

**Aus dem Institut für Klinische Diabetologie des Deutschen Diabetes-Zentrums
-Leibniz-Institut-
an der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf**

Komm. Direktorin: Priv.Doz. Dr. med. Nanette C. Schloot

**Assoziation von systemischen Zytokin- und Chemokin-
Spiegeln mit natürlicher und Cyclosporin A-induzierter
Remission bei Typ 1 Diabetes**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der Heinrich - Heine - Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Olaf Giovanni De Rosa

2007

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg

Dekan

Referentin: Priv.-Doz. Dr. Schloot

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. MacKenzie

Inhaltsverzeichnis

Einleitung

1.	Diabetes mellitus	8
1.1.	Der Typ 1 Diabetes	9
1.2.	Immunologische Grundlage des Typ 1 Diabetes	11
1.3.	Bedeutung der Makrophagen beim Typ 1 Diabetes	12
1.4.	Bedeutung und Funktion der Zytokine	14
1.4.1.	Interleukin-10 (IL-10)	15
1.4.2.	Interferon- γ (IFN- γ)	17
1.5.	Bedeutung und Funktion der Chemokine	19
1.5.1.	Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1, CCL2)	21
1.5.2.	Macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α , CCL3)	22
1.6.	Cyclosporin A	25
1.7.	Remission und Insulinresistenz beim Typ 1 Diabetes	28
1.8.	Zielsetzung der vorliegenden Studie	35

Material und Methoden

2.	Materialien	37
2.1.	Geräte und Pipetten	37
2.1.1.	Gefäße	38
2.1.2.	Einmalmaterialien	38
2.1.3.	Chemikalien	39
2.1.4.	Lösungen	40

2.1.4.1.	Waschpuffer	40
2.1.4.2.	Überzug-Puffer	41
2.1.4.3.	Verdünnungslösungen	42
2.1.5.	Antikörper	43
2.1.6.	Standards	44
2.1.7.	Klinische Daten der Studienteilnehmer	44
2.1.8.	Statistische Auswertung	45
2.2.	Methoden	46
2.2.1.	Allgemeine Grundlagen des ELISA-Verfahrens	46
2.3.	Störfaktoren bei ELISA	48
2.3.1.	Stabilität von Zytokinen und Chemokinen im Serum	48
2.3.2.	Interferenz mit heterophilen Antikörpern	48
2.3.3.	Software-Fehler	49
2.4.	In-House ELISA Protokolle des Deutschen Diabetes Forschungsinstituts Düsseldorf	50
2.4.1.	MIP-1 α	50
2.4.2.	MCP-1	57
2.4.3.	IL-10	65
2.4.4.	IFN- γ	72
2.5.	Serumproben von Patienten mit Typ 1 Diabetes	79
2.5.1.	Aliquotierung und Lagerung	80

Ergebnisse

3.	Etablierung und Optimierung der In-House ELISA für MCP-1 und MIP-1 α	82
3.1.	Ermittlung der optimalen Konditionen	82

3.1.1.	Spiking und Interferenz mit heterophilen Antikörpern	86
3.1.2.	Stabilität und Linearität der Chemokine	90
3.2.	Charakteristika der Studienteilnehmer zu Studienbeginn	93
3.3.	Longitudinaler Verlauf der gemessenen Zyto-/Chemokine	94
3.3.1.	Longitudinaler Verlauf von IL-10	88
3.3.2.	Longitudinaler Verlauf von IFN- γ	90
3.3.3.	Longitudinaler Verlauf von MCP-1	98
3.3.4.	Longitudinaler Verlauf von MIP-1 α	99
3.3.5.	Zyto- und Chemokin Ratios	101
3.3.6.	TH1/TH2 Zytokin Ratio (IFN- γ /IL-10)	101
3.3.7.	TH1-lastige/TH2-lastige Chemokin Ratio (MIP-1 α /MCP-1)	103
3.4.	Korrelation von Zyto-/Chemokinen mit klinischen Patienten-Charakteristika bei Studienbeginn	105
3.4.1.	Korrelation von Zyto-/Chemokinen mit klinischen Patienten-Charakteristika zum Zeitpunkt 6 und 12 Monate	106

Diskussion

4.	Einführung	108
4.1.	Longitudinaler Verlauf der Zyto-/Chemokine	110
4.2.	Zytokin- und Chemokin Ratios	113
4.3.	Korrelation von Zyto-/Chemokinen mit klinischen Patienten- Charakteristika	114
4.4.	Schlussfolgerung	116

Literaturverzeichnis	117
Danksagung	143
Zusammenfassung	144
Lebenslauf	145

Abkürzungsverzeichnis

ADA	American Diabetes Association
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
BB	Bio-Breeding
BMI	Body mass index
CMV	Cytomegalie Virus
DNA	Desoxiribonucleinsäure (-acid)
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
EP	Endogenes Pyrogen
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
GAD	Glutamic acid decarboxylase
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GTT	Glukosetoleranztest
HLA	Human leukocyte antigen
IAA	Insulin Autoantikörper
IA2A	Insulinoma associated antigen 2 antibody
ICA	Inselzellantikörper (islet cell antibodies)
IDDM	Insulin dependent Diabetes Mellitus
IFG	Impaired fasting glycaemia
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGT	Impaired glucose tolerance
IL	Interleukin
IP	Interferon-gamma inducible protein
ISRE	IFN- γ -stimulated response elements
kDa	kiloDalton
LPS	Lipopolysaccharid

MCP	Monocyte chemoattractant protein
MHC	Major histocompatibility complex
MIG	Monokine induced by IFN-gamma
MIP	Macrophage inflammatory protein
NIDDM	Non-insulin dependant Diabetes Mellitus
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	Non obese diabetic (nicht adipös diabetisch)
OD	Optical density (optische Dichte)
RNA	Ribonucleinsäure (-acid)
SCYA2	Small inducible cytokine A2
TARC	Thymus and Activation-Regulated Chemokine
TCA-3	T-cell activation gene
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tween	Polyoxyethylsorbitmonolaureat
WHO	World Health Organization

Einleitung

1. Diabetes mellitus

Aufgrund der Tatsache, dass viele neue Erkenntnisse und aussagekräftige Daten zum Diabetes in den vergangenen Jahren intensiver Forschung gewonnen wurden, hat 1996 eine Expertengruppe der WHO (World Health Organization) und 1997 die ADA (American Diabetes Association) ein überarbeitetes Klassifikations- und Diagnosesystem zum Diabetes vorgeschlagen. 2001 veröffentlichte die DDG (Deutsche Diabetes Gesellschaft) ein mit den beiden vorher genannten Arbeitsgruppen in weiten Teilen übereinstimmendes System, wobei Begriffe wie „IDDM“ (insulin-dependent diabetes mellitus) oder „NIDDM“ (non-insulin-dependent diabetes mellitus) nicht mehr verwendet werden sollten. Bei der Einteilung wird unterschieden:

- I. Typ 1 Diabetes: B-Zell-Zerstörung, die zum absoluten Insulinmangel führt
 - A. immunologisch vermittelt
 - B. idiopathisch
- II. Typ 2 Diabetes: 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. Erkrankungen des exokrinen Pankreas, z.B. Pankreatitis
 - C. Endokrinopathien, z.B. Morbus Cushing
 - D. Medikamentös oder chemisch/toxisch induziert, z.B. durch Vacor (Rattengift)
 - E. Infektionen, z.B. CMV
 - F. Seltene Formen des immunvermittelten Diabetes, z.B. „Stiff-Person“-Syndrom
 - G. Genetische Defekte der Insulinwirkung, z.B. Leprechaunismus
 - H. Andere, gelegentlich mit Diabetes assoziierte genetische Syndrome, z.B.

Down-Syndrom

IV. Gestationsdiabetes

Zusätzlich unterscheidet man verschiedene Stadien des Diabetes mellitus:

- IGT (Impaired Glucose Tolerance)
- IFG (Impaired Fasting Glycaemia)
- Prädiabetes: Patienten mit einem nicht pathologischen Glukosetoleranztest (GTT), die aber mit hoher Wahrscheinlichkeit (positive Familienanamnese, Adipositas, positive Schwangerschaftsanamnese) einen Diabetes entwickeln werden
- Latenter Diabetes: nur unter Extrembedingungen pathologischer GTT
- Subklinischer Diabetes: pathologischer GTT bei normalen Blutzuckerkonzentrationen
- Manifeste Diabetes: permanente Hyperglykämie und Glukosurie

Die wichtigste Änderung der Diagnosekriterien für einen Diabetes mellitus war die Herabsetzung des diagnostischen Nüchternwertes der Plasma-Glukosekonzentration von 7.8 mmol/l (140 mg/dl) auf 7.0 mmol/l (126 mg/dl).

1.1. Der Typ 1 Diabetes

Der Typ 1 Diabetes ist durch eine Zerstörung der insulinproduzierenden Zellen (auch Betazellen genannt) in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas charakterisiert, die aufgrund von chronisch-progressiven Immunmechanismen selektiv und unwiderruflich geschädigt werden (Rossini et al., 1991). Diese Tatsache hat zur Folge, dass an Typ 1 Diabetes erkrankte Menschen einen absoluten Insulinmangel aufweisen und deshalb auf eine lebenslange exogene Insulinzufuhr angewiesen sind. In Deutschland leiden etwa 8% der Bevölkerung an Diabetes mellitus, wovon der Typ 2 Diabetes (auch als alters- oder übergewichtsbedingter Diabetes bezeichnet) ca. 90% ausmacht, der Typ 1 Diabetes im Gegensatz dazu nur ca. 10% der Gesamtdiabetiker umfasst (Kolb, 1990).

Grundsätzlich kann der Typ 1 Diabetes in jedem Lebensalter auftreten, in der Mehrzahl der Fälle manifestiert er sich jedoch vor dem 35. Lebensjahr, wohingegen der Diabetes Typ 2 meist nach dem 35. Lebensjahr klinisch auffällig wird (Scherbaum et al., 1999).

Der durch absoluten Insulinmangel gekennzeichnete Typ 1 Diabetes weist typische Symptome wie Polydipsie, Polyurie, Gewichtsabnahme und Müdigkeit bzw. verminderte Leistungsfähigkeit auf. Des Weiteren kann sich eine Ketoazidose ausbilden, da der Insulinmangel eine ungebremste Lipolyse mit einer gesteigerten Ketonkörperproduktion in Gang setzt. Die Ketoazidose wiederum kann zu Pseudoperitonitis, Kussmaulscher Atmung und Bewusstseinsintrübung bis hin zum ketoazidotischen Koma führen, welches einen lebensgefährlichen Zustand darstellt und der sofortigen intensivmedizinischen Behandlung bedarf. Die moderne Insulinbehandlung hat in den letzten Jahren wesentlich dazu beigetragen, dass betroffene Diabetiker eine erhebliche Aufwertung ihrer Lebensqualität und Lebensführung erfahren haben. Trotz der ständigen therapeutischen Verbesserungen treten diabetische Spätkomplikationen jedoch immer noch zu häufig auf. Als diabetische Spätkomplikationen werden die unspezifische Makroangiopathie (Frühatherosklerose), die Diabetes-spezifische Mikroangiopathie mit Prädilektion von Retina und Glomeruli (Retinopathie und Glomerulosklerose) und die diabetische Neuropathie, welche durch ein buntes klinisches Bild mit Abgrenzungsschwierigkeiten zu anderen neurologischen Erkrankungen charakterisiert ist, bezeichnet (Scherbaum et al., 1999; Siegenthaler et al., 1987; Herold et al., 2001).

Die Ursachen für die Entstehung des Typ 1 Diabetes sind bis heute nicht hinreichend geklärt worden. Grundlage der Erkrankung sind prädisponierende genetische Faktoren, die zum Teil identifizierbar sind. Besonders in den letzten zehn Jahren hat man durch intensive Sequenzierung der Allele des Haupthistokompatibilitätsantigenkomplexes (MHC) die facettenreiche genetische Grundlage zum Teil erklärt. Die Vorstellungen zur genetischen und immunpathologischen Ätiologie hat man nicht nur am Menschen, sondern auch aus Untersuchungen an Tiermodellen gewonnen, wie der nicht adipösen diabetischen Maus (NOD-Mäuse) oder der Bio-Breeding Ratte (BB-Ratte) (Mordes et al.,

1987; Rohane et al., 1993). Den größten Beitrag zum genetischen Krankheitsrisiko liefert die HLA-D-Region (human leukocyte antigen), insbesondere die zwei Hauptisotypen von MHC-II-Molekülen HLA DR3 und DR4 beim Menschen, I-A und I-E bei der Maus (Wicker et al., 1995). Es gibt noch andere Genloci, die verdächtig im Hinblick auf die Entstehung des Typ 1 Diabetes sind (Wicker et al., 1995; Vyse und Todd, 1996), aber größtenteils noch nicht identifiziert wurden (Mein et al., 1998). An der Diabetesentstehung werden neben den genetischen Faktoren auch Inselzell-spezifische Umwelttoxine, bestimmte Nahrungsbestandteile und Virusinfektionen vermutet (Herrath et al., 1998; Yoon, 1990 und 1991; Elliott et al., 1984). Bei Hochrisiko-Patienten hat zudem die Anwesenheit von immunologischen Markern einen prädiktiven Wert. Anhand des Autoantikörperstatus kann jedoch nicht vorhergesagt werden, wann eine Diabetes-Manifestation eintritt. An knapp 900 Patienten mit an zu Typ 1 Diabetes erstgradig-verwandten Personen wurde ICA (islet cell antibodies), IAA (insulin autoantibodies) und GAD-Antikörper (glutamic acid decarboxylase) gemessen, wobei sich zeigte dass 98% dieser Personengruppe, die im Verlauf einen Diabetes entwickelte, mindestens einen der gemessenen Parameter aufwies, bei 80% sogar zwei oder mehr Antikörper vorgefunden wurde (Verge et al., 1996). Allerdings gibt es auch Formen des Typ 1 Diabetes, für die es keine immunologische Evidenz gibt. Dies verdeutlicht eine Arbeit bei der afrikanische Patienten mit Typ 1 Diabetes keine Assoziation mit ICA aufwiesen (McLarty et al., 1990).

1.2. Immunologische Grundlage des Typ 1 Diabetes

Es ist bekannt, dass beim Typ 1 Diabetes eine chronisch progressive Inselentzündung (Insulitis) von meist jahre- bis jahrzehntelanger Dauer (Pipeleers et al., 1992; Thai et al., 1993) besteht, die von einer mononukleären Zellinfiltration in einer durch Insel-Antigen gerichteten T-Lymphozyten (Amrani et al., 2000) dominierenden Zerstörung der Betazellen resultiert. Gewebeanalysen post mortem und Biopsiematerialien zeigten

zusätzlich, wenn auch in kleinerem Umfang, Inselzellinfiltrate bestehend aus anderen Lymphozytentypen, Monozyten/Makrophagen und Granulozyten (Hänninen et al., 1992). Die Bedeutung dieser Zelltypen bei der Entstehung des Diabetes ist jedoch nur unzureichend erklärt. Zahlreiche Studien an Tiermodellen wie der NOD-Maus haben zur Vorstellung eines Stufenmodells bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes geführt. 1.) Die ersten Zeichen einer Perivaskulitis können schon 15 Tage postnatal beobachtet werden (Sugihara et al., 1989; Miyazaki et al., 1985). 4-10 Wochen nach der Geburt ist die Periinsulitis durch Vorkommen von Makrophagen, dendritischen Zellen und B- und T-Lymphozyten charakterisiert. Diese Zellen wandern zur periductulären Region, bleiben jedoch in der Peripherie der Inseln. 2.) Zu einem späteren Zeitpunkt infiltrieren die Zellen in das Innere der Inseln, es kommt zur Intra-Insulitis. Diese Phase ist entscheidend für die Erkennung von Inselzell-Antigenen (Wicker et al., 1992), obwohl nur wenige dieser Antigene so früh erkannt werden (Tisch et al., 1993; Kaufmann et al., 1993). Die beiden ersten Stufen werden auch als „Prädiabetes“ bezeichnet. 3.) Zur Manifestation des Diabetes kommt es, wenn 80-90% der Betazellen des Pankreas zerstört sind. Inselzellregeneration und metabolische Gegenregulation sind dann nicht mehr ausreichend, weshalb die typischen Symptome des Diabetes zum Vorschein kommen.

1.3. Bedeutung der Makrophagen beim Typ 1 Diabetes

Dieser Zelltypus stammt von den Promonozyten des Knochenmarks ab. Promonozyten entwickeln sich über die Stufe der Blutmonozyten zu reifen Makrophagen, die schließlich in die Gewebe einwandern und dort das sogenannte *mononukleäre Phagozytosesystem* bilden.

Makrophagen spielen bei immunologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Dieser Zelltypus unterliegt einem komplexen System von verschiedenen endogenen und exogenen Einflüssen. Aktivierte Makrophagen produzieren Zytokine und reaktive

Radikale, außerdem sind sie in der Lage, T-Zellen Antigene zu präsentieren. Zahlreiche Untersuchungen am Tiermodell untermauern in signifikanter Weise die wichtige Beteiligung der Makrophagen an der Entstehung des Diabetes. Es wurde gezeigt, dass die Inaktivierung von Makrophagen in transgenen NOD-Mäusen eine komplette Prävention des Diabetes zur Folge hatte (Jun et al., 1999). Auch die Behandlung mit Silika, einem selektiven Makrophagentoxin (Zimmermann et al., 1986), zeigte eine ausbleibende Manifestation des Typ 1 Diabetes (Oschilewski et al., 1985; Kiesel et al. 1986; Charlton et al., 1988).

In weiteren Studien wurde die zytotoxische Potenz der Makrophagen gegen die Beta-Zellen dokumentiert (Kroncke et al., 1991; Kasuga et al., 1993). Die durch aktivierte Makrophagen produzierten Zytokine und freien Sauerstoffradikale schienen eine zentrale Rolle bei der Schädigung der Inselzellen zu spielen. Zu den für die Pankreasinseln toxischen Zytokine zählen Interleukin-1 (IL-1) (Sjoholm, 1998; Mandrup-Poulsen et al., 1985; Pukel et al., 1988) und TNF- α , welches die Wirkung von IL-1 potenziert und die Insulinsekretion noch weiter supprimiert (Metha et al., 1994; Nerup et al., 1988; Rabinovitch et al., 1989). Auch eine Kombination von TNF- α mit IL-1 oder dem T-Zell-Zytokin IFN- γ zeigte einen zytotoxischen Effekt (Pukel et al., 1988; Soldevila et al., 1991). Zudem war eine Kombination von TNF- α und IFN- γ in der Lage MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Antigene auf Beta-Zellen zu induzieren (Pujol-Borrel et al., 1988).

Eine weitere zentrale Rolle bei der Diabetesentstehung nimmt Stickstoffmonoxid (NO) ein, welches ebenfalls von aktivierten Makrophagen sezerniert wird. Die für Inselzellen zytotoxische Wirkung von NO wurde in zahlreichen Studien gezeigt (Delaney et al., 1996; Gurlo et al., 1999; Kroncke et al., 1991). Eine Inhibierung von NO wirkte sich dagegen zytoprotektiv aus (Sekiya et al., 2000). Die erwähnten Befunde der Auswirkungen der NO-Synthese von Makrophagen zeigten somit eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes (Kolb et al., 1992).

1.4. Bedeutung und Funktion der Zytokine im Immunsystem

Zytokine sind Peptide mit niedrigem Molekulargewicht (zumeist zwischen 15 und 25 kDa), die von Zellen des Immunsystems sezerniert werden und als Mediatoren wichtige biologische Vorgänge regulieren. Charakteristisch für Zytokine sind deren geringe Konzentration und kurze Halbwertszeit im Serum. Anders als endokrine Hormone entfalten Zytokine deshalb ihre Wirkung gewöhnlich in parakriner oder sogar autokriner Art und Weise, d.h. sie wirken auf benachbarte Zellen oder auf die produzierende Zelle selbst. Die Produktion und Wirkung der Zytokine basiert auf einem komplexen Netzwerk. Diese Tatsache ist darauf zurückzuführen, dass immunkompetente Zellen in der Lage sind verschiedene Zytokine zu produzieren und diese wiederum, allein oder in Kombination mit einem oder mehreren anderen Zytokinen, modulatorisch auf andere Zellen des Immunsystems wirken. Zu den Funktionen der Zytokine zählen: 1.) Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten, 2.) Regulation des Wachstums und Differenzierung anderer Leukozyten, 3.) Regulation der antigenspezifischen T-Zellimmunantwort und B-Zell-Stimulation, 4.) Vermittlung von Entzündungsreaktionen, 5.) einige Zytokine besitzen chemotaktische Fähigkeiten, 6.) Kontrolle der Hämatopoese durch Differenzierung von Stammzellen im Knochenmark.

Die nachfolgenden Ausführungen erläutern die in dieser Arbeit untersuchten Zytokine genauer. Zum besseren Verständnis der hier vorgestellten Arbeit sollte zuvor jedoch etwas näher auf die weiter oben unter Punkt 3 erwähnte Regulation der antigenspezifischen T-Zellimmunantwort durch Zytokine eingegangen werden. T-Zellen werden je nach ihrer Differenzierung in CD4-(T-Helferzellen) und CD8-Zellen (zytotoxische T-Lymphozyten) unterteilt. Ein weiterer Subtyp wird T-Regulatorzelle (T-reg) genannt, die von enormer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz durch Hemmmechanismen ist. Dank verschiedener Arbeiten von Mossman et al. wird die Gruppe der CD4-Zellen weiter in TH1- und TH2-Zellen unterteilt, da sich diese in ihrer Zytokinproduktion unterscheiden. Man beobachtet, dass

TH1-Zellen IFN- γ und IL-2 produzieren und TH2-Zellen IL-4 und IL-10 ausschütten (Mossman et al., 1987). Das TH1/TH2-Konzept bildet auch die Grundlage für die hier vorgestellte Arbeit. Es sei jedoch auch erwähnt, dass neuere Untersuchungen immer deutlicher auf die Wichtigkeit einer weiteren Untergruppe von T-Zellen aufmerksam machen, der IL-17 produzierenden CD4-Zelle oder auch TH17-Zelle genannt, deren Hauptaufgabe darin besteht, entscheidend in inflammatorischen Reaktionen regulativ einzugreifen (Harrington et al., 2005, Mangan et al., 2006).

1.4.1. Interleukin-10 (IL-10)

Das pleiotrope humane Zytokin IL-10, welches im Jahre 1990 entdeckt wurde, ist ein Polypeptid von 18 kDa Molekulargewicht. Im Gegensatz zum murinen IL-10, welches nahe dem M-Terminus N-glykosyliert ist, enthält die humane Variante keine Kohlenhydrate. Zur Entdeckung des IL-10 kam es, da man auf der Suche nach einem Zytokin von TH2-Zellen war, welches in der Lage war die Proliferation, die Effektorfunktion und die Entwicklung von TH1-Zellen zu hemmen. Der Zytokinsynthese-Inhibitorfaktor (CSIF, jetzt IL-10) wurde als solcher identifiziert. Im DNAX Research Institute, Palo Alto, wurde eine cDNA, die für murines IL-10 kodiert, isoliert. Mit dieser Sonde konnte in humaner cDNA durch Kreuzhybridisierung das menschliche IL-10 identifiziert werden. Weiterhin wurde ein Mediator aus murinen B-Zell-Lymphomzellen isoliert, der die Proliferation von reifen und unreifen murinen Thymozyten in Anwesenheit von IL-2 und IL-4 verstärkte und die Proliferation muriner Mastzellen in Anwesenheit von IL-3 oder IL-4 erhöhte (MacNeil et al, 1990; Nakahata et al., 1992). Diese Aktivität wurde von rekombinantem IL-10 imitiert. Humanes und murines IL-10 weisen einen hohen Grad von Nukleotidsequenzhomologie auf (>80%). Die Gene von murinem und humanem IL-10 sind bei beiden Spezies auf Chromosom 1 lokalisiert (Flad et al., 1997). Außerdem zeigt humanes und murines IL-10 eine starke DNA- und Aminosäuresequenzhomologie

mit einem offenen Leserahmen im Epstein-Barr-Virus-Genom, BCRF-1, welches ähnliche Aktivitäten wie IL-10 zeigt. BCRF-1, auch virales IL-10 genannt, scheint die Produktion von IFN- γ herunterzuregulieren und somit die Persistenz des Virus zu fördern (Moore et al., 1993).

Humanes IL-10 wird von vielen Zellen gebildet: humane CD4-positive T-Zellen, TH0- und TH2-Zellklone sowie CD8-positive T-Zellen, Monozyten/Makrophagen, Keratinozyten, aktivierten B-Zellen, B-Zell-Lymphomen und Zellen von Burkitt-Lymphom-Linien, die mit EBV-Stämmen transformiert wurden. Die Auflistung der verschiedenen Zellen, die potentiell dazu in der Lage sind IL-10 zu bilden, macht deutlich, dass IL-10 strenggenommen kein TH2 spezifisches Zytokin ist. Aufgrund dieses Umstands ist auch die biologische Wirkung von IL-10 breit gefächert. Die Hemmung der Produktion von IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, und Lymphotoxin durch humanes IL-10 ist sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene nachweisbar. IL-4 und IFN- γ sind in der Lage die Produktion von IL-10 zu hemmen. Humanes IL-10 hemmt auch die von Monozyten/Makrophagen abhängige Zytokinsynthese (IFN- γ und TNF- α) durch humane IL-2 stimulierte NK-Zellen. Außerdem reduziert humanes IL-10 in von Monozyten/Makrophagen abhängigen Systemen nicht nur die Zytokinsynthese, sondern auch die Proliferation humaner T-Zellen und T-Zellklone (Flad et al., 1997). Die Expression von HLA-DR, -DP und -DQ humaner Monozyten wird ebenfalls von humanem IL-10 herunterreguliert. Man nimmt an, dass IL-10 die Produktion oder Funktion membrangebundener kostimulatorischer Moleküle, die für die Aktivierung von TH1-Zellen notwendig sind, inhibiert (Van Gool et al., 1999). Weiterhin hat IL-10 autoregulatorische Aktivitäten, indem es seine eigene Produktion hemmt. Da es die Produktion des IL-1 Rezeptorantagonisten heraufreguliert, hat es mit diesem zusammen eine starke antiinflammatorische Wirkung. Auch die Produktion von NO durch IFN- γ aktivierte Makrophagen, die von endogener TNF-Produktion abhängig ist, wird durch IL-10 inhibiert (Flad et al., 1997). Humanes IL-10 ist auch in der Lage als Kostimulator für die Proliferation humaner B-Lymphozyten zu

wirken (Stimulatoren können Staphylococcus aureus Cowan [SAC] oder Anti-IgM-Antikörper sein), welche dann IgM, IgG und IgA produzieren.

Zusammengefasst erweist sich IL-10 als ein wichtiger Mediator der TH2-Immunantwort. Dies zeigt sich deutlich, wenn Antagonisten für IL-10 selektiv eine Steigerung der TH1 Aktivität hervorrufen, was dann bei Infektionskrankheiten viraler oder bakterieller Genese von klinischer Bedeutung sein kann.

1.4.2. Interferon- γ (IFN- γ)

Im Jahre 1957 wurde ein löslicher Faktor von Lindenmann und Isaacs entdeckt, der aus virusinfiziertem Gewebe freigesetzt wurde. Dieser Faktor „interferierte“ mit der Virusreplikation im nichtinfizierten Gewebe (Lindenmann et al., 1957). In folgenden Untersuchungen stellte sich zudem heraus, dass das sog. Interferon aus mehreren Proteinen mit antiviraler Wirkung besteht.

Man unterscheidet drei verschiedene Interferonarten: IFN- α wird von Leukozyten gebildet, IFN- β wird hauptsächlich von Fibroblasten produziert, und schließlich IFN- γ , welches nach Aktivierung von T-Lymphozyten und NK-Zellen durch Antigene, Mitogene bzw. Zytokine wie IL-2 gebildet wird.

IFN- γ , früher auch als Typ II oder Immuninterferon bezeichnet, wird jedoch sowohl von CD4-positiven als auch von CD8-positiven T-Zellen produziert. Ein Vorläufermolekül von 166 Aminosäuren wird synthetisiert, von dem eine Signalsequenz von 23 Aminosäuren abgespalten wird. Es gibt zwei biologisch aktive Varianten von 20 bzw. 25 kDa, welche sich in ihrer Glykosylierung voneinander unterscheiden. Das Protein bildet Dimere oder Tetramere und hat zudem keine Homologie mit IFN- α und IFN- β . Im Gegensatz zu den beiden anderen Interferonen ist es bei pH 2,0 labil. Das Gen, welches für IFN- γ kodiert, wurde auf Chromosom 12 lokalisiert.

Die biologischen Wirkungen von Interferonen sind vielfältig und können zusammengefasst als antiviral, antiproliferativ und immunmodulierend bezeichnet werden. Zahlreiche Proteine, die den Stoffwechsel der Zellen verändern, werden durch Interferone induziert. Interferone hemmen die Vermehrung fast aller Viren. Hierzu gibt es zahlreiche Untersuchungen, wobei unterschiedliche Mechanismen aufgedeckt worden sind (Gyotoku et al., 2002). Beim Herpes-simplex-Virus wirkt Interferon auf die Synthese früher viral kodierter Proteine des Virus, der sog. β -Proteine (Straub et al., 1986). Beim SV-40-Virus liegt die Wirkung der Interferone vor der Transkription (Harms et al., 1995). Retroviren werden auf der Ebene des „virus budding“, d.h. des Ausschleusens neugebildeter Virionen, beeinflusst (Canivet et al., 1983). Bei Infektion mit lytischen RNA-Viren werden die zellulären Enzyme 2',5'-Oligoadenylatsynthetase und dsRNA-abhängige Proteinkinase gebildet, welche ihrerseits den für die Proteinbiosynthese wichtigen eukaryontischen Initiationsfaktor eIF-2 inaktiviert und so die Synthese neuer viraler Proteine verhindert.

Interferone hemmen zudem das Wachstum hämatopoetischer Progenitorzellen, von Fibroblasten und T- und B-Lymphozyten (Laato et al., 2001, Somasundaram et al., 2002). Auch können sie die Differenzierung von Zellen einleiten, wie z.B. die Differenzierung von Makrophagen aus der Promyelozytenlinie HL-60, oder auch Einfluss nehmen auf die Expression von Onkogenen. Neben den genannten antiviralen Wirkungen der Interferone hat sich die immunmodulatorische Aktivität, insbesondere das T-Lymphozyten-Produkt IFN- γ , als besonders bedeutsam herausgestellt. IFN- γ steigert die Bakterizidie und Phagozytose von Monozyten und Makrophagen (Moore et al., 1985), aber auch ihre akzessorische Funktion als antigenpräsentierende Zellen. Letztere Funktion steht in engem Zusammenhang mit der verstärkten Expression von Histokompatibilitätsantigenen der Klassen II und I, da die verstärkte Ausbildung von Rezeptoren für IgG wichtig ist für die Phagozytose von Bakterien, die Aufnahme von Immunkomplexen und die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität. Mittlerweile wurde die IFN- γ abhängige Aktivierung von Makrophagen sehr detailliert untersucht. IFN-

γ wirkt als sog. „Priming“-Signal aus Lymphozyten, das Makrophagen empfänglich macht für sog. „Trigger“-Signale wie LPS aus Bakterien oder TNF- α und IL-1 (Herriott et al., 1987). Dieses Zweistufensystem der Makrophagenaktivierung ist eines der wirkungsvollsten Effektormechanismen der Immunantwort und erzielt kurzfristig (für 10-15 Stunden) in Makrophagen einen extrem hohen Anstieg der Abwehrfunktion. IFN- γ hemmt das durch IL-4 induzierte Wachstum von B-Lymphozyten. Dadurch erweist es sich als von TH1-Lymphozyten produziertes Zytokin als Antagonist für die durch TH2-Lymphozyten gesteuerte IgG₁- und IgE-Synthese. Die pleiotrope Wirkung von IFN- γ beruht auf der Tatsache, dass viele Gene in ihrer Promotorregion „IFN- γ -stimulated response elements (ISRE)“ enthalten sind, die als Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren fungieren (Alcantara et al., 2002). Auch NK-Zellen werden in ihrer zytotoxischen Effizienz gesteigert, wobei verschiedene Mechanismen dem zugrunde zu liegen scheinen: zum einen die vermehrte Expression von Erkennungsstrukturen auf NK-Zellen (Ogasawara et al., 2002), zum anderen die verstärkte Stoffwechselaktivität und Bildung zytolytischer Faktoren, u.a. von TNF- α .

1.5. Bedeutung und Funktion der Chemokine im Immunsystem

Aufgrund intensiver Forschung, insbesondere in der letzten Dekade, sind mittlerweile 60 verschiedene Chemokine und 24 verschiedene Chemokin-Rezeptoren bekannt (Bacon et al., 1998). Chemokine, abgeleitet von chemotaktischen Zytokinen, haben eine Molekularmasse zwischen 8-10 kDa. Die Chemokine weisen eine zwischen 20-50 % variierende Sequenzhomologie untereinander auf. Man teilt die Chemokine in vier Hauptgruppen, wobei die Zugehörigkeit zu einer Gruppe über die Position von Cystein – Resten definiert wird: C -, CC -, CXC - und CX3C-Chemokine. Die meisten bekannten Chemokine werden den Gruppen CC und CXC zugeordnet.

Chemokine sind dazu in der Lage als potente chemotaktische Botenstoffe auf Subpopulationen von Leukozyten wie Neutrophile, Monozyten oder Lymphozyten zu wirken (Baggiolini et al., 1997). Die Einwanderung der Leukozyten in ein Entzündungsgebiet wird durch Chemokin-Gradienten gelenkt, die an Moleküle der extrazellulären Matrix fixiert sind (Haptotaxis). Weiterhin greifen Chemokine direkt in die Adhäsionsvorgänge am Endothel ein und fördern somit die transendotheliale Migration der Leukozyten (Schall et al., 1994; Imhof et al.; 1995). Die Ausschüttung der inflammatorischen Chemokine kann u. a. von Lipopolysaccharid (LPS), aber auch von anderen Stimuli induziert werden (Kolios et al., 1999). Dabei ist jedoch zu beachten, dass einige Chemokine (MIP-1 α , IP-10, MIG, IL-8, MIP-1 β) von IFN- γ induziert werden und sich dadurch chemotaktisch auf Monozyten, Neutrophile und TH1-Lymphozyten auswirken, andere Chemokine (MCP-1, Eotaxin, TCA-3, TARC, MDC) aber von IL-4 und IL-13 abhängig sind und somit eine TH2-Zellrekrutierung auslösen (Ward et al., 1998; Kolios et al., 1999; Baggiolini et al., 1997). Überdies sind IL-4 und IFN- γ dazu in der Lage sich gegenseitig in ihrer Zytokininduktion zu antagonisieren (Ward et al., 1998; Luther et al., 2001; Olson et al. 2002). Als Beispiel sei hier die Produktion von IP-10 und MIG von Makrophagen erwähnt, die durch IFN- γ induziert wird und von IL-4 inhibiert werden kann (Deng et al., 1994; Farrar et al., 1993).

Damit Chemokine ihre biologische Aktivität an immunkompetenten Zellen entfalten können, binden sie an spezifische Rezeptoren. CXC-Chemokine binden an CXCR, CC-Chemokine jedoch binden an CCR (Zlotnik et al., 2000). Diese Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben transmembranen Domänen, welche auch als Korezeptoren für verschiedene Viren wie HIV, EBV, HSV und andere fungieren (Jensen et al., 2003; Birkenbach et al., 1993; Ahuja et al., 1993). In den folgenden Ausführungen werden nun zwei Chemokine näher erläutert, die auch in dieser Arbeit untersucht wurden.

1.5.1. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1, CCL2)

MCP-1, auch monocyte chemotactic protein-1 genannt, wird auf Chromosom 17 kodiert (Rollins et al., 1991) und zwar vom sog. JE-Gen, oder SCYA2 (small inducible cytokine A2) genannt. In einer neueren Klassifikation wurde SCYA2 in CCL2 (CC-Chemokine Ligand 2) umbenannt (Zlotnik et al., 2000).

MCP-1 wird u.a. von Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, natürlichen Killerzellen, Endothelzellen und β -Zellen produziert (Tab.II, S.29) und wirkt mittels seines spezifischen Rezeptors CCR2 hauptsächlich auf Monozyten, basophile Granulozyten und T-Zellen (Bischoff et al., 1992; Valente et al., 1992), nicht aber auf neutrophile Granulozyten. Es wurden jedoch Punktmutationen der Aminosäuresequenz von MCP-1 beschrieben, wonach dieses Chemokin dann auch chemotaktisch auf Neutrophile wirkte (Beall et al., 1992 und 1996). Dabei scheint die unglykosylierte Form von MCP-1 (Molekularmasse von 6-7 kDA) eine potentere chemotaktische Aktivität zu besitzen als die 30 kDA glykosylierte Form (Liu et al., 1996). Die Ausschüttung von biologisch aktivem MCP-1 kann durch Stimulation mit PHA (Phytohämagglutinin), LPS (Lipopolysaccharid), IL-4 und IL-13 in vitro bewirkt werden (Reale et al., 2001; Leonard et al., 1990; Yoshida et al., 2001). Die vielfältigen und komplizierten Regulationsmechanismen, welche die Induktion von Chemokinen und Zytokinen bewirken, sind aber nicht nur von der Anwesenheit und der Konzentration bestimmter Botenstoffe abhängig. Neuere Untersuchungen zeigten eine weitere Feinmodulation durch andere Faktoren, wie z. B. die Anwesenheit und Wirkung von Sauerstoff auf die MCP-1 Produktion (Reale et al., 2003).

Die biologische Wirkung von MCP-1 ist nicht nur auf die Chemotaxis beschränkt. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass MCP-1 auch eine Rolle in der Differenzierung von T-Helfer-Zellen spielt und somit dazu beiträgt, ob sich die T-Zellen zu TH1- oder TH2-Zellen wandeln. Als Beispiel sei hier die Wirkung von MCP-1 auf dendritische Zellen genannt. Dendritische Zellen sind sehr bewegliche antigen-präsentierende Zellen,

welche via Chemotaxis zum Ort der Infektion zwecks Antigen-Aufnahme wandern, um von den nicht-lymphoiden Organen über Lymphknoten bis hin zur Milz zu gelangen (Foti et al., 1999). MCP-1 scheint nicht nur die Differenzierung von Monozyten zu modulieren, sondern auch, die Ausschüttung von IL-12 von dendritischen Zellen zu inhibieren und somit eine Inhibierung der TH1-Differenzierung zu bewirken (Omata et al., 2002).

Da es sich beim Typ 1 Diabetes um eine immun-medierte Erkrankung handelt, wurde die Rolle von MCP-1 in vielen Studien, wie u.a. auch in der vorliegenden Untersuchung, versucht zu charakterisieren. MCP-1 gilt als ein TH2-lastiges Chemokin, was durch eine vorwiegende TH2-Zellrekrutierung zum Ausdruck kommt. Einerseits wurde gezeigt, dass in einer Studie mit Diabetikern ein erniedrigter MCP-1 Serumspiegel mit erhöhten Werten von Autoantikörpern (GAD, IA 2) assoziiert war (Hanifi-Moghaddam et al., 2003), wohingegen die Überexpression von MCP-1, ausgelöst durch Hyperglykämie, gestörte Glukosetoleranz oder Adipositas mit diabetestypischen Folgekomplikationen wie z.B. kardiovaskulären Erkrankungen einherging (Takaishi et al., 2003; Piemonti et al., 2003; Takahashi et al, 2003).

Zusammengefasst machen diese Ausführungen deutlich, dass MCP-1, wie auch viele andere an der Immunregulation beteiligten Mediatoren, komplizierten und auf verschiedenen Ebenen voneinander abhängigen Faktoren und Umständen unterliegen.

1.5.2. Macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α , CCL3)

MIP-1 α ist ein säurehaltiges Protein bestehend aus 69 Aminosäuren und einer Molekularmasse von 7,8 kDA. Es gibt zwei Varianten: MIP-1 α (CCL3) und MIP-1 β (CCL4), beide auf Chromosom 17 lokalisiert (Irving et al., 1990). Am Rande sei erwähnt, dass chromosomale Aberrationen in den Gen-Abschnitten, die für MIP-1 α kodieren, häufig mit der Neurofibromatosis 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. MIP-1 α und MIP-1 β haben eine hohe Sequenzhomologie auf Proteinbasis von ca. 60% (Sherry et al., 1988). Das entsprechende Gen-Symbol lautet SCYA3, jetzt umbenannt in CCL3 (Zlotnik et al., 2000). MIP-1 α wird auch EP (endogenes Pyrogen) genannt, da Studien den Nachweis der Induktion eines monophasischen Fieberverlaufes erbrachten (Davatelis et al., 1989). Wie auch MCP-1 gehört MIP-1 α in die Gruppe der sog. CC-Chemokine, welches in der Lage ist an zwei verschiedene Rezeptoren zu binden: CCR1 und CCR5 (Gao et al., 1993; Raport et al., 1996), wobei an Rezeptor CCR5 nicht nur MIP-1 α und MIP-1 β sondern auch das Chemokin RANTES (CCL5) bindet.

MIP-1 α wird von Makrophagen, eosinophilen Zellen, T-Zellen und NK-Zellen sezerniert (Martin et al., 1991, Lee et al., 2000; Kukita et al., 1997). Zielzellen von MIP-1 α sind Monozyten/Makrophagen, T-Zellen (TH1>TH2), NK-Zellen, basophile Granulozyten, dendritische Zellen und Knochenmarkzellen (Graham et al., 1990; Fahey et al., 1992; Loetscher et al., 1996) (Tab.II, S.29). Wie auch bei anderen immunologischen Botenstoffen, hat die Sezernierung von MIP-1 α verschiedene biologische Wirkungen zur Folge. Es wurde gezeigt, dass MIP-1 α nicht nur chemotaktisch auf Monozyten/Makrophagen wirkt, sondern auch als ein Ko-Aktivator dieser Zellen fungiert, und dass u.a. zusammen mit IFN- γ eine TH1-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 TH1-Zellrekrutierung führt. Es wurde gezeigt, dass MIP-1 α auch als potenter Agonist auf basophile Granulozyten wirkt durch eine schnell induzierte Veränderung des zytosolischen Calciums, der Freisetzung von Histamin und Sulfido-Leukotrienen (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 TH1-Zellantwort ausgelöst durch MIP-1 α und anderen proinflammatorischen Botenstoffen 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 von Typ 1 Diabetes 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 (Cameron et al., 2000). MIP-1 α /MIP-1 β Ratio korreliert mit destruktiver Insulitis und Progression zum manifesten Diabetes in NOD-Mäusen (nonobese diabetic), wohingegen eine erniedrigte intrapankreatische MIP-1 α /MIP-1 β Ratio in NOR-Mäusen (nonobese diabetes-resistant) beobachtet wurde, wobei gleichzeitig nachgewiesen wurde, dass eine Behandlung mit IL-4, was einen Typ 1 Diabetes in NOD-Mäusen mittels TH2-Zellpolarisierung verhindert, eine Herunterregulierung des MIP-1 α Rezeptors CCR5 in Inselzellen bewirkt (Cameron et al., 2000). Interessant sind auch Beobachtungen bei frisch manifesten Patienten mit Typ 1 Diabetes mit erniedrigter Expression TH1-assoziiertes 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 MIP-1 β Spiegel. Ähnliche Untersuchungen bei prädiabetischen Typ1 Diabetes Patienten zeigten erhöhte MIP-1 α Spiegel bei den Personen mit Inselzellautoantikörpern (Hanifi-Moghaddam et al., 2006). Eine andere Arbeit machte 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).

1.6. Cyclosporin A

Eine Forschergruppe der Firma Sandoz in Basel war in den 70er Jahren auf der Suche nach Substanzen zur Behandlung von Pilzinfekten beim Menschen. Die Forscher vermuteten, dass Bodenpilze chemische Verbindungen produzieren, mit denen sie sich gegen andere Bodenpilze zur Wehr setzen. Bei Sandoz vermehrte die Forschergruppe Bodenpilze auf Nährmedien und testete die daraus gewonnenen Rohextrakte zusammen mit vielen Tausend anderen Substanzen. Einige aus diesen Proben isolierte Pilzstämme wurden ausgewählt, um in verschiedenen Tests auf die Bildung von antibiotischen oder antifungischen Substanzen untersucht zu werden. Einer davon war *Tolypocladium inflatum*. Der Pilz wies zwar keine Wirkung gegen Bakterien auf, hemmte jedoch andere Pilze in ihrem Wachstum und verursachte bei ihnen eine ganz besondere, spezifische Art der Verzweigung (Ramifizierung). Es folgte eine aufwendige chemische Analyse der aktiven Substanz, des Cyclosporins A. Als Antibiotikum war Cyclosporin A nicht interessant, jedoch stellte sich heraus, dass es die Abwehrreaktion des körpereigenen Immunsystems unterdrückte (Borel et al., 1995). Eine derartige immunsuppressive Wirkung ist zum Beispiel erwünscht, wenn Krankheiten vorliegen, bei denen sich das Immunsystem gegen körpereigenes Gewebe richtet oder bei Organtransplantationen, bei denen das Immunsystem normalerweise versucht, das transplantierte "fremde" Organ abzustößen. Maßgeblich an der Entdeckung und weiteren Erforschung der immunsuppressiven Wirkung von Cyclosporin A waren die Arbeitsgruppen um Borel und Stahelin in den 70er Jahren, die die experimentelle Plattform entwickelten und im Tierversuch den immunsuppressiven Nachweis des Cyclosporins A erbrachten (Borel et al., 1976). Aufgrund seiner spezifischen Wirkung wurde Cyclosporin A im weiteren Verlauf mit Erfolg in der Transplantationsmedizin eingesetzt, und findet auch Anwendung bei Psoriasis, glomerulären Krankheiten und Behcet-Uveitis.

Cyclosporin ist ein Cyclopeptid aus 11 Aminosäuren und hat die chemische Formel $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$. Es wirkt durch Bindung an Immunophiline (intrazelluläre

Bindungsproteine) und Hemmung von Calcineurin (Schreiber et al., 1992, Fischer et al., 1989, Tropschug et al., 1990), einer Proteinphosphatase, und damit den Beginn einer Kaskade, die schließlich die Bildung von Interleukin-2, Interleukin-4 und anderer Genprodukte unterdrückt (Sideras et al., 1988, Kronke et al., 1984), sodass zwar Fremdantigene erkannt werden, die Immunantwort aber ausbleibt oder zumindest stark reduziert wird. Dieser Vorgang ist reversibel: unterlässt es ein Transplantiertes, Cyclosporin einzunehmen, lösen die T-Lymphozyten die Immunantwort gegen das Transplantat aus und die gefürchtete Abstoßungsreaktion beginnt. Die Wirkung ist besonders stark in CD4-Lymphozyten. Das Cyclosporinmolekül hat ausgeprägte hydrophobe Eigenschaften, was die Entwicklung eines speziellen Lösungsmittelgemisches zur oralen Einnahme nötig machte. Es ist jedoch gut löslich in organischen Lösungsmitteln wie Ethanol, Methanol, Aceton, Ether und Fett (Verheyden et al., 1994, Yee et al., 1991). Nachteile der Behandlung mit Cyclosporin, besonders bei Langzeittherapie, sind die Nebenwirkungen, wovon im Folgenden nur einige genannt werden: Erhöhung der Serumspiegel von Kreatinin und Harnstoff bis hin zu Nierenschädigung mit Strukturveränderungen, Anstieg von Bilirubin und Leberenzymen, erhöhtes Risiko für lymphoproliferative Störungen und maligne Tumoren, Kardiotoxizität, Menstruationsstörungen, Hautaffektionen, Muskelschwäche, neurologische Störungen, Hypertonie, Hypertrichose, gastrointestinale Symptome (Min et al., 1991, Miach 1986, Calne et al., 1982).

Mit der Entdeckung des Cyclosporins wurden neue Fragestellungen aufgeworfen, und die Annahme, dass autoimmune Vorgänge eine Zerstörung der insulinproduzierenden Pankreaszellen einleiten und schließlich Typ 1 Diabetes zur Folge haben, war der Beginn der Erforschung der Beeinflussbarkeit autoimmuner Prozesse durch Pharmakotherapie (Rossini et al., 1984, Kolb et al., 1985). Studien am Typ 1 Diabetes Tiermodell der BB-Ratte zeigten erste Erfolge einer Behandlung mit Cyclosporin, welche sich in einer Prävention eines Diabetes zeigten (Laupacis et al., 1983). Daraufhin folgten Pilotstudien an kleinen menschlichen Kollektiven mit frisch manifestem Typ 1 Diabetes,

wobei sich auch hier der Effekt des Cyclosporins in einer Erhöhung der Remissionsrate bei den Patienten manifestierte (Assan et al., 1985, Stiller et al., 1984). Kurz darauf fand eine Studie in Frankreich statt, die mit einer größeren Probandenzahl die Wirkung von Cyclosporin auf die Remissionsrate bei Patienten mit frisch manifestem Typ 1 Diabetes dokumentierte. Auch hier zeigte sich eine signifikant erhöhte Remissionsrate (Remission definiert als: $< 0,25$ U(Insulin)/kg/d) bei den Patienten, die über 9 Monate behandelt wurden (Feutren et al., 1986). Im Jahre 1988 wurde die *European-Canadian Randomized Control Trial Group* veröffentlicht, die die Beobachtung einer größeren Personengruppe (188 manifeste Typ 1 Diabetes Patienten, die höchstens 6 Wochen vor Studienbeginn einer Insulintherapie zugeführt wurden, und höchstens 14 Wochen vor Studienbeginn erste typische Diabetes-Symptome zeigten), die mindestens 1 Jahr mit Cyclosporin behandelt wurden, zum Thema hatte. Auch in dieser Studie bestätigten sich die Resultate vorangegangener Cyclosporin-Studien. Die Remissionsrate (definiert als: kein Insulin benötigt oder Glukagon-stimulierter C-Peptid-Plasmaspiegel ≥ 0.6 nM), die 6 und 12 Monate nach Studienbeginn ermittelt wurde, wurde durch Cyclosporin erhöht und eine damit assoziierte Verbesserung der β -Zellfunktion beobachtet. Die Remissionsrate wurde abermals gesteigert, wenn die Probanden weniger als 6 Wochen vor Studienbeginn erste Diabetes-Symptome zeigten und weniger als 2 Wochen vor Studienbeginn mit Insulin behandelt wurden (Canadian-European Trial Group, 1988). Obwohl u. a. gezeigt werden konnte, dass Cyclosporin die pankreatischen Inselzellen vor zytotoxischen Makrophagen schützte und zu dessen Funktionserhaltung beitrug (Burkart et al., 1992), so zeigte sich jedoch in verschiedenen anderen Langzeitstudien, dass durch die Gabe von Cyclosporin nur eine Verzögerung, nicht jedoch eine Prävention oder gar Heilung des Typ 1 Diabetes bewirkt werden konnte (Carel et al., 1996, De Filippo et al., 1996, Martin et al., 1991). Zusätzlich entwickelten mehrere Patienten Zeichen einer Nierenschädigung als Nebenwirkung der Cyclosporin A Behandlung, weshalb der klinische Einsatz von Cyclosporin beim Typ 1 Diabetes nicht mehr zu rechtfertigen war (Schernthaner, 1995, Faulds et al., 1993).

1.7. Remission und Insulinresistenz beim Typ 1 Diabetes

Unter Remission (lat. Remissio = Nachlassen, Erholung), auch „Honeymoon-Phase“ genannt, versteht man eine nach dem Erstauftreten eines Diabetes mellitus Typ 1 zu beobachtende spontane Stoffwechselverbesserung, in der das Pankreas wieder Insulin produziert, die typischerweise zu einer Verminderung des Insulinbedarfs bis hin zur völligen Unabhängigkeit exogener Insulinzufuhr führt. Die Hoffnung, dass mit Eintreten der Remission der Typ 1 Diabetes geheilt sein könnte, ist leider trügerisch. Die Remissionsphase dauert meistens 2-3 Monate an, in seltenen Fällen kann sie auch 2 Jahre oder länger dauern. Nach dieser Zeit versiegt die endogene Insulinproduktion jedoch und eine exogene Insulinsubstitution wird nötig, da sonst erhebliche und auch lebensgefährliche Stoffwechselentgleisungen drohen (Abb. I).

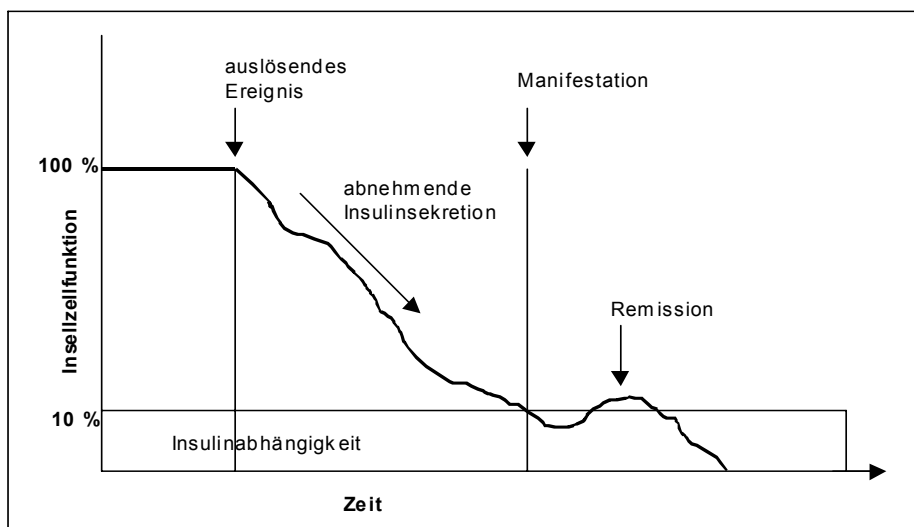


Abb.: I: Schema des Krankheitsverlaufes beim Typ 1 Diabetes. Adaptiert von G.S.Eisenbarth, *New England Journal of Medicine (NEJM)*, 1982

Bis heute ist es noch nicht gelungen eine gültige und einheitliche Definition des Begriffs Remission in Zusammenhang mit dem Typ 1 Diabetes zu bilden. Dies liegt daran, dass die Fülle der vielen verschiedenen Faktoren, die man bei dieser Erkrankung beobachten kann, Einfluss auf die klinische Erstmanifestation, den weiteren Verlauf, aber auch auf den prädiabetischen Status haben. Nicht jede Studie untersucht dieselben zahlreichen Parameter, die der Remission förderlich sind oder einen negativen Einfluss haben und so eine Progression des Krankheitsverlaufes zur Folge haben. Überdies sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht sämtliche Faktoren identifiziert, die die Erkrankung in Richtung einer Remission lenken könnten. Denkbar wäre auch eine mögliche gedachte optimale Konstellation einiger Faktoren zueinander, die eine komplette und vor allem langfristige Remission bewirken könnte. Die vielen möglichen Variablen machen deutlich, warum der Begriff der Remission beim Typ 1 Diabetes in vielen Studien unterschiedlich bewertet und definiert wird.

Je nach Studie variiert die Zahl der Patienten, die während der Beobachtungszeit in eine Phase der kompletten, partiellen oder sogar langfristigen Remission gelangen (Lombardo et al., 2002, Bober et al., 2001, Knip et al., 1982). Eine Erklärung für die zum Teil erheblich voneinander abweichende Spannbreite der Remissionsphase ist, wie weiter oben schon erwähnt, u.a. die Uneinheitlichkeit der Probandengruppen, aber auch die in jeder Studie verschiedenen Parameter und unterschiedlichen Definitionen der Remission (Tab.I). Der Grad der Remission wird meist als Kombination von gutem HbA_{1c} (entsprechend einer guten Stoffwechseleinstellung) und dabei geringem oder fehlendem exogenen Insulinbedarf beschrieben. Auch das messbare C-Peptid als Ausdruck der endogenen Insulin(rest)produktion wird bei einigen Studien zur Definition hinzugezogen.

Tabelle I: Beispiele aus publizierten Arbeiten zur Definition von Remission beim Typ 1 Diabetes.

Remissionskriterien	Autor
- HbA1c <7.5% - benötigtes Insulin <0.38 U/kg/d - Datenerhebung 3-7 Tage und 3-4 Monate nach Diagnosestellung	Schloot NC et al., 2007 in <i>Diabet Med.</i>
- normales HbA1c - kapilläre Nüchtern-Blutglukose <7.8 mM - keine Insulintherapie für mind. 14 Tage - Datenerhebung 3,6,9,12 Monate nach Studienbeginn	Hramiak IM et al., 1993 in <i>Diabetes Care</i>
- Nüchtern-Blutglukose <7.8 mM - Postprandiale Blutglukose <11.1 mM - HbA1c <7.5% - keine benötigte Insulin- oder orale antidiabetische Therapie - Datenerhebung 6,9,12 Monate nach Studienbeginn	Vialettes B et al., 1990 in <i>Diabet Med.</i>
- normales HbA1c - benötigtes Insulin <0.3 U/kg/d - Remissionsdauer mind. 10 Tage - Datenerhebung 3,6,12 Monate nach Studienbeginn	Bonfanti R et al., 1998 in <i>Acta Diabetol.</i>
- benötigtes Insulin <0.5 U/kg/d - Datenerhebung 1,3,6,12,18,24 Monate nach Diagnosestellung	Muhammad BJ et al., 1999 in <i>Arch Dis Child.</i>
- HbA1c <6.5% - benötigtes Insulin <0.4 U/kg/d - Remissionsdauer mind. 1 Monat	Scholin A et al., 1999 in <i>J Intern Med.</i>
- stimuliertes Plasma-C-Peptid >0.6 nM oder - kein benötigtes Insulin mit BZ-Werten innerhalb des Zielbereichs - Datenerhebung 6,12 Monate nach Studienbeginn	Canadian-European Randomized Control Trial Group, 1988 in <i>Diabetes</i>

In der letzten Zeit wurde zunehmend klar, dass die Rate der Remission oder deren Ausmaß auch von der Insulinresistenz abhängt. In einer Arbeit von Greenbaum wurde der Faktor der Insulinresistenz von verschiedenen Seiten beleuchtet und in Zusammenhang gebracht mit dem Krankheitsverlauf und der Remission beim Typ 1 Diabetes (Greenbaum, 2002). Seit dem sich die Hinweise darauf verdichten, dass dem Diabetes eine immunologische Zerstörung der Inselzellen zu Grunde liegt, haben Wissenschaftler weltweit ihr Hauptaugenmerk auf die Rolle der versiegenden Insulinsekretion gelenkt. Der biologische Effekt der Normoglykämie resultiert aber nicht

nur aus einer intakten, den Bedürfnissen angepassten Insulinsekretion, sondern ist gleichzeitig abhängig von der peripheren Insulinsensitivität. Dieser Umstand war schon früh bekannt, dass nämlich die Insulinsensitivität sehr wohl einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat (Ginsberg, 1977). Es ist allgemein akzeptiert, dass die periphere Insulinresistenz ein kritischer Faktor bei der Entstehung des Typ 2 Diabetes ist, jedoch wird die gestörte Insulinsensitivität erst in jüngster Zeit wieder mit dem Typ 1 Diabetes in Verbindung gebracht (Leslie et al., 1997). Die These, dass zur Krankheitsentstehung entweder die Insulinresistenz oder der progrediente β -Zellverlust verantwortlich ist, versuchte eine Arbeitsgruppe mit einem Probandenkollektiv zu zeigen, die aus normoglykämischen, ICA+ und erstgradig (zu an Typ 1 Diabetes erkrankten) verwandten Personen bestand. Hierbei zeigte sich, dass Probanden die mit Nicotinamid behandelt wurden eine höhere Insulinresistenz und eine erniedrigte Glukose-Toleranz aufwiesen, wobei eine nochmalige Messung nach Absetzen der Nicotinamid-Gabe eine Normalisierung der Blut-Glukosewerte offenbarte (Greenbaum et al., 1996). Diese Studie macht auf die Probleme bei der Interpretation von klinischen Interventionsstudien aufmerksam. Nicht allein die sinkende Insulinsekretion ist ursächlich für die klinische Manifestation des Diabetes, sondern eben auch die, hier durch Nicotinamid-Gabe, ausgelöste steigende Insulinresistenz, die selbst auch eine Änderung der Insulinsekretion bewirkt.

Viele Autoren vertreten die Meinung, dass die Phase der Remission die Folge einer Verbesserung der Insulinsekretion ist, welche sich nach der akuten körpereigenen Immunantwort einstellt und so eine Reduzierung oder kompletter Wegfall der exogenen Insulinzufuhr mit relativ normalen Blutzuckerwerten beobachtet werden kann. Dabei zeigen andere Studien auch einen Zusammenhang zwischen Remission und Insulinresistenz bzw. effektiverer Insulinsensitivität. Beispielsweise zeigte eine Arbeit, dass diejenigen Patienten mit frisch manifestem Typ 1 Diabetes eine verbesserte Insulinsensitivität aufwiesen während sie sich in der Remissionsphase befanden, verglichen mit anderen nicht in Remission befindlichen Diabetikern. Der gemessene

Glukose-uptake war in dieser Probandengruppe um 40 % höher als bei den Personen mit Typ 1 Diabetes, die nicht in eine Phase der Remission kamen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Insulinresistenz während des ersten Jahres nach Krankheitsbeginn variabler zu sein schien, als bei Individuen, die schon mehrere Jahre an Diabetes litten. Dazu wurden 53 Patienten in 3 Gruppen eingeteilt: Patienten, die 2-10 Jahre, 11-20 Jahre und mehr als 20 Jahre an Diabetes litten. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede zur vergleichenden Diabetikergruppe während des ersten Jahres nach Krankheitsbeginn. Bei den Langzeit-Diabetikern fand man verminderte C-Peptid-Level, einen erhöhten Insulinbedarf und erhöhte HBA_{1c}-Werte (Yki-Jarvinen et al., 1986 und 1984). Auch andere Studien zeigten signifikante Zusammenhänge zwischen Beginn der Remission und verbesserter Insulinresistenz, wobei interessanterweise auch demonstriert werden konnte, dass der Verlust der Remission, hin zu einem insulinabhängigen Status, assoziiert war mit einer Verringerung der Insulinsensitivität, oder anders ausgedrückt mit einer Verstärkung der Insulinresistenz (Finewood et al., 1990, Hramiak et al., 1993). Die genannten Studien sowie auch andere hier nicht erwähnte Arbeiten können eine Assoziation von Remission und Insulinresistenz nicht von der Hand weisen, weshalb sich zwangsläufig die Frage ergibt, worin dieser Zusammenhang seinen Grund hat. Denkbar wäre, dass gerade die akute Stoffwechsellage ein Grund für die steigende Insulinresistenz im Sinne einer stetigen Erschöpfung der körpereigenen gegenregulatorischen Maßnahmen sein könnte. Man kann vermuten, dass auch andere Faktoren eine Rolle spielen, die vielleicht eine Erklärung für den Zusammenhang zwischen Remission und Insulinresistenz liefern. Möglicherweise ist eine Änderung der Hormonsituation dafür mitverantwortlich, wobei nicht nur eine Korrelation zwischen exzessiv gemessenem Wachstumshormon und verminderter Insulinsensitivität festgestellt wurde, sondern sich auch ein Rückgang der Sekretion von Wachstumshormon bei Verbesserung der Stoffwechsellage zeigte (Acerini et al., 2000, Sharp et al., 1987). Vielleicht kann aber auch die Betrachtung der Hyperglykämie oder der Hypoinsulinämie dazu beitragen eine Erklärung oder zumindest

einen Hinweis auf den Einfluss der Insulinresistenz zu liefern. Eine Arbeit konnte demonstrieren, dass der Insulineffekt bei an Typ 1 Diabetes erkrankten Menschen niedriger war nach einer 24 stündigen Periode der Hyperglykämie, als nach einer 24 stündigen Periode der Euglykämie (Yki-Jarvinen, 1990). Dies könnte möglicherweise einen Hinweis auf eine toxische Komponente bei Hyperglykämie sein, welche dann die Insulinresistenz nach sich zieht oder daran beteiligt ist. Unterstützt wird diese These durch eine Arbeit bei der Phlorizin im Tiermodell angewendet wurde (90%ige pankreatektomierte Ratten). Phlorizin senkt den Blutzuckerspiegel durch Einwirkung auf Nierentubuli. Nachdem die Ratten einer chronischen Hyperglykämie (4 Wochen) ausgesetzt waren, zeigte sich bei der mit Phlorizin behandelten Gruppe eine suffiziente Insulinsekretion (Rossetti et al., 1987). Dies verdeutlicht, dass ein chronisch erhöhter Blutzuckerspiegel eine ungenügende Insulinsekretion zur Folge haben kann, welche aber reversibel ist, wenn wieder der Status der Normoglykämie erreicht wird. Zu den genannten Aspekten gesellt sich noch der Einfluss der exogenen Insulinsubstitution auf die Insulinresistenz bei Diabetikern hinzu. Dieser Gesichtspunkt sollte in die Überlegungen miteinbezogen werden, da in Studien mit Patienten die an einem Typ 1 Diabetes leiden zwangsläufig eine Insulinsubstitution stattfindet, sei es aus therapeutischen oder aus experimentellen Gründen. Bezogen auf die Insulinresistenz hat sich gezeigt, dass eine intensiviertere Insulintherapie im Vergleich zu einer konventionellen Therapie dazu führt, dass Diabetiker der ersten Gruppe eine höhere Insulinsensitivität aufwiesen, als Probanden die nur die konventionelle Insulintherapie bekamen, selbst nach einem Erfassungszeitraum von 5 Jahren (Linn et al., 1996). Die vorstehenden Ausführungen machen auf die Tatsache aufmerksam, dass der Insulinsensitivität bzw. Insulinresistenz bei Präventions- und Interventionsstudien zum Typ 1 Diabetes zu wenig Beachtung geschenkt wurde, da viele Arbeiten den verbesserten Funktionszustand der Pankreasinseln, und damit auch eine erhöhte Insulinsekretion, als primären therapeutischen Effekt ansehen, der als immunmodulatorische Intervention zur Dämpfung der Zerstörung der β -Zellen

interpretiert wird. Wenn man Interventionsstudien bei Patienten mit Typ 1 Diabetes mit Cyclosporin A betrachtet, stellt man fest, dass die Remissionsrate im ersten Jahre nach Cyclosporin-Gabe im Vergleich zu den Kontrollgruppen höher war (European-Canadian Trial Group, 1988), wobei dieser Unterschied im zweiten Jahr nach der Applikation nicht mehr beobachtet werden konnte (Bougneres et al., 1990). Besonders interessant war die Beobachtung, dass Personen, die mit Cyclosporin A behandelt wurden selbst nach 2 Jahren eine bessere Funktion der β -Zellen aufwiesen als vergleichbare Kontrollgruppen (Assan et al., 1990). Hinzu kamen noch Hinweise, dass der Verlust der Remission bei mit Cyclosporin behandelten Probanden assoziiert war mit einer gleichzeitigen Erhöhung der Insulinresistenz (Burcelin et al., 1993). Es wurde darüber hinaus die Überlegung angestellt, dass ein weniger toxisches Behandlungsregime als mit Cyclosporin A kombiniert mit einer minimal supportiven Insulintherapie bei in Remission befindlichen Patienten die Phase der Remission merklich verlängert werden könnte und so eine optimale Insulinsensitivität erreicht werden könnte. Aufgrund der Zusammenhänge zwischen Remission und Insulinresistenz sprach sich Greenbaum in ihrer Arbeit dafür aus, zumindest eine repräsentative Personengruppe in künftigen Interventionsstudien mit ausreichend validen Tests sowohl die β -Zell-Funktion, als auch die Insulinsensitivität zu erfassen, damit auch dem Einfluss der sich eventuell ändernden Insulinresistenz Rechnung getragen wird (Greenbaum, 2001). Weiterhin ist zu überlegen die Phase der Remission schärfer zu definieren, denn die vorstehenden Ausführungen machen deutlich, dass es gerade bei Präventions- und Interventionsstudien sinnvoll wäre vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, um mögliche potentielle Therapiestrategien zu optimieren.

Letztlich sollte im Zusammenhang mit Insulinresistenz die sogenannte „Accelerator-Hypothese“ (Beschleuniger-Hypothese), die erstmals von T.J. Wilkin formuliert wurde, erwähnt werden. Diese Hypothese besagt, dass dem Typ 1 und 2 Diabetes dieselbe Störung in Bezug auf die Insulinresistenz auf dem Boden genetisch bedingter Faktoren zugrunde liegt (Wilkin, 2001 und 2006). Die These identifiziert 3 Prozesse, die in

variabler Weise den Verlust von Betazellen beschleunigen: Konstitution, Insulinresistenz und die darauffolgende Immunantwort. Die Gewichtszunahme verursacht eine Erhöhung der Insulinresistenz, die wiederum eine Schwächung der Glukosekontrolle nach sich zieht. Die erhöhte Blutglukose beschleunigt ihrerseits die Apoptose der Betazellen (Glukotoxizität), was schließlich zu einer überschüssigen Immunantwort führt. Die hier genannte Hypothese wird durch eine Arbeit gestützt, die zeigt, dass übergewichtige Kinder im Vergleich zu Gesunden gleichen Alters eher einen Typ 1 Diabetes entwickeln (Betts et al., 2005).

1.8. Zielsetzung der vorliegenden Studie

Die Pathogenese des Typ 1 Diabetes ist assoziiert mit der Infiltration mononukleärer Zellen, was letztlich zur Zerstörung der β -Zellen führt. Auch der Zusammenhang von Chemo- und Zytokinen in Bezug auf den diabetischen Krankheitsprozess ist in zahlreichen Studien am Tiermodell dokumentiert. Eine Beobachtung an NOD-Mäusen zeigt, dass sich sowohl TH1- als auch TH2-Zytokin-Spiegel im Serum während des Krankheitsverlaufes ändern und mit Insulinitis sowie pankreatären Zytokinen korrelieren (Schloot et al., 2002). Dieser Zusammenhang leitete zu der Überlegung, ob man TH1/TH2 - Zyto-/Chemokin-Spiegel auch als Monitor beim Krankheitsverlauf bei Typ 1 Diabetes heranziehen könnte. Eigens für diese Arbeit wurde eine Messmethode etabliert (ELISA) und bestehende Messprotokolle optimiert. Ein weiterer Fokus dieser Arbeit besteht aus dem Versuch Prädiktion von Remission sowie die Auswirkungen immunsuppressiven Eingreifens beim diabetischen Krankheitsprozess anhand von Immunparametern zu erlangen, in der vorliegenden Studie also durch die Behandlung mit Cyclosporin A. Für die Untersuchungen konnte auf Serumproben von Patienten aus der Cyclosporin A Studie zurückgegriffen werden (Canadian-European Randomized Control Trial Group, 1988). Die schwindende endogene Insulinproduktion wird durch

exogene Insulinzufuhr kompensiert, was in vielen Fällen mit einer Verbesserung der endogenen Insulinsekretion und Insulinsensitivität einhergeht. Diese Phase wird Remission oder „Honeymoon-Phase“ genannt. Immunsuppressive Medikamente wie Cyclosporin A sind in der Lage diese Phase zu induzieren oder zu verlängern. Hier wird die These überprüft, ob sich die Serum-Level von Zyto-/Chemokinen während der Remission oder als Antwort auf eine immunsuppressive Behandlung mit Cyclosporin A verändern. Des Weiteren wird in dieser Arbeit untersucht, ob sich der natürliche Verlauf der Immunparameter ändert (Placebogruppe) in Abhängigkeit von der Krankheitsprogression. Hierzu wurden repräsentativ (für TH1 Zyto-/Chemokine IFN- γ und MIP-1 α , für TH2 Zyto-/Chemokine IL-10 und MCP-1) Botenstoffe im Serum mittels ELISA untersucht und ausgewertet. Letztlich interessiert auch, ob eine Korrelation zwischen Zyto-/Chemokinen mit metabolischen und klinischen Patienten-Parametern wie Alter, BMI oder HbA_{1c} besteht, um so möglicherweise eine Aussage bezüglich der Prädiktion zu formulieren.

Tabelle II: Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Zyto-/Chemokine.

Zyto-/Chemokin	produziert von	Zielzelle	Th-Typ
IFN γ	T-Zellen, natürlichen Killerzellen	natürliche Killerzellen (Aktivierung), CD-4-Zellen (zwecks Differenzierung zu TH1 Zellen)	TH1
IL-10	T-Zellen, Makrophagen, EBV-transformierte B-Zellen, CD-4/CD-8 Zellen, Keratinozyten, aktivierte B-Zellen	Makrophagen/Monozyten (Supprimierung) B-Lymphozyten (Kostimulation)	TH1/TH2
MIP-1 α (CCL3)	T-Zellen, Makrophagen, natürliche Killerzellen, eosinophile Zellen	Makrophagen/Monozyten, T-Zellen (TH1>TH2), natürliche Killerzellen, basophile Granulozyten, dendritische Zellen, Knochenmarkzellen	TH1
MCP-1 (CCL2)	Lymphozyten, Makrophagen/Monozyten, natürliche Killerzellen, Endothelzellen, β -Zellen	Monozyten, T-Zellen, basophile Granulozyten	TH2

Material und Methoden

2. Materialien

2.1. Geräte und Pipetten:

Acht-Kanal-Pipetten:	Eppendorf Forschung 300 µl, 100 µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Finnpipette 1500 µl, Labsystem, Los Angeles, USA
Ein-Kanal-Pipetten:	Eppendorf Forschung 1000, 100, 10 µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Pipetus-Akku, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
ELISA Fotometer:	Titertek Multiskan MMC, EFLAB, Finnland
Gefrierschränke:	Comfort –32°C, Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland Forma Scientific –86°C Gefrierschrank, Marietta, USA
Kühlschränke:	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Magnetrührer:	RS-9, Klein Feld Labortechnik, Gehrden, Deutschland IKAMAG RCT, Janke und Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Manuelle Plattenwäsche:	Wasch-12-Kanal, Dunn
PH-Meter:	pH-Meter 761 Calimatic, Knick, Berlin, Deutschland
Schüttler:	Titramax 100, Heidolph, Chemnitz, Deutschland
Sterile Arbeitsbank:	HB2572 Lamin Air, Heraeus Instrument, Osterode, Deutschland
Uhr:	3-zeilig, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Vakuumpumpe:	Laboport, KNF, Freiburg, Deutschland
Vortex:	VF2, Janke und Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland

Waagen: Sartorius analytisch, Sartorius, Göttingen, Deutschland
 Wasseraufbereitung: Milli-Q, Milipore, Molsheim, Frankreich
 Zentrifugen: Zentrifuge CS-15R, Beckmann, Fullerton, USA
 Zentrifuge Christ 4400, Heraeus, Osterode, Deutschland
 Zentrifuge Sepatech, Heraeus, Osterode, Deutschland

2.1.1. Gefäße

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

2.1.2. Einmalmaterialien

Abdeckfolien: Versiegelungsfolie
 Parafilm M, American National Can, Greenwich
 Einmalpipetten: 25 ml, 10 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
 Eppendorf Röhrchen: 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 Matrix Röhrchen: 1,4 ml, Matrix, Hudson, USA
 Mikrotiter-Platten: F96-Maxisorp Nunc-Imunoplatte, Nunc, Wiesbaden,
 Deutschland
 PCR-Gefäße: 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
15 und 50 ml-Röhrchen: 50 ml, 15 ml, Greiner Bio-one, Solingen, Deutschland

2.1.3. 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 (Fötale Kälberserum): Virus und Mycoplasma getestet, Endotoxin getestet, steril gefiltert, PAA Linz, Österreich
HRP-Konjugat: ELISA Grade Streptavidin, Biosource, Camarillo, USA
Milchpulver: Glücksklee, Nestle, München, 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
Natriumcarbonat: NaHCO_3 , Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
Natriumchlorid: NaCl , Merck, Darmstadt, Deutschland
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%, Titrisol 1N, Merck, Darmstadt, Deutschland
Tetramethylbenzidin (TMB): TMB Plus gebrauchsfertig, KEM/EN/TEC NS, Kopenhagen, Dänemark

Thiomersal:	$C_9H_9HgO_2SNa$, Sigma Aldrich Laborchemikalien, Seelze, Deutschland
Tween 20:	$C_{58}H_{114}O_{26}$, Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.4. Lösungen

2.1.4.1. Waschpuffer

0,2 M Phosphat gepufferte Salze (PBS: phosphate buffered saline):

als Grundlösung (zwanzig-fache Konzentration)

32	g	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$
6	g	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$
164	g	NaCl
900	ml	Aqua destillata
20	μg	Thiomersal (Konservierungsmittel)

Bei Raumtemperatur (18-25°C) wird der pH überprüft und falls nötig auf 6,8 - 6,9 mit konzentriertem HCl oder NaOH titriert. Danach wird destilliertes Wasser hinzugegeben bis zu einem Gesamtvolumen von 1 Liter (nach einer zwanzig-fachen Verdünnung wird der Puffer einen pH von 7,2 - 7,4 haben). Zuletzt fügt man 20 μg Thiomersal als Konservierungsmittel hinzu. Diese hergestellte Vorratslösung kann bis zu drei Monate bei 2 - 8°C gelagert werden. Bei der Lagerung dieser Lösung bei 2 - 8°C können sich ausfallende Salzkristalle bilden. Bevor man die Vorratslösung zu anderen Lösungen weiterverarbeitet, sollte man in diesen Fällen den konzentrierten Puffer moderat bei ca. 37°C aufwärmen, damit sich die gebildeten Kristalle lösen können.

0,2 M Phosphat gepufferte Salze (PBS: phosphate buffered saline):

als Gebrauchslösung (einfache Konzentration)

100 ml PBS (zwanzig-fache Konzentration)

1900 ml Aqua destillata

0,2 M Phosphat gepufferte Salze + 0.005% Tween 20 (PBS-Tween):

als Gebrauchslösung (einfache Konzentration)

100 ml PBS (zwanzig-fache Konzentration)

1900 ml Aqua destillata

50 µl Tween 20

PBS-Tween sollte kräftig geschüttelt werden, damit sich Tween in der Lösung gut verteilen kann. Beide Lösungen können bei +4°C bis zu einer Woche aufbewahrt werden.

2.1.4.2. Überzug-Puffer (Coating puffer)

0,1 M Natriumbicarbonathydrat/ Natriumcarbonat pH 9,6 (Überzug-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

Man nimmt 70 ml von Lösung A und fügt Lösung B unter Rühren solange hinzu, bis ein pH von 9,6 erreicht wird. Die Lösung kann bei 2-8°C bis zu einer Woche aufbewahrt werden.

Natriumcarbonat pH 9,6 (Überzug-Puffer 2):

0,356 g	$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0,84 g	NaHCO_3
100 ml	Aqua destillata

auf pH 9,6 titrieren.

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

0,2 M Natriumphosphat pH 6,7 (Überzug-Puffer 3):

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.

0,2 M Natriumphosphat pH 9,6 (Überzug-Puffer 4):

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 9,6 titrieren.

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

2.1.4.3. Verdünnungslösungen**10%ig Fötiales Kälberserum/PBS (10%ig FCS/PBS):**

10 ml	Fötiales Kälberserum (FCS)
90 ml	Phosphat gepufferte Salze (PBS, einfache Konzentration)

Diese Lösung wurde auch zum Blocken benutzt.

0,5%ig Milchpulver/PBS:

0,5 g Milchpulver
100 ml Phosphat gepufferte Salze (PBS, einfache Konzentration)

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

Stopp-Lösung 1,8 N Schwefelsäure:

37 ml H_2SO_4
363 ml Aqua destillata

2.1.5. Antikörper

Macrophage inflammatory protein-1 α :

- *Monoclonaler* Anti-humaner MIP-1a/CXCL3 Antikörper (erster Antikörper), Maus IgG_{2a}, Klon 14215.41, 0.5 mg/ml (LOT HJ04), Cat# MAB670, R&D Systems, Minneapolis, USA.
- *Biotinylierter* Anti-humaner MIP-1a Antikörper (zweiter Antikörper), Ziegen IgG, Polyclonal, Cat# BAF270, 0.05 mg/ml (LOT UU03), R&D Systems, Minneapolis, USA.

Monocyte chemotactic protein-1:

- *Monoclonaler* Anti-humaner MCP-1 Antikörper (erster Antikörper), Maus IgG_{2b}, Klon 23007.111, Cat# MAB679, 0.5 mg/ml (LOT JU04), R&D Systems, Minneapolis, USA.
- *Biotinylierter* Anti-humaner MCP-1 Antikörper (zweiter Antikörper), Ziegen IgG, Polyclonal, Cat# BAF279, 0.05 mg/ml (LOT AKY02), R&D Systems, Minneapolis, USA.

Interferon- γ :

– *Monoclonaler* Anti-humaner IFN- γ Antikörper (erster Antikörper), Maus IgG₁, k, Klon 2G1, Cat# M-700A, 1.03 mg/ml, LOT 018714, Endogen, Woburn, USA.

- *Biotinylierter* Anti-humaner IFN- γ Antikörper (zweiter Antikörper), Maus IgG₁, k, Klon B133.5, Endogen, Cat# M-701B, 0.5 mg/ml, LOT CA47012, Endogen, Woburn, USA.

Interleukin-10:

- *Monoclonaler* Anti-humaner IL-10 Antikörper (erster Antikörper), Ratte IgG₁, Klon JES3-9D7, Cat# 18551D, 0.5 mg/ml, Pharmingen, San Diego, USA.

- *Biotinylierter* Anti-humaner IL-10 Antikörper (zweiter Antikörper), Ratte IgG_{2a} Klon JES3-12G8, 0.5 mg/ml, 0.5 mg/ml, Cat# 18562D, Pharmingen, San Diego, USA.

2.1.6. Standards

Macrophage inflammatory protein-1 α : Cat# 270-LD (LOT CG068061), R&D Systems, Minneapolis, USA

Monocyte chemotactic protein-1: Cat# 279-MC (LOT EZ140082) R&D Systems, Minneapolis, USA

Interferon- γ : Cat# 19751N, Pharmingen, San Diego, CA, USA

Interleukin-10: Cat# 19701V, Pharmingen, San Diego, CA, USA

2.1.7. Klinische Daten der Studienteilnehmer

Die klinischen Patientendaten, die in die Auswertung dieser Arbeit eingeflossen sind, stammen von den Patientenakten der Cyclosporin A Studie (Canadian-European Randomized Control Trial Group, 1988) und wurden damals bei jedem monatlichen

Untersuchungstermin bei allen Probanden erhoben und dokumentiert. Zu den hier verwendeten klinischen Daten zählen (Tab. XII a und b, S. 87+88): Geschlecht, BMI, C-Peptid basal und stimuliert, Gewicht, Alter, HbA_{1c}, Insulindosis, Nüchtern-Glukose und Kreatinin.

2.1.8. Statistische Auswertung

Median und Mittelwert für die Zytokin- und Chemokin-Spiegel werden für jede Gruppe ermittelt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen werden mit dem *Kruskal-Wallis-Test* untersucht, gefolgt vom *Mann Whitney U Test (zweiseitig)*. Dabei wird $P < 0,05$ als signifikant berücksichtigt. Die Serumspiegel der gemessenen Parameter zu den hier verwendeten Zeitpunkten (6 Monate, 12 Monate) werden mit den entsprechenden Werten bei Studienbeginn mittels *gepaartem Wilcoxon Test verglichen*. Die Korrelation der benutzten Parameter wird mit *Spearman rank correlation* evaluiert. Signifikante Einflüsse von Alter und Geschlecht werden mit *multivariater linearer Regressions Analyse* ermittelt. Alle hier vorgestellten P- Werte sind für Alter und Geschlecht adjustiert.

Für die statistische Analyse wird folgende Software verwendet: Excel (Microsoft, Seattle, WA), NCSS 2000 (Number Cruncher Statistical Systems, Keyville, UT), GraphPad Prism 3.00 für Windows (GraphPad Software, San Diego, CA), SAS 8.0. Die statistische Auswertung erfolgte in Kooperation mit Dr. B. Haastert (DDZ, Abteilung für Biometrie und Epidemiologie).

2.2. Methoden

2.2.1. Allgemeine Grundlagen des ELISA-Verfahrens

Sämtliche Untersuchungen werden mit ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) gemessen, das zu den immunologischen Sandwich-Verfahren gehört. Folgende Bindungsschritte und Reaktionen laufen dabei ab.

Coating (Überzug):

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

Blocking (Blocken):

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

Inkubation von Standardlösungen und Proben:

Die zu untersuchende Substanz wird 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 Antikörper. Es schließt sich abermals ein Waschvorgang an.

Inkubation des zweiten Antikörpers:

Der zweite spezifische Antikörper (detection antibody) wird inkubiert und besetzt nunmehr freie Bindungsstellen an den verankerten Molekülen der zu messenden Substanz. Dieser zweite Antikörper besitzt an seinem freien Ende eine Biotingruppe. Es erfolgt wiederum das Auswaschen nicht gebundener Antikörpermoleküle.

Enzym-Inkubation:

Die hier verwendete Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (Streptavidin-HRP = polyhorse-radish-peroxidase) wird aufgetragen und bildet eine stabile kovalente Bindung ihres Avidin-Restes mit der Biotingruppe des gebundenen zweiten Antikörpers. Freie Peroxidase wird im Anschluss ausgewaschen.

Enzymatische Farbreaktion:

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

Stoppen:

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.

Lesen der Immunplatte:

Die Messung der bearbeiteten Immunplatte wird mittels des Fotometers (ELISA-reader) bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenz-Filter OD 540 nm) vorgenommen.

2.3. Störfaktoren bei ELISA

2.3.1. Stabilität von Zytokinen und Chemokinen im Serum

Bei vielen klinischen Studien ist es üblich, dass Serumproben über einen langen Zeitraum gelagert werden und in dieser Zeit mehrfach für verschiedene Untersuchungen gebraucht werden. Es ist nicht bekannt, ob die lange Lagerungszeit oder das wiederholte Auftauen und Einfrieren der gesammelten Proben einen nachteiligen Effekt auf die Proteinstruktur der Zyto- und Chemokine haben. Im Zuge der internen Qualitätskontrolle machte unsere Arbeitsgruppe die Beobachtung, dass sich nach wiederholtem (mehr als dreimaligem) Einfrieren und Auftauen die Proteinstruktur der Zyto- und Chemokine so verändert, dass derartige Proben für eine Untersuchung mittels ELISA unbrauchbar wurden (Tab.III). Unter der Annahme, dass sich die Langzeitlagerung von Serumproben nicht als nachteilig erweist, wurden nur Serumproben verwendet, die weniger als drei mal aufgetaut und wieder eingefroren wurden. Außerdem wurden Serumproben von der Studie ausgeschlossen, sobald der Test für alle zu messenden Parameter negativ ausfiel, in der Annahme, dass durch eventuell zu häufiges Auftauen und Einfrieren sämtliche Proteinstrukturen für eine Messung unbrauchbar wurden. Zu erwähnen ist auch, dass die Chemokin und Zytokin-Spiegel in den getesteten Seren denen in frisch gewonnenem Serum ähneln. Trotz allem ist natürlich nicht auszuschließen, dass die Langzeitlagerung einen Effekt aufweisen könnte.

2.3.2. Interferenz mit heterophilen Antikörpern

Heterophile Antikörper oder Rheuma-Faktoren sind in der Lage Antikörper multivalent im Serum zu binden und ein falsch positives Signal in Form einer enzymatischen Farbreaktion zu erzeugen (Tab.III, S.43). Wenn man jedoch fötales Kälberserum (FCS) als Verdünnungslösung zusetzt, kann man dieses Phänomen der unspezifischen

Kreuzreaktion weitestgehend vermeiden (Revelen et al., 2000). Auch im Serum gelöste Rezeptoren oder Antikörper-tragende Transportproteine können im ELISA-Verfahren interferieren und falsch positive Signale hervorrufen. Diese Bindungen sind jedoch reversibel und können durch Verwendung von passenden Antikörpern mit hoher Affinität zum Zielprotein durch Verdrängung gelöst werden. Ob sich diese Antikörper, die ihre hohe Affinität unter Beweis stellen müssen, dafür eignen, kann man dadurch testen, dass man eine definierte Menge des Proteins einer Serumprobe hinzufügt (spiking). Beträgt die Rate an zurückgewonnenem Protein 80% und mehr, sichert dies die Affinitätsqualität des spezifischen Antikörpers. Die Bindungsspezifität des Zielproteins kann zusätzlich gesteigert werden unter Verwendung von PBS (phosphate buffered saline) als Verdünnungslösung, die Herabsetzung der Inkubationstemperatur von Raumtemperatur auf 4°C und eine Verlängerung der Inkubationszeit (des ersten Antikörpers) von 1 Stunde auf eine Inkubation über Nacht (ca. 16 Stunden).

2.3.3. Software- Fehler

Normalerweise kommen Chemokine und Zytokine nur in sehr geringen Mengen im Serum vor. Die Berechnung ihrer Konzentration beruht auf der optischen Dichte des seriell verdünnten Proteins, was letztlich dazu benutzt wird um die Konzentrationskurve, auch Standardkurve genannt, zu erstellen. Die Verwendung der log-log- Transformation zur Erstellung der Standardkurve in standardisierten ELISA-Verfahren hat den Nachteil, dass eine geringe Präzision mit hoher Fehlerquote bei niedrigen Konzentrationen des zu messenden Proteins beobachtet wird, wenn sie mit bekannten Werten verglichen werden, obwohl die log-log-Transformation eine hohe Genauigkeit bei Formung der Standardkurve aufweist ($r^2 > 0,97$). Dies zeigt, dass allein ein hohes r^2 kein ausreichendes Kriterium ist, um eine möglichst genaue Standardkurve zu erhalten, zumal die Serumkonzentrationen von Zytokinen und Chemokinen sehr gering sind. Es

wurde gezeigt, dass die Erstellung der Standardkurve durch Verwendung der Funktion *Four-parameter logistic-log* die genaueste Methode ist (Plikaytis et al., 1991, Karpinski et al., 1987)

Tabelle III: Störfaktoren bei der Durchführung von ELISA, deren Gründe und mögliche Lösungswege

Fehlertyp	Grund	Lösung
Falsch negatives Signal	-Proteinstruktur verändert	Auftauen und Einfrieren nicht mehr als drei mal; Vortex <5s; während des Pipetiervorgangs sollten Serumproben auf Eis gelegt werden; Einsatz von Protease-Inhibitoren
	-ungenau Standardkurve	Benutzung der Funktion four-parameter anstatt log-log
	-Rezeptorbindungskapazität gestört	Durchführung des spiking-Vorgangs einschließlich der seriellen Verdünnungsreihe mit dem spiked rekombinanten Antikörper, Wiedergewinnung sollte >80% betragen
Falsch positives Signal	-heterophile Antikörper	Zugabe von 10%igem FCS zu PBS; Inkubation über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler; erneute Messung mit unpassenden (unmatched) Antikörpern
	-Rheumafaktoren	s. heterophile Antikörper
	-andere bindende Proteine	s. heterophile Antikörper
	-Erythrozytenkontamination	Zentrifugieren des Serums vor Gebrauch bei 2500 g für 20 min
	-Randeffekt	Versiegeln der Mikrotiterplatte um Verdunstung zu vermeiden
Inkonstante Ergebnisse	-breite Variation der Messergebnisse	Inter- und Intra-assay- Variation sollte <10% betragen
	-verschiedene Antikörper-Chargen	Benutzung der passenden Antikörper-Paare oder Verwendung der gleichen Kit-nr.
	-Pipetierfehler	Verwendung von genauen und geeichten Pipetten

2.4. In-House ELISA Protokolle des Deutschen Diabetes Forschungsinstituts Düsseldorf

2.4.1. Macrophage inflammatory protein-1-alpha

Vorbemerkungen: Sämtliche Arbeitsschritte bei der Durchführung von ELISA sollten ohne Kontamination durchgeführt werden, damit es nicht zu

Artefakten bei den Ergebnissen kommt. Besonders wichtig ist darauf zu achten, dass die FCS/PBS-Lösung nicht kontaminiert wird, da diese in fast allen Arbeitsschritten benutzt wird. Milchige Trübung oder Schlieren beispielsweise lassen darauf schließen, dass die Haltbarkeit der Lösung überschritten ist oder aber eine Kontamination stattgefunden hat. Alle gefrorenen Reagenzien müssen vor Gebrauch langsam auf Raumtemperatur gebracht werden.

Lösungen, die vorab hergestellt werden können:

Waschlösungen:

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

Überzug-Puffer 1:

- 0,1 M Natriumbicarbonathydrat/Natriumcarbonat pH 9,6

Verdünnungslösungen:

- 10%ig FCS/PBS
- 0,5%ig Milchpulver/PBS

Substratlösung:

- Tetramethylbenzidin (TMB), gebrauchsfertig

Stopplösung:

- 1,8 N H₂SO₄

1. Erster Antikörper (1:250 verdünnt) für eine 96-Loch Immunoplatte:

48	µl	Antikörper
12	ml	Puffer 1

Antikörper und Puffer sollten durch vorsichtiges Schwenken gemischt werden. Vor Gebrauch wird jede Messplatte mit dem Namen des verwendeten Zytokins/Chemokins, dem Datum und dem Namen des Untersuchers beschriftet. Es werden jeweils 100 µl des verdünnten Antikörpers pro Kuhle der Messplatte mit der Acht-Kanal-Multipipette aufgetragen. Die Platte wird mit Folie abgedeckt und über Nacht bei 4°C, oder alternativ eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 4000 Umdrehungen pro Minute inkubiert.

2. Waschen:

Die mit Antikörper inkubierten Kühlen werden nach Ablauf der vorgeschriebenen Zeit aspiriert und mit mindestens 350 µl PBS (einfache Konzentration, ohne Tween) pro Kuhle ausgewaschen. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt. Anschließend wird die Messplatte sorgfältig auf absorbierendem Papier ausgeklopft. Vor jedem Arbeitsschritt müssen die Kühlen trocken sein.

3. Blocken:

Es werden 200 µl 10%ig FCS/PBS mit der Acht-Kanal-Multipipette pro Kuhle aufgetragen. Die Messplatte wird mit Folie versiegelt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die FCS/PBS-Lösung wird anschliessend aspiriert und mit mindestens 350 µl PBS-Tween (einfache Konzentration) pro Kuhle ausgewaschen. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt.

[Nach diesem Arbeitsschritt kann die Platte bei Bedarf bei -20°C eingefroren werden, um zu einem späteren Zeitpunkt die restlichen Arbeitsschritte

durchzuführen. Die Messplatte wird dafür 15 Minuten getrocknet und sorgfältig mit Folie abgedeckt. Bevor die restlichen Arbeitsschritte getätigt werden, sollte die Messplatte vorsichtig aufgetaut werden.]

4. Standards und Proben:

Um die Standard-Verdünnungsreihen vorzubereiten, werden die Ständer mit Matrix-Röhrchen bestückt. Der Top-Standard (2000 pg/ml) wird mit 10%ig FCS/PBS vorbereitet und in die jeweils obersten Röhrchen pipettiert. Standard-Duplikate oder -Triplikate werden unabhängig voneinander erstellt. Man fängt mit dem Top-Standard an und verdünnt diesen sieben-mal seriell mit 10%ig FCS/PBS um den Faktor **1:2,5** jeweils in das nächste Röhrchen. Die Verdünnungsreihe reicht danach von 2000 pg/ml (Top-Standard) bis 3,28 pg/ml (letztes Röhrchen). Jede Verdünnung wird sorgfältig mit dem Vortex gemischt. Für jeden Verdünnungsvorgang wird eine neue Pipettenspitze verwendet, wobei die Pipette jedoch nicht gewechselt werden darf. Die serielle Verdünnung wird explizit nicht auf der Messplatte erstellt um unnötige Verwechslung zu vermeiden. Die Serumproben werden **1:3** mit der Acht-Kanal-Multipipette in den aliquotierten PCR-Röhrchen mit 10%ig FCS/PBS verdünnt. Die positive Kontrolle (wenn möglich als Duplikat) wird wie die Standardreihe mit 10%ig FCS/PBS **1:2,5** seriell verdünnt. Sämtliche Lösungen werden kurz mit dem Vortex gemischt. Sobald alle Proben und Lösungen vorbereitet sind, werden jeweils 50 µl Standardlösungen, Proben, positive Kontrolle, negative Kontrolle und Leerkontrolle gemäß der Abbildung IV auf die Messplatte pro Kuhle aufgetragen. Dieser Arbeitsschritt sollte nicht mehr als fünf Minuten dauern.

MIP-1 α	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2000	2000									Pos.Kont	Pos.Kont
B	800	800										
C	320	320									1:2,5	1:2,5
D	128	128									↓	↓
E	51.2	51.2										
F	20.48	20.48										
G	8.19	8.19									Neg.Kont	Neg.Kont
H	3.28	3.28									Leerkont.	Leerkont.

Abb.IV: Darstellung einer Immunoplatte für die Messung von MIP-1 α . Spalte 1+2 beinhalten den Standard beginnend mit dem Top-Standard (2000 pg/ml) und einer seriellen Verdünnung jeweils um den Faktor 1:2,5. Spalten 3-10 sind für die Serumproben reserviert. Spalte 11+12 von A-F beinhaltet die positive Kontrolle mit einer seriellen Verdünnung ebenfalls um den Faktor 1:2,5. Spalte 11+12 bei Zeile G enthält die negative Kontrolle, Zeile H enthält dagegen die Leerkontrolle (oder auch „blank“ genannt).

- Die Leerkontrolle wird folgendermaßen bearbeitet: Zunächst wird der erste Antikörper inkubiert, gefolgt von Waschen mit PBS. Danach wird in die Kühlen für die Leerkontrollen 10%ig FCS/PBS zum Blocken hinzugefügt. Standard oder Serum wird für die Leerkontrolle nicht verwendet. Ebenfalls wird kein zweiter Antikörper oder Streptavidin-Peroxidase inkubiert, sondern dafür jeweils nur 10%ig FCS/PBS benutzt. TMB und Stopplösung dagegen werden jedoch bei den entsprechenden Arbeitsschritten verwendet.
- Die negative Kontrolle wird folgendermaßen bearbeitet: Zunächst wird der erste Antikörper inkubiert, gefolgt von Waschen mit PBS. Danach wird in die Kühlen für die negative Kontrolle 10%ig FCS/PBS zum Blocken hinzugefügt. Standard oder Serum wird für die negative Kontrolle nicht verwendet, sondern nur jeweils 10%ig FCS/PBS hinzugefügt. Danach folgt die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, der Streptavidin-Peroxidase, der TMB-Lösung und letztlich der Stopplösung.
- Die positive Kontrolle wird folgendermaßen bearbeitet: Die vorher in ihrer Konzentration bekannte Probe wird wie die Standardreihe seriell 1:2,5 verdünnt. Dabei ist die Konzentration der positiven Probe, von der aus die serielle

Verdünnung gestartet wird, unerheblich solange sich die Verdünnungsreihe der positiven Kontrolle im Messbereich der jeweiligen Versuchsanordnung befindet.

Sind alle Kühlen mit den jeweiligen Inhalten, wie weiter oben gezeigt wurde, bestückt, wird die Messplatte mit Versiegelungsfolie abgedeckt und 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

5. Waschen:

Nachdem die Folie entfernt wurde erfolgt die Füllung der Kühlen mit PBS-Tween, wobei darauf geachtet werden sollte, dass nichts überläuft und benachbarte Kühlen kontaminiert. Im nächsten Arbeitsschritt werden die gefüllten Kühlen mit der Acht-Kanal-Multipipette geleert und mit mindestens 350 µl PBS-Tween (einfache Konzentration) pro Kuhle ausgewaschen. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt. Danach wird die Messplatte sorgfältig auf absorbierendem Papier ausgeklopft.

6. Zweiter Antikörper (1:500 verdünnt) für eine 96-Loch Immunoplatte:

24	µl	Antikörper
12	ml	10%ig FCS/PBS

Antikörper und 10%ig FCS/PBS werden durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Danach werden 100 µl des verdünnten Antikörpers pro Kuhle (außer in die Leerkontrolle) mit der Acht-Kanal-Multipipette aufgetragen. Die Messplatte wird anschließend mit Folie abgedeckt und 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

7. Waschen:

Nach Entfernen der Folie werden die Kühlen mit der Acht-Kanal-Multipipette geleert. Nun werden alle Kühlen mit mindestens 350 µl PBS-Tween (einfache Konzentration) ausgewaschen. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt. Danach wird die Messplatte sorgfältig auf absorbierendem Papier ausgeklopft.

8. Enzym-Konjugat-Lösung (1:4000 verdünnt) für eine 96-Loch Immunoplatte:

3	µl	Streptavidin-PolyHorseRadish-Peroxidase (S-HRP)
12	ml	0,5%ig Milchpulver/PBS

Diese beiden Zusätze werden sorgfältig mit dem Vortex gemischt. Danach werden 100 µl der Enzym-Konjugat-Lösung pro Kuhle (außer in die Leerkontrolle) mit der Acht-Kanal-Multipipette aufgetragen. Die Messplatte wird anschließend mit Folie abgedeckt und 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

9. Waschen:

Nach Entfernen der Folie werden die Kühleninhalte mittels der Acht-Kanal-Multipipette geleert und anschließend mit mindestens 350 µl PBS-Tween (einfache Konzentration) pro Kuhle ausgewaschen. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt. Danach wird die Messplatte sorgfältig auf absorbierendem Papier ausgeklopft.

10. Substrat-Lösung:

Im nächsten Arbeitsschritt werden 100 µl der kalten (zuvor auf Eis gestellten) TMB-Lösung pro Kuhle (inklusive in die Leerkontrolle) aufgetragen. Die gefüllte Messplatte wird dann ohne Folienabdeckung bei Raumtemperatur an einen abgedunkelten Platz gestellt (z.B. Schrank), wobei die Farbreaktion mehrmals beobachtet werden sollte. Die Farbumsetzungsreaktion kann bis zu 30 Minuten dauern, in den meisten Fällen ist sie jedoch nach 5-10 Minuten vollendet.

11. Stopp-Lösung:

Hat die Farbreaktion die gewünschte Intensität erreicht werden 100 µl der Stopp-Lösung pro Kuhle (inklusive in die Leerkontrolle) aufgetragen. Nach 5-10 Minuten kann die Messplatte im ELISA-Fotometer ausgelesen werden.

12. Lesen der Platte:

Das Fotometer sollte einige Minuten vor Gebrauch eingeschaltet werden, damit die Betriebstemperatur erreicht wird. Die Platte wird mit dem 450 nm Filter (Referenz-Filter 540 nm) gelesen.

13. Kalkulation der Konzentrationen

Mittels des zum Fotometer kompatiblen Programms wird die Schablone erstellt. Dabei werden die Partition bzw. die Gruppen, sowie die Kontrollen und die Standardreihen gemäß der verwendeten Messplatte eingetragen. Die negative Kontrolle wird als Referenzwert auf 0 pg/ml gesetzt. Der Wert der vom Fotometer gemessenen Leerkontrolle wird von allen Werten subtrahiert, da die Leerkontrolle theoretisch den Wert 0 haben müsste. Da in einigen Fällen jedoch trotzdem Werte >0 angezeigt werden, betrachtet man dies als Interferenz und gleicht diese „Falschmessung“ durch Subtraktion aus. Die Standardkurve wird nach der Formel für *Vier-Parameter* erstellt.

Nun wird geprüft wie nah die kalkulierten Werte den erwarteten Werten für die Standardkurve kommen. Auf diese Weise kann die Qualität der Standardkurve kontrolliert werden. Einzelne Standard-Messwerte können aus der Kalkulation entfernt werden, damit diese genauer wird. Dies ist möglich, da in der Regel Duplikate der Standardreihen vorliegen und diese unabhängig voneinander in den einzelnen Arbeitsschritten bearbeitet wurden. Es sollten jedoch mindestens vier Messpunkte vorhanden sein, um bei einer *Vier-Parameter*-Annäherung eine Standardkurve zu erstellen. Für MIP1- α gilt in dem verwendeten Messprotokoll eine Erfassungsgrenze (detection limit) von 8 pg/ml.

2.4.2. Monocyte chemotactic protein -1

Vorbemerkungen: Sämtliche Arbeitsschritte bei der Durchführung von ELISA sollten ohne Kontamination durchgeführt werden, damit es nicht zu

Artefakten bei den Ergebnissen kommt. Besonders wichtig ist darauf zu achten, dass die FCS/PBS-Lösung nicht kontaminiert wird, da diese in fast allen Arbeitsschritten benutzt wird. Milchige Trübung oder Schlieren beispielsweise lassen darauf schließen, dass die Haltbarkeit der Lösung überschritten ist oder aber eine Kontamination stattgefunden hat. Alle gefrorenen Reagenzien müssen vor Gebrauch langsam auf Raumtemperatur gebracht werden.

Lösungen, die vorab hergestellt werden können:

Waschlösungen:

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

Überzug-Puffer 1:

- 0,1 M Natriumbicarbonathydrat/Natriumcarbonat pH 9,6

Verdünnungslösungen:

- 10%ig FCS/PBS
- 0,5%ig Milchpulver/PBS

Substratlösung:

- Tetramethylbenzidin (TMB), gebrauchsfertig

Stopplösung:

- 1,8 N H₂SO₄

1. Erster Antikörper (1:250 verdünnt) für eine 96-Loch Immunplatte:

48	µl	Antikörper
12	ml	Puffer 1

Antikörper und Puffer sollten durch vorsichtiges Schwenken gemischt werden. Vor Gebrauch wird jede Messplatte mit dem Namen des verwendeten Zytokins/Chemokins, dem Datum und dem Namen des Untersuchers beschriftet. Es werden jeweils 100 µl des verdünnten Antikörpers pro Kuhle der Messplatte mit der Acht-Kanal-Multipipette aufgetragen. Die Platte wird mit Folie abgedeckt und über Nacht bei 4°C, oder alternativ eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 4000 Umdrehungen pro Minute inkubiert.

2. Waschen:

Die mit Antikörper inkubierten Kühlen werden nach Ablauf der vorgeschriebenen Zeit aspiriert und mit mindestens 350 µl PBS (einfache Konzentration, ohne Tween) pro Kuhle ausgewaschen. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt. Anschließend wird die Messplatte sorgfältig auf absorbierendem Papier ausgeklopft. Vor jedem Arbeitsschritt müssen die Kühlen trocken sein.

3. Blocken:

Es werden 200 µl 10%ig FCS/PBS mit der Acht-Kanal-Multipipette pro Kuhle aufgetragen. Die Messplatte wird mit Folie versiegelt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die FCS/PBS-Lösung wird anschliessend aspiriert und mit mindestens 350 µl PBS-Tween (einfache Konzentration) pro Kuhle ausgewaschen. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt.

[Nach diesem Arbeitsschritt kann die Platte bei Bedarf bei -20°C eingefroren werden, um zu einem späteren Zeitpunkt die restlichen Arbeitsschritte durchzuführen. Die Messplatte wird dafür 15 Minuten getrocknet und sorgfältig mit

Folie abgedeckt. Bevor die restlichen Arbeitsschritte getätigt werden, sollte die Messplatte vorsichtig aufgetaut werden.]

4. Standards und Proben:

Um die Standard-Verdünnungsreihen vorzubereiten, werden die Ständer mit Matrix-Röhrchen bestückt. Der Top-Standard (2000 pg/ml) wird mit 10%ig FCS/PBS vorbereitet und in die jeweils obersten Röhrchen pipettiert. Standard-Duplikate oder -Triplikate werden unabhängig voneinander erstellt. Man fängt mit dem Top-Standard an und verdünnt diesen sieben-mal seriell mit 10%ig FCS/PBS um den Faktor **1:2,5** jeweils in das nächste Röhrchen. Die Verdünnungsreihe reicht danach von 2000 pg/ml (Top-Standard) bis 3,28 pg/ml (letztes Röhrchen). Jede Verdünnung wird sorgfältig mit dem Vortex gemischt. Für jeden Verdünnungsvorgang wird eine neue Pipettenspitze verwendet, wobei die Pipette jedoch nicht gewechselt werden darf. Die serielle Verdünnung wird explizit nicht auf der Messplatte erstellt um unnötige Verwechslung zu vermeiden. Die Serumproben werden **1:3** mit der Acht-Kanal-Multipipette in den aliquotierten PCR-Röhrchen mit 10%ig FCS/PBS verdünnt. Die positive Kontrolle (wenn möglich als Duplikat) wird wie die Standardreihe mit 10%ig FCS/PBS **1:2,5** seriell verdünnt. Sämtliche Lösungen werden kurz mit dem Vortex gemischt. Sobald alle Proben und Lösungen vorbereitet sind, werden jeweils 50 µl Standardlösungen, Proben, positive Kontrolle, negative Kontrolle und Leerkontrolle gemäß der Abbildung V auf die Messplatte pro Kuhle aufgetragen. Dieser Arbeitsschritt sollte nicht mehr als fünf Minuten dauern.

MCP-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2000	2000									Pos.Kont	Pos.Kont
B	800	800										
C	320	320									1:2,5	1:2,5
D	128	128									↓	↓
E	51.2	51.2										
F	20.48	20.48										
G	8.19	8.19									Neg.Kont	Neg.Kont
H	3.28	3.28									Leerkont.	Leerkont.

Abb.V: Darstellung einer Immunplatte für die Messung von MCP-1. Spalte 1+2 beinhalten den Standard beginnend mit dem Top-Standard (2000 pg/ml) und einer seriellen Verdünnung jeweils um den Faktor 1:2,5. Spalten 3-10 sind für die Serumproben reserviert. Spalte 11+12 von A-F beinhaltet die positive Kontrolle mit einer seriellen Verdünnung ebenfalls um den Faktor 1:2,5. Spalte 11+12 bei Zeile G enthält die negative Kontrolle, Zeile H enthält dagegen die Leerkontrolle (oder auch „blank“ genannt).

- Die Leerkontrolle wird folgendermaßen bearbeitet: Zunächst wird der erste Antikörper inkubiert, gefolgt von Waschen mit PBS. Danach wird in die Kuhlen für die Leerkontrollen 10%ig FCS/PBS zum Blocken hinzugefügt. Standard oder Serum wird für die Leerkontrolle nicht verwendet. Ebenfalls wird kein zweiter Antikörper oder Streptavidin-Peroxidase inkubiert, sondern dafür jeweils nur 10%ig FCS/PBS benutzt. TMB und Stopplösung dagegen werden jedoch bei den entsprechenden Arbeitsschritten verwendet.
- Die negative Kontrolle wird folgendermaßen bearbeitet: Zunächst wird der erste Antikörper inkubiert, gefolgt von Waschen mit PBS. Danach wird in die Kuhlen für die negative Kontrolle 10%ig FCS/PBS zum Blocken hinzugefügt. Standard oder Serum wird für die negative Kontrolle nicht verwendet, sondern nur jeweils 10%ig FCS/PBS hinzugefügt. Danach folgt die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, der Streptavidin-Peroxidase, der TMB-Lösung und letztlich der Stopplösung.
- Die positive Kontrolle wird folgendermaßen bearbeitet: Die vorher in ihrer Konzentration bekannte Probe wird wie die Standardreihe seriell 1:2,5 verdünnt. Dabei ist die Konzentration der positiven Probe, von der aus die serielle

Verdünnung gestartet wird, unerheblich solange sich die Verdünnungsreihe der positiven Kontrolle im Messbereich der jeweiligen Versuchsanordnung befindet.

Sind alle Kühlen mit den jeweiligen Inhalten, wie weiter oben gezeigt wurde, bestückt, wird die Messplatte mit Versiegelungsfolie abgedeckt und 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

5. Waschen:

Nachdem die Folie entfernt wurde erfolgt die Füllung der Kühlen mit PBS-Tween, wobei darauf geachtet werden sollte, dass nichts überläuft und benachbarte Kühlen kontaminiert. Im nächsten Arbeitsschritt werden die gefüllten Kühlen mit der Acht-Kanal-Multipipette geleert und mit mindestens 350 µl PBS-Tween (einfache Konzentration) pro Kuhle ausgewaschen. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt. Danach wird die Messplatte sorgfältig auf absorbierendem Papier ausgeklopft.

6. Zweiter Antikörper (1:500 verdünnt) für eine 96-Loch Immunoplatte:

24	µl	Antikörper
12	ml	10%ig FCS/PBS

Antikörper und 10%ig FCS/PBS werden durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Danach werden 100 µl des verdünnten Antikörpers pro Kuhle (außer in die Leerkontrolle) mit der Acht-Kanal-Multipipette aufgetragen. Die Messplatte wird anschließend mit Folie abgedeckt und 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

7. Waschen:

Nach Entfernen der Folie werden die Kühlen mit der Acht-Kanal-Multipipette geleert. Nun werden alle Kühlen mit mindestens 350 µl PBS-Tween (einfache Konzentration) ausgewaschen. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt. Danach wird die Messplatte sorgfältig auf absorbierendem Papier ausgeklopft.

8. Enzym-Konjugat-Lösung (1:4000 verdünnt) für eine 96-Loch Immunoplatte:

3	µl	Streptavidin-PolyHorseRadish-Peroxidase (S-HRP)
12	ml	0,5%ig Milchpulver/PBS

Diese beiden Zusätze werden sorgfältig mit dem Vortex gemischt. Danach werden 100 µl der Enzym-Konjugat-Lösung pro Kuhle (außer in die Leerkontrolle) mit der Acht-Kanal-Multipipette aufgetragen. Die Messplatte wird anschließend mit Folie abgedeckt und 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

9. Waschen:

Nach Entfernen der Folie werden die Kühleninhalte mittels der Acht-Kanal-Multipipette geleert und anschließend mit mindestens 350 µl PBS-Tween (einfache Konzentration) pro Kuhle ausgewaschen. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt. Danach wird die Messplatte sorgfältig auf absorbierendem Papier ausgeklopft.

10. Substrat-Lösung:

Im nächsten Arbeitsschritt werden 100 µl der kalten (zuvor auf Eis gestellten) TMB-Lösung pro Kuhle (inklusive in die Leerkontrolle) aufgetragen. Die gefüllte Messplatte wird dann ohne Folienabdeckung bei Raumtemperatur an einen abgedunkelten Platz gestellt (z.B. Schrank), wobei die Farbreaktion mehrmals beobachtet werden sollte. Die Farbumsetzungsreaktion kann bis zu 30 Minuten dauern, in den meisten Fällen ist sie jedoch nach 5-10 Minuten vollendet.

11. Stopp-Lösung:

Hat die Farbreaktion die gewünschte Intensität erreicht werden 100 µl der Stopp-Lösung pro Kuhle (inklusive in die Leerkontrolle) aufgetragen. Nach 5-10 Minuten kann die Messplatte im ELISA-Fotometer ausgelesen werden.

12. Lesen der Platte:

Das Fotometer sollte einige Minuten vor Gebrauch eingeschaltet werden, damit die Betriebstemperatur erreicht wird. Die Platte wird mit dem 450 nm Filter (Referenz-Filter 540 nm) gelesen.

13. Kalkulation der Konzentrationen

Mittels des zum Fotometer kompatiblen Programms wird die Schablone erstellt. Dabei werden die Partition bzw. die Gruppen, sowie die Kontrollen und die Standardreihen gemäß der verwendeten Messplatte eingetragen. Die negative Kontrolle wird als Referenzwert auf 0 pg/ml gesetzt. Der Wert der vom Fotometer gemessenen Leerkontrolle wird von allen Werten subtrahiert, da die Leerkontrolle theoretisch den Wert 0 haben müsste. Da in einigen Fällen jedoch trotzdem Werte >0 angezeigt werden, betrachtet man dies als Interferenz und gleicht diese „Falschmessung“ durch Subtraktion aus. Die Standardkurve wird nach der Formel für *Vier-Parameter* erstellt.

Nun wird geprüft wie nah die kalkulierten Werte den erwarteten Werten für die Standardkurve kommen. Auf diese Weise kann die Qualität der Standardkurve kontrolliert werden. Einzelne Standard-Messwerte können aus der Kalkulation entfernt werden, damit diese genauer wird. Dies ist möglich, da in der Regel Duplikate der Standardreihen vorliegen und diese unabhängig voneinander in den einzelnen Arbeitsschritten bearbeitet wurden. Es sollten jedoch mindestens vier Messpunkte vorhanden sein, um bei einer *Vier-Parameter*-Annäherung eine Standardkurve zu erstellen. Für MCP-1 gilt in dem verwendeten Messprotokoll eine Erfassungsgrenze (detection limit) von 6 pg/ml.

2.4.3. Interleukin-10

Vorbemerkungen: Sämtliche Arbeitsschritte bei der Durchführung von ELISA sollten ohne Kontamination durchgeführt werden, damit es nicht zu Artefakten bei den Ergebnissen kommt. Besonders wichtig ist darauf zu achten, dass die FCS/PBS-Lösung nicht kontaminiert wird, da diese in fast allen Arbeitsschritten benutzt wird. Milchige Trübung oder Schlieren beispielsweise lassen darauf schließen, dass die Haltbarkeit der Lösung überschritten ist oder aber eine Kontamination stattgefunden hat. Alle gefrorenen Reagenzien müssen vor Gebrauch langsam auf Raumtemperatur gebracht werden.

Lösungen, die vorab hergestellt werden können:

Waschlösungen:

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

Überzug-Puffer 1:

- 0,1 M Natriumbicarbonathydrat/Natriumcarbonat pH 9,6

Verdünnungslösungen:

- 10%ig FCS/PBS
- 0,5%ig Milchpulver/PBS

Substratlösung:

- Tetramethylbenzidin (TMB), gebrauchsfertig

Stopplösung:

- 1,8 N H₂SO₄

1. Erster Antikörper (1:1000 verdünnt) für eine 96-Loch Immunoplatte:

12	µl	Antikörper
12	ml	Puffer 1

Antikörper und Puffer sollten durch vorsichtiges Schwenken gemischt werden. Vor Gebrauch wird jede Messplatte mit dem Namen des verwendeten Zytokins/Chemokins, dem Datum und dem Namen des Untersuchers beschriftet. Es werden jeweils 100 µl des verdünnten Antikörpers pro Kuhle der Messplatte mit der Acht-Kanal-Multipipette aufgetragen. Die Platte wird mit Folie abgedeckt und über Nacht bei 4°C, oder alternativ eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 4000 Umdrehungen pro Minute inkubiert.

2. Waschen:

Die mit Antikörper inkubierten Kühlen werden nach Ablauf der vorgeschriebenen Zeit aspiriert und mit mindestens 350 µl PBS (einfache Konzentration, ohne Tween) pro Kuhle ausgewaschen. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt. Anschließend wird die Messplatte sorgfältig auf absorbierendem Papier ausgeklopft. Vor jedem Arbeitsschritt müssen die Kühlen trocken sein.

3. Blocken:

Es werden 200 µl 10%ig FCS/PBS mit der Acht-Kanal-Multipipette pro Kuhle aufgetragen. Die Messplatte wird mit Folie versiegelt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die FCS/PBS-Lösung wird anschliessend aspiriert und mit mindestens 350 µl PBS-Tween (einfache Konzentration) pro Kuhle ausgewaschen. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt.

[Nach diesem Arbeitsschritt kann die Platte bei Bedarf bei -20°C eingefroren werden, um zu einem späteren Zeitpunkt die restlichen Arbeitsschritte durchzuführen. Die Messplatte wird dafür 15 Minuten getrocknet und sorgfältig mit Folie abgedeckt. Bevor die restlichen Arbeitsschritte getätigt werden, sollte die Messplatte vorsichtig aufgetaut werden.]

4. Standards und Proben:

Um die Standard-Verdünnungsreihen vorzubereiten, werden die Ständer mit Matrix-Röhrchen bestückt. Der Top-Standard (250 pg/ml) wird mit 10%ig FCS/PBS vorbereitet und in die jeweils obersten Röhrchen pipettiert. Standard-Duplikate oder -Triplikate werden unabhängig voneinander erstellt. Man fängt mit dem Top-Standard an und verdünnt diesen sieben-mal seriell mit 10%ig FCS/PBS um den Faktor **1:2** jeweils in das nächste Röhrchen. Die Verdünnungsreihe reicht danach von 250 pg/ml (Top-Standard) bis 1,95 pg/ml (letztes Röhrchen). Jede Verdünnung wird sorgfältig mit dem Vortex gemischt. Für jeden Verdünnungsvorgang wird eine neue Pipettenspitze verwendet, wobei die Pipette jedoch nicht gewechselt werden darf. Die serielle Verdünnung wird explizit nicht auf der Messplatte erstellt um unnötige Verwechslung zu vermeiden. Die Serumproben werden **1:2** mit der Acht-Kanal-Multipipette in den aliquotierten PCR-Röhrchen mit 10%ig FCS/PBS verdünnt. Die positive Kontrolle (wenn möglich als Duplikat) wird wie die Standardreihe mit 10%ig FCS/PBS verdünnt, und zwar einmal **1:10** und einmal **1:20**. Sämtliche Lösungen werden kurz mit dem Vortex gemischt. Sobald alle Proben und Lösungen vorbereitet sind, werden jeweils 50 μl Standardlösungen, Proben, positive Kontrolle, negative Kontrolle und Leerkontrolle gemäß der Abbildung VI auf die Messplatte pro Kuhle aufgetragen. Dieser Arbeitsschritt sollte nicht mehr als fünf Minuten dauern.

IL-10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	250	250										
B	125	125										
C	62.5	62.5										
D	31.25	31.25										
E	15.63	15.63									Neg.Kont	Neg.Kont
F	7.81	7.81									Pos.Kont 1:10	Pos.Kont 1:10
G	3.90	3.90									Pos.Kont 1:20	Pos.Kont 1:20
H	1.95	1.95									Leerkont.	Leerkont.

Abb.VI: Darstellung einer Immunoplatte für die Messung von IL-10. Spalte 1+2 beinhalten den Standard beginnend mit dem Top-Standard (250 pg/ml) und einer seriellen Verdünnung jeweils um den Faktor 1:2. Spalten 3-10 und 11-12 (A-D) sind für die Serumproben reserviert. Spalte 11+12 E beinhaltet die negative Kontrolle. Spalte 11+12 F enthält die positive Kontrolle verdünnt um den Faktor 1:10. Spalte 11+12 G enthält die positive Kontrolle verdünnt um den Faktor 1:20. Zeile H enthält dagegen die Leerkontrolle (oder auch „blank“ genannt).

- Die Leerkontrolle wird folgendermaßen bearbeitet: Zunächst wird der erste Antikörper inkubiert, gefolgt von Waschen mit PBS. Danach wird in die Kuhlen für die Leerkontrollen 10%ig FCS/PBS zum Blocken hinzugefügt. Standard oder Serum wird für die Leerkontrolle nicht verwendet. Ebenfalls wird kein zweiter Antikörper oder Streptavidin-Peroxidase inkubiert, sondern dafür jeweils nur 10%ig FCS/PBS benutzt. TMB und Stopplösung dagegen werden jedoch bei den entsprechenden Arbeitsschritten verwendet.
- Die negative Kontrolle wird folgendermaßen bearbeitet: Zunächst wird der erste Antikörper inkubiert, gefolgt von Waschen mit PBS. Danach wird in die Kuhlen für die negative Kontrolle 10%ig FCS/PBS zum Blocken hinzugefügt. Standard oder Serum wird für die negative Kontrolle nicht verwendet, sondern nur jeweils 10%ig FCS/PBS hinzugefügt. Danach folgt die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, der Streptavidin-Peroxidase, der TMB-Lösung und letztlich der Stopplösung.
- Die positive Kontrolle wird folgendermaßen bearbeitet: Die vorher in ihrer Konzentration bekannte Probe wird einmal 1:10 und einmal 1:20 mit 10%ig

FCS/PBS verdünnt (jeweils als Duplikat). Dabei ist die Konzentration der positiven Probe, von der aus die Verdünnung gestartet wird, unerheblich solange sich die Verdünnungsreihe der positiven Kontrolle im Messbereich der jeweiligen Versuchsanordnung befindet.

Sind alle Kühlen mit den jeweiligen Inhalten, wie weiter oben gezeigt wurde, bestückt, wird die Messplatte mit Versiegelungsfolie abgedeckt und 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

5. Waschen:

Nachdem die Folie entfernt wurde erfolgt die Füllung der Kühlen mit PBS-Tween, wobei darauf geachtet werden sollte, dass nichts überläuft und benachbarte Kühlen kontaminiert. Im nächsten Arbeitsschritt werden die gefüllten Kühlen mit der Acht-Kanal-Multipipette geleert und mit mindestens 350 µl PBS-Tween (einfache Konzentration) pro Kuhle ausgewaschen. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt. Danach wird die Messplatte sorgfältig auf absorbierendem Papier ausgeklopft.

6. Zweiter Antikörper (1:2000 verdünnt) für eine 96-Loch Immunoplatte:

6	µl	Antikörper
12	ml	10%ig FCS/PBS

Antikörper und 10%ig FCS/PBS werden durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Danach werden 100 µl des verdünnten Antikörpers pro Kuhle (außer in die Leerkontrolle) mit der Acht-Kanal-Multipipette aufgetragen. Die Messplatte wird anschließend mit Folie abgedeckt und 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

7. Waschen:

Nach Entfernen der Folie werden die Kühlen mit der Acht-Kanal-Multipipette geleert. Nun werden alle Kühlen mit mindestens 350 µl PBS-Tween (einfache Konzentration)

ausgewaschen. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt. Danach wird die Messplatte sorgfältig auf absorbierendem Papier ausgeklopft.

8. Enzym-Konjugat-Lösung (1:4000 verdünnt) für eine 96-Loch Immunplatte:

6	µl	Streptavidin-PolyHorseRadish-Peroxidase (S-HRP)
24	ml	0,5%ig Milchpulver/PBS

Diese beiden Zusätze werden sorgfältig mit dem Vortex gemischt. Danach werden 100 µl der Enzym-Konjugat-Lösung pro Kuhle (außer in die Leerkontrolle) mit der Acht-Kanal-Multipipette aufgetragen. Die Messplatte wird anschließend mit Folie abgedeckt und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

9. Waschen:

Nach Entfernen der Folie werden die Kühleninhalte mittels der Acht-Kanal-Multipipette geleert und anschließend mit mindestens 350 µl PBS-Tween (einfache Konzentration) pro Kuhle ausgewaschen. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt. Danach wird die Messplatte sorgfältig auf absorbierendem Papier ausgeklopft.

10. Substrat-Lösung:

Im nächsten Arbeitsschritt werden 100 µl der kalten (zuvor auf Eis gestellten) TMB-Lösung pro Kuhle (inklusive in die Leerkontrolle) aufgetragen. Die gefüllte Messplatte wird dann ohne Folienabdeckung bei Raumtemperatur an einen abgedunkelten Platz gestellt (z.B. Schrank), wobei die Farbreaktion mehrmals beobachtet werden sollte. Die Farbumsetzungsreaktion kann bis zu 30 Minuten dauern, in den meisten Fällen ist sie jedoch nach 5-10 Minuten vollendet.

11. Stopp-Lösung:

Hat die Farbreaktion die gewünschte Intensität erreicht werden 100 µl der Stopp-Lösung pro Kuhle (inklusive in die Leerkontrolle) aufgetragen. Nach 5-10 Minuten kann die Messplatte im ELISA-Fotometer ausgelesen werden.

12. Lesen der Platte:

Das Fotometer sollte einige Minuten vor Gebrauch eingeschaltet werden, damit die Betriebstemperatur erreicht wird. Die Platte wird mit dem 450 nm Filter (Referenz-Filter 540 nm) gelesen.

13. Kalkulation der Konzentrationen

Mittels des zum Fotometer kompatiblen Programms wird die Schablone erstellt. Dabei werden die Partition bzw. die Gruppen, sowie die Kontrollen und die Standardreihen gemäß der verwendeten Messplatte eingetragen. Die negative Kontrolle wird als Referenzwert auf 0 pg/ml gesetzt. Der Wert der vom Fotometer gemessenen Leerkontrolle wird von allen Werten subtrahiert, da die Leerkontrolle theoretisch den Wert 0 haben müsste. Da in einigen Fällen jedoch trotzdem Werte >0 angezeigt werden, betrachtet man dies als Interferenz und gleicht diese „Falschmessung“ durch Subtraktion aus. Die Standardkurve wird nach der Formel für *Vier-Parameter* erstellt.

Nun wird geprüft wie nah die kalkulierten Werte den erwarteten Werten für die Standardkurve kommen. Auf diese Weise kann die Qualität der Standardkurve kontrolliert werden. Einzelne Standard-Messwerte können aus der Kalkulation entfernt werden, damit diese genauer wird. Dies ist möglich, da in der Regel Duplikate der Standardreihen vorliegen und diese unabhängig voneinander in den einzelnen Arbeitsschritten bearbeitet wurden. Es sollten jedoch mindestens vier Messpunkte vorhanden sein, um bei einer *Vier-Parameter*-Annäherung eine Standardkurve zu erstellen. Für IL-10 gilt in dem verwendeten Messprotokoll eine Erfassungsgrenze (detection limit) von 2 pg/ml.

2.4.4. Interferon- γ

Vorbemerkungen: Sämtliche Arbeitsschritte bei der Durchführung von ELISA sollten ohne Kontamination durchgeführt werden, damit es nicht zu Artefakten bei den Ergebnissen kommt. Besonders wichtig ist darauf zu achten, dass die FCS/PBS-Lösung nicht kontaminiert wird, da diese in fast allen Arbeitsschritten benutzt wird. Milchige Trübung oder Schlieren beispielsweise lassen darauf schließen, dass die Haltbarkeit der Lösung überschritten ist oder aber eine Kontamination stattgefunden hat. Alle gefrorenen Reagenzien müssen vor Gebrauch langsam auf Raumtemperatur gebracht werden.

Lösungen, die vorab hergestellt werden können:

Waschlösungen:

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

Überzug-Puffer 1:

- 0,1 M Natriumbicarbonathydrat/Natriumcarbonat pH 9,6

Verdünnungslösungen:

- 10%ig FCS/PBS
- 0,5%ig Milchpulver/PBS

Substratlösung:

- Tetramethylbenzidin (TMB), gebrauchsfertig

Stopplösung:

- 1,8 N H₂SO₄

1. Erster Antikörper (1:1000 verdünnt) für eine 96-Loch Immunoplatte:

12	µl	Antikörper
12	ml	Puffer 1

Antikörper und Puffer sollten durch vorsichtiges Schwenken gemischt werden. Vor Gebrauch wird jede Messplatte mit dem Namen des verwendeten Zytokins/Chemokins, dem Datum und dem Namen des Untersuchers beschriftet. Es werden jeweils 100 µl des verdünnten Antikörpers pro Kuhle der Messplatte mit der Acht-Kanal-Multipipette aufgetragen. Die Platte wird mit Folie abgedeckt und über Nacht bei 4°C, oder alternativ eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 4000 Umdrehungen pro Minute inkubiert.

2. Waschen:

Die mit Antikörper inkubierten Kühlen werden nach Ablauf der vorgeschriebenen Zeit aspiriert und mit mindestens 350 µl PBS (einfache Konzentration, ohne Tween) pro Kuhle ausgewaschen. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt. Anschließend wird die Messplatte sorgfältig auf absorbierendem Papier ausgeklopft. Vor jedem Arbeitsschritt müssen die Kühlen trocken sein.

3. Blocken:

Es werden 200 µl 10%ig FCS/PBS mit der Acht-Kanal-Multipipette pro Kuhle aufgetragen. Die Messplatte wird mit Folie versiegelt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die FCS/PBS-Lösung wird anschliessend aspiriert und mit mindestens 350 µl PBS-Tween (einfache Konzentration) pro Kuhle ausgewaschen. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt.

[Nach diesem Arbeitsschritt kann die Platte bei Bedarf bei -20°C eingefroren werden, um zu einem späteren Zeitpunkt die restlichen Arbeitsschritte durchzuführen. Die Messplatte wird dafür 15 Minuten getrocknet und sorgfältig mit Folie abgedeckt. Bevor die restlichen Arbeitsschritte getätigt werden, sollte die Messplatte vorsichtig aufgetaut werden.]

4. Standards und Proben:

Um die Standard-Verdünnungsreihen vorzubereiten, werden die Ständer mit Matrix-Röhrchen bestückt. Der Top-Standard (250 pg/ml) wird mit 10%ig FCS/PBS vorbereitet und in die jeweils obersten Röhrchen pipettiert. Standard-Duplikate oder -Triplikate werden unabhängig voneinander erstellt. Man fängt mit dem Top-Standard an und verdünnt diesen sieben-mal seriell mit 10%ig FCS/PBS um den Faktor **1:2** jeweils in das nächste Röhrchen. Die Verdünnungsreihe reicht danach von 250 pg/ml (Top-Standard) bis 1,95 pg/ml (letztes Röhrchen). Jede Verdünnung wird sorgfältig mit dem Vortex gemischt. Für jeden Verdünnungsvorgang wird eine neue Pipettenspitze verwendet, wobei die Pipette jedoch nicht gewechselt werden darf. Die serielle Verdünnung wird explizit nicht auf der Messplatte erstellt um unnötige Verwechslung zu vermeiden. Die Serumproben werden **1:5** mit der Acht-Kanal-Multipipette in den aliquotierten PCR-Röhrchen mit 10%ig FCS/PBS verdünnt. Die positive Kontrolle (wenn möglich als Duplikat) wird wie die Standardreihe mit 10%ig FCS/PBS verdünnt, und zwar einmal **1:160** und einmal **1:320**. Sämtliche Lösungen werden kurz mit dem Vortex gemischt. Sobald alle Proben und Lösungen vorbereitet sind, werden jeweils 50 μl Standardlösungen, Proben, positive Kontrolle, negative Kontrolle und Leerkontrolle gemäß der Abbildung VII auf die Messplatte pro Kuhle aufgetragen. Dieser Arbeitsschritt sollte nicht mehr als fünf Minuten dauern.

IFN- γ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	250	250										
B	125	125										
C	62.5	62.5										
D	31.25	31.25										
E	15.63	15.63									Neg.Kont	Neg.Kont
F	7.81	7.81									Pos.Kont 1:160	Pos.Kont 1:160
G	3.90	3.90									Pos.Kont 1:320	Pos.Kont 1:320
H	1.95	1.95									Leerkont.	Leerkont.

Abb.VII: Darstellung einer Immunoplatte für die Messung von IFN- γ . Spalte 1+2 beinhalten den Standard beginnend mit dem Top-Standard (250 pg/ml) und einer seriellen Verdünnung jeweils um den Faktor 1:2. Spalten 3-10 und 11-12 (A-D) sind für die Serumproben reserviert. Spalte 11+12 E beinhaltet die negative Kontrolle. Spalte 11+12 F enthält die positive Kontrolle verdünnt um den Faktor 1:160. Spalte 11+12 G enthält die positive Kontrolle verdünnt um den Faktor 1:320. Zeile H enthält dagegen die Leerkontrolle (oder auch „blank“ genannt).

- Die Leerkontrolle wird folgendermaßen bearbeitet: Zunächst wird der erste Antikörper inkubiert, gefolgt von Waschen mit PBS. Danach wird in die Kuhlen für die Leerkontrollen 10%ig FCS/PBS zum Blocken hinzugefügt. Standard oder Serum wird für die Leerkontrolle nicht verwendet. Ebenfalls wird kein zweiter Antikörper oder Streptavidin-Peroxidase inkubiert, sondern dafür jeweils nur 10%ig FCS/PBS benutzt. TMB und Stopplösung dagegen werden jedoch bei den entsprechenden Arbeitsschritten verwendet.
- Die negative Kontrolle wird folgendermaßen bearbeitet: Zunächst wird der erste Antikörper inkubiert, gefolgt von Waschen mit PBS. Danach wird in die Kuhlen für die negative Kontrolle 10%ig FCS/PBS zum Blocken hinzugefügt. Standard oder Serum wird für die negative Kontrolle nicht verwendet, sondern nur jeweils 10%ig FCS/PBS hinzugefügt. Danach folgt die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, der Streptavidin-Peroxidase, der TMB-Lösung und letztlich der Stopplösung.
- Die positive Kontrolle wird folgendermaßen bearbeitet: Die vorher in ihrer Konzentration bekannte Probe wird einmal 1:160 und einmal 1:320 mit 10%ig

FCS/PBS verdünnt (jeweils als Duplikat). Dabei ist die Konzentration der positiven Probe, von der aus die Verdünnung gestartet wird, unerheblich solange sich die Verdünnungsreihe der positiven Kontrolle im Messbereich der jeweiligen Versuchsanordnung befindet.

Sind alle Kühlen mit den jeweiligen Inhalten, wie weiter oben gezeigt wurde, bestückt, wird die Messplatte mit Versiegelungsfolie abgedeckt und 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

5. Waschen:

Nachdem die Folie entfernt wurde erfolgt die Füllung der Kühlen mit PBS-Tween, wobei darauf geachtet werden sollte, dass nichts überläuft und benachbarte Kühlen kontaminiert. Im nächsten Arbeitsschritt werden die gefüllten Kühlen mit der Acht-Kanal-Multipipette geleert und mit mindestens 350 µl PBS-Tween (einfache Konzentration) pro Kuhle ausgewaschen. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt. Danach wird die Messplatte sorgfältig auf absorbierendem Papier ausgeklopft.

6. Zweiter Antikörper (1:2000 verdünnt) für eine 96-Loch Immunoplatte:

6	µl	Antikörper
12	ml	10%ig FCS/PBS

Antikörper und 10%ig FCS/PBS werden durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Danach werden 100 µl des verdünnten Antikörpers pro Kuhle (außer in die Leerkontrolle) mit der Acht-Kanal-Multipipette aufgetragen. Die Messplatte wird anschließend mit Folie abgedeckt und 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

7. Waschen:

Nach Entfernen der Folie werden die Kühlen mit der Acht-Kanal-Multipipette geleert. Nun werden alle Kühlen mit mindestens 350 µl PBS-Tween (einfache Konzentration) ausgewaschen. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt. Danach wird die Messplatte sorgfältig auf absorbierendem Papier ausgeklopft.

8. Enzym-Konjugat-Lösung (1:3000 verdünnt) für eine 96-Loch Immunoplatte:

6	µl	Streptavidin-PolyHorseRadish-Peroxidase (S-HRP)
18	ml	0,5%ig Milchpulver/PBS

Diese beiden Zusätze werden sorgfältig mit dem Vortex gemischt. Danach werden 100 µl der Enzym-Konjugat-Lösung pro Kuhle (außer in die Leerkontrolle) mit der Acht-Kanal-Multipipette aufgetragen. Die Messplatte wird anschließend mit Folie abgedeckt und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

9. Waschen:

Nach Entfernen der Folie werden die Kühleninhalte mittels der Acht-Kanal-Multipipette geleert und anschließend mit mindestens 350 µl PBS-Tween (einfache Konzentration) pro Kuhle ausgewaschen. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt. Danach wird die Messplatte sorgfältig auf absorbierendem Papier ausgeklopft.

10. Substrat-Lösung:

Im nächsten Arbeitsschritt werden 100 µl der kalten (zuvor auf Eis gestellten) TMB-Lösung pro Kuhle (inklusive in die Leerkontrolle) aufgetragen. Die gefüllte Messplatte wird dann ohne Folienabdeckung bei Raumtemperatur an einen abgedunkelten Platz gestellt (z.B. Schrank), wobei die Farbreaktion mehrmals beobachtet werden sollte. Die Farbumsetzungsreaktion kann bis zu 30 Minuten dauern, in den meisten Fällen ist sie jedoch nach 5-10 Minuten vollendet.

11. Stopp-Lösung:

Hat die Farbreaktion die gewünschte Intensität erreicht werden 100 µl der Stopp-Lösung pro Kuhle (inklusive in die Leerkontrolle) aufgetragen. Nach 5-10 Minuten kann die Messplatte im ELISA-Fotometer ausgelesen werden.

12. Lesen der Platte:

Das Fotometer sollte einige Minuten vor Gebrauch eingeschaltet werden, damit die Betriebstemperatur erreicht wird. Die Platte wird mit dem 450 nm Filter (Referenz-Filter 540 nm) gelesen.

13. Kalkulation der Konzentrationen

Mittels des zum Fotometer kompatiblen Programms wird die Schablone erstellt. Dabei werden die Partition bzw. die Gruppen, sowie die Kontrollen und die Standardreihen gemäß der verwendeten Messplatte eingetragen. Die negative Kontrolle wird als Referenzwert auf 0 pg/ml gesetzt. Der Wert der vom Fotometer gemessenen Leerkontrolle wird von allen Werten subtrahiert, da die Leerkontrolle theoretisch den Wert 0 haben müsste. Da in einigen Fällen jedoch trotzdem Werte >0 angezeigt werden, betrachtet man dies als Interferenz und gleicht diese „Falschmessung“ durch Subtraktion aus. Die Standardkurve wird nach der Formel für *Vier-Parameter* erstellt.

Nun wird geprüft wie nah die kalkulierten Werte den erwarteten Werten für die Standardkurve kommen. Auf diese Weise kann die Qualität der Standardkurve kontrolliert werden. Einzelne Standard-Messwerte können aus der Kalkulation entfernt werden, damit diese genauer wird. Dies ist möglich, da in der Regel Duplikate der Standardreihen vorliegen und diese unabhängig voneinander in den einzelnen Arbeitsschritten bearbeitet wurden. Es sollten jedoch mindestens vier Messpunkte vorhanden sein, um bei einer *Vier-Parameter*-Annäherung eine Standardkurve zu erstellen. Für IFN- γ gilt in dem verwendeten Messprotokoll eine Erfassungsgrenze (detection limit) von 2 pg/ml.

2.5. Serumproben von Patienten mit Typ 1 Diabetes

Das in dieser Arbeit verwendete menschliche Serum stammt aus den Beständen einer multizentrischen, prospektiven, randomisierten, doppelt blinden Studie aus dem Jahre 1988 (**Cyclosporin-Induced Remission of IDDM After Early Intervention** - The Canadian-European Randomized Control Trial Group, veröffentlicht in: Diabetes, Vol. 37, No.11, November 1988).

Eingeschlossen in diese Studie wurden Patienten von 9-35 Jahren in 2 Zentren und von 16-35 Jahren in 10 weiteren Zentren mit der Diagnose eines ketonurischen Diabetes mellitus Typ 1. Voraussetzung für den Eintritt in die Studie war einerseits, dass der Zeitraum von der Diagnose bis zum Beginn der Studie nicht mehr als 6 Wochen betragen durfte, und andererseits nicht mehr als 14 Wochen nach Erscheinen der klassischen Diabetes-Symptome bis zum Studienbeginn vergehen durften. Diese Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Diagnose einen reproduzierbar erhöhten Nüchtern-Blutzuckerspiegel von >7.8 mM auf, oder zeigten konstant erhöhte postprandiale Blut-Glukose-Werte von >11.1 mM, kombiniert mit einem ungewollten Gewichtsverlust. Ausgeschlossen aus dieser Studie wurden Patienten mit Adipositas ($>110\%$ des idealen Körpergewichts für die <16 -jährigen Teilnehmer, $>120\%$ des idealen Körpergewichts für >16 -jährigen Teilnehmer). Weitere Ausschlussgründe waren eine Familienanamnese mit gehäuftem Auftreten von nicht-insulinabhängigen-Diabetes, ein in der Anamnese bekanntes hepatisches, renales oder das Knochenmark betreffende Leiden, sonstige bösartige Erkrankungen, aktuelle Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus, Zytomegalie-Virus oder ein signifikant messbarer IgM EBV Antikörper-Titer, andere unkontrollierte Infektionen, medikamentöse Zufuhr von zytostatischen Agentien, Steroiden, Levamisol oder Penicillamin, außerdem das Vorhandensein von AIDS (acquired immune deficiency syndrome).

In dieser randomisierten Doppelblind-Studie bekamen die Teilnehmer initial eine Cyclosporin-Dosis von 10 mg/kg täglich oral, aufgeteilt in 12 stündigem Intervall. Die Dosen wurden bei Bedarf angepasst, um eine Serumkonzentration des Cyclosporins

von 100-200 ng/ml (gültig für teilnehmende kanadische Zentren) und eine Vollblutkonzentration von 400-800 ng/ml (gültig für teilnehmende europäische Zentren) zu gewährleisten. Die restlichen Patienten erhielten ein Placebo-Präparat. Den Studienteilnehmern wurden monatliche Blutproben entnommen, zusätzlich wurden sie klinisch untersucht und eine aktuelle Anamnese erhoben. Die Blutproben dienten zur Bestimmung von HbA_{1c}, Kreatinin, C-Peptid, ICA, Nüchtern-Glukose und Cyclosporin-Konzentration. Insgesamt nahmen an dieser multizentrischen Studie 188 Patienten mit frisch manifestem Diabetes teil, von denen 1 Patient dem follow-up nicht mehr zur Verfügung stand, 45 Patienten ihre Medikamenteneinnahme vor dem festgesetzten Beobachtungszeitraum von 12 Monaten unterbrachen und 38 Patienten inkomplette Daten bezüglich der Studienvariablen aufwiesen. Bei Begutachtung der Serenbestände zeigte sich, dass nicht von allen Patienten genügend Serum zu den verschiedenen Zeitpunkten vorhanden war. Bei 71 Patienten fanden sich ausreichende Serummengen zu Beginn der Studie, 3 Monate, 6 Monate, 9 Monate, 12 Monate und 18 Monate nach Beginn der Studie. Von diesen 71 Patienten wurden 31 mit Cyclosporin A behandelt, 40 Patienten erhielten ein Placebo. Remission wurde definiert anhand der durchschnittlich benötigten Insulindosis von <0.25 U/kg/d und einen durchschnittlich gemessenen HbA_{1c}-Titer von <7.5 %. Die genannten Durchschnittswerte wurden aus den gesammelten Monatsintervall-Daten von Monat 2 bis Monat 12 nach Studienbeginn errechnet. Mit diesen Kriterien wurden 64,5% (20 von 31 Patienten) aus der Gruppe der Cyclosporin-behandelten und 37,5% (15 von 40 Patienten) aus der Placebo-Behandelten Gruppe als sogenannte Remitter identifiziert.

2.5.1. Aliquotierung und Lagerung

Die Serumproben wurden in PCR-Röhrchen zu kleinen (maximal 2ml) Serummengen aliquotiert. Die jeweiligen Serumvolumina berechneten sich aus den ermittelten

optimalen Verdünnungsfaktoren für die Messungen der einzelnen Zytokine und Chemokine. Dieser Arbeitsschritt wurde durchgängig unter Kühlung mit Trockeneis durchgeführt, um einen möglichen Einfluss von Erwärmung auf die Stabilität der zu messenden Substanzen zu vermeiden. Die Proben wurden bei -80°C gelagert. Zur Reserve wurden die verbliebenen Serummengen in getrennten Eppendorf-Röhrchen gefüllt und ebenfalls bei -80°C aufbewahrt.

Ergebnisse

3. Etablierung und Optimierung der In-House ELISA Protokolle für MCP-1 und MIP-1 α

3.1. Ermittlung der optimalen Konditionen

Zunächst einmal wurde mittels einer Matrix die optimale Verdünnung des ersten und zweiten Antikörpers, der bestgeeignete Überzug-Puffer und das stabilste Enzym-Konjugat-Verhältnis für beide Chemokine bestimmt. Im Folgenden sind die zuerst verwendeten Konditionen aufgelistet, wobei alle Konditionen (gemäß des chronologischen Ablaufs eines ELISA Protokolls) miteinander kombiniert wurden:

Überzug-Puffer

- Natriumbicarbonathydrat/Natriumcarbonat pH 9,6 (Puffer 1)
- Natriumcarbonat pH 9,6 (Puffer 2)
- Natriumphosphat pH 6,7 (Puffer 3)
- Natriumphosphat pH 9,6 (Puffer 4)

Verdünnung des 1. Antikörpers

- 1:125
- 1:250
- 1:500
- 1:1000
- 1:2000
- 1:4000

Verdünnung des 2. Antikörpers

- 1:500
- 1:1000
- 1:2000

Verdünnung des Enzym-Konjugats

- 1:2000
- 1:3000
- 1:4000
- 1:6000

Es folgt nun stellvertretend ein Beispiel dieser Versuchsreihe, um zu demonstrieren wie gearbeitet wurde und in welcher Weise die verschiedenen Konditionen miteinander kombiniert wurden, wobei es sich in der folgenden Abbildung IIa-d (bestehend aus den unten aufgeführten Einzelabbildungen: a) 1. Antikörper, b) Standard, c) 2. Antikörper, d) Enzym-Konjugat) um eine Messplatte handelt, die gemäß dem weiter oben aufgeführten chronologischen Ablauf der ELISA-Arbeitsschritte (s.S. 39-41) bearbeitet wurde (Abb.IIa-d). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird nicht jede Versuchsanordnung hier dargestellt.

a) 1. Antikörper (Verdünnung in verschiedenen Überzug-Puffern)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000
B	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000
C	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000
D	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000
E	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000
F	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000
G	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000
H	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000

In Puffer 1

in Puffer 2

in Puffer 3

b) Standard (jeweils für MCP-1 und MIP-1 α mit Konzentrationsangaben)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml
B	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml
C	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml
D	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml
E	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml
F	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml
G	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml	500 pg/ml
H	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml

1. Antikörper verdünnt in Puffer 1,
Standard verdünnt in 10%ig FCS/PBS

1. Antikörper verdünnt in Puffer 2,
Standard verdünnt in 10%ig FCS/PBS

1. Antikörper verdünnt in Puffer 3,
Standard verdünnt in 10%ig FCS/PBS

c) 2. Antikörper (Verdünnung in 10%ig FCS/PBS)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500
B	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500
C	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500
D	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500
E	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000
F	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000
G	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000
H	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000

1. Antikörper verdünnt in Puffer 1,
Standard verdünnt in FCS/PBS,
2. Antikörper verdünnt in FCS/PBS

1. Antikörper verdünnt in Puffer 2,
Standard verdünnt in FCS/PBS,
2. Antikörper verdünnt in FCS/PBS

1. Antikörper verdünnt in Puffer 3,
Standard verdünnt in FCS/PBS,
2. Antikörper verdünnt in FCS/PBS

d) Enzym- Konjugat (Verdünnung in 0,5%ig Milchpulver/PBS)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000
B	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000
C	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000
D	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000
E	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000
F	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000
G	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000
H	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000	1:6000

Abbildung IIa-d: Schematische Darstellung einer Immunplatte (bestehend aus den 4 vorangegangenen Einzelabbildungen) mit den nacheinander folgenden Schritten gemäß dem chronologischen ELISA-Ablauf: Zunächst Besetzen der Vertiefungen der Platte mit 1. Antikörper, danach Waschen und Blocken, danach Auftragen des Standards, danach Waschen, danach Inkubation mit dem 2. Antikörper, danach Waschen und schließlich Hinzufügen von Enzym-Konjugat in den jeweils abgebildeten Verdünnungen. Letztlich erfolgen nach Ablauf der Farbreaktion das Beenden mit Stopp-Lösung sowie das Lesen der Platte mittels Fotometer und schließlich die Bearbeitung der Ergebnisse mit dem dazugehörigen Programm.

Die Ermittlung der optimalen Konditionen für beide Chemokine (MCP-1 und MIP-1 α) ergab folgende Vorgehensweise:

- Verwendung von Natriumbicarbonathydrat/Natriumcarbonat pH 9,6 (Puffer 1) als Überzug-Puffer
- 1. Antikörper wird 1:250 verdünnt
- 2. Antikörper wird 1:500 verdünnt
- Enzym-Konjugat wird 1:4000 verdünnt

3.1.1. Spiking und Interferenz mit heterophilen Antikörpern

Auf die Problematik der Interferenz mit nicht zu analysierenden Substanzen, die falsch-positive oder falsch-negative Farbsignale auslösen können, wurde schon weiter oben eingegangen. Die Verwendung von 10%igem FCS/PBS als Verdünnungslösung vermeidet weitestgehend Störsignale von heterophilen Antikörpern oder Rheumafaktoren, da FCS-Proteine die heterophilen Antikörper bereits binden bevor diese an den ersten Antikörper binden können. Aus diesem Grund wird in allen hier in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten Lösungen mit 10%igem FCS/PBS verwendet. Andere im Serum gelöste Strukturen wie Rezeptoren oder Transportproteine können ebenfalls im ELISA-Verfahren als Störfaktoren auftreten. Um die Qualität der hier verwendeten Antikörper auf deren Spezifität und hohe Affinität zu prüfen, wurde das sogenannte *spiking* angewendet. Dabei wird pro Chemokin einer Serumprobe im Vergleich zu einer Verdünnungslösung eine bestimmte Menge des Proteins hinzugefügt und die Wiedergewinnungsrate errechnet (Tab. IV-VII). Wenn die Wiedergewinnungsrate zu gering ist, kann davon ausgegangen werden, dass das zu messende Chemokin unspezifisch in Bezug auf die eingesetzten Antikörper ist, da z.B. Transportproteine eher an die Antikörper binden und somit die Bindungsstellen besetzen.

Tabelle IV: Wiedergewinnungsrate von rekombinantem MCP-1 aus einer 10%igen FCS-Lösung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, da diese Messungen mehrmals (10-mal) durchgeführt wurden.

erwartet [pg/ml]	gemessen [pg/ml]	Wiedergewinnung [%]
192,39 \pm 4,5	168,67 \pm 6,6	87,7 \pm 2,1
77,82 \pm 9,8	65,23 \pm 4,5	83,8 \pm 3,8
37,53 \pm 5,1	34,62 \pm 6,8	92,2 \pm 2,3
25,26 \pm 6,3	22,58 \pm 5,2	89,4 \pm 2,2

Tabelle V: Wiedergewinnungsrate von rekombinantem MCP-1 aus negativen Serumproben. Die negativen Serumproben enthielten bei zuvor durchgeführten Messungen kein MCP-1, d.h. sie wurden negativ für MCP-1 getestet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, da diese Messungen mehrmals (10-mal) durchgeführt wurden.

erwartet [pg/ml]	gemessen [pg/ml]	Wiedergewinnung [%]
192,39 \pm 4,5	167,55 \pm 7,3	87,1 \pm 3,3
77,82 \pm 9,8	80,7 \pm 6,2	103,7 \pm 6,5
37,53 \pm 5,1	36,76 \pm 4,4	97,9 \pm 2,1
25,26 \pm 6,3	25,87 \pm 4,1	102,4 \pm 4,8

Tabelle VI: Wiedergewinnungsrate von rekombinantem MIP-1 α aus einer 10%igen FCS-Lösung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, da diese Messungen mehrmals (10-mal) durchgeführt wurden.

erwartet [pg/ml]	gemessen [pg/ml]	Wiedergewinnung [%]
199,1 \pm 2,5	207,52 \pm 8,8	104,2 \pm 5,6
77,39 \pm 5,8	66,19 \pm 9,2	85,5 \pm 3,0
40,89 \pm 6,9	38,54 \pm 4,1	94,2 \pm 2,2
29,93 \pm 3,1	25,12 \pm 2,1	83,9 \pm 2,1

Tabelle VII: Wiedergewinnungsrate von rekombinantem MIP-1 α aus negativen Serumproben. Die negativen Serumproben enthielten bei zuvor durchgeführten Messungen kein MIP-1 α , d.h. sie wurden negativ für MIP-1 α getestet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, da diese Messungen mehrmals (10-mal) durchgeführt wurden.

erwartet [pg/ml]	gemessen [pg/ml]	Wiedergewinnung [%]
199,1 \pm 1,9	189,27 \pm 4,3	95,1 \pm 3,0
77,39 \pm 3,4	65,44 \pm 7,4	84,6 \pm 3,2
40,89 \pm 6,7	32,87 \pm 1,1	80,4 \pm 1,9
29,93 \pm 5,3	24,92 \pm 2,3	83,3 \pm 2,4

Die Wiedergewinnungsrate der zu messenden rekombinanten Chemokine betrug durchgängig >80%, was eine genügend hohe Spezifität und Affinität der Antikörper für diese Messmethode darstellt (Tab.IV-VII). Der Vergleich zwischen der Wiedergewinnungsrate zum einen aus einer negativen menschlichen Serumprobe und zum anderen aus einer Verdünnungslösung (10%ig FCS/PBS) wurde vorgenommen, um eventuelle Interferenzen aufzudecken, die durch die verschiedene Herkunft (menschliches Serum versus fötales Kälberserum) bedingt sein könnten. Dies konnte jedoch, wie weiter oben dargestellt, ausgeschlossen werden, da sich die Wiedergewinnungsraten ähnelten.

Um der Qualitätssicherung der zu etablierenden Messmethode gerecht zu werden, wurde nach einem zweiten Antikörper gesucht (*unpassender zweiter Antikörper*), der kein positives Signal hervorruft (Tab.VIII). Werden nun signifikante Werte gemessen, können die Serumproben mit dem zuvor ermittelten *unpassenden zweiten Antikörper* auf mögliche falsch positive Messwerte getestet werden. Das bedeutet, dass eine (für das jeweilige Chemokin zuvor positiv getesteten) Serumprobe in der Wiederholungsmessung mit dem *unpassenden zweiten Antikörper* negativ sein muss.

Tabelle VIII: Identifizierung eines zweiten Antikörpers (hier TNF- α), der bei Messungen mit MCP-1 bzw. MIP-1 α kein positives Signal auslöst (*unpassender zweiter Antikörper*). Alle Werte sind pg/ml.

Probe	1. Antikörper	2. Antikörper			
		<u>IL-4</u>	<u>IL-10</u>	<u>TNF-α</u>	<u>INF-γ</u>
10%ig FCS-PBS	MCP-1	106,7	8,4	0	171,3
Serum versetzt mit positiver Kontrolle	MCP-1	88,6	0	0	142,8
10%ig FCS-PBS	MIP-1 α	10,9	0	0	43
Serum versetzt mit positiver Kontrolle	MIP-1 α	0	0	0	0

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl für MCP-1 als auch für MIP-1 α jeweils TNF- α als zweiter Antikörper ermittelt wurde, der kein positives Signal auslöst. In der Tabelle VIII ist zu sehen, dass einige Antikörper ein Signal auslösen, welche man auf unspezifische Bindungen zurückführen kann. Wären die unspezifischen Bindungen an den Kunststoff der Immunplatte dafür verantwortlich, dann wären bei beiden Chemokinen ähnliche Messergebnisse zu erwarten. Aufgrund der unspezifischen Bindungen und den daraus resultierenden positiven Signalen, kann nur TNF- α für Wiederholungsmessungen benutzt werden. TNF- α wurde daraufhin als *unpassender zweiter Antikörper* bei Serumproben der Cyclosporin A-Studie als Wiederholungsmessung eingesetzt. (Tab.IX).

Tabelle IX: Vergleich von Serumproben der Cyclosporin A-Studie mit TNF- α als 2. Antikörper in der Wiederholungsmessung jeweils für MCP-1 und MIP-1 α zum Ausschluss falsch positiver Messwerte. Alle Werte sind pg/ml.

Probe	1. Antikörper	2. Antikörper	
		MCP-1 (1.Messung)	TNF- α (Wiederholungsmessung)
Serum der Cyclosporin- Studie	MCP-1	217,67	0
		236,63	0
		286,77	0
		268,5	0
		276,36	0
		322,7	0
		357,9	0
Serum der Cyclosporin- Studie	MIP-1 α	34,4	0
		0	0
		0	0
		0	0
		0	0
		595,3	0
		624,9	0

Hier kann gezeigt werden, dass durch Verwendung von TNF- α als *unpassender zweiter Antikörper* falsch positive Signale ausgeschlossen sind, da in den Wiederholungsmessungen der gleichen Serumproben keine Signale festgestellt wurden. Auch negative Erstmessungen (s. Tab. IX bei MIP-1 α) sind in dieser Auflistung enthalten, um zu untermauern, dass falsch positive Ergebnisse hier keine Rolle spielen, da nach negativer Erstmessung auch die Wiederholungsmessung negativ sein muss.

3.1.2. Stabilität und Linearität der Chemokine

Aufgrund der Tatsache, dass Serumproben über einen längeren Zeitraum gelagert, wiederholt aufgetaut und wieder eingefroren werden, muss man die Möglichkeit in Betracht ziehen, dass sich die zu messenden Proteine durch solche Vorgänge irreversibel verändern und für eine Messung unbrauchbar werden. Um diese möglichen Auswirkungen zu testen werden negative Serumproben (1:3 verdünnt mit 10%ig FCS-PBS-Lösung) mit positiver Kontrolle versetzt und diese unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt. In der ersten Versuchsreihe werden die vorbereiteten Serumproben bei -20°C gelagert und vor der ELISA-Messung bis zu 16-mal aufgetaut und wieder eingefroren (Tab.X).

Tabelle X: Ergebnisse von Serumproben (Zugabe von positiver Kontrolle) nach wiederholtem Auftauen und Einfrieren. Alle Werte sind pg/ml.

Anzahl des Auftau-/Einfriervorgangs vor ELISA-Messung	Negative Serumproben mit positiver Kontrolle	
	<u>MCP-1</u>	<u>MIP-1α</u>
0x	1020,1	305,1
1x	1003,2	285,4
2x	830,6	268,2
4x	1087,2	291,2
8x	1170,1	279,9
16x	1038,3	298,5

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, dass sich die Messungen für die jeweiligen Chemokine selbst nach 16-maligem Auftau-/Einfriervorgang nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Die Abweichung der Werte für beide Chemokine bleibt deutlich <10%. Auch die Messung bei MCP-1 nach 2-maligem und 8-maligem Auftauen/Einfrieren weicht <20% vom Mittelwert ab. Hieraus kann der Schluss gezogen werden, dass wiederholtem Auftauen und Einfrieren kein wesentlicher negativer Effekt zuzuschreiben ist.

In einer zweiten Versuchsreihe wird überprüft, wie sich Proteinkonzentrationen verhalten, wenn man sie verschiedenen Umgebungstemperaturen aussetzt (Tab.XI). Hierzu werden dieselben Serumproben der ersten Versuchsreihe benutzt. Ein Teil wird im Kühlraum bei 4°C gelagert, ein anderer Teil der Raumtemperatur ausgesetzt. Nach definierten Zeitpunkten werden die Proben dann bei -20°C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt mittels des ELISA-Protokolls gemessen.

Tabelle XI: Vergleich zwischen identischen Serumproben bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen. Der linke Teil der Tabelle zeigt Lagerung der Proben bei 4°C und Einfrieren zu definierten Zeitpunkten, der rechte Tabellenteil zeigt Lagerung bei Raumtemperatur (RT). Alle Werte sind pg/ml.

Lagerung der Proben bei 4°C und Einfrieren nach	Negative Serumproben versetzt mit positiver Kontrolle		Lagerung der Proben bei RT und Einfrieren nach	Negative Serumproben versetzt mit positiver Kontrolle	
	MCP-1	MIP-1 α		MCP-1	MIP-1 α
10 min.	992,1	290,8	10 min.	985,7	321,5
30 min.	943,1	304,7	30 min.	1020,1	304,3
1 Std.	1022	291,6	1 Std.	932,8	292,7
2 Std.	1073,9	283,1	2 Std.	1062,9	281,9
4 Std.	967,7	276	4 Std.	1116,4	308,5
8-10 Std.	1120,6	298,9	8-10 Std.	1032,5	325,3
24 Std.	1143,4	299,7	24 Std.	1136,8	366,1

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich bei MCP-1 und MIP-1 α um stabile Proteine handelt, die sich, wenn man sie verschiedenen äußeren Bedingungen aussetzt, nicht wesentlich in ihrer Struktur ändern und so kontinuierlich ähnliche Messwerte beobachtet werden können. Trotz allem wird jedoch empfohlen darauf zu achten, dass zu messende Serumproben während des Pipettiervorgangs immer auf Eis gelagert sind und keine Proben verwendet werden sollten, die mehr als 3-mal aufgetaut und eingefroren worden sind, um die Möglichkeit störender Interferenzen so gering wie möglich zu halten. Dies gilt natürlich auch für das Arbeiten mit anderen Zytokinen.

Die Linearität des Signals für die Standardkurve wird etabliert für die Werte der optischen Dichte zwischen 0,05 und 2,0. Hierzu werden Standardreihen von MCP-1 und MIP-1 α mit einem Top-Standard von 2000 pg/ml hergestellt und diese seriell 1:2,5 verdünnt. Alle gemessenen Werte weichen nicht mehr als 10% von den theoretischen Werten der hier verwendeten Standardreihen (2000 pg/ml Top-Standard, serielle Verdünnung 1:2,5) ab. Des Weiteren ergibt sich auch die Messgrenze (detection level) der jeweiligen ELISA-Protokolle, die sich aus den Mittelwerten in pg/ml errechnen, die der kleinsten

gemessenen optischen Dichte bei 450nm für die serielle Verdünnung der Standardkurve entspricht und nicht 0 beträgt. Die Messgrenze für MCP-1 ist demnach 6 pg/ml, die für MIP-1 α 8 pg/ml.

3.2. Charakteristika der Studienteilnehmer zu Studienbeginn

Insgesamt stehen Serumproben von 71 Patienten mit Typ 1 Diabetes zur Verfügung. Patienten, die (in der Cyclosporin-Vorläuferstudie aus dem Jahre 1988) entweder mit Placebo oder Cyclosporin A behandelt wurden, teilt man der Gruppe zu, die in Remission kommt (Remitter) oder nicht (Non-Remitter) (Tab XIIa). Remission wird hier definiert als benötigte mittlere Insulindosis von <0,25 U/kg/d und einen mittleren HbA_{1c}-Titer von <7,5. Die Placebo-Teilnehmer spiegeln den natürlichen Krankheitsverlauf wider. Die späteren Remitter weisen tendentiell niedrigere HbA_{1c}-Werte auf und benötigen zudem ebenfalls tendentiell eine geringere Insulindosis als die Non-Remitter. Zu Studienbeginn kann jedoch kein signifikanter Unterschied bezüglich der mit in die Analyse einflussenden Patientencharakteristika wie Alter, Gewicht, BMI, HbA_{1c}, Insulindosis, C-Peptid basal und stimuliert zwischen den vier Hauptgruppen auf der einen Seite gefunden werden (Tab XIIa und b), was aber auf der anderen Seite für ein gutes und ausreichendes Gruppen-Matching spricht und die zu untersuchenden Gruppen durch ähnliche Voraussetzungen vergleichbar macht.

Tabelle X11a: Charakteristika der Patienten bei Studienbeginn. Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichung.

	Placebo		Cyclosporin A	
	Non-Remitter	Remitter	Non-Remitter	Remitter
n	25	15	11	20
m/w	6/19	9/6	4/7	5/15
Body mass Index (BMI)	20,8 \pm 2,7	20,6 \pm 2,5	20,6 \pm 3,6	20,6 \pm 2,5
C-Peptid basal	0,21 \pm 0,08	0,25 \pm 0,14	0,19 \pm 0,08	0,23 \pm 0,09
C-Peptid stimuliert	0,36 \pm 0,17	0,38 \pm 0,17	0,28 \pm 0,14	0,37 \pm 0,17
Gewicht (kg)	63,8 \pm 9,3	65,3 \pm 10,6	63,3 \pm 14,5	66,2 \pm 9,1
Alter (Jahre)	21,2 \pm 5,2	23,5 \pm 6,3	20,7 \pm 6,7	22,5 \pm 6,2
HbA _{1c}	7,5 \pm 0,34	6,3 \pm 0,18	7,7 \pm 0,50	6,0 \pm 0,20
Insulindosis (iU/kg/d)	0,40 \pm 0,17	0,2 \pm 0,02	0,40 \pm 0,30	0,19 \pm 0,02

3.3. Longitudinaler Verlauf der gemessenen Zyto-/Chemokine

Bei Studienbeginn zeigt sich, dass die Serumspiegel von IL-10, IFN- γ , MCP-1 und MIP-1 α sich nicht signifikant zwischen der Placebo-Gruppe und der Cyclosporin-Gruppe voneinander unterscheiden (Tab XIIb). Auch dieser Umstand weist, wie man bereits bei Betrachtung der Patientencharakteristika sieht, auf eine gute Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen hin. In den folgenden 4 Abbildungen sind die longitudinalen Verläufe von IL-10, IFN- γ , MCP-1 und MIP-1 α von Studienbeginn bis 18 Monate nach Studienbeginn für die einzelnen Gruppen dargestellt (Abb. XIII, IX, X, XI). Um zwei Positionen innerhalb derselben Gruppe zu vergleichen wird der *Paired Wilcoxon ranked Test* verwendet.

Tabelle XIIb: Charakteristika bei Studienbeginn. Im *zweiseitigen Mann-Whitney U Test* ($P < 0,05$ signifikant) zeigen sich keine Unterschiede bei Studienbeginn. *Signifikante Einflüsse durch Geschlecht und Alter werden mittels *multivariater linearer Regression* ermittelt, wobei das Signifikanzniveau P für diese Faktoren angepasst wird.

	Placebo	Cyclosporin A	P-Werte
n	40	31	
Nüchtern-Glukose	9,98 ± 9,3	8,80 ± 4,2	0,40
HbA _{1c}	10,60 ± 2,34	10,61 ± 1,77	0,42
Gewicht (kg)	62,6 ± 10,7	63,4 ± 12,4	0,39
Kreatinin	76,75 ± 17,16	74,27 ± 17,49	0,25
Serum IL-10 (pg/ml) *	2,2 ± 3,3	1,5 ± 0,3	0,28
Serum IFN- γ (pg/ml) *	26,9 ± 74,8	29,7 ± 35,2	0,72
Serum MCP-1 (pg/ml) *	328,6 ± 212,0	325,8 ± 125,5	0,20
Serum MIP-1 α (pg/ml) *	68,1 ± 113,7	61,2 ± 70,9	0,13

3.3.1. Longitudinaler Verlauf von IL-10

Die Serumspiegel von IL-10 sind in fast allen Gruppen relativ stabil. 6 Monate nach Studienbeginn kann in der Gruppe der Placebo-behandelten Non-Remitter ein im Vergleich zu Studienbeginn niedrigerer Serumspiegel für IL-10 nachgewiesen werden ($p < 0,04$), der sich statistisch signifikant nach 12 Monaten abermals erniedrigt ($p < 0,03$). Zum Vergleich kann in der Placebo Remitter Gruppe weder bei Zeitpunkt 6 noch 12 ein Rückgang der Serumkonzentration von IL-10 nach Studienbeginn gemessen werden. Die Gruppe der Cyclosporin-behandelten Remitter und Non-Remitter zeigen, außer ein paar individuellen Schwankungen, keine relevante Veränderung des IL-10 Serumspiegels über den gesamten beobachteten Zeitraum (Abb. VIII).

Ausgehend von der Annahme, dass IL-10 ein TH2 Zytokin ist, kann die Vermutung angestellt werden, dass der hier gefundene Abfall des IL-10 Serumspiegels in der Placebo Non-Remitter Gruppe ursächlich in Zusammenhang mit dem Eintreten oder Ausbleiben einer Remission steht, da ja die Placebo-behandelten Gruppen den

natürlichen Krankheitsverlauf widerspiegeln. Die (schützende) TH2-Antwort könnte bei den Placebo-behandelten Non-Remittern nicht suffizient gewesen sein, so dass die Remission ausbleibt.

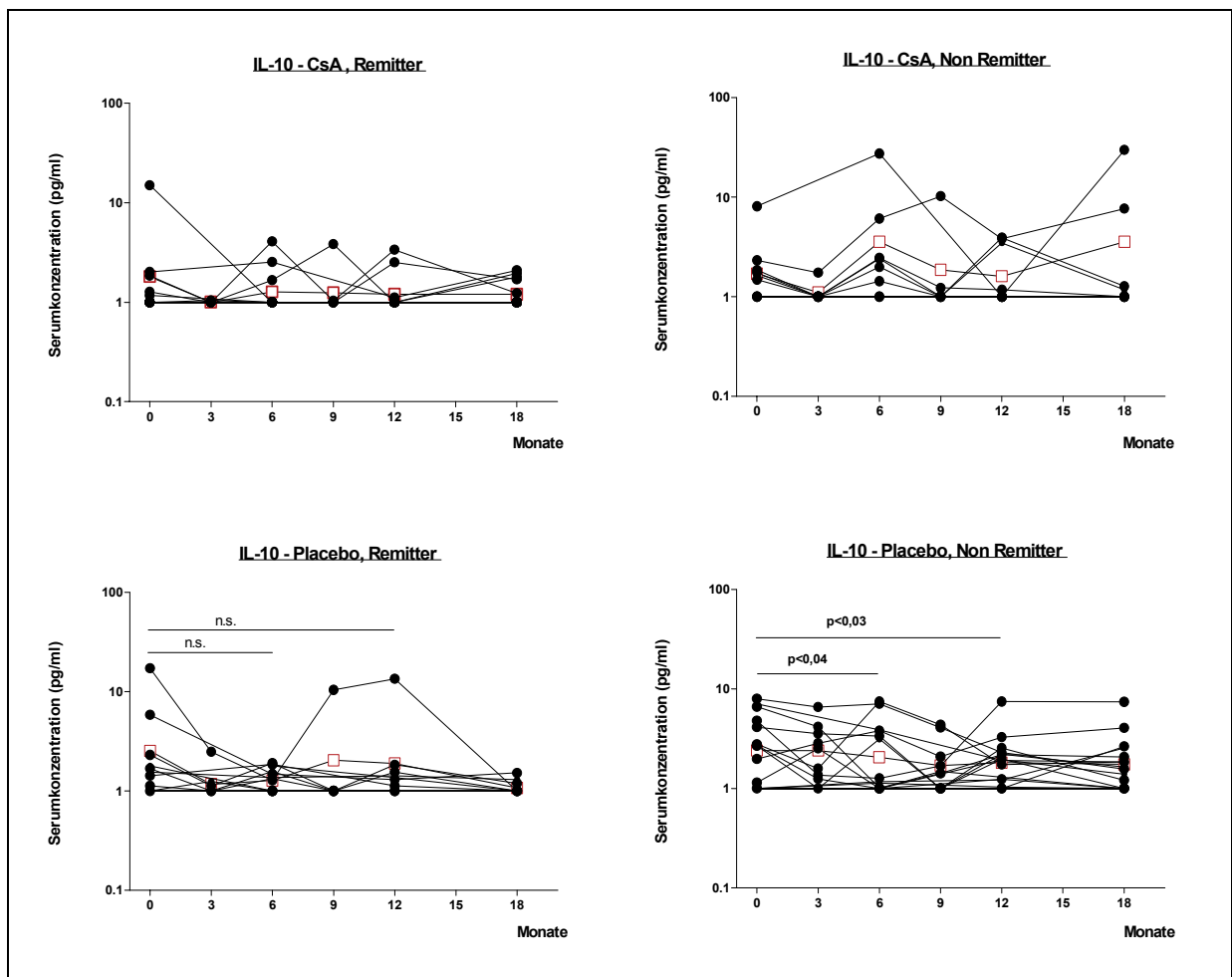


Abb. VIII: Individuelle Verläufe der Serumkonzentration von IL-10 in den verschiedenen Gruppen. Die Werte eines Patienten sind jeweils durch eine Linie miteinander verbunden. Die Mittelwerte sind durch rote Kästchen gekennzeichnet. Die Messgrenze (detection level) beträgt für IL-10 2 pg/ml, alle Werte unterhalb der Messgrenze werden auf 1 pg/ml gesetzt (50% der Messgrenze).

3.3.2. Longitudinaler Verlauf von IFN- γ

Die Serumkonzentration von IFN- γ weist bei Vergleich der Gruppen im longitudinalen Verlauf keine wesentlichen Unterschiede auf. Es zeigen sich sowohl in der Verum- als auch in der Placebogruppe stabile Werte für IFN- γ über die gesamte Studiendauer mit Ausnahme von wenigen individuellen Schwankungen (Abb.IX). Ableitend aus den vorliegenden Daten entsteht der Eindruck, dass der Serumspiegel von IFN- γ nicht mit dem Eintreten oder Ausbleiben einer Remission assoziiert ist.

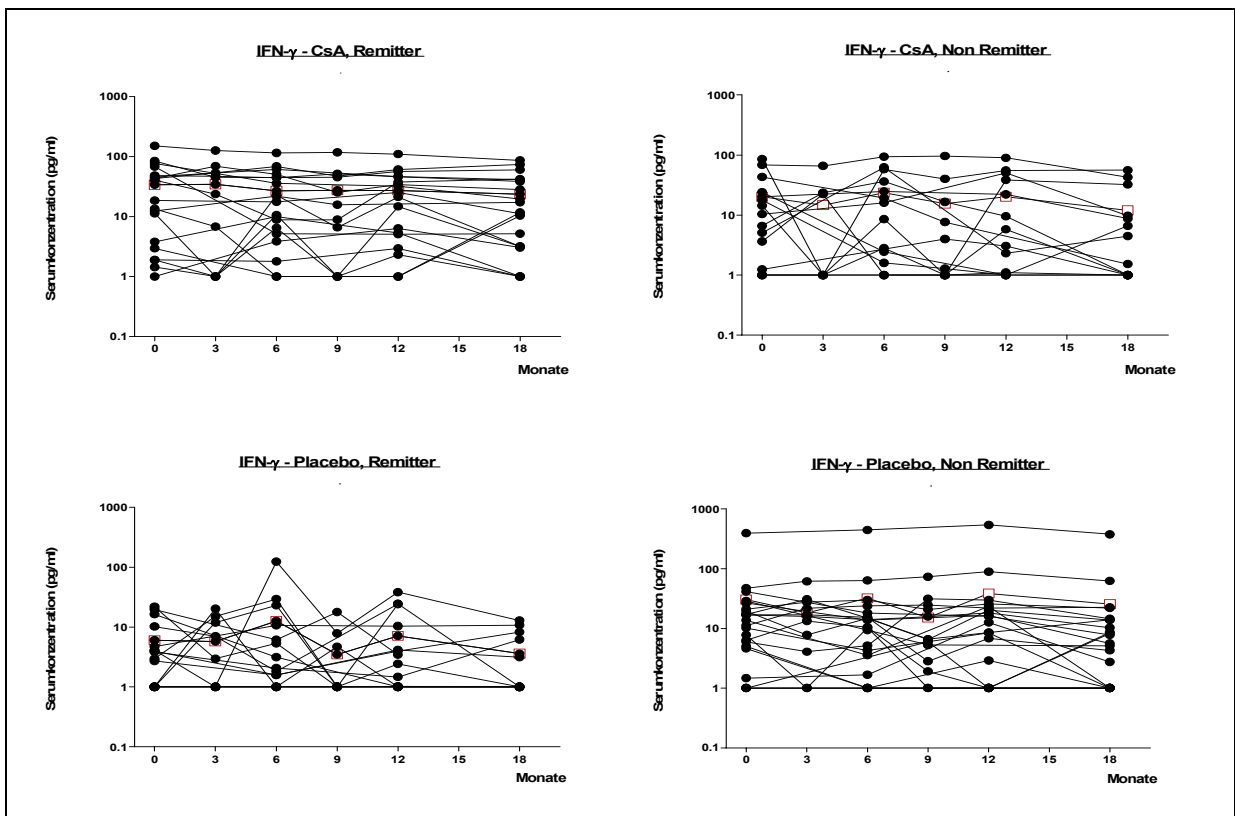


Abb. IX: Individuelle Verläufe der Serumkonzentration von IFN- γ in den verschiedenen Gruppen. Die Werte eines Patienten sind jeweils durch eine Linie miteinander verbunden. Die Mittelwerte sind durch rote Kästchen gekennzeichnet. Die Messgrenze (detection level) beträgt für IFN- γ 2 pg/ml, alle Werte unterhalb der Messgrenze werden auf 1 pg/ml gesetzt (50% der Messgrenze).

3.3.3. Longitudinaler Verlauf von MCP-1

Bei Messung der Serumspiegel von MCP-1 findet sich, ähnlich wie bei IFN- γ , in allen Gruppen kein signifikanter Abfall oder Erhöhung der Werte im gesamten Studienverlauf. Außer einigen Ausreißern ist in jeder der 4 dargestellten Gruppen ein stabiler MCP-1 Serumspiegel zu sehen (Abb.X).

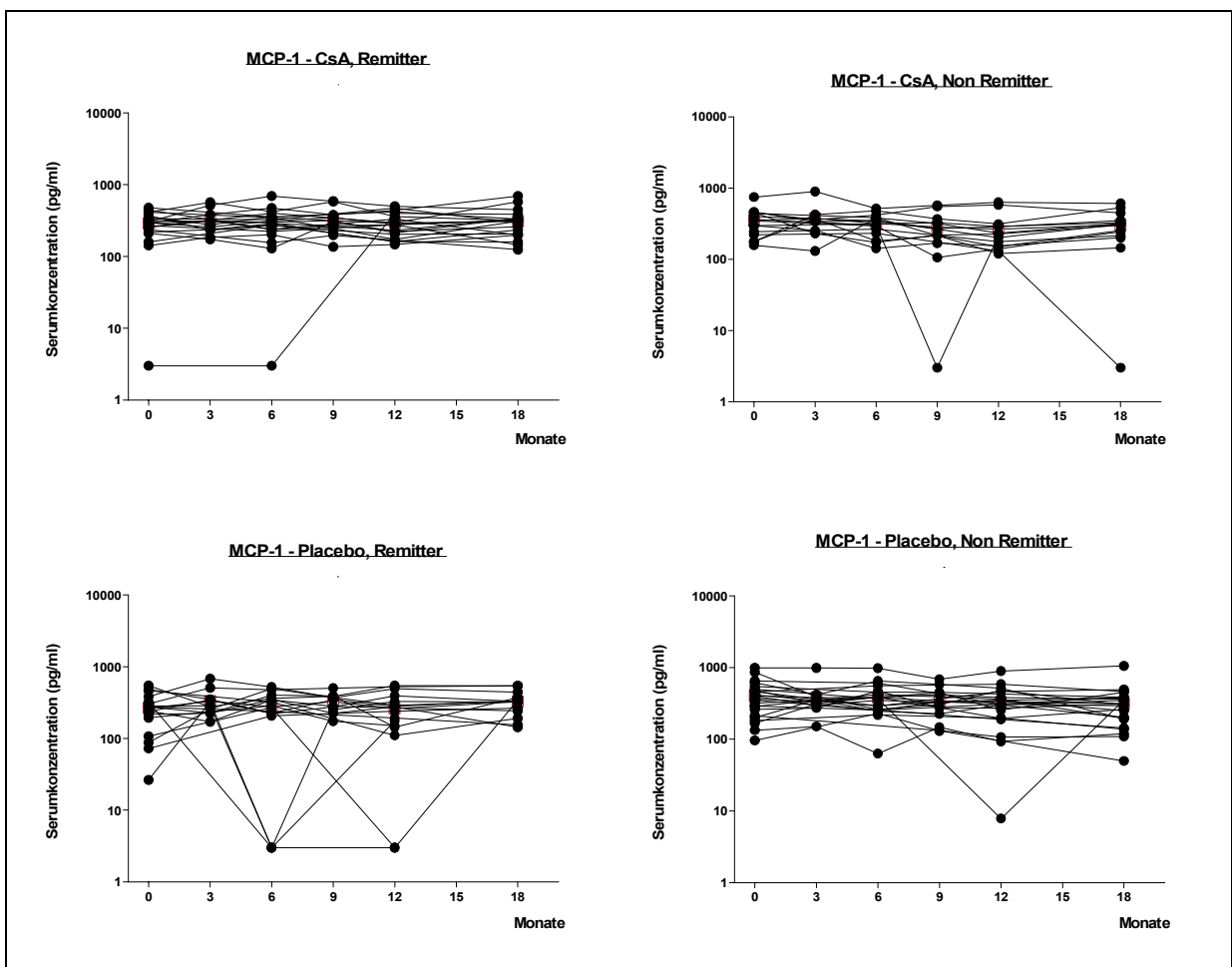


Abb. X: Individuelle Verläufe der Serumkonzentration von MCP-1 in den verschiedenen Gruppen. Die Werte eines Patienten sind jeweils durch eine Linie miteinander verbunden. Die Mittelwerte sind durch rote Kästchen gekennzeichnet. Die Messgrenze (detection level) beträgt für MCP-1 6 pg/ml.

3.3.4. Longitudinaler Verlauf von MIP-1 α

In der Placebo Non-Remitter Gruppe kann bei Messung der Serumwerte von MIP-1 α festgestellt werden, dass sich 12 Monate nach Studienbeginn im Vergleich zu den Ausgangswerten diese sich signifikant verringern ($p < 0,007$), wobei gleichzeitig dieser Umstand in der Placebo Remitter Gruppe nicht nachweisbar ist (n.s.). Des Weiteren ist aus Abbildung XI ersichtlich, dass sich in der Verum Remitter Gruppe die Werte von MIP-1 α 6 Monate nach Studienbeginn im Vergleich zur Ausgangssituation ebenfalls verringern ($p < 0,0001$). Dieser Effekt ist in der Verum Non-Remitter Gruppe nicht zu sehen (n.s.).

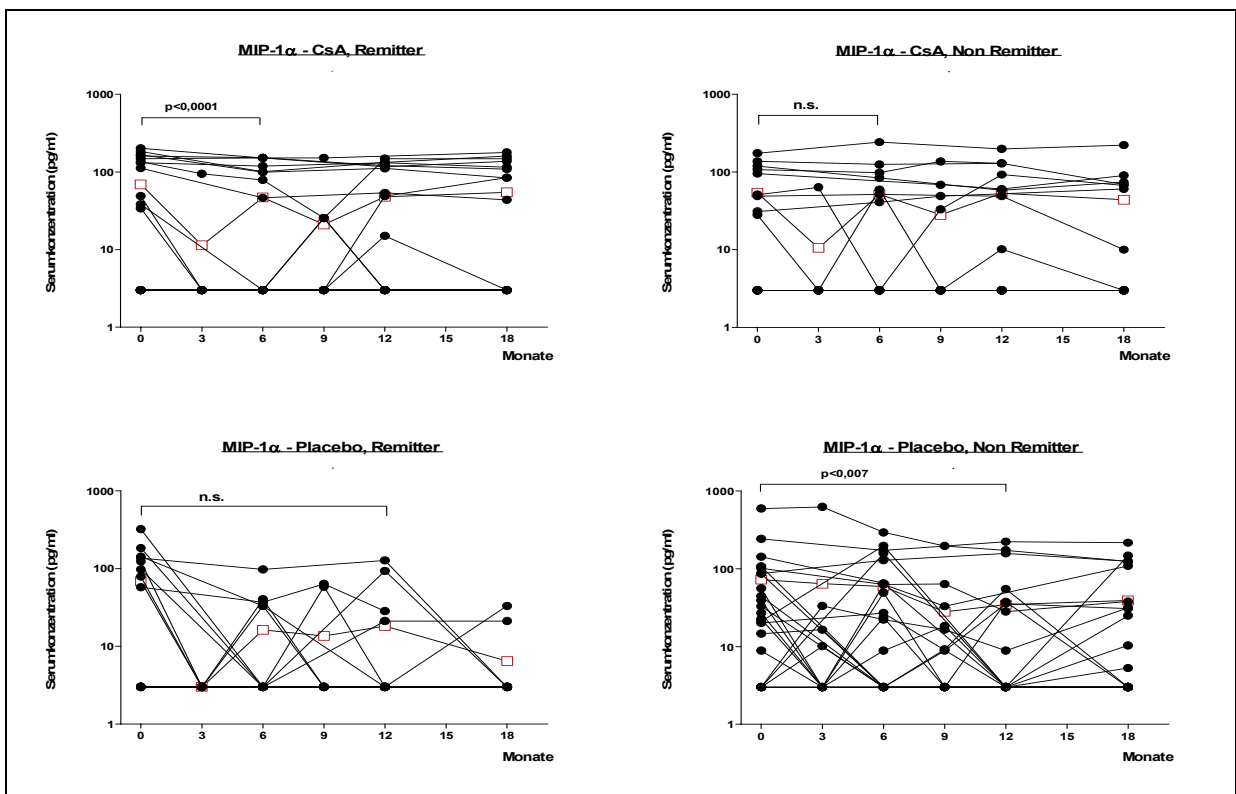


Abb. XI: Individuelle Verläufe von MIP-1 α in den verschiedenen Gruppen. Die Werte eines Patienten sind jeweils durch eine Linie miteinander verbunden. Die Mittelwerte sind durch rote Kästchengekennzeichnet. Die Messgrenze (detection level) beträgt für MIP-1 α 2 pg/ml, alle Werte unterhalb der Messgrenze werden auf 4 pg/ml gesetzt (50% der Messgrenze).

Zusammenfassend wird festgehalten, dass insgesamt die Serumkonzentrationen von IL-10, IFN- γ , MCP-1 und MIP-1 α stabil sind, wobei es individuelle Abweichungen gibt. Es zeigen sich lediglich Veränderungen der Serumspiegel von IL-10 und MIP-1 α in der Placebo Non-Remitter Gruppe sowie von MIP-1 α in der Cyclosporin Remitter Gruppe (Tab. XIII). Dies bedeutet, dass in den meisten Fällen die Zyto- und Chemokinspiegel durch das Vorkommen bzw. Ausbleiben einer Remission oder die Behandlung mit Cyclosporin A nicht signifikant beeinflusst werden.

Tabelle XIII: Übersicht der Veränderungen der Serumkonzentrationen im zeitlichen Verlauf bei den berücksichtigten Gruppen.

Gruppe	Zyto-/Chemokin Level im longitudinalen Verlauf	
CsA Remitter	IL-10	stabil
	IFN- γ	stabil
	MCP-1	stabil
	MIP-1 α	Abfall nach 6 Monaten ($p < 0,0001$)
CsA Non-Remitter	IL-10	stabil
	IFN- γ	stabil
	MCP-1	stabil
	MIP-1 α	stabil
Placebo Remitter	IL-10	stabil
	IFN- γ	stabil
	MCP-1	stabil
	MIP-1 α	stabil
Placebo Non-Remitter	IL-10	Abfall nach 6 und 12 Monaten ($p < 0,04$ und $p < 0,03$)
	IFN- γ	stabil
	MCP-1	stabil
	MIP-1 α	Abfall nach 12 Monaten ($p < 0,007$)

3.3.5. Zyto- und Chemokin Ratios

Der Immunstatus beschreibt den Zustand der Funktionsfähigkeit eines immunologischen Systems sowie dessen Fähigkeit zur immunologischen Reaktion. Die Beurteilung der Funktionsfähigkeit erfolgt u.a. anhand von Lymphozytenzahl, CD4-Zellzahl, TH1/TH2-Ratio, Hauttests oder Immunglobulinen. Die hier mit in die Analyse einfließende TH1/TH2-Ratio beschreibt das Verhältnis von TH1-Zellen zu TH2-Zellen bzw. zu dessen Produkten. Die Immunbalance zwischen Produkten wie Zyto- und Chemokinen von TH1/TH2-Zellen ist deswegen so interessant, da sie unabhängig von der absoluten Höhe des Ausgangswertes sind. In dieser Arbeit werden sowohl eine TH1/TH2 Zytokinbalance (IFN- γ /IL-10) als auch eine TH1-lastige/TH2-lastige Chemokinbalance analysiert, um zu klären, ob eher eine TH1 - oder TH2 - Immunantwort stattgefunden hat im Hinblick auf die allgemeingültige Annahme, dass die Progression des Typ 1 Diabetes TH1-getriggert ist.

3.3.6. TH1/TH2 Zytokin Ratio (IFN- γ /IL-10)

Die numerische Ratio von IFN- γ dividiert durch IL-10 Serumspiegel ergibt keine signifikanten Unterschiede innerhalb einer der 4 unterschiedlichen Gruppen (Abb. XII). Fasst man jedoch alle vorhandenen Zeitpunkte zusammen und vergleicht die 4 Gruppen in Hinblick auf deren Ratio, so zeigt sich eine erniedrigte IFN- γ /IL-10 Ratio bei Remitter gegen Non-Remitter in der Placebo Gruppe ($p < 0,006$). Die IFN- γ /IL-10 Ratio zeigt eine signifikante Hochregulation bei Remittern im Vergleich zu Non-Remittern in der Cyclosporin Gruppe ($p < 0,005$). Weiterhin sind die IFN- γ /IL-10 Ratios erhöht in der Cyclosporin Remitter Gruppe im Vergleich zur Placebo Remitter Gruppe ($p < 0,0001$) und der Placebo Non-Remitter Gruppe ($p < 0,0006$).

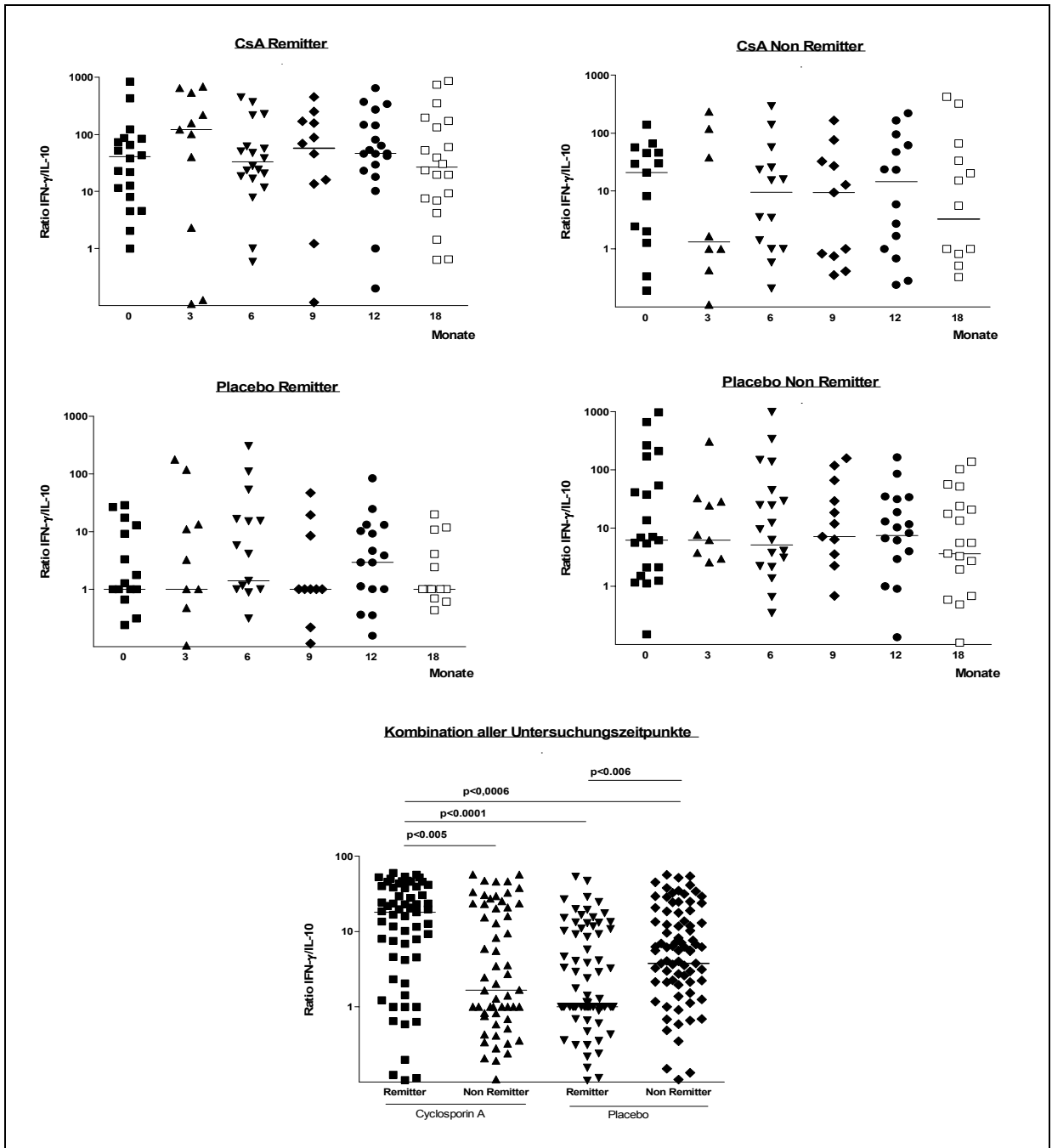


Abb. XII: Zytokin-Ratio IFN- γ /IL-10. Jeder Punkt repräsentiert eine Serumprobe. Die horizontale Linie zeigt den Median. Die X-Achse zeigt die Ratio, die Y-Achse zeigt verschiedene Untersuchungszeitpunkte in den einzelnen Patientengruppen.

3.3.7. TH1-lastige/TH2-lastige Chemokin Ratio (MIP-1 α /MCP-1)

Das Verhalten der Immunbalance von TH1/TH2 Zellen wird ebenso für die hier im Fokus stehenden Chemokine untersucht, indem die numerische Ratio errechnet wird, welche aus der Division von MIP-1 α zu MCP-1 Serumspiegel besteht.

In der Cyclosporin A Remitter Gruppe zeigt sich in Monat 6 im Vergleich zum Ausgangswert eine erniedrigte Ratio für MIP-1 α /MCP-1 ($p=0,0245$) (Abb. XIII). Im Gegensatz dazu beobachtet man einen Anstieg der Ratio in der Cyclosporin A Non-Remitter Gruppe von Monat 3 im Vergleich zu Monat 12 ($p=0,0266$). Analog zur Cyclosporin A Remitter Gruppe findet man in der Placebo Remitter Gruppe ebenfalls einen Abfall der MIP-1 α /MCP-1 Ratio und zwar jeweils im Vergleich zum Ausgangswert bei den Monaten 3 ($p=0,0145$), 9 ($p=0,408$) und 18 ($p=0,0111$). Einzig in der Placebo Non-Remitter Gruppe kann kein signifikanter Unterschied der hier analysierten Ratio gefunden werden. Letztlich werden alle Zeitpunkte zusammengefasst und die 4 Hauptgruppen auf signifikante Unterschiede bezüglich der MIP-1 α /MCP-1 Ratio untersucht. Wie schon bei der Analyse der IFN- γ /IL-10 Ratio kann auch bei Betrachtung der MIP-1 α /MCP-1 Ratio eine signifikante Erniedrigung der Ratio bei Remitter gegen Non-Remitter in der Placebo Gruppe festgestellt werden ($p=0,0449$). Weitere Unterschiede oder analoge Ergebnisse im Vergleich zur IFN- γ /IL-10 Ratio bei Vergleich der Hauptgruppen untereinander finden sich jedoch nicht (Abb. XIII).

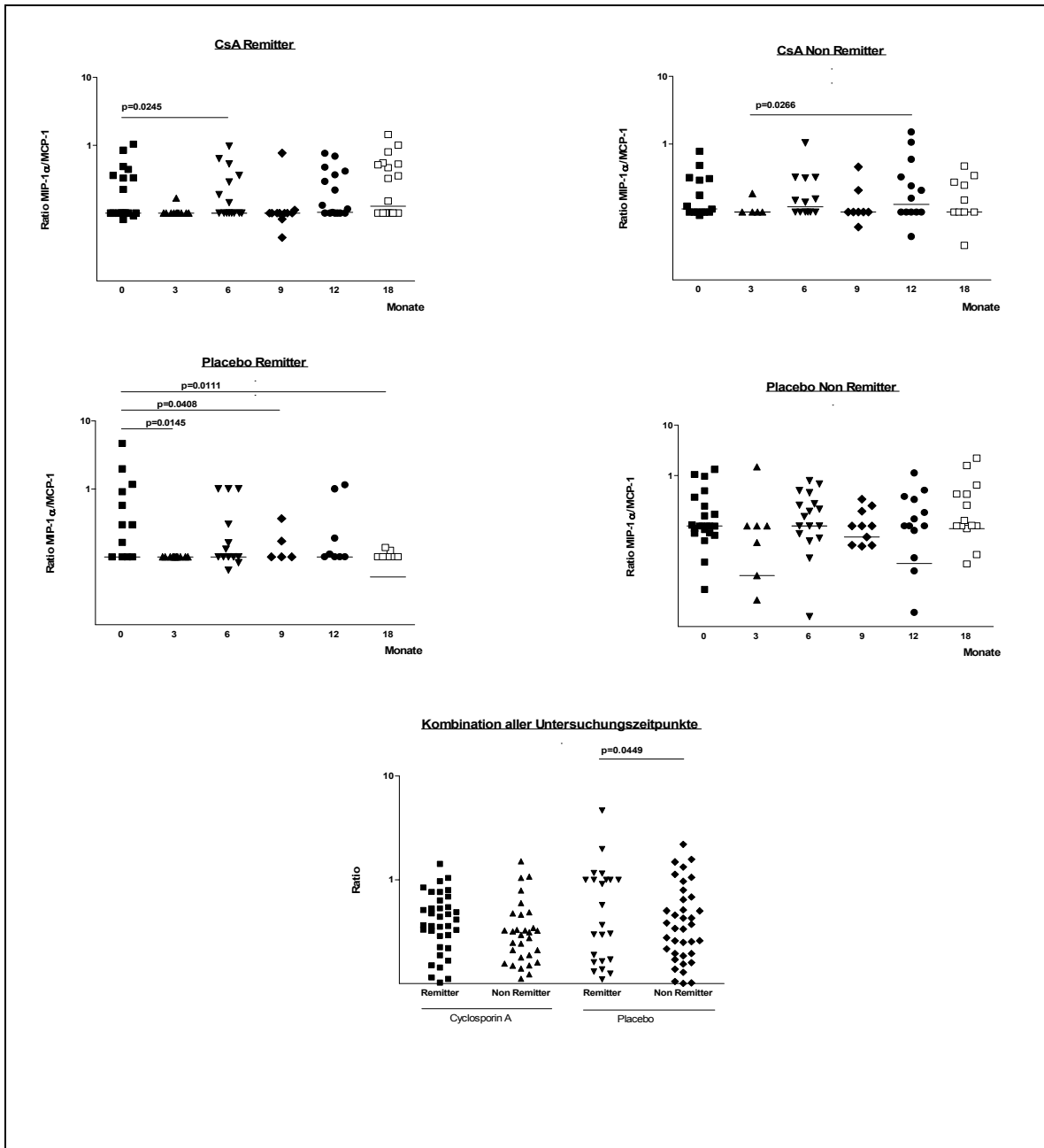


Abb. XIII: Chemokin-Ratio MIP-1 α /MCP-1. Jeder Punkt repräsentiert eine Serumprobe. Die horizontale Linie zeigt den Median. Die X-Achse zeigt die Ratio, die Y-Achse zeigt verschiedene Untersuchungszeitpunkte in den einzelnen Patientengruppen.

3.4. Korrelation von Zyto-/Chemokinen mit klinischen Patienten-Charakteristika bei Studienbeginn

In der Gesamtgruppe der Patienten zu Studienbeginn zeigt sich eine signifikante negative Assoziation von Alter mit IFN- γ Serumkonzentration ($r = -0,2512$, $p = 0,014$).

HbA_{1c} und BMI zeigen keine signifikante Assoziation mit IFN- γ .

IL-10 ist weder mit HbA_{1c}, Alter oder BMI assoziiert. MCP-1 zeigt einen Trend zur positiven Assoziation mit Alter ($r = 0,217$, $p = 0,069$), aber keine Relation mit HbA_{1c} oder BMI.

MIP-1 α zeigt im Gegensatz zu MCP-1, und ähnlich wie IFN- γ , einen Trend zur negativen Assoziation mit Alter ($r = -0,230$, $p = 0,055$), erscheint jedoch unabhängig von BMI und HbA_{1c} (Tab. XIV).

Tabelle XIV: Übersicht der Korrelation von Zyto-/Chemokinen mit klinischen Patienten Charakteristika bei Studienbeginn. Es zeigt sich lediglich Korrelation im Gesamtkollektiv (Placebo und Verumgruppe zusammengefasst) für Alter, nicht jedoch für BMI oder HbA_{1c}

Gesamtgruppe (Placebo und CsA)	
IFN- γ	Negative Assoziation mit Alter ($r = -0,2512$, $p = 0,014$)
IL-10	Keine Assoziation mit Alter, BMI, HbA _{1c}
MCP-1	Trend zur positiven Assoziation mit Alter ($r = 0,217$, $p = 0,069$)
MIP-1 α	Trend zur negativen Assoziation mit Alter ($r = -0,230$, $p = 0,055$)

3.4.1. Korrelation von Zyto-/Chemokinen mit klinischen Patienten-Charakteristika zum Zeitpunkt 6 und 12 Monate

Zum Zeitpunkt 6 Monate zeigen sich in der Placebo-Gruppe (Remitter und Non-Remitter kombiniert) keine signifikanten Assoziationen mit Alter, BMI und HbA_{1c}. Interessant ist in diesem Fall jedoch die Untergruppe der Placebo-behandelten Remitter, die, wie schon bei Studienbeginn beobachtet, eine negative Assoziation von Alter mit IFN- γ haben ($r = -0,574$, $p = 0,032$).

Zum Zeitpunkt 12 Monate ist dieser Effekt der negativen Assoziation von Alter zu IFN- γ auch in der kombinierten Placebo-Gruppe (Remitter und Non-Remitter) zu erkennen ($r = -0,3575$, $p = 0,0255$), wobei die Einzelergebnisse in der Remitter-Gruppe ($r = -0,3963$, $p = 0,1436$) und der Non-Remitter Gruppe ($r = -0,2775$, $p = 0,1892$) nicht das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ erreichen.

Zusätzlich ist IFN- γ assoziiert mit BMI ($r = 0,4195$, $p = 0,0413$) und IL-10 assoziiert mit BMI ($r = 0,467$, $p = 0,0216$), allerdings nur signifikant in der Gruppe der Non-Remitter (Placebo und Cyclosporin Gruppe kombiniert). MCP-1 zeigt wie schon zu Studienbeginn bei Zeitpunkt 12 Monate einen Trend zur positiven Assoziation mit Alter ($r = -0,223$, $p = 0,066$), nicht jedoch mit BMI oder HbA_{1c}. Bei MIP-1 α kann zu Zeitpunkt 6 und 12 Monate nach Studienbeginn keine Assoziation zu Alter, BMI und HbA_{1c} festgestellt werden (Tab. XV).

Tabelle XV: Übersicht der Korrelation von Zyto-/Chemokinen mit klinischen Patienten Charakteristika bei Zeitpunkt 6 und 12 Monate nach Studienbeginn. Dargestellt sind nur die signifikant korrelierenden Patientencharakteristika.

	Placebo		Cyclosporin A	
	<u>Non-Remitter</u>	<u>Remitter</u>	<u>Non-Remitter</u>	<u>Remitter</u>
IFN- γ , nach 6 Monaten		Alter (r=-0,574, p=0,032)		
IFN- γ , nach 12 Monaten	Alter (r=-0,3575, p=0,0255)			
IFN- γ , nach 12 Monaten	BMI (r=0,4195, p=0,0413)		BMI (r=0,4195, p=0,0413)	
IL-10, nach 12 Monaten	BMI (r=0,467, p=0,0216)		BMI (r=0,467, p=0,0216)	
MCP-1, nach 12 Monaten	Trend zur positiven Assoziation mit Alter (r =0,223, p=0,066)			
MIP-1 α , nach 6+12 Monaten	Keine Assoziation mit Alter, BMI, HbA _{1c}			

Diskussion

4. Einführung

Die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 ist trotz intensiver Forschung immer noch weitestgehend unverstanden. Dies liegt nicht zuletzt an den vielen verschiedenen Ursachen, die dieser Erkrankung zugrunde liegen können, sondern ebenso an der Vielzahl von verschiedenen körpereigenen Stoffen, die in unterschiedlicher Gewichtung an der Entstehung und Verlauf des Diabetes teilhaben. Zudem ist das körpereigene Immunsystem in vielfältiger und komplizierter Art und Weise vernetzt, wobei sich einzelne immunologische Prozesse überschneiden und sich gegenseitig so beeinflussen, dass absolute Aussagen über die Funktion einzelner immunpotenter Stoffe nur bedingt möglich sind. In diesem Zusammenhang spielen beispielsweise so genannte pleiotrope Effekte eine Rolle: ein Zyto-/Chemokin kann sich mit unterschiedlicher Affinität an verschiedene Rezeptoren binden und so eine immunologische Reaktion auslösen, die nicht spezifisch für den Botenstoff ist. Die mannigfaltigen Wechselwirkungen während immunologischer Prozesse, wie auch beim Diabetes, und die vielen, teils sogar entgegengesetzten, Aufgaben einzelner Immunkomponenten erschweren die Beobachtung, Beschreibung und letztlich die Heilung oder vielleicht auch Prävention der Erkrankung an vielen Fronten.

Die vorliegende Arbeit basiert auf der im Jahre 1988 veröffentlichten Studie *European-Canadian Randomized Control Trial Group*. Diese Studie galt als eine Schlüsselstudie, denn die Tatsache, dass durch Manipulation des Immunsystems durch das immunsupprimierende Cyclosporin A eine Erhöhung der Remissionsrate erzielt werden konnte, wies auf eine immunologisch vermittelte Krankheitsentwicklung beim Typ 1 Diabetes hin. Der durch die Steigerung der Remissionsrate bedingte Erfolg wurde jedoch getrübt, denn im Laufe der Studie zeigten sich die nephrotoxischen Nebenwirkungen des Cyclosporins

bei den Studienteilnehmern immer deutlicher, so dass letztlich entschieden wurde, die Studie abubrechen.

In der hier vorgestellten Arbeit werden aus dem genannten Kollektiv die Serumproben von 71 Patienten identifiziert von denen für die Analysen genügend Serum zu den Zeitpunkten 0 (Studienbeginn), 3, 6, 9, 12, 18 Monate zur Verfügung steht. Diese Gruppe wird abhängig von der ursprünglichen Behandlung mit Cyclosporin A sowie das Vorkommen oder Ausbleiben einer Remission in 4 Untergruppen eingeteilt:

1. Cyclosporin-behandelt, Remitter
2. Cyclosporin-behandelt, Non-Remitter
3. Placebo-behandelt, Remitter
4. Placebo-behandelt, Non-Remitter

In der vorliegenden Arbeit wird der so genannte „cut off“, also die Remission, definiert als eine durchschnittlich benötigte Insulindosis von <0.25 U/kg/d und einen durchschnittlichen HbA_{1c} von < 7.5 .

Cyclosporin A wirkt stark immunsupprimierend auf T-Lymphozyten (Wong et al., 1993). Die Bindung von Cyclosporin an Calcineurin, welches für die Transkription des für IL-2 kodierenden Gens benötigt wird, hemmt die Produktion von IL-2. Die Suppression der IL-2 Produktion wiederum beeinträchtigt die frühe Phase der Aktivierung und Proliferation von T-Helferzellen und zytotoxischen T-Lymphozyten (Ho et al., 1996, Garcia et al., 2000). Aus diesem Grunde ist es in der hier vorgestellten Arbeit von besonderem Interesse zu verfolgen, wie Zyto- und Chemokine unter einer Cyclosporin A Therapie beeinflusst werden. Diese Studie dokumentiert das Verhalten von Zyto-/Chemokin-Spiegel während einer immunsuppressiven Behandlung mit Cyclosporin A und während des natürlichen Krankheitsverlaufes (Placebo-behandelte Patienten).

Die Vorgänge, die zu einer Remission führen sind noch wenig verstanden (Greenbaum, 2002). Mögliche Ursachen für eine Remission basieren auf der Insulinresistenz, der

Betazell-Ruhe oder aber auf immunologischen Grundlagen. Das Eintreten der Remission ist natürlich ein positives Ereignis für die erkrankten Patienten, doch wäre es wünschenswert, wenn man diesen Umstand besser einschätzen könnte. Die Prädiktion von Remission hat in diesem Zusammenhang einen großen Stellenwert, denn man könnte diese Information für die Planung und Durchführung von klinischen Studien effektiv nutzen. Zudem wäre die Prädiktion von Remission generell dem Verständnis dieses Ereignisses sehr förderlich und letztlich könnte die Prädiktion bei der ärztlichen Beratung von erkrankten Patienten zum Einsatz kommen und so die Diabetes-Therapie und die Prävention von möglichen Folgeschäden optimiert werden. Es wurde bereits gezeigt, dass ein negativer IA-2 Antikörper-Status möglicherweise prädiktiv für das Eintreten einer Remission sein könnte bei Cyclosporin-behandelten Patienten (Christie et al, 2002). Hier wird unter anderem geprüft, ob die in dieser Arbeit einbezogenen Parameter möglicherweise als Monitor für den Krankheitsverlauf oder sogar als Prädiktor für das Eintreten einer Remission herangezogen werden können. Weiterhin wird überprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen den in dieser Arbeit gemessenen Zyto-/Chemokinen und Patienten-Parametern wie Alter, HbA_{1c} oder BMI gibt. Als klassisches TH1-Zytokin wird in den vorliegenden Patientenproben IFN- γ gemessen, während repräsentativ als TH2-Zytokin IL-10 gewählt wurde. Die Messung von Chemokinen wird ebenfalls in diese Arbeit integriert, um Informationslücken bezüglich dieser Stoffgruppe zu füllen. Als TH1-lastiges Chemokin wurde repräsentativ MIP-1 α untersucht, MCP-1 dagegen repräsentiert sich als TH2-lastiges Chemokin.

4.1. Longitudinaler Verlauf der Zyto- und Chemokine

Zunächst einmal muss festgehalten werden, dass die natürlich vorkommende Remission (siehe Gruppe der Placebo-behandelten Remitter) mit stabilen Serumspiegeln von proinflammatorischen (IFN- γ , MIP-1 α) und antiinflammatorischen (IL-10, MCP-1)

Mediatoren über den beobachteten Zeitraum von 18 Monaten assoziiert ist. Zusätzlich zu diesem Befund kommt hinzu, dass bei einigen Non-Remittern ein ebenfalls stabiler Zyto- und Chemokin-Spiegel beobachtet wird, so dass hieraus geschlossen werden kann, dass die hier untersuchten Marker sich nicht als Prädiktor für das Eintreten oder Ausbleiben einer Remission eignen. Interessant ist jedoch, dass in der Gruppe der Non-Remitter der Serumspiegel von IL-10 nach 6 und 12 Monaten signifikant fällt. Der abfallende antiinflammatorische IL-10 Serumspiegel könnte somit ursächlich für das Ausbleiben einer Remission in Zusammenhang stehen. Dieser Befund steht in Einklang mit der Beobachtung, dass IL-10 abhängige CD4(+) T-Zellen Interaktionen direkt an der Wiedererlangung der Funktionsfähigkeit von Betazellen beteiligt sind (Karges et al., 2006). In der kurz vor Veröffentlichung stehenden *DiabMarker-Studie* wird zudem nachgewiesen, dass IL-10 Spiegel bei späteren Non-Remittern im Vergleich zu Remittern mit Typ 1 Diabetes niedriger sind (Schloot et al., 2007). An dieser Stelle sollte jedoch daran erinnert werden, dass IL-10 nicht nur antiinflammatorische Impulse setzt, was schon in vielen vorangehenden Studien dokumentiert wurde. Als Beispiel sei hier die Produktion von IL-10 durch Inselzellen erwähnt, die die immunmedierte Zerstörung von Betazellen im NOD-Mausmodell beschleunigt (Wogensen et al., 1994). Neben der scheinbar zentralen Rolle des IL-10 Serumspiegels in Zusammenhang mit dem Auftreten einer Remission greift IL-10 ebenso entscheidend in den Immunmechanismus während der prädiabetischen Phase ein. So kann bei nicht-diabetischen NOD-Mäusen ein kontinuierliches Sinken der IL-10 Produktion bei zunehmendem Alter bis zur Diabetes-Manifestation gezeigt werden (Schloot et al., 2002). Die Wichtigkeit von IL-10 in der Pathogenese des Diabetes wird weiter untermauert durch eine Studie, in der monozygote Zwillinge diskordant für Typ 1 Diabetes untersucht werden. Hier zeigt sich eine erhöhte IL-10-Antwort auf die Stimulation mit hsp60 bei dem Zwilling mit niedrigem Risiko zu erkranken (Inselzell-Antikörper-negativ) im Vergleich zu dem dazugehörigen diabetischen Zwilling (Kallmann et al., 1999). Auch wenn IL-10 bei Betrachtung der vorliegenden Studie nicht als Marker für eine Remission herangezogen werden kann, so

scheint seine Rolle eine wichtige Bedeutung im diabetischen Krankheitsprozess zu haben.

Betrachtet man die Cyclosporin-behandelten Individuen, so stellt man, ähnlich wie in den Placebo Gruppen, relativ stabile Zyto- und Chemokin-Spiegel im longitudinalen Verlauf fest. Verglichen mit der Gruppe der Placebo-behandelten Remitter zeigen die Cyclosporin-behandelten Gruppen eher einen Trend zu höheren IFN- γ Spiegeln, allerdings ohne signifikante Unterschiede. Dieser Trend könnte vielleicht als Nebeneffekt durch die Inhibition von IL-10 durch die Cyclosporin-Behandlung aufgetreten sein. Des Weiteren ist MIP-1 α signifikant erniedrigt in der Gruppe der Cyclosporin-behandelten Remitter nach 6 Monaten. Man weiß, dass MIP-1 α chemotaktisch auf Monozyten, CD4+ und CD8+ T-Zellen wirkt (Gu et al., 2000). Ebenfalls ist schon über die Inhibition von MIP-1 α Sekretion von T-Zell-Klonen durch Cyclosporin A berichtet worden (Pette et al., 1997), entsprechend unserer Beobachtung, dass der MIP-1 α Spiegel unter der Cyclosporin-Behandlung sinkt. Andererseits ist es verwunderlich, dass der MIP-1 α Spiegel in der Cyclosporin-behandelten Non-Remitter Gruppe stabil bleibt. Dies mag jedoch in der Tatsache begründet liegen, dass keine Remission eingetreten ist und mutmaßlich andere immunologisch wirksame Einflüsse für einen stabilen MIP-1 α Spiegel durch Gegenregulation dafür verantwortlich sind. Auf der anderen Seite beobachtet man einen signifikanten Abfall des MIP-1 α Spiegels in der Gruppe der Placebo-behandelten Non-Remitter nach 12 Monaten. In einer anderen Arbeit wird eine verringerte Expression von TH1-assoziierten Chemokinrezeptoren auf peripheren Blut-Lymphozyten bei Erstdiagnose eines Diabetes im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe gezeigt, was als Ausdruck für die Extravasation in das entzündete Pankreasgewebe interpretiert wird (Lohmann et al., 2002). In dieser Arbeit zeigt sich bei Studienbeginn kein signifikanter Unterschied der Zyto- und Chemokin Spiegel in den verschiedenen Gruppen, wobei erwähnt werden muss, dass auch keine gesunde Kontrollgruppe zur Verfügung steht. Somit kann zwar die Aussage, die in der oben erwähnten Arbeit von Lohmann et al. getroffen wird, nicht direkt bestätigt werden, der Abfall des MIP-1 α

Spiegels könnte jedoch Ausdruck einer weiteren Extravasationsperiode von TH1-assoziierten Lymphozyten sein und zudem mitverantwortlich sein für das Ausbleiben der Remission in der Placebo-behandelten Non-Remitter Gruppe.

4.2. Zytokin- und Chemokin Ratios

In dieser Studie zeigt sich eine erniedrigte IFN- γ /IL-10 Ratio in der Placebo-behandelten Remitter Gruppe im Vergleich zu den Non-Remittern. Dieser Befund charakterisiert einen niedrigeren proinflammatorischen Status im Vergleich zu den Non-Remittern und ist gleichzeitig assoziiert mit Remission. Dieser Umstand wird untermauert durch die Ergebnisse von Schloot et al., wo ein Trend zu niedrigen IL-10 und IFN- γ Spiegeln bei Patienten mit Typ 1 Diabetes und späterer Remission zu sehen ist (Schloot et al., 2007). Interessant in diesem Zusammenhang ist nebenbefundlich, dass ein negativer Autoantikörper Status ein Prädiktor für Remission ist (Christie et al., 2002). Ein erniedrigter proinflammatorischer Status könnte in Kombination mit einem negativen Autoantikörper Status bei der Remission eine wichtige Rolle spielen. Bei Betrachtung dieser Befunde scheint die Krankheitsentwicklung, also das Eintreten oder Ausbleiben einer Remission, schon in einem frühen Stadium zwischen Remittern und Non-Remittern zu differieren. Eine signifikante Hochregulation der IFN- γ /IL-10 Ratio zeigt sich in der Gruppe der Cyclosporin-behandelten Remitter. Dies mag entweder Ausdruck dafür sein, dass eine Inhibition von IL-10 durch Cyclosporin mit nachfolgender Gegenregulierung bzw. Hochregulierung der TH1/TH2 Balance stattfindet, oder aber Cyclosporin hemmend auf andere Mediatoren wirkt und diese ihrerseits den hemmenden Einfluss auf die IFN- γ /IL-10 Ratio nicht in vollem Maße ausüben. Ein Hinweis, dass andere inhibierende Mediatoren eine Rolle spielen könnten, zeigt sich bei Betrachtung der Gruppe der Cyclosporin-behandelten Non-Remitter, wo Cyclosporin keinen Einfluss zu haben

scheint. Die Ratio ist nämlich in dieser Gruppe auf demselben Niveau wie bei den Placebo-behandelten Non-Remittern.

4.3. Korrelation von Zyto-/Chemokinen mit klinischen Patienten-Charakteristika

Bei Betrachtung der Ergebnisse in dieser Arbeit sollte zunächst als Kernaussage festgehalten werden, dass eine Änderung der gemessenen Zyto- und Chemokine in Assoziation mit dem Alter der Patienten beobachtet wird, und zwar mit einem Trend von abnehmenden TH1-assoziierten Zyto-/Chemokinen mit dem Alter sowie einem Trend von zunehmenden TH2-assoziierten Zyto-/Chemokinen mit dem Alter. Bei Studienbeginn kann in der Gesamtgruppe eine negative Assoziation von Alter mit IFN- γ (TH1-assoziiert) und MIP1- α (TH1-assoziiert) sowie eine positive Assoziation von Alter mit MCP-1 (TH2-assoziiert) gezeigt werden. Die Änderungen der gemessenen Parameter in Bezug auf das Alter setzen sich zumindest teilweise bei zunehmender Studiendauer fort und können für die Gruppe der Placebo-behandelten Remitter nach 6 Monaten bestätigt werden (negative Assoziation von Alter mit IFN- γ), nicht jedoch für die Gruppe der Placebo-behandelten Non-Remitter. Ob dieser Umstand durch die relativ geringen Patientenzahlen erklärt werden muss oder eher einer biologischen Bedeutung gleichkommt, im Sinne einer Dysregulation bei Non-Remittern, kann mit dieser Studie nicht geklärt werden. 12 Monate nach Studienbeginn zeigt sich diese Beobachtung zusätzlich in der kombinierten Placebo Gruppe (Remitter und Non-Remitter), wobei die Einzelergebnisse der genannten Untergruppen das Signifikanzniveau nicht erreichen, was wiederum wahrscheinlich seine Erklärung in den relativ kleinen Patientenzahlen findet.

Eine mögliche Erklärung für die hier vorgestellten Änderungen der gemessenen Zyto- und Chemokine könnte sein, dass mit zunehmendem Alter die Progression von Krankheiten weniger stark ausgeprägt ist. Hinweise für diesen im Alter niedriger

werdenden proinflammatorischen Status werden durch Messungen von Zytokinen bei anderen Kohorten bereits gezeigt (Bruunsgaard et al., 2003 und Roubenoff et al., 1998). Der in dieser Arbeit gefundene mit dem Alter abnehmende IFN- γ Spiegel zeigt sich ebenfalls bei Untersuchung an Rhesus-Affen (Mascarucci et al., 2001).

Letztlich findet sich bei Zeitpunkt 12 Monate eine positive Korrelation von BMI mit IFN- γ und IL-10, jedoch nur in der Gruppe der Non-Remitter (Placebo- und Cyclosporin-behandelt). Einerseits könnte dies wiederum als Ergebnisverzerrung durch die kleinen Fallzahlen interpretiert werden. Interessant ist jedoch andererseits gerade die Beobachtung, dass dies nur in der Gruppe der Non-Remitter festgestellt wird. Nebenbefundlich wird in einer Arbeit beispielsweise gezeigt, dass erhöhte Entzündungsparameter, als Ausdruck für ein gesteigertes proinflammatorisches Geschehen, prävalent für eine Insulinresistenz zu sein scheinen (Erhöhung der HbA_{1c} Spiegel) durch positive Assoziation mit BMI und eine Verschlechterung der metabolischen Situation beobachtet wird (Scholin et al., 2004). Bei der Pathophysiologie des Typ 2 Diabetes weiß man, dass die Insulinresistenz zwar im Vordergrund steht, aber der Krankheitsverlauf entscheidend durch Umwelteinflüsse wie fettreiche Ernährung, Übergewicht und Bewegungsmangel verstärkt werden kann. Natürlich kann die Pathophysiologie der beiden Diabetes-Typen nicht gleichgesetzt werden, aber ein wie in der vorliegenden Arbeit gezeigter Zusammenhang von BMI mit dem Ausbleiben einer Remission beim Typ 1 Diabetes als Ausdruck für eine ungünstigere metabolische Situation im Vergleich zu Remittern scheint zumindest möglich.

In dieser Studie wird keine Korrelation von HbA_{1c} und Zyto-/Chemokinen festgestellt. Mögliche Gründe hierfür sind die kleinen Patientenzahlen oder die Korrelation von HbA_{1c} mit anderen, hier nicht gemessenen, Immunparametern. Als Beispiel sei hier Adiponectin (ein Adipozytokin) aufgeführt, welches eine positive Korrelation mit HbA_{1c} bei einer Kohorte von präpubertären diabetischen Kindern hat (Celi et al., 2006).

4.4. Schlussfolgerung

Durch diese Arbeit wird gezeigt, dass die systemische Immunantwort (hier repräsentativ durch die Messung von ausgewählten Botenstoffen) stabil ist während natürlich vorkommender Remission bei Patienten mit Typ 1 Diabetes. Die immunologischen Prozesse scheinen nur geringfügig durch die Krankheitsaktivität oder die Behandlung mit dem immun-supprimierenden Medikament Cyclosporin A voneinander abzuweichen. Keins der gemessenen Parameter stellt sich als eindeutiger Prädiktor für das Eintreten einer Remission heraus. Diese Tatsache liegt wahrscheinlich darin begründet, dass beim diabetischen Pathomechanismus nicht einzelne Marker, sondern vielmehr Zytokin-Muster besser dazu geeignet sind, den komplexen Vorgang bei einer immun-medierten Krankheit wie dem Diabetes widerzuspiegeln und zu erklären. Dies sollte durch unabhängige Studien bestätigt werden.

Literaturverzeichnis

Acerini CL, Cheetham TD, Edge JA, Dunger DB. Both sensitivity and insulin clearance in children and young adults with type I (insulin-dependent) diabetes vary with growth hormone concentrations and with age. *Diabetologia*. 2000;43(1):61-8

Ahuja SK, Murphy PM. Molecular piracy of mammalian interleukin-8 receptor type B by herpesvirus saimiri. *J Biol Chem*. 1993;268(28):20691-4

Aleantara FF, Tang H, McLachlan A. Functional characterization of the interferon regulatory element in the enhancer 1 region of the hepatitis B virus genome. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30(9): 2068-75

Amrami A, Verdaguer J, Serra P, Tafuro S, Tau R, Santamaria P. Progression of autoimmune diabetes driven by avidity maturation of a T-cell population. *Nature* 2000; 406(6797): 739-42

Assan R, Feutren G, Sirmai J, Laborie C, Boitard C, Vexiau P, Du Rostu H, Rodier M, Figoni M, Vague P, et al. Plasma C-peptide levels and clinical remissions in recent-onset type 1 diabetic patients treated with cyclosporin A and insulin. *Diabetes*. 1990;39(7):768-74

Assan R, Feutren G, Debray-Sachs M, Quiniou-Debrie MC, Laborie C, Thomas G, Chatenoud L, Bach JF. Metabolic and immunological effects of cyclosporin in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus. *Lancet*. 1985;1(8420):67-71

Bacon KB, Greaves DR, Dairaghi DJ, Schall TJ. The Cytokine Handbook, 3rd Edition, Academic Press Limited (1998), Kapitel 27, S: 753 – 775

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu.Rev.Immunol.* 1997;15:675-705

Beall CJ, Mahajan S, Kolattukudy PE. Conversion of monocyte chemoattractant protein-1 into a neutrophil attractant by substitution of two amino acids. *J Biol Chem.* 1992;267(5):3455-9

Beall CJ, Mahajan S, Kuhn DE, Kolattukudy PE. Site-directed mutagenesis of monocyte chemoattractant protein-1 identifies two regions of the polypeptide essential for biological activity. *Biochem J.* 1996;313(Pt 2):633-40

Betts P, Mulligan J, Ward P, Smith B, Wilkin T. Increasing body weight predicts the earlier onset of insulin-dependant diabetes in childhood: testing the 'accelerator hypothesis' (2). *Diabet Med.* 2005 Feb;22(2):144-51

Birkenbach M, Josefsen K, Yalamanchili R, Lenoir G, Kieff E. Epstein-Barr virus-induced genes: first lymphocyte-specific G protein-coupled peptide receptors. *J Virol.* 1993;67(4):2209-20

Bischoff SC, Krieger M, Brunner T, Dahinden CA. Monocyte chemotactic protein 1 is a potent activator of human basophils. *J Exp Med.* 1992;175(5):1271-5

Bischoff SC, Krieger M, Brunner T, Rot A, von Tscharner V, Baggiolini M, Dahinden CA. RANTES and related chemokines activate human basophil granulocytes through different G protein-coupled receptors. *Eur J Immunol.* 1993;23(3):761-7

Bober E, Dundar B, Buyukgebiz A. Partial remission phase and metabolic control in type 1 diabetes mellitus in children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2001;14(4):435-41

Bonfanti R, Bognetti E, Meschi F, Brunelli A, Riva MC, Pastore MR, Calori G, Chiumello G. Residual beta-cell function and spontaneous clinical remission in type 1 diabetes mellitus: the role of puberty. *Acta Diabetol.* 1998;35(2):91-5

Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions.* 1976;6(4):468-75

Borel JF, Kis ZL, Beveridge T. The history and development of cyclosporin (Sandimmun). In:Merluzzi VJ, Adams J, eds.The Search for anti-inflammatory drugs. Boston: Birkhäuser, 1995;27-63

Bougneres PF, Landais P, Boisson C, Carel JC, Frament N, Boitard C, Chaussain JL, Bach JF. Limited duration of remission of insulin dependency in children with recent overt type 1 diabetes treated with low-dose cyclosporin. *Diabetes.* 1990;39(10):1264-72

Bruunsgaard H, Pedersen BK. Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2003;23:15-39

Buhler MM, Craig M, Donaghue LC, Badhwar P, Willis J, Manolios N, Tait BD, Silink M, Bennetts BH, Stewart GJ. CCR5 genotyping in an Australian and New Zealand type 1 diabetes cohort. *Autoimmunity.* 2002;35(7):457-61

Burcelin RG, Eddouks M, Beylot M, Normad S, Boitard C, Feutren G, Landais P, Riou JP, Girard JR, Bach JF, et al. Hypersensitivity to insulin during remissions in cyclosporin treated IDDM patients. *Diabetes Care*. 1993;16(6):881-8

Burkart V, Imai Y, Kallmann B, Kolb H. Cyclosporin A protects pancreatic islet cells from nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity. *FEBS Lett*. 1992;313(1):56-8

Calne RY, White DJ. The use of cyclosporin A in clinical organ grafting. *Ann Surg*. 1982;196(3):330-7

Cameron MJ, Arreaza GA, Grattan M, Meagher C, Sharif S, Burdick MD, Strieter RM, Cook DN, Delovitch TL. Differential expression of CC chemokines and the CCR5 receptor in the pancreas is associated with progression to type I diabetes. *J Immunol*. 2000;165(2):1102-10

Canadian-European Randomized Control Trial Group. 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*. 1988;37(11):1574-82

Canivet M, Jouanny C, Fourcade A, Lasneret J, Rhodes-Feuilletes A, Perries J. Effect of human interferon on type D retroviruses multiplication in chronically infected cell lines. *J. Interferon Res*. 1983; 3(1): 53-64

Carel JC, Boitard C, Eisenbarth G, Bach JF, Bougneres PF. Cyclosporine delays but does not prevent clinical onset in glucose intolerant pre-type 1 diabetic children. *J Autoimmun*. 1996;9(6):739-45

Celi F, Bini V, Papi F, Santilli E, Castellani MS, Ferretti A, Mencacci M, Berioli MG, De Giorgi G, Falorni A. Circulating adipocytokines in non-diabetic and Type 1 diabetic children: relationship to insulin therapy, glycaemic control and pubertal development. *Diabet Med.* 2006 Jun;23(6):660-5

Charlton B, Bacelj A, Mandel TE. 1988. Administration of silica particles or anti-Lyt2 antibody prevents β -cell destruction in NOD mice given cyclophosphamide. *Diabetes* 37: 930-35

Christie MR, Molvig J, Hawkes CJ, Carstensen B, Mandrup-Poulsen T. IA-2 antibody-negative status predicts remission and recovery of C-peptide levels in type 1 diabetic patients treated with cyclosporin. *Diabetes Care* 2002, 25:1192-1197

Davatelis G, Wolpe SD, Sherry B, Dayer JM, Chicheportiche R, Cerami A. Macrophage inflammatory protein-1: a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. *Science.* 1989;243(4894 Pt 1):1066-8

De Filippo G, Carel JC, Boitard C, Bougneres PF. Long-term results of early cyclosporin therapy in juvenile IDDM. *Diabetes.* 1996;45(1):101-4

Delaney CA, Eizirik DL. Intracellular targets for nitric oxide toxicity to pancreatic beta-cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1996; 29(5): 569-79

Deng W, Ohmori Y, Hamilton TA. Mechanisms of IL-4-mediated suppression of IP-10 gene expression in murine macrophages. *J Immunol.* 1994;153(5):2130-6

Dorner BG, Scheffold A, Rolph MS, Huser MB, Kaufmann SH, Radbruch A, Flesch IE, Kroczeck RA. MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, and ATAC/lymphotactin function

together with IFN-gamma as type 1 cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(9):6181-6

Fahey TJ 3rd, Tracey KJ, Tekamp-Olson P, Cousens LS, Jones WG, Shires GT, Cerami A, Sherry B. Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J Immunol*. 1992;148(9):2764-9

Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:571-611

Faulds D, Goa KL, Benfield P. Cyclosporin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs*. 1993;45(6):953-1040

Feutren G, Papoz L, Assan R, Vialettes B, Karsenty G, Vexiau P, Du Rostu H, Rodier M, Sirmai J, Lallemand A, et al. Cyclosporin increases the rate and length of remissions insulin-dependent diabetes of recent onset. Results of a multicentre double-blind trial. *Lancet*. 1986;2(8499):119-24

Finegood DT, Hramiak IM, Dupre J. A modified protocol for estimation of insulin sensitivity with the minimal model of glucose kinetics in patients with insulin-dependent diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;70(6):1538-49

Fischer G, Wittmann-Liebhold B, Lang K, Kiefhaber T, Schmid FX. Cyclophilin and peptidyl-propyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature*. 1989;337(6206):476-8

Flad HD, Gemsa D. 1997. Zytokine. In: Immunologie (Hrsg.: Gemsa D, Kalden JR, Resch K). Thieme Verlag Stuttgart, 4. Auflage, S. 56-57

Foti M, Granucci F, Aggujaro D, Liboi E, Luini W, Minardi S, Mantovani A, Sozzani S, Ricciardi-Castagnoli P. Upon dendritic cell (DC) activation chemokines and chemokine receptor expression are rapidly regulated for recruitment and maintenance of DC at the inflammatory site. *Int Immunol*. 1999;11(6):979-86

Gao JL, Kuhns DB, Tiffany HL, McDermott D, Li X, Francke U, Murphy PM. Structure and functional expression of the human macrophage inflammatory protein 1 alpha/RANTES receptor. *J Exp Med*. 1993;177(5):1421-7

Garcia JE, de Cabo MR, Rodriguez FM, Losada JP, Lopez AJ, Arellano JL. Effect of cyclosporin A on inflammatory cytokine production by U937 monocyte-like-cells. *Mediators.Infalmm*. 2000;8:169-74

Ginsberg HN. Investigation of insulin sensitivity in treated subjects with ketosis-prone diabetes mellitus. *Diabetes*. 1977;26(4):278-283

Graham GJ, Wright EG, Hewick R, Wolpe SD, Wilkie NM, Donaldson D, Lorimore S, Pragnell IB. Identification and characterization of an inhibitor of haemopoietic stem cell proliferation. *Nature*. 1990;344(6265):442-4

Greenbaum CJ, Kahn SE, Palmer JP. Nicotinamide's effects on glucose metabolism in subjects at risk for IDDM. *Diabetes*. 1996;45(11):1631-4

Greenbaum CJ. Insulin resistance in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2002;18(3):192-200

GU L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 2000; 404:407-411

Guo H, Jin YX, Ishikawa M, Huang YM, van der Meide PH, Link H, Xiao BG. Regulation of beta-chemokine mRNA expression in adult rat astrocytes by lipopolysaccharide, Proinflammatory and immunoregulatory cytokines. *Scand J Immunol.* 1998;48(5):502-8

Gurlo T, Kawamura K, von Grafenstein H. Role of inflammatory infiltrate in activation and effector function of cloned islet reactive nonobese diabetic CD8+ T-cells: involvement of a nitric oxide dependent pathway. *J. Immunol.* 1999; 163: 5770-80

Gyotoku T, Ono F, Aurelian L. Development of HSV-specific CD4+ Th1 responses and CD8+ cytotoxic T-lymphocytes with antiviral activity by vaccination with the HSV-2 mutant ICP10 Delta Pk. *Vaccine* 2002; 20(21-22): 2796-807

Hanifi-Moghaddam P, Schloot NC, Kappler S, Seissler J, Kolb H. An association of autoantibody status and serum cytokine levels in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2003;52(5):1137-42

Hanifi-Moghaddam P, Kappler S, Seissler J, Muller-Scholze S, Martin S, Roep BO, Strassburger K, Kolb H, Schloot NC. Altered chemokine levels in individuals at risk of Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2006 Feb;23(2):156-63

Harms JS, Splitter GA. Interferon-gamma inhibits transgene expression driven by SV 40 or CMV promoters but augments expression driven by the mammalian MHC I promotor. *Hum. Gen. Ther.* 1995; 6(10): 1291-7

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005 Nov;6(11):1123-32

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

Herold G. 2001. Innere Medizin . Herold G (Hrsg.), Köln

Herrath vMG, Holtz A, Homann D, Oldstone MB: Role of viruses in type 1 diabetes. *Semin. Immunol.* 10 (1998): 87-100

Herriott MJ, Leu RW. Activation of mouse macrophages for migration inhibition and for tumor cytotoxicity is mediated by interferon-gamma priming and triggering by various agents. *J. Interferon Res.* 1987; 7(2): 165-71

HO S, Clipstone N, Timmermann L, Northorp J, Fiorentino D et al. The mechanisms of action of cyclosporin A and FK 506. *Clin.Immunol.Immunopath.* 1996;80:40-45

Hramiak IM, Dupre J, Finegood DT. Determinants of clinical remission in recent-onset IDDM. *Diabetes Care.* 1993;16(1):125-32

Imhof BA, Dunon D. Leukocyte migration and adhesion. *Adv Immunol.* 1995;58:345-416

Irving SG, Zipfel PF, Balke J, McBride OW, Morton CC, Burd PR, Siebenlist U, Kelly K. Two inflammatory mediator cytokine genes are closely linked and variably amplified on chromosome 17q. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(11):3261-70

Jensen MA, Li FS, Van't Wout AB, Nickle DC, Shriner D, He HX, McLaughlin S, Shankarappa R, Margolick JB, Mullins JI. Improved Coreceptor Usage Prediction and Genotype Monitoring of R5-to-X4 Transition by Motif Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 env V3 Loop Sequences. *J.Virol.* 2003;77(24):13376-13388

Jun HS, Santamaria P, Lim HW, Zhang ML, Yoon JW. Absolute requirement of macrophages for the development and activation of beta-cell cytotoxic CD8+ T-cells in T-cell receptor transgenic NOD mice. *Diabetes* 1999; 48(1): 34-42

Kallmann BA, Lampeter EF, Hanifi-Moghaddam P, Hawa M, Leslie RD, Kolb H. Cytokine secretion patterns in twins discordant for type 1 diabetes. *Diabetologia.* 1999 Sep;42(9):1080-5

Kapp A, Zeck-Kapp G, Czech W, Schopf E. 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 Immunol Dermatol.* 1994;102(6):906-14

Karges B, Durinovic-Bello I, Heinze E, Debatin KM, Boehm B, Karges W. Immunological mechanisms associated with long-term remission of human type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2006 May-Jun;22(3):184-9

Karpinski KF, Hayward S, Tryphonas H. Statistical considerations in the quantitation of serum immunoglobulin levels using the enzym-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Immunol Methods.* 1987: 103:189-94

Kasuga A, Maryama T, Takei I, Shimada A, Kasatani T, Watanabe K, Saruta T, Nakaki T, Habu S, Miyazaki J. The role of cytotoxic macrophages in non-obese-diabetic mice: cytotoxicity against murine mastocytoma and beta cell lines. *Diabetologia* 1993; 36(12): 1252-7

Kaufmann DL, Care-Saltzer M, Tian J, Forsthuber T, Ting GS, Robinson P, Atkinson MA, Sercarz EE, Tobin AJ, Lehmann PV. Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin dependent diabetes. 1993. *Nature* 366: 69-72

Kiesel U, Oschilewski U, Kantwerk G, Maruta M, Hanenberg H, Treichel U, Kolb-Bachofen V, Hartung HP, Kolb H. 1986. Essential role of macrophages in the development of type 1 diabetes in BB rats. *Transplant. Proc.* 18: 1525-7

Kolb H. 1990. Diabetes. In: Immunologie (Hrsg.: Gemsa D, Kalden JR, Resche K), Thieme Verlag Stuttgart, S.: 288-321

Kolb H, Kolb-Bachofen V. 1992. Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus and nitric oxide. *Diabetologia* 35: 796-97

Kolb H, Nerup J. Type I diabetes mellitus: rationale for immune intervention. In: *Ciclosporin in Autoimmune Diseases*. Schindler R, Ed. Berlin, Springer-Verlag, 1985, 117-19

Kolios G, Wright KL, Jordan NJ, Leithead JB, Robertson DA, Westwick J. C-X-C and C-C chemokine expression and secretion by the human colonic epithelial cell line, HAT-29: differential effect of T Lymphocyte – derived cytokines. *Eur.J.Immunol.* 1999;29:530-6

Knip M, Puukka R, Kaar ML, Akerblom HK. Remission phase, endogenous insulin secretion and metabolic control in diabetic children. *Acta Diabetol Lat.* 1982;19(3):243-51

Kroncke KD, Fund J, Berschick B, Kolb H, Kolb-Bachofen V. Macrophage cytotoxicity towards isolated rat islet cells: neither lysis nor its protection are beta-cell specific. *Diabetologia* 1991; 34(4): 232-8

Kroncke KD, Kolb-Bachofen V, Berschick B, Burkart V, Kolb H. Activated macrophages kill pancreatic syngenic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 175: 752-8

Kronke M, Leonard WJ, Depper JM, Arya SK, Wong-Staal F, Gallo RC, Waldmann TA, Greene WC. Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984;81(16):5214-8

Kukita T, Nomiyama H, Ohmoto Y, Kukita A, Shuto T, Hotokebuchi T, Sugioka Y, Miura R, Iijima T. Macrophage inflammatory protein-1 alpha (LD78) expressed in human bone marrow: its role in regulation of hematopoiesis and osteoclast recruitment. *Lab Invest.* 1997;76(3):399-406

Laato M, Heino J, Gerdin B, Kahari VM, Niimkoski J. Interferon-gamma-induced inhibition of wound healing in vivo and in vitro. *Ann. Chir. Gynaecol.* 2001; 90 Suppl. 215: 19-23

Laupacis A, Stiller CR, Gardell C, Keown P, Dupre J, Wallace AC, Thibert P. Cyclosporin prevents diabetes in BB Wistar rats. *Lancet.* 1983;1(8314-5):10-2

Lee SC, Brummet ME, Shahabuddin S, Woodworth TG, Georas SN, Leiferman KM, Gilman SC, Stellato C, Glaude RP, Schleimer RP, Beck LA. Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein-1 alpha induces significant recruitment of neutrophils and monocytes. *J Immunol.* 2000;164(6):3392-401

Leonard EJ, Yoshimura T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol. Today.* 1990;11(3):97-101

Leslie RD, Taylor R, Pozzilli P. The role of insulin resistance in the natural history of type 1 diabetes. *Diabet Med.* 1997;14(4):327-31

Lindenmann J, Isaacs A. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1957 Sep 12;147(927):258-67

Linn T, Ortac K, Laube H, Federlin K. Intensive therapy in adult insulin-dependent diabetes mellitus is associated with improved insulin sensitivity and reserve: a randomised, controlled, prospective study over 5 years in newly diagnosed patients. *Metabolism.* 1996;45(12):1508-13

Liu ZG, Haelens A, Wuyts A, Struyf S, Pang XW, Proost P, Chen WF, van Damme J. Isolation of a lymphocyte chemotactic factor produced by the murine thymic epithelial cell line MTEC1: identification as a 30 kDa glycosylated form of MCP-1. *Eur Cytokine Netw.* 1996;7(3):381-8

Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca²⁺ mobilization, and enzyme release. *J Immunol.* 1996;156(1):322-7

Lohmann T, Laue S, Nietzschmann U, Kapellen TM, Lehmann I, Schroeder S, Paschke R, Kiess W. Reduced expression of Th1-associated chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes at diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetes* 2002 Aug;51(8):2474-80

Lombardo F, Valenzise M, Wasniewska M, Messina MF, Ruggeri C, Arrigo T, De Luca F. Two-year prospective evaluation of the factors affecting honeymoon frequency and duration in children with insulin dependent diabetes mellitus: the role key of age at diagnosis. *Diabetes Nutr Metab.* 2002;15(4):246-51

Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat.Immunol.* 2001;2:102-7

Mac Neil IA, Suda T, Moore KW, Mossman TR, Zlotnik A. IL-10, a novel growth cofactor for mature and immature t-cells. *J. Immunol.* 1990; 145: 4167-73

Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Nielsen JH, Bendixen G, Nerup J. Cytokines cause functional and structural damage to isolated islets of langerhans. *Allergy* 40 (1985): 424-29

Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature.* 2006 May 11;441(7090):231-4

Martin CA, Dorf ME. Differential regulation of interleukin-6, macrophage inflammatory protein-1, and JE/MCP-1 cytokine expression in macrophage cell lines. *Cell Immunol.* 1991;135(1):245-58

Martin S, Schernthaner G, Nerup J, Gries FA, Koivisto VA, Dupre J, Standl E, Hamet P, McArthur R, Tan MH, et al. Follow-up of cyclosporin A treatment in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: lack of long-term effects. *Diabetologia*. 1991;34(6):429-34

Mascarucci P, Taub D, Sacconi S, Paloma MA, Dawson H, Roth GS, Ingram DK, Lane MA. Age-related changes in cytokine production by leukocytes in rhesus monkeys. *Aging(Milano)*. 2001 Apr;13(2):85-94

Mattapallil JJ, Dandekar S, Canfield DR, Solnick JV. A predominant Th1 type of immune response is induced early during acute *Helicobacter pylori* infection in rhesus macaques. *Gastroenterology*. 2000;118(2):307-15

McLarty DG, Athaide I, Bottazzo GF, Swai AM, Alberti KG. Islet cell antibodies are not specifically associated with insulin-dependent diabetes in Tanzanian Africans. *Diabetes Res Clin Pract*. 1990;9(3):219-24

McManus CM, Brosnan CF, Berman JW. Cytokine induction of MIP-1 alpha in human fetal microglia. *J Immunol*. 1998;160(3):1449-55

Mein CA, Esposito L, Dunn MG, Johnson GC, Timms AE, Goy JV, Smith AN, Sebag-Montefiore L, Merriman ME, Wilson AJ, Pritchard LE, Cucca F, Barnett AH, Bain SC, Todd GA. A search for type 1 diabetes susceptibility genes in families from the United Kingdom. *Nat. Genet*. 19(1998): 297-400

Metha VK, Hao W, Brooks-Worrell BM, Palmer JP. Low-dose interleukin 1 and tumor necrosis factor individually stimulate insulin release but in combination cause suppression. *Eur. J. Endocrinol*. 1994 Feb; 130(2): 208-14

Miach PJ. Cyclosporin A in organ transplantation. *Med J Aust.* 1986;145(3-4):146-50

Min DI, Monaco AP. Complications associated with immunosuppressive therapy and their management. *Pharmacotherapy.* 1991;11(5):119s-125s

Miyazaki A, Hanafusa T, Yamada K, Miyagawa J, Fujino-Kurihara H, Nakaijima H, Monaka K, Tarui S. Predominance of T-lymphocytes in pancreatic islets and spleen of pre-diabetic-non-obese (NOD) mice; a longitudinal study. *Clin. Exp. Immuno.* 60 :622-630

Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mossman TR. Interleukin -10 . *Annu. Rev. Immunol.* 1993 ; 11 : 165-90

Moore RN, Pitruzzello FJ, Deana DG, Rouse BT. Endogenous regulation of macrophage proliferation and differentiation by E prostaglandins and interferon alpha/beta. *Lymphokine Res.* 1985 Winter; 4(1) :43-50

Mordes JP, Desemone J, Rossini AA. The BB rat. *Diabet. Metab. Rev.* (1987) 725

Mossman TR, Coffmann RL. Two types of mouse helper t-cell clone: implications for immune regulation. *Immunol. Today* 8 (1987) :223-227

Muhammad BJ, Swift PG, Raymond NT, Botha JL. Partial remission phase of diabetes in children younger than age 10 years. *Arch Dis Child.* 1999;80(4):367-9

Nakahata T, Tsuji K. Function, molecular structure and gene expression regulation of interleukin-10 (IL-10). *Nippon Riusho.* 50 (1992) :1827-32

Nerup J, Mandrup-Poulsen T, Molvig J, Helqvist S, Wogensen L, Egeberg J. Mechanisms of pancreatic beta-cell destruction in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 1988 Nov-Dec; 11 Suppl. 1 :16-23

Ogasawara K, Yoshinaga SK, Lanier LL. Inducible Costimulator costimulates cytotoxic activity and IFN-gamma production in activated murine NK-cells. *J. Immunol* 2002 Oct 1; 169(7) :3676-85

Olson JM, Vongpunsawad S, Kuivaniemi H, Ronkainen A, Hernesniemi J, Ryyanen M et al. Search for intracranial aneurysm susceptibility gene(s) using Finnish families. *BMC.Med.Genet.* 2002;3:7

Omata N, Yasutomi M, Yamada A, Iwasaki H, Mayumi M, Ohshima Y. Monocyte chemoattractant protein-1 selectively inhibits the acquisition of CD40 ligand-dependent IL-12-producing capacity of monocyte-derived cells and modulates Th1 immune response. *J Immunol.* 2002;69(9):4861-6

Oschilewski U, Kiesel U, Kolb H. Administration of silica prevents diabetes in BB-rats. *Diabetes* 34 :197-9

Pette M, Pette DF, Muraro PA, Martin R, McFarland HF. In vitro modulation of human, autoreactive MBP-specific CD4+ T-cell clones by cyclosporin A. *J Neuroimmunol.* 1997;76:91-99

Piemonti L, Calori G, Mercalli A, Lattuada A, Monti G, Garancini MP, Costantino F, Ruotolo G, Luzi L, Perseghin G. Fasting plasma leptin, tumor necrosis factor-alpha receptor 2, and monocyte chemoattracting protein 1 concentration in a population of

glucose-tolerant and glucose-intolerant women: impact on cardiovascular mortality. *Diabetes Care*. 2003;26(10):2883-9

Pipeleers D, Ling Z. Pancreatic beta cells in insulin-independent diabetes. *Diabet. Metab. Rev.* 8 (1992) 209

Plikaytis BD, Turner SH, Gheesling LL, Carlone GM. Comparisons of standard curve-fitting methods to quantitate *Neisseria meningitidis* group A polysaccharide antibody levels by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 1991;29:1439-46

Pujol-Borrel R, Todd I, Doshi M, Bottazzo GF, Sutton R, Gray D, Adolf GR, Feldman M. HLA class induction in human islet cells by interferon-gamma plus tumor necrosis factor or lymphotoxin. *Nature* 326 :304-6

Pukel C, Baquerizo H, Rabinovitch A: Destruction of rat islet cell monolayers by cytokines: synergistic interaction of interferon-gamma, tumor necrosis factor, lymphotoxin and interleukin-1. *Diabetes* 37 :133-6

Rabinovitch A, Baquerizo H, Pukel C, Sumoski W. Effects of cytokines on rat pancreatic islet cell monolayer cultures: distinction between functional and cytotoxic effects on islet beta-cells. *Reg. Immunol.* 1989 Mar-Apr; 2(2) :77-82

Raport CJ, Gosling J, Schweickart VL, Gray PW, Charo IF. Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β . *J Biol Chem.* 1996;271(29):17161-6

Reale M, Barbacane RC, DiGiacchino M, Felaco M, Croce A, Ferro FM, Lotti TM, Conti P. Differential expression and secretion of RANTES and MCP-1 in activated peripheral blood mononuclear cell cultures of atopic subjects. *Immunol Lett.* 2001;76(1):7-14

Reale M, Di Giulio C, Cacchio M, Barbacane RC, Grilli A, Felaco M, Bianchi G, Di Giacchino M, Conti P. Oxygen supply modulates MCP-1 release in monocytes from young and aged rats: decrease of MCP-1 transcription and translation is age-related. *Mol Cell Biochem.* 2003;248(1-2):1-6

Revelen R, Bordron A, Dueymes M, Youinou P, Arvieux J. False positivity in a cyto-ELISA for anti-endothelial cell antibodies caused by heterophile antibodies to bovine serum proteins. *Clin Chem.* 2000 Feb;46(2):273-8

Rohane P, Fathman CG. Initiation of autoimmunity in NOD mice. *Diabet. Rev.* 1 (1993) 166

Rollins BJ, Morton CC, Ledbetter DH, Eddy RL Jr, Shows TB. Assignment of the human small inducible cytokine A2 gene, SCYA2 (encoding JE or MCP-1), to 17q11.2-12: evolutionary relatedness of cytokines clustered at the same locus. *Genomics.* 1991; 10(2):489-92

Rossetti L, Shulman GI, Zawulich W, DeFronzo RA. Effect of chronic hyperglycemia on in vivo insulin secretion in partially pancreatectomized rats. *J Clin Invest.* 1987;80(4):1037-44

Rossini AA, Handler ES, Greiner DL, Mordes JP. Insulin dependent diabetes mellitus hypothesis of autoimmunity. *Autoimmunity.* 1991;8(3):221-35

Rossini AA, Mordes JP, Like AA. Animal models of insulin-dependant diabetes mellitus. In: *Immunology in Diabetes*. Andreani D, DiMario U, Federlin KF, Heding LG, Eds. London, Kimpton, 1984, 35-44

Rot A, Krieger M, Brunner T, Bischoff SC, Schall TJ, Dahinden CA. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J Exp Med*. 1992;176(6):1489-95

Roubenoff R, Harris TB, Abad LW, Wilson PW, Dallal GE, Dinarello CA. Monocyte cytokine production in an elderly population:effect of age and inflammation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*.1998;53:M20-M26

Schall TJ, Bacon KB. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr Opin Immunol*. 1994 Dec;6(6):865-73

Scherbaum WA. Stoffwechselstörungen. In: Thiemes Innere Medizin, Thieme Verlag Stuttgart (1999), S: 288-321

Schernthaler G. Progress in the immunointervention of type-1 diabetes mellitus. *Horm Metab Res*. 1995;27(12):547-54

Schlöot NC, Hanifi-Moghaddam P, Goebel C, Shatavi SV, Flohe S, Kolb H, Rothe H. Serum IFN-gamma and IL-10 levels are associated with disease progression in non-obese diabetic mice. *Metab Res Rev*. 2002;18(1):64-70

Schlöot NC, Hanifi-Moghaddam P, Aabenhus-Andersen N, Alizadeh BZ, Saha MT, Knip M, Devendra D, Wilkin T, Bonifacio E, Roep BO, Kolb H, Mandrup-Poulsen T.

Association of immune mediators at diagnosis of Type 1 diabetes with later clinical remission. *Diabet Med.* 2007 Mar 22

Scholin A, Berne C, Schvarcz E, Karlsson FA, Bjork E. Factors predicting clinical remission in adult patients with type 1 diabetes. *J Intern Med.* 1999;245(2):155-62

Scholin A, Siegbahn A, Berne C, Sundkvist G, Bjork E, Karlsson FA; Diabetes Incident Study in Sweden group. CRP and IL-6 concentrations are associated with poor glycemic control despite preserved beta-cell function during the first year after diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2004 May-Jun;20(3):205-10

Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol. Today.* 1992;13(4):136-42

Sekiya K, Nagasaki H, Ozaki N, Suzuki A, Miura Y, Oiso Y. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents cytokine-induced cytotoxicity via inhibition of inducible nitric oxide expression in beta cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 278 :211-6

Sharp PS, Mohan V, Vitelli F, Maneschi F, Kohner EM. Changes in insulin resistance with long-term insulin therapy. *Diabetes Care.* 1987;10(1):56-61

Sherry B, Tekamp-Olson P, Gallegos C, Bauer D, Davatellis G, Wolpe SD, Masiarz F, Coit D, Cerami A. Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory 1 beta. *J Exp Med.* 1988;168(6):2251-9

Sideras P, Funa K, Zalcborg-Quintana I, Xanthopoulos KG, Kisielow P, Palacios R. Analysis by in situ hybridization of cells expressing mRNA for interleukin 4 in the

developing thymus and in peripheral lymphocytes from mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85(1):218-21

Siegenthaler W, Kaufmann W, Hornbostel H, Waller HD: Lehrbuch der Inneren Medizin. Thieme Verlag Stuttgart (1987), 2. Auflage

Sjoholm A. Aspects of the involvement of interleukin-1 and nitric oxide in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell Death Differ*. 1998 Jun; 5(6) :461-8

Soldevila G, Buscema M, Doshi M, James RF, Bottazzo GF, Pujol-Borrell R. Cytotoxic effect of IFN-gamma plus TNF-alpha on human islet cells. *J. Autoimmun*. 1991; 4 :291-306

Somasundaram R, Jacob L, Swoboda R, Caputo L, Song H, Basak S, Monos D, Peritt D, Marincola F, Cai D, Birebent B, Bloome E, Kim J, Berenncsi K, Mastrangelo M, Herlyn D. Inhibition of cytotoxic T-lymphocyte proliferation by autologous CD4+/CD25+ regulatory T-cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor-beta. *Cancer Res*. 2002 Sep 15; 62(18) 5267-72

Stiller CR, Dupre J, Gent M, Jenner MR, Keown PA, Laupacis A, Martell R, Rodger NW, von Graffenried B, Wolfe BM. Effects of cyclosporine immunosuppression in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. *Science*. 1984;223(4643):1362-7

Straub P, Domke J, Kirchner H, Jacobson H, Panet A. Synthesis of herpes simplex virus proteins and nucleic acids in interferon-treated macrophages. *Virology* 1986 Apr 30; 150(2) :411-8

Sugihara T, Yoshimura Y, Tanaka O. Ultrastructural and immuno-electron microscopic studies on infiltrating mononuclear cells in lymphatic submandibulitis in NOD mice. *Histology and Histopathology* 4 :397-404

Takahashi K, Mizuarai S, Araki H, Mashiko S, Ishihara A, Kanatani A, Itadani H, Kotani H. Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem.* 2003;278(47):46654-60

Takaishi H, Taniguchi T, Takahashi A, Ishikawa Y, Yokoyama M. High glucose accelerates MCP-1 production via p38 MAPK in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;305(1):122-8

Thai AC, Eisenbarth S. Natural history of IDDM. *Diabet. Rev.* 1 (1993) 1

Tisch R, Yang XD, Singer SM, Liblau RS, Fugger L, Mc Devitt HO. Immune response to glutaemic acid decarboxylase correlates with insulinitis in nonobese diabetic mice. *Nature* 366 (1993): 72-5

Topham PS, Csizmadia V, Soler D, Hines D, Gerard CJ, Salant DJ, Hancock WW. Lack of chemokine receptor CCR1 enhances Th1 responses and glomerular injury during nephrotoxic nephritis. *J Clin Invest.* 1999;104(11):1549-57

Tropschug M, Wachter E, Mayer S, Schonbrunner ER, Schmid FX. Isolation and sequence of an FK506-binding protein from *N. crassa* which catalyses protein folding. *Nature.* 1990;346(6285):674-7

Valente AJ, Rozek MM, Sprgue EA, Schwartz CJ. Mechanisms in intimal monocyte-macrophage recruitment. A special role for monocyte chemotactic protein-1. *Circulation*. 1992;86(6 Suppl):III 20-5

Van Gool SW, Vermeiren J, Rafiq K, Lorr K, de Boer M, Ceuppens JL. Blocking CD40 – CD154 and CD80/CD86 – CD28 interactions during primary allogenic stimulation results in T-cell anergy and high IL-10 production. *Eur. J. Immunol.*, 1999 Aug; 29(8) : 2367-75

Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes*. 1996;45(7):926-33

Verheyden P, Jaspers H, De Wolf E, Van Binst G. Conformational study of cyclosporin A in acetone at low temperature. *Int J Pept Protein Res*. 1994;44(4):364-71

Vialettes B, Picq R, du Rostu M, Charbonnel B, Rodier M, Mirouze J, Vexiau P, Passa P, Pehuet M, Elgrably F, et al. A preliminary multicentre study of the treatment of recently diagnosed type 1 diabetes by combination nicotinamide-cyclosporin therapy. *Diabet Med*. 1990;7(8):731-5

Ward SG, Bacon K, Westwick J. Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity*. 1998;9: I-II

Wicker LS, Appel MC, Dotta F, Pressey A, Miller BJ, Delarato NG, Fischer PA, Boltz RC, Peterson LB. Autoimmune syndromes in major histocompatibility complex (MHC) congenic strains of nonobese diabetic (NOD) mice. The MHC is dominant for insulinitis and cyclophosphamide-induced diabetes. *J. Exp. Med*. 176 (1992) : 67-77

Wicker LS, Todd JA, Peterson LB: Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu. Rev. Immunol.* 13 (1995) : 179-200

Wilkin TJ. The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between Type I and Type II diabetes. *Diabetologia.* 2001 Jul;44(7):914-22

Wilkin TJ. The accelerator hypothesis: a unifying explanation for type-1 and type-2 diabetes. *Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme.* 2006;11:139-50; discussion 150-3

Wogensen L, Lee MS, Savertrick M. Production of interleukin 10 by islet cells accelerates immune-mediated destruction of beta cells in nonobese diabetic mice. *J Exp Med.* 1994 Apr 1;179(4):1379-84

Wong RL, Winslow CM, Cooper KD. The mechanisms of action of cyclosporin A in the treatment of psoriasis. *Immunol.Today.* 1993;14:69-74

Yee GC. Dosage forms of cyclosporine. *Pharmacotherapy.* 1991 ;11(6) :149s-152s

Ying S, Meng Q, Barata LT, Kay AB. 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.* 2001 ;31(11) :1724-31

Yki-Jarvinen H, Koivisto VA. Insulin sensitivity in newly diagnosed type 1 diabetics after ketoacidosis and three months of insulin therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984 ;59(3):371-8

Yki-Jarvinen H, Koivisto VA. Natural course of insulin resistance in type I diabetics. *N Engl J Med.* 1986 ;315(4) :224-30

Yki-Jarvinen H. Acute and chronic effects of hyperglycaemia on glucose metabolism. *Diabetologia.* 1990;33(10):579-85

Yoshida A, Elnor SG, Bian ZM, Kunkel SL, Lukacs NW, Elnor VM. Differential chemokine regulation by Th2 cytokines during human RPE-monocyte coculture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001 ;42(7) :1631-8

Zang YC, Samanta AK, Halder JB, Hong J, Tejada-Simon MV, Rivera VM, Zhang JZ. Aberrant t cell migration toward RANTES and MIP-1 alpha in patients with multiple sclerosis. Overexpression of chemokine receptor CCR5. *Brain.* 2000 ;123(Pt 9) :1874-82

Zimmermann BT, Canono BP, Campbell PA. Silica decreases phagocytosis and bactericidal activity of both macrophages and neutrophils in vitro. *Immunology* 59 (1986): 521-25

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 2000;12(2):121-7

Danksagung

Besonderer Dank gilt Priv. Doz. Dr. med. Nanette C. Schloot am Deutschen Diabetes Zentrum für die Überlassung des Themas und die freundliche Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein weiterer Dank gilt Dr. Pejman Hanifi-Moghaddam und Gennaro Manzo für die beispiellose Anleitung während der Laborarbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Monika Kluza für ihre Hilfe und moralische Unterstützung bedanken. Letztlich gilt mein Dank meinen Eltern und Geschwistern.

Zusammenfassung

Patienten mit Typ 1 Diabetes entwickeln nach Beginn der Insulintherapie häufig eine Phase der reduzierten Insulinbedürftigkeit, die als Remission bezeichnet wird. Es ist davon auszugehen, dass die Ursache hierfür sowohl in einer verminderten Insulinresistenz als auch in einer vorübergehenden Erholung der Insulin-produzierenden β -Zellen liegt. Letztere werden bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes durch einen immunmedierten Prozess selektiv zerstört. Immunsuppressive Medikamente wie Cyclosporin A sind in der Lage, die natürliche Remissionsrate zu steigern, wie dies in der 1988 veröffentlichten Studie *The European-Canadian Randomised Control Trial Group* gezeigt wurde. Entscheidend am Pathomechanismus der Inselzelldestruktion beteiligt sind die immunkompetenten Zellen und deren Produkte wie Zyto- und Chemokine, die letztlich die Immunreaktion vermitteln.

Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob aussgewählte Zytokine und Chemokine mit Remission assoziiert sind und ob die Zytokinbalance durch die Gabe von Cyclosporin A verändert wird.

Dazu wurden Serumproben von 71 Patienten aus der *European-Canadian Randomised Control Trial Group* mittels ELISA auf TH1- und TH2- assoziierte Immunmarker (IFN- γ , IL-10, MIP-1 α , MCP-1) zu den Zeitpunkten 0, 3, 6, 9, 12, 18 Monate nach Studienbeginn untersucht.

Bei Betrachtung des gesamten untersuchten Kollektivs waren die systemischen Zyto- und Chemokin-Spiegel über die 18 Monate dauernde Studiendauer stabil. Weder die TH1- assoziierten Zytokine IFN- γ und MIP-1 α noch die TH2- assoziierten Zytokine IL-10 und MCP-1 waren zu Beginn der Studie mit dem späteren Eintritt einer Remission assoziiert, so dass diesen Immunmediatoren kein prädiktiver Wert zukommt. Auch zum Zeitpunkt der klinischen Remission zeigten sich keine deutlichen Assoziationen mit den gemessenen Zytokinen.

Die Analyse der Untergruppen (Placebo im Vergleich zu Cyclosporin A behandelten Patienten und Remitter im Vergleich zu Non-Remittern) zeigte, dass auch hier die Verläufe von IFN- γ und MCP-1 stabil waren. Für IL-10 zeigte sich jedoch ein Abfall der Serumkonzentration 6 und 12 Monate nach Studienbeginn in der Gruppe der Non-Remitter. Dies kann als Verlust einer eher protektiven Wirkung des TH2-assozierten IL-10 gedeutet werden, der bei den Remittern so nicht zu finden war.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass auch das TH1-lastige Chemokin MIP-1 α zum Zeitpunkt 12 Monate bei den Non-Remittern (Placebo) erniedrigt war, so dass eine gleichsinnige Herunterregulation von sowohl TH1- als auch von TH2-assozierten Zytokinen im Serum vorhanden ist. Ob diese Veränderungen auch das lokale Milieu der Insulin-produzierenden β -Zellen widerspiegeln oder komplementär zu sehen sind, kann mit dieser Studie nicht beantwortet werden.

Zusätzlich zu den Einzelzytokinanalysen zeigten TH1/TH2 Ratios als Ausdruck der Immunbalance, dass sowohl die IFN- γ /IL-10 Ratio als auch die MIP-1 α /MCP-1 Ratio in der Remittergruppe (Placebo) geringer ausfiel als bei den Non-Remittern. Diese Beobachtung war in der Cyclosporin A-behandelten Gruppe für die IFN- γ /IL-10 Ratio genau umgekehrt und für die MIP-1 α /MCP-1 Ratio nicht nachweisbar. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Cyclosporin A die Immunbalance beeinflusst.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass zwar Veränderungen von löslichen Zytokinen im peripheren Blut in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium nachweisbar sind, diese jedoch für Prädiktion und Prognose einzelner Patienten nicht geeignet sind. In weiteren Studien sollten daher zusätzliche Immunmediatoren und Zytokinmuster untersucht werden.

Gesehen und genehmigt

Priv. Doz. Dr. med. Nanette C. Schloot

Lebenslauf

Name: Olaf Giovanni De Rosa
Anschrift: Stoffelerstr.14
40227 Düsseldorf

Geburtsdatum: 07.08.1975
Geburtsort: Solingen
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Konfession: römisch-katholisch

Schullaufbahn:
1981 - 1985 Besuch der Grundschule Gottlieb-Heinrich in Solingen
1985 - 1992 Besuch des Gymnasiums Vogelsang in Solingen
1992 - 1995 Besuch des Gymnasiums Adlerstrasse in Haan
1995 Abitur

Zivildienst:
09/1995 - 10/1996 Städtisches Krankenhaus Solingen

Studium:
04/1997 - 10/2003 Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
03/1999 Physikum
03/2000 Erstes Staatsexamen
08/2002 Zweites Staatsexamen
10/2002 - 09/2003 Praktisches Jahr:
Chirurgie, Innere Medizin und Orthopädie: ev. Krankenhaus Bethesda
Duisburg
10/2003 Drittes Staatsexamen

Ärztliche Tätigkeit:
Seit 04/2004 Assistenzarzt in der Abteilung für Unfallchirurgie und Orthopädie,
Krankenhaus Benrath, Chefarzt: Priv. Doz. Dr. med. M. Roesgen

Promotion:
Seit 07/2001 Mitglied der Arbeitsgruppe von Fr. Priv. Doz. Dr. med. N.C. Schloot

Düsseldorf, den 16.08.2007

Olaf Giovanni De Rosa