *Nucleic.Acids Res.*, 18, 3261-3270.
- Itoh, N., Hanafusa, T., Miyazaki, A., Miyagawa, J., Yamagata, K., Yamamoto, K., Waguri, M., Imagawa, A., Tamura, S., Inada, M. & . (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.
- Izuhara, K., Heike, T., Otsuka, T., Yamaoka, K., Mayumi, M., Imamura, T., Niho, Y. & Harada, N. (1996). Signal transduction pathway of interleukin-4 and interleukin-13 in human B cells derived from X-linked severe combined immunodeficiency patients. *J.Biol.Chem.*, 271, 619-622.
- Jian, M. & Parker, C. R., Jr. (2003). Macrophage migration inhibitory factor is a constitutively expressed cytokine in the human adrenal gland. *IUBMB.Life*, 55, 155-158.

- Jun, H. S., Santamaria, P., Lim, H. W., Zhang, M. L. & Yoon, J. W. (1999a). Absolute requirement of macrophages for the development and activation of beta-cell cytotoxic CD8+ T-cells in T-cell receptor transgenic NOD mice. *Diabetes*, 48, 34-42.
- Jun, H. S., Yoon, C. S., Zbytniuk, L., van Rooijen, N. & Yoon, J. W. (1999b). The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J.Exp.Med.*, 189, 347-358.
- Jun, H. S. & Yoon, J. W. (2003). A new look at viruses in type 1 diabetes. *Diabetes Metab.Res.Rev.*, 19, 8-31.
- Kapp, A., Zeck-Kapp, G., Czech, W. & Schopf, E. (1994). The chemokine RANTES is more than a chemoattractant: characterization of its effect on human eosinophil oxidative metabolism and morphology in comparison with IL-5 and GM-CSF. *J.Invest.Dermatol.*, 102, 906-914.
- Keymeulen, B., Vandemeulebroucke, E., Ziegler, A. G., Mathieu, C., Kaufman, L., Hale, G., Gorus, F., Goldman, M., Walter, M., Candon, S., Schandene, L., Crenier, L., De, B. C., Seigneurin, J. M., De, P. P., Pierard, D., Weets, I., Rebello, P., Bird, P., Berrie, E., Frewin, M., Waldmann, H., Bach, J. F., Pipeleers, D. & Chatenoud, L. (2005). Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N.Engl.J.Med.*, 352, 2598-2608.
- Kleemann, R., Hausser, A., Geiger, G., Mischke, R., Burger-Kentischer, A., Flieger, O., Johannes, F. J., Roger, T., Calandra, T., Kapurniotu, A., Grell, M., Finkelmeier, D., Brunner, H. & Bernhagen, J. (2000). Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature*, 408, 211-216.
- Kleemann, R., Kapurniotu, A., Frank, R. W., Gessner, A., Mischke, R., Flieger, O., Juttner, S., Brunner, H. & Bernhagen, J. (1998). Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase. *J.Mol.Biol.*, 280, 85-102.
- Klein, R. & Klein, B. E. (1997). Diabetic eye disease. *Lancet*, 350, 197-204.
- Klein, R., Klein, B. E., Moss, S. E., Davis, M. D. & DeMets, D. L. (1984a). The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch.Ophthalmol.*, 102, 520-526.
- Klein, R., Klein, B. E., Moss, S. E., Davis, M. D. & DeMets, D. L. (1984b). The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Arch.Ophthalmol.*, 102, 527-532.
- Knip, M., Douek, I. F., Moore, W. P., Gillmor, H. A., McLean, A. E., Bingley, P. J. & Gale, E. A. (2000). Safety of high-dose nicotinamide: a review. *Diabetologia*, 43, 1337-1345.
- Kolb, H. (1997). Benign versus destructive insulinitis. *Diabetes Metab.Rev.*, 13, 139-146.
- Kolb, H. & Burkart, V. (1999). Nicotinamide in type 1 diabetes. Mechanism of action revisited. *Diabetes Care*, 22 Suppl 2, B16-B20.
- Kolb, H. & Kröncke, K.-D. (1993). Lessons from the low dose streptozocin model in mice. *Diabetes Rev.*, 1, 116-126.
- Kretowski, A., Mysliwiec, J. & Kinalska, I. (2000). In vitro interleukin-13 production by peripheral blood in patients with newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus and their first degree relatives. *Scand.J.Immunol.*, 51, 321-325.

Kroncke, K. D., Fehsel, K., Sommer, A., Rodriguez, M. L. & Kolb-Bachofen, V. (1995). Nitric oxide generation during cellular metabolism of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. *Biol.Chem.Hoppe Seyler*, 376, 179-185.

Lampeter, E. F. (1993). Intervention with nicotinamide in pre-type 1 diabetes: the Deutsche Nikotinamid Interventionsstudie-DENIS. *Diabetes Metab.*, 19, 105-109.

Lampeter, E. F., Klinghammer, A., Scherbaum, W. A., Heinze, E., Haastert, B., Giani, G. & Kolb, H. (1998). The Deutsche Nicotinamide Intervention Study: an attempt to prevent type 1 diabetes. DENIS Group. *Diabetes*, 47, 980-984.

LaPorte, R. E., Tajima, N., Akerblom, H. K., Berlin, N., Brosseau, J., Christy, M., Drash, A. L., Fishbein, H., Green, A., Hamman, R. & . (1985). Geographic differences in the risk of insulin-dependent diabetes mellitus: the importance of registries. *Diabetes Care*, 8 Suppl 1, 101-107.

Lazarow, A. (1947). Protection against alloxan diabetes. *Anat.Rec.*, 97, 353.

Lazarow, A., Liambies, L. & Tausch, A. (1950). Protection against diabetes with nicotinamide. *J.Lab.Clin.Med.*, 36, 249-258.

Lee, S. C., Brummet, M. E., Shahabuddin, S., Woodworth, T. G., Georas, S. N., Leiferman, K. M., Gilman, S. C., Stellato, C., Gladue, R. P., Schleimer, R. P. & Beck, L. A. (2000). Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein-1 alpha induces significant recruitment of neutrophils and monocytes. *J.Immunol.*, 164, 3392-3401.

Lentsch, A. B., Shanley, T. P., Sarma, V. & Ward, P. A. (1997). In vivo suppression of NF-kappa B and preservation of I kappa B alpha by interleukin-10 and interleukin-13. *J.Clin.Invest.*, 100, 2443-2448.

Lernmark, A., Molenaar, J. L., van Beers, W. A., Yamaguchi, Y., Nagataki, S., Ludvigsson, J. & Maclaren, N. K. (1991). The Fourth International Serum Exchange Workshop to standardize cytoplasmic islet cell antibodies. The Immunology and Diabetes Workshops and Participating Laboratories. *Diabetologia*, 34, 534-535.

Lernmark, A. & Ott, J. (1998). Sometimes it's hot, sometimes it's not. *Nat.Genet.*, 19, 213-214.

Leslie, R. D., Atkinson, M. A. & Notkins, A. L. (1999). Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*, 42, 3-14.

Lewis, E. J., Hunsicker, L. G., Bain, R. P. & Rohde, R. D. (1993). The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N.Engl.J.Med.*, 329, 1456-1462.

Like, A. A. & Rossini, A. A. (1976). Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science*, 193, 415-417.

Lo, H. C., Lin, S. C. & Wang, Y. M. (2004). The relationship among serum cytokines, chemokine, nitric oxide, and leptin in children with type 1 diabetes mellitus. *Clin.Biochem.*, 37, 666-672.

Loetscher, P., Seitz, M., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. & Moser, B. (1996). Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca²⁺ mobilization, and enzyme release. *J.Immunol.*, 156, 322-327.

- Lohmann, T., Laue, S., Nietzschmann, U., Kapellen, T. M., Lehmann, I., Schroeder, S., Paschke, R. & Kiess, W. (2002). Reduced expression of Th1-associated chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes at diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetes*, 51, 2474-2480.
- Lonnrot, M., Salminen, K., Knip, M., Savola, K., Kulmala, P., Leinikki, P., Hyypia, T., Akerblom, H. K. & Hyoty, H. (2000). Enterovirus RNA in serum is a risk factor for beta-cell autoimmunity and clinical type 1 diabetes: a prospective study. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *J.Med.Virol.*, 61, 214-220.
- Lue, H., Kleemann, R., Calandra, T., Roger, T. & Bernhagen, J. (2002). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes.Infect.*, 4, 449-460.
- Makino, S., Harada, M., Kishimoto, Y. & Hayashi, Y. (1986). Absence of insulinitis and overt diabetes in athymic nude mice with NOD genetic background. *Jikken Dobutsu*, 35, 495-498.
- Manna, R., Migliore, A., Martin, L. S., Ferrara, E., Ponte, E., Marietti, G., Scuderi, F., Cristiano, G., Ghirlanda, G. & Gambassi, G. (1992). Nicotinamide treatment in subjects at high risk of developing IDDM improves insulin secretion. *Br.J.Clin.Pract.*, 46, 177-179.
- Manna, S. K. & Aggarwal, B. B. (1998). IL-13 suppresses TNF-induced activation of nuclear factor-kappa B, activation protein-1, and apoptosis. *J.Immunol.*, 161, 2863-2872.
- Martin, C. A. & Dorf, M. E. (1991). Differential regulation of interleukin-6, macrophage inflammatory protein-1, and JE/MCP-1 cytokine expression in macrophage cell lines. *Cell Immunol.*, 135, 245-258.
- Matsushima, M., LaPorte, R. E., Maruyama, M., Shimizu, K., Nishimura, R. & Tajima, N. (1997). Geographic variation in mortality among individuals with youth-onset diabetes mellitus across the world. DERI Mortality Study Group. Diabetes Epidemiology Research International. *Diabetologia*, 40, 212-216.
- Mattapallil, J. J., Dandekar, S., Canfield, D. R. & Solnick, J. V. (2000). A predominant Th1 type of immune response is induced early during acute *Helicobacter pylori* infection in rhesus macaques. *Gastroenterology*, 118, 307-315.
- Matthews, D. J., Clark, P. A., Herbert, J., Morgan, G., Armitage, R. J., Kinnon, C., Minty, A., Grabstein, K. H., Caput, D., Ferrara, P. & . (1995). Function of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma-chain in biologic responses of X-linked severe combined immunodeficient B cells to IL-2, IL-4, IL-13, and IL-15. *Blood*, 85, 38-42.
- Matthews, D. J., Hibbert, L., Friedrich, K., Minty, A. & Callard, R. E. (1997). X-SCID B cell responses to interleukin-4 and interleukin-13 are mediated by a receptor complex that includes the interleukin-4 receptor alpha chain (p140) but not the gamma c chain. *Eur.J.Immunol.*, 27, 116-121.
- Mauricio, D. & Mandrup-Poulsen, T. (1998). Apoptosis and the pathogenesis of IDDM: a question of life and death. *Diabetes*, 47, 1537-1543.
- McManus, C. M., Brosnan, C. F. & Berman, J. W. (1998). Cytokine induction of MIP-1 alpha and MIP-1 beta in human fetal microglia. *J.Immunol.*, 160, 1449-1455.
- Meazza, C., Travaglini, P., Pignatti, P., Magni-Manzoni, S., Ravelli, A., Martini, A. & De Benedetti, F. (2002). Macrophage migration inhibitory factor in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.*, 46, 232-237.

- Mehnert, H., Standl, E. & Usadel, K.-H. (1998). *Diabetologie*.
- Michaelis, D., Jutzi, E. & Heinke, P. (1993). Inzidenz- und Prävalenztrend der juvenilen Typ-1-Diabetes in der ostdeutschen Bevölkerung. *Diabet.Stoffw.*, 2, 245-250.
- Miesel, R., Kurpisz, M. & Kroger, H. (1995). Modulation of inflammatory arthritis by inhibition of poly(ADP ribose) polymerase. *Inflammation*, 19, 379-387.
- Miloux, B., Laurent, P., Bonnin, O., Lupker, J., Caput, D., Vita, N. & Ferrara, P. (1997). Cloning of the human IL-13R alpha1 chain and reconstitution with the IL4R alpha of a functional IL-4/IL-13 receptor complex. *FEBS Lett.*, 401, 163-166.
- Mischke, R., Kleemann, R., Brunner, H. & Bernhagen, J. (1998). Cross-linking and mutational analysis of the oligomerization state of the cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF). *FEBS Lett.*, 427, 85-90.
- Mitchell, R. A., Liao, H., Chesney, J., Fingerle-Rowson, G., Baugh, J., David, J. & Bucala, R. (2002). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 99, 345-350.
- Miyata, T., Maeda, K., Kurokawa, K. & van Ypersele, d. S. (1997). Oxidation conspires with glycation to generate noxious advanced glycation end products in renal failure. *Nephrol.Dial.Transplant.*, 12, 255-258.
- Mogensen, C. E. (1976). Progression of nephropathy in long-term diabetics with proteinuria and effect of initial anti-hypertensive treatment. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.*, 36, 383-388.
- Morgan, J. G., Dolganov, G. M., Robbins, S. E., Hinton, L. M. & Lovett, M. (1992). The selective isolation of novel cDNAs encoded by the regions surrounding the human interleukin 4 and 5 genes. *Nucleic.Acids Res.*, 20, 5173-5179.
- Moriwaki, M., Itoh, N., Miyagawa, J., Yamamoto, K., Imagawa, A., Yamagata, K., Iwahashi, H., Nakajima, H., Namba, M., Nagata, S., Hanafusa, T. & Matsuzawa, Y. (1999). Fas and Fas ligand expression in inflamed islets in pancreas sections of patients with recent-onset Type I diabetes mellitus. *Diabetologia*, 42, 1332-1340.
- Moser, B., Barella, L., Mattei, S., Schumacher, C., Boulay, F., Colombo, M. P. & Baggiolini, M. (1993). Expression of transcripts for two interleukin 8 receptors in human phagocytes, lymphocytes and melanoma cells. *Biochem.J.*, 294 (Pt 1), 285-292.
- Mosmann, T. R. & Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol.Today*, 17, 138-146.
- Mrena, S., Savola, K., Kulmala, P., Akerblom, H. K. & Knip, M. (1999). Staging of preclinical type 1 diabetes in siblings of affected children. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Pediatrics*, 104, 925-930.
- Muchamuel, T., Menon, S., Pisacane, P., Howard, M. C. & Cockayne, D. A. (1997). IL-13 protects mice from lipopolysaccharide-induced lethal endotoxemia: correlation with down-modulation of TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-12 production. *J.Immunol.*, 158, 2898-2903.
- Muntoni, S. & Muntoni, S. (1999). New insights into the epidemiology of type 1 diabetes in Mediterranean countries. *Diabetes Metab.Res.Rev.*, 15, 133-140.

- Nagata, M. & Yoon, J. W. (1992). Studies on autoimmunity for T-cell-mediated beta-cell destruction. Distinct difference in beta-cell destruction between CD4+ and CD8+ T-cell clones derived from lymphocytes infiltrating the islets of NOD mice. *Diabetes*, 41, 998-1008.
- Nguyen, M. T., Beck, J., Lue, H., Funzig, H., Kleemann, R., Koolwijk, P., Kapurniotu, A. & Bernhagen, J. (2003). A 16-residue peptide fragment of macrophage migration inhibitory factor, MIF-(50-65), exhibits redox activity and has MIF-like biological functions. *J.Biol.Chem.*, 278, 33654-33671.
- Nicoletti, F., Conget, I., Di Marco, R., Speciale, A. M., Morinigo, R., Bendtzen, K. & Gomis, R. (2001). Serum levels of the interferon-gamma-inducing cytokine interleukin-18 are increased in individuals at high risk of developing type I diabetes. *Diabetologia*, 44, 309-311.
- Nicoletti, F., Mancuso, G., Cusumano, V., Di Marco, R., Zaccone, P., Bendtzen, K. & Teti, G. (1997). Prevention of endotoxin-induced lethality in neonatal mice by interleukin-13. *Eur.J.Immunol.*, 27, 1580-1583.
- Nishihira, J. (2004). [A novel mediator--macrophage migration inhibitory factor]. *Nippon Rinsho*, 62, 2205-2211.
- Nishihira, J. & Ogata, A. (2001). Macrophage migration inhibitory factor as a target molecule in multiple sclerosis. *Curr.Opin.Investig.Drugs*, 2, 778-782.
- Nishino, T., Bernhagen, J., Shiiki, H., Calandra, T., Dohi, K. & Bucala, R. (1995). Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland. *Mol.Med.*, 1, 781-788.
- Nistico, L., Buzzetti, R., Pritchard, L. E., Van der, A. B., Giovannini, C., Bosi, E., Larrad, M. T., Rios, M. S., Chow, C. C., Cockram, C. S., Jacobs, K., Mijovic, C., Bain, S. C., Barnett, A. H., Vandewalle, C. L., Schuit, F., Gorus, F. K., Tosi, R., Pozzilli, P. & Todd, J. A. (1996). The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Hum.Mol.Genet.*, 5, 1075-1080.
- Noorchashm, H., Noorchashm, N., Kern, J., Rostami, S. Y., Barker, C. F. & Najj, A. (1997). B-cells are required for the initiation of insulinitis and sialitis in nonobese diabetic mice. *Diabetes*, 46, 941-946.
- Norgauer, J., Metzner, B. & Schraufstatter, I. (1996). Expression and growth-promoting function of the IL-8 receptor beta in human melanoma cells. *J.Immunol.*, 156, 1132-1137.
- Norris, J. M., Beaty, B., Klingensmith, G., Yu, L., Hoffman, M., Chase, H. P., Erlich, H. A., Hamman, R. F., Eisenbarth, G. S. & Rewers, M. (1996). Lack of association between early exposure to cow's milk protein and beta-cell autoimmunity. Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *JAMA*, 276, 609-614.
- Oberholzer, C., Oberholzer, A., Clare-Salzler, M. & Moldawer, L. L. (2001). Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J.*, 15, 879-892.
- Ogawa, M., Maruyama, T. & Hasegawa, T. (1985). The inhibitory effect of neonatal thymectomy on the incidence of insulinitis in non-obese diabetes (NOD) mice. *Biomed.Res.*, 6, 103-106.
- Onkamo, P., Vaananen, S., Karvonen, M. & Tuomilehto, J. (1999). Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia*, 42, 1395-1403.

- Onodera, S., Kaneda, K., Mizue, Y., Koyama, Y., Fujinaga, M. & Nishihira, J. (2000). Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis. *J.Biol.Chem.*, 275, 444-450.
- Padrines, M., Wolf, M., Walz, A. & Baggiolini, M. (1994). Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3. *FEBS Lett.*, 352, 231-235.
- Pan, J., Chan, E. K., Cheta, D., Schranz, V. & Charles, M. A. (1995). The effects of nicotinamide and glimepiride on diabetes prevention in BB rats. *Life Sci.*, 57, 1525-1532.
- Parving, H. H., Tarnow, L., Nielsen, F. S., Rossing, P., Mandrup-Poulsen, T., Osterby, R. & Nerup, J. (1999). Cyclosporine nephrotoxicity in type 1 diabetic patients. A 7-year follow-up study. *Diabetes Care*, 22, 478-483.
- Paul, T. L., Hramiak, I. M., Mahon, J. L., Freeman, D., Atkison, P., Finegood, D. T. & Dupre, J. (1993). Nicotinamide and insulin sensitivity. *Diabetologia*, 36, 369.
- Pedrini, M. T., Levey, A. S., Lau, J., Chalmers, T. C. & Wang, P. H. (1996). The effect of dietary protein restriction on the progression of diabetic and nondiabetic renal diseases: a meta-analysis. *Ann.Intern.Med.*, 124, 627-632.
- Pellat-Deceunynck, C., Wietzerbin, J. & Drapier, J. C. (1994). Nicotinamide inhibits nitric oxide synthase mRNA induction in activated macrophages. *Biochem.J.*, 297 (Pt 1), 53-58.
- Peters, C. E., Chaplin, D. J. & Hirst, D. G. (1997). Nicotinamide reduces tumour interstitial fluid pressure in a dose- and time-dependent manner. *Br.J.Radiol.*, 70, 160-167.
- Petley, A., Macklin, B., Renwick, A. G. & Wilkin, T. J. (1995). The pharmacokinetics of nicotinamide in humans and rodents. *Diabetes*, 44, 152-155.
- Phan, U. T., Lackman, R. L. & Cresswell, P. (2002). Role of the C-terminal propeptide in the activity and maturation of gamma -interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 99, 12298-12303.
- Phillips, J. C. & Scheen, A. J. (2002). [Info-congress. Study of the prevention of type 1 diabetes with nicotinamide: positive lessons of a negative clinical trial (ENDIT)]. *Rev.Med.Liege*, 57, 672-675.
- Plaisance, V., Thompson, N., Niederhauser, G., Haefliger, J. A., Nicod, P., Waeber, G. & Abderrahmani, A. (2002). The mif gene is transcriptionally regulated by glucose in insulin-secreting cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 295, 174-181.
- Pociot, F. & McDermott, M. F. (2002). Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Genes Immun.*, 3, 235-249.
- Pociot, F., Reimers, J. I. & Andersen, H. U. (1993). Nicotinamide--biological actions and therapeutic potential in diabetes prevention. IDIG Workshop, Copenhagen, Denmark, 4-5 December 1992. *Diabetologia*, 36, 574-576.
- Podar, T., Solntsev, A., Reunanen, A., Urbonaite, B., Zalinkevicius, R., Karvonen, M., LaPorte, R. E. & Tuomilehto, J. (2000). Mortality in patients with childhood-onset type 1 diabetes in Finland, Estonia, and Lithuania: follow-up of nationwide cohorts. *Diabetes Care*, 23, 290-294.
- Potolicchio, I., Santambrogio, L. & Strominger, J. L. (2003). Molecular interaction and enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor with immunorelevant peptides. *J.Biol.Chem.*, 278, 30889-30895.

- Pozzilli, P., Browne, P. D. & Kolb, H. (1996). Meta-analysis of nicotinamide treatment in patients with recent-onset IDDM. The Nicotinamide Trialists. *Diabetes Care*, 19, 1357-1363.
- Price, M. J., Li, L. T., Tward, J. D., Bublik, I., McBride, W. H. & Lavey, R. S. (1995). Effect of nicotinamide and pentoxifylline on normal tissue and FSA tumor oxygenation. *Acta Oncol.*, 34, 391-395.
- Rabinovitch, A. (1994). Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes*, 43, 613-621.
- RAKIETEN, N., RAKIETEN, M. L. & NADKARNI, M. V. (1963). Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother.Rep.*, 29, 91-98.
- Rankin, P. W., Jacobson, E. L., Benjamin, R. C., Moss, J. & Jacobson, M. K. (1989). Quantitative studies of inhibitors of ADP-ribosylation in vitro and in vivo. *J.Biol.Chem.*, 264, 4312-4317.
- Rapoport, M. J., Jaramillo, A., Zipris, D., Lazarus, A. H., Serreze, D. V., Leiter, E. H., Cyopick, P., Danska, J. S. & Delovitch, T. L. (1993). Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J.Exp.Med.*, 178, 87-99.
- Raport, C. J., Gosling, J., Schweickart, V. L., Gray, P. W. & Charo, I. F. (1996). Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha. *J.Biol.Chem.*, 271, 17161-17166.
- Rayner, M. L., Kelly, M. A., Mijovic, C. H. & Barnett, A. H. (2002). Sequencing of the second exon of the MHC class II DQ6 alleles in patients with type 1 diabetes. *Autoimmunity*, 35, 155-157.
- Raz, I., Elias, D., Avron, A., Tamir, M., Metzger, M. & Cohen, I. R. (2001). Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet*, 358, 1749-1753.
- Reimers, J. I., Larsen, C. M. & Mandrup-Poulsen, T. R. (2005). [European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT)--secondary publication. A randomized, placebo-controlled trial of intervention before the onset of type 1 diabetes]. *Ugeskr.Laeger*, 167, 293-296.
- Revelen, R., Bordron, A., Dueymes, M., Youinou, P. & Arvieux, J. (2000). False positivity in a cyto-ELISA for anti-endothelial cell antibodies caused by heterophile antibodies to bovine serum proteins. *Clin.Chem.*, 46, 273-278.
- Robertson, R. P. (1999). Prevention of recurrent hypoglycemia in type 1 diabetes by pancreas transplantation. *Acta Diabetol.*, 36, 3-9.
- Roger, T., David, J., Glauser, M. P. & Calandra, T. (2001). MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature*, 414, 920-924.
- Roger, T., Froidevaux, C., Martin, C. & Calandra, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates host responses to endotoxin through modulation of Toll-like receptor 4 (TLR4). *J.Endotoxin.Res.*, 9, 119-123.
- Rosengren, E., Bucala, R., Aman, P., Jacobsson, L., Odh, G., Metz, C. N. & Rorsman, H. (1996). The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction. *Mol.Med.*, 2, 143-149.

- Rot, A., Krieger, M., Brunner, T., Bischoff, S. C., Schall, T. J. & Dahinden, C. A. (1992). RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J.Exp.Med.*, 176, 1489-1495.
- Sakaue, S., Nishihira, J., Hirokawa, J., Yoshimura, H., Honda, T., Aoki, K., Tagami, S. & Kawakami, Y. (1999). Regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression by glucose and insulin in adipocytes in vitro. *Mol.Med.*, 5, 361-371.
- Sanjeevi, C. B. (2000). HLA-DQ6-mediated protection in IDDM. *Hum.Immunol.*, 61, 148-153.
- Sarri, Y., Mendola, J., Ferrer, J. & Gomis, R. (1989). Preventive effects of nicotinamide administration on spontaneous diabetes of BB rats. *Med.Sci.Res.*, 17, 987-988.
- Satoh, M. S. & Lindahl, T. (1992). Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature*, 356, 356-358.
- Schatz, D., Cuthbertson, D., Atkinson, M., Salzler, M. C., Winter, W., Muir, A., Silverstein, J., Cook, R., Maclaren, N., She, J. X., Greenbaum, C. & Krischer, J. (2004). Preservation of C-peptide secretion in subjects at high risk of developing type 1 diabetes mellitus--a new surrogate measure of non-progression? *Pediatr.Diabetes*, 5, 72-79.
- Schatz, D., Gale, E. A. & Atkinson, M. A. (2003). Why can't we prevent type 1 diabetes?: maybe it's time to try a different combination. *Diabetes Care*, 26, 3326-3328.
- Schatz, D. A. & Bingley, P. J. (2001). Update on major trials for the prevention of type 1 diabetes mellitus: the American Diabetes Prevention Trial (DPT-1) and the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT). *J.Pediatr.Endocrinol.Metab.*, 14 Suppl 1, 619-622.
- Schloot, N. C., Hanifi-Moghaddam, P., Kolb, H., Mandrup-Poulsen, T., Roep, B. O. & Knip, M. (2006). Association of immune mediators at diagnosis of Type 1 diabetes with later clinical remission. *Diabetic Medicine*, in press.
- Schonbeck, U., Brandt, E., Petersen, F., Flad, H. D. & Loppnow, H. (1995). IL-8 specifically binds to endothelial but not to smooth muscle cells. *J.Immunol.*, 154, 2375-2383.
- Schroder, J. M., Mrowietz, U., Morita, E. & Christophers, E. (1987). Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J.Immunol.*, 139, 3474-3483.
- Seissler, J., de Sonnaville, J. J., Morgenthaler, N. G., Steinbrenner, H., Glawe, D., Khoo-Morgenthaler, U. Y., Lan, M. S., Notkins, A. L., Heine, R. J. & Scherbaum, W. A. (1998). Immunological heterogeneity in type I diabetes: presence of distinct autoantibody patterns in patients with acute onset and slowly progressive disease. *Diabetologia*, 41, 891-897.
- Serreze, D. V., Chapman, H. D., Varnum, D. S., Hanson, M. S., Reifsnyder, P. C., Richard, S. D., Fleming, S. A., Leiter, E. H. & Shultz, L. D. (1996). B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new "speed congenic" stock of NOD.Ig mu null mice. *J.Exp.Med.*, 184, 2049-2053.
- Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Ryan, E. A., Korbitt, G. S., Toth, E., Warnock, G. L., Kneteman, N. M. & Rajotte, R. V. (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N.Engl.J.Med.*, 343, 230-238.
- She, J. X., Ellis, T. M., Wilson, S. B., Wasserfall, C. H., Marron, M., Reimsneider, S., Kent, S. C., Hafler, D. A., Neuberger, D. S., Muir, A., Strominger, J. L. & Atkinson, M. A. (1999).

Heterophile antibodies segregate in families and are associated with protection from type 1 diabetes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 96, 8116-8119.

Sherry, B., Tekamp-Olson, P., Gallegos, C., Bauer, D., Davatelis, G., Wolpe, S. D., Masiarz, F., Coit, D. & Cerami, A. (1988). Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 beta. *J.Exp.Med.*, 168, 2251-2259.

Shimada, A., Morimoto, J., Kodama, K., Suzuki, R., Oikawa, Y., Funae, O., Kasuga, A., Saruta, T. & Narumi, S. (2001). Elevated serum IP-10 levels observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 24, 510-515.

Smirnov, D. V., Smirnova, M. G., Korobko, V. G. & Frolova, E. I. (1995). Tandem arrangement of human genes for interleukin-4 and interleukin-13: resemblance in their organization. *Gene*, 155, 277-281.

Stamler, J., Vaccaro, O., Neaton, J. D. & Wentworth, D. (1993). Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care*, 16, 434-444.

Stratford, M. R., Dennis, M. F., Hoskin, P., Phillips, H., Hodgkiss, R. J. & Rojas, A. (1996). Nicotinamide pharmacokinetics in humans: effect of gastric acid inhibition, comparison of rectal vs oral administration and the use of saliva for drug monitoring. *Br.J.Cancer*, 74, 16-21.

Stratford, M. R., Rojas, A., Hall, D. W., Dennis, M. F., Dische, S., Joiner, M. C. & Hodgkiss, R. J. (1992). Pharmacokinetics of nicotinamide and its effect on blood pressure, pulse and body temperature in normal human volunteers. *Radiother.Oncol.*, 25, 37-42.

Sun, H. W., Bernhagen, J., Bucala, R. & Lolis, E. (1996). Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 93, 5191-5196.

Taylor, A. B., Johnson, W. H., Jr., Czerwinski, R. M., Li, H. S., Hackert, M. L. & Whitman, C. P. (1999). Crystal structure of macrophage migration inhibitory factor complexed with (E)-2-fluoro-p-hydroxycinnamate at 1.8 Å resolution: implications for enzymatic catalysis and inhibition. *Biochemistry*, 38, 7444-7452.

The Diabetes Control and Complications (DCCT) Research Group (1995). Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications (DCCT) Research Group. *Kidney Int.*, 47, 1703-1720.

The Diabetes Control and Complications Trial (2000). Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. *N.Engl.J.Med.*, 342, 381-389.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N.Engl.J.Med.*, 329, 977-986.

Thomas, C. D., Prade, M. & Guichard, M. (1995). Tumour oxygenation, radiosensitivity, and necrosis before and/or after nicotinamide, carbogen and perflubron emulsion administration. *Int.J.Radiat.Biol.*, 67, 597-605.

- Todd, J. A. (1999). From genome to aetiology in a multifactorial disease, type 1 diabetes. *Bioessays*, 21, 164-174.
- Topham, P. S., Csizmadia, V., Soler, D., Hines, D., Gerard, C. J., Salant, D. J. & Hancock, W. W. (1999). Lack of chemokine receptor CCR1 enhances Th1 responses and glomerular injury during nephrotoxic nephritis. *J.Clin.Invest.*, 104, 1549-1557.
- Tuomilehto, J., Karvonen, M., Pitkaniemi, J., Virtala, E., Kohtamaki, K., Toivanen, L. & Tuomilehto-Wolf, E. (1999). Record-high incidence of Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus in Finnish children. The Finnish Childhood Type I Diabetes Registry Group. *Diabetologia*, 42, 655-660.
- Turk, J., Corbett, J. A., Ramanadham, S., Bohrer, A. & McDaniel, M. L. (1993). Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 197, 1458-1464.
- Turner, R., Stratton, I., Horton, V., Manley, S., Zimmet, P., Mackay, I. R., Shattock, M., Bottazzo, G. F. & Holman, R. (1997). UKPDS 25: autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. UK Prospective Diabetes Study Group. *Lancet*, 350, 1288-1293.
- Vajo, Z. & Duckworth, W. C. (2000). Genetically engineered insulin analogs: diabetes in the new millenium. *Pharmacol.Rev.*, 52, 1-9.
- Van Damme, J. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. *Academic Press*, 185-208.
- Vannier, E., de Waal, M. R., Salazar-Montes, A., de Vries, J. E. & Dinarello, C. A. (1996). Interleukin-13 (IL-13) induces IL-1 receptor antagonist gene expression and protein synthesis in peripheral blood mononuclear cells: inhibition by an IL-4 mutant protein. *Blood*, 87, 3307-3315.
- Verge, C. F., Gianani, R., Yu, L., Pietropaolo, M., Smith, T., Jackson, R. A., Soeldner, J. S. & Eisenbarth, G. S. (1995). Late progression to diabetes and evidence for chronic beta-cell autoimmunity in identical twins of patients with type I diabetes. *Diabetes*, 44, 1176-1179.
- Verge, C. F., Stenger, D., Bonifacio, E., Colman, P. G., Pilcher, C., Bingley, P. J. & Eisenbarth, G. S. (1998). Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes: Combinatorial Islet Autoantibody Workshop. *Diabetes*, 47, 1857-1866.
- Vetter, U., Heinze, E., Beischer, W., Kohne, E., Kleihauer, E. & Teller, W. M. (1980). Haemoglobin A1c: a predictor for the duration of the remission phase in juvenile insulin-dependent diabetic patients. *Acta Paediatr.Scand.*, 69, 481-483.
- Virtanen, S. M., Laara, E., Hypponen, E., Reijonen, H., Rasanen, L., Aro, A., Knip, M., Ilonen, J. & Akerblom, H. K. (2000). Cow's milk consumption, HLA-DQB1 genotype, and type 1 diabetes: a nested case-control study of siblings of children with diabetes. Childhood diabetes in Finland study group. *Diabetes*, 49, 912-917.
- Vogt, B. W., Schleicher, E. D. & Wieland, O. H. (1982). epsilon-Amino-lysine-bound glucose in human tissues obtained at autopsy. Increase in diabetes mellitus. *Diabetes*, 31, 1123-1127.
- Waeber, G., Calandra, T., Roduit, R., Haefliger, J. A., Bonny, C., Thompson, N., Thorens, B., Temler, E., Meinhardt, A., Bacher, M., Metz, C. N., Nicod, P. & Bucala, R. (1997). Insulin

secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 94, 4782-4787.

Wierusz-Wysocka, B., Wykretowicz, A., Byks, H., Sadurska, K. & Wysocki, H. (1993). Polymorphonuclear neutrophils adherence, superoxide anion (O₂⁻) production and HBA1 level in diabetic patients. *Diabetes Res.Clin.Pract.*, 21, 109-114.

Williams, A. J., Bingley, P. J., Moore, W. P. & Gale, E. A. (2002). Islet autoantibodies, nationality and gender: a multinational screening study in first-degree relatives of patients with Type I diabetes. *Diabetologia*, 45, 217-223.

Williams, B., Gallacher, B., Patel, H. & Orme, C. (1997). Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro. *Diabetes*, 46, 1497-1503.

Winkler, G., Dworak, O., Salamon, F., Salamon, D., Speer, G. & Cseh, K. (1998). Increased interleukin-12 plasma concentrations in both, insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia*, 41, 488.

Wong, F. S., Visintin, I., Wen, L., Flavell, R. A. & Janeway, C. A., Jr. (1996). CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *J.Exp.Med.*, 183, 67-76.

Wong, T. Y., Shankar, A., Klein, R. & Klein, B. E. (2004). Retinal vessel diameters and the incidence of gross proteinuria and renal insufficiency in people with type 1 diabetes. *Diabetes*, 53, 179-184.

Wuyts, A., Proost, P. & Van Damme, J. (1998). Interleukin-8 and other CXC chemokines. *The Cytokine Handbook*.

Yamada, G., Shijubo, N., Takagi-Takahashi, Y., Nishihira, J., Mizue, Y., Kikuchi, K. & Abe, S. (2002). Elevated levels of serum macrophage migration inhibitory factor in patients with pulmonary tuberculosis. *Clin.Immunol.*, 104, 123-127.

Yamada, K., Nonaka, K., Hanafusa, T., Miyazaki, A., Toyoshima, H. & Tarui, S. (1982). Preventive and therapeutic effects of large-dose nicotinamide injections on diabetes associated with insulinitis. An observation in nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes*, 31, 749-753.

Yamamoto, K., Miyagawa, J., Itoh, N., Nakajima, H., Waguri, M., Shimada, T., Yasuda, K., Kono, N., Namba, M., Kuwajima, M., Hanafusa, T. & Matsuzawa, Y. (1997). Differentiation of beta-cells from ductal cells and acceleration of this process by nicotinamide: ultrastructural study on the non-obese diabetic (NOD) mouse with overt diabetes. *Biomed.Res.Tokyo*, 18, 171-178.

Ying, S., Meng, Q., Barata, L. T. & Kay, A. B. (2001). Macrophage inflammatory protein-1alpha and C-C chemokine receptor-1 in allergen-induced skin late-phase reactions: relationship to macrophages, neutrophils, basophils, eosinophils and T lymphocytes. *Clin.Exp.Allergy*, 31, 1724-1731.

Yoon, J. W. & Jun, H. S. (2001). Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 928, 200-211.

Yoon, J. W., Jun, H. S. & Santamaria, P. (1998). Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. *Autoimmunity*, 27, 109-122.

- Zacccone, P., Phillips, J., Conget, I., Gomis, R., Haskins, K., Minty, A., Bendtzen, K., Cooke, A. & Nicoletti, F. (1999). Interleukin-13 prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*, 48, 1522-1528.
- Zang, Y. C., Samanta, A. K., Halder, J. B., Hong, J., Tejada-Simon, M. V., Rivera, V. M. & Zhang, J. Z. (2000). Aberrant T cell migration toward RANTES and MIP-1 alpha in patients with multiple sclerosis. Overexpression of chemokine receptor CCR5. *Brain*, 123 (Pt 9), 1874-1882.
- Zekzer, D., Wong, F. S., Ayalon, O., Millet, I., Altieri, M., Shintani, S., Solimena, M. & Sherwin, R. S. (1998). GAD-reactive CD4+ Th1 cells induce diabetes in NOD/SCID mice. *J Clin. Invest.*, 101, 68-73.
- Zhang, X. & Bucala, R. (1999). Inhibition of macrophage migration inhibitory factor (MIF) tautomerase activity by dopachrome analogs. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, 9, 3193-3198.
- Zimmet, P. Z., Tuomi, T., Mackay, I. R., Rowley, M. J., Knowles, W., Cohen, M. & Lang, D. A. (1994). Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabet.Med.*, 11, 299-303.
- Zlotnik, A. & Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12, 121-127.
- Zozulinska, D., Majchrzak, A., Sobieska, M., Wiktorowicz, K. & Wierusz-Wysocka, B. (1999). Serum interleukin-8 level is increased in diabetic patients. *Diabetologia*, 42, 117-118.
- Zozulinska, D. A., Wierusz-Wysocka, B., Wysocki, H., Majchrzak, A. E. & Wykretowicz, A. (1996). The influence of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) duration on superoxide anion and hydrogen peroxide production by polymorphonuclear neutrophils. *Diabetes Res.Clin.Pract.*, 33, 139-144.
- Zurawski, G. & de Vries, J. E. (1994). Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol.Today*, 15, 19-26.
- Zurawski, S. M., Vega, F., Jr., Huyghe, B. & Zurawski, G. (1993). Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction. *EMBO J.*, 12, 2663-2670.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Vor- und Zuname: Simon Jörg Werner Schimmack
 Geburtstag: 13.08.1978
 Geburtsort: Duisburg
 Wohnort: 45478 Mülheim, Hochfelder Str. 51
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Religion: evangelisch

Schulbildung:

07/1985 - 07/1989 Besuch der Grundschule GGS Obermauerstraße
in Duisburg
 09/1989 - 06/1998 Besuch des Landfermann - Gymnasium in Duisburg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst:

07/1998 - 04/1999 Hauptgefreiter als Sanitätssoldat in Hemer, Ahlen und im
Sanitätszentrum Düsseldorf

Studium:

04/1999 - 09/2005 Studium der Humanmedizin an der
Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf
 10/2004 – 09/2005 PJ im ev. Krankenhaus Bethesda zu Duisburg
 11/2005 Approbation als Arzt
 04/2001 - 03/2004 Tutor des physiologischen Praktikums für Studierende
der Vorklinik am Institut für Herz- und
Kreislaufphysiologie an der HHU

Famulaturen:

09 - 10/2001 Famulatur in der klinischen Forschung des Deutschen
Diabetes Zentrum (Prof. Scherbaum)
 09 - 10/2002 Famulatur in der Orthopädie an der HHU (Prof. Krauspe)
 03/2003 Famulatur in der Pädiatrie und in der Gynäkologie am
Universitätsklinikum in Hamburg (Prof. Stahnke, Prof.
Hüneke)
 09 – 10/2003 Famulatur- und Entwicklungshilfaufenthalt in Sikasso
und Konna in Mali/Afrika (Dr. Kampo)

Promotionsarbeit:

08/2001 – 08/2007 experimentelle Doktorarbeit (ELISA und Cytometric bead
array/LiquiChip) im Rahmen des European Nicotinamid
Diabetes Intervention Trial (ENDIT) am Deutschen
Diabetes Zentrum an der Heinrich-Heine Universität
Düsseldorf, Direktor: Prof. Dr. W. Scherbaum

ärztliche Tätigkeit:

seit 01/2006 Assistenzarzt in der Viszeralchirurgie im EVK in Mülheim
(Prof. Gassel)

Danksagung

Meine Dankbarkeit gilt Frau PD Dr. med. N. Schloot und Herrn Professor Dr. rer. nat. H. Kolb für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Bereitstellung der Arbeitsmittel, die langen, interessanten und fruchtbaren Diskussionen sowie die Rolle als hervorragende Berater und Lehrer.

Ich denke besonders an Dr. Pejman Hanifi-Moghaddam, von dem ich alles über experimentelle Forschung gelernt habe, was ich weiß, der mir Begeisterung vermittelt und Neugier geweckt hat. Vielen Dank für das gemeinsame Arbeiten bis in die Nächte.

Ich danke Dr. Strassburger, der ebenfalls viel Zeit in die statistische Auswertung der ENDIT-Daten investiert und viel Verständnis und Interesse in den Diskussionen gezeigt hat.

Außerdem freue ich mich über die guten Worte und helfenden Hände von PD Dr. V. Burkart, W. Fingberg und R. Schreiner.