

Aus der
**Klinischen Abteilung des
Deutschen Diabetes-Forschungsinstituts
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**
Direktor: Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum

**Expression und Induzierbarkeit
des humanen Hitzeschockproteins hsp70
beim Typ-I-Diabetes
und ein immunologisches Modell für
deren Beeinflussung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Leif Germaschewski

2003

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referent: Prof. Dr. Kolb

Korreferent: Prof. Dr. Wasmuth

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Typ-I-Diabetes mellitus	1
1.2	Immunologie und Pathomechanismen des Typ-I-Diabetes	2
1.3	Hitzeschockproteine	4
1.3.1	Übersicht	4
1.3.2	Hsp70	4
1.3.3	Regulation der hsp70-Expression	5
1.3.4	Hitzeschockproteine, Immunologie und Autoimmunologie	6
1.3.5	Hitzeschockproteine und Typ-I-Diabetes	7
1.4	Das Th1/Th2-Modell der T-Helferzellen	8
1.4.1	Der Th1-Subtyp	8
1.4.2	Der Th2-Subtyp	9
1.4.3	Interferon- γ	10
1.4.4	Interleukin-4	10
1.4.5	Transforming Growth Factor β (TGF- β)	11
1.5	Das Th1/Th2-Modell beim Typ-I-Diabetes	12
1.6	Ziel der Arbeit	12
2.	Material und Methoden	13
2.1	Material und Geräte	13
2.1.1	Patienten und Kontrollpersonen	13
2.1.1.1	Patienten mit längermanifestem Typ-I-Diabetes	13
2.1.1.2	Patienten mit neumanifestem Typ-I-Diabetes	13
2.1.2	Geräte	14
2.1.3	Chemikalien	15
2.1.4	Sterilisation der Chemikalien und Geräte	15
2.1.5	Einwegartikel für die Zellkultur	15
2.1.6	Antikörper	16
2.1.7	Medien für die Zellkultur	16
2.1.8	Stammlösungen und Puffer	16
2.2	Methoden	18
2.2.1	Anfertigung von Blutausstrichen	18
2.2.2	Differenzieren von Blutausstrichen	19

2.2.3	Allgemeine Kulturbedingungen	19
2.2.4	Isolation von mononukleären Blutzellen	19
2.2.5	Kultivierung von mononukleären Blutzellen	19
2.2.6	Bestimmung der Lebendzellzahl	19
2.2.7	Behandlung von Zellen mit Hitzeschock	20
2.2.8	Herstellung von Zellysaten	20
2.2.9	Analyse von Zellysaten mittels Western Blot	20
2.2.9.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	20
2.2.9.2	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	21
2.2.9.3	Immunodetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	21
2.3	Statistische Verfahren	22
3.	Ergebnisse	23
3.1	Expression und Induzierbarkeit von Hitzeschockproteinen beim längermanifesten Typ-I-Diabetes	23
3.1.1	hsp70-Expression bei längermanifestem Typ-I-Diabetes	23
3.1.2	Induzierbarkeit von hsp70 bei längermanifestem Typ-I-Diabetes	24
3.1.3	hsc70-Expression bei längermanifestem Typ-I-Diabetes	25
3.1.4	Induzierbarkeit von hsc70 bei längermanifestem Typ-I-Diabetes	26
3.2	Expression und Induzierbarkeit von hsp70 bei neumanifestem Typ-I-Diabetes	27
3.2.1	hsp70-Expression bei neumanifestem Typ-I-Diabetes, Tag 0	27
3.2.2	Induzierbarkeit von hsp70 bei neumanifestem Typ-I-Diabetes	28
3.2.3	hsp70-Expression bei neumanifestem Typ-I-Diabetes, Tag 8	29
3.2.4	hsp70-Expression bei neumanifestem Typ-I-Diabetes, Tag 0-8	30
3.3	Induzierbarkeit von hsp70 nach Th1/Th2-Stimulation	33
3.3.1	Induzierbarkeit von hsp70 nach Th1-Stimulation	33
3.3.2	Induzierbarkeit von hsp70 nach Th2-Stimulation	34
3.3.3	Induzierbarkeit von hsp70 nach TH1/Th2-Stimulation	35
4.	Diskussion	36
4.1	Einführung	36
4.2	Unterschied der Induzierbarkeit von hsp70 beim längermanifesten versus neumanifesten Typ-I-Diabetes	36
4.2.1	Die genetische Ebene	38

4.2.2	Die metabolische Ebene	39
4.2.3	Die immunologische Ebene	40
4.3	Effekt von Th1/Th2-Zytokinen auf die Expression von hsp70	41
4.4	Abschliessende Betrachtung zur Rolle von hsp70 beim Typ-I-Diabetes	42
5.	Zusammenfassung	45
6.	Literaturverzeichnis	46
7.	Danksagungen	56
8.	Lebenslauf	57

Abkürzungsverzeichnis

ATP	AdenosinTriPhosphat
BB-Ratte	Bio-Breeding-Rat
CD	Cluster of Differentiation
DNA	DesoxyRiboNucleid Acid
dp	diabetes-prone
dr	diabetes-resistant
ECL	Enhanced Chemi Luminescence
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GAD	Glutamatdecarboxylase
GM-CSF	Granulocyte-Monocyte-Colony Stimulating Factor
GRP	Glucose Reguliertes Protein
HLA	Human Leucocyte Antigen
HSF	Heat Shock Factor
HSP	Heat Shock Protein
IAA	Insulin Auto Antibody
ICA	Islet Cell Antibody
IDDM	Insulin Dependent Diabetes Mellitus
IFN	Interferon
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ISRE	Interferon- γ -Stimulated Response Element
kb	kilo base
kD	kilo Dalton
LPS	LipoPolySaccharid
M-CSF	Monocyte-Colony Stimulating Factor
MHC	Major Histocompatibility Complex
NK-Zellen	Natural Killer Zellen
NO	Nitric Oxide
NOD-Maus	Non Obese Diabetic Maus
RIN-Zellen	Rat Insulinoma-Zellen
ROI	Reactive Oxygen Intermediate
TGF	Transforming Growth Factor

1. Einleitung

1.1 Typ-I-Diabetes mellitus

Beim Typ-I-Diabetes (Synonym: insulinabhängiger Diabetes mellitus, IDDM) handelt es sich nach gegenwärtiger Vorstellung um eine immunmedierte Erkrankung multifaktorieller Genese. Pathogenetisch stellt sich die Erkrankung als ein chronisch-progredientes, immunologisch vermitteltes Leiden dar, deren pathomorphologisches Substrat die zerstörte Insulin-produzierende Betazelle in den Langerhansschen Inseln des Pankreas ist (**Rossini et al., 1993**). Als ursächlich an diesem Prozess beteiligt werden Umwelt- und polygenetische Faktoren (multifaktorielle Genese, s.o.) angesehen (**Castano und Eisenbarth, 1990**).

Anders als der Typ-II-Diabetes (sog. Altersdiabetes) handelt es sich beim Typ-I-Diabetes um eine eher seltene Erkrankung deren Anteil an den Gesamtdiabetikern bei etwa 10-15% liegt (**Kolb, 1997**).

Der Manifestation des Typ-I-Diabetes geht ein oft jahrelanger, chronischer Entzündungsprozess der Inseln des Pankreas voraus. Ein absoluter Insulinmangel, durch den sich die Erkrankung manifestiert, kommt aber meist erst nach einer Zerstörung von mehr als 80 - 90% der Betazellen vor.

Die Patienten stellen sich typischerweise mit den Symptomen Polyurie, Polydipsie, körperlicher Abgeschlagenheit und Gewichtsabnahme vor. Der Mangel an Insulin führt zu einer Stoffwechselentgleisung, die unbehandelt von letalem Ausgang ist. Der Stoffwechsel kann durch die lebenslange Substitution von Insulin stabilisiert, wenn auch nicht vollständig normalisiert werden, da der natürlich Sekretionsrhythmus von Insulin nur unvollkommen nachgeahmt werden kann. Infolgedessen kommt es bei vielen Patienten zu diabetischen Folgeerkrankungen wie massive Arteriosklerose und Arteriolsklerose, diabetischer Makro- und Mikroangiopathie, um nur einige die Lebenserwartung verkürzende Schädigungen zu nennen. Speziell die diabetische Mikroangiopathien, zu der die Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie gezählt werden (**Wilson et al., 1991; Siegenthaler et al., 1987; Herold et al., 1997**) sind bisher therapeutisch nur unzureichend beeinflussbar.

Die kausale Pathogenese des Typ-I-Diabetes ist bis heute nur unzureichend geklärt. Bereits 1940 beschrieb **Meyenburg** eine Infiltration von Langerhansschen Inseln durch mononukleäre Zellen und prägte den Begriff „Insulitis“. Die Annahme, nach der es sich dabei um einen Autoimmunprozess mit einer vorwiegend selektiven Zerstörung der Betazellen des Pankreas handelt (**Eisenbarth, 1986**), wird unterstützt durch das

Vorhandensein von inselzellspezifischen Autoantikörpern (ICA) (**Botazzo et al., 1974**) die schon lange vor der Manifestation der Krankheit nachweisbar und im Serum von Patienten mit frischmanifestem Typ-I-Diabetes bei bis zu 90% der Fälle auffindbar sind. Ebenso können häufig Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase (GAD) und im Kindesalter auch gegen Insulin (IAA) (**Palmer et al., 1983**) nachgewiesen werden. Als weitere Grundlage der Erkrankung konnte eine genetische Prädisposition in der HLA-D-Region mit den Haplotypen DR3 und / oder DR4 gezeigt werden (**Nerup et al., 1987**). Dennoch beträgt die Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen nur 30-40% (**Zielaseck et al. 1989**), was darauf schließen lässt, dass andere Faktoren ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Pathogenese spielen müssen. Hierfür wurden virale oder auch bakterielle Infektionen ebenso wie andere Umweltfaktoren (**Kolb, 1997**) in Betracht gezogen, so dass man heute von einer multifaktoriell bedingten Erkrankung sprechen kann.

1.2 Immunologie und Pathomechanismen des Typ-I-Diabetes

Bekannt ist, dass an der jahrelangen, vorwiegend selektiven Zerstörung der Betazellen des Pankreas Inselzell-Antigen spezifische T-Helfer Lymphozyten beteiligt sind. Ein tierexperimentelles Modell dieses Prozesses haben Studien an nicht adipösen diabetischen Mäusen (NOD-Mäuse) hervorgebracht, das die Vorgänge bei der Entstehung des Typ-I-Diabetes in verschiedene Phasen einteilt:

1. Die Peri-Insulitis in den ersten 4-10 Wochen nach der Geburt, gekennzeichnet durch eine Ansammlung von Makrophagen, dendritischen Zellen und B- sowie T-Lymphozyten.
2. Die Intra-Insulitis mit Infiltration der Langerhansschen Inseln durch die oben genannten Zellen.
3. Die Manifestation des Diabetes nach Zerstörung von 80 – 90% der gesamten Beta-zellmasse.

Entscheidender Faktor ist das Erkennen von Betazell-Antigenen in der zweiten Phase (**Wicker et al., 1992**), wobei in dieser frühen Phase nur wenige Autoantigene erkannt werden (**Kaufmann et al., 1993; Tisch et al., 1993**).

Funktion und Bedeutung von Makrophagen in der Pathogenese des Typ-I-Diabetes konnten in den achtziger Jahren durch tierexperimentelle Studien näher untersucht werden. So konnte zum Beispiel durch die Behandlung mit Silika, einer selektiv Makrophagen-toxischen Substanz (**Zimmermann et al., 1986**), die Entstehung des Diabetes in allen wichtigen diabetischen Tiermodellen verhindert werden (**Oschilewski et al., 1985; Kiesel et al., 1986; Charlton et al., 1988; Oschilewski et al., 1986**).

Makrophagen spielen als multifunktionale Immunzellen eine essentielle Rolle bei Immunreaktionen durch Produktion verschiedener immunmodulierender Faktoren. Entscheidend hierfür ist die Fähigkeit der Makrophagen, nach Aktivierung unterschiedliche Mediatoren, z. B. Zytokine, reaktive Radikale wie Sauerstoffintermediate und Stickstoffmonoxid zu bilden und die Präsentation von T-Zellantigenen an ihrer Oberfläche.

Die Rolle von Makrophagen als prädominante Immunzellen der Initialphase, die für die weitere Infiltration der Langerhansschen Inseln mit T- / B-Lymphozyten und NK-Zellen verantwortlich sind, konnte in morphologischen Studien im diabetischen Tiermodell nachgewiesen werden (**Kolb et al., 1990; Lee et al., 1988; Hanenberg et al., 1989**). **Kolb-Bachofen et al. (1988)** beschrieben diese frühe Phase der Makrophagen – Infiltration 1983 als „single-cell-insulitis“.

Eine spontane Zytotoxizität von aktivierten Makrophagen gegenüber Inselzellen wurde in *in vitro*-Experimenten gezeigt (**Appels et al., 1989**), vermittelt durch humorale Sekretionsprodukte und nicht über direkte Zell-Zell-Kontakte (**Kröncke et al., 1991**). Eine zentrale Rolle bei der Schädigung der Beta-Zellen kommt hier Zytokinen zu, insbesondere dem inselzelltoxischen Interleukin-1 (IL-1) (**Mandrup-Poulsen et al., 1985; Nerup et al., 1988; Pukel et al., 1988**).

Auch der Tumornekrosefaktor α (TNF- α) ist hierbei möglicherweise von Bedeutung. Untersuchungen zeigen, dass NOD-Mäuse, die von Geburt an TNF- α in ihren Inselzellen produzieren, eine aggressivere und frühere Infiltration der Inseln mit Immunzellen entwickeln (**Green et al., 1999**).

Von Makrophagen produzierte reaktive Sauerstoffintermediate (ROI) scheinen ebenfalls eine Rolle bei der Diabetesentwicklung zu spielen, da sie, wie von **Burkart et al. (1992)** gezeigt, in der Lage sind, Inselzellen zu zerstören. Dafür spricht ebenfalls die besondere Anfälligkeit von Inselzellen für die toxischen Effekte von ROI, da sie nur ein geringes Radikalfänger-potential aufweisen (**Grankvist et al., 1981; Malaisse et al., 1982**). Auch an den toxischen Effekten von IL-1 und TNF- α scheinen ROI beteiligt zu sein, da sie durch Radikalfänger verhindert werden können (**Sumoski et al., 1989**). Zudem konnte an Makrophagen von BB-Ratten eine erhöhte Produktion von ROI nachgewiesen werden (**Brenner et al., 1993**).

Ein weiteres Produkt von aktivierten Makrophagen ist das oben schon kurz erwähnte Stickstoffmonoxid (NO) (**Kröncke et al., 1991**), das *in vitro* als dominantes Inseltoxin identifiziert wurde, da auch die toxische Wirkung des proinflammatorischen IL-1 primär durch NO vermittelt zu werden scheint (**Southern et al., 1990; Corbett et al., 1992**).

1.3 Hitzeschockproteine

1.3.1 Übersicht

Bei den Hitzeschockproteinen (hsps) handelt es sich um eine Familie evolutionär konservierter Proteine mit vielfältigen physiologischen Funktionen innerhalb der Zelle. Hierzu gehören der Schutz in Stresssituationen (Hitze- oder oxidativer Stress) und eine Rolle beim Proteintransport und der Proteinfaltung (molekulare Chaperone, **Ellis et al., 1989**). Interessanterweise findet sich eine vermehrte Expression von Hitzeschockproteinen auch bei immunmedierten Erkrankungen (**Übersicht: Jäättelä und Wissing, 1992**).

Hitzeschockproteine wurden erstmals 1962 von Ritossa bei *Drosophila melongaster* beschrieben, ähnliche Befunde wurden dann seit 1980 bei Prokaryonten wie *E.coli* über Eukaryonten wie Hefen bis hin zu menschlichen Zellen erhoben.

Die Klassifikation der Hitzeschockproteine erfolgt normalerweise über ihr Molekulargewicht, zu den Hauptfamilien der Hsps gehören Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60 und die sogenannten kleinen Hsps (**Leung und Gershwin, 1991**).

Die folgenden Ausführungen beziehen sich vornehmlich auf die Hitzeschockproteine der 70 kD-Familie, da diese in der folgenden Arbeit genauer untersucht wurden.

1.3.2 Hsp70

Zur hsp70-Familie zählt man heute vier verschiedene Hitzeschockproteine mit den Molekulargewichten 72 kD, 73 kD, 75 kD und 78 kD. Alle Proteine dieser Familie sind in der Lage, mit hoher Affinität ATP zu binden und besitzen selbst eine schwache ATPase-Aktivität (**Rothman, 1989**). Einige Mitglieder der hsp70-Familie sind durch Stress induzierbar, während andere konstitutiv in der Zelle vorhanden sind (**Übersicht: Craig, 1985**), außerdem können die Proteine anhand ihrer Lokalisation in verschiedenen zellulären Kompartimenten unterschieden werden (**Welch und Feramisco, 1985**).

Im endoplasmatischen Retikulum findet sich ein weiterer Vertreter der hsp70-Familie, das GRP78. GRP78 interagiert mit den schweren Ketten der Immunglobuline (**Haas und Wabl, 1983**).

In Säugerzellen unterscheidet man ein durch Stress induzierbares hsp72 (=hsp70) von dem konstitutiv im Zytosol und Nukleus exprimierten hsp73 (=hsc70). Beide Proteine unterscheiden sich kaum in ihren biochemischen Eigenschaften und besitzen eine strukturelle Homologie von 95% (**Welch, 1992**). Hsp72 ist der am stärksten induzierbare Vertreter aller Hitzeschockproteine (**Hunt und Morimoto, 1985**) und ist wie hsp73 an vielen Aspekten der Proteinreifung beteiligt.

Eine wesentliche Funktion von zytosolischem hsp70 besteht in der Beteiligung an der ATP-abhängigen posttranskriptionellen Translokation von Proteinen aus dem Zytosol in das endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien (**Chirico et al., 1988; Deshaies et al., 1988**).

Weitere Untersuchungen haben eine vorübergehende Komplexbildung von hsp70 mit neusynthetisierten Proteinen zum Zeitpunkt der Proteinsynthese an den Ribosomen gezeigt (**Beckmann et al., 1990**).

Diese Untersuchungen führten zu der Annahme, dass die Hitzeschockproteine der hsp70-Familie in verschiedene Aspekte der Proteinreifung involviert sind und hierbei eine essentielle Rolle einnehmen (**Welch, 1992**), woraus sich auch eine mögliche Erklärung der vermehrten Expression von hsp70 in zellulären Stresssituationen ergibt: hierdurch wird der Zelle eine adäquate Reaktion auf physiologische Belastungen erst möglich, wenn man davon ausgeht, dass das Hauptziel zellulären Stresses neusynthetisierte, bzw. in der Proteinsynthese befindliche Proteine sind. Hierfür spricht auch die hohe Konzentration von hsp70 im Nucleus, bzw. Nucleolus hitzegeschockter Zellen (**Pelham, 1984; Velazquez und Lindquist, 1984; Welch und Feramisco, 1984**).

1.3.3 Regulation der hsp70-Expression

Als auslösende Stressoren der hsp70-Synthese sind u.a. erhöhte Temperaturen (**Lindquist und Craig, 1988**), Aminosäureanaloga (**Goff und Goldberg, 1987; Kelley und Schlesinger, 1978**), Virusinfektionen (**Nevins 1982**) und verschiedene Schwermetalle (**Wu et al., 1986**) bekannt.

Die schnelle und vorübergehende Induktion der Synthese von Stressproteinen erfolgt durch Regulation auf der Transkriptionsebene unter hauptsächlichlicher Kontrolle eines konstitutiv exprimierten Hitzeschocktranskriptionsfaktors, kurz HSF1 (**Rabindran et al., 1991**). Der HSF1 liegt in Säugerzellen in einer inaktiven Form vor, die nach Einwirkung eines Stressors durch Änderung der Tertiärstruktur im Zellkern akkumuliert und phosphoryliert wird. Nach Bindung des aktivierten HSF1 an regulatorische DNA-Motive im Bereich der 5'-Enden der hsp-Gene, sogenannte Hitzeschockelemente (**Amin et al., 1988**) kommt es zur Initiierung der Transkription der Hitzeschockproteine (**Morimoto et al., 1992; Morimoto 1998**).

Davon zu unterscheiden ist die Regulation der Stressgenexpression während des Zellzyklus und bei Differenzierungs-, bzw. Entwicklungsvorgängen der Zelle.

Hauptverantwortlich hierfür scheint der HSF2 (**Schuetz et al., 1991**) zu sein, der nicht durch Stress, sondern durch Denaturierungsprozesse, assoziiert mit Entwicklung und Differenzierung, aktiviert wird (**Sistonen et al., 1994**).

Die DNA-Bindungsaktivität eines weiteren Transkriptionsfaktors, des HSF3, muss, ähnlich wie bei HSF1, induziert werden, erfordert aber andere Aktivierungsmechanismen (**Nakai und Morimoto, 1993**).

Zwischen HSF1 und hsp70 wurden außerdem ATP-abhängige Interaktionen im Sinne einer negativen Rückkopplung beschrieben (**Abravaya et al., 1992**).

1.3.4 Hitzeschockproteine, Immunologie und Autoimmunologie

Besondere Aufmerksamkeit verlangt die Rolle der Stressantwort aufgrund ihrer Verbindungen zur Immunantwort des Organismus.

Es ist bekannt, dass verschiedene Zytokine die Expression und/oder Phosphorylierung unterschiedlicher Hitzeschockproteine in verschiedenen weißen Blutzellen beeinflussen (**Ferris et al., 1988, Helquist et al., 1991**). So zeigen beispielsweise B-Zellen nach Aktivierung über ihren Antigen-Rezeptor eine vermehrte Expression von Stressproteinen einhergehend mit einer erhöhten Thermotoleranz (**Spector et al., 1989**).

Außerdem scheinen insbesondere Mitglieder der hsp70-Familie in die MHC-medierte Antigenpräsentation eingebunden zu sein, da hsp70-Proteine, wie die MHC-Klasse I- und II –Komplexe, kleine Peptide mit einer Bindungsstelle binden, die der entsprechenden Bindungsstelle der MHC-Komplexe sehr ähnlich ist (**Rippman et al., 1991**). Unterstützt wird diese Annahme außerdem durch die Lage der die hsp70 kodierenden Gene im Genlokus der MHC-Komplexe (Übersicht: **Günther, 1991; Pierce, 1994**).

Stressproteine stellen außerdem selbst Ziele für die Immunantwort dar. Die Expression mikrobieller Stressproteine wird nach Übertragung der Mikroorganismen auf den Wirt durch Temperaturänderung oder Produkte der Immunzellen des Wirtes induziert. Einige dieser Stressproteine stellen dann selbst ein wichtiges Ziel sowohl für B-, als auch für T-Zellreaktionen dar.

Aufgrund der evolutionär stark konservierten Aminosäurestruktur der Hitzeschockproteine könnte hier ein Mechanismus bestehen, der eine mögliche Rolle der hsps bei der Entwicklung autoimmunologischer Phänomene erklärt:

So reagieren zum Beispiel T-Zellklone von Patienten mit rheumatoider Arthritis mit mykobakteriellem hsp60 (**Res et al., 1988**). Aufgrund der hohen Homologie zu humanem hsp60 könnte es im Sinne einer molekularen Mimikry zu einer Kreuzreaktion gegen humanes hsp und damit zur Überwindung der Immunantwort kommen.

Außerdem ist das Vorkommen autoreaktiver Antikörper gegen hsps bei Patienten mit anderen immunologischen Erkrankungen, z.B. systemischem Lupus erythemathodes, ankylosierender Spondylarthritis und Morbus Crohn beschrieben worden (Übersicht: **Winfield und Jarjour, 1991**). Inwieweit solche autoimmunologischen Phänomene direkt

mit der Entwicklung der entsprechenden Krankheiten in Zusammenhang stehen, ist jedoch noch nicht ausreichend untersucht worden.

1.3.5 Hitzeschockproteine und Typ-I-Diabetes

Unterschiedliche Untersuchungen brachten in den 90er Jahren die Hitzeschockproteine in einen möglichen pathogenetischen Zusammenhang mit dem Typ-I-Diabetes.

So wurden bei Untersuchungen von NOD-Mäusen Autoantikörper und gegen hsp60 gerichtete, autoimmune T-Zellen gefunden, die mit dem hsp65-Molekül der Mykobakterien kreuzreagierten (**Elias et al., 1995; Birk et al., 1996**).

Weitere Analysen identifizierten hierbei als dominantes Epitop ein 24-Aminosäuren (Position 437-460) umfassendes Segment, das Peptid p277, das von einem pathogenen T-Zellklon der NOD-Mäuse erkannt wird. Humanes und murines p277 unterscheiden sich in nur einer Aminosäure und sind kreuzreaktiv.

Interessanterweise kann Vakkzinierung mit dem p277 auch in Mausstämmen, die sonst nicht zur Entwicklung eines Diabetes neigen, eine transiente Hyperglykämie und Insulitis hervorrufen (**Elias et al., 1995**).

Auch die Induktion der Entwicklung eines Diabetes bei C57/Bl/KsJ-Mäusen durch eine Niedrigdosis Streptozotocin-Behandlung geht mit der Ausbildung von Autoantikörpern gegen hsp60 und gegen p277 reaktiven T-Zellklonen einher (**Elias et al., 1994**).

Andere Untersuchungen konzentrierten sich auf die Rolle des Hitzeschockproteins hsp70 im Zusammenhang mit dem Typ-I-Diabetes.

So zeigten Untersuchungen, dass Interleukin-1 in isolierten Inselzellen des Pankreas der Maus und der Ratte zu einer Induktion der hsp70-Synthese führt (**Eizirik et al., 1990; Welsh et al., 1991**).

Eine mögliche protektive Funktion der hsps bei der Insulitis zeigten in vitro-Experimente an

kultivierten Inselzellen der Ratte: hier erhöhte Hitzeschockbehandlung, und damit die vermehrte Expression induzierbarer hsps, signifikant die Widerstandsfähigkeit der Zellen gegen typische Inselzelltoxine wie NO, Sauerstoffradikale und Streptozotocin (**Bellmann et al., 1995**). Ergänzende Untersuchungen konnten später diesen Effekt eindeutig dem Hitzeschockprotein hsp70 zuordnen, da durch Transfektion mit dem hsp70-Gen zur Überexpression von hsp70 gebrachte RINm5F-Zellen eine ebenso erhöhte Resistenz gegenüber der zytotoxischen Wirkung von NO zeigten, wie Hitzeschock-vorbehandelte, nicht transfizierte Zellen der gleichen Linie (**Bellmann et al., 1996**).

Untersuchungen von Inselzellen verschiedener Rattenstämme zeigten schließlich eine eingeschränkte Induzierbarkeit von hsp70 bei diabetes-prone (dp)BB-Ratten im

Gegensatz zu diabetes-resistent (dr)BB-Ratten und anderen, ebenfalls nicht-diabetischen Stämmen.

Diese eingeschränkte Induzierbarkeit der Stressantwort geht einher mit einer erhöhten Vulnerabilität der Inselzellen der dpBB-Ratten für Inselzelltoxine wie NO und Streptozotocin (**Bellmann et al., 1997**).

Ein weiteres interessantes Phänomen zeigen Untersuchungen von **Chen et al., (1999)**: Hier wurde durch Stimulation mit hsp70 die NO-Produktion in Makrophagen induziert. Beim Menschen konzentrierten sich vorliegende Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen auf die genetische Variabilität von hsp70 im Zusammenhang mit dem Typ-I-Diabetes:

In Analysen von hsp70-Allelen konnte bei Japanern keine Assoziation mit dem Vorhandensein eines Typ-I-Diabetes festgestellt werden (**Kawaguchi et al., 1993**), zwei weitere Studien (**Caplen et al., 1990; Pugliese et al., 1992; Chuang et al., 1996**) wiesen jedoch Unterschiede zwischen Patienten mit Typ-I-Diabetes und Normalpersonen nach.

1.4 Das Th1/Th2-Modell der T-Helferzellen

Der Begriff T-Helferzellen umfasst alle T-Zellen, die anderen Zellen des Immunsystems bei der Ausübung ihrer speziellen Funktionen zur Hilfe kommen. Hierzu zählen zum Beispiel die Aktivierung von Makrophagen und deren Konditionierung zum Abtöten intrazellulärer Mikroorganismen, die Bildung zytotoxischer T-Zellen und die Induzierung der Antikörperantwort.

Die meisten T-Helferzellen exprimieren an ihrer Oberfläche den CD4⁺-Proteinkomplex, während zytotoxische T-Zellen CD8⁺ positiv sind.

Das Th1/Th2-Modell der T-Helferzellen (**Mosmann und Coffman, 1989**) basiert auf der Beobachtung, dass eine antigen-spezifische Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen zwei scheinbar gegensätzliche biologische Folgen haben kann: die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (Th1-Phänotyp) oder die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine (Th2-Phänotyp).

1.4.1 Der Th1-Subtyp

Th1-Zellen (Syn.(pro-)inflammatorisch wirksame T-Helferzellen) fördern die polyklonale, nicht antigen-spezifische B-Zellantwort, besitzen darüber hinaus selbst zytolytische Aktivität und vermögen einen Teil der Immunglobulinproduktion zu supprimieren (funktionelle T-Suppressor-Zelle). Th1-Zellen sezernieren vor allem die Zytokine

Interleukin-2, Interferon- γ , TNF- β sowie GM-CSF. Ausgeprägte Entzündungsvorgänge, die auch das Abtöten intrazellulärer Erreger ermöglichen, werden vor allem durch die Aktivierung von Makrophagen induziert.

Auch führen Th1-Zytokine, wie zum Beispiel Interferon- γ zu einer Behinderung von Th2-Zellen und im Sinne einer positiven Rückkopplung (IL-2) zu einer positiven Verstärkung der eigenen Subpopulation.

1.4.2 Der Th2-Subtyp

Th2-Zellen unterstützen dagegen sowohl die polyklonale als auch die spezifische B-Zell-Antwort („klassische“ T-Helferzellen). Die klonale Expansion von Th2-Zellen scheint, im Gegensatz zu Th1-Zellen, offenbar essentiell von Interleukin-1 abhängig zu sein.

Th2-Zellen bilden vor allem die Zytokine Interleukin-4 und Interleukin-5. Das ebenfalls von Th2-Zellen gebildete Interleukin-10 behindert die Makrophagenaktivierung und führt damit zur ausgeprägten Immunsuppression, während Interleukin-4 wiederum im Sinne der positiven Rückkopplung zur Verstärkung der Th2-Subpopulation führt.

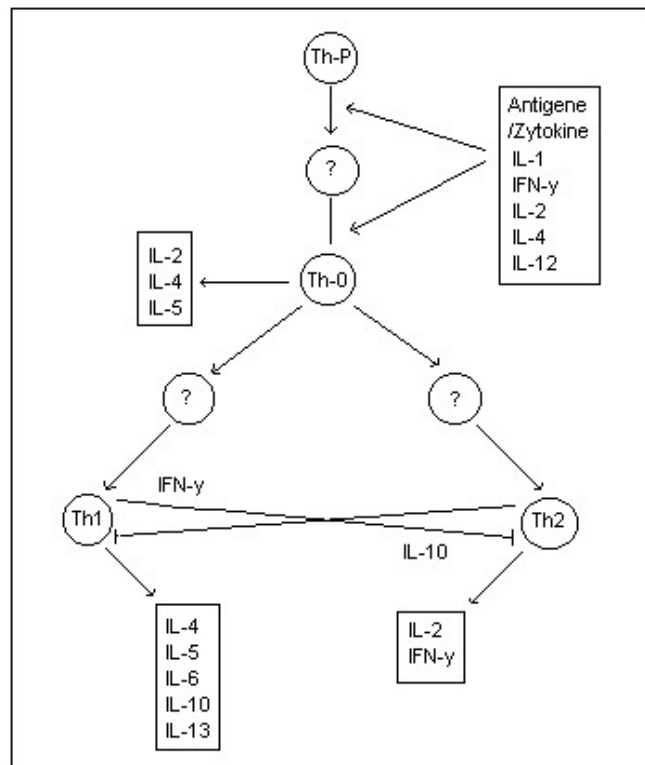


Abb. 1: Mögliche Differenzierung von CD4⁺-T-Helferzellen.
 Thx =Vorläuferzelle; Th-0=Ausgangszelle der T-Helferzelle;
 (nach: Immunologie, Thieme, 1997)

Im folgenden sollen nun die in der Arbeit verwendeten Zytokine Interferon- γ , Interleukin-4 und der transforming growth factor- β einer näheren Betrachtung unterzogen werden.

1.4.3 Interferon- γ

Interferone sind antivirale Proteine, die erstmals 1957 von **Isaacs und Lindemann** in virusinfiziertem Gewebe beschrieben wurden. Man unterscheidet drei verschiedene Interferonarten, IFN- α , IFN- β und IFN- γ , die sich in ihrer Größe, Funktion und ihrem Bildungsort unterscheiden.

IFN- γ , früher auch als Typ-II- oder Immuninterferon bezeichnet, ist ein Protein aus 166 Aminosäuren, zu dessen Aktivierung eine Signalsequenz von 23 Aminosäuren abgespalten wird. Es existiert in zwei biologisch aktiven Formen von 20 bzw. 25 kDa, die sich in ihrer Glykolysierung voneinander unterscheiden. Homologien zu IFN- α oder IFN- β bestehen nicht. Das humane Gen für IFN- γ wurde auf Chromosom 12 lokalisiert, das Genprodukt wird sowohl von CD4- als auch CD8-positiven T-Zellen und NK-Zellen nach Aktivierung durch Antigene und Zytokine wie IL-2 produziert.

Neben der antiviralen Aktivität haben sich insbesondere für IFN- γ immunmodulatorische Wirkungen als sehr bedeutsam herausgestellt. IFN- γ ist das erste Signal aus Lymphozyten, das Makrophagen für sekundäre Signale wie TNF- α , IL-1 oder LPS sensibilisiert, wodurch innerhalb kurzer Zeit ein extrem hoher Anstieg der Immunantwort erzielt werden kann. Weiterhin erweist sich IFN- γ , wie oben bereits erwähnt, durch Hemmung der IL-4-induzierten Proliferation von B-Lymphozyten als Antagonist für die überwiegend durch Th2-Lymphozyten gesteuerte IgG- und IgE-Synthese.

Eine weitere wichtige Rolle von IFN- γ ist bei der Entstehung zytotoxischer T-Lymphozyten beschrieben worden: Durch eine Steigerung der Expression der Histokompatibilitätsantigene der Klassen I und II wird die Funktion der T-Helferzellen und damit die Funktion der Klasse-I-Antigen erkennenden zytotoxischen T-Zellen reguliert (**Pestka et al., 1987**).

Vermittelt werden die vielfältigen Möglichkeiten der Wirkung von IFN- γ durch „IFN- γ -stimulated response elements“ (ISRE), die Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im Bereich der Promotorregion vieler Gene darstellen.

1.4.4 Interleukin-4

Erstmals wurde Interleukin-4 (IL-4) als B-Zell-stimulierender Faktor (BSF-1) beschrieben, der in der Lage ist, B-Lymphozyten aus der Ruhephase in die Proliferationsphase des Zellzyklus zu überführen.

IL-4 ist ein Polypeptid aus 153 Aminosäuren mit einer Signalsequenz von 24 Aminosäuren. Der Genort von IL-4 liegt eng benachbart zu den Genen für GM-CSF, M-CSF, IL-3 und IL-5 auf Chromosom 5. Die Wirkung von Interleukin-4 wird durch einen Rezeptor mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kD vermittelt.

Für Interleukin-4 sind mittlerweile neben der oben genannten Aktivierung des Zellzyklus vielfältige weitere biologische Wirkungen beschrieben, so z. B. die Steigerung der Expression von MHC-Klasse-II-Antigenen auf B-Lymphozyten, die Steigerung der Expression des FcR II für IgE und eine Steigerung der Proliferation und IgG/IgE-Sekretion vorstimulierter B-Zellen.

Interleukin-4 wird hauptsächlich von den für B-Lymphozyten wirksamsten T-Helferzellen, den Th2-Zellen produziert.

Weiter wurde IL-4 beschrieben als Wachstumsfaktor für T-Lymphozyten und Kostimulator für Thymuszellen. Außerdem hemmt es die IL-2 vermittelte Aktivierung von NK-Killerzellen und die Produktion von $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ durch Makrophagen.

1.4.5 Transforming Growth Factor β (TGF- β)

Der Transforming Growth Factor β (TGF- β) ist ein in 5 Isoformen (TGF- β_{1-5}) existierendes Protein, dessen biologisch aktive Form ein Homodimer von 25 kD ist. Die überwiegende Isoform ist das TGF- β_1 . TGF- β ist in verschiedenen Spezies stark konserviert und weist Sequenzhomologien von > 98% auf. Interessanterweise werden die verschiedenen Isoformen von TGF- β in Genen kodiert, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Das humane TGF- β_1 -Gen befindet sich auf Chromosom 19.

TGF- β wird von Thrombozyten, Lymphozyten, Makrophagen, Keratinozyten und Endothelzellen gebildet und hat vielfältige sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Einflüsse auf die Proliferation und Differenzierung von Zellen.

Die Wirkung von TGF- β wird durch Rezeptoren vermittelt, die an nahezu allen normalen Zellen zu finden sind, man unterscheidet verschiedene Rezeptortypen mit Molekulargewichten von 65-280 kD. Die Affinität von TGF- β zu seinen Rezeptoren ist hoch.

Im Bereich des Immunsystems dient TGF- β wahrscheinlich als negatives Rückkopplungssignal, das durch Hemmung der IL-2-Rezeptoren-induzierenden Wirkung von IL-2 die überschüssige klonale Expansion von T-Zellen verhindert und die IL-1-abhängige Proliferation von Lymphozyten hemmt. Ebenso kann TGF- β die Differenzierung von B-Lymphozyten in Immunglobulin-produzierende Plasmazellen verhindern und NK-Zellen in ihrer Funktion behindern.

1.5 Das TH1/Th2-Modell beim Typ-I-Diabetes

Den zahlenmäßig größten Anteil an Immunzellen in der Langerhansschen Insel des Pankreas während der die Betazellen zerstörenden Insulitis bilden die T-Lymphozyten (**Foulis et al., 1991**). Eine pathogenetische Bedeutung der gegen Betazellen gerichteten Autoantikörper erscheint eher unwahrscheinlich, da Übertragungen von Patientenserum oder Immunglobulinen auf Mäuse im Experiment keine Inselbeschädigungen verursachen konnten.

Auch in den gebräuchlichen Tiermodellen, der NOD-Maus, dem Niedrigdosis-Streptozotocin-Diabetes der Maus und der BB-Ratte sprechen vorliegende Befunde für eine primäre Beteiligung von Makrophagen und T-Lymphozyten.

Untersuchungen der Zytokin-Sekretionsmuster im Pankreas der BB-Ratte zeigten einen Beginn der Infiltration von Langerhansschen Inseln mit mononukleären Zellen in einem Alter der Tiere von 70 Tagen, der assoziiert war mit einer vermehrten Produktion von IFN- γ und einer verminderten Expression von TGF- β (**Kolb et al., 1996**). Diese Ergebnisse zeigen eine Verschiebung der TH1/Th2-Balance in Richtung Th1 im Anfangsstadium der Insulitis bei der BB-Ratte.

Die Analyse von Zytokin-Sekretionsmustern an für Typ-I-Diabetes mellitus diskordanten, monozygoten, Zwillingen zeigte ähnliche Ergebnisse:

Nach Inkubation von peripheren Blutzellen mit dem Hitzeschockprotein hsp60 ergab sich kein Unterschied in der Höhe der Th1-Antwort (IFN γ), jedoch eine signifikant höhere Sekretion von Th2-Zytokinen (IL-10) bei den gesunden Zwillingen im Gegensatz zu ihren erkrankten Geschwistern (**Kallmann et al., 1999**).

1.6 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst durch eine vergleichende Analyse der Stressantwort untersucht werden, ob Unterschiede in der basalen Expression oder der Induzierbarkeit von Hitzeschockproteinen zwischen Diabetikern und gesunden Kontrollpersonen bestehen, wie es die Ergebnisse von **Bellmann et al. 1997** für BB-Ratten und nicht-diabetische Rattenstämme gezeigt haben.

Außerdem sollte in einem in-vitro Modell ein möglicher immunologischer Einfluss auf die Stressantwort von Zellen untersucht werden, der eine mögliche Erklärung nicht genetisch bedingte Unterschiede derselben darstellen könnte.

2. Material und Methoden

2.1 Material und Geräte

2.1.1 Patienten und Kontrollpersonen

2.1.1.1 Patienten mit längermanifestem Typ-I-Diabetes

Untersucht wurden 8 Patienten (4 männlich, 4 weiblich), die zum Zeitpunkt der Untersuchung zwischen 47 und 20 Jahre alt waren. Die Diabetesdauer lag zwischen 8 Monaten und 10 Jahren. Alle Patienten dieser Gruppe hatten das DDFI zur Neueinstellung ihrer Insulintherapie aufgesucht. Die HbA1c-Werte lagen bei 5 von 8 Patienten unter 9%, diabetische Folgeerkrankungen wie Polyneuropathie, Nephropathie und Retinopathie bestanden bei 4 Patienten.

Dieser Gruppe wurden 8 gesunde Kontrollpersonen (5 männlich, 3 weiblich) im Alter zwischen 23 und 46 Jahren zugeordnet. Weißes Blutbild und Differentialblutbild wurden bei allen Kontrollpersonen überprüft und lagen im Bereich der Normalwerte.

Patient	Leukozyten	HbA1c	Aceton i.U.	Azidose (pH<7.35)	Folgeerkrankungen	Iddm seit (Jahre)	Grund d. stat. Aufenthaltes
I	<10 000	8.4%	neg	nein	nein	10	Neueinstellung
II	<10 000	12.7%	neg	nein	ja	5	Neueinstellung
III	<10 000	6.8%	neg	nein	nein	<1 (8 mon)	Neueinstellung
IV	<10 000	7.8%	neg	nein	nein	4	Neueinstellung
V	<10 000	10.1%	neg	nein	ja	5	Neueinstellung
VI	<10 000	8.6%	neg	nein	ja	7	Neueinstellung
VII	<10 000	9.6%	neg	nein	nein	8	Neueinstellung
VIII	<10 000	8.1%	neg	nein	ja	6	Neueinstellung

Tab. 1: Patienten mit längermanifestem Typ-I-Diabetes.

2.1.1.2 Patienten mit neumanifestem Typ-I-Diabetes

Untersucht wurden 8 Patienten (5 männlich, 3 weiblich) im Alter zwischen 18 und 36 Jahren, die das DDFI zum Zeitpunkt der Neumanifestation eines Typ-I-Diabetes aufsuchten.

Bei 2 Patienten fand sich zum Zeitpunkt der Untersuchung eine leichtgradige Leukozytose bis 12 000/μl. Bei allen ließ sich Aceton im Urin nachweisen, 6 zeigten außerdem einen Blut-pH-Wert von <7.35 im Sinne einer Ketoazidose. Die HbA1c-Werte waren bei allen

Patienten bis maximal 12.9% erhöht. Bei 5 Patienten konnten ICA-Autoantikörper nachgewiesen werden, GAD-Antikörper fanden sich in 3 Fällen. Fettwerte und übrige Laborparameter befanden sich bei allen Patienten im Normbereich.

Patient	Leukozyten	HbA1c	Aceton i.U.	Azidose (pH<7.35)	ICA	GAD
I	12000	12.9%	pos	ja	pos	neg
II	9900	12.1%	pos	ja	pos	neg
III	5100	12.7%	pos	ja	k.A.	k.A.
IV	7300	11.5%	pos	ja	neg	neg
V	11200	10.0%	pos	ja	neg	pos
VI	5800	10.9%	pos	nein	pos	pos
VII	4700	11.0%	pos	nein	pos	neg
VIII	6300	10.8%	pos	ja	pos	pos

Tab. 2: Patienten mit neumanifestem Typ-I-Diabetes

ICA = Inselzellantikörper; GAD = Glutamatdecarboxylase-Antikörper

6 Patienten dieser Gruppe wurden eine Woche nach der Neumanifestation nochmals untersucht, zu diesem Zeitpunkt fand sich bei einer Patientin weiter eine Leukozytose von 11 400/ μ l, Zeichen der Ketoazidose und sonstige pathologische Laborparameter fanden sich bei keinem Patienten mehr.

Auch dieser Gruppe wurden 8 gesunde Kontrollpersonen (5 männlich, 3 weiblich) im Alter zwischen 24 und 38 Jahren zugeordnet. Weißes Blutbild und Differentialblutbild wurden bei allen Kontrollpersonen überprüft und lagen im Bereich der Normalwerte. Chronische oder akute Krankheitsbilder bestanden bei den Kontrollpersonen nicht.

2.1.2 Geräte

Blotting Apparatur	Biorad, Minden, Deutschland
Halbmikroküvetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Sterilfilter	Millipore, Eschborn, Deutschland
SDS-Gelapparatur	Biorad, Minden, Deutschland
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge –15R	Beckmann, Fullerton, USA
Zentrifuge Christ 4400	Hereaeus, Osterode, Deutschland
Zentrifuge Sepatech	Hereaeus, Osterode, Deutschland
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, soweit sie nicht im folgenden aufgelistet sind, von Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma (Deisenhofen, Deutschland) oder Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland) bezogen.

Ampicillin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ampicillin-Na-Salz	ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA
Ficoll 400	Seromed
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Glycerin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Hepes	Serva, Heidelberg, Deutschland
Hybond-ECL	Amersham, Braunschweig, Deutschland
Penicillin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Proteinleiter 10 kDa	Gibco, Eggenstein, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Streptomycin	Serva, Heidelberg, Deutschland
TEMED	Biorad, Minden, Deutschland
Trypanblau (0.4% in 0.85% NaCl)	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Acrylamid	ProSieve

2.1.4 Sterilisation der Chemikalien und Geräte

Hitzebeständige Lösungen und Glaswaren wurden bei 120° C und 2 bar für 30 min autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden durch Filter mit der Porengröße 0.2 µm sterilfiltriert.

2.1.5 Einwegartikel für die Zellkultur

Kunststoffartikel für die Zellkultur (Zellkulturschalen, Zentrifugenröhrchen) wurden von Falcon (Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA), Greiner (Solingen, Deutschland) oder Costar (Cambridge, USA) bezogen.

2.1.6 Antikörper

α hsp70	Maus-anti-hsp72, monoklonal	StressGen, Victoria B.C., Canada
α hsc70	Ratte-anti-hsp73, monoklonal	StressGen, Victoria B.C., Canada
α Maus IgG	peroxidasekonjugierter Kaninchen-anti-Maus IgG (H+L) Antikörper	Dako, Hamburg, Deutschland
α Ratte IgG	peroxidasekonjugierter Kaninchen-anti-Ratte IgG (H+L) Antikörper	Dako, Hamburg, Deutschland

2.1.7 Medien für die Zellkultur

Hank's balanced Salt Solution (HBSS): Gibco Europa, Eggenstein

RPMI 1640-Medium enthielt Zusätze von:

Ampicillin 25 mg/ml
Penicillin 120 mg/ml
Streptomycin 270 mg/ml
Natriumpyruvat 1mM
10 ml/l nicht-essentielle Aminosäuren (100x)
NaHCO₃ 2g/l
Hepes 2.38 g/l

Trypsinlösung:

20 mg Trypsin ad. 10 ml 0.9% NaCl, sterilfiltriert, Aliquot-Lagerung bei -20°

2.1.8 Stammlösungen und Puffer

APS

1 g Ammoniumpersulfat
ad 10 ml ddH₂O
Lagerung bei -20° C

Blotting Puffer

3.03 g TRIS
14.41 g Glycin
200 ml Methanol
ad 1l H₂O

Lower TRIS (4x)

90.85 g TRIS
20 ml 10% SDS
ad 500 ml H₂O
pH 8.8

PBS

80 g NaCl
2 g KCl
14.4 g Na₂HPO₄
2.4 g KH₂PO₄
ad 1 l ddH₂O

Ponceau S (10X)

2 g Ponceau S
30 g Trichloressigsäure
30 g Sulfosalicylsäure
ad 100 ml H₂O

Probenpuffer

100 mM TRIS, pH 7.8
4% SDS
0.2% Bromphenolblau
20% Glycerol
2% Mercaptoethanol

Laufpuffer (10x)

30.3 g TRIS
144 g Glycin
10 g SDS
pH 8.3
ad 1 l H₂O

TBS

50 ml 3 M NaCl
20 ml 1 M TRIS, pH 7.6
ad 1 l ddH₂O

TBS + Tween

10% Tween20

ad 1 l ddH₂O

Upper TRIS (4x)

30.3 g TRIS

20 ml 10% SDS

ad 500 ml ddH₂O

pH 6.8

Giemsa-Stammlösung

Azur II + eosinsaures Azur II in Methanol:Glycerin 1:1

Giemsa-Gebrauchslösung

1 ml Giemsa-Stammlösung

20 ml ddH₂O

May-Grünwald-Lösung

eosinsaures Methylenblau in Methanol:Glycerin 2:1

2.2 Methoden

2.2.1 Anfertigung und Färbung von Blutausstrichen

Zur Anfertigung von Blutausstrichen wurde ein Tropfen Heparin-Blut mit Hilfe eines Deckglases auf einem Objektträger gleichmäßig dünn ausgestrichen und an der Luft getrocknet.

Gefärbt wurde wie folgt nach Pappenheim:

Die getrockneten Ausstriche wurden mit May-Grünwald-Lösung bedeckt. Nach dreiminütiger Einwirkzeit wurde die Lösung kurz mit Aqua bidest abgespült und die Ausstriche anschließend 3 min mit Aqua bidest bedeckt stehen gelassen.

Anschließend erfolgte eine 15minütige Färbung mit Giemsa-Gebrauchslösung.

Nach nochmaliger Spülung mit Aqua bidest wurden die Ausstriche an der Luft getrocknet und konnten dann ausgewertet werden.

2.2.2 Differenzieren von Blutausstrichen

Zur Differenzierung der Blutausstriche wurden diese unter dem Lichtmikroskop bei 100facher Vergrößerung betrachtet. Hierbei wurden die Präparate in den Bereichen, in denen die Erythrozyten nebeneinander lagen, mäanderförmig durchmustert. Es wurden jeweils 100 Leukozyten nach Größe, Kern-Plasma-Relation, Kernform und –struktur, Cytoplasmafarbe und –granulierung klassifiziert.

2.2.3 Allgemeine Kulturbedingungen

Alle Zellen wurden in Brutschränken (Heraeus, Osterode, Deutschland) bei 37° C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90% kultiviert.

2.2.4 Isolation von mononukleären Blutzellen

10 ml mit Ammonium-Heparin versetztes Vollblut wurde 1:1 mit HBSS verdünnt und jeweils 10 ml dieser Lösung wurden vorsichtig auf 5 ml Ficolllösung (Seromed) geschichtet. Anschließend wurde 20 min bei 500 g bei 20 °C zentrifugiert. Lymphozyten und Monozyten befanden sich nun in der Trennschicht zwischen Ficoll und Serum und konnten mit einer Transferpipette abgenommen und in ein neues Falconröhrchen überführt werden. Nun wurde 3 x mit HBSS gewaschen und bei 250 g zentrifugiert. Zuletzt wurde noch einmal bei 130 g zentrifugiert, das Pellet wurde in 10 ml RPMI aufgenommen und die Zellen wurden gezählt.

2.2.5 Kultivierung von mononukleären Blutzellen

Die mononukleären Blutzellen wurden im RPMI 1640-Medium mit 10% FCS in Petrischalen liegend unter den in 2.2.3 genannten Bedingungen kultiviert.

2.2.6 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in einer Suspension wurde der Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt, wobei tote Zellen blau gefärbt werden, während vitale Zellen ungefärbt bleiben. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension 1:1 mit verdünnter Trypanblau-Lösung (Lösung aus 2.1.3, 1:4 verdünnt mit 0.9% NaCl-Lösung) gemischt und die ungefärbten Zellen in der Neubauer Zählkammer gezählt. der Mittelwert X aus der

Zählung der vier Eckquadrate wurde zur Berechnung der Zellzahl nach folgender Formel eingesetzt:

$$\text{Zellen/ml} = X \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10000$$

2.2.7 Behandlung von Zellen mit Hitzeschock

Ziel der Behandlung der Zellen mit Hitzeschock war die Auslösung eines Stressses, durch den vermehrt Hitzeschockproteine in den Zellen exprimiert wurden.

Hierzu wurden die mononukleären Zellen in Petrischalen in einem Wärmeschränk für 60 min bei 42.5° C inkubiert.

2.2.8 Herstellung von Zellysaten

Die Zellen wurden einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit einem Zellschaber von der Petrischale gelöst. Um eine Induktion von Hitzeschockproteinen auszuschließen, wurden die Zellen in diesem Fall nicht trypsiniert. Nun wurden die Zellen 5 min bei 250 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen, in ein Eppendorfröhrchen transferiert und 5 min bei 720 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in Probenpuffer unter Einstellung einer Zellzahl von 200000/0,01 ml aufgenommen. Dann wurde das Zellysate 5 min bei 95 °C inkubiert, anschließend sofort auf Eis gelegt und dann bei -20 °C tiefgefroren.

2.2.9 Analyse von Zellysaten mittels Western Blot

Diese Methode dient zum immunchemischen Nachweis von Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran (modifiziert nach Laemmli, 1970). Dabei werden Proteine nach Größe über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend das gesuchte Protein mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

2.2.9.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Der Aufbau der Gelapparatur erfolgte nach Protokollen der Fa. Biorad (Minden, Deutschland) mit 0.75 mm Abstandhaltern zwischen beiden Glasplatten. Das untere Gel wurde mit einer Pasteurpipette blasenfrei zwischen die Platten gegossen und 30 min auspolymerisiert. Darüber wurde das obere Gel gegossen, ein Kamm zur Aussparung von Geltaschen eingesteckt und 20 min auspolymerisiert. Anschließend wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen, die Geltaschen mit Wasser gespült und 0.02 ml der Proben pro

Tasche aufgetragen. Die Gelapparatur wurde mit Laufpuffer (1x) aufgefüllt. Die Laufzeit betrug 60 min bei 180 V. Durch die unterschiedliche Vernetzung des oberen und des unteren Gels kommt es zu einer besseren Auftrennung der Proben mit schärferen Proteinbanden.

Unteres Gel (10%ig)	1.875	ml	Lower Tris (4x)
	1.5	ml	Acrylamid (pro Sieve 50)
	4.05	ml	H ₂ O
	4	μl	TEMED
	75	μl	APS
Oberes Gel (5%ig)	700	μl	Upper Tris (4x)
	500	μl	Acrylamid (proSieve 50)
	3.75	ml	H ₂ O
	5	μl	TEMED
	30	μl	APS

2.2.9.2 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Das obere Gel wurde vorsichtig entfernt. Das untere Gel wurde von der Glasscheibe entfernt und 10 min in Blotting Puffer zusammen mit 4 entsprechend großen Stücken Whatman-Papier und einem entsprechendem Stück Hybond-ECL schüttelnd inkubiert. Der Blot wurde aus 2 Schichten Whatman-Papier, dem Gel, der Hybond-ECL und wieder 2 Schichten Whatman-Papier aufgebaut und in die Blotting-Apparatur (Biorad) gegeben. Die Apparatur wurde mit Blotting Puffer aufgefüllt, eine Eisbox (Biorad) zugegeben und bei 4 °C auf einem Magnetrührer inkubiert. Der Transfer erfolgte bei 100 Volt für 1 h. Danach wurde die Membran zur Anfärbung der Proteine 2 min mit Ponceau S inkubiert, um den Erfolg des Transfers vom Gel auf die Membran zu überprüfen. Danach wurde zum Entfärben der Membran dreimal 2 min mit TBS gewaschen.

2.2.9.3 Immunodetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Zum immunzytochemischen Nachweis von filtergebundenen Proteinen wurde die ECL-Methode (ECL: enhanced chemiluminescence; **Whitehead et al, 1979**) benutzt (Amersham, Braunschweig, Deutschland).

Lumineszenz ist definiert als Lichtemission, die aus dem Energieverlust einer Substanz entsteht, die sich in einem angeregten Zustand befindet. Bei der Chemilumineszenz erfolgt diese Anregung durch eine chemische Reaktion. Bei der ECL-Methode erfolgt diese Reaktion durch die von Peroxidase in Anwesenheit von Hydrogenperoxid katalysierte Oxidation von Luminol. Direkt nach der Oxidation befindet sich Luminol in

einem angeregten Zustand, der durch Lichtemission der Wellenlänge 428 nm abklingt und durch einen Blaulicht-sensitiven Autoradiographiefilm detektiert werden kann.

Zum Blockieren unspezifischer Antikörperbindungen wurde 30 min mit 5 % Trockenmilchpulver (in TBS) schüttelnd inkubiert und dann 1 x 15 und 2 x 5 min mit TBS + Tween gewaschen. Mit dem Primärantikörper (monoklonaler Antikörper Verdünnung 1:1000) wurde 1 h schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert und dann 3 x 10 min mit TBS + Tween gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde im Verhältnis 1: 10 000 in 0,5 % Trockenmilchpulver in TBS verdünnt und 30 min schüttelnd mit der Membran inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit TBS + Tween wurde 1-2 min mit den 1: 100 gemischten Komponenten des Luminol-enthaltenden ECL-Detektionskits (Amersham) inkubiert. Die überschüssige Flüssigkeit wurde entfernt und die Membran wurde in Frischhaltefolie gewickelt.

Detektiert wurden die Signale mit Hilfe des Lumi Imager der Firma Boehringer Mannheim in einem Expositionszeitraum von 10-30 min.

2.3 Statistische Verfahren

Bei der Auswertung der Daten der Patienten mit Typ-I-Diabetes wurden 6-8 Einzelwerte zu einem Mittelwert zusammengefasst. Die Einzelmesswerte der Experimente zur Th1/Th2-Stimulation mit IFN- γ (4 Messungen), TGF- β (4 Messungen) und IL-4 (3 Messungen) wurden ebenfalls zu Mittelwerten zusammengefasst.

Bei normalverteilten Werten wurden die Gruppenmittelwerte mit dem Student's T-Test (t-hom und T-het Test, zweiseitig) für unverbundene Stichproben berechnet.

Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0.05$ festgesetzt, d.h. der Unterschied zwischen einer Versuchs- und einer Kontrollgruppe wurde als signifikant bezeichnet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) kleiner als 5% war

3. Ergebnisse

3.1 Expression und Induzierbarkeit von Hitzeschockproteinen beim längermanifesten Typ-I-Diabetes

Um die Expression der humanen Hitzeschockproteine hsp70 / hsc70 beim längermanifesten (Krankheitsdauer > 8 Monate) Typ-I-Diabetiker zu überprüfen, wurde hsp70 / hsc70 aus peripheren mononukleären Blutzellen bestimmt. Die Zellen wurden nach der Isolation aus NH₄-Heparin-Vollblut für 60 Minuten bei 42.5°C inkubiert. Nach 6 und 18 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen lysiert und aus dem entstandenen Zellysat wurde hsp70 / hsc70 mittels Western Blot bestimmt. Eine unbehandelte Kontrolle wurde ohne vorherigen Hitzeschock 18h bei 37°C inkubiert und anschließend auf hsp70 / hsc70 analysiert.

3.1.1 hsp70-Expression bei längermanifestem Typ-I-Diabetes

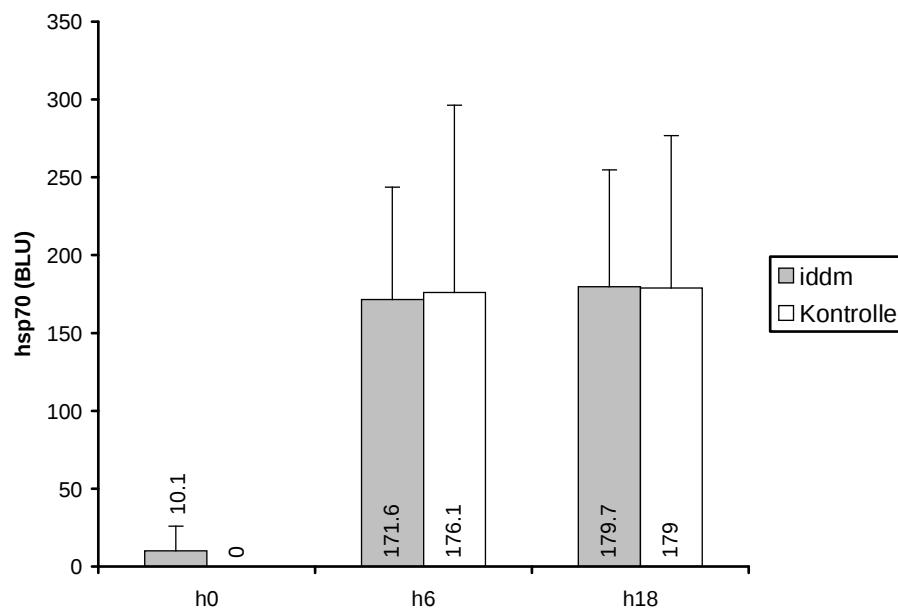


Abb. 3.1: Expression von hsp70 in humanen peripheren mononukleären Blutzellen ohne Hitzeschockbehandlung (h0), 6 h nach Hitzeschockbehandlung (h6) und 18 h nach Hitzeschockbehandlung (h18); Angegeben sind die Mittelwerte von 8 Bestimmungen bei Patienten mit längermanifestem Typ-I-Diabetes (idm) und 8 Bestimmungen bei gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle) $\pm$ SD;

Zeigte sich ohne vorhergehende Hitzeschockbehandlung nur eine sehr geringe Expression von hsp70, so stieg diese bereits 6 Stunden nach Hitzeschockbehandlung auf ein Maximum an, das sich nach 18h nahezu unverändert darstellte.

Ein Unterschied in der Expression von hsp70 zwischen längermanifesten Typ-I-Diabetikern und gesunden Kontrollpersonen zeigte sich nicht.

3.1.2 Induzierbarkeit von hsp70 bei längermanifestem Typ-I-Diabetes

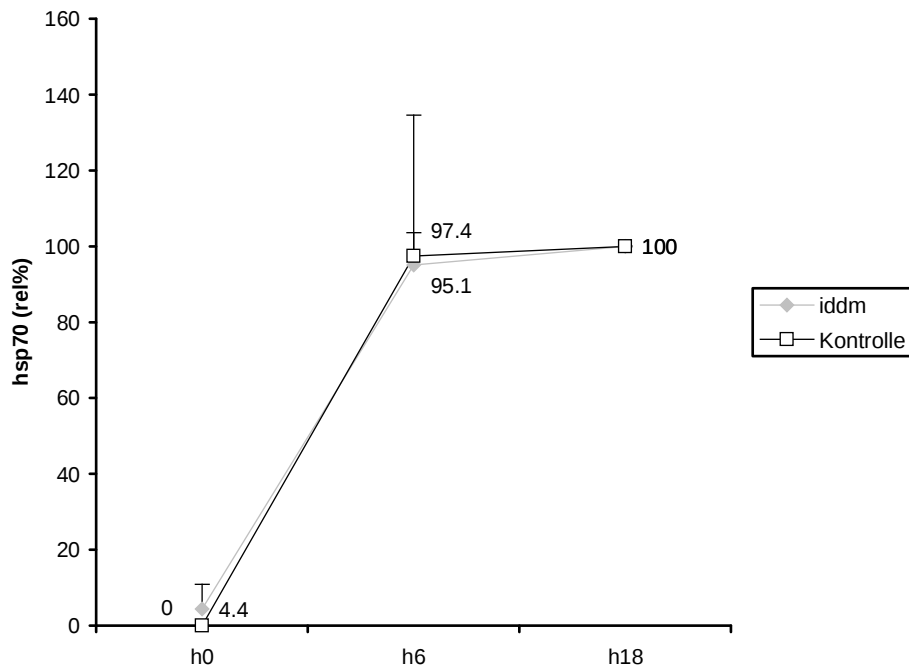


Abb.3.2: Induzierbarkeit von hsp70 in humanen peripheren mononukleären Blutzellen nach Hitzeschockbehandlung, dargestellt als Verlaufskinetik; Die absoluten Werte der hsp70-Bestimmung 18h nach Stimulation wurden gleich 100% gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte von 8 Bestimmungen bei Patienten mit längermanifestem Typ-I-Diabetes (idm) und 8 Bestimmungen bei gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle) $\pm$ SD;

Deutlich zeigt sich hier der schnelle Anstieg der hsp70-Produktion innerhalb der ersten 6 Stunden nach Stimulation. Danach scheint sich die Menge des exprimierten hsp70 auf dem erreichten Niveau einzupendeln. Beide Gruppen zeigen eine gute und schnelle Induzierbarkeit der Stressantwort ohne signifikante Unterschiede.

Die nachfolgende Abbildung 3.3 zeigt einen exemplarischen Westernblot für dieses Ergebnis:

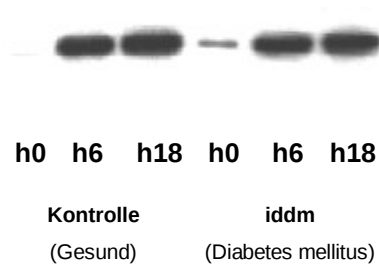


Abb. 3.3: Abbildung eines ECL-belichteten Filmes. h0= Kontrolle ohne Hitzestress, h6= 6h nach Hitzestress, h18= 18h nach Hitzestress; iddm= Patient mit Typ-I-Diabetes (Patient VII, s. Tab.1, S.13), Kontrolle= gesunde Kontrollperson;

3.1.3 hsc70-Expression bei längermanifestem Typ-I-Diabetes

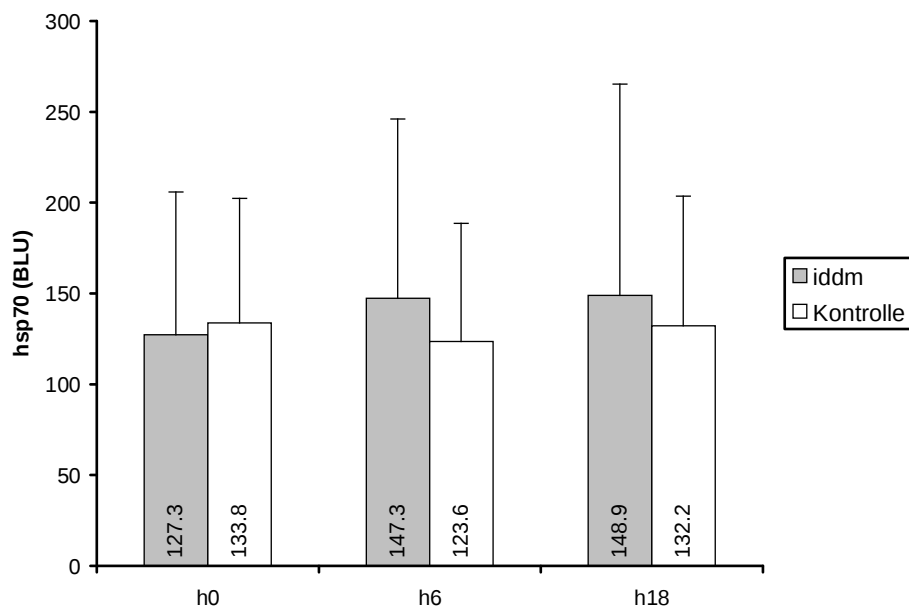


Abb. 3.4: Expression von hsc70 in humanen peripheren mononukleären Blutzellen ohne Hitzeschockbehandlung (h0), 6 h nach Hitzeschockbehandlung (h6) und 18 h nach Hitzeschockbehandlung (h18); Angegeben sind die Mittelwerte von 4 Bestimmungen bei Patienten längermanifestem Typ-I-Diabetes (iddm) und 7 Bestimmungen bei gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle) $\pm$ SD;

Hsc70 als konstitutiv exprimiertes 70kDa-Hitzeschockprotein zeigte erwartungsgemäß eine vergleichbare Expression in den unterschiedlichen Gruppen. Eine Beeinflussbarkeit der Expression durch Hitzestress zeigt sich ebenso wenig wie ein Unterschied in der Expression zwischen Typ-I-Diabetikern und gesunden Kontrollpersonen.

3.1.4 Induzierbarkeit von hsc70 bei längermanifestem Typ-I-Diabetes

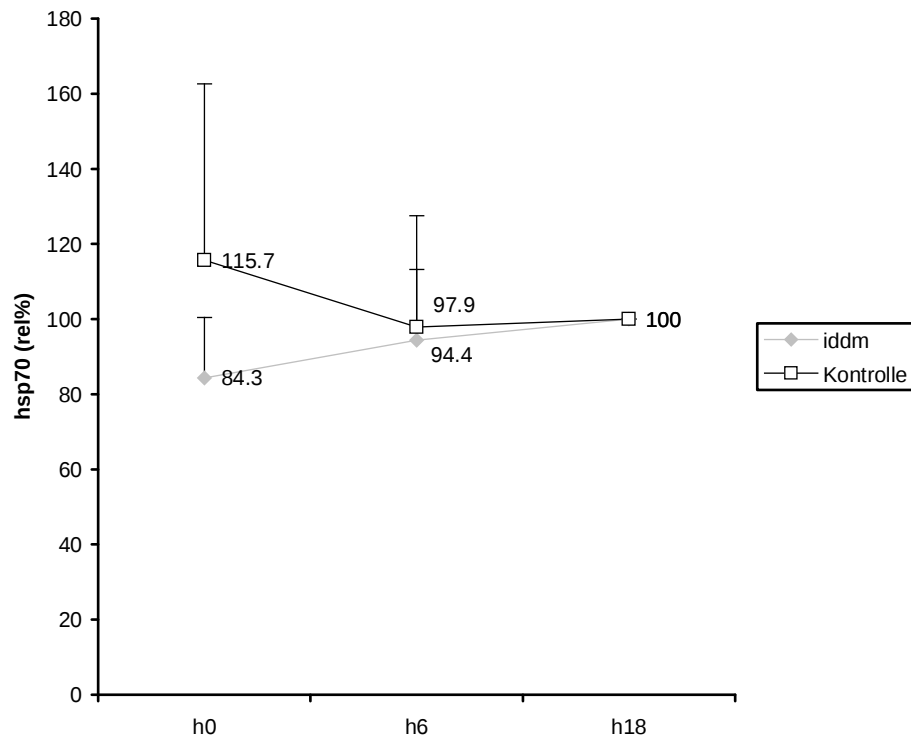


Abb.3.5: Induzierbarkeit von hsc70 in humanen peripheren mononukleären Blutzellen nach Hitzeschockbehandlung, dargestellt als Verlaufskinetik; Die absoluten Werte der hsc70-Bestimmung 18h nach Stimulation wurden gleich 100% gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte von 4 Bestimmungen bei Patienten mit längermanifestem Typ-I-Diabetes (iddm) und 7 Bestimmungen bei gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle) $\pm$ SD;

Die obige Abbildung zeigt einen gleichmäßigen Verlauf der hsc70-Expression über die Zeit. Es findet sich kein signifikanter Anstieg der hsc70-Expression in den 18h nach Stimulation. Die exprimierte Menge von hsc70 entspricht auch nach 18h der bereits konstitutiv exprimierten, hsc70 stellt sich als nicht durch Hitzestress induzierbares Hitzeschockprotein dar. Ein signifikanter Unterschied zwischen Typ-I-Diabetikern und gesunden Kontrollpersonen zeigt sich nicht, der hohe Wert für hsc70 bei 0 h in der Kontrollgruppe ist auf zwei Kontrollpersonen zurückzuführen, deren Werte deutlich über den durchschnittlichen Werten lagen.

3.2 Expression und Induzierbarkeit von Hitzeschockproteinen beim neumanifesten Typ-I-Diabetes

Um die Expression des humanen Hitzeschockproteins hsp70 beim neumanifesten (d.h. zum Zeitpunkt der Diagnose) Typ-I-Diabetiker zu überprüfen, wurde hsp70 aus peripheren mononukleären Blutzellen bestimmt. Die Zellen wurden nach der Isolation aus NH_4 -Heparin-Vollblut für 60 Minuten bei 42.5°C inkubiert. Nach 6 und 18 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen lysiert, aus dem entstandenen Zelllysate wurde hsp70 mittels Western Blot bestimmt. Eine unbehandelte Kontrolle wurde ohne vorherigen Hitzeschock 18h bei 37°C inkubiert und anschließend auf hsp 70 analysiert.

Auf eine weitere Untersuchung von hsc70 wurde aufgrund der Ergebnisse bei den längermanifesten Typ-I-Diabetikern verzichtet. Zwei exemplarische Versuche hatten hier ähnliche Ergebnisse wie unter 3.1.3 und 3.1.4 erbracht.

3.2.1 hsp70-Expression bei neumanifestem Typ-I-Diabetes, Tag 0

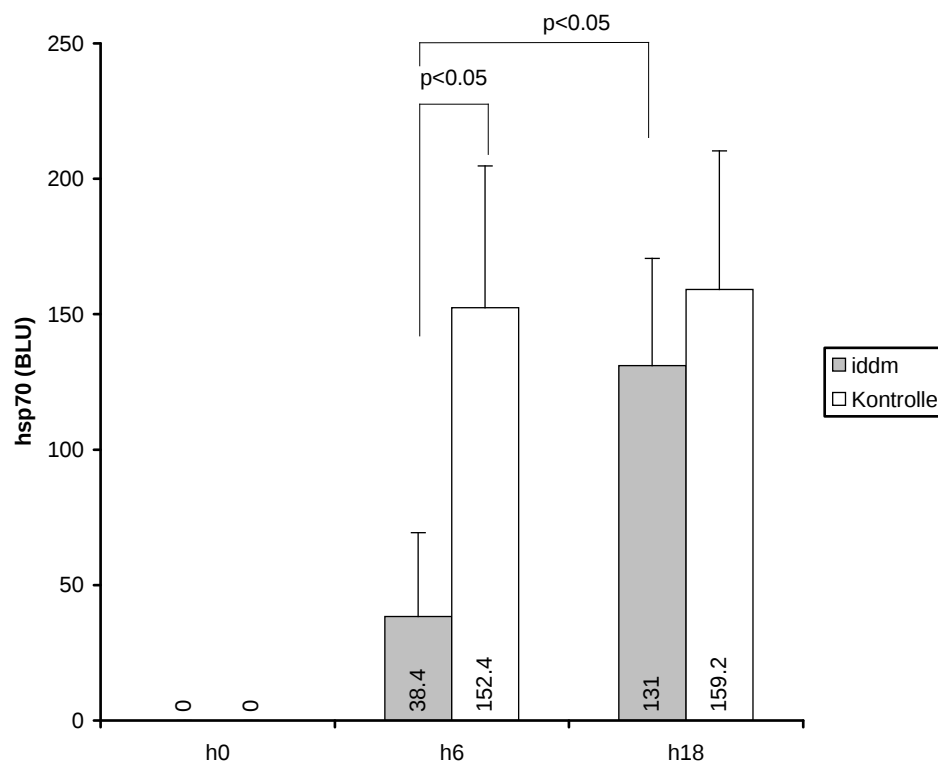


Abb. 3.6: Expression von hsp 70 in humanen peripheren mononukleären Blutzellen ohne Hitzeschockbehandlung (h0), 6 h nach Hitzeschockbehandlung (h6) und 18 h nach Hitzeschockbehandlung (h18); Angegeben sind die Mittelwerte von 8 Bestimmungen bei Patienten mit neumanifestem Typ-I-Diabetes am Tag 0 (idm) und 8 Bestimmungen bei gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle) $\pm$ SD;

Der Versuch zeigt eine signifikant niedrigere Expression von hsp70 beim Typ-I-Diabetiker 6 h nach Stimulation, die sich nach 18 h weitestgehend der Expression bei den Kontrollpersonen angeglichen hat.

3.2.2 Induzierbarkeit von hsp70 bei neumanifestem Typ-I-Diabetes, Tag 0

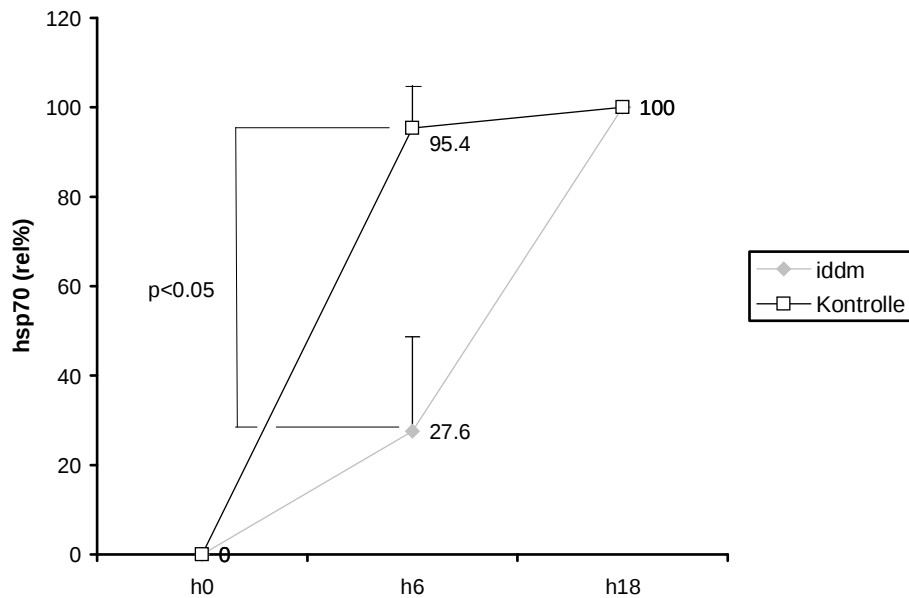


Abb.3.7: Induzierbarkeit von hsp 70 in humanen peripheren mononukleären Blutzellen nach Hitzeschock-behandlung, dargestellt als Verlaufskinetik; Die absoluten Werte der hsp70-Bestimmung 18h nach Stimulation wurden gleich 100% gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte von 8 Bestimmungen bei Patienten mit neumanifestem Typ-I-Diabetes am Tag 0 (idm) und 8 Bestimmungen bei gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle) $\pm$ SD;

Deutlich zeigt sich hier der schnelle Anstieg von hsp70 bei den Kontrollpersonen innerhalb von 6 Stunden auf ein Niveau, welches nach 18 h unverändert besteht. Bei den Patienten mit neumanifestem Typ-I-Diabetes sieht man dagegen einen trägen Anstieg von hsp70 in den ersten 6 Stunden nach Stimulation, der sich bis zum Zeitpunkt 18 Stunden fortsetzt und ein, wie aus Abb. 3.6 ersichtlich, ähnliches Niveau wie bei den Kontrollpersonen erreicht.

Die nachfolgende Abbildung 3.8 zeigt einen exemplarischen Westernblot für dieses Ergebnis.

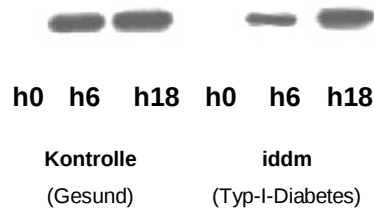


Abb. 3.8: Abbildung eines ECL-belichteten Filmes. k= Kontrolle ohne Hitzestress, h6= 6h nach Hitzestress, h18= 18h nach Hitzestress; iddm=Patient mit Typ-I-Diabetes Tag 0 (Patient III, s. Tab.2, S.14), Kontrolle= gesunde Kontrollperson

Dieser signifikante Unterschied in der Induzierbarkeit von hsp70 zu Beginn der Erkrankung, der sich, wie oben gezeigt, ca. 7 Monate später nicht mehr darstellte, gab Anlass zur Nachuntersuchung eines Teiles des Kollektives der Patienten mit neumanifestem Typ-I-Diabetes eine Woche nach der ersten Untersuchung.

3.2.3 hsp70-Expression bei neumanifestem Typ-I-Diabetes, Tag 8

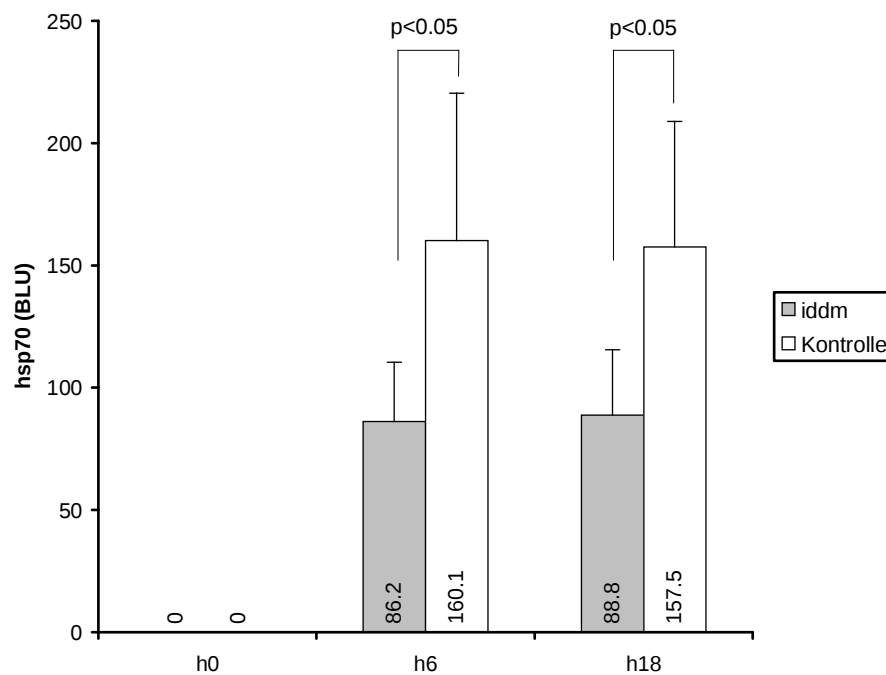


Abb. 3.9: Expression von hsp 70 in humanen peripheren mononukleären Blutzellen ohne Hitzeschockbehandlung (h0), 6 h nach Hitzeschockbehandlung (h6) und 18 h nach Hitzeschockbehandlung (h18); Angegeben sind die Mittelwerte von 6 Bestimmungen bei Patienten mit neumanifestem Typ-I-Diabetes am Tag 8 (iddm) und 6 Bestimmungen bei gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle) $\pm$ SD;

Am Tag 7 der Erkrankung zeigt sich eine Normalisierung der Induzierbarkeit von hsp70, d. h. bereits 6 h nach Hitzeschockbehandlung wird eine Menge von hsp70 exprimiert, die sich von der 12 h später exprimierten Menge nicht mehr unterscheidet. Es fällt jedoch auf,

dass im Vergleich zur Kontrollgruppe die absolute Menge des exprimierten hsp70 um ca. 50% reduziert ist.

3.2.4 hsp70-Expression bei neumanifestem Typ-I-Diabetes, Tag 0-8

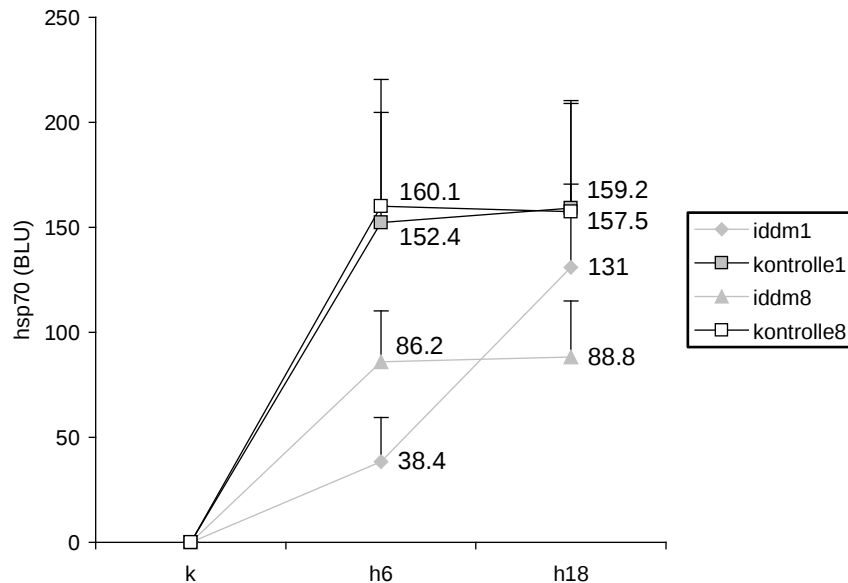


Abb. 3.10: Expression von hsp70 in humanen peripheren mononukleären Blutzellen ohne Hitzeschockbehandlung (k), 6 h nach Hitzeschockbehandlung (h6) und 18 h nach Hitzeschockbehandlung (h18); Angegeben sind die Mittelwerte von 6 Bestimmungen bei neumanifesten Patienten mit Typ-I-Diabetes am Tag 8 (iddm8) und 6 Bestimmungen bei gesunden Kontrollpersonen (kontrolle8) $\pm$ SD, sowie die Mittelwerte von 8 Bestimmungen bei neumanifesten Patienten am Tag 1 (iddm1) und 8 Bestimmungen bei gesunden Kontrollpersonen (kontrolle1) $\pm$ SD;

Betrachtet man die Ergebnisse aus 3.2.1 und 3.2.3 wie hier dargestellt im direkten Vergleich, so zeigt sich im Vergleich mit den zugehörigen Kontrollpersonen nochmals deutlich die reduzierte Expression von hsp70 durch die neumanifesten Patienten mit Typ-I-Diabetes am Tag 0 und Tag 8. Außerdem fällt auf, dass sich die Kinetik der hsp70-Expression am Tag 0 von der am Tag 8 (Patienten) ebenfalls unterschiedlich verhält: Fällt am Tag 0 besonders der langsame Anstieg auf, so stellt sich am Tag 8 bei einer mit der Kontrollgruppe vergleichbaren Kinetik die Gesamtmenge des exprimierten Hitzeschockproteins erniedrigt dar.

Zur weiteren Verdeutlichung zeigt Abbildung 3.11.1-6 auf der nächsten Seite nochmals die Einzelverläufe aus der oben genannten Untersuchung.

Abb. 3.11.1

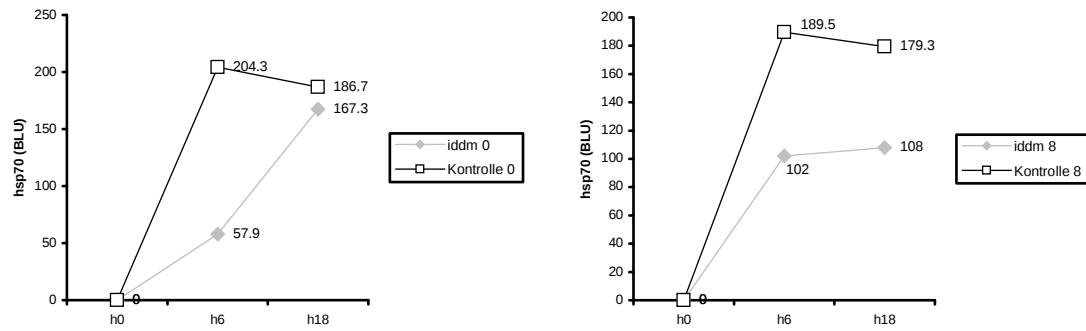


Abb. 3.11.2

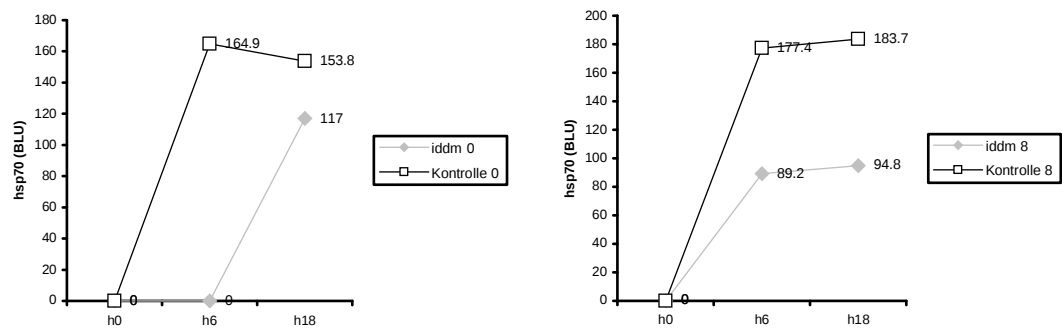


Abb. 3.11.3

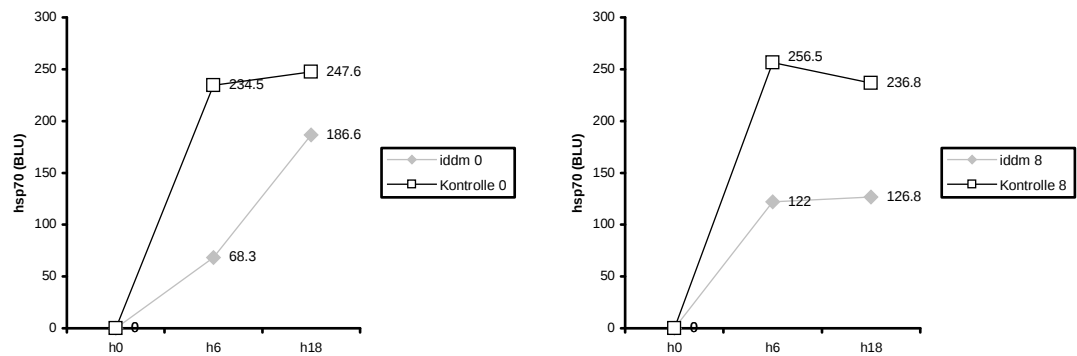


Abb. 3.11.4

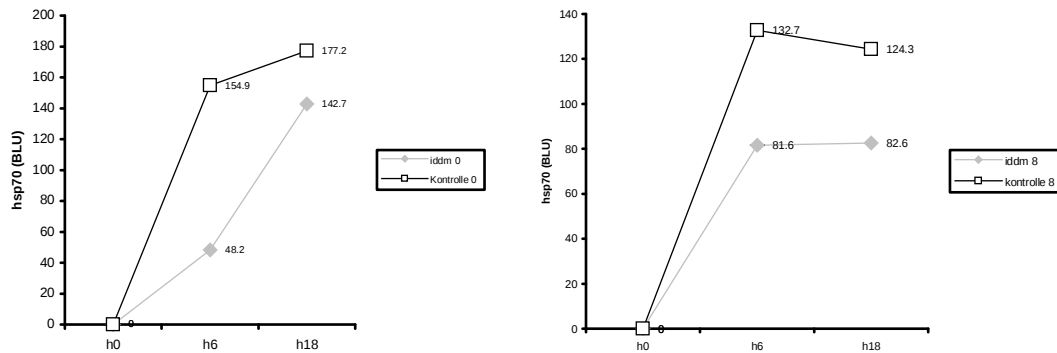


Abb. 3.11.5

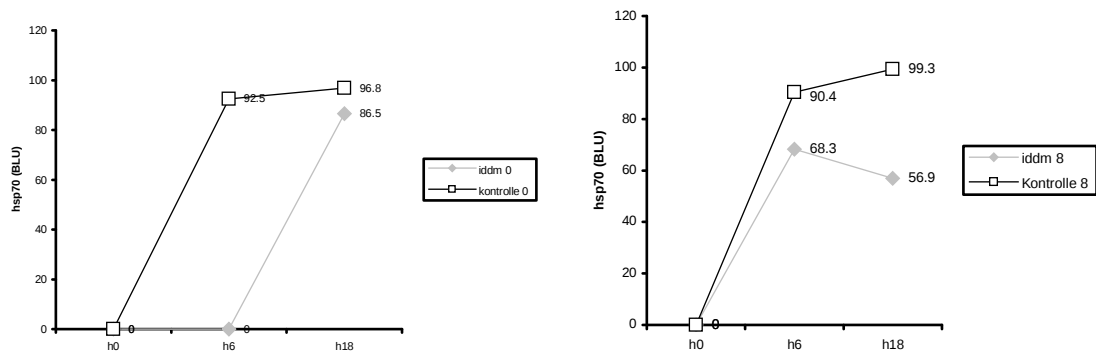


Abb. 3.11.6

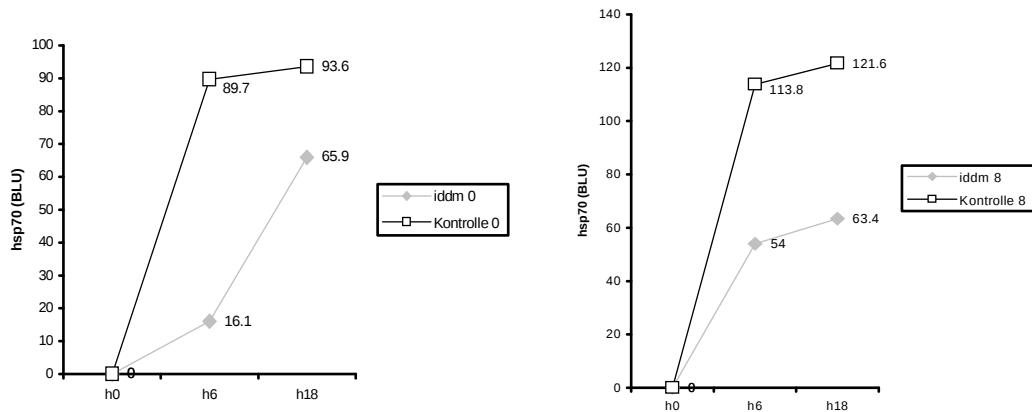


Abb. 3.11.1-6: Expression von hsp70 in humanen peripheren mononukleären Blutzellen ohne Hitzeschockbehandlung (h0), 6 h nach Hitzeschockbehandlung (h6) und 18 h nach Hitzeschockbehandlung (h18); Angegeben sind die Einzelverläufe von 6 Bestimmungen bei Patienten mit neumanifestem Typ-I-Diabetes am Tag 0 (iddm) und 6 Bestimmungen bei gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle 0), sowie die Einzelwerte von 6 Bestimmungen derselben Patienten am Tag 8 nach Diabetes-Manifestation (iddm 8) und 6 Bestimmungen bei gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle 8); (Patienten 1-6 entsprechend röm. I-VI, Tab. 2, S.14)

Betrachtet man die Ergebnisse aus 3.2.1 und 3.2.3 wie hier dargestellt im direkten Vergleich, so zeigt sich im Vergleich mit den zugehörigen Kontrollpersonen nochmals deutlich die reduzierte Expression von hsp70 durch die Patienten mit neu manifestem Typ-1-Diabetes am Tag 0 und Tag 8.

3.3 Induzierbarkeit von hsp70 nach Th1/Th2-Stimulation

Um eventuelle Einflüsse auf die Induzierbarkeit von hsp70 durch verschiedene Zytokinmilieus zu untersuchen, wurden Zellen gesunder Kontrollpersonen nach der gleichen Methode wie oben bereits beschrieben isoliert und kultiviert. Vor dem Hitzeschock von

42.5° C wurden diese jedoch für 24 h in Kultur mit je 10 ng/ml IFN γ , TGF β oder Interleukin-4 (IL-4) behandelt.

Um die Auswirkungen dieser unterschiedlichen Stimuli zu überprüfen, wurde diesmal nur der Wert 6h nach Hitzeschock bestimmt und mit den nicht mit Hitzestress behandelten Kontrollen verglichen.

3.3.1 Induzierbarkeit von hsp70 nach Th1-Stimulation

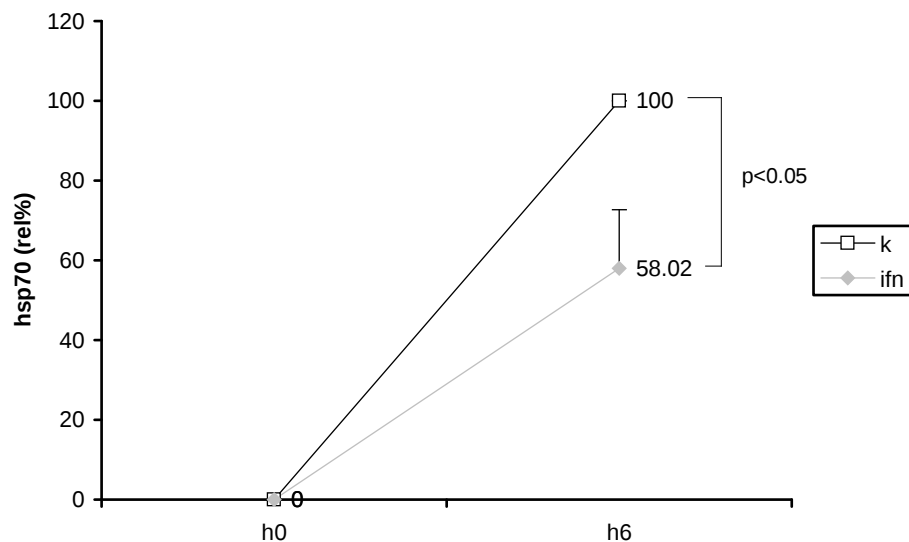


Abb.3.12: Induzierbarkeit von hsp 70 in humanen peripheren mononukleären Blutzellen nach Stimulation mit 10 ng/ml IFN γ für 24h und nachfolgender Hitzeschockbehandlung, dargestellt als Verlaufskinetik; Hier wurden an den Werten der hsp70-Bestimmung 6h nach Stimulation geeicht (gleich 100%). Angegeben sind die Mittelwerte von 5 Bestimmungen bei gesunden Kontrollpersonen $\pm$ SD;

Im Vergleich zur unbehandeltem Kontrolle zeigt sich eine Einschränkung der Induzierbarkeit von hsp70 um circa 42% nach 24stündiger Vorstimulation der Zellen mit dem TH1-Zytokin IFN- γ .

Einen Einfluss auf die basale Expression von hsp70 durch IFN- γ besteht nicht, wie die Werte der nicht hitzestressten Kontrollen zeigen.

3.3.2 Induzierbarkeit von hsp70 nach Th2-Stimulation

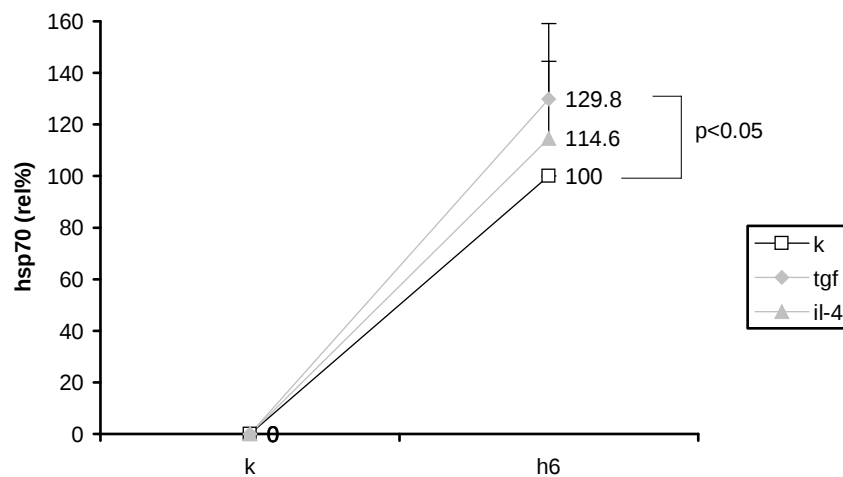


Abb.3.13: Induzierbarkeit von hsp 70 in humanen peripheren mononukleären Blutzellen nach Stimulation mit 10 ng/ml TGF- β / IL-4 für 24h und nachfolgender Hitzeschockbehandlung, dargestellt als Verlaufskinetik; Hier wurden an den Werten der hsp70-Bestimmung 6h nach Stimulation geeicht (gleich 100%). Angegeben sind die Mittelwerte von 5 Bestimmungen bei gesunden Kontrollpersonen $\pm$ SD;

Vergleicht man die Induzierbarkeit von hsp70 nach Vorstimulation mit dem TH2-Zytokin IL-4 mit einer unbehandelten Kontrollgruppe, so zeigt sich eine statistisch nicht signifikante Erhöhung der Induzierbarkeit 6h nach Hitzeschockbehandlung.

Dagegen erhöht Vorbehandlung mit dem TH2-Zytokin TGF- β im vorliegenden Versuch die Induzierbarkeit von hsp70 um circa 30%.

3.3.3 Induzierbarkeit von hsp70 nach Th1/Th2-Stimulation

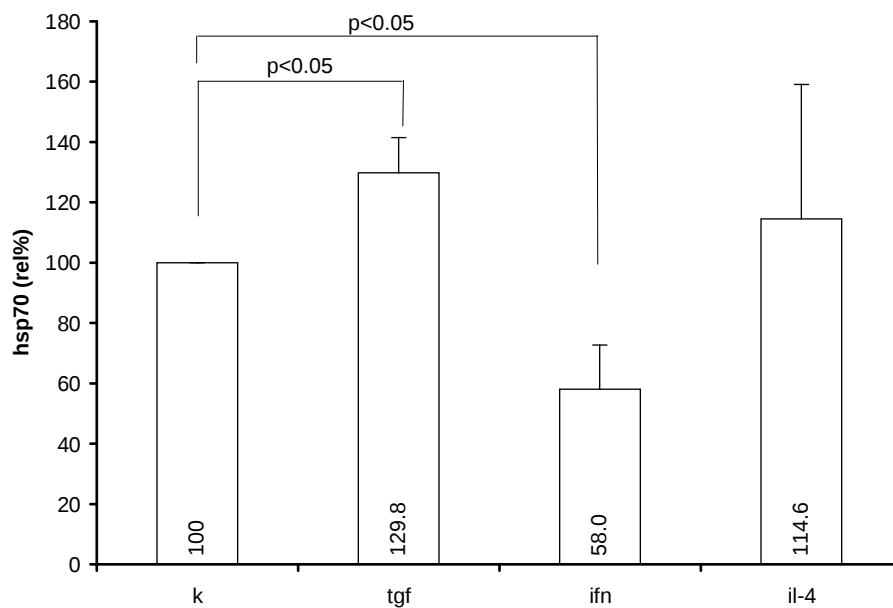


Abb.3.14: Induzierbarkeit von hsp 70 in humanen peripheren mononukleären Blutzellen nach Stimulation mit 10 ng/ml TGF β / IFN γ / IL-4 für 24h und nachfolgender Hitzeschockbehandlung, dargestellt sind hier nur die Werte 6h nach Hitzeschockbehandlung zum Vergleich der einzelnen Gruppen; Hier wurden an den Werten der hsp70-Bestimmung 6h nach Stimulation geeicht (gleich 100%). Angegeben sind die Mittelwerte von 5 Bestimmungen bei gesunden Kontrollpersonen $\pm$ SD;

Betrachtet man nun einzeln die Werte 6h nach Hitzeschockbehandlung aller Gruppen im Vergleich, so zeigt sich noch einmal verdeutlicht eine erhöhte Induzierbarkeit von hsp70 nach Vorbehandlung mit TGF- β und eine stark erniedrigte Induzierbarkeit von hsp70 nach Vorbehandlung mit IFN- γ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Abb. 3.14 zeigt einen exemplarischen Westernblot.

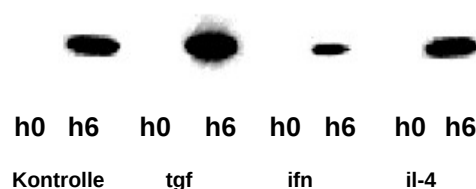


Abb. 3.15: Abbildung eines ECL-belichteten Filmes. h0= Kontrolle ohne Hitzestress, h6= 6h nach Hitzestress; Kontrolle= Kontrolle ohne Vorstimulation mit Zytokinen; tgf, ifn, il-4= 24h Vorstimulation mit 10 ng/ml TGF- α / Interferon γ / Interleukin 4;

4. Diskussion

4.1 Einführung

Grundlage der vorliegenden Untersuchungen bildete die Frage, ob Unterschiede in der Expression und insbesondere der Induzierbarkeit von hsp70 zwischen Patienten mit Typ-I-Diabetes und Gesunden bestehen.

Diese Fragestellung ergab sich aus den an verschiedenen Rattenstämmen durchgeführten Untersuchungen, die eine verminderte Induzierbarkeit von hsp70 in Langerhansschen Inselzellen und eine dadurch erhöhte Vulnerabilität derselben gegen Inselzelltoxine aufgezeigt hatten. Hierdurch wird eine mögliche Rolle von hsp70 in der Pathogenese des Typ-I-Diabetes nahegelegt.

Bisher nicht untersucht ist jedoch, wie sich die hsp70-Expression bei Patienten mit Typ-I-Diabetes verhält und ob Unterschiede zwischen Gesunden und Erkrankten bestehen. Gezeigt werden konnten in der vorliegenden Arbeit, dass solche Unterschiede der Expression und Induzierbarkeit von hsp70 bestehen, aber nur zu einem bestimmten Zeitpunkt des Krankheitsgeschehens nachweisbar sind.

Diese Tatsache veranlasste zu weiteren Untersuchungen, mit dem Ziel, einen möglichen Erklärungsansatz für einen solchen, zeitlich begrenzten Unterschied zu finden.

4.2 Unterschied der Induzierbarkeit von hsp70 beim längermanifesten versus neumanifesten Typ-I-Diabetes

Die Induktion von Stressproteinen durch inflammatorischen oder thermischen Stress ist lange bekannt und stellt einen unspezifischen zellulären Abwehrmechanismus dar (**Welch, 1992; Craig, 1985**), der durch die Funktion der Stressproteine als molekulare Chaperone letztlich das Überleben der Zelle unter ungünstigen Bedingungen unterstützt. Studien an Inselzellen von Wistar-Ratten zeigten, dass eine Hitzeschockbehandlung die Widerstandsfähigkeit der Zellen gegen zytotoxische Effekte von NO, Sauerstoffradikalen und Streptozotocin drastisch erhöhen kann (**Bellmann et al., 1995**). Ein hierfür wesentliches Stressprotein ist das hsp70, wie weitere Untersuchungen an einer RIN-Zelllinie zeigten: Mit dem hsp70-Gen transfizierte, nun konstitutiv hsp70 exprimierende RIN-Zellen waren genauso gut gegen NO-induzierte Zellyse geschützt, wie nicht transfizierte Zellen der gleichen Linie, die vorher mit einem Hitzeschock behandelt wurden (**Bellmann et al., 1996**). Bei Untersuchungen an Inselzellen verschiedener Rattenstämme

zeigten sich Unterschiede in der Induzierbarkeit einer Stressantwort. Verglichen mit Wistar-Ratten zeigten BB-Ratten

keine Induktion von hsp70 nach Hitzeschockbehandlung und damit auch keinen protektiven Effekt derselben gegen eine durch Inselzelltoxine ausgelöste Zellyse (**Bellmann et al., 1997**).

Auch in Leber- und Nebennierenzellen von Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes findet sich eine verminderte Stressantwort durch hsp70, verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren (**Yamagishi et al., 2001**).

Diese Ergebnisse legen eine mögliche pathogenetische Bedeutung von hsp70 beim Typ-I-Diabetes im Sinne des Fehlens der Induzierbarkeit eines protektiven Faktors nahe und veranlassten zu einer ersten vergleichenden Untersuchung der Expression und Induzierbarkeit von Hitzeschockproteinen der hsp70-Familie beim Menschen.

Verglichen wurde zunächst die Expression und Induzierbarkeit des konstitutiv exprimierten hsc70 und des induzierbaren hsp70 in peripheren Blutzellen bei Patienten mit länger-manifestem Typ-I-Diabetes und bei gesunden Kontrollpersonen.

Hierbei zeigte sich im Falle des hsc70 eine konstitutive Expression, die sich auch durch Hitzeschockbehandlung nicht signifikant änderte und keine Unterschiede zwischen Erkrankten und Gesunden aufwies.

Im Falle des induzierbaren hsp70 zeigte sich eine ausgeprägte Induzierbarkeit des in der unbehandelten Kontrolle kaum nachweisbaren Proteins durch Hitzeschockbehandlung.

Die Induzierbarkeit von hsp70 bei Patienten mit längermanifestem Typ-I-Diabetes entsprach der Induzierbarkeit bei den Kontrollpersonen.

Diese Ergebnisse schließen eine Störung im Sinne einer grundsätzlich defizitären Stressantwort durch hsp70 aus.

Es ist jedoch bekannt, dass die zum Diabetes führende Insulitis in ihrem Verlauf verschiedene Phasen durchläuft und nach der Manifestation der Krankheit mangels Substrat zum Erliegen kommt.

Es erschien also denkbar, dass sich die Expression/Induzierbarkeit von hsp70 im Verlauf der Erkrankung verändert.

Um die Frage zu klären, ob es während der Ausbildung der Krankheit unter bestimmten Voraussetzungen zu einem temporären Defizit der Stressantwort kommt, wurden Patienten mit neu manifestem Typ-I-Diabetes am Tage der Diagnosestellung der Krankheit untersucht.

Hier zeigte sich für die Expression des konstitutiven hsc70 ein ähnliches Ergebnis wie bei den längermanifest Erkrankten.

Die Expression von hsp70 beim neumanifesten Patienten mit Typ-I-Diabetes zeigt 18h nach Hitzeschockbehandlung einen der gesunden Kontrollpersonen vergleichbaren Wert, zieht man jedoch die Werte 6h nach Stressbehandlung heran, fällt ein ca. 75% geringere Expression von hsp70 auf.

Damit ergibt sich ein Unterschied in der Zeitkinetik der Induzierbarkeit von hsp70 bei neumanifesten Patienten mit Typ-I-Diabetes, im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen. Beim neumanifest Erkrankten findet sich ein wesentlich langsamerer Anstieg der hsp70-Expression bei Stress. Dieser Unterschied scheint sich gemäß der Ergebnisse aus 3.2.3 / 3.2.4 in den ersten Tagen der Erkrankung noch zu verstärken, in der Untersuchung 8 Tage nach erstmaliger Diagnose findet sich eine insgesamt erniedrigte Expression von hsp70 beim Patienten mit Typ-I-Diabetes im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen.

Mögliche Mechanismen dieser unterschiedlichen Expression/Induzierbarkeit von hsp70 bei neumanifesten Patienten mit Typ-I-Diabetes und Kontrollpersonen einerseits sowie neumanifesten und längermanifesten Erkrankten andererseits sollen nun im folgenden diskutiert werden.

4.2.1 Die genetische Ebene

Zwei Untersuchungen der Verteilung der verschiedenen Allele (8,5 und 9,0 kb) des hsp70-Gens bei Diabetikern und Gesunden zeigten ein signifikant häufigeres Vorkommen des 8,5 kb-Typs bei den Diabetikern (**Caplen et al., 1990; Pugliese et al., 1992**), jedoch kann diese Assoziation zum Typ-I-Diabetes über eine enge Kopplung zum HLA-Genkomplex erklärt werden

In den eingangs bereits erwähnten Untersuchungen von **Bellmann et al. (1997)** zeigten sich Unterschiede in der hsp70-Expression nicht nur zwischen BB-Ratten und nicht-diabetischen Stämmen, sondern auch zwischen zwei verschiedenen BB-Rattenstämmen, von denen der eine einen Diabetes ausbildet (diabetes-prone), der andere jedoch nicht (diabetes-resistant).

Diese beiden Stämme sind genetisch mit Ausnahme eines Diabetesrisikogens nahezu vollkommen identisch (**Butler et al., 1983; Jacob et al., 1992**).

Es finden sich also Hinweise in der Literatur auf eine mögliche Beteiligung von hsp70 in der Pathogenese des Typ-I-Diabetes im Sinne einer genetisch bedingten Veränderung der Stressantwort, insbesondere des hsp70, hin (s.o. **Bellmann et al., 1997, Butler et al., 1983; Jacob et al., 1992**).

Da die vorliegenden Untersuchungen an Patienten mit längermanifestem Typ-I-Diabetes keine Unterschiede in der Expression/Induzierbarkeit von hsp70 im Vergleich mit

gesunden Kontrollpersonen zeigen, erscheint ein grundsätzliches, genetisch bedingtes Defizit in der hsp70-Synthese und damit in der Stressantwort bei Patienten mit Typ-I-Diabetes nicht zu bestehen. Dennoch muss es einflussnehmende Faktoren auf die Expression/Induzierbarkeit von hsp70 beim Patienten mit Typ-I-Diabetes mellitus geben, da sich zum Zeitpunkt der Krankheitsmanifestation und im frühen Krankheitsverlauf Unterschiede in der Expression/Induzierbarkeit von hsp70 zwischen Patienten und gesunden Kontrollpersonen finden.

4.2.2 Die metabolische Ebene

Bei Manifestation des Typ-I-Diabetes bestehen in der Regel ausgeprägte metabolische Störungen des Kohlenhydrat-, Lipid- und Eiweißstoffwechsels, sowie daraus resultierende Störungen des Säure-Base-Haushaltes.

Im Rahmen der Entgleisung des Kohlenhydratstoffwechsels durch den Insulinmangel kommt es zu vermehrter Glukoneogenese, die in Kombination mit der verminderten Glukose-utilisation das Auftreten einer Hyperglykämie hervorruft. Im Fettstoffwechsel bewirkt der Insulinmangel eine gesteigerte Lipolyse über die Triglyceridsynthese sowie eine erhöhte Produktion von Ketonkörpern in der Leber mit der Konsequenz einer zunehmenden Ketoazidose. Der Proteinstoffwechsel führt durch eine Zunahme der Proteolyse und durch das Überwiegen derselben über die Proteinsynthese zu einer katabolen Stoffwechsellage.

Es ist vorstellbar, dass solche umfangreichen metabolischen Veränderungen sich auch auf die Expression/Induzierbarkeit von Stressproteinen, wie sie hier beobachtet wurden, auswirken.

So zeigten beispielsweise **Cowley et al.** (1995) eine erhöhte Expression von hsp70 in Markzellen der Niere bei erhöhter Plasmaosmolalität im Sinne eines osmotischen Stresses.

Bei Transplantation von Inselzellen unter die Nierenkapsel von hyper- und normoglykämischen Mäusen fanden **Sandberg et al.** (1995) aber keine Auswirkungen der Hyperglykämie auf die hsp70-Expression, die in beiden Gruppen 3 Tage nach Transplantation deutlich geringer als in einer Kontrollgruppe von in vitro kultivierten Inselzellen war.

Die oben genannten Untersuchungen von **Cowley** und **Sandberg** weisen darauf hin, dass metabolische Ausnahmesituationen im Sinne eines metabolischen Stresses die Expression von hsp70 verändern können.

Um genauer zu untersuchen, ob es sich bei der verminderten Induzierbarkeit von hsp70 bei neu manifesten Diabetikern am Tage der Diagnosestellung um einen Effekt der

unzweifelhaft zum Untersuchungszeitpunkt vorliegenden metabolischen Störung handelt, wurden ein Teil der Patienten 1 Woche später, nach Normalisierung der Stoffwechselsituation nach-untersucht. Auch zu diesem Zeitpunkt zeigten sich weiterhin Unterschiede zu der gesunden Kontrollgruppe. Es zeigt sich eine Normalisierung der Induzierbarkeit des Stressproteins, d. h. bereits 6 h nach Hitzestimulation hat die hsp70-Expression ihr Maximum erreicht, es fällt jedoch auf, dass dieses Maximum jetzt auch 18h nach Stimulation um ca. 50% gegenüber der Kontrollgruppe reduziert ist. Diese weiterhin bestehenden Unterschiede weisen darauf hin, dass metabolische Ursachen zumindest nicht allein verantwortlich für die veränderte Expression/Induzierbarkeit sein können, da die Veränderungen nach Normalisierung der Stoffwechselsituation nicht komplett reversibel sind.

4.2.3 Die immunologische Ebene

Der Einfluss immunologischer Faktoren, z.B. von Zytokinen auf die Stressantwort der Zelle ist bereits Gegenstand verschiedener Untersuchungen gewesen.

In humanen myelocytären Zellen findet sich nach Stimulation der Zellen mit $\text{TNF-}\alpha$ eine vermehrte Expression von hsp70 mRNA, wogegen Stimulation mit $\text{IFN-}\gamma$ keinen Effekt hat (**Fincato et al., 1991**).

Untersuchungen von **Schett et al. (1998)** zeigen eine Erhöhung der Expression von hsp70 in kultivierten Synovialzelllinien (SFC) nach Stimulation mit $\text{IL-1}\alpha$, IL-6 und $\text{TNF-}\alpha$. Auch sie wiesen keinen Einfluss von $\text{IFN-}\gamma$ auf die hsp70-Expression nach.

Gegenstand beider Untersuchungen war jedoch nur die hsp70-Induktion durch die Zytokine selbst.

Die hier vorliegenden Daten zeigen keine Induktion von hsp70 durch das Th1-Zytokin $\text{IFN-}\gamma$, wie auch durch die Th2-Zytokine IL-4 und $\text{TGF-}\beta$. Demnach können nur die unmittelbar mit Entzündungsreaktionen verbundenen Zytokine IL-1 , IL-6 und $\text{TNF-}\alpha$ eine Expression von hsp70 direkt bewirken. Die immunregulatorischen Th1, bzw. Th2-Zytokine $\text{IFN-}\gamma$, IL-4 oder $\text{TGF-}\beta$ können dies nicht. Dafür fand sich eine regulatorische Wirkung auf die Induzierbarkeit von hsp70: In Gegenwart der Zytokine ergab sich eine erhöhte Induzierbarkeit von hsp70 nach Hitzestimulation ($\text{TGF-}\beta$), bzw. eine erniedrigte Induzierbarkeit ($\text{IFN-}\gamma$). IL-4 zeigte keinen modulierenden Effekt.

Vorstellbar ist, dass in den entsprechenden Zellen direkte hemmende/stimulierende Wirkungen der Zytokine auf die Regulation der Biosynthese von hsp70 vorliegen. Etwaige Ziele könnten hier etwa die Transkriptionsfaktoren HSF1 und HSF2 als Regulatoren der stressinduzierten Biosynthese von hsp70 sein (**Fernandes et al., 1994; Sistonen et al., 1994**).

Eine andere Möglichkeit ist, dass durch Stimulation einzelner Zellen in der Kultur von diesen weitere Zytokine freigesetzt wurden und erst durch diese Wechselwirkungen und gegenseitige Beeinflussung der Leukozyten, angestoßen durch das jeweils künstlich zugesetzte Zytokin, die beobachtete Änderung der Stressantwort erfolgt ist.

Diese Beobachtungen zur Beeinflussung der Expression/Induzierbarkeit von hsp70 durch Th1 und Th2-Zytokine bieten einen möglichen Erklärungsansatz für die im ersten Teil der Arbeit gemachten Beobachtungen zur verminderten Induzierbarkeit von hsp70 beim Patienten mit neu manifestem Typ-I-Diabetes einerseits und zur Veränderung der Stressantwort in der Zeit kurz nach der Manifestation bis hin zur Normalisierung einige Monate später.

4.3 Effekt von Th1/Th2-Zytokinen auf die Expression von hsp70 beim Typ-I-Diabetes

In Tiermodell der NOD-Maus beobachtet man eine frühe benigne, nicht destruiende Form der Insulitis, bei der eine Beteiligung von Th2-Zellen dominiert, erkennbar an der vor-wiegenden Expression von Th2-Zytokinen wie IL-4 und IL-10. Eine Betazell-destruktive Insulitis ist im Gegensatz dazu mit der erhöhten Expression von Th1-Zytokinen assoziiert.

Betrachtet man den natürlichen Verlauf einer durch Cyclophosphamid-Behandlung ausgelösten Diabetesentwicklung bei der NOD-Maus, so findet sich zunächst eine Th2-dominierte Peri-Insulitis ohne Zerstörung der Inselzellen (**Rabinovitch, 1994**), die nach Initiierung der Produktion von IL-12 durch Makrophagen in eine Th1-dominierte, destruktive Intra-Insulitis mündet, an deren Ende die Ausbildung eines Diabetes steht. Im Modell der BB-Ratte unterscheidet sich der natürliche Verlauf der Insulitis deutlich, hier gibt es nur eine sehr gering ausgeprägte Peri-Insulitis. Noch bevor sich eine nachweisbare Insulitis ausgebildet hat findet sich im Vergleich mit Langerhansschen Inseln anderer, nicht diabetischer Rattenstämme, bereits eine erhöhte Expression von Th1 und Th2-Zytokinen, IFN- γ und IL-10, was das Konzept einer frühen, so genannten „single-cell-insulitis“ unterstützt. 20 Tage später, im Stadium der manifesten Intra-Insulitis, gekennzeichnet durch die massive Infiltration der Inseln durch mononukleäre Zellen, findet sich eine Heraufregulation von IFN- γ und Herunterregulation von IL-10, also eine Änderung der TH1/Th2-Balance zu einem Überwiegen der Th1-Aktivität. Der Grad der Insulitis korreliert hierbei interessanterweise nicht mit der Höhe der IFN- γ -Level,

sondern mit der Niedrigkeit des IL-10-Levels, hier scheint also das Verhältnis von Th1 zu Th2-Zytokinen mehr Aussagekraft zu haben als die absolute Menge. (**Kolb et al., 1996**). Auch bei menschlichen Zellen zeigten Untersuchungen an mit Phytohämagglutinin stimulierten Vollblutkulturen von Patienten mit neu manifestem Typ-I-Diabetes signifikant höhere Expression der Th1-Zytokine IFN- γ und TNF- α im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen bei einer gleich hohen Expression der Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 (**Kallmann et al., 1997**).

Eine weitere Untersuchung schließlich vergleicht die T-Zellreaktionsmuster eineiiger Zwillinge, von denen der eine Geschwisteranteil an Typ-I-Diabetes erkrankt ist, der andere jedoch nicht. Nach Stimulation von Vollblutkulturen mit hsp60, Phytohämagglutinin oder Staphylokokkenenterotoxin B wurden die Zytokinsekretionsmuster mittels Sandwich-ELISA bestimmt. Es zeigten sich keine krankheitsassoziierten Unterschiede in der Höhe der Th1-Zytokinantwort (Analyse von IFN- γ und TNF- α), die IL-10-Antwort auf hsp60 war jedoch ebenso wie die IL-4-Antwort auf Phytohämagglutinin bei den diabetischen Zwillingsteilen signifikant geringer als bei den jeweiligen gesunden Geschwistern (**Kallmann et al., 1999**).

4.4 Abschließende Betrachtung zur Rolle von hsp70 beim Typ-I-Diabetes

Der Expression von hsp70 scheint, wie aus der gegenwärtigen Literatur hervorgeht, eine Rolle bei der Entwicklung eines Typ-I-Diabetes zuzukommen:

- Hitzeschockbehandlung vermag Inselzellen der Ratte vor der Zerstörung durch Betazelltoxine wie NO, Sauerstoffradikale und Streptozotocin zu schützen. (**Bellmann et al., 1995**).
- Dieser Effekt ist dem Hitzeschockprotein hsp70 zuzuordnen (**Bellmann et al., 1996**). An einer humanen Betazelllinie konnte die entscheidende Rolle von hsp70 bei der Widerstandsfähigkeit gegen das Betazelltoxin NO ebenfalls gezeigt werden (**Burkart und Liu et al., 2000**).
- Im Tiermodell der BB-Ratte konnte eine verminderte hsp70-Stressantwort mit der Konsequenz einer erhöhten Vulnerabilität der Inselzellen gegen Betazelltoxine bewiesen werden (**Bellmann et al., 1997**).

Eine, vermutlich ursächliche, Beteiligung von Th1-Zellen, bzw. –Zytokinen legen ebenfalls verschiedenen Untersuchungen nahe:

- Versuche an NOD-Mäusen und BB-Ratten konnten zeigen, dass bei der zum Diabetes führenden Intra-Insulitis in den Inselzellen des Pankreas Th1-Zytokine, bzw. eine Verschiebung der Th1/Th2-Balance in Richtung Th1, eine entscheidende Rolle spielen (**Rabinovitch, 1994; Kolb et al., 1996**).
- Untersuchungen von Inselzellantigen-spezifischen T-Zellklonen prädiabetischer NOD-Mäuse zeigen mit der Produktion von IFN- γ eine ausgeprägte Th1-Lastigkeit in ihrem Zytokinsekretionsmuster (**Wegmann et al., 1994; Daniel et al., 1995**).
- Auch beim Menschen finden sich signifikante, krankheitsassoziierte Unterschiede in den Zytokinsekretionsmustern im Sinne einer Verschiebung der Th1/Th2-Balance in Richtung Th1 beim Patienten mit Typ-I-Diabetes (**Kallmann et al., 1997**). Dass diese Unterschiede nicht genetisch bedingt sind zeigt die Untersuchung für Typ-I-Diabetes diskordanter, monozygoter Zwillinge (**Kallmann et al., 1999**).

Dies liegt umso näher, als dass in der vorliegenden Arbeit erstmals Unterschiede in der Expression/Induzierbarkeit von hsp70 bei menschlichen Diabetikern und Gesunden demonstriert werden konnten. Diese Unterschiede können, wie oben dargelegt, aufgrund ihrer nur temporären Nachweisbarkeit und nachweisbarer fehlender Konkordanz bei Zwillingen nicht ausschließlich genetisch bedingt sein, auch eine metabolische Ursache erscheint unwahrscheinlich.

Die Tatsache, dass bei Patienten mit Typ-I-Diabetes eine bekannte Verschiebung der Th1/Th2-Balance in Richtung Th1 besteht, und in der Arbeit gezeigt werden konnte, dass Stimulation peripherer Blutzellen von Gesunden in vitro mit Th1-Zytokinen eine abgeschwächte, bzw. Stimulation mit Th2-Zytokinen eine verstärkte Stressantwort bedingt, legt als Erklärung für die Befunde eben dieses Phänomen der Beeinflussung der Stressantwort der Zelle auch in vivo nahe.

Diese Hypothese würde auch den passageren Charakter der Änderung der Stressgen-expression beim Diabetiker erklären.

Außerdem bietet sie einen Einblick in einen möglichen Pathomechanismus, der den destruierenden Verlauf der Insulitis näher erklärt:

Eine wichtige Rolle bei der Zerstörung der Betazellen wird den aktivierten Sauerstoffradikalen, dem Stickstoffmonoxid und den Zytokinen IL-1 und TNF- α zugeschrieben. Hierbei handelt es sich um Sekretionsprodukte von Makrophagen (**Kröncke et al., 1991**), deren Aktivierung IFN- γ -abhängig ist, und deren erhöhter Gehalt in Langerhansschen Inseln während der Insulitis in verschiedenen Untersuchungen gezeigt wurde (**Rabinovitch et al., 1994; Kolb et al., 1996**). So wären, unter Berücksichtigung der

Ergebnisse dieser Arbeit, der Th1/Th2-Imbalance im Verlauf der Insulitis gleich zwei, einander verstärkende Effekte zuzuschreiben: 1. Die Unterhaltung der Insulitis durch Makrophagen-Aktivierung und 2. eine Verstärkung der Effektivität der Inselzellzerstörung durch die Schwächung von zelleigenen Abwehrmechanismen der Inselzellen durch Unterdrückung der Induzierbarkeit und damit der Expression von hsp70.

Hieraus ergäbe sich ein regelrechter Circulus vitiosus, der in der vollständigen Zerstörung der Betazellen und damit der Manifestation des Diabetes endet.

Kritisch muss hier jedoch angemerkt werden, dass die Ergebnisse der Zwillingsstudie (**Kallmann et al., 1999**) auch noch Jahre nach der Manifestation des Typ-I-Diabetes ein Ungleichgewicht der Th1/Th2-Balance zeigen, dieses ist jedoch möglicherweise nur zum Zeitpunkt der floriden Insulitis ausgeprägt genug, um Veränderungen im Bereich der Stressantwort zu verursachen.

Hierfür sprechen Ergebnisse aus einer Untersuchung des Serums von neumanifesten Diabetikern auf das von Makrophagen produzierte Zytokin IL-18, welches in T-Lymphozyten die Bildung von IFN- γ stimuliert. Hier zeigten sich bei den neumanifesten Diabetikern und gesunden Kontrollen keine erhöhten Serumlevel von IL-18, wohl aber im Serum von Verwandten der Patienten, die selbst ein hohes Risiko für die Ausbildung der Erkrankung hatten.

5. Zusammenfassung

Während der Pathogenese des Typ-I-Diabetes kommt es zu einer Infiltration der Langerhansschen Inseln des Pankreas mit Immunzellen im Sinne einer progredienten Insulitis, die mit der Zerstörung der Inselzellen durch toxische Mediatoren der Immunzellen endet.

Ein natürlicher Abwehrmechanismus gegen eine inflammatorische Attacke ist das Hitzeschockprotein hsp70.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob sich, ähnlich wie im Tiermodell der BB-Ratte, beim Patienten mit Typ-I-Diabetes mellitus eine Einschränkung dieses Abwehrmechanismus im Sinne einer defizitären Stressantwort findet.

Hierzu wurden periphere mononukleäre Blutzellen von Patienten mit Typ-I-Diabetes mellitus und Gesunden auf die Induzierbarkeit und Expression von hsp70 untersucht.

Es konnte erstmals beschrieben werden, dass zum Zeitpunkt der Manifestation der Krankheit und auch 8 Tage später, also im kurzfristigen Krankheitsverlauf, eine geringere Induzierbarkeit, bzw. Expression von hsp70 bei Patienten mit Typ-I-Diabetes im Gegensatz zu Gesunden besteht. Diese Unterschiede bestehen im weiteren Verlauf der Erkrankung nicht mehr.

Hierfür, und insbesondere für den temporären Charakter der Veränderungen, sollte in weiteren Untersuchungen ein möglicher Erklärungsansatz gefunden werden.

Erstmals wurde gezeigt, dass die Inkubation humaner peripherer mononukleärer Blutzellen mit Th1 und Th2-Zytokinen eine Änderung der Stressantwort der Zellen nach Hitzeschockbehandlung bedingt.

Eine Verschiebung der Th1/Th2-Balance in Richtung Th1 reduzierte die Induzierbarkeit von hsp70, während eine Verschiebung in Richtung Th2 einen verstärkenden Effekt auf die hsp70-Expression hatte.

Diese geänderte Stressantwort durch Zytokinstimulation lässt sich sinnvoll mit den Ergebnissen der veränderten Stressantwort der neumanifesten Typ-I-Diabetiker verknüpfen, da ein in vitro dem des neumanifesten Patienten mit Typ-I-Diabetes nachempfundenen Zytokinmilieu einen ähnlichen Effekt auf die Stressgenexpression zeigt, wie er beim neumanifesten Patienten beschrieben wurde.

6. Literaturverzeichnis

Abravaya K, Myers MP, Murphy SP, Morimoto RI. The human heat shock protein hsp70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression. *Genes Dev* 1992; 13:1983-97

Amin J, Ananthan J, Voellmy R. Key features of heat shock regulatory elements. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 3761-9

Appels B, Burkart V, Kantwerk-Funke G, Funda J, Kolb-Bachofen V, Kolb H. Spontaneous cytotoxicity of macrophages against pancreatic islet cells. *J Immunol* 1989; 142: 3803-8

Beckmann RP, Mizzen LA, Welch WJ. Interaction of hsp70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly events. *Science Wash DC* 1990; 248: 850-4

Bellmann K, Hui L, Radons J, Burkart V, Kolb H. Low stress response enhances vulnerability of islet cells in diabetes-prone BB rats. *Diabetes* 1997; 46:232-6

Bellmann K, Jäättelä M, Wissing D, Burkart V, Kolb H. Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Lett* 1996; 391: 185-8

Bellmann K, Wenz A, Radons J, Burkart V, Kolb H. Heat shock induces resistance in rat pancreatic islet cells against nitric oxide, oxygen radicals and streptozotocin toxicity in vitro. *J Clin Invest* 1995; 95: 2840-5

Birk OS, Elias D, Weiss AS, Rosen A, van der Zee R, Walker MD, Cohen IR. NOD mouse diabetes: the ubiquitous mouse hsp60 is a beta cell target antigen of autoimmune T cells. *J Autoimmunity* 1996; 9:159-66

Botazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 1974; 2(7892): 1279-83

Brenner HH, Burkart V, Rothe H, Kolb H. Oxygen radical production is increased in macrophages from diabetes prone BB-rats. *Autoimmunity* 1993; 15: 93-8

Burkart V, Koike T, Brenner HH, Kolb H. Oxygen radicals by the enzyme xanthine oxidase lyse rat pancreatic islet cells in vitro. *Diabetologia* 1992; 35: 1028-34

Burkart V, Liu H, Bellmann K, Wissing D, Jäättelä M, Cavallo MG, Pozzilli P, Briviba K, Kolb H. Natural resistance of human beta cells towards nitric oxide is mediated by heat shock protein 70. *J Biol Chem* 2000; 275: 19521-8

Butler L, Guberski DL, Like AA. Genetic analysis of the BB/W diabetic rat. *Can J Genet Cyt* 1983; 25: 7-12

Caplen NJ, Patel A, Millward A, Campbell RD, Ratanachaiyavong S, Wong FS, Demaine AG. Complement C4 and heat shock protein70 genotypes and type-I-diabetes mellitus. *Immunogenetics* 1990; 32: 427-30

Castano I, Eisenbarth GS. Type-I-Diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse and rat. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 647-79

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

Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol* 1999; 162: 3212-9

Chirico WJ, Waters MG, Blobel G. 70k heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature Lond* 1988; 332: 805-10

Chuang LM, Tzuu-Shuh J, Huey-Peir W, Tong-Yuan T, Boniface JL. A rapid method to study heat shock protein 70-2 gene polymorphism in insulin-dependant diabetes mellitus. *Pancreas* 1996; 13: 268-72

Corbett JA, McDaniel ML. Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of beta cells? possible therapeutic interventions in IDDM. *Diabetes* 1992; 41: 897-03

Cowley BD, Muesel MJ, Douglass D, Wilkins W. In vivo and in vitro osmotic regulation of hsp70 and prostaglandin synthase gene expression in kidney cells. *Am J Physiol* 1995; 269: 854-62

Craig EA. The heat shock response. *CRC Crit Rev Biochem* 1985; 18: 239-80

Daniel D, Gill RG, Schloot N, Wegmann D. Epitope specificity, cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T cell clones isolated from NOD mice. *Eur J Immunol* 1995 ; 25: 1056-62

Deshaies RJ, Koch BD, Weiner-Washburne M, Craig E, Schekman R. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature Lond* 1988; 332: 800-5

Eisenbarth GS. Type-I-Diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 1986; 314: 1360-68

Eizirik DL, Welsh M, Strandell E, Welsh N, Sandler S. Interleukin-1 β depletes insulin messenger ribonucleic acid and increases the heat shock protein hsp70 in mouse pancreatic islets without impairing the glucose metabolism. *Endocrinol* 1990; 127: 2290-7

Elias D, Marcus H, Reshef T, Albumin V, Chen IR. Induction of diabetes in standard mice by immunization to the p277 peptide of a 60 kDa heat shock protein. *Eur J Immunol* 1995; 25 : 2851-57

Elias D, Prigozin H, Polak N, Rapaport M, Lohse A, Cohen IR. Autoimmune diabetes induced by the beta-cell toxin streptozotocin: Immunity to the 60 kDa heat shock protein and to insulin. *Diabetes* 1994; 43: 992-98

Ellis RJ, van der Vies SM, Hemmingsen SM. The molecular chaperone concept. *Biochem Soc Symp* 1989; 55: 145-53

Fernandes M, Xiao H, Lis JT. Fine structure analyses of the drosophila and *Saccharomyces* heat shock factor-heat shock element interactions. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 167-73

Ferris DK, Harel-Bellan A, Morimoto RI, Welch WJ, Farrar WL. Mitogen and lymphokine stimulation of heat shock proteins in T Lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 61-74

Fincato G, Polentarutti N, Sica A, Mantovani A, Colotta F. Expression of a heat-inducible gene of the HSP70 family in human myelomonocytic cells: regulation by bacterial products and cytokines. *Blood* 1991; 77: 579-86

Foulis AK, McGill M, Farquharson MA. Insulitis in type-I-diabetes mellitus in man. *J Pathol* 1991; 164: 97-103

Goff SA, Goldberg AL. Production of abnormal proteins in E.coli stimulates transcription of ion and other heat shock genes. *Cell* 1987; 41: 587-95

Grankvist K, Marklund SL, Täljedal IB. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide-dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues of the mouse. *Biochem J* 1981; 199: 393-8

Green EA, Flavell RA. Tumor necrosis factor-alpha and the progression of diabetes in non-obese diabetic mice. *Immunol Rev* 1999; 169: 11-22

Günther E, Kiesel U, Kolb H, Krawczak M, Rothermel E, Wurst W. Genetic Analysis of susceptibility to diabetes mellitus in F2-hybrids between diabetes-prone BB and various MHC-recombinant cingenic rat-strains. *J Autoimmun* 1991; 4: 543-51

Hanenberg H, Kolb-Bachofen V, Kantwerk-Funke G, Kolb H. Macrophage infiltration precedes and is prerequisite for lymphocytic insulitis in pancreatic islets of pre-diabetic BB-rats. *Diabetologia* 1989; 32: 126-34

Helquist S, Zumsteg UW, Spinas GA. Repetitive exposure of pancreatic islets to interleukin-1 β . An in vitro model of pre-diabetes? *Autoimmunity* 1991; 10: 311-8

Herold G. Innere Medizin. Köln, *Arzt und Information* 1997

Hunt C, Morimoto RI. Conserved features of eucaryotic hsp70 genes revealed by comparison with nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 6455-9

Jäättelä M, Wissing D. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. *Ann Med* 1992; 24: 249-58

Jacob HJ, Pettersson A, Wilson D, Mao Y, Lernmark A, Lander ES: Genetic dissection of autoimmune type-I-diabetes in the BB rat. *Nat Genet* 1992; 2: 56-60

Kallmann BA, Hütter M, Tubes M, Feldkamp J, Bertrams J, Gries FA, Lampeter EF, Kolb H. Systemic bias of cytokine production toward cell-mediated immune regulation in IDDM and toward humoral immunity in Graves' disease. *Diabetes* 1997; 46: 237-43

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

Kaufmann DL, Clare-Salzler 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. *Nature* 1993; 336: 69-2

Kawaguchi Y, Ikegami H, Fukuda M, Fujioka Y, Shima K, Ogiwara T. Polymorphism of the hsp70 gene is not associated with type-I-diabetes mellitus in japanese. *Diabetes Res Clin Pract* 1993 ; 21 : 103-7

Kelley PM, Schlesinger MJ. The effects of amino acid analogs and heat shock gene expression in chicken embryo fibroblasts. *Cell* 1978; 19: 1277-86

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

Kolb H. Diabetes. In: Gerns D, Kalden JR, Resche K (Hrsg.): *Immunologie*, Thieme Stuttgart, 4. Auflage 1997; S. 440-47

Kolb H. Ätiopathogenese des Typ-I-Diabetes. In: Berger M (Hrsg): *Diabetes mellitus*, Urban&Fischer München/Jena, 2. Auflage 2000; S. 247-52

Kolb H, Burkart V, Appels B, Hanenberg H, Kantwerk.Funke G, Kiesel U, Funda J, Schraermeyer U, Kolb-Bachofen V. Essential contribution of macrophages to islet cell destruction in vivo and in vitro. *J Autoimmun* 1990; 3: 117-20

Kolb H, Wörz-Pagenstert U, Kleemann R, Rothe H, Rowsell P, Scott FW. Cytokine gene expression in the BB rat pancreas: natural course and impact of bacterial vaccines. *Diabetologia* 1996; 39: 1448-54

Kolb-Bachofen V, Epstein S, Kiesel U, Kolb H. Low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. Electron microscopy reveals single-cell insulinitis before diabetes onset. *Diabetes* 1988; 37: 21-7

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

Lee KU, Amano K, Yoon JW. Evidence for initial involvement of macrophage in development of insulinitis in NOD mice. *Diabetes* 1988; 37:989-91

Leung PSC, Gershwin ME. The immunobiology of heat shock proteins. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1991; 1: 23-30

Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988; 22: 631-677

Malaisse WJ, Malaisse Lagae F, Sener A, Pipeleers DG. Determinants of the selective cytotoxicity of alloxan to the pancreatic B cell. *Pro Natl Acad Sci Usa* 1982; 79: 927-30

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

Moosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretions lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-73

Morimoto RI, Sarge KD, Abravaya K. Transcriptional regulation of heat shock genes. *J Biol Chem* 1992; 267: 21987-90

Morimoto RI: Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 1998; 12: 3788-96

Nakai A, Morimoto RI. Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 1983-97

Nerup J, Mandrup-Paulsen T, Molvig J. The HLA-IDDM association: Implications for etiology and pathogenesis of IDDM. *Diabet Metab Rev* 1987; 3:779-02

Nerup J, Mandrup-paulsen T, Molvig J, Helqvist S, Wogensen L, Egeberg J. Mechanism of pancreatic beta-cell destruction in type-I-diabetes. *Diabetes Care* 1988; 11: 16-23

Nevins JR. Induction of the synthesis of a 70.000 dalton mammalian heat shock protein by the adenovirus E1A gene product. *Cell* 1982; 29: 913-9

Oschilewski U, Kiesel U, Kolb H. Administration of silica prevents diabetes in BB-rats. *Diabetes* 1985; 34: 197-9

Oschilewski U, Schwab E, Kiesel U, Opitz U, Stünkel K, Kolb-Bachofen V, Kolb H. Administration of silica or monoclonal antibody to Th1 prevents low-dose streptozotocin induced diabetes in mice. *Immunol Lett* 1986; 12: 289-94

Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati o, Raghu PK, Paquette TL. Insulin antibodies in insulin-dependant diabetics before insulin treatment. *Science* 1983; 222: 1337-39

Pelham HRB. Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *EMBO J* 1984; 3: 3095-100

Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 727-77

Pierce SK. Molecular chaperones in the processing and presentation of antigen to helper T cells. *Experientia* 1994; 50: 1026-30

Prowse SJ, Lafferty J, Nomikos JN, Carotenuto P. The pathogenesis of spontaneous diabetes. *Annu Inst Pasteur* 1986 ; 137D : 459-62

Pugliese A, Awdeh ZL, Galluzo A, Yunis EJ, Alper CA, Eisenbarth GS. No independent association between hsp70 gene polymorphism and IDDM. *Diabetes* 1992; 41: 788-91

Pukel C, Baquerizo H, Rabinovitch A. Destruction of rat islet cell monolayers by cytokines: synergistic interactions of interferon- γ , tumor necrosis factor α , lymphotoxin and interleukin-1. *Diabetes* 1988; 37: 133-6

Rabindran SK, Giorgi G, Clos J, Wu C. Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, HSF1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6906-10

Rabinovitch A. Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. *Diabetes* 1994; 43:613-621

Res MPC, Schaar CG, Breedveld FC. Synovial fluid T cell reactivity against 65 kDa heat shock protein of mycobacteria in early chronic arthritis. *Lancet* 1988; 27: 478-80

Rippmann F, Taylor WR, Rothbard JB, Green NM. A hypothetical model for the peptide binding domain of hsp70 based on the peptide binding domain of HLA. *EMBO J* 1991; 10: 1053-9

Rossini AA, Greiner DL, Friedmann HP, Mordes JP. Immunopathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes Rev* 1993; 1: 43-75

Rothmann JE. Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells. *Cell* 1989; 59: 591-01

Sandberg JO, Marquis B, Jansson L, Karlsten R, Korsgren O. Transplantation of fetal porcine pancreas to diabetic or normoglycemic nude mice. Evidence of a rapid engraftment process demonstrated by blood flow and heat shock protein 70 measurements. *Transplantation* 1995; 59: 1665-9

Schett G, Redlich K, Xu Q, Bizan P, Gröger M, Tohidast-Akrad M, Kiener H, Smolen J, Steiner G. Enhanced expression of heat shock protein 70 (hsp70) and heat shock factor 1 (HSF1) activation in rheumatoid arthritis synovial tissue. Differential regulation of hsp70 expression and HSF1 activation in synovial fibroblasts by proinflammatory cytokines, shear stress, and antiinflammatory drugs. *J Clin Invest* 1998; 102: 302-11

Schuetz TJ, Gallo GJ, Sheldon L, Tempst P, Kingston RE. Isolation of cDNA for HSF2: evidence for two heat shock factor genes in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6911-5

Siegenthaler W, Kaufmann W, Hornbostel H, Waller HD. *Lehrbuch der Inneren Medizin. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 2. Auflage 1987*

Sistonen L, Sarge KD, Morimoto RI. Human heat shock factors 1 and 2 are differently activated and can synergistically induce hsp70 gene transcription. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 2087-99

Southern C, Schulster D, Green IC. Inhibition of insulin secretion by interleukin-1 β and tumor necrosis factor α via an L-arginine-dependant nitric oxide generating mechanism. *FEBS* 1990; 276: 42-4

Spector NL, Freedman AS, Freeman G, Segil J, Whitman JF, Welch WJ, Nadler LM. Activation primes human B-lymphocytes to respond to heat shock. *J Exp Med* 1989; 170: 1763-8

Sumoski W, Baquerizo H, Rabinovitch A. Oxygen free radical scavengers protect rat islet cells from damage by cytokines. *Diabetologia* 1989; 32: 792-6

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

Velazquez JM, Lindquist S. hsp70: nuclear concentration during environmental stress: cytoplasmic storage during recovery. *Cell* 1984; 36: 655-63

Wegmann DR, Gill RG, Norbury-Glaser M, Schloot N, Daniel D. Analysis of the spontaneous T cell response to insulin in NOD mice. *J Autoimmun* 1994; 7: 833-43

Welch WJ. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev* 1992; 72: 1063-81

Welch WJ, Feramisco JR. Nuclear and nucleolar localization of the 72.000 dalton heat shock protein in heat shocked mammalian cells. *J Biol Chem* 1984; 259: 4501-10

Welch WJ, Feramisco JR. Rapid purification of mammalian 70.000-dalton stress proteins: affinity of the proteins for nucleotides. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 1229-37

Welsh N, Welsh M, Lindquist S, Eizirik DL, Bendtzen K, Sandler S. Interleukin-1 β increases the biosynthesis of the heat shock protein 70 and selectively decreases the biosynthesis of five proteins in rat pancreatic islets. *Autoimmunity* 1991; 9: 33-40

Wicker LS, Appel MC, Dotta F, Pressey A, Miller BJ, Delarato NG, Fischer PA, Boltz RC, Peterson LB. Autoimmune Syndroms 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* 1992; 176: 67-7

Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK. *Harrisons Principles of internal medicine*, International Edition, New York, McGraw Hill, 12. Auflage 1991.

Winfield J, Jarjour W. Do stress proteins play a role in arthritis and autoimmunity? *Immunol Rev* 1991; 121: 193-220

Wu BJ, Kingston RE, Morimoto RI. Human hsp70 promotor contains at least two distinct regulatory domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 629-33

Yamagishi N, Nakayama K, Wakatsuki T, Hatayama T. Characteristic changes of stress protein expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 2001; 69: 2603-9

Zielaseck J, Jackson RA, Eisenbarth GS. The potentially simple mathematics of type-I-diabetes mellitus. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 52: 347-65

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

7. Danksagungen

Herrn Prof. Dr. H. Kolb danke ich sehr herzlich für die Betreuung, die Überlassung des Themas, die Gewährung der Arbeitsmöglichkeiten und die steten Hilfestellungen und anregenden fachlichen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. W. A. Scherbaum danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der Promotion am Deutschen Diabetes-Forschungsinstitut Düsseldorf.

Frau Dr. rer. nat. Kerstin Bellmann danke ich für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit und die intensive Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung meiner Experimente.

Ihr Engagement und ihre fachliche Kompetenz waren stets, auch aus der Ferne, eine grosse Hilfe für die Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Bei allen Mitarbeitern des Forschungsschwerpunktes Immunologie im Diabetes-Forschungsinstitut möchte ich mich für die gute und kollegiale Arbeitsatmosphäre sehr herzlich bedanken.

Ganz besonders danke ich meiner Freundin Nicole und meinen Eltern, die mich stets bestärkt haben, dies hier zu vollenden.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Germaschewski, Leif
geboren	12. Januar 1974
Geburtsort	Düsseldorf
Familienstand	ledig
Eltern	Germaschewski, Udo Germaschewski, Ute, geb. Herrmann

Ausbildung

1980-84	Katholische Grundschule Kaarst-Vorst
1984-93	Gymnasium Büttgen, Abitur am 15.06.1993
1994	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
1996	Physikum
1997	1. Staatsexamen
1999	2. Staatsexamen 1. Tertial des Praktischen Jahres in der Klinik für Hämatologie und Onkologie der HHU Düsseldorf 2. Tertial des Praktischen Jahres in der Klinik für Allgemein- und Unfallchirurgie / Herz-Thoraxchirurgie der HHU Düsseldorf 3. Tertial des Praktischen Jahres an der Klinik für Ophtalmologie der HHU Düsseldorf
2000	3. Staatsexamen am 28.11.2000
2001	Beginn der Tätigkeit als Arzt in Praktikum an der Klinik für Allgemein-, Thorax- und Unfallchirurgie des Domunikus-Krankenhauses Düsseldorf Heerdt
2002	Weiterbildungsassistent im Fach Chirurgie an der Klinik für Allgemein-, Thorax- und Unfallchirurgie des Domunikus-Krankenhauses Düsseldorf Heerdt

Zusammenfassung – Abstract

In Säugetierzellen wird durch unterschiedliche Stressoren die Expression von sogenannten Hitzeschockproteinen induziert. Hierbei handelt es sich um eine unspezifische Abwehrmaßnahme der Zelle, die zum Beispiel im Verlauf von Entzündungsreaktionen zu beobachten ist.

Während der Pathogenese des Typ-I-Diabetes mellitus kommt es zu einer progredienten Infiltration der Langerhansschen Inseln des Pankreas mit Immunzellen im Sinne einer Insulitis, die mit der Zerstörung der Inselzellen durch toxische Mediatoren der Immunzellen endet. Ein natürlicher Abwehrmechanismus gegen eine solche inflammatorische Attacke ist das Hitzeschockprotein hsp70.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sich in der Phase der Erstmanifestation der Krankheit eine defizitäre Stressantwort, die bereits im Tiermodell vorbeschrieben ist, auch in humanen peripheren Blutlymphozyten von Patienten mit neumanifestem Typ-I-Diabetes findet. Hierfür wurden Lymphozyten von Patienten mit Typ-I-Diabetes am Tage der Krankheitsmanifestation einem definierten Hitzestress ausgesetzt und anschließend auf die Expression und Induzierbarkeit von hsp70 untersucht.

Da die Veränderungen nur zeitlich begrenzt während der frühen Phase der Krankheit nachweisbar waren, wurde in weiteren Untersuchungen ein mögliches Modell für eine Beeinflussung der Expression und Induzierbarkeit von hsp70 entworfen.

Bekanntermaßen herrschen in der Phase der Insulitis der Langerhansschen Inseln unterschiedliche Zytokinmilieus, die *in vitro*, stark vereinfacht, nachempfunden wurden, und denen Lymphozyten gesunder Kontrollpersonen ausgesetzt wurden. Nach Hitzeschockbehandlung fanden sich nun auch hier signifikante Unterschiede in der Induzierbarkeit von hsp70. Ein Th1-lastiges Zytokinmilieu korrespondierte mit einer geringeren Induzierbarkeit von hsp70, während ein Th2-lastiges Zytokinmilieu die Induzierbarkeit von hsp70 erhöhte.

Diese geänderte Stressantwort durch Zytokinstimulation lässt sich sinnvoll mit den Ergebnissen der veränderten Stressantwort der neumanifesten Typ-I-Diabetiker verknüpfen, da ein *in vitro* dem des neumanifesten Patienten mit Typ-I-Diabetes nachempfundenen Zytokinmilieu einen ähnlichen Effekt auf die Stressgenexpression zeigt, wie er beim neumanifesten Patienten beschrieben wurde.