

Aus dem Deutschen Diabetes-Zentrum
Leibniz-Zentrum für Diabetes-Forschung
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Institut für Klinische Diabetologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Roden

Das Hitzeschockprotein DnaK vermittelt die Stimulation der Makrophagenaktivität
durch das autoantigene B-Ketten Insulinpeptid B11-23

Dissertation

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

vorgelegt von
Elias Blasius
2017

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

Gez: Elias Blasius

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Volker Burkart

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Sven Schinner

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	6
	Diabetes Mellitus.....	6
	Klinik des Typ 1 Diabetes	8
	Klinische Erscheinung des Typ 1 Diabetes	8
	Laborparameter beim Typ 1 Diabetes	8
	Pathogenese des Typ 1 Diabetes.....	10
	Ätiopathogenese des Typ 1 Diabetes	10
	Rolle der Makrophagen bei der Zerstörung der pankreatischen Betazellen	13
	Zerstörung der Betazellen durch Freisetzung von betazellschädigenden Makrophagen-Mediatoren	14
	Aktivierung des adaptiven Immunsystems zur antigenspezifischen Schädigung von Betazellen.....	15
	Zytokine	17
	TNF- α	17
	IL-6	18
	Insulin als antigene Struktur	19
	Hitzeschockprotein 70	21
	Homologie von DnaK und Hsp70	25
	Zielsetzung der Arbeit	26
2.	MATERIAL UND METHODEN	27
	Material	27
	Zelllinien	27
	Bakterielle Präparate	27
	Zellkulturmedien	27
	Spezifische Reagenzien/ Kits	28
	Chemikalien.....	29
	Verbrauchsmaterialien/Einwegartikel	30
	Stammlösungen und Puffer	31
	Geräte	32
	Methoden.....	34
	Makrophagenkultivierung.....	34
	MonoMac 6 - Makrophagen Kultivierung	34
	J774A.1 -Makrophagen Kultivierung.....	34
	Vorbereitung und Durchführung der Experimente	35
	Zellzahlbestimmung	35
	Vorbereitung der Zellen für Experimente	35
	Herstellung der Aliquots von LPS, DnaK und Insulinpeptiden.....	35

	Versuchsbeschickung.....	38
	Überstandabnahme nach Ablauf der Inkubationszeit.....	39
	Nachweis von Zytokinen mittels ELISA.....	40
	Nachweis von TNF- α mittels ELISA.....	40
	MTT-Verfahren zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität	41
	Statistische Analyse.....	42
3.	ERGEBNISSE	43
	Induktion von TNF- α - und IL-6-Freisetzung aus Makrophagen durch LPS	43
	Induktion der Freisetzung von TNF- α und IL-6 durch DnaK und Insulinpeptide ..	45
	Induktion der Freisetzung von TNF- α und IL-6 durch DnaK und Insulinpeptide aus humanen MonoMac 6 Makrophagen.....	45
	Induktion der Freisetzung von TNF- α durch DnaK und Insulinpeptide bei humanen MonoMac 6 Makrophagen	45
	Dosisabhängigkeiten der IL-6 Induktion durch Insulinpeptide bei humanen MonoMac6.....	51
	Induktion der Freisetzung von TNF- α und IL-6 durch DnaK und Insulinpeptide bei J774A.1 –Makrophagen	56
	Dosisabhängigkeit der TNF- α Induktion bei J774A.1 - Makrophagen.....	56
	Dosisabhängigkeit der IL-6 Induktion bei J774A.1-Makrophagen	59
4.	DISKUSSION.....	64
	Einleitung	64
	Charakterisierung und Validierung des experimentellen Systems	64
	Fehlende Reaktivität von Makrophagen auf Insulinpeptide	66
	Reaktivität von Makrophagen mit DnaK	68
	Ausschluss von makrophagenstimulierenden Effekten aufgrund einer LPS- Kontamination.....	70
	Makrophagenaktivierende Wirkung der Kombination von DnaK und Insulinpeptiden	71
	Biologische Effekte der HSP Insulinpeptid vermittelten Makrophagen- Stimulation	74
	Makrophagen-vermittelte Aktivierung der Immunkaskade durch HSP- Insulinpeptid Kombinationen	74
	HSP-Peptid induzierte Makrophagenaktivierung als Wegbereiter der T- Lymphozyten -Aktivierung und –Rekrutierung	76
	Epitopespreading als essentieller Mechanismus der Ausweitung der Immunkaskade.....	78
	Mögliche präventive sowie therapeutische Ansätze im Bezug auf Hsp70/InsB11-23 Interaktion und deren Einfluss auf die Betazellschädigung	79

5.	ZUSAMMENFASSUNG	83
6.	LITERATURVERZEICHNIS	84
7.	DANKSAGUNGEN	119

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Burkart,V, Siegenthaler,RK, Blasius,E, Vandenbroeck,K, Alloza,I, Fingberg,W, Schlööt,NC, Christen,P, Kolb,H: High affinity binding of hydrophobic and autoantigenic regions of proinsulin to the 70 kDa chaperone DnaK. BMC.Biochem. 11:44, 2010

1. EINLEITUNG

Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus umfasst eine Gruppe heterogener Störungen des Stoffwechsels, deren Leitbild die chronische Hyperglykämie ist (American Diabetes Association (ADA) 2017a). Es werden zwei Hauptformen unterschieden: der Typ 1 Diabetes (T1D) und der Typ 2 Diabetes (T2D).

Der T1D tritt hauptsächlich bei Kindern und Heranwachsenden in Erscheinung und bestimmt sich durch einen absoluten Insulinmangel, der durch eine immunvermittelte Zerstörung der autologen Betazellen verursacht wird (Eisenbarth 1986). Die Therapie der Wahl ist hier die Insulinsubstitution. Als T2D wird jener Symptomkomplex bezeichnet, welcher durch eine periphere Insulinresistenz und einen relativen Insulinmangel gekennzeichnet ist. Insbesondere in der Frühphase der Erkrankung findet sich häufig eine Hyperinsulinämie. Die Therapieoptionen sind beim T2D weiter gefächert; er ist durch die Gestaltung des Lebensstils, insbesondere Ernährung und Bewegung, sowie einer Vielfalt an Medikamenten zu beeinflussen. Neben dem T1D und dem T2D finden sich einige Sonderformen des Diabetes mellitus: Als herausragend ist hier der nicht-insulinpflichtige Diabetes bei jungen Menschen, der *maturity onset diabetes of the young* (MODY) zu sehen, der auf einem monogenetischen Defekt basiert (Tattersall und Fajans 1975, Kim 2015) basiert. Als weitere Sonderform mit protrahiertem Verlauf ist der latente Autoimmundiabetes des Erwachsenen (*latent autoimmune diabetes in adults* (LADA), Teng und Leslie 2006, Laugesen et al. 2015) zu nennen. Als dritte Sonderform ist der Gestationsdiabetes (*gestational diabetes mellitus* (GDM), Walker 1928, Zhu und Zhang 2016) mit erstmals in der Schwangerschaft auftretender Glukosetoleranzstörung aufzuführen.

Eine Vor- bzw. Zwischenstufe der Erkrankung stellen Zustände gestörter Glukosetoleranz (*impaired glucose tolerance*, IGT) dar, die durch ein pathologisches Ergebnis des oralen Glukosetoleranztests (oGTT) bei noch normalen Nüchternglukosewerten gekennzeichnet sind oder aber durch gestörte Nüchternglukosewerte auffallen (ADA 2017a, Eisenbarth 2004). Epidemiologische

Studien gehen davon aus, dass die Prävalenz für Diabetes mellitus weltweit bei 6,5 Prozent liegt (Shaw 2010). Hiervon sind 90-95 Prozent dem T2D zuzurechnen (ADA 2017a) und 5-10 Prozent dem T1D (Maahs et al. 2010, Dabelea et. al. 2014)

Für den Patienten ebenso belastend wie die primäre Erkrankung sind die langfristigen Komplikationen: hierbei sind insbesondere die diabetische Retinopathie (Pines 1952, Forsius et al. 1963, Laws et al. 1966, Symes et al. 2014) welche zur Erblindung führen kann, die diabetische Nephropathie mit der Endstufe des Nierenversagens (Rosenbaum et al. 1963, Honey et al. 1964, Tuttle et al. 2014), die diabetische Neuropathie (Hoffmann 1964, Gamstorp 1966, Reichel et al. 1983, Kaku et al. 2015), das diabetische Fußsyndrom, das zu Fußulzera oder auch Amputationen führen kann (Lowrie et al. 1955, Ellenberg 1973, Ward 1982, Jeffcoate 1993, Tuttolomondo 2014), sowie eine kombinierte Mikro/Makroangiopathie zu nennen. (Lundbeak 1954, Banson und Lacey 1964, Angervell und Säve-Söderbergh 1966, Faris et al. 1983, James et al. 2014). Aus neueren Untersuchungen wird als weiterer langfristiger Endorganschaden die diabetische Enzephalopathie angesehen (Biessels et al. 2008, Biessels und Reijmer 2014), die insbesondere bei frühzeitiger Erkrankung zu langfristigen neuropsychologischen Defiziten beiträgt (Schoenle et al. 2002, Ferguson et al. 2005). Es besteht eine deutliche Risikoerhöhung für Schlaganfall/Stroke (Lavy et al. 1974, Welborn et al. 1984, Putaala et al. 2011, Secrest et al. 2012, Kalani et al. 2015) und Herzinfarkt (Lee et al. 1954, Kannel und McDee 1979, Rytter et al 1985, de Ferranti 2014). All diese langfristigen Komplikationen finden sich häufig vergesellschaftet mit psychischer Belastungsreaktion, welche die Lebensqualität des Patienten weiter einschränkt (Mazze 1984, Holstein et al. 1986, Rodin 1990, Holt et al. 2014, kritisch hierzu Sivertsen et al. 2014).

Klinik des Typ 1 Diabetes

Klinische Erscheinung des Typ 1 Diabetes

Der Patient leidet im Initialstadium des T1D zunächst an einer über Wochen oder Monate abnehmenden körperlichen Leistungsfähigkeit sowie Polyurie und Polydipsie. Die Stoffwechsellage wird bestimmt durch einen Insulinmangel, welcher zu Hyperglykämie, erhöhter Lipolyse und Ketonkörperproduktion führt (Eisenbarth 1986, ADA 2017a). Wird kein Insulin substituiert, kommt es zu Dehydration, Ketoazidose und Elektrolytentgleisung (Stephens 1953, Felig 1976). Im weiteren unbehandelten Verlauf kann es sogar zu einem ketoazidotischen Koma kommen, welches sofort intensivmedizinisch versorgt werden muss (Westernberg 2013).

Unter Insulingabe bessert sich die Stoffwechsellage. Nach Erstmanifestation kommt es häufig zu einer Remissionsphase in der kein oder nur geringe Mengen Insulin substituiert werden muss („*honeymoon*“-Phase). Auf eine über Monate dauernde Phase kommt es bei zunehmender Zerstörung der Betazellen zur Notwendigkeit einer lebenslangen Insulinersatztherapie für die mehrere Schemata zur Verfügung stehen (ADA 2017, Fullerton 2014). Als derzeit noch weitestgehend experimentelle Therapie besteht die Möglichkeit einer Transplantation von Langerhans'schen Inseln, respektive eine kombinierte Transplantation von Pankreas und Niere (Shapiro et al. 2000, Hirschberg et al. 2003, Yang et al. 2004, Pepper et al. 2013).

Als weitere derzeitig noch theoretische Therapieoption ist der Einsatz von Stammzellen zu sehen (Yang 2006, Li und Ikehara 2014, Jiang und Morahan 2014).

Laborparameter beim Typ 1 Diabetes

Zur Bestimmung des aktuellen Verlaufszustandes und des Bedarfs an Insulin wird der Glukosespiegel im Blut herangezogen: Für die Sicherung der Diagnose sind mindestens zwei Messungen der Nüchternglukosekonzentration im Plasma an zwei unterschiedlichen Tagen erforderlich. Folgende Stufen werden gemäß ADA (2017b) festgehalten: Nüchternglukosekonzentrationen im Plasma (nach 8 Stunden Nahrungskarenz) von unter 6,1 mmol/l (<100 = normal 110 mg/dl) gelten als normal, Werte zwischen 6,1 mmol/l und 6,9 mmol/l (125 mg/dl) gelten als eingeschränkte Glukosetoleranz, Werte über oder gleich 7,0 mmol/l (126 mg/dl) gelten als

pathologisch. Die Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) (Kerner und Brückel 2014) verwendet hiervon leicht abweichende Werte. Als weiterer wichtiger Diagnostikparameter wird der HbA1c herangezogen. Hierbei werden Werte über 6,5% ($> 48 \text{ mmol/mol}$) als pathologisch gewertet (ADA 2017b). Als dritter klassischer Laborparameter wird nach einer Applikation von 75 mg Glukoselösung nach zwei Stunden die Plasmaglukose gemessen, Werte über 200 mg/dl ($11,1 \text{ mmol/l}$) gelten als pathologisch. Es wird keinem der drei Testverfahren per se der Vorzug gegeben, es sollten am besten zwei Testverfahren zwecks Diagnosesicherung eingesetzt werden (ADA 2017a).

Im Rahmen der Differentialdiagnostik zur Unterscheidung des T1D von anderen Diabetesformen werden folgende vier dominante Autoantikörper gegen inselspezifische Antigengruppen bestimmt: Insulin (IAA) (bzw. Proinsulin, Palmer et al. 1983), der als wichtigster Marker für die im Verlauf des T1D sich entwickelnde gegen Betazellen gerichtete Immunität anzusehen ist. Darüber hinaus finden sich glutamic acid decarboxylase (GAD) 65 beziehungsweise GAD67 (Baekkeskov et al. 1990), islet-associated protein (IA)-2 (respektive islet cell antigen (ICA)512 bzw. IA-2 β oder PHOGRIN (Rabin et al. 1994, Lan et al. 1994, Verge et al. 1996, Lu et al. 1996), sowie als neuester Marker die gegen den Zinktransporter 8 (ZnT8) gerichteten Antikörper (Wenzlau et al. 2007). Diese Marker können schon in der prädiabetischen Phase mit hoher Wahrscheinlichkeit die Erkrankung vorhersagen (Achenbach et al. 2005, Pietropaolo et al. 2012). Bingley (2010) postulierte, dass durch die Kombination von IAA, GAD 65A, IA2A und ZnT8 98 Prozent der Fälle vorhergesagt werden können (so auch Bonifacio et al. 2014). Mit fortschreitendem Lebensalter des Patienten verlieren die Marker jedoch ihre Aussagekraft. Die Antikörper werden nicht im Rahmen der Standarddiagnostik eingesetzt. Sie sollten im Rahmen von klinischen Studien bei Anverwandten von T1D Patienten herangezogen werden. Hierbei zeigten Steck et al. 2011 (so auch Parikka 2012), dass hierunter der IAA Titer beim Kind der wichtigste Marker ist und ein enger Zusammenhang zwischen dem Alter, in dem die Diagnose T1D gestellt wird und der Kombination aus dem Zeitpunkt des ersten Auftretens von Autoantikörpern sowie die Höhe des IAA Titers besteht.

Zur Bestimmung der Restaktivität der Betazellen kann eine Messung der C-Peptid Konzentration durchgeführt werden (Kajinuma et al. 1979). Das C-Peptid wird in äquimolaren Mengen zum Insulin produziert und freigesetzt, und kann somit Auskunft über die endogene Produktion von Insulin geben. Im Krankheitsverlauf fällt dieser Wert, der in der Regel zwischen 1,1 – 5,0 µg/l (0,31-1,4 nmol/l; Oyer et al. 1971, Rendell 1983, Hills et al. 2009) liegt, bis zum Stadium eines Vollbildes des T1D fast vollständig ab. Ein C-Peptid Wert im Blut nach Glukosestimulation < 0,2 nmol/l (nach Fasten < 0,08 nmol/l, oder postprandiales C-Peptid im Urin) bestätigt den absoluten Insulinmangel (Jones und Hattersley 2013).

Während des chronischen Verlaufs des T1D wird zur Therapiekontrolle der HbA1c-Wert herangezogen, welcher Auskunft über die Blutglukosebelastung der letzten 3 Monate gibt. Grundlage ist die Assoziation von durchschnittlichen Blutglukosewerten und dem HbA1c-Wert (*A1c-Derived Average Glucose* (ADAG) Studie, Whei et al. 2014) Dieser kann als Marker des langfristigen Therapieverlaufs bestimmt werden. Bei einem HbA1c-Wert von unter 7,0 % (< 53 mmol/mol) ist der Diabetes Mellitus bei nicht schwangeren Patienten als gut eingestellt anzusehen (ADA 2017b). Hiervon abweichend hat die International Diabetes Federation (IDF) hier differenziert nach T1D einen Zielbereich von 6.2–7.5 % (44–58 mmol/mol) festgelegt (Aguilar et al. 1999). Grundsätzlich ist eine Individualisierung der Therapie zusammen mit dem Patienten anzustreben, wobei insbesondere Hypoglykämien zu vermeiden sind und auch höhere HbA1c-Werte in Kauf genommen werden (ADA 2017b, Braun et al. 2016).

Pathogenese des Typ 1 Diabetes

Ätiopathogenese des Typ 1 Diabetes

Erkenntnisse zur Ätiologie und der Pathogenese des T1D basieren auf genetischen Analysen, epidemiologischen Untersuchungen, direkten Beobachtungen am Menschen sowie Erkenntnissen aus Tiermodellen. Platz et al. (1981, so auch Noble und Valdes 2011) zeigten, dass die Entwicklung eines T1D mit spezifischen Allelen des

HLA-Systeme auf Chromosom 6, darunter HLA DR3/DR4⁻, DR3/DR3⁻ und DR4/DR4⁻ Genotypen, welche für die MHC-II-Moleküle kodieren, assoziiert ist. Noble et al. (2010) zeigten darüber hinaus, dass auch MHC-I-Moleküle wie B*39:06 mit einem erhöhten Risiko verbunden sind. Steck und Rewers (2011) zeigten, dass auch Nicht-HLA Gene das Risiko eines T1D beeinflussen: Hierbei ist insbesondere das Allel des Insulins (INS) Gens auf Chromosom 11p15.5 von Bedeutung, welches das Risiko zur Entwicklung eines T1D um 10 % erhöht.

Dass ätiologisch jedoch auch andere Faktoren eine Rolle spielen, zeigt das verhältnismäßig geringe Lebenserkrankungsrisiko innerhalb der Familie eines an T1D Erkrankten. Dieses liegt bei 5-10 % für Geschwister von Erkrankten sowie bei 30-40 % für eineiige Zwillinge (Hyttinen et al. 2003). Als Umwelteinflüsse wird eine Reihe von viralen Infektionen postuliert, wobei eine kongenitale Rubella-Infektion (Forrest et al. 1992, Ginsberg, Fellner et al. 1985, McIntosh und Menser 1992, Schneider und von Herrath 2014) eine sehr hohe Korrelation vorweist. Auch intrauterine Infektionen mit Enteroviren sollen gemäß Dalquist et al. (1995, so auch Yeung et al. 2011, Bergamin et al. 2015) mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung eines T1D verbunden sein. Weiterhin werden Nahrungsmittelbestandteile, so unter anderem Gluten und Kuhmilchprodukte, als Risikofaktoren diskutiert (Elliot und Martin 1984, Scott und Kolb 1996, Ziegler et al. 2003, MacFarlane et al. 2009, Antvorskov et al. 2014).

Ein grundsätzliches Problem für den beginnenden Krankheitsprozess beim T1D ist, dass eine sehr überschaubare Fallzahl histopathologisch analysiert worden ist (Morgan et al. 2014, Nokoff et al. 2013), so dass ein Großteil der derzeitigen Hypothesen zur Pathogenese im Tiermodell generiert wurde. Die Betazellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas werden im Rahmen einer Inselzellentzündung, basierend auf einem multifokalen inflammatorischen Geschehen, zerstört (In't Veld 2014). Hierbei wird eine prädiabetische von einer diabetischen Phase unterschieden. In der prädiabetischen Phase weist das Auftreten von Autoantikörpern auf den Beginn der immunvermittelten Krankheit hin. Die direkte Beteiligung der Autoantikörper an der Schädigung der Betazellen und der Entwicklung des insulinabhängigen Diabetes kann weitestgehend ausgeschlossen werden (Martin et

al. 2001), allerdings wird immer wieder eine indirekte Beteiligung diskutiert, wie der Verlust der insel-reaktiven CD4⁺T-Lymphozyten Toleranz (Silva et al. 2011). Ein klassisches Modell aus der NOD Maus von Hanenberg et al. (1989) unterteilt den Krankheitsverlauf in drei Stadien: im Stadium 1 finden sich lediglich aktivierte Makrophagen, während sich im Stadium 2 zusätzlich T-Lymphozyten und NK-Zellen finden, sind im Stadium 3 auch B-Lymphozyten nachweisbar waren. Magnus et al. (2015) konnten ebenfalls im Modell der Non-Obese Diabetic (NOD)-Maus während der Wochen 4-14 folgende Zellpopulationsabfolge beobachten: Während bereits zu Beginn ein Anstieg der Leukozyten (CD45⁺) zu beobachten war, stieg dieser insbesondere in den Wochen 8-12 deutlich an. In der Woche 4 fanden sich vermehrt Makrophagen, wohingegen die Leukozyten bis Woche 12-14 die vorherrschende Immunzellpopulation wurden.

Bei verstorbenen Patienten mit T1D zeigten Wilcox et al. (2011) ein Vorherrschen der CD8⁺-T-Zellen über den gesamten Untersuchungszeitraum, die mit zunehmenden Verlust von Insulin-positiven Betazellen zunahmen. Währenddessen waren Makrophagen insbesondere in der Initialphase sowie gegen Ende der Betazellzerstörung vermehrt zu finden. B-Lymphozyten und CD4⁺-T-Lymphozyten stellten eher kleinere Zellpopulationen dar (Wilcox et al. 2011), wobei deren Rolle, wie Morgan et al. (2013) für die B-Lymphozyten eine wesentliche Mitwirkung an der Ausprägung der Insulitis unterstellten, und infolge dessen einen aggressivere Variante mit vielen B-Lymphozyten (CD20^{Hi}) einer mit wenigen (CD20^{Lo}) gegenüberstellten.

Mathis et al. (2001) vermuten zwei Wege zur Betazellzerstörung: Im ersten erkennen T-Lymphozyten Autoantigene, die über MHC-Moleküle auf der Oberfläche von Betazellen präsentiert werden. Dies erfordert direkten Kontakt von Betazellen zu T-Lymphozyten und würde die Erkennung von MHC-I-Strukturen durch CD8⁺-Lymphozyten voraussetzen. Dudek et al. (2006) vermuteten, dass hierbei sowohl Perforine als auch Fas/FasL beteiligt sind, wobei gemäß Knight et al. (2013) ersterer Mechanismus überwiegt. Im zweiten Modell (Mathis et al. 2001) erkennen die T-Lymphozyten (entweder CD4⁺ oder CD8⁺) betazellspezifische Antigene, welche über MHC-II-Moleküle in der Nähe von Inselzellen präsentiert werden. Ersteres Modell

resultiert in der direkten Zerstörung von Bystander-Betazellen durch Zytokine und lösliche „Todesmediatoren“, welche durch T-Lymphozyten produziert werden sowie in der Stimulation der zytolytischen Aktivität von Makrophagen. Der endgültige Betazelltod würde über Apoptose im Rahmen des ersten Modelles erfolgen (Knight et al. 2013), wohingegen im Rahmen des zweiten Modelles lösliche Mediatoren und freie Radikale die Betazellen zerstören (Mathis et al. 2001).

Mit fortschreitender Zerstörung der Betazellen tritt eine Reduktion der Insulinsekretionskapazität und hierdurch eine Verringerung der Glukosetoleranz ein, bis schließlich dauerhaft Insulin substituiert werden muss. Die Betazellen der Langerhans'schen Inseln werden durch immunologische Effektormechanismen immer weiter zerstört, bis nach dem Verlust von fünfzig, zum Teil sogar bis neunzig Prozent der Betazellen eine klinisch manifeste Form des Diabetes auftritt (Canivell und Gomis 2014). Besondere Bedeutung kommt in diesem Ablauf der Anwesenheit von Makrophagen zu, da eine Infiltration der Inseln mit Lymphozyten in Abwesenheit aktivierter Makrophagen nicht nachgewiesen werden konnte (Hanenberg et al. 1989).

Rolle der Makrophagen bei der Zerstörung der pankreatischen Betazellen

Makrophagen sind als gewebsständige Phagozyten ein Teil des angeborenen nicht-adaptiven Immunsystems. Monozyten/Makrophagen sind an der Primärabwehr im Rahmen der angeborenen Immunität beteiligt. Sie spielen jedoch auch eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Initiierung von Reaktionen des erworbenen (adaptiven) Immunsystems, indem sie verschiedene Funktionen vermitteln. Dazu gehören die Antigenpräsentation an T-Lymphozyten, sowie die an der LPS-Erkennung beteiligten Zelloberflächenrezeptoren toll-like-receptor (TLR)-4 und cluster of differentiation (CD)14, die Fc-Region von Immunglobulin (Ig)G (CD16, CD32, CD64), die aktivierten Komplementkomponenten (CD35) und die Sekretion von Mediatoren, wie Chemokinen und Zytokinen/Monokinen, die eine zentrale Rolle in der antigenspezifischen Aktivierung von T- und B-Lymphozyten spielen (Allison 1973, Iwasaki und Medzhitov 2010). Aktivierte Makrophagen können auch in antigenunspezifischer Weise lytische Aktivitäten vermitteln und veränderte

körpereigene Zellen, wie beispielsweise Tumorzellen, in Abwesenheit von Antikörpern schädigen und zerstören. (Mace et al. 1988, Cui et al. 1994). An diesen Aktivitäten sind unter anderem phagozytotische Prozesse und Zytokine beteiligt (zum Beispiel Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α und Interleukin (IL)-1).

Zahlreiche Arbeiten belegen die entscheidende Rolle der Makrophagen als Effektorzellen für die Pathogenese des Insulinmangeldiabetes respektive des T1D des Menschen (Kolb et al. 1990, Burkart und Kolb 1996, Calderon et al. 2014). Makrophagen sind im zeitlichen Ablauf der Insulitis die ersten Effektorzellen, welche die Pankreasinseln infiltrieren (Lee et al. 1998a). Sie konnten bereits in der prädiabetischen Phase in Nachbarschaft zerstörter Betazellen elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden (Lee et al. 1998a). So verhinderte eine intraperitoneale Applikation von makrophagentoxischen Silica-Partikeln in BioBreeding(BB)-Ratten und die Verabreichung monoklonaler Antikörper gegen Makrophagen (Lee et al. 1988b, Lee et al. 1988c) vollständig die Migration von Immunzellen in die Pankreasinseln und somit eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems (Walker et al. 1988). Jun et al. (1999) konnte für die NOD-Maus zeigen, dass Makrophagen für die Aktivierung der betazellschädigenden zytotoxischen CD8⁺-T-Lymphozyten essentiell erforderlich sind (gestützt auch durch Calderon et al. 2014).

Zerstörung der Betazellen durch Freisetzung von betazellschädigenden Makrophagen-Mediatoren

Im Verlauf der Entwicklung des Insulinmangels scheinen ein erhöhtes Maß an oxidativem Stress (Malaisse et al. 1982, Padgett et al. 2013) sowie die erniedrigte Radikalfängerkapazität der Betazellen (Lenzen et al. 1996, Fridlyand und Philipson 2005), wesentlich zum selektiven Tod der insulinproduzierenden Betazellen beizutragen.

Als ein wichtiges zytotoxisches Effektormolekül der Betazellschädigung wurde Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert (Kröncke et al. 1991), welches nach der Aktivierung von Makrophagen durch LPS, Interferon (IFN)- γ (Nussler 1993), und TNF- α (McCall et al. 1991) und der nachfolgenden erhöhten Expression der induzierbaren NO-Synthase

(iNOS) in hohen zellschädigenden Konzentrationen freigesetzt wird (Padgett et al. 2013). Das kurzlebige freie Radikal NO führt zu mitochondrialen Funktionsstörungen (Maechler und Wolheim 2001, Newmeyer und Fergusson-Miller 2003) und das aus Reaktion mit Superoxid entstehende Peroxynitrit bedingt DNA-Strangbrüche (Fehsel et al. 1993). Durch Aktivierung des DNA-Reparaturenzyms Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) und dem dadurch bedingten erhöhten Verbrauch des zellulären Energieträgers Nicotinamid-adenin-dinukleotid (NAD⁺) (Radons et al. 1994) wird der Untergang von Betazellen beschleunigt (Burkart und Kolb 1996). Gemäß Cnop et al. (2005) sind mit hoher Wahrscheinlichkeit folgende drei Mechanismen am Betazelltod beteiligt: (1) die Aktivierung der „stress-aktivierten“ c-JunNH2-terminale Kinase (JNK), ein Mitglied der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK)-Familie, p38 MAPK; (2) die von Schroder und Kaufman (2005) beschriebene Stressreaktion des Endoplasmatischen Retikulums (ER); (3) die Freisetzung pro-apoptotischer Proteine/ Todes(rezeptor)sigale aus Mitochondrien (Maechler und Wollheim 2001, Newmeyer und Fergusson-Miller 2003).

Aktivierung des adaptiven Immunsystems zur antigenspezifischen Schädigung von Betazellen

Als antigenpräsentierende Zellen (APC) spielen Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des adaptiven Immunsystems (Fearon et al. 1996, Calderon et al. 2014). Aufgabe der APC, zu denen neben den Makrophagen sowohl B-Lymphozyten als auch dendritische Zellen gehören, ist die Erkennung und Prozessierung aufgenommener antigener Strukturen und deren Präsentation an T-Lymphozyten. Weiterhin fällt den APC eine kostimulatorische Funktion gegenüber anderen immunkompetenten Zellen durch Abgabe von Zytokinen in Form der Generierung eines polarisierenden Signals zu (Kapsenberg et al. 1999, Calderon et al. 2014).

Entsprechend ihres Zytokinprofils lassen sich APC in zwei Gruppen unterteilen: APC1-Zellen, welche überwiegend TNF- α , IL-12, IL-15, IL-18 freisetzen, besitzen eine proinflammatorische Wirkung, sowie APC2-Zellen, welche vorwiegend IL-10 und PGE2 freisetzen (Rothe und Kolb 1998), und eine antiinflammatorische Wirkung ausüben. Mills et al. (2000) übertrugen in Analogie zur Th1/Th2 Unterteilung der CD4⁺-

Helferzellen die Aktivierung der Makrophagen in einen M1-klassischen Aktivierungspfad sowie einen M2-alternativen Aktivierungspfad. Verreck et al. (2006) zeigten in vitro, dass periphere Blutmonozyten sich in zwei unterschiedliche Makrophagentypen differenzieren können: einen proinflammatorischen Typ 1 oder einen anti-inflammatorischen Typ 2. Gesteuert wurde diese differentielle Entwicklung einerseits durch Th1-assoziierte Zytokine wie IFN- γ , auf der anderen Seite durch Th2-assoziierte Zytokine wie IL-4, zusammen mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) und Makrophagen koloniestimulierenden Faktor (M-CSF) (Fixe und Praloran 1998). Dieses Konzept wurde durch eine Unterteilung des alternativen Pfades erweitert (Martinez et al. 2008, Mantovani et al. 2004) und schließlich auf ein Spektrumkonzept der Makrophagenaktivität erweitert (Xue et al. 2014). Als wichtiger Faktor ist hierbei der Wechsel des Makrophagenaktivitätszustandes aufgrund zeitlicher und örtlicher Komponenten zu berücksichtigen (Porcheray et al. 2005, Stout et al. 2005).

Aufgrund vorgenannter Beobachtung liegt es nahe zu vermuten, dass Defekte oder Fehlregulationen der APC zu pathologischen Immunreaktionen einschließlich der Entstehung von Autoimmunkrankheiten beitragen können (Boyd und Hugo 1991). In Tiermodellen des T1D konnten zahlreiche Abweichungen im Zytokinmuster festgestellt werden. Rothe et al. (1990) zeigten hierbei eine deutliche Hochregulation der TNF- α Produktion ohne direkten Einflussfaktor auf die Diabetesentwicklung der BB Ratte. Alleva et al. (2000) stellten eine deutliche Abweichung des Zytokinprofils von Makrophagen aus NOD-Mäusen dar, welche eher einen proinflammatorischen Phänotyp begünstigen. Dendritische Zellen von Patienten mit T1D zeigten eine verminderte Fähigkeit, autoreaktive T-Lymphozyten im Sinne der Behauptung der Selbsttoleranz zu selektionieren (Jansen et al. 1995).

In der Tat deuten die bisher publizierten Daten insgesamt auf eine proinflammatorische Neigung der Effektorzellen des angeborenen, unspezifischen Immunsystems bei Individuen mit einer Prädisposition zur Entwicklung eines T1D hin (Hussain et al. 1996). Die verstärkte Freisetzung von Zytokinen durch APC1-Zellen führt zu einer proinflammatorischen Th1-Lastigkeit des adaptiven Immunsystems. Dies ist mit der

verminderten Fähigkeit verbunden, eine Neigung des Immunsystems zu zytotoxischen Reaktionen im Rahmen eines inflammatorischen Prozesses zu limitieren (Kolb 1999, Padgett et al. 2013).

Zytokine

Zytokine sind Polypeptide, die von zahlreichen Zellpopulationen verwendet werden, um miteinander zu kommunizieren. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Kontrolle lokaler und systemischer Immunreaktionen, von Entzündung, der Hämatopoese, Heilungsprozessen und der systemischen Antwort auf Verletzungen. Als wesentliche Subgruppen werden Interleukine (IL), Interferone (IFN), Tumornekrosefaktoren (TNF) sowie Kolonie-Stimulierende-Faktoren (CSF) angesehen (Whicher und Evans 1990). Im Rahmen der Betazellzerstörung und der Ausbildung eines T1D fällt Zytokinen eine entscheidende Rolle zu (Rabinovitch und Suarez-Pinzon 1998).

TNF- α

TNF- α ist ein von Makrophagen und Mastzellen produziertes Zytokin, welches im Rahmen einer lokalen oder systemischen Immunreaktion die Abwehrbereitschaft des Körpers modifiziert. Es bewirkt im Entzündungsgebiet eine erhöhte Gefäßpermeabilität für Immunglobuline, Komplementfaktoren und Immunzellen, während bei systemischer wirksamer Konzentration Fieber und ein kataboler Lipid- und Proteinstoffwechsel auftreten können, die bis hin zum klinischen Bild einer Sepsis reichen können (Hehlhans und Pfeffer 2005). TNF- α wird durch Makrophagen nach einer Exposition gegenüber LPS oder an CD4⁺-T-Lymphozyten gebundener Antigene synthetisiert. Das Zytokin bewirkt eine verstärkte Expression von MHC-Molekülen der Klassen I und II auf deren Oberfläche sowie eine Induktion der iNOS. Die damit einhergehende Initiierung der phagozytischen, zytotoxischen und zytolytischen Makrophagenaktivität ist verantwortlich für die namensgebende Wirkung dieses Zytokins auf Tumorzellen. Es könnte hieraus abgeleitet werden, dass TNF- α auch im

Rahmen der Modulation der Immunfunktionen während der Insulitis eine wichtige Rolle spielt (Rabinovitch und Suarez-Pinzon 1998). Campbell et al. (1988) konnten eine zytotoxische Wirkung für TNF- α auf Betazellen feststellen. In vitro Versuche ergaben, dass TNF- α , zusammen mit IFN- γ sowie IL-1 β betazelltoxisch wirkt (Eizirik und Mandrup-Poulsen 2001). In einer Untersuchung von Gurgul-Convey et al. (2011) konnte gezeigt werden, dass die Exposition von Insulin-produzierenden RINm5F Zellen durch eine Kombination von IL-1 β , TNF- α , und IFN- γ , wodurch die Bedingungen während der Inselentzündung simuliert werden sollen, sowohl NO als auch *reactive oxygen species* (ROS) generierte.

IL-6

IL-6, früher bezeichnet als IFN- β 2, wird überwiegend in Hepatozyten produziert (Gauldie et al. 1989), kontrolliert im Wesentlichen die Synthese der Akute-Phase-Proteine (Hirano et al. 1989, Heinrich et al. 1990) und stimuliert zudem Wachstum und Differenzierung von B-Lymphozyten zu antikörperproduzierenden Zellen, wie von Muraguchi et al. 1981 erstmals beschrieben. IL-6 wird vermehrt im Rahmen der systemischen Reaktion auf Verletzungen sowie Infektionen gebildet.

Das Zytokin spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Schutzmechanismen im Verlauf einer Wirtabwehrreaktion gegen Parasiten, wie Egwang et al. (1985) für den Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis*, sowie Pancre et al. (1990) für *Schistosoma Mansoni* zeigen konnten. Eine stark erhöhte Produktion von IL-6 wurde in der Pathogenese (auto)immun vermittelter Erkrankungen, wie der Rheumatoiden Arthritis (Swaak et al. 1988) und dem systemischen Lupus Erythematoses (SLE) (Swaak et al. 1989), beschrieben. Bereits Campbell et al. (1989, 1991) konnten eine wesentliche Rolle erhöhter IL-6 Spiegel bei der Pathogenese des Insulinmangeldiabetes in NOD Mäusen feststellen. Reis et al. (2012) konnten insbesondere für die ersten Jahre der Erkrankung erhöhte IL-6 Spiegel im Plasma von Patienten mit T1D im Vergleich zu Kontrollgruppen feststellen, wobei Kaas et al. (2010) keine direkten Rückschlüsse aus der Höhe des IL-6 Spiegels auf die Krankheitsaktivität ziehen konnten.

Insulin als antigene Struktur

Insulin wird von den Betazellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas gebildet und induziert (über eine membrangebundene Tyrosinkinase, Rosen 1987) eine erhöhte Aktivierung von Glukosetransportern. Hierdurch kommt es primär in Leber, Muskulatur und Fettzellen zu einem Anstieg der Glukosetransportrate in die Zellen hinein (MacLeod und Aberd 1922, Park et al. 1955). Insulin wirkt als anaboles Hormon und hat einen regulatorischen Einfluss auf die hepatische Glukoseproduktion, die Lipolyse, die Proteolyse, die Proteinbiosynthese und den Aminosäuren- und Kaliumtransport in die Zellen (Stetten und Klein 1946, Wall et al. 1957, Wool und Cavicchi 1966, Kalkoff und Kipnis 1966).

Bereits vor Manifestation des T1D werden Antikörper gegen Strukturen der Betazellen gebildet. Dabei haben sich sowohl im Mensch als auch im Tiermodell vielfache Hinweise für Insulin als dominantes betazellspezifisches (Auto)Antigen ergeben (Wegmann und Eisenbarth 2000).

Insulin und Proinsulin dienen als Zielstrukturen für Antikörper (Atkinson et al. 2000) und T-Lymphozyten (Wegmann 1994) in prädiabetischen und diabetischen Individuen. Hierbei zählen Anti-Insulin Antikörper (IAA) zu den ersten Antikörpern gegen autologe Betazellstrukturen, welche bei diabetesgefährdeten Kindern gefunden werden (Ziegler et al. 1999, Jasinski und Eisenbarth 2005). In Tierversuchen von Karges et al. (2002) wurde nach einer Vakzinierung von NOD-Mäusen mit Insulin-DNA ein Anstieg der an Diabetes erkrankten Tiere festgestellt. Weiterhin konnten Halbout et al. 2002 bei NOD-Mäusen zeigen, dass sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Lymphozyten aus pankreatischen Lymphknoten eine erhöhte Reaktivität gegen Insulin aufweisen. Jaeckel et al. (2004) konnte zeigen, dass insulinreaktive T-Lymphozyten ein ideales Ziel darstellen, um einen Insulinmangeldiabetes in NOD Mäusen dramatisch zu reduzieren.

Aus den zuvor benannten Untersuchungen lässt sich somit ableiten, dass Insulin eine wesentliche betazellspezifische Zielstruktur repräsentiert, gegen die sich das körpereigene Immunsystem richtet.

Bei der Entwicklung einer gegen Insulin gerichteten Immunreaktion scheinen bestimmte Regionen des Insulinmoleküls eine besondere Immunogenität aufzuweisen. Daniel et al. (1995) identifizierte eine kurze Region der B-Kette des Insulins, den Abschnitt B 9-23 (im Weiteren als InsB9-23 bezeichnet), auf die fast 90% der aus den Inseln des Pankreas von NOD Mäusen isolierten anti-Insulin CD4⁺-T-Lymphozyten als antigene Struktur reagierten. In weiteren Versuchen konnte Daniel und Wegmann 1996 und Chen et al. 2001 in Vakzinierungsversuchen mit NOD Mäusen zeigen, dass definierte Abschnitte der Insulin-B-Kette bei der Pathogenese des autoimmunen Diabetes eine wesentliche Rolle einnehmen. Wong et al. (1999) konnte zeigen, dass Epitope der B-Kette, insbesondere die Sequenz InsB9-23, bevorzugte Zielstrukturen von Immunreaktionen im T1D sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass, sofern diese Zielstrukturen in genetisch entsprechend veränderten NOD-Mäusen nicht mehr vorhanden sind, der Ausbruch des Insulinmangeldiabetes verzögert, wenn nicht gar gänzlich verhindert wird: Nakayama et al. (2005) berichtete, dass NOD Mäuse, die eine transgene Mutation in Position 16 der B-Kette beider Insulinvarianten besitzen, bei der Tyrosin durch Alanin ersetzt wurde, vor autoimmuner Inselzellschädigung geschützt sind und somit Diabetes verhindert wird. Diese Beobachtung führt zu der Schlussfolgerung, dass spezifische Zielstrukturen aus der Beta-Kette des Insulins und hier speziell das Epitop InsB9-23 der B-Kette einen großen Einfluss auf den Verlauf der betazellgerichteten Immunreaktion und damit des Diabetes ausüben.

Hitzeschockproteine

Bei weiterführenden Untersuchungen der Schädigung von Betazellen durch immunologische Mechanismen wurden Hinweise darauf gefunden, dass Hitzeschockproteine (HSP) eine entscheidende Rolle sowohl beim Schutz der Betazellen gegen inflammatorischen Stress als auch bei der Entwicklung der gegen

die Betazellen gerichteten Immunantwort einnehmen (Retzlaff et al. 1994, Bellmann et al. 1995, Linquist und Craig 1998).

Die ursprüngliche Entdeckung der HSP durch Ritossa (1962) erfolgte im Rahmen von Untersuchungen des Schutzes von Zellen und Geweben, die erhöhten Temperaturen ausgesetzt waren. Hartl (1996) erweiterte durch HSP das bestehende Konzept von Anfinsen (1973), wonach neu synthetisierte Proteine unkatalysiert ihre korrekte Tertiärstruktur annehmen. Hartl (1996) zeigte, dass im Anschluss an die Proteinneosynthese am endoplasmatischen Retikulum (ER) durch die Chaperonfunktion der HSP eine weitere Modifikation auf dem Weg zum funktionsfähigen Protein zur Tertiärstruktur stattfindet (Bukau et al. 2000).

HSP wirken in vielfältigen Stoffwechselprozessen auf die Faltung von Polypeptiden ein, beeinflussen die Zusammensetzung von Oligomeren und überwachen das Zusammenspiel von Proteinkomplexen durch Strukturerhalt. Wachstum, Differenzierung und Apoptose, Ausbildung von Proteinkomplexen, Proteintransport und Aktivierung von Enzymen und Rezeptoren werden von ihnen maßgeblich beeinflusst. Sie sind sowohl in prokaryotischen als auch eukaryotischen Lebewesen zu finden und sind hierbei phylogenetisch sehr gut konserviert (Hartl 1996, Fink 1999, Bukau et al. 2000, Hartl und Mayer-Hartl 2002, Mayer und Bukau 2002).

HSP werden nach ihrem Molekulargewicht in Gruppen eingeteilt (Fink 1999): Hsp90, Hsp70, Hsp60 und kleine HSP (sHSP). Im Bezug auf Untersuchungen zur Rolle von HSP bei der Entwicklung des T1D liegt das Augenmerk auf den Hsp70, da sich vermehrt Hinweise ergeben, dass sie zusammen mit den Hsp60 entscheidend die immunvermittelte Betazellzerstörung beeinflussen (Bukau et al. 1998, Binder et al. 2000).

Hitzeschockprotein 70

Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) und seine assistierenden Proteine DnaJ und GrpE (Liberek et al. 1991, Caplan et al. 1993, Dekker et al. 1997) sind in fast allen

Kompartimenten der Zelle zu finden. Sie assistieren beim korrekten Falten der durch Translation neu gebildeten Proteine, leiten die Translokation der Proteine durch Organellenmembranen, zerlegen kontrolliert oligomere Proteinkomplexe, erleichtern die proteolytische Spaltung von instabilen Proteinen und kontrollieren die biologische Aktivität von regulatorischen Proteinen, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren (Meyer und Bukau 2005).

Weiterhin wird Hsp70 bei Stressreaktionen als ein dominantes HSP vermehrt exprimiert. Studien von Bukau et al. (1998) deuten darauf hin, dass Mitglieder der Hsp70 Familie Zellen vor stressinduzierter Apoptose schützen können. Campisi und Fleshner (2003) bestätigen den durch extrazelluläres Hsp72 hervorgerufenen Schutz bei Stressreaktionen und wiesen zusätzlich eine durch Hsp72 vermittelte gesteigerte Aktivierung des angeborenen, nicht-adaptiven Immunsystems bei physischer Aktivität in Ratten nach. Bellmann et al. (1996) konnten zeigen, dass eine gesteigerte intrazelluläre Konzentration von Hsp70 Inselzellen auch ohne Stressreaktion eine Resistenz gegenüber der schädigenden Wirkung von NO, ROS und ROI sowie Streptozototozin (SZ) verlieh. Bei Bouchentouf et al. (2004) konnte dadurch das Überleben von transplantierten Muskelzellen erhöht werden. Grossin et al. (2004) zeigte, dass erhöhte intrazelluläre Hsp70 Konzentrationen einer Protektion von Knorpelzellen dienlich sind.

Im Hinblick auf die vielfältigen Eigenschaften von Hsp70 im biologischen System wurde auch im immunologischen Bereich nach relevanten Hsp70-vermittelten Vorgängen gesucht. Es fanden sich deutliche Hinweise, dass HSP eine ausgeprägte T-Zell-basierte Immunantwort gegenüber Tumoren, Viren und Histokompatibilitäts-Antigenen hervorrufen können (Srivastava et al. 1998). Lussow et al. (1991) zeigte, dass mykobakterielle HSP als Carriermoleküle fungieren können, welche Barrios et al. (1992) einsetzte, um Bacillus Calmette–Guérin (BCG) als Adjuvans zu ersetzen. Suzu et al. (1997) nutzte Hsp70 zusammen mit konjugierten antigenen Proteinen und Peptiden, um letztere in den MHC-I-Weg einzuschleusen und eine zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) gesteuerte Immunantwort hervorzurufen, für die Huang et al. (2000) zusätzlich zu einer weiteren Spezifizierung der antigenen Struktur eine

Abhängigkeit von CD4⁺-T-Helfer-Lymphozyten feststellen konnte. Roman und Moreno (1996) zeigten, dass synthetische Peptide, die nichtkovalent an Hsp70 gebunden sind, MHC-I- beziehungsweise MHC-II-Epitope binden und effektiv zu einer Proliferation von CTL führten. Ciupitu et al. (1998) zeigte, dass durch die Kombination von Hsp70 mit Choriomeningitis Virus (CMV) Peptiden eine antivirale Immunität generiert und spezifische zytotoxische T-Lymphozyten aktivieren werden können.

Für Hsp70, Hsp90, und gp96 konnte durch Binder et al. (2000) eine spezifische Interaktion mit APC festgestellt werden. Hierbei wurde die Existenz von zwei unterschiedlichen Rezeptoren vermutet, einen spezifisch für Hsp90 und gp96, der andere für Hsp70. Sondermann et al. (2000) wies einen spezifischen Rezeptor für Hsc70/Hsp70 von Säugetieren auf der Zelloberfläche von humanen Makrophagen und Monozyten nach, über den Hsp70 nach der Bindung endozytotisch ins Zellinnere aufgenommen wird. Zusätzlich wurden Hinweise vorgelegt, dass Mitglieder der Hsp70 Familie als Chaperone agieren: In Versuchen von Basu et al. (2000) konnten Peptide, gebunden an gp96, Calretikulin, Hsp90 oder Hsp70, über den Rezeptor CD91 von Makrophagen und dendritischen Zellen aufgenommen werden, bevor sie über MHC-I-Moleküle präsentiert wurden.

Erste Hinweise auf eine funktionelle Beteiligung von Hsp70 bei der Antigenprozessierung ergaben sich aus einer weiteren Untersuchung von Binder et al. (2001): Peptide, die an Hsp70, Hsp90 oder gp96 gebunden waren, wurden mit wesentlich höherer Wahrscheinlichkeit von MHC-I-Molekülen präsentiert als freie Peptide oder an Serumalbumin gebundene Peptide, welche ins Zytosol gegeben wurden. Die wesentliche Beteiligung von Hsp70 an diesen Prozessen konnten Binder et al. (2001) durch die Zugabe von Deoxyspergualin nachweisen, das Hsp70 und Hsp90 spezifisch bindet, und eine Unfähigkeit der Zelle bewirkt, antigene Peptide über MHC-I zu präsentieren. Diese Blockade konnte jedoch durch die Zugabe von Hsp70 in das Zytosol antagonisiert werden. Weiterhin ergaben sich Hinweise für die Fähigkeit des Hsp70, als extrazellulär wirkender Mediator bei APC eine proinflammatorische Reaktion auslösen zu können. Aus nekrotischen Zellen freigesetztes Hsp70, sowie auch Hsp 90, gp96 und Calretikulin, konnte Makrophagen aktivieren und so zu einer

Antigenpräsentation stimulieren (Basu et al. 2000). Extrazelluläres Hsp70 und gp96 können weiterhin die iNOS aktivieren, und somit die NO-Produktion von APCs auslösen (Panjawi et al. 2002).

Präparationen von Hsp70, welche aus Tumorzellen isoliert wurden, bewirkten eine Immunisierung gegen diesen Tumor, sowie die Hemmung dessen weiteren Wachstums (Menoret et al. 2000). Im Serum von tumortragenden Versuchstieren konnten Antikörper gegen tumorassoziiertes Hsp70 gefunden werden, deren Bildung die Induktion einer spezifischen Immunantwort voraussetzt. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde geprüft, ob mit Hilfe des Hsp70 eine gezielte Immunantwort gegen Peptid-Antigene induziert werden kann. In Untersuchungen von Moroi et al. (2000) konnte gezeigt werden, dass durch eine Immunisierung mit an Hsp70 gebundenen Peptiden eine Aktivierung einer Immunreaktion gegen dieses Peptid induziert werden kann. Chen et al. (2000) konnte die Erhöhung des DNA-Vakzinierungspotentials durch die Verknüpfung der Antigensequenz mit der DNA-Sequenz von Hsp70 zeigen. Ueda et al. (2004) konnte die Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten über eine Immunisierung mit autologen Tumor-assoziierten Hsp70 über APC bestätigen. Wieland et al. (2008) zeigte, dass Komplexe von Antigenen mit Hsp70 einen immunogenen Einfluss auf CD8⁺-T-Lymphozyten ausüben und zur Vakzinierung eingesetzt werden können. Nylstand et al. (2002) konnte über die Applikation eines mit anti-Tumor-Hsp70-DNA beladenen Adenovirus einen massiven Apoptose-ähnlichen Tumorzelltod bei Glioblastom, Brustkrebs und Kolonkarzinom induzieren und eine Rekrutierung von Makrophagen in das Tumorgewebe bewirken. Nach Isolation aus dem Gewebe waren die Makrophagen in vitro in der Lage, die apoptotischen Tumorzellen effektiv zu beseitigen. Gaspar et al. (2004) gelang es, ein Mitglied der Hsp70-Familie zu identifizieren, welches in der Lage ist, die Migration von NK-Zellen gegenüber Tumorzellen zu induzieren. In diesen Studien wurde Hsp70 als ein Protein identifiziert, welches die Fähigkeit besitzt, nach der Bindung von LPS eine proinflammatorische Signalkaskade zu aktivieren, womit die Beteiligung von Hsp70 an bakteriellen Entzündungsprozessen belegt ist. In Folgestudien konnte die Signaltransduktion über TLR-4 an den Golgi-Apparat identifiziert werden (Triantafilou und Tritantafilou 2004, Bukau und Horwich 1998, Keskin et al. 2002, Ueno et al. 2004).

Millar et al. zeigte 2003, dass Hsp70 zusammen mit Antigenen bei DC die APC Funktion stimulieren und in Richtung einer autoimmunen T-Lymphozyten Antwort in vivo lenken kann.

Zusammenfassend legen diese Befunde nahe, dass Hsp70 ein zentraler Vermittler der Immunantwort ist und somit ein vielversprechendes Ziel in der Aufklärung der Pathogenese des autoimmunvermittelten T1D darstellt.

Homologie von DnaK und Hsp70

Ein weiterer Beleg der hohen funktionalen Bedeutung der HSP ist ihre ausgeprägte phylogenetische Konservierung (Kelley und Schlesinger 1982). Wie Bardwell und Craig bereits 1984 darlegten, beträgt die Homologie auf der Ebene der Aminosäuresequenz zwischen DnaK des Bakteriums *Escheria coli* (*E. coli*) und Hsp 70 des Eukaryonten *Drosophila* 48%, auf Ebene der Nukleotidsequenz besteht eine Übereinstimmung von 57%. Im Abschnitt zwischen den Aminosäuren 138 und 183 besteht sogar eine Übereinstimmung von über 90%. Die Übereinstimmung zwischen menschlichen Hsp70 und dem Hsp70 von *Drosophila* liegt auf Nukleotidebene bei 73%, zwischen menschlichen Hsp70 und DnaK, dem Hsp70 Homolog von *E. coli*, besteht auf Ebene der Nukleotidsequenz eine Übereinstimmung von 50% (Clayton und Hunt 1985). Letztere zeigte auf Ebene der Aminosäuresequenz zwischen Mensch und *Drosophila* eine deutliche Variabilität zwischen Aminosäure 600 und 625, wogegen sich zwischen Aminosäure 150 und 175 eine Homologie von 96% findet. Im Vergleich zwischen humanem Hsp70 und DnaK von *E. coli* finden sich Schwerpunkte der Übereinstimmung zwischen Aminosäure 150 und 175 (75-85%), 250 und 275 (75-85%) sowie zwischen Aminosäure 500 und 525 (75-85%). Schlecht et al. (2011) konnten für DnaK als Analogon des Hsp70 eine differenzierte Substratbindung feststellen, bei der sich unter Ausbildung von mehreren Konformationszuständen unterschiedliche Bindungseigenschaften ergeben haben. In vorangegangenen Arbeiten von Burkart et al. (2010) konnte eine Bindung von DnaK an Bereiche der B-Kette des Insulins, InsB11-23, festgestellt werden. In derselben Arbeit der eigenen

Arbeitsgruppe (Burkart et al. 2010) wurde weiterhin darauf hingewiesen, dass Hsp70 und DnaK in der Peptid-Bindungsregion eine Homologie von 69,9 % zeigen.

Zielsetzung der Arbeit

Die immunvermittelte Zerstörung der Betazellen der Pankreasinseln stellt einen mehrstufigen Prozess dar, bei dem als Endpunkt die klinische Manifestation eines T1D steht. Neuere Untersuchungen belegen die zentrale Rolle von molekularen und zellulären Komponenten des natürlichen Immunsystems, insbesondere den Makrophagen und Stressproteinen. Makrophagen fällt bei der Initiierung der betazellgerichteten Immunreaktion eine wesentliche Rolle zu. Sie können zum einen die Betazellen selber direkt schädigen (Appels et al. 1989), als auch die Zellen des adaptiven Immunsystems, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten, durch Mediatorenfreisetzung und Antigenpräsentation beeinflussen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll weiter beleuchtet werden, welche Auswirkung durch das Zusammenwirken von als immundominant beschriebener Insulinpeptide (Nakayama et al. 2005) und Hsp70, beziehungsweise seinem Homolog DnaK, auf die Aktivität von Makrophagen in der Entwicklung des T1D resultiert. Als Parameter der immunstimulatorischen Effekte sollte die Freisetzung der (proinflammatorischen) Zytokine TNF- α sowie IL-6 nach Exposition gegenüber DnaK und Insulinpeptiden bestimmt werden.

In der vorliegenden Arbeit soll ein Beitrag zur Prüfung der Hypothese geleistet werden, dass Insulin nach Zerstörung von Betazellen im Übermaß fragmentiert vorhanden ist, und von kursierenden HSP sequenzspezifisch erkannt und in Folge dessen zu einer Stimulation der Makrophagen und zur Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren führt. Durch die weitere Aufklärung dieser frühen Schritte bei der Aktivierung einer betazellgerichteten Immunreaktion ergeben sich möglicherweise Optionen für eine direkte Beeinflussung des Krankheitsgeschehens sowie Hinweise für die Entwicklung betazellprotektiver Strategien.

2. MATERIAL UND METHODEN

Material

Zelllinien

Humane Makrophagen (MonoMac 6) (Verdoppelungszeit in Kultur nach ca. 60 h)

Zelltyp: humane akute monozytische Leukämie

MonoMac 6 hergestellt aus dem peripheren Blut eines 64-jährigen Mannes mit Remission einer akuten myeloischen Leukämie (AML FAB M5) (1985) (Ziegler-Heitbrock et al. 1988)

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

J774A.1 Mausmakrophagen (Verdoppelungszeit in Kultur nach ca. 35 h)

Zelltyp: murine Maus-Monozyten

J774A.1 hergestellt aus einem Tumor einer weiblichen BALB/c Maus (1968) (Ralph et al. 1976)

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

Bakterielle Präparate

Lipopolysaccharid (LPS)

Sigma, Deisenhofen

E. coli-Stamm:026: B6

Zellkulturmedien

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
(D-PBS)

Sigma Aldrich Chemie GmbH,
Schnelldorf

RPMI 1640 Medium

PAA, Linz, Österreich

Supplement Zugabe	Endkonzentrationen der Zusätze nach Zugabe eines Aliquots (13,75 ml) in eine Flasche RPMI 1640 (500 ml) (Volumen des zugegebenen Supplements vernachlässigt) Glutamin 146 mg/500 ml (2 mM) Non-essential aminoacids L-Alanin 4,45 mg/500 ml L-Asparagin x H ₂ O 7,5 mg/500 ml L-Glutaminsäure 7,35 mg/500 ml Glycin 0,56 mg/500 ml L-Prolin 1,32 mg/500 ml L-Serin 1,10 mg/500 ml HEPES 1,19 g/500 ml (10 mM) Penicillin 60 mg/500 ml Streptomycin 135 mg/500 ml Ampicillin 12,5 mg/500 ml
----------------------	---

Spezifische Reagenzien/ Kits

ELISA OptEIA -Sets: humanes TNF-alpha humanes IL-6 murines TNF-alpha murines IL-6	Pharmingen, Heidelberg
Coating-Puffer pH 8,2 0,1 M NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
HRP Avidin	Pharmingen, Heidelberg

Chemikalien

Accutase	PAA, Linz, Österreich
Bicoll Separating Solution (Density 1,077 mg/ml)	Biochrom AG, Berlin
Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS)	Serva, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Linz, Österreich Gibco, Life Technologies, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco, Life Technologies, Karlsruhe
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma, Deisenhofen
Natriumcarbonat (NaCO_3)	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydrogenmonophosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat(NaHCO_3)	Serva, Heidelberg

Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure 14,8 M (H_3PO_4^-)	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Thiazolyl blue analytic grade (MTT)	Biomol, Hamburg
TMB Substrat Reagenz Set	Pharmingen, Heidelberg ICN Biomedicals Inc, Aurora, Ohio(OH), USA
Trypanblau	Gibco, Life Technologies, Karlsruhe
Tween-20	Calbiochem, Bad Soden /Schwalbach
Verbrauchsmaterialien/Einwegartikel	
Abdeckfolie, selbstklebend	Beyer GmbH, Düsseldorf
Assay Platte PRO-BIND	Falcon Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont-de-Claix, Frankreich
Nunc-Immuno Platten Maxi-Sorp	Nunc, Roskilde, Dänemark
96-Well Nunc-Immuno-plate	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Pipettenspitzen	
10 µl kristall	Biozym Diagnostig GmbH, Hess. Oldendorf
200 µl gelb	Sarstedt, Nümbrecht
1000 µl blau	Sarstedt, Nümbrecht

Polystyrol-Röhrchen 15 ml/50 ml	Falcon Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont-de-Claix, Frankreich
Wägeschalen	Rotilabo, Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Vacutainer (250 ml/75 cm ²)	BD Vacutainer Systems, Preanalytical Solutions, Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK
Zellkulturflasche	Falcon Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont-de-Claix, Frankreich
PS Microtestplatte	Greiner Labortechnik, Solingen
Zellkulturflaschen 250 ml	Falcon Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont-de-Claix, Frankreich
96-well Zellkulturplatte Mikrotest	Falcon Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont-de-Claix, Frankreich
Stammlösungen und Puffer	
1% Paraformaldehyd/PBS	0,5 ml Paraformaldehyd in 49,5 ml PBS Gibco, Eggenstein
Trypanblau	(0,4 g in 0,85 % NaCl) 1:4 verdünnt in PBS Gibco, Eggenstein

10xPBS	(Phosphate Buffered Saline, pH 7) 40,0 g NaCl 7,3 g Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O 1,0 g KH ₂ PO ₄ 1,0 g KCl in 500 ml ddH ₂ O
--------	---

Waschpuffer	(PBS mit 0,05 %Tween, pH 7,0) 100 ml 10xPBS 900 ml ddH ₂ O 500 µl Tween-20 für 1l Lösung
-------------	---

Geräte

CO ₂ -Inkubator Cytoperm	Pharmacia, Freiburg
ELISA Photometer MWG und Software Softmax	Biotech, Ebersberg
Mikroskop	Zeiss, Göttingen
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikroreaktionsgefäß 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Multipipette 200 µl	Eppendorf, Hamburg

Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Umkehrmikroskop	Zeiss, Jena
Sterilbank	Heraeus, Osterode
Zentrifuge 4400	Heraeus, Osterode
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Vortex	Heidolph, Hamburg
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg

Methoden

Makrophagenkultivierung

MonoMac 6 - Makrophagen Kultivierung

Die nachfolgend beschriebenen Arbeiten werden alle unter einer Sterilbank (Gegenstromarbeitsbank) durchgeführt. Die Zellen werden in einem Inkubator bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einer Atmosphäre von 5 % CO₂ kultiviert. Hierbei befinden sie sich in einem RPMI 1640 Medium, welches mit 10% FCS sowie Supplement versehen ist. In Abständen von 5-6 Tagen werden die Zellen verdünnt. Dazu wird der Kulturflascheninhalt auf zwei 15 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und bei 250 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. In der Zwischenzeit wird eine Kulturflasche (250 ml/75 cm²) mit 20 ml Medium befüllt. Der Überstand wird abgesaugt, die Zellen werden in 5 ml frischen Mediums resuspendiert. In einer 1 zu 10 Verdünnung werden die Zellen nun wieder in der vorbereiteten Kulturflasche zurück in den Inkubator gegeben.

J774A.1 -Makrophagen Kultivierung

Die nachfolgend beschriebenen Arbeiten werden alle unter einer Sterilbank (Gegenstromarbeitsbank) durchgeführt. Die Zellen werden in einem Inkubator bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einer Atmosphäre von 5 % CO₂ kultiviert. Hierbei befinden sie sich in einem RPMI 1640 Medium, welches mit 10 % FCS sowie Supplement (siehe Material 2.1) versehen ist. In Abständen von 2-3 Tagen werden die adhärennten Zellen vom Boden der Kulturflaschen (250 ml/75 cm²) abgelöst. Hierzu wird das Restmedium zunächst aus der Kulturflasche abgesaugt, die Zellen werden zweimal mit PBS (+ Glucose + KCl) (siehe Material 2.1) gespült. Das PBS wird vollständig abgesaugt, anschließend werden 5 ml Accutase hinzugefügt. Die Flasche wird für 5 min abermals in den Inkubator gebracht, um anschließend die Zellen schonend mittels einer Pipette vom Flaschenboden zu spülen. Die gewonnene Zellsuspension wird nun in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und nun bei 250 g

für 5 min bei 4°C zentrifugiert. In der Zwischenzeit wird eine Kulturflasche (250 ml/75 cm²) mit 20 ml Medium befüllt. Der Überstand wird abgesaugt, die Zellen werden in 5 ml frischen Mediums resuspendiert. In einer 1 zu 10 Verdünnung werden die Zellen nun wieder in der vorbereiteten Kulturflasche zurück in den Inkubator gegeben.

Vorbereitung und Durchführung der Experimente

Die nachfolgend beschriebenen Techniken gelten, falls nicht abweichend aufgeführt, sowohl für humane MonoMac 6 als auch die murinen J774A.1 Zellen.

Zellzahlbestimmung

Die während der Verdünnungsvorgänge verbliebene restliche Zellsuspension kann zur Zellzahlbestimmung als Vorbereitung für Experimente verwendet werden. Dazu werden 20 µl der Zellsuspension aus dem Zentrifugenröhrchen entnommen und mit 180 µl Trypanblau vermischt; es folgt die Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer, bei der vier Quadranten ausgezählt werden.

Vorbereitung der Zellen für Experimente

Nach Bestimmung der prozentualen Anzahl der lebenden und toten Zellen kann nun unter der Sterilbank eine Verdünnung der Zellen auf 1×10^6 /ml erfolgen. Zur Durchführung der Experimente werden die Zellen in die Wells einer 96-Well Platte ausgesät. Die äußeren Randwells werden mit Medium bzw. Puffer als Verdunstungsschutz befüllt. In die verbleibenden inneren 60 Wells werden nun mit Hilfe einer Mikropipette mit jeweils 200 µl der verdünnten Zellsuspension beschickt. Die derartig befüllte 96-Well Platte wird dann über Nacht im Inkubator (95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂) belassen.

Herstellung der Aliquots von LPS, DnaK und Insulinpeptiden

Die nachfolgend beschriebenen Arbeiten werden alle unter der Sterilbank durchgeführt. Alle Lösungen (LPS, DnaK, InsB11-23, InsB18-30) werden während der Versuchsvorbereitung auf Eis gestellt. Es ist darauf zu achten, dass nach jedem

Verdünnungsschritt die Lösung gut gemischt werden muss.

Herstellung der Gebrauchslösungen

LPS

Konzentration der Stammlösung: 1 mg/ml

Endkonzentration im Well: 10 ng/ml

Dazu wird im Mikroreaktionsgefäß eine Verdünnung von 100 ng/ml hergestellt.

Verdünnungsfaktor = 10000

1.) 3 µl LPS Stammlösung + 297 µl PBS = 300 µl

(Konz.: 1:100 = 10 µg/ml)

2.) 50 µl 1:100 LPS Verdünnung + 450 µl PBS = 500 µl

(Konz: 1:10 = 1 µg/ml)

3.) 50 µl 1:10 LPS Verdünnung + 450 µl PBS = 500 µl

(Konz: 1:10 = 0,1 µg/ml = 100 ng/ml)

InsB11-23 (Synthesenr. 48/40)

Konzentration der Stammlösung: 5,4 mg/ml

Endkonzentration im Well: 10 µg/ml

Dazu wird im Mikroreaktionsgefäß eine Verdünnung von 200 µg/ml hergestellt.

5400 µg/ml : 200 µg/ml

Verdünnungsfaktor = 27

3,5 µl InsB11-23 Stammlösung + 91 µl PBS = 94,5 µl (Konzentration = 200 µg/ml).

InsB18-30 (Synthesenr. 51/52)

Konzentration der Stammlösung: 5,4 mg/ml

Endkonzentration im Well: 10 µg/ml

Dazu wird im Mikroreaktionsgefäß eine Verdünnung von 200 µg/ml hergestellt.

5400 µg/ml : 200 µg/ml

Verdünnungsfaktor = 27

3,5 µl InsB18-30 Stock Solution + 91 µl PBS = 94,5 µl (Konzentration = 200 µg/ml).

DnaK

Konzentration der Stammlösung: 0,9 mg/ml

Endkonzentration im Well: 1 µg/ml

Dazu wird im Mikroreaktionsgefäß eine Verdünnung von 20 µg/ml hergestellt.

900 µg/ml: 20 µg/ml

Verdünnungsfaktor = 45

6 µl DnaK Stammlösung + 264 µl PBS = 270 µl (Konzentration = 20 µg/ml).

Aus den fertigen Gebrauchslösungen (InsB11-23 200 µg/ml, InsB18-30 200 µg/ml, DnaK 20 µg/ml) werden nun folgende 1:2 Verdünnungen hergestellt:

1.) LPS = 50 µl LPS (10 ng/ml)

- | | |
|----------------------|--|
| 2.) InsB11-23 | = 50 µl InsB11-23 (200 µg/ml) + 50 µl PBS |
| 3.) InsB18-30 | = 50 µl InsB18-30 (200 µg/ml) + 50 µl PBS |
| 4.) DnaK | = 50µl DnaK (20 µg/ml) + 50µl PBS |
| 5.) DnaK + InsB11-23 | = 50µl DnaK (20 µg/ml)
+ 50µl InsB11-23 (200 µg/ml) |
| 6.) DnaK + InsB18-30 | = 50µl DnaK (20 µg/ml)
+ 50µl InsB18-30 (200 µg/ml) |

Werden im Versuchsaufbau nunmehr niedrigere Konzentrationen der Einzelsubstanzen benötigt, so zum Beispiel 0,1 µg/ml DnaK, so sind 50 µl DnaK (20 µg/ml) zuvor mit 450 µl PBS zu verdünnen, bevor 50 µl InsB11-23 (200 µg/ml) hinzugegeben wird. Gleiches gilt, wenn nur 1 µg/ml InsB11-23 (oder InsB18-30) erforderlich sind.

Die 1:2 Verdünnungen werden nun für ca. 5 sec. bei 600/min auf dem Vortex-Schüttler gemischt. Anschließend kommen sie bei 37 °C in den Thermoblock und werden gleichzeitig bei 600/min geschüttelt. Die Inkubationszeit beträgt 30 Minuten.

Versuchsbeschickung

Die Herstellung der Experiment-Aliquots ist wie oben beschrieben durchzuführen. In der Inkubationszeit entnimmt man aus den vorbereiteten inneren 60 Wells der Platte (bis auf den äußeren Rand) jeweils 20 µl pro Well und verwirft diese.

In drei horizontal aufeinanderfolgenden Wells, einem Triplikat, wird zunächst als Referenz jeweils 20 µl Medium hinzugegeben.

Vertikal absteigend werden nun drei Wells als Triplikat zusammengefasst, von denen jedem 20 µl aus einem der aliquotierten Testsubstanzen hinzugegeben wird. Hiernach wird ein Deckel (siehe Material) auf die 96 Well Platte gegeben, auf dem die inneren 60 Wells in ihren Triplikaten markiert und beschriftet werden. Hiernach wird die 96 Well Platte in den Brutschrank verbracht.

Beispiel für ein Pipettierschema für MonoMac 6

Die 1:2 Verdünnungen werden nun nochmals für ca. 5 sec. bei 600/min auf dem Vortexer gemischt. Nun pipettiert man in drei Wells einer Spalte 20 µl/Well der entsprechenden Testsubstanzen.

- 1.) Reihe 2 B-D = Medium
- 2.) Reihe 3 B-D = DnaK
- 3.) Reihe 4 B-D = InsB11-23
- 4.) Reihe 5 B-D = InsB18-30
- 5.) Reihe 6 B-D = DnaK + InsB11-23
- 6.) Reihe 7 B-D = DnaK + InsB18-30
- 7.) Reihe 8 B-D = LPS

Da man 20 µl der Testsubstanzen zu den 180 µl MonoMac 6 Zellen pipettiert, entsteht noch mal eine Verdünnung von 1:10. Somit erhält man die gewünschte Endkonzentration. Anschließend wird die 96 Well Platte für sechs bzw. vierundzwanzig Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Überstandabnahme nach Ablauf der Inkubationszeit

Nach sechs Stunden werden bei geplanter TNF-α –Bestimmung aus jedem Well der Platten 60 µl entnommen und auf eine leere 96 Well-Platte transferiert. Danach erfolgt das Aufbringen einer Abdeckfolie, die Markierung der inneren 60 Wells, deren Beschriftung sowie die Beschriftung der Randlasche, um die Information der Bebrütungszeit und des zu untersuchenden Zytokins ergänzt. Die Wellplatten werden

bei -20 °C gelagert. Nach 24 Stunden werden analog die Überstände zwecks IL-6 Bestimmung entnommen und eingefroren.

Nachweis von Zytokinen mittels ELISA

Die Bestimmung der Zytokine mittels ELISA (ELISA Kits siehe Material) werden nach den Protokollen gemäß der Herstellerangaben durchgeführt. Diese unterscheiden sich lediglich bezüglich des verwendeten Antikörpers, so dass nachfolgend der Nachweis mittels TNF- α aufgeführt ist und in analoger Weise für die IL-6 Bestimmung mit ebenjenen Antikörper zu erfolgen hat.

Nachweis von TNF- α mittels ELISA

Zunächst wird eine Stammlösung des Antikörpers gegen TNF- α in Coating-Puffer bis zu einer Endkonzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt. Das genaue Prozedere ist jeweils den spezifischen Angaben des ELISA-Kit Herstellers zu entnehmen. Eine ELISA-Platte wird nun in jedem Well mit 50 μl der Lösung beschickt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird eine Waschlösung (PBS/0,05 % Tween) angesetzt. Der Überstand in den Wells wird verworfen und die Platte wird dreimal mit dieser Waschlösung gespült, anschließend werden die Wells mit 100 μl Assay-Diluent (PBS/10 % FCS) für eine Stunde blockiert. Der Überstand wird abermals verworfen. Es folgen wieder drei Waschschrte. Nun werden die Wells jeweils mit Triplikaten der Standardkonzentrationsreihe für TNF- α sowie 50 μl der aufgetauten Proben versehen. Dieser Ansatz wird zwei Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Auch hiernach wird der Überstand in den Wells verworfen und es werden fünf Waschdurchgänge durchgeführt. Nun werden in jedes Well 50 μl mit einer Lösung bestehend aus 5 % Detection Antikörper/ 5 % Peroxidase in Assay Diluent beschickt, welche für eine weitere Stunde auf den Wells verbleibt. Die Überstände werden abermals verworfen. Es folgen sieben Waschschrte. Anschließend werden in jedes Well 50 μl einer Mischung aus 50 % Lösung A/ 50 % Lösung B gegeben und für 30-40 Minuten ins Dunkel gestellt.

Danach werden in jedes Well 50 µl Stopp-Lösung (2 molare Schwefelsäure) hinzugefügt. Für die photometrische Messung werden die Proben bei Bedarf zuvor 1:10 verdünnt. Die Messung erfolgt nun durch das Photometer (ELISA Photometer MWG, siehe Material) unter Verwendung der Auswertungssoftware Software Softmax. Die Konzentration des gelösten Farbstoffes wird mittels Photometer bei 550 nm (Referenzwellenlänge: 650 nm) im ELISA-Reader bestimmt.

MTT-Verfahren zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität

Das MTT Verfahren dient der Bestimmung der mitochondrialen Dehydrogenasen in (lebenden) Zellen. Das wasserlösliche 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) wird von seiner gelblichen Färbung durch Dehydrogenasen in das alkohollösliche Formazan mit bläulicher Färbung umgewandelt, welches nach der Lyse der Zellen durch SDS freigesetzt wird. Die Konzentration des gelösten Farbstoffes kann mittels Photometer bei 550 nm (Referenzwellenlänge: 650 nm) in einem ELISA-Reader bestimmt werden. Zur Durchführung der MTT-Messung werden nach Abnahme der Zellkulturüberstände zwecks der Bestimmung mitochondrialen Dehydrogenasen 5 mg MTT Reagenz in 1 ml PBS gelöst und zu jedem Well so viel Reagenz hinzugegeben, dass das Reagenz im Verhältnis 1:5 verdünnt wird. In den meisten der hier dargestellten Versuche war für die Zytokinbestimmung bereits zweimal 60 µl entnommen worden, so dass bei einem Restvolumen von 80 µl noch 20 µl der MTT Reagenzlösung hinzugegeben werden. Die Zellkulturplatte wurde nach Reagenzhinzugabe bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit für vier Stunden inkubiert. Hiernach wird der Überstand vollständig entnommen und in jedes Well 200 µl DMF/SDS gegeben. Nach weiteren 16 Stunden Inkubation wurden durch wiederholtes Mischen die Zellen restlos aufgelöst und die Formazankonzentration photometrisch bestimmt. Für die Bestimmung der Formazankonzentration wird die Lösung vor photometrischer Messung 1:10 verdünnt.

Statistische Analyse

Zur Berechnung statistischer Signifikanzen zwischen mehreren Mittelwerten wurde der One-Way-ANOVA (mit Bonferroni post-hoc Test) angewendet. Die graphische Darstellung der Daten erfolgt als Mittelwerte + Standardabweichung (SD). Als statistisch signifikant wurden Unterschiede zwischen zwei Datenpunkten bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von $p < 0,05$ angesehen.

Die Erstellung aller statistischen Analysen erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism 4.02 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA)

3. ERGEBNISSE

Induktion von TNF- α - und IL-6-Freisetzung aus Makrophagen durch LPS

Um die mögliche modulierende Wirkung von DnaK auf die Makrophagen stimulierende Wirkung des InsB11-23 zu untersuchen, wurden sowohl Makrophagen der murinen J774A.1 Zelllinie als auch der humanen MonoMac 6 Zelllinie verschiedenen Konzentrationen von 13-mer-Peptiden der Insulin B-Kette und DnaK in verschiedenen Kombinationen ausgesetzt.

In einem Vorversuch wurde zunächst die Stimulierbarkeit der Zellen durch steigende Konzentrationen von LPS untersucht. Die Zellen wurden hierbei für jeweils sechs Stunden beziehungsweise 24 Stunden im Brutschrank belassen. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeiten wurden die Kulturüberstände abgenommen und die metabolische Aktivität der Zellen mittels des MTT Verfahrens bestimmt. In den nach sechs Stunden abgenommenen Überständen wurde der Gehalt an TNF- α bestimmt. In den nach 24 Stunden entnommenen Überständen wurde die Konzentration an IL-6 bestimmt.

In Abb. 1 (A) ist die Reaktion der MonoMac 6 Zellen auf unterschiedliche LPS-Mengen und hieraus resultierender TNF- α Konzentration aufgeführt. Um zu prüfen, welche Effekte alleine die Kulturbedingungen in Abwesenheit stimulierender Substanzen haben, wurden die MonoMac 6 Makrophagen in Kontrollansätzen in Medium ohne Peptide oder DnaK inkubiert (Abb. 1A). Die Mediumkontrolle führte zu einer geringen Stimulation der Zellen, wodurch Effekte der Kulturbedingungen weitgehend ausgeschlossen werden konnten. Abb. 1 zeigt weiterhin, wie aus der Literatur bekannt und durch eine Reihe von Vorversuchen bestätigt, dass eine direkte Proportionalität der TNF- α Produktion zur eingesetzten LPS-Konzentration besteht. So lässt sich bei einer LPS-Konzentration von 1 ng/ml eine TNF- α Konzentration von $329,10 \pm 22,13$ pg/ml messen. Bei einer LPS-Konzentration von 10 ng/ml ergibt sich ein TNF- α Wert von $705,00 \pm 43,84$ pg/ml; steigert man die LPS Konzentration auf 1000 ng/ml wird ein TNF- α Anstieg auf $2775,00 \pm 154,19$ pg/ml gemessen. Aus den in der Abb. 1 B

dargestellten MTT-Werten lässt sich auf lebende Zellen schließen. Da sich in keinem Ansatz ein Hinweis auf eine toxische Schädigung der Zellen ergab, wird bei der Beschreibung der weiteren Experimente auf eine graphische Darstellung der MTT-Daten verzichtet.

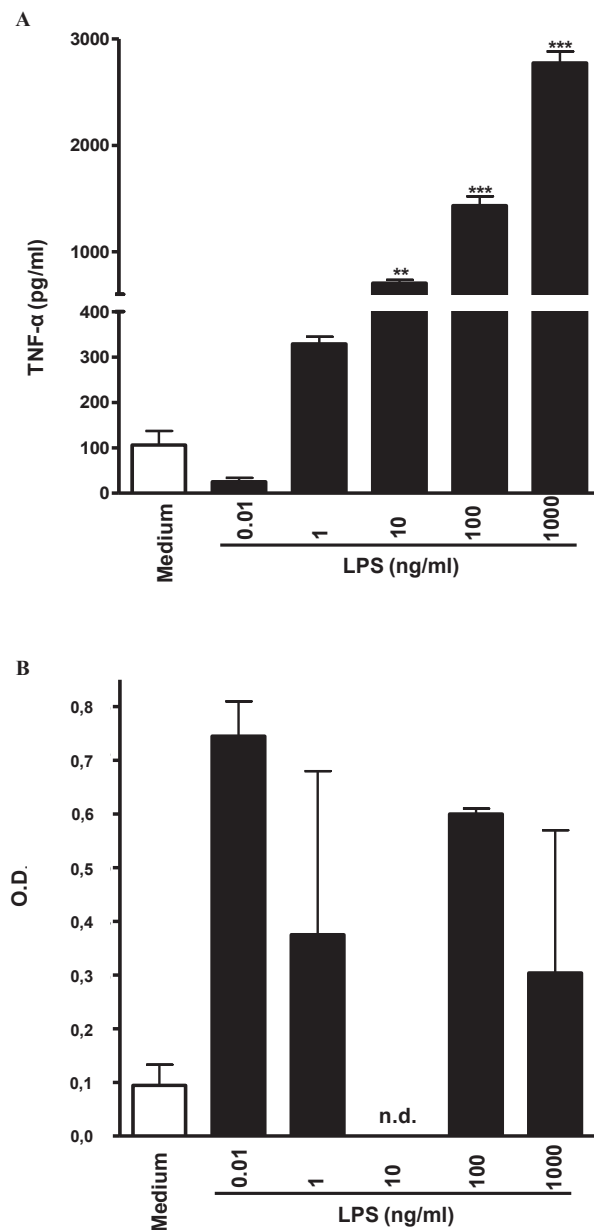


Abbildung 1

Humane Makrophagen der Linie MonoMac 6 (100.000/ml) wurden in 96 Well Platten in Abwesenheit (Medium) oder in Anwesenheit von LPS in aufsteigender Konzentration inkubiert. Nach sechs Stunden wurde im Kulturüberstand (A) die Konzentration von TNF-α (pg/ml) gemessen sowie (B) die optische Dichte (O.D.) im Rahmen des MTT-Verfahrens ermittelt. Die Daten zeigen Mittelwerte (+ SD) aus Triplikaten. n.d. = nicht detektierbar ; **p<0,01, ***p<0,001 im Vergleich zum Medium.

Induktion der Freisetzung von TNF- α und IL-6 durch DnaK und Insulinpeptide

Aufbauend auf den in Abb. 1 dargestellten Ergebnissen wurde in den nun folgenden Experimenten untersucht, inwieweit der Stimulus DnaK und/oder ein Insulinpeptid einzeln in der Lage ist, die Ausschüttung der proinflammatorischen Mediatoren TNF- α und IL-6 aus Makrophagen zu induzieren.

Dazu wurden die Zellen in Gegenwart von unterschiedlichen Kombinationen von DnaK und ausgewählten Insulinpeptiden inkubiert und untersucht, ob sich das Muster der freigesetzten Zytokine TNF- α und IL-6 ändert. LPS (10 ng/ml) wurde als Kontrolle der Zellaktivierung in drei Wells der 96-Wellplatten hinzugegeben, ebenso wurden drei Wells mit Medium als primär unveränderte Kontrolle für den gleichen Zeitraum inkubiert.

Induktion der Freisetzung von TNF- α und IL-6 durch DnaK und Insulinpeptide aus humanen MonoMac 6 Makrophagen

Induktion der Freisetzung von TNF- α durch DnaK und Insulinpeptide bei humanen MonoMac 6 Makrophagen

Abb. 2, Abb. 3, Abb. 4 zeigen die Freisetzung von TNF- α durch MonoMac6 Zellen nach Behandlung mit steigender Konzentration der Einzelsubstanzen.

In Abb. 2 erkennt man die TNF- α Freisetzung von MonoMac 6 Zellen nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen von DnaK. In diesen Ansätzen bewegte sich das Mediumniveau für TNF- α bei $1,66 \pm 0,87$ pg/ml. In Reaktion auf eine Hinzugabe von 1 μ g/ml DnaK alleine wurde eine TNF- α Konzentration von $16,69 \pm 2,47$ pg/ml gemessen; wurde DnaK in einer niedrigeren Konzentration (0,1 μ g/ml) alleine hinzugegeben, befand sich die TNF- α Konzentration bei $3,70 \pm 0,55$ pg/ml. Bei der Zugabe von 10 ng/ml LPS als Positivkontrolle zeigte sich eine hohe TNF- α Freisetzung von $862,40 \pm 115,00$ pg/ml.

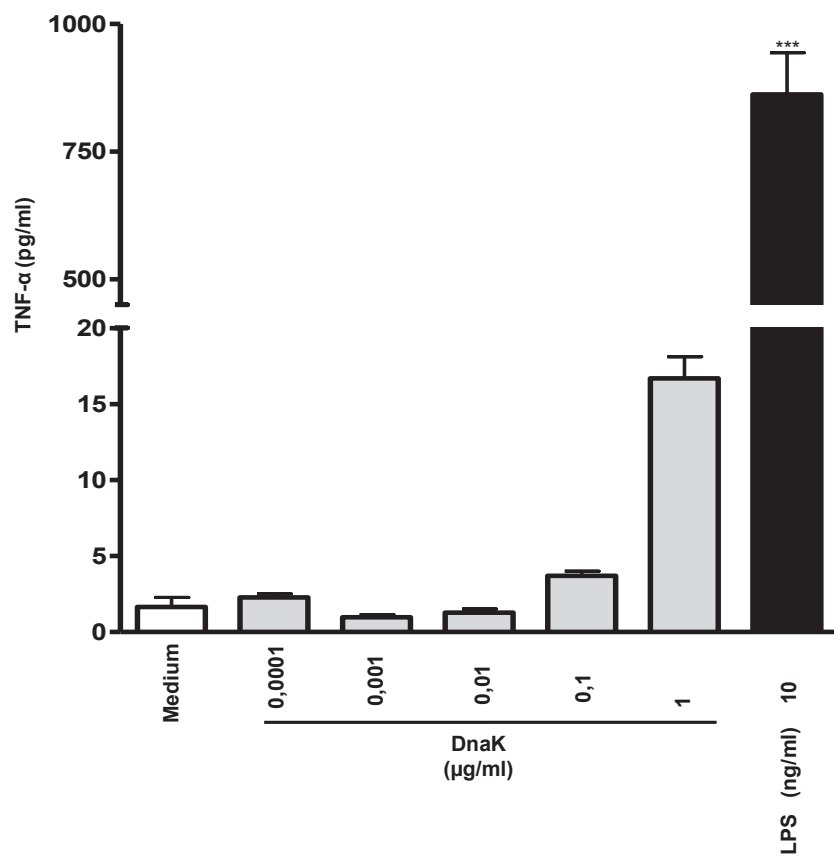


Abbildung 2

Humane Makrophagen der Linie MonoMac 6 (100.000/ml) wurden in 96 Well Platten in Abwesenheit (Medium) oder in Anwesenheit von LPS (10 ng/ml) oder in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen von DnaK inkubiert. Nach sechs Stunden wurde im Kulturüberstand die Konzentration von TNF- α (pg/ml) gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte (+ SD) aus Triplikaten. *** $p < 0,001$ im Vergleich zum Medium.

In Abb. 3 sieht man nun, dass unter Hinzugabe von 10 µg/ml InsB11-23 eine TNF-α Konzentration von $2,43 \pm 0,70$ pg/ml resultierte. Auch bei niedrigeren Konzentrationen der Einzelsubstanz zeigte sich ein ähnlicher Befund: Unter 0,01 µg/ml InsB11-23 zeigte sich eine TNF-α Konzentration von $3,20 \pm 0,63$ pg/ml.

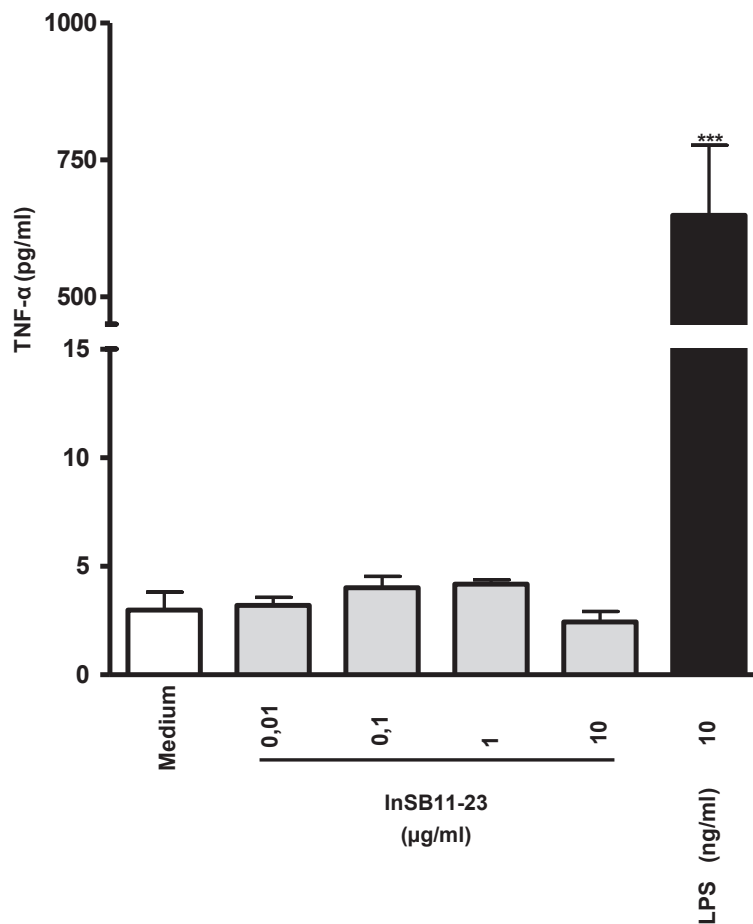


Abbildung 3

Humane Makrophagen der Linie MonoMac 6 (100.000/ml) wurden in 96 Well-Platten in Abwesenheit (Medium) oder in Anwesenheit von LPS (10 ng/ml) oder in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen InsB11-23 (µg/ml) inkubiert. Nach sechs Stunden wurde im Kulturüberstand die Konzentration von TNF-α (pg/ml) gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte (+ SD) aus Triplikaten. *** $p < 0,001$ im Vergleich zum Medium.

Abb. 4 zeigt, dass 10 µg/ml InsB18-30 eine TNF-α Konzentration von $1,76 \pm 0,30$ pg/ml hervorrief. Eine InsB18-30-Konzentration von 0,001 µg/ml ergab eine TNF-α Konzentration von $0,69 \pm 0,01$ pg/ml.

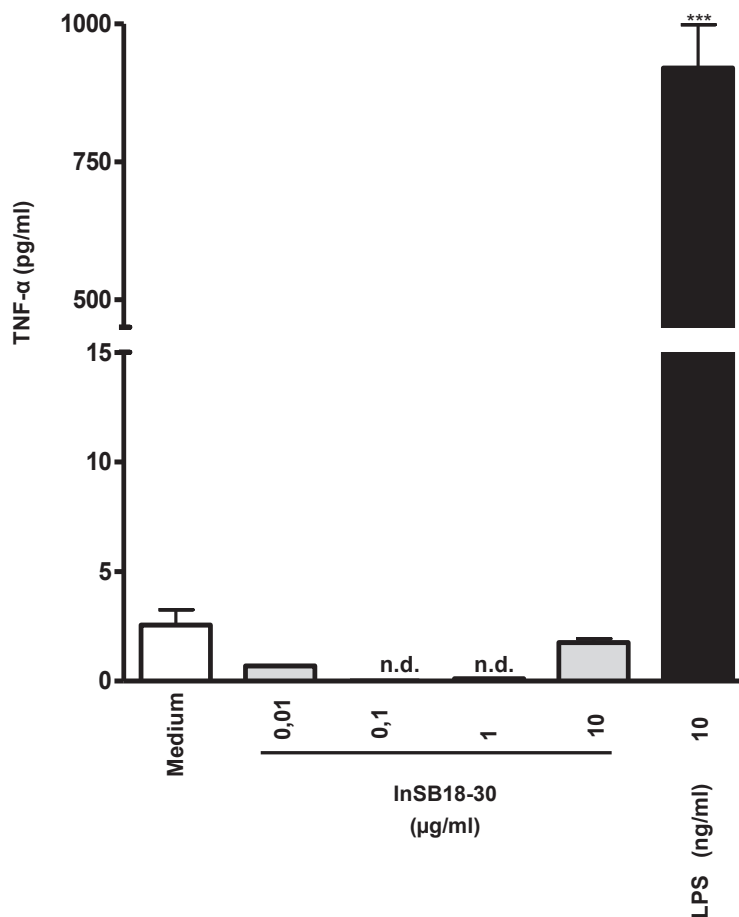


Abbildung 4

Humane Makrophagen der Linie MonoMac 6 (100.000/ml) wurden in 96 Well Platten in Abwesenheit (Medium) oder in Anwesenheit von LPS (10 ng/ml) oder in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen von InsB18-30 (µg/ml) inkubiert. Nach sechs Stunden wurde im Kulturüberstand die Konzentration von TNF-α (pg/ml) gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte (+ SD) aus Triplikaten. n.d. = nicht detektierbar; *** $p < 0,001$ im Vergleich zum Medium.

Somit erkennt man in Abb. 3 und Abb. 4, dass sowohl die Peptidsequenz InsB11-23 als auch InsB18-30 als Einzelsubstanzen keine signifikante Zytokinausschüttung gegenüber dem Medium hervorrufen.

Abb. 5 zeigt, dass die Kombination von 1 µg/ml DnaK und 10 µg/ml InsB11-23 eine deutliche Steigerung der TNF-α Konzentration gegenüber dem Medium von $1,66 \pm 0,87$ pg/ml auf $757,30 \pm 110,20$ pg/ml TNF-α bewirkt. Diese ist fast gleichauf mit der Stimulation durch 10 ng/ml LPS mit einer TNF-α Konzentration von $862,40 \pm 115,00$ pg/ml.

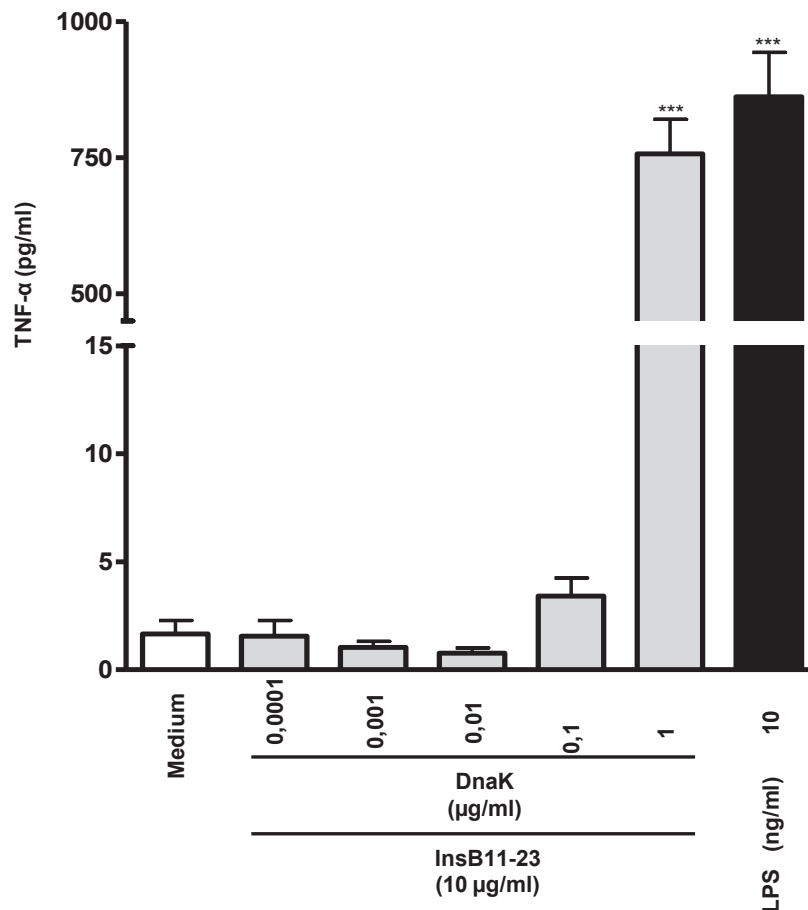


Abbildung 5

Humane Makrophagen der Linie MonoMac 6 (100.000/ml) wurden in 96 Well Platten in Abwesenheit (Medium) oder in Anwesenheit von LPS (10 ng/ml) oder in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen von DnaK und InsB11-23 (10 µg/ml) inkubiert. Nach sechs Stunden wurde im Kulturüberstand die Konzentration von TNF-α (pg/ml) gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte (+ SD) aus Triplikaten. *** $p < 0,001$ im Vergleich zum Medium.

Bei einer Kombination von 1 µg/ml DnaK und 10 µg/ml InsB18-30 (Abb. 6) wurde eine TNF-α Konzentration auf Mediumniveau von $1,68 \pm 0,87$ pg/ml festgestellt. Bei einseitiger Reduktion der DnaK-Konzentration verringern sich die TNF-α Konzentrationen weiter leichtgradig, so dass bei einer Kombination von DnaK (0,1 µg/ml) mit InsB18-30 (10 µg/ml) eine TNF-α Konzentration von $1,23 \pm 0,26$ pg/ml gemessen wird.

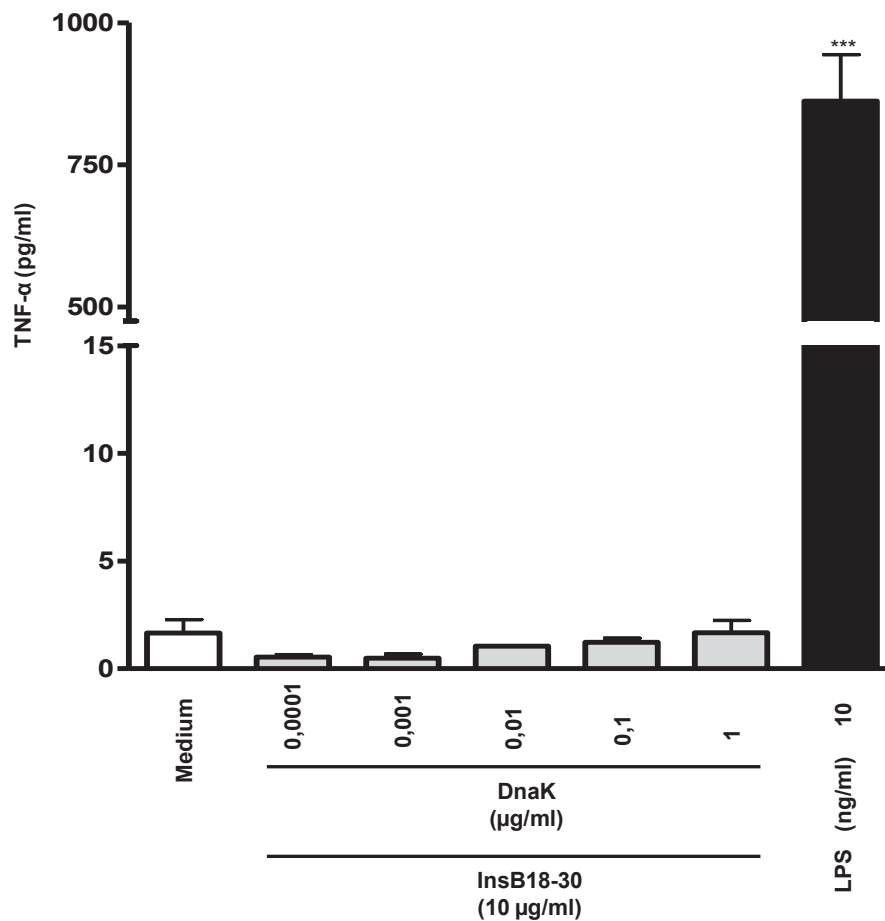


Abbildung 6

Humane Makrophagen der Linie MonoMac 6 (100.000/ml) wurden in 96 Well Platten in Abwesenheit (Medium) oder in Anwesenheit LPS (10 ng/ml) oder in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen von DnaK und InsB18-30 (10 µg/ml) inkubiert. Nach sechs Stunden wurde im Kulturüberstand die Konzentration von TNF-α (pg/ml) gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte (+ SD) aus Triplikaten. *** $p < 0,001$ im Vergleich zum Medium.

Zusammenfassend lässt sich für die Resultate in den beiden voran beschriebenen Abb. festhalten, dass DnaK in deutlich reduzierter Konzentration ($0,0001 \mu\text{g/ml}$) in Kombination mit InsB11-23 ($10 \mu\text{g/ml}$) (Abb. 5) mit einer resultierenden TNF- α Konzentration von $1,56 \pm 1,01 \text{ pg/ml}$, vergleichbar dem Resultat bei Kombination DnaK ($0,0001 \mu\text{g/ml}$) mit InsB18-30 ($10 \mu\text{g/ml}$) mit einer gemessenen TNF- α Konzentration von $0,54 \pm 0,15 \text{ pg/ml}$ (Abb. 6), sich in der Nähe des Mediumniveaus bewegt.

Aufgrund des ausbleibendes Effektes auf die Zytokinausschüttung bei den Kombinationen von geringen DnaK- und Peptidkonzentrationen wurden in den Folgeversuchen DnaK, InsB11-23 sowie InsB18-30 nur noch in den beiden höchsten Konzentrationen untersucht; folglich für DnaK in Konzentrationen von $0,1 \mu\text{g/ml}$ und $1 \mu\text{g/ml}$ und für die beiden Peptide (InsB11-23 und InsB18-30) in Konzentrationen von $1 \mu\text{g/ml}$ und $10 \mu\text{g/ml}$.

Dosisabhängigkeiten der IL-6 Induktion durch Insulinpeptide bei humanen MonoMac6

Wie in den vorausgegangenen Versuchen für die TNF- α Ausschüttung dargelegt, zeigt die Abb. 7 auch in der Bestimmung der IL-6 Konzentration nach 24 Stunden, dass sowohl die Peptide InsB11-23 als auch InsB18-30 keine signifikante Zytokinausschüttung gegenüber dem Medium induzieren: in der Mediumsprobe findet sich eine IL-6 Konzentration von $1,52 \pm 1,36 \text{ pg/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$ InsB11-23 resultiert in einer IL-6 Konzentration von $1,29 \pm 0,61 \text{ pg/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$ InsB18-30 ergibt eine IL-6 Konzentration von $3,14 \pm 0,26 \text{ pg/ml}$. DnaK alleine (Abb. 7) zeigt hier eine leichte Erhöhung gegenüber dem Medium in höherer Konzentration: $1 \mu\text{g/ml}$ DnaK ergibt eine IL-6 Konzentration von $9,79 \pm 6,97 \text{ pg/ml}$, in niedriger Konzentration bewegt sich die Zytokinausschüttung auf Mediumniveau, $0,1 \mu\text{g/ml}$ DnaK induziert lediglich eine IL-6 Konzentration von $1,42 \pm 0,96 \text{ pg/ml}$.

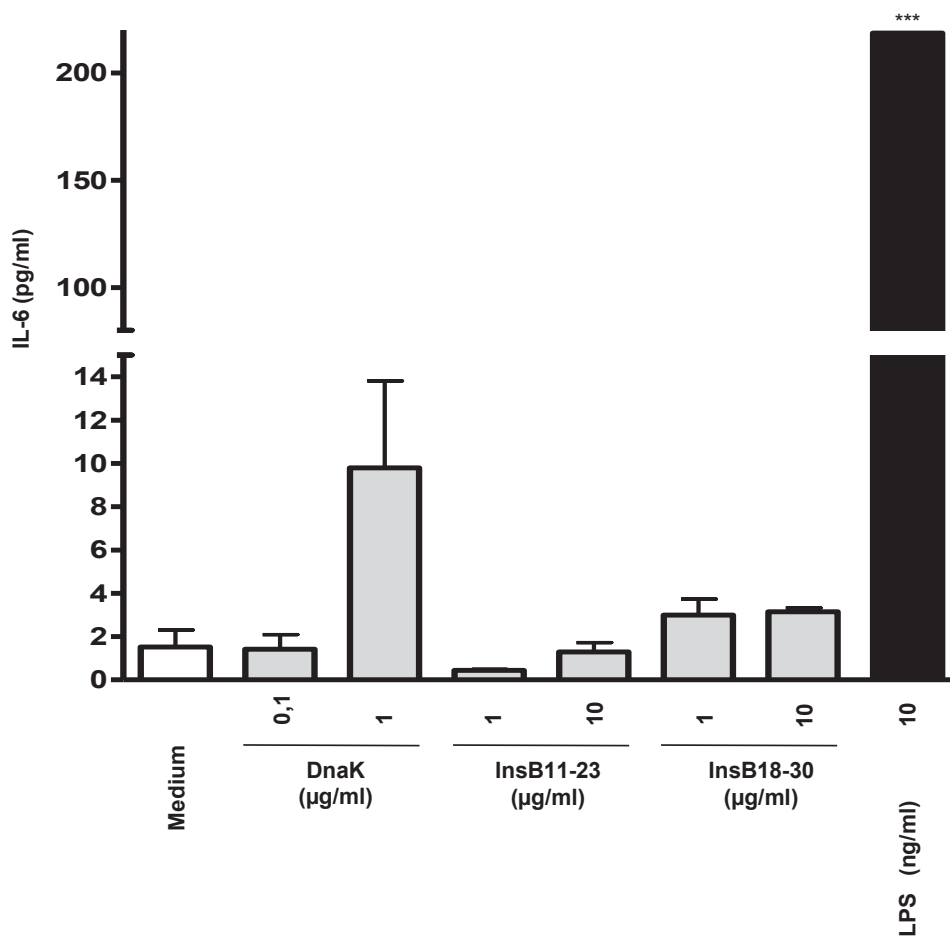


Abbildung 7

Humane Makrophagen der Linie MonoMac 6 (100.000/ml) in 96 Well Platten wurden in Abwesenheit (Medium) oder in Anwesenheit von DnaK oder InsB11-23 oder InsB18-30 oder LPS (10 ng/ml) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde im Kulturüberstand die Konzentration von IL-6 (pg/ml) gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte (+ SD) aus Triplikaten. *** $p < 0,001$ im Vergleich zum Medium.

Im Weiteren wurde nunmehr getestet, ob ebenso wie nach sechs Stunden unterschiedliche Kombinationen der Konzentration von DnaK und den Peptidsequenzen Einfluss auf die Zytokinausschüttung nach 24 Stunden zeigen (Abb. 8 und Abb. 9). Hierbei zeigt sich, dass es in der Kombination der hohen Konzentrationen von DnaK (1 µg/ml) mit InsB11-23 (10 µg/ml) zu einer deutlichen IL-6-Ausschüttung kam: hierbei wurde eine IL-6 Konzentration von $204,80 \pm 12,00$ pg/ml gemessen (Abb. 8).

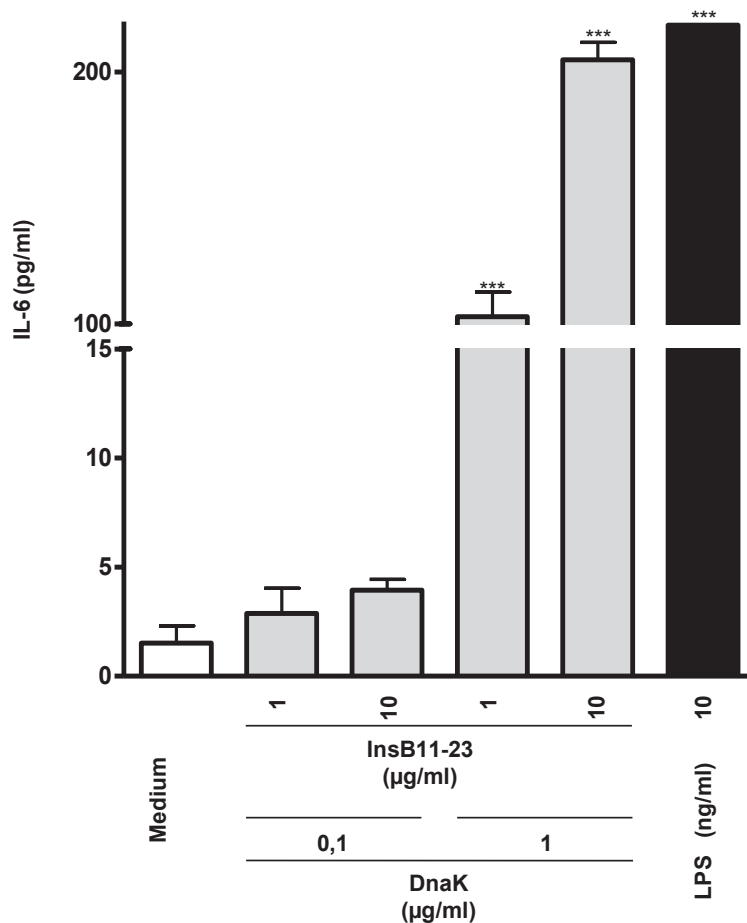


Abbildung 8

Humane Makrophagen der Linie MonoMac 6 (100.000/ml) in 96 Well Platten wurden in Abwesenheit (Medium) oder in Anwesenheit von DnaK und InsB11-23 oder LPS (10 ng/ml) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde im Kulturüberstand die Konzentration von IL-6 (pg/ml) gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte (+ SD) aus Triplikaten. *** $p < 0,001$ im Vergleich zum Medium.

Senkte man die Konzentration von InsB11-23 auf 1 µg/ml, so zeigte sich in Kombination mit DnaK in einer Konzentration von 1 µg/ml immer noch eine deutlich erhöhte IL-6 Konzentration von $103,00 \pm 16,86$ pg/ml. Demgegenüber zeigte die niedrigere Konzentration von DnaK (0,1 µg/ml) in Kombination mit der höheren Konzentration von InsB11-23 keine wesentliche Erhöhung der Zytokinausschüttung (Abb. 8) gegenüber der Mediumkontrolle; 0,1 µg/ml DnaK sowie 10 µg/ml InsB11-23 resultierten in einer IL-6 Konzentration von $3,95 \pm 0,70$ pg/ml, bei weiterer Absenkung der InsB11-23 Konzentration führte dies zu keiner wesentlichen Veränderung

gegenüber dem Medium: 0,1 µg/ml DnaK sowie 1 µg/ml InsB11-23 ergaben eine IL-6 Konzentration von $2,88 \pm 2,00$ pg/ml.

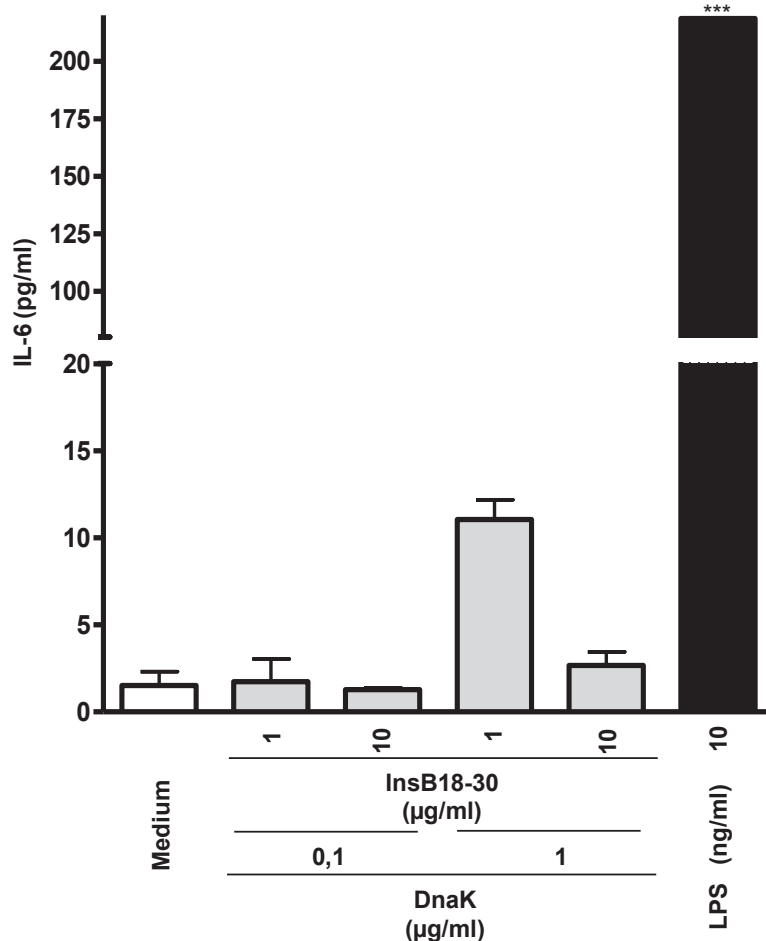


Abbildung 9

Humane Makrophagen der Linie MonoMac 6 (100.000/ml) in 96 Well Platten wurden in Abwesenheit (Medium) oder in Anwesenheit von DnaK und InsB18-30 oder LPS (10 ng/ml) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde im Kulturüberstand die Konzentration von IL-6 (pg/ml) gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte (+ SD) aus Triplikaten. *** $p < 0,001$ im Vergleich zum Medium.

Bereits die Kombination von DnaK und InsB18-30 (Abb. 9) in hoher Konzentration zeigte keine wesentliche IL-6 Erhöhung: 1 µg/ml DnaK und 10 µg/ml InsB18-30 induzierten eine IL-6 Konzentration von $2,67 \pm 1,36$ pg/ml, bei Absenkung der InsB18-30 Konzentration zeigte sich eher eine höhere IL-6 Konzentration: die Kombination von 1 µg/ml DnaK und 1 µg/ml InsB18-30 ergaben eine IL-6 Konzentration von $11,05 \pm 1,60$ pg/ml. Die Kombination von DnaK in einer niedrigeren Konzentration von 0,1

µg/ml mit InsB18-30 führte in beiden Insulinpeptid-Konzentrationen zu keiner wesentlichen Änderung gegenüber dem Mediumniveau ($1,52 \pm 1,36$ pg/ml): 0,1 µg/ml DnaK und 10 µg/ml InsB18-30 ergaben eine IL-6 Konzentration von $1,27 \pm 0,19$ pg/ml; 0,1 µg/ml DnaK und 1 µg/ml InsB18-30 bewirkten eine IL-6 Konzentration von $1,73 \pm 2,26$ pg/ml.

Induktion der Freisetzung von TNF- α und IL-6 durch DnaK und Insulinpeptide bei J774A.1-Makrophagen

In der sich anschließenden Versuchsreihe wurde überprüft, ob die zuvor gemachte Beobachtung erhöhter TNF- α und auch IL-6 Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Hinzugabe von DnaK und InsB11-23 lediglich auf die humane Zelllinie MonoMac 6 zutreffen, oder ob sich ein ähnliches Muster bei der murinen Zelllinie J774A.1 findet.

Dosisabhängigkeit der TNF- α Induktion bei J774A.1 -Makrophagen

Abb. 10 zeigt die Effekte der Einzelsubstanzen DnaK, InsB11-23 und InsB18-30 in steigender Konzentration gegenüber dem Medium.

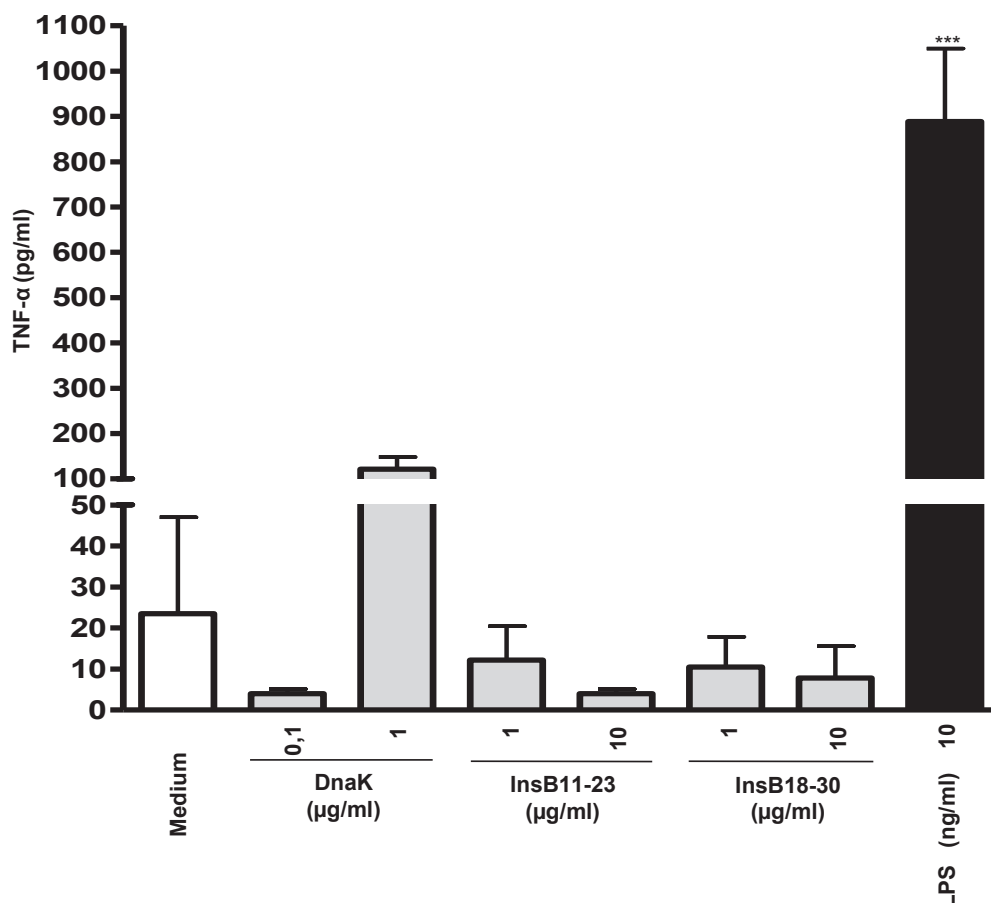


Abbildung 10

Murine Makrophagen der Linie J774A.1 (100.000/ml) in 96 Well Platten wurden in Abwesenheit (Medium) oder in Anwesenheit von DnaK oder InsB11-23 oder InsB18-30 oder LPS (10 ng/ml) inkubiert. Nach sechs Stunden wurde im Kulturüberstand die Konzentration von TNF- α (pg/ml) gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte (+ SD) aus Triplikaten. *** $p < 0,001$ im Vergleich zum Medium.

In diesem Versuchsansatz war eine relativ hohe TNF- α Konzentration von $23,50 \pm 40,70$ pg/ml unter Mediumbedingungen zu finden. DnaK als Einzelsubstanz zeigte bei $0,1 \mu\text{g/ml}$ eine TNF- α Konzentration von $4,00 \pm 2,00$ pg/ml, in hohen Konzentrationen verursacht DnaK eine leicht aber nicht signifikant erhöhte TNF- α Konzentration gegenüber dem Medium: bei $1 \mu\text{g/ml}$ DnaK von $121,70 \pm 46,19$ pg/ml TNF- α . Unter Hinzugabe der einzelnen Peptide zeigten sich niedrige TNF- α Konzentrationen: Bei einer InsB11-23 Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ wurde eine TNF- α Konzentration von $12,16 \pm 14,40$ pg/ml gemessen, bei einer InsB11-23 Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ wurde eine TNF- α Konzentration von $4,00 \pm 2,00$ pg/ml ermittelt. Bei einer InsB18-30 Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ wurde eine TNF- α Konzentration von $10,51 \pm 10,34$ pg/ml nachgewiesen, bei einer Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ InsB18-30 wurde eine TNF- α Konzentration von $7,80 \pm 13,51$ pg/ml festgestellt.

Abb. 11 zeigt, dass die Kombination von 1 µg/ml DnaK und 10 µg/ml InsB11-23 zu einer deutlichen Steigerung der TNF-α Konzentration führt: $445,90 \pm 143,20$ pg/ml TNF-α wurden in dieser Kombination gemessen. Auch bei 1 µg/ml InsB11-23 in Kombination mit 1 µg/ml DnaK findet sich noch eine TNF-α Konzentration von $167,00 \pm 21,70$ pg/ml. Nach Stimulation durch 10 ng/ml LPS war eine TNF-α Konzentration von $888,70 \pm 228,10$ pg/ml nachweisbar.

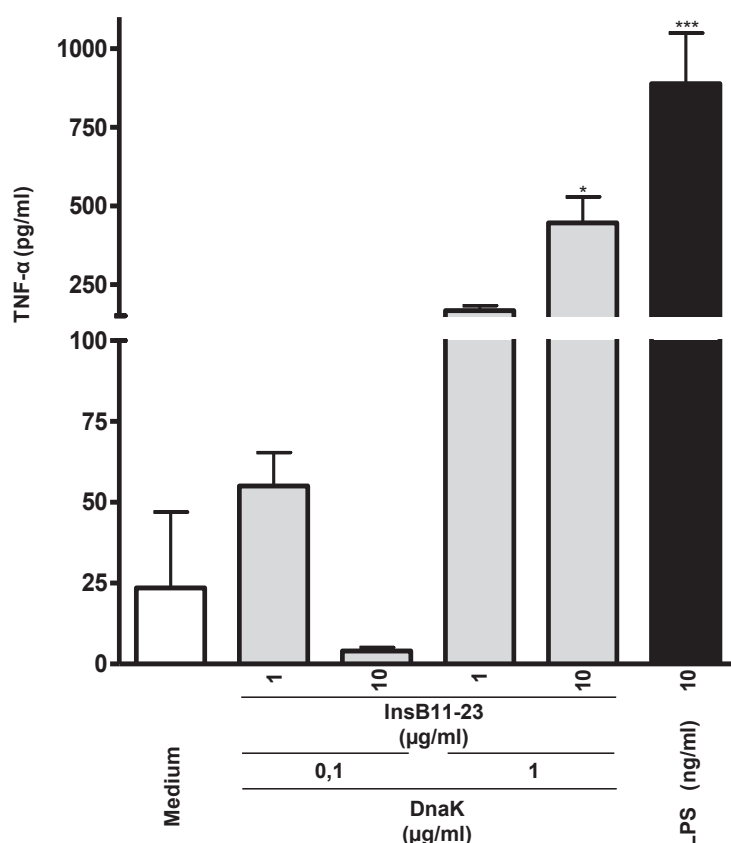


Abbildung 11

Murine Makrophagen der Linie J774A.1 (100.000/ml) wurden in 96 Well Platten in Abwesenheit (Medium) oder in Anwesenheit von LPS (10 ng/ml) sowie in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen von DnaK und InsB11-23 inkubiert. Nach sechs Stunden wurde im Kulturüberstand die Konzentration von TNF-α (pg/ml) gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte (+ SD) aus Triplikaten. *p<0,05 im Vergleich zum Medium; *** p<0,001 im Vergleich zum Medium.

Abb. 12 zeigt hingegen, dass es auch in den höchsten verwendeten Konzentrationen in der Kombination von 1 µg/ml DnaK und 10 µg/ml InsB18-30 zu keiner wesentlichen Änderung der TNF-α Konzentration gegenüber der Mediumkontrolle kommt; hierbei wurden $69,84 \pm 21,98$ pg/ml des Zytokins gemessen. Reduzierte man InsB18-30 auf 1 µg/ml und beließ DnaK bei einer Konzentration von 1 µg/ml, so konnte eine TNF-α Konzentration von $53,73 \pm 16,53$ pg/ml gemessen werden. Bei Reduktion der DnaK

Konzentration auf 0,1 µg/ml und der Beibehaltung der InsB18-30 Konzentration bei 10 µg/ml war lediglich eine TNF-α Konzentration von $22,05 \pm 31,18$ pg/ml festzustellen.

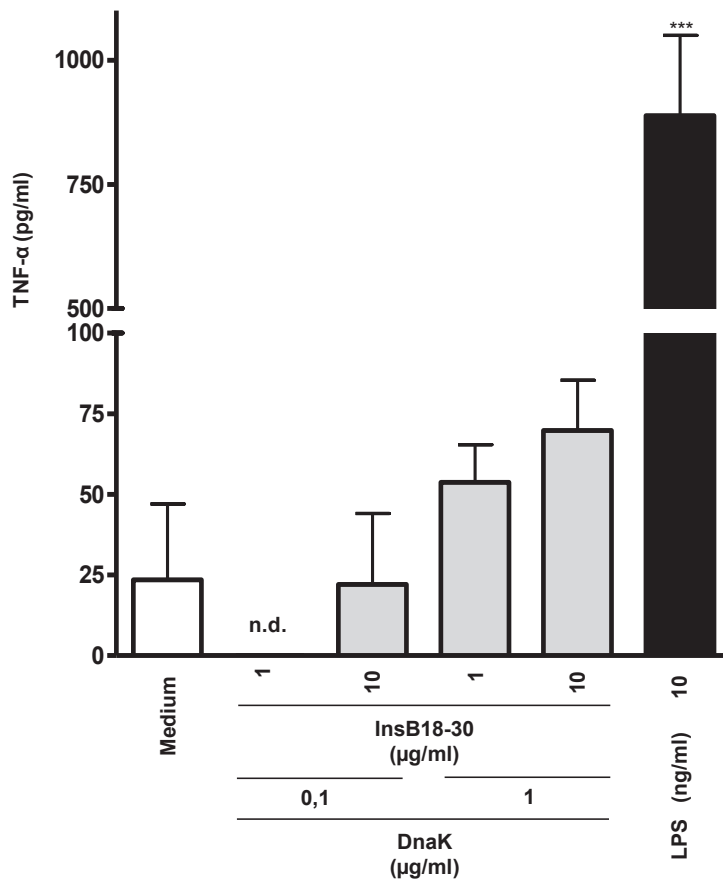


Abbildung 12

Murine Makrophagen der Linie J774A.1 (100.000/ml) in 96 Well Platten wurden in Abwesenheit (Medium) oder in Anwesenheit von DnaK und InsB18-30 oder LPS (10 ng/ml) inkubiert. Nach sechs Stunden wurde im Kulturüberstand die Konzentration von TNF-α (pg/ml) gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte (+ SD) aus Triplikaten. n.d. = nicht detektierbar; *** $p < 0,001$ im Vergleich zum Medium.

Dosisabhängigkeit der IL-6 Induktion bei J774A.1-Makrophagen

Abb. 13 stellt erneut die Effekte der Einzelsubstanzen DnaK, InsB11-23 und InsB18-30 in steigender Konzentration gegenüber dem Medium dar. DnaK als Einzelsubstanz verursacht in hohen Konzentrationen eine leichte aber nicht signifikant erhöhte IL-6 Konzentration gegenüber dem Medium: Bei einer IL-6 Konzentration gegenüber dem Medium von $6,71 \pm 3,30$ pg/ml zeigt sich nach der Hinzugabe von 1 µg/ml DnaK eine IL-6 Konzentration von $29,79 \pm 6,50$ pg/ml.

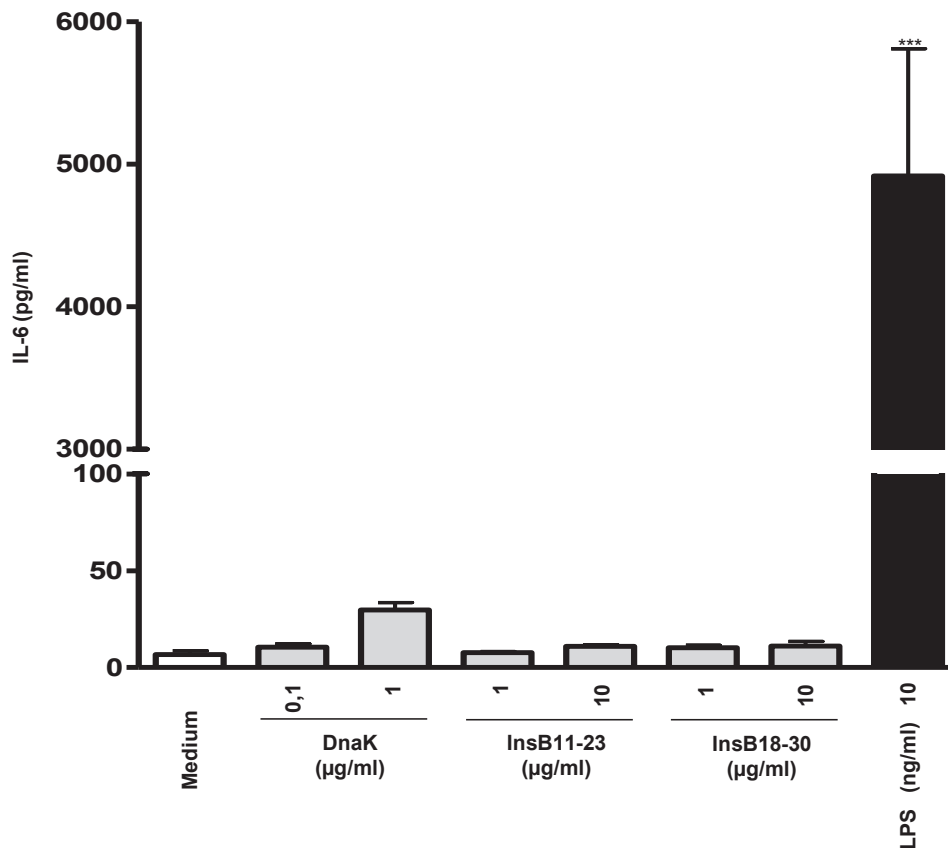


Abbildung 13

Murine Makrophagen der Linie J774A.1 (100.000/ml) in 96 Well Platten wurden in Abwesenheit (Medium) oder in Anwesenheit von DnaK oder InsB11-23 oder InsB18-30 oder LPS (10 ng/ml) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde im Kulturüberstand die Konzentration von IL-6 (pg/ml) gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte (+ SD) aus Triplikaten. *** $p < 0,001$ im Vergleich zum Medium.

Bei Hinzugabe von 10 µg/ml InsB11-23 konnte eine IL-6 Konzentration von $10,93 \pm 1,55$ pg/ml gemessen werden, bei der Hinzugabe von 10 µg/ml InsB18-30 ließ sich eine IL-6 Konzentration von $11,08 \pm 4,20$ pg/ml messen. Auch in beiden niedrigeren Konzentrationen der Peptide zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zur Konzentration der mit Medium beimpften Probe; bei einer Konzentration von 1 µg/ml InsB11-23 fand sich eine IL-6 Konzentration von $7,76 \pm 0,99$ pg/ml, bei einer Hinzugabe von 1 µg/ml InsB18-30 konnte eine IL-6 Konzentration von $10,21 \pm 2,30$ pg/ml gemessen werden.

Aus Abb. 14 wird ersichtlich, dass unter der Kombination von 1 µg/ml DnaK und 10 µg/ml InsB11-23 die IL-6 Konzentration auf $322,30 \pm 16,61$ pg/ml ansteigt. Bei der Kombination von 1 µg/ml DnaK und 1 µg/ml InsB11-23 ist immer noch eine IL-6

Konzentration von $89,13 \pm 6,08$ pg/ml festzustellen.

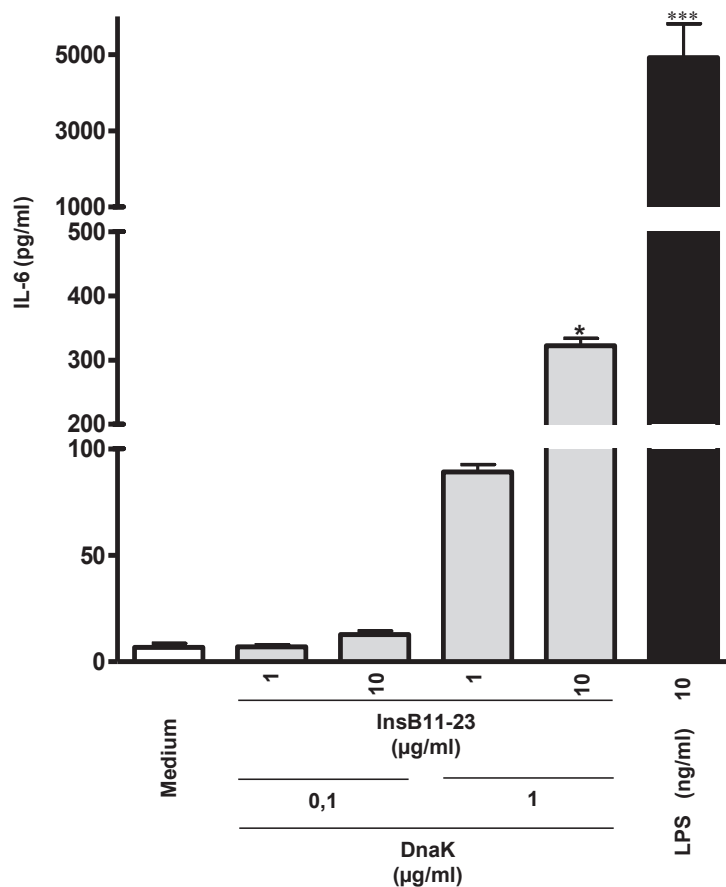


Abbildung 14

Murine Makrophagen der Linie J774A.1 (100.000/ml) in 96 Well Platten wurden in Abwesenheit (Medium) oder in Anwesenheit von DnaK und InsB11-23 oder LPS (10 ng/ml) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde im Kulturüberstand die Konzentration von IL-6 (pg/ml) gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte (+ SD) aus Triplikaten. *** $p < 0,001$ im Vergleich zum Medium.

Bei niedrigerer DnaK Konzentration ist der Unterschied zum Medium nur noch geringfügig: Bei der Kombination von 0,1 µg/ml DnaK und 10 µg/ml InsB11-23 war eine IL-6 Konzentration von $12,78 \pm 2,33$ pg/ml zu messen, bei der Kombination von 0,1 µg/ml DnaK und 1 µg/ml InsB11-23 ist eine IL-6 Konzentration von $6,94 \pm 1,94$ pg/ml zu beobachten, die gleichauf mit der IL-6 Konzentration liegt, die unter Mediumbedingungen bei $6,71 \pm 3,30$ pg/ml gemessen wird.

Abb. 15 zeigt, dass auch bei J774A.1-Makrophagen unter Einwirkung der Kombination von InsB18-30 und DnaK keine wesentliche Änderung der IL-6 Konzentration festzustellen ist. Während unter Mediumbedingungen die Konzentration des Zytokins bei $6,71 \pm 3,30$ pg/ml liegt, findet sich unter dem Einsatz von 10 ng/ml LPS eine IL-6 Konzentration von $4918,00 \pm 1548,00$ pg/ml.

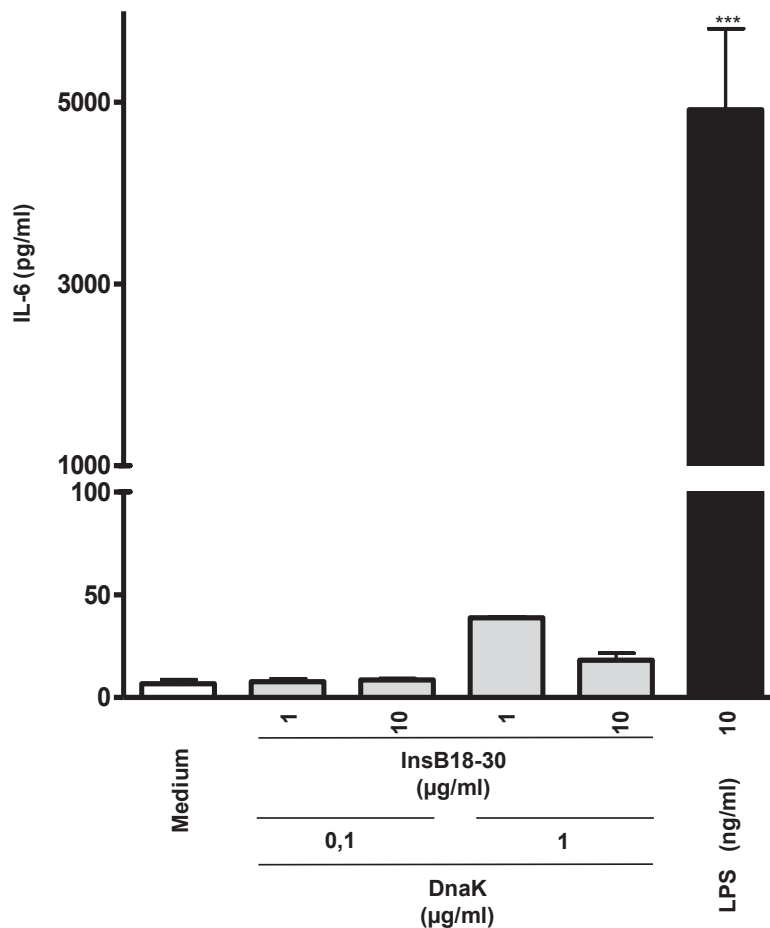


Abbildung 15

Murine Makrophagen der Linie J774A.1 (100.000/ml) in 96 Well Platten wurden in Abwesenheit (Medium) oder in Anwesenheit von DnaK und InsB18-30 oder LPS (10 ng/ml) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde im Kulturüberstand die Konzentration von IL-6 (pg/ml) gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte (+ SD) aus Triplikaten. *** $p < 0,001$ im Vergleich zum Medium.

Bei einer Kombination von 1 µg/ml DnaK und 10 µg/ml InsB18-30 zeigte sich eine IL-6 Konzentration von $18,22 \pm 5,69$ pg/ml. Senkte man die InsB18-30 Konzentration auf 1 µg/ml ab und kombinierte sie mit 1 µg/ml DnaK, zeigte sich eine IL-6 Konzentration von $38,82 \pm 0,76$ pg/ml. Bei einer DnaK Konzentration von 0,1 µg/ml kombiniert mit 10 µg/ml InsB18-30 ist eine IL-6 Konzentration auf Mediumniveau von $8,61 \pm 1,06$ pg/ml festzuhalten. Bei weiterer Absenkung der DnaK Konzentration auf 0,1 µg/ml und der InsB18-30 Konzentration auf 1 µg/ml zeigt sich eine IL-6 Konzentration auf Mediumniveau von $7,70 \pm 2,55$ pg/ml.

4. DISKUSSION

Einleitung

Bei der Pathogenese des T1D kommt Makrophagen eine wesentliche Rolle zu (Burkart und Kolb 1996). Als Zellen des natürlichen Immunsystems nehmen sie eine Schlüsselrolle in der Initiation und Progression betazellschädigender Prozesse des nicht-adaptiven und adaptiven Immunsystems ein, die über die Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten zu einer Zerstörung der Betazellen führen (Calderon et al. 2006). Insulin ist eine dominante betazellspezifische Zielstruktur der Immunreaktion im Rahmen der Entwicklung eines T1D (Jasinski und Eisenbarth 2005). Als weiteres wichtiges immunstimulatorisches Agens sind HSP im extrazellulären Raum in der Lage, sowohl das nicht-adaptive als auch das adaptive Immunsystem zu aktivieren (Chen et al. 1999, Srivasta 2000). HSP sind insbesondere in der Lage, die immunogenen Eigenschaften des von ihnen gebundenen Peptids zu erhöhen (Binder und Srivasta 2005). Diese Eigenschaft kann auch zur Entstehung (auto)immunvermittelter Erkrankungen beitragen, sofern die Reaktivität des Immunsystems gegenüber HSP-gebundener autologer Peptide erhöht ist (Eggleton 2003). Diese Betrachtungen legen die Funktion der HSP als molekulare Chaperone in der Entstehung der immunvermittelten Reaktion gegenüber autologen, betazellassozierten Antigenen nahe. Aufgrund dieser Vermutung ergab sich die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, die inflammatorische Reaktivität von Makrophagen durch Stimulation von Insulinpeptiden in Gegenwart des Hsp70 Analogons DnaK aufzuklären.

Charakterisierung und Validierung des experimentellen Systems

Zahlreiche Untersuchungen zur Pathogenese des T1D zeigen, dass die betazellgerichtete Immunreaktion insbesondere durch Komponenten des nicht-adaptiven Immunsystems kontrolliert wird. Makrophagen produzieren als eine der wichtigsten zellulären Komponente des nicht-adaptiven Immunsystems auf eine Vielzahl äußerer Stimuli eine breite Palette immunmodulatorischer und chemotaktischer Mediatoren, die wiederum in der Lage sind, andere Immunzellen zu

aktivieren. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Darstellung einer proinflammatorischen Reaktivität TNF- α (Perlmutter et al. 1986, Campbell et al. 1988, Vassalli et al. 1992) und IL-6 (Heinrich et al. 1990, Campbell et al. 1990) als Surrogatmarker herangezogen, die beide typische Zytokine einer proinflammatorischen Immunreaktion repräsentieren. Eine erhöhte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, so unter anderem TNF- α , IL-6 und IL-1 β , wurde sowohl in der prädiabetischen Phase als auch nach Manifestation des T1D gefunden (Hussain et al. 1996, Dogan et al. 2006). Bradshaw et al. (2009) zeigten, dass periphere Monozyten des Blutes (PBMC) von Patienten mit T1D bezüglich der Genexpression proinflammatorischer Zytokine keiner weiteren Stimulation bedürfen.

LPS, ein Bestandteil der bakteriellen Zellwand von (gram-negativen) Bakterien (Bergmann und Wendt 1954, Shilo und Bergmann 1958), stellt ein potentes immunstimulatorisches Agens dar und diente in der vorliegenden Arbeit als proinflammatorischer Stimulus für Makrophagen/Monozyten (Watson et al. 1990, Evans 1996), der insbesondere die Produktion von TNF- α (Beutler und Cerami 1988, Tracy und Cerami 1993) und IL-6 (Andersson und Matsuda 1989, Zhang et al. 1995, Dinarello 1996) induziert.

Die humane Makrophagen/Monozyten-Linie MonoMac 6 sowie die murine Makrophagenlinie J774A.1 sind gut etablierte Zelllinien, die für die Charakterisierung der Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren nach Einwirkung unterschiedlicher Stimuli weite Anwendung haben. Ziegler-Heitbrock et al. charakterisierten 1988 humane MonoMac 6 Zellen als Makrophagen/Monozytenlinie, die Eigenschaften reifer Monozyten aufweisen und zeigten 1992, dass MonoMac 6 Zellen, nach einer Stimulation mit LPS erhöhte Konzentrationen von TNF- α und IL-6 ausschütten, was einem proinflammatorischen Zytokinmuster entspricht (Mills et al. 2000, Cassetta et al. 2011). Okada et al. fanden 1977 eine deutliche proinflammatorische Reaktivität von murinen J774A.1 Zellen auf LPS-Exposition, welche hierauf erhöhte T-Lymphozyten aktivierende Mediatoren freisetzen. In weiterführenden Studien zeigten Martin et al. (1990) eine Freisetzung von IL-6 sowie TNF- α aus J774A.1 Zellen nach Stimulation durch bakterielles LPS. Beide Zelllinien, sowohl die humane Zelllinie MonoMac 6 als

auch die murine Zelllinie J774A.1, zeigen somit eine (proinflammatorische) Aktivierbarkeit, die sich in einer erhöhten Freisetzung von TNF- α und IL-6 äußert.

Aus mehreren vorangegangenen Arbeiten ist weiterhin etabliert, MonoMac 6 und J774A.1 gemeinsam zu vergleichenden Studien heranzuziehen. Diese Strategie kam unter anderem bei der Erprobung einer Antibiotikatherapie von Wright et al. (1996) und Barrow et al. (1998) (gegenüber *Mycobacterium tuberculosis*) sowie Valderas und Barrow (2008) (für *Brucella abortus*) zum Einsatz.

Die Verwendung zweier Zelllinien von zwei unterschiedlichen Spezies dient zusätzlich der Beantwortung der Frage, ob die zu untersuchende makrophagenaktivierende Wirkung der HSP-Peptid-Komplexe speziesspezifisch ist oder ein allgemeines respektive speziessübergreifendes Prinzip darstellt. Wie in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe belegt werden konnte (Chen et al. 1999), zeigen sowohl Makrophagen der humanen Zelllinie MonoMac 6 als auch der murinen Zelllinie J774A.1 bei Inkubation in Gegenwart von LPS eine erhöhte Ausschüttung von Immunmediatoren als Indikator einer proinflammatorischen Aktivierung. Die Zytokinkonzentrationen in Anwesenheit von 10 ng/ml LPS liegen auch in der hier vorgelegten Arbeit für TNF- α im Bereich von 1000-2700 ng/ml und für IL-6 im Bereich von 750-1200 ng/ml und damit im Bereich der Literaturwerte (Chen et al. 1999).

Fehlende Reaktivität von Makrophagen auf Insulinpeptide

Nachdem die Validität des experimentellen Systems durch die weitgehende Übereinstimmung der eigenen Befunde mit publizierten Daten zur LPS-Stimulierbarkeit von MonoMac 6 und J774A.1 Zellen belegt werden konnte, wurde der Frage nachgegangen, ob die Zellen alleine durch die Anwesenheit von Insulinpeptiden eine erhöhte Zytokinausschüttung zeigen.

Shimizu et al. stellte bereits 1993 die Hypothese auf, dass die Immunogenität auf betazellspezifische Peptidfragmente beeinflusst wird, wenn diese durch APC gegenüber CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten der NOD Maus präsentiert werden.

Daniel et al. (1995) identifizierten eine kurze Region der B-Kette des Insulins, auf die fast 90% der aus den Inseln des Pankreas von NOD Mäusen isolierten anti-Insulin CD4⁺-T-Lymphozyten als antigene Struktur reagierten (siehe Einleitung).

Aus tierexperimentellen Untersuchungen von Alleva et al. (2001) und Eckenrode et al. (2004) ergibt sich eine Reaktivität von Makrophagen gegenüber InsB9-23, einem immundominanten Peptid der B-Kette des Insulins. Aus Tierversuchen von Nakayama et al. (2005) konnte anhand von NOD Maus-Mutanten nach Manipulation des Insulin 1 (als auch des Insulin 2) Gens gezeigt werden, dass nach Austausch der 16. Aminosäure (Tyrosin) der B-Kette durch Alanin bei weiblichen Mäusen, im Gegensatz zu jenen, die zumindest eine Kopie des Wildtyp-Insulingens besaßen, es weder zur Bildung von Insulinantikörpern, noch zu Insulitis und auch nicht zur Entwicklung eines autoimmunen Diabetes/Insulinmangeldiabetes kam. Aus Untersuchungen von Prasad et al. (2012) geht hervor, dass durch das (funktionelle) Epitop InsB9-23 der B-Kette des Insulinmoleküls eine Initiierung der Pathogenese des Diabetes bei NOD Mäusen ausgelöst werden kann.

In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten fand sich unter der Einwirkung des InsB11-23 alleine kaum eine Veränderung der Mediatorenfreisetzung aus MonoMac 6 und aus J774A.1 Zellen gegenüber der Zytokinfreisetzung unter Mediumbedingungen. Gleiches gilt für InsB18-30 alleine, das zur Kontrolle eingesetzt wurde und aus einem als nicht immunstimulatorisch beschriebenen Bereich der B-Kette von Insulin stammt. Für beide Peptide bewegte sich die gemessene Konzentration von IL-6 oder TNF- α wie bei der Mediumkontrolle im Bereich von weniger als 5 pg/ml.

Das Ausbleiben einer proinflammatorischen Makrophagenaktivierung durch die Insulinpeptide allein erscheint unter physiologischen Bedingungen im lebenden Organismus zur Vermeidung einer Immunreaktion gegenüber Insulin sinnvoll. Zwar ist beim gesunden Probanden nach Nahrungsaufnahme ein kurzfristiger Anstieg proinflammatorischer Mediatoren nachweisbar (Kolb und Mandrup-Poulsen 2010), doch findet sich keine dauerhafte Erhöhung von Entzündungszeichen nach einer

Nahrungsaufnahme. Demgegenüber zeigen Monozyten des peripheren Blutes (PBMC) von Patienten mit Diabetes ohne weitere Stimulation ein bereits aktiviertes Zytokinprofil wie Bradshaw et al. (2009) darstellte. Prasad et al. (2012) beschreibt für die NOD Maus die Situation eines bereits intrinsisch aktivierten Organismus, welcher schon eine deutliche Prädisposition zur Entwicklung eines (auto)immunvermittelten Diabetes zeigt.

Die hier dargestellten Daten legen somit die Vermutung nahe, dass in einem nicht-aktivierten System ohne Augmentation durch einen weiteren Einflussfaktor durch die alleinige Anwesenheit eines hochpotenten Antigens keine wesentliche proinflammatorische Immunreaktion zu erwarten ist.

Reaktivität von Makrophagen mit DnaK

In mehreren vorangegangenen Studien wird eine makrophagenaktivierende Wirkung von HSP beschrieben (so unter anderem Retzlaff et al. 1994, Wallin et al. 2002, Rajaiah und Moudgil 2008). Aufgrund der guten Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit Hsp70 und der besseren Verfügbarkeit findet sich in zahlreichen Aufsätzen der Einsatz von DnaK als Analogon des Hsp70. Bei der Mehrheit der in vitro durchgeführten Untersuchungen zu Hsp70 wurde DnaK eingesetzt (Fink 1999). Chen et al. hatten 1999 nach einer Stimulation von J774A.1-Makrophagen durch Hsp60 ohne die Zugabe eines weiteren Agens eine erhöhte Zytokinfreisetzung gezeigt, so unter anderem TNF- α , als auch IL-12 und IL-15, zwei weiteren wichtigen Induktoren einer Th1-Anwort des Immunsystems. Asea et al. (2000) konnten für humane PBMC zeigen, dass Hsp70 zur Ausschüttung von TNF- α , IL-6 und IL-1 β führt.

Bei den zuvor genannten Untersuchungen blieb jedoch unklar, ob HSP alleine oder HSP in Verbindung mit weiteren Faktoren, wie LPS oder Peptiden, stimulatorisch wirken. Neben der Untersuchung zur alleinigen Makrophagenaktivierung durch die verwendeten Insulinpeptide stellte sich somit die Frage, ob das verwendete Hitzeschockprotein DnaK, als Analogon des Hsp70, allein verwendet, eine

makrophagenstimulierende Wirkung in Richtung einer proinflammatorischen Reaktion zeigt.

In den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Experimenten zeigte sich bei einer alleinigen Verwendung des DnaK nur ein geringgradiger Effekt auf die Freisetzung von Makrophagenmediatoren; bei 1 µg/ml DnaK fanden sich circa 5-15 pg/ml TNF-α, sowohl für die MonoMac 6 als auch die J774A.1 Makrophagen. Für die IL-6 Ausschüttung fand sich bei beiden Zelllinien unter derselben DnaK Konzentration (1 µg/ml) eine IL-6 Konzentration von circa 2-9 pg/ml. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentrationen für DnaK liegen gemäß den Beobachtungen von Wright et al. (2000) im Bereich der Hsp70-Serumkonzentration für gesunde Individuen (0-1,96 µg/ml).

Galdiero et al. hatten 1997 gezeigt, dass DnaK die Freisetzung von TNF-α und IL-6 (sowie GM-CSF) aus Makrophagen stimulieren kann. Bukau et al. (1998) und Binder et al. (2000) beschrieben für Hsp70 eine stimulatorische Wirkung auf APC, wie Makrophagen und dendritische Zellen. In Übereinstimmung mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigte Persson et al. (2008), dass bei alleiniger Exposition gegenüber rekombinantem Hsp60 oder Hsp70 (3 µg/ml) in beiden Fällen kein stimulatorischer Effekt auf die Makrophagen im Sinne der Induktion einer TNF-α Freisetzung zu beobachten ist. Er konnte durch die Hinzugabe von Hsp70 die TNF-α Ausschüttung der Makrophagen steigern, wenn diese zusammen mit Polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) kokultiviert wurden, in denen experimentell Apoptose durch eine Mycobacterium tuberculosis (MTB) Exposition eingeleitet worden war. Er zeigte sehr gut, dass die TNF-α Ausschüttung nach vorheriger Gabe von Hsp70 auch nach nachfolgender Inkubation mit diesen PMN nicht wesentlich gesteigert werden konnte.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse implizieren also, dass Hsp70/DnaK in physiologischer Konzentration, alleine ohne einen weiteren kostimulatorischen Faktor, keinen wesentlichen stimulierenden Effekt auf die Makrophagenaktivität hat.

Ausschluss von makrophagenstimulierenden Effekten aufgrund einer LPS-Kontamination

Im Zusammenhang mit zuvor veröffentlichten Ergebnissen, die zeigen, dass DnaK, beziehungsweise die Gruppe der Hitzeschockproteine, zur Induktion einer proinflammatorischen Reaktion führen können, wurde wiederholt argumentiert, dass diese Wirkung lediglich durch eine Kontamination der rekombinant hergestellten HSP-Präparationen durch LPS zurückzuführen ist (Bao und Tsan 2003, 2004). Zur Unterstützung dieser Argumentation wurden die zuvor bereits angesprochenen Experimente von Wallin et al. 2002 herangezogen, die in Makrophagen keine Freisetzung von Zytokinen durch LPS-armes Hsp70 erzielen konnten, welches zuvor aus Mausleber gewonnen wurde. Nicht einmal mit Konzentrationen zwischen 200-300 µg/ml war ein signifikanter Effekt festzustellen.

Diese von einigen Autoren postulierte Vermutung, dass die Reaktion der Makrophagen auf eine Verunreinigung der HSP-Präparationen durch LPS beruht, lässt sich in der vorliegenden Arbeit insoweit zurückweisen, als die Einzelsubstanzen DnaK, InsB11-23 und InsB18-30, auch bei erhöhten Konzentrationen, nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Zytokinausschüttung führten, was eine Kontamination des HSP beziehungsweise der Peptidpräparationen durch LPS weitestgehend ausschließt. Das in der vorliegenden Arbeit gewählte Peptidsyntheseverfahren trägt zudem ein geringes Risiko einer LPS-Kontamination. Weiterhin wurden die in der vorliegenden Arbeit verwendete DnaK-Präparation sowie die Peptide in hauseigenen Versuchen mittels eines chromogenen Limulus Amöbozytenlysat (LAL)-Tests auf die Anwesenheit von LPS getestet (Burkart et al 2010). Hierbei konnte keine Verunreinigung durch LPS nachgewiesen werden.

Makrophagenaktivierende Wirkung der Kombination von DnaK und Insulinpeptiden

Bereits Atkinson et al. hatten 1991 infrage gestellt, dass HSP-Moleküle alleine Antigene in der Entwicklung des T1D darstellen, da er keine serologische Immunität gegenüber HSP aus Inselzellen nachweisen konnte. Purcell et al. (2003) hatten dagegen die Hypothese aufgestellt, dass eine Assoziation von Stressproteinen mit Autoantigenen als möglicher Trigger von Autoimmunität fungiert.

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, ist für das in den hier dargestellten Versuchen verwendete DnaK, das HSP 70 Analog von *Escherichia coli*, eine klassische Chaperonfunktion (Genevaux et al. 2007) beschrieben, wie von Hartl 1996 postuliert. In den hier vorgelegten Untersuchungen wurde der Arbeitshypothese nachgegangen, dass Insulin nach Zerstörung von Betazellen im Übermaß fragmentiert vorhanden ist, und von kursierenden HSP sequenzspezifisch erkannt und in der Folge HSP-Peptid-Komplexe zu einer Stimulation der Makrophagen führen. Dies wurde an der Frage konkretisiert, ob die Insulinpeptidsequenz InsB11-23 in der Gegenwart von DnaK, als Mitglied der Hsp70 Stressproteinfamilie, Makrophagen aktivieren kann. Hierbei zeigte sich, dass DnaK kombiniert mit dem InsB11-23 zu einem deutlichen Anstieg sowohl der TNF- α als auch der IL-6 Freisetzung aus Makrophagen führte. Wurde das InsB18-30, welches als Negativkontrolle diente, zusammen mit DnaK eingesetzt, blieb eine Aktivierung der Makrophagen aus. Dieser Befund zeigte sich für beide in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien, sowohl die humanen MonoMac 6 als auch die murinen J774A.1 Zellen und deutet folglich auch auf einen speziesübergreifenden Mechanismus hin.

Erst in der Kombination von InsB11-23 und DnaK findet sich eine stimulatorische Aktivität, welche sich dem Niveau der LPS Kontrolle nähert. Wäre diese Aktivierung im Wesentlichen auf eine Verunreinigung der zur Stimulation verwendeten Reagenzien mit LPS zurückzuführen, müssten bereits die Einzelsubstanzen zu einem

Reaktionsmuster führen, das dem des LPS entspricht. Zudem induziert die Kombination aus DnaK und InsB18-30 kein Reaktionsmuster, welches mit dem des LPS vergleichbar ist. Wäre der hier beobachtete stimulatorische Effekt auf eine LPS Verunreinigung zurückzuführen, hätte es sowohl in der Kombination von DnaK und InsB11-23 sowie DnaK und InsB18-30 zu gleich hohen Zytokinausschüttungen kommen müssen.

Betrachtet man nun die molaren Verhältnisse auf Grundlage des Molekulargewichtes der Einzelsubstanzen, das für DnaK 69115, InsB11-23 1422 sowie für InsB18-30 1504 beträgt, ergibt sich bei den Kombinationen von 1 µg/ml DnaK und 10 µg/ml des Peptides, bei denen sich in den Experimenten signifikante Unterschiede zwischen InsB11-23 und InsB18-30 zeigten, dass DnaK in einer Molarität von 145 µM und Ins B11-23 in einer Molarität von 703 µM vorliegt. InsB11-23 liegt somit in 4,8 fachen molaren Überschuss im Vergleich zu DnaK vor. Für das Verhältnis von DnaK mit 145 µM zu InsB18-30 in einer Molarität von 665 µM ergibt sich, dass das Peptid in 4,6 fachen molaren Überschuss im Vergleich zu DnaK vorliegt. Der 4,6 bis 4,8 fache molare Überschuss der Peptide im Vergleich zu den Hitzeschockproteinen entspricht den Konzentrationsverhältnissen, die zuvor in den Untersuchungen von Scheufler et al. (2000) zur COOH-terminalen Reaktivität und Sondermann et al. (2000) zur NH₂-terminalen Reaktivität des Hsp70 eingesetzt wurden.

Aus den dargelegten Beobachtungen ergibt sich zunächst die Frage in welcher Art und Weise HSP und Peptid interagieren und an welcher Bindungsstelle ein Kontakt von DnaK, respektive Hsp70, sowie der Peptide, falls sie binden, zu erwarten ist.

Nach initialer Charakterisierung der Substratbindungsstelle(n) für DnaK durch Zhu et al. (1996) konnte Rüdiger et al. (1997) zeigen, dass DnaK als molekulares Chaperon spezifische Mustererkennungen umfasst, deren primäres Bindungsmotiv sieben (hydrophobe) Aminosäuren umfasst.

Für die mögliche Wechselwirkung und Bindung von DnaK und InsB11-23 zeigte sich in vorhergehenden Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe (Burkart et al. 2010), dass zwischen DnaK und dem InsB11-23 (LVEALYLVCGERG) im Kompetitions-Assay eine

erhöhte Affinität besteht. Im Gegensatz zeigt DnaK keine erhöhte Affinität zum Insulinpeptid InsB18-30 (VCGERGFFYTPKT), welches aus der weniger immunogenen C-terminalen Region der Insulin B-Kette stammt. Als zentrales Motiv der InsB11-23 Bindung an DnaK ist hier das LYL-Motiv anzusehen. Für Hsp70 ist bekannt, dass es eine große Bandbreite von Heptapeptiden bindet, mit einer Präferenz für hydrophobe Seitenketten, insbesondere Leucin und Isoleucin (Flynn et al. 1989, de Crouy-Chanel et al. 1996, Rüdiger et al. 1997). Für das Insulinpeptid InsB11-23 und DnaK besteht bei hoher DnaK-Peptid Affinität eine hohe konzentrationsabhängige Proportionalität zur makrophagenstimulierenden Aktivität, während bei InsB18-30 bei niedriger DnaK-Peptid Affinität eine geringe makrophagenstimulierende Aktivität zu finden ist.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Beobachtung lässt somit einen Zusammenhang zwischen der Bindungsaffinität zwischen InsB11-23 und DnaK, als Analogon des Hsp70, und der makrophagenstimulierenden Eigenschaft bei der betazellspezifischen Immunreaktivität vermuten.

Die Ergebnisse gewinnen eine besondere Bedeutung im Zusammenhang mit erhöhten Hsp70 Konzentrationen, wie Eizirik et al. (1990) bei Inselzellen, die inflammatorischen Bedingungen ausgesetzt sind, als auch die Ergebnisse von Oglesbee et al. (2005) bei T1D belegen: hier ist eine Chaperonfunktion für die antigenen Insulinpeptide von gestressten, zum Teil auch irreversibel geschädigten und zerfallenden Betazellen viel eher zu erwarten als unter physiologischen Bedingungen, und hieraus resultierend auch viel eher eine Initiierung der betazellgerichteten Immunreaktion.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Befunde weisen auf eine Assoziation der Affinität der Peptide zu DnaK und der Fähigkeit zur nachfolgenden Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch die Makrophagen hin. Diese Ergebnisse erfordern weitere Untersuchungen, um den molekularen Mechanismus der Insulinpeptid/Chaperon-vermittelten Makrophagenaktivierung vollständig zu klären. Weiterhin ergibt sich die Frage, über welchen Mechanismus Hsp70/DnaK zusammen mit den Insulinpeptiden mit den Makrophagen interagieren.

Biologische Effekte der HSP Insulinpeptid vermittelten Makrophagen-Stimulation

Insgesamt zeigen die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse, dass in Gegenwart des 70 kDa Chaperons DnaK eine starke proinflammatorische Makrophagenaktivierung durch das Insulin-B-Ketten-Peptid InsB11-23 zu beobachten ist, was auf eine wesentliche Rolle des chaperonierten Peptides bei der Initiierung der Immunreaktion gegen Insulin als einem dominanten autologen betazell-assoziierten Antigen hindeutet.

Makrophagen-vermittelte Aktivierung der Immunkaskade durch HSP-Insulinpeptid Kombinationen

Arnold-Schild et al. hatten 1999 gezeigt, dass exogen zugeführte HSP-Peptid Komplexe über rezeptorvermittelte Endozytose in APC aufgenommen werden. Aus mehreren Untersuchungen von Binder et al. (2000), Habich et al. (2002) und Becker et al. (2002) lässt sich ableiten, dass Makrophagen eine große Vielfalt an Rezeptorstrukturen zur Erkennung von HSP aufweisen, so unter anderem Rezeptoren, die mit gp96, Hsp60 und Hsp70 interagieren.

In vorangegangenen Arbeiten konnte Becker et al. (2002) bei einem circa fünffachen molaren Überschuss des Peptides gegenüber Hsp70/DnaK, welches den molaren Verhältnissen in der vorliegenden Arbeit entspricht, eine deutliche Verbesserung der Bindung des Peptids an CD40 zeigen. Balasa et al. (1997) hatten CD40-CD40L eine wesentliche Rolle als Bindeglied zwischen der Insulitis und der Entwicklung eines Diabetes bei der NOD zugeschrieben. Dass Hsp70 erst in Kombination mit einem Peptidsubstrat an CD40 gebunden wird, wurde von Becker auf die höhere Affinität zwischen Peptid und Hsp70 zurückgeführt (Becker et al. 2002). Nach rezeptorvermittelter Aufnahme von HSP-Peptid-Komplexen (Castellino et al. 2000) und Antigenprozessierung sowohl über den zytosolischen als auch den endozytotischen Weg können diese im Kontext von MHC-I-Strukturen auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Tobian et al. (2004b), deren Befunde durch Binder

und Srivasta (2005) bestätigt wurden, zeigte, dass HSP über CD91 eine Kreuz-Präsentation von chaperonierten Peptiden durch vakuoläre Mechanismen bei Makrophagen über MHC-I gegenüber CD8⁺-T-Lymphozyten fördern. Sie zeigten hierbei, dass die Komplexierung von DnaK respektive MTB-Hsp70 mit dem chaperonierten Peptid (hier ein verlängertes OVA-Peptid (EQLESIINF EKLLVLLKK) notwendig ist, um eine vermehrte MHC-I-Expression des SIINF EKL-Epitops zu zeigen. Auch hierbei wird das LVLL-Motiv unter Verweis auf Rüdiger et al. (1997) als wesentlich steigernder Faktor der Bindung des DnaK aufgeführt. Zudem konnte Tobian et al. (2004b) zeigen, dass DnaK-OVA-Peptid-Komplexe von Makrophagen aktiv aufgenommen und eine aktive Prozessierung der DnaK-OVA-Peptid-Komplexe erfolgt. Tobian et al. (2004b) fanden in diesem Zusammenhang, dass HSP-OVA-Peptid-Komplexe die Aufnahme von Antigenen deutlich steigern und so zu einer vermehrten MHC-I-Präsentation führen.

In weiterführenden Arbeiten zeigten Tobian et al. (2004a), dass DnaK chaperonierte Peptide ebenfalls über MHC-II gegenüber CD4⁺-T-Zellen präsentiert werden können. Eine Steigerung der MHC-II-Präsentation konnte nur durch komplexierte HSP-OVA-Peptide erreicht werden. HSP allein führte zu keiner Steigerung der OVA-Peptid Prozessierung und Präsentation. Sie zeigten weiterhin, dass der HSP-OVA-Peptidkomplex von Makrophagen aufgenommen wird. Er fand darüber hinaus Hinweise, dass HSP im Makrophagen an der OVA-Peptid Prozessierung auf dem Weg zur MHC-II-Präsentation beteiligt sind. Tobian et al. (2004a) vermutet hier, dass bakterielles HSP bakterielle Peptide an die Makrophagen heranträgt.

Diesbezüglich kann ebenfalls vermutet werden, dass körpereigenes HSP fremdes Peptid bindet und an die APC heranführt, genauso wie körpereigenes HSP, möglicherweise auch in untypischer Art exprimierter Form körpereigene oder körperähnliche oder veränderte körpereigene Peptide an APC heranführt. Eine Möglichkeit, die auch zur Induktion einer autoimmunen Reaktion führen kann, ergibt sich, wenn körpereigene Peptidfragmente durch körperfremde HSP chaperoniert werden und diese dann von APC über MHC-II an peptidspezifische T-Lymphozyten präsentiert werden.

HSP-Peptid induzierte Makrophagenaktivierung als Wegbereiter der T-Lymphozyten-Aktivierung und -Rekrutierung

Bei der Entwicklung des T1D ist das Fortschreiten der Betazell-Zerstörung abhängig von der Geschwindigkeit der Feedback Schleife zwischen APCs und T-Lymphozyten, so unter anderem der Effektivität des Transports, der Präsentation und Erkennung der Antigene; weiterhin durch die Höhe der Zytokinproduktion und der Effektivität der Abwehrmechanismen der Betazellen, sich vor der inflammatorischen Attacke zu schützen (Freiesleben De Blasio et al. 1999).

Green et al. (1998) hatten zuvor gezeigt, dass die lokale Expression von TNF- α in den Inseln der NOD Maus zu einer erhöhten Präsentation von inselzellspezifischen Antigenen durch APC, wie Makrophagen und DC, führt. Weiterhin zeigt TNF- α grundsätzlich auch einen seine eigene Ausschüttung aufrechterhaltenden als auch verstärkenden Effekt auf Makrophagen, die hierdurch wesentlich besser die Bildung von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) induzieren können (Green et al. 2000). Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass durch TNF- α sowohl die Aktivität von Inselzell-spezifischen CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Lymphozyten gesteigert werden kann.

Neben der Aktivierung von direkt betazelltoxischen Substanzen konnten Binder und Srivasta (2005) zeigen, dass Peptide, die HSP als Chaperon tragen, eine notwendige und ausreichende Quelle für eine Antigenpräsentation in der initialen Aktivierung von CD8⁺-T-Lymphozyten darstellen, die als CTL eine deutliche Zerstörung von Betazellen hervorrufen können. Acosta-Rodriguez et al. (2007) hatten Hinweise gefunden, dass IL-1 β und IL-6 an der Differenzierung von CD4⁺-T-Lymphozyten in IL-17-produzierende (Th17) Zellen beteiligt sind, die im Zusammenhang mit Insulitis stehen.

Eine interessante Frage bleibt weiterhin, ob und wie InsB9-23 nach der Prozessierung auf dem Makrophagen (oder auch DC) gegenüber den T-Lymphozyten präsentiert wird, und wie hier der weitere Einfluss des HSP aussieht.

Eine hypothetische Grundlage zur Klärung dieser Frage ist die Ausbildung eines trimolekularen Komplexes, bestehend aus einem MHC-II-Molekül, dem Peptid eines Autoantigens sowie eines spezifischen T-Zell-Rezeptors (TCR), welcher das gebundene Peptid erkennt (Michels und Nakayama 2010, Sosinowski und Eisenbarth 2012). Dieses Szenario geht davon aus, dass der HSP-Peptid-Komplex bereits in die APC aufgenommen wurde und an den T-Lymphozyten präsentiert wird. Becker et al. (2002) hatten die Möglichkeit anhand der Aufnahme von Hsp70-Peptidkomplexen durch CD40 veranschaulicht, so auch Srivastava (2002). Millar et al. (2003) zeigten anhand der RIP-GP/P14 TCR Maus, dass Hsp70 chaperonierte Peptide hierbei eine wichtige Rolle spielen. Bei diesem Tiermodell des autoimmunvermittelten Diabetes wird das lymphozytäre CMV-Glykopeptid (LCMV-GP) über den Insulin-Promotor der Ratte (RIP-GP) in Betazellen exprimiert und die Mehrheit der CD8⁺-T-Lymphozyten exprimieren den LCMV-GP-spezifischen T-Zellrezeptor (P14-TCR) (Ohashi et al. 2000). So konnten Millar et al. (2003) zeigen, dass rekombinantes humanes Hsp70, ebenso wie gp33, ein Modellpolypeptid zur Aktivierung der Immunreaktion aus dem CMV-Glykoprotein (GP) alleine, nicht in der Lage waren, eine anhaltende T-Lymphozyten Aktivierung in vivo zu induzieren. Kombinierten sie beide Substanzen (20 µg Hsp70 sowie 100 µg gp33), konnten sie eine Konvertierung von 80 Prozent der RIP-GP/P14 TCR Mäuse zu einem rasch progredienten Diabetes erreichen. Sie vermuteten, dass das gp33 eine spezifische TCR-Aktivierung verursacht und Hsp70 hierbei eine wesentliche kostimulatorische Rolle zufällt. In diesen Untersuchungen konnte für Hsp70 ein in der verwendeten Mauslinie über mehrere Tage anhaltender APC aktivierender Effekt festgestellt werden und auch die spätere Applikation des gp33 eine anhaltende CTL Antwort auslösen. Auch hierbei wurde eine zentrale Rolle der Vermittlung der Effekte über CD40 festgestellt, da bei Fehlen des CD40 Gens (tnfrf5^{-/-}) keine Aktivierung nachgewiesen werden konnte. Weiterhin zeigte sich in vivo eine CD4⁺-T-Lymphozyten Abhängigkeit der CTL Aktivierung.

Als Erweiterung des oben aufgeführten Modelles wäre denkbar, dass das Hsp70 die Sequenz des InsB9-23 in einer solchen Weise bindet und so spezifische bindungsaverse Strukturen abschirmt, dass die Präsentation über die MHC-II-Struktur an den TCR eine deutlich stärkere Bindung vorweist, als dies durch die trimolekulare Struktur aus InsB9-23/MHCII/TCR gegeben wäre.

Epitope-Spreading als essentieller Mechanismus der Ausweitung der Immunkaskade

Die Progression einer (auto-)immunvermittelten Reaktion stützt sich weiterhin auf der Hypothese der Epitop-Ausbreitung („*Epitope-Spreading*“) (Lehmann et al. 1992, Vanderlugt und Miller 1996, Vanderlugt und Miller 2002), bei dem es ausgehend von einem besonders immundominanten Epitop zu einer Ausweitung der Immunreaktion auf sekundäre Epitope kommt, die im weiteren Krankheitsverlauf ebenfalls zum Ziel der Immunreaktion werden. In der vorliegenden Arbeit wird hier das Insulinfragment InsB11-23 als ein solches immundominantes Epitop postuliert.

Luo et al (2008) fanden hierfür deutliche Hinweise im Tiermodell der NOD Maus: Das Fortschreiten des Insulinmangeldiabetes in diesem Modell erfolgt durch sequentielle Aktivierung autoreaktiver T-Zellen auf verschiedenen diabetogene Epitope im Rahmen eines *Epitope-Spreading*. Luo et al (2008) postulierten hierbei, dass die T-Lymphozyten sich soweit vermehren, bis ausreichend autoreaktive Effektorzellen vorhanden sind und dies zu einer effektiven Betazellschädigung führt.

Luo et al. (2008) zeigten hierbei, dass InsB9-23 bereits sehr früh als diabetogenes Epitop in der NOD Maus auftritt. Im Rahmen der voranschreitenden Betazellzerstörung treten weitere antigene Insulinepitope auf, so unter anderem InsB15-23 und im weiteren Verlauf auch Epitope der Insulin A und B Kette. Die Epitope auf der Insulin A beziehungsweise Insulin B-Kette (außerhalb des InsB9-23) scheinen besonders in der Phase des Überganges zum apparenten Insulinmangeldiabetes bei einem Verlust von fast 75% der Betazellmasse vorzuherrschen.

Ein ähnliches Muster könnte somit auch für das Auftreten des T1D des Menschen postuliert werden (Luo et al. 2010). Aus von Prasad et al. (2012) publizierten Daten kann abgeleitet werden, dass durch die Gabe des funktionellen Epitops InsB9-23 der B-Kette eine Initiierung der Pathogenese des Insulinmangeldiabetes bei NOD Mäusen im Rahmen eines Epitopespreading erreicht werden kann.

Mögliche präventive sowie therapeutische Ansätze im Bezug auf Hsp70/InsB11-23 Interaktion und deren Einfluss auf die Betazellschädigung

Im Verlauf der (Immun)pathogenese des T1D infiltrieren autoreaktive T-Zellen sowie andere mononukleäre Zellen die Inseln und führen schlussendlich zu einer Betazellschädigung, einer verminderten Insulinproduktion, und der Notwendigkeit einer lebenslangen Insulinsubstitutionstherapie (Bluestone et al. 2010).

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde tragen nicht nur zu einem besseren Verständnis des Pathomechanismus des T1D bei, sondern bieten auch eine mögliche Grundlage zur Entwicklung therapeutischer und präventiver Maßnahmen.

Der Gold-Standard einer Prävention oder Therapie (auto)immunvermittelter Erkrankungen, wie T1D, wäre eine Strategie, bei der die pathogenen, gegen autologe Betazellen gerichteten T-Lymphozyten sicher und in einer (auto)antigen-spezifischen Weise inaktiviert werden, während andere Funktionen des verbleibenden Immunsystems unbeeinflusst bleibt, so zum Beispiel die Induktion antigen-spezifischer immunologischer Toleranz (Luo et al. 2010, Kolb und von Herrath 2017).

Dabei deuten die im vorherigen Kapitel dargestellten biologischen Effekte den Weg für eine erfolgreiche immunmodulatorische Therapie an.

Ausgehend vom oben erläuterten trimolekulären Komplex, aus InsB9-23/MHC(II)/TCR und dessen Modifikation durch Hsp70 erscheint eine Unterbrechung der Interaktion der drei Komponenten sowie der Hsp70 vermittelten verbesserten Bindung ein

erfolgversprechender Ansatz. Therapeutisches Ziel wäre es, diese trimolekulare Struktur zu beeinflussen, indem man einen ihrer Bestandteile funktionell verändert.

Eine Möglichkeit wäre, den spezifischen TCR zu blockieren. Ein weiterer wäre die Störung der Interaktion der Komponenten durch Antikörper. Weiterhin denkbar ist eine Modulation der Interaktion, so dass der diabetogene Effekt nicht zustande kommt. Hier ist die Induktion spezifischer regulatorischer T-Lymphozyten denkbar, welche selektiv die Aktivierung InsB11-23-spezifischer T-Lymphozyten unterbinden.

Weiterhin sind Maßnahmen denkbar, die verhindern, dass die Kombination aus Hsp70 in Verbindung mit InsB11-23 die Makrophagen als APC überhaupt erreicht und so verhindert wird, dass zytotoxische T-Lymphozyten aktiviert werden, die ebenjene Peptidsequenz als Zielstruktur vorweisen. Hierbei wäre daran zu denken, die Aufnahme von Hsp70-InsB11-23 über den CD40 Rezeptor zu unterbinden.

Auf der anderen Seite ist eine (Re)-Präsentation durch Makrophagen und andere APC durchaus erwünscht. Das Ziel dieser alternativen Strategie wäre somit die Induktion einer Immuntoleranz durch die Aktivierung antigenspezifischer regulatorischer T-Lymphozyten (Kolb und von Herrath 2017).

Bereits in früheren Studien fanden sich erfolgversprechende Hinweise im Tiermodell, um eine insulinspezifische Toleranz zu induzieren, so von Wegmann et al. (1996), die durch die intranasale Applikation von InsB9-23 bei NOD Mäusen zunächst eine Manifestation des Diabetes verhindern konnten. Tang et al. (2004) konnten zeigen, dass für eine Suppression des Insulinmangeldiabetes in vitro expandierte regulatorische T-Lymphozyten eingesetzt werden können. Weber et al. (2006) konnten zeigen, dass adaptive CD4⁺-T-Lymphozyten den Insulinmangeldiabetes kontrollieren und Th1-Effektorzellen in vivo supprimieren können. Kretschmer et al. (2006) konnten die Neubildung von antigenspezifischen Suppressorzellen in vivo zeigen. Godebu et al. (2008) konnte bezüglich adaptiver regulatorischer CD4⁺-T-Lymphozyten zeigen, dass diese als *Memory* Zellen langfristig vorhanden sind. Orban et al. (2008) hatten im Rahmen einer Phase-I-Studie 2009 erste Hinweise für die Wirksamkeit einer

intramuskulären Injektion der Insulin B-Kette und Freund's Adjuvans bei einer Gruppe von Patienten mit frisch diagnostiziertem Diabetes gezeigt, die auch zwei Jahre nach der initialen Applikation B-Ketten spezifische regulatorische CD4⁺-T-Lymphozyten aufwiesen.

Hier zeigen die Strategien aus der Arbeitsgruppe von Miller (u.a. Miller et al. 2007, Luo et al. 2010, Prasad et al. 2012) zur antigenspezifischen Toleranzentwicklung ein äußerst vielversprechendes Potential. In der oben bereits erwähnten Arbeit an der NOD Maus von Prasad et al. (2012) wurden mit Antigen (hier das InsB9-23) mittels 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (ECDI) an aus der Milz entnommene APC fixiert und zur Induktion einer Immuntoleranz verwendet. Eine erste MRT-kontrollierte Phase I/IIa Studie am Menschen mit dem gleichen Wirkungsprinzip wird derzeit im Rahmen einer Kooperation zwischen Stephen D. Millers und Roland Martins Arbeitsgruppe am Universitätsklinikum Hamburg bei *relapsing-remitting multiple sclerosis* (RR-MS) unternommen. Die oben dargestellten Ansätze würden auf der Stufe der Interaktion des Hsp70-InsB11-23-Komplexes eingreifen und somit die Entwicklung einer betazellgerichteten Immunreaktion bereits in einem sehr frühen Stadium unterbinden. Ein frühes Eingreifen in den Krankheitsverlauf ist besonders hilfreich, um für den einzelnen Patienten einen sehr hohen Nutzen zu generieren, welcher im frühen Stadium der Erkrankung erst gering durch seine Erkrankung belastet ist und in dieser Phase kaum oder wenige sekundäre Schädigungen von Endorganen eingetreten sind. Weiterhin sind hierdurch die Versorgungskosten des einzelnen Patienten wesentlich geringer zu halten. Für eine frühe Intervention sind neben der Verhinderung der weiteren Inselzerstörung auch die lokalen Gegebenheiten in den Inselzellen so zu beeinflussen, dass zumindest der Erhalt einer Restfunktion der Betazellen erreicht wird. Dies würde zu einer deutlich besser kontrollierten Insulinfreisetzung inklusive der C-Peptidfreisetzung und folglich eine deutlich besseren Glukosehomöostase als unter alleiniger externer Insulinzufuhr führen. Eine Erholung beziehungsweise Wiederherstellung der Betazellfunktion im Rahmen eines manifesten T1D, wenn nahezu alle Betazellen zerstört wurden, würde mutmaßlich eine Kombination einer Toleranzinduktion gegenüber den initial auslösenden Autoantigenen als auch ein Betazellersatzverfahren unter Zuhilfenahme von Allo- oder

Xenotransplantation erfordern. Vielversprechend scheinen auch zellbasierte Therapieverfahren, wie die auf embryonalen Stammzellen (ESCD) basierenden dendritischen Zellen (DC) (Ikeda et al. 2014) oder pluripotenten Zellen wie Fibroblasten in der Arbeit von Jalili et al. (2016).

Bei einem frühen Eingreifen wäre darüber hinaus die Möglichkeit einer Erholung der Betazellen aus ihren spezifischen Vorläuferzellen hypothetisch denkbar. Hierdurch würde sich eine neue Perspektive für ein möglicherweise diabetesfreies Leben ergeben.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Typ 1 Diabetes (T1D) zeichnet sich durch die (auto)immunvermittelte Zerstörung der pankreatischen Betazellen und daraus resultierendem absoluten Insulinmangel aus. Makrophagen fällt bei der Initiierung der betazellgerichteten Immunreaktion eine wesentliche Rolle zu. Sie können zum einen Betazellen selber direkt schädigen als auch Zellen des adaptiven Immunsystems durch Mediatorenfreisetzung und Antigenpräsentation beeinflussen. Als potentes immunstimulatorisches Agens sind Hitzeschockproteine (HSP) im extrazellulären Raum in der Lage, sowohl das nicht-adaptive als auch das adaptive Immunsystem zu aktivieren. Aufgrund ihrer Chaperonfunktion sind sie insbesondere in der Lage, die immunogenen Eigenschaften des von ihnen gebundenen Peptids zu erhöhen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das mögliche Zusammenwirken von als immundominant beschriebener Insulinpeptide und dem Hsp70-Homolog DnaK, auf die Aktivität von Makrophagen bei der Entwicklung betazellschädigender Aktivitäten in vitro weiter aufgeklärt werden. Sowohl bei der Verwendung von murinen als auch humanen Makrophagen zeigte sich lediglich nach der Exposition gegenüber einer Kombination aus DnaK und dem als immundominant beschriebenen Peptid der Insulin B-Kette InsB11-23 eine wesentliche Steigerung der Freisetzung von TNF- α sowie IL-6. Hierbei wurden Zytokinspiegel gemessen, die denen vergleichbar waren, die nach einer Exposition von Makrophagen gegenüber bakteriellem Lipopolysaccharid gemessen wurden. Bei Reduktion der Konzentration von DnaK und InsB11-23 waren die zuvor beschriebenen Effekte auf die Zytokinfreisetzung wieder rückläufig, so dass eine Konzentrationsabhängigkeit anzunehmen ist. Weder die Gabe der beiden einzelnen Komponenten (DnaK oder InsB11-23) noch die Verwendung einer anderen, nicht als immundominant beschriebenen Insulinpeptidsequenz (InsB18-30), auch in Kombination mit DnaK, bewirkten eine vergleichbare Erhöhung der freigesetzten TNF- α sowie der IL-6 Spiegel. Die Ergebnisse zeigen, dass das Zusammenwirken des 70 kDa Chaperons DnaK und des Insulinpeptids InsB11-23 eine deutliche proinflammatorische Makrophagenaktivität induziert, was auf eine wichtige Rolle molekularer Chaperone bei der Induktion von Immunreaktionen durch betazell-assoziierte Antigene hindeutet. Durch die weitere Aufklärung dieser frühen Schritte einer betazellgerichteten Immunreaktion ergeben sich möglicherweise Optionen für eine direkte Beeinflussung des Krankheitsgeschehens sowie für die Entwicklung betazellprotektiver Strategien.

6. LITERATURVERZEICHNIS

[No authors listed]

Standards of Medical Care in Diabetes-2017 Abridged for Primary Care Providers.

American Diabetes Association. *Clin Diabetes*.35(1):5-26, 2017

[No authors listed]

American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes.*Diabetes Care*.40(Suppl 1): S11-S24. 2017a

[No authors listed]

American Diabetes Association. 6. Glycemic Targets.*Diabetes Care*.;40(Suppl 1):S48-S56. 2017b

Acosta-Rodriguez,EV, Napolitani,G, Lanzavecchia,A, Sallusto,F: Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat.Immunol*. 8:942-949, 2007

Alleva,DG, Pavlovich,RP, Grant,C, Kaser,SB, Beller,DI: Aberrant macrophage cytokine production is a conserved feature among autoimmune-prone mouse strains: elevated interleukin (IL)-12 and an imbalance in tumor necrosis factor-alpha and IL-10 define a unique cytokine profile in macrophages from young nonobese diabetic mice. *Diabetes* 49:1106-1115, 2000

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

Allison,AC: Interactions of antibodies and effector cells in immunity against tumours. *Ann.Inst.Pasteur (Paris)* 122:619-631, 1972

Andersson,U, Matsuda,T: Human interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha production studied at a single-cell level. *Eur.J.Immunol.* 19:1157-1160, 1989

Anfinsen,CB: Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181:223-230, 1973

Angervall,L, Save-Soderbergh,J: Microangiopathy in the digestive tract in subjects with diabetes of early onset and long duration. *Diabetologia* 2:117-122, 1966

Appels,B, Burkart,V, Kantwerk-Funke,G, Funda,J, Kolb-Bachofen,V, Kolb,H: Spontaneous cytotoxicity of macrophages against pancreatic islet cells. *J.Immunol.* 142:3803-3808, 1989

Arnold-Schild,D, Hanau,D, Spehner,D, Schmid,C, Rammensee,HG, de la,SH, Schild,H: Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J.Immunol.* 162:3757-3760, 1999

Asea,A, Kraeft,SK, Kurt-Jones,EA, Stevenson,MA, Chen,LB, Finberg,RW, Koo,GC, Calderwood,SK: HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat.Med.* 6:435-442, 2000

Atkinson,MA, Holmes,LA, Scharp,DW, Lacy,PE, Maclaren,NK: No evidence for serological autoimmunity to islet cell heat shock proteins in insulin dependent diabetes. *J.Clin.Invest* 87:721-724, 1991

Atkinson,MA, Eisenbarth,GS: Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358:221-229, 2001

Baekkeskov,S, Aanstoot,HJ, Christgau,S, Reetz,A, Solimena,M, Cascalho,M, Folli,F, Richter-Olesen,H, De Camilli,P: Identification of the 64K autoantigen in insulin-

dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347:151-156, 1990

Balasa,B, KrahI,T, Patstone,G, Lee,J, Tisch,R, McDevitt,HO, Sarvetnick,N: CD40 ligand-CD40 interactions are necessary for the initiation of insulitis and diabetes in nonobese diabetic mice. *J.Immunol.* 159:4620-4627, 1997

Banson,BB, Lacy,PE: diabetic microangiopathy in human toes, with emphasis on the ultrastructural chanin in dermal *Am.J.Pathol.* 45:41-58, 1964

Bardwell,JC, Craig,EA: Major heat shock gene of Drosophila and the Escherichia coli heat-inducible dnaK gene are homologous. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81:848-852, 1984

Barrios,C, Lussow,AR, Van Embden,J, Van der,ZR, Rappuoli,R, Costantino,P, Louis,JA, Lambert,PH, Del Giudice,G: Mycobacterial heat-shock proteins as carrier molecules. II: The use of the 70-kDa mycobacterial heat-shock protein as carrier for conjugated vaccines can circumvent the need for adjuvants and Bacillus Calmette Guerin priming. *Eur.J.Immunol.* 22:1365-1372, 1992

Basu,S, Binder,RJ, Suto,R, Anderson,KM, Srivastava,PK: Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int.Immunol.* 12:1539-1546, 2000

Becker,T, Hartl,FU, Wieland,F: CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J.Cell Biol.* 158:1277-1285, 2002

Bellmann,K, Wenz,A, Radons,J, Burkart,V, Kleemann,R, Kolb,H: Heat shock induces resistance in rat pancreatic islet cells against nitric oxide, oxygen radicals and streptozotocin toxicity in vitro. *J.Clin.Invest* 95:2840-2845, 1995

Bellmann,K, Jaattela,M, Wissing,D, Burkart,V, Kolb,H: Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Lett.* 391:185-188, 1996

Bergmann,H, Buschmann,G, Doering,P, Fritze,E, Wendt,F: [Effect of bacterial pyrogens (lipopolysaccharides) on phagocytic activity of granulocytes and on electric surface charging of the human blood cells in vivo]. *Klin.Wochenschr.* 32:500-503, 1954

Beutler,B, Cerami,A: Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu.Rev.Biochem.* 57:505-518, 1988

Biessels,GJ, Deary,IJ, Ryan,CM: Cognition and diabetes: a lifespan perspective. *Lancet Neurol.* 7:184-190, 2008

Binder,RJ, Han,DK, Srivastava,PK: CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat.Immunol.* 1:151-155, 2000

Binder,RJ, Harris,ML, Menoret,A, Srivastava,PK: Saturation, competition, and specificity in interaction of heat shock proteins (hsp) gp96, hsp90, and hsp70 with CD11b+ cells. *J.Immunol.* 165:2582-2587, 2000

Binder,RJ, Blachere,NE, Srivastava,PK: Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules. *J.Biol.Chem.* 276:17163-17171, 2001

Binder,RJ, Srivastava,PK: Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8⁺ T cells. *Nat.Immunol.* 6:593-599, 2005

Bingley,PJ: Clinical Applications of Diabetes Antibody Testing. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95:25-33, 2010

Bluestone,JA, Herold,K, Eisenbarth,G: Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 464:1293-1300, 2010

Bonifacio,E, Krumsiek,J, Winkler,C, Theis,FJ, Ziegler,AG: A strategy to find gene combinations that identify children who progress rapidly to type 1 diabetes after islet autoantibody seroconversion. *Acta Diabetologica* 51:403-411, 2014

Bouchentouf,M, Benabdallah,BF, Tremblay,JP: Myoblast survival enhancement and transplantation success improvement by heat-shock treatment in mdx mice. *Transplantation* 77:1349-1356, 2004

Boyd,RL, Hugo,P: Towards an integrated view of thymopoiesis. *Immunol.Today* 12:71-79, 1991

Bradshaw,EM, Raddassi,K, Elyaman,W, Orban,T, Gottlieb,PA, Kent,SC, Hafler,DA: Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. *J.Immunol.* 183:4432-4439, 2009

Bukau,B, Horwich,AL: The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92:351-366, 1998

Bukau,B, Deuerling,E, Pfund,C, Craig,EA: Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 101:119-122, 2000

Burkart,V, Kolb,H: Macrophages in islet destruction in autoimmune diabetes mellitus. *Immunobiology* 195:601-613, 1996

Burkart,V, Siegenthaler,RK, Blasius,E, Vandenbroeck,K, Alloza,I, Fingberg,W, Schloot,NC, Christen,P, Kolb,H: High affinity binding of hydrophobic and autoantigenic regions of proinsulin to the 70 kDa chaperone DnaK. *BMC.Biochem.* 11:44, 2010

Calderon,B, Suri,A, Unanue,ER: In CD4⁺-T-cell-induced diabetes, macrophages are the final effector cells that mediate islet beta-cell killing: studies from an acute model. *Am.J.Pathol.* 169:2137-2147, 2006

Calderon,B, Carrero,JA, Unanue,ER: The Central Role of Antigen Presentation in Islets of Langerhans in Autoimmune Diabetes. *Curr Opin Immunol* 26:32-40, 2014

Campbell,IL, Iscaro,A, Harrison,LC: Ifn-Gamma and Tumor Necrosis Factor-Alpha - Cyto-Toxicity to Murine Islets of Langerhans. *Journal of Immunology* 141:2325-2329, 1988

Campbell,IL, Cutri,A, Wilson,A, Harrison,LC: Evidence for IL-6 production by and effects on the pancreatic beta-cell. *J.Immunol.* 143:1188-1191, 1989

Campbell,IL, Kay,TW, Oxbrow,L, Harrison,LC: Essential role for interferon-gamma and interleukin-6 in autoimmune insulin-dependent diabetes in NOD/Wehi mice. *J.Clin.Invest* 87:739-742, 1991

Campisi,J, Fleshner,M: Role of extracellular HSP72 in acute stress-induced potentiation of innate immunity in active rats. *J.Appl.Physiol* 94:43-52, 2003

Canivell,S, Gomis,R: Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. *Autoimmun.Rev.* 2014

Caplan,AJ, Cyr,DM, Douglas,MG: Eukaryotic homologues of Escherichia coli dnaJ: a diverse protein family that functions with hsp70 stress proteins. *Mol.Biol.Cell* 4:555-563, 1993

Cassetta,L, Cassol,E, Poli,G: Macrophage polarization in health and disease. *ScientificWorldJournal.* 11:2391-2402, 2011

Castellino,F, Boucher,PE, Eichelberg,K, Mayhew,M, Rothman,JE, Houghton,AN, Germain,RN: Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. *J.Exp.Med.* 191:1957-1964, 2000

Chen,CH, Wang,TL, Hung,CF, Yang,Y, Young,RA, Pardoll,DM, Wu,TC: Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene. *Cancer Res.* 60:1035-1042, 2000

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.* 162:3212-3219, 1999

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.* 162:3212-3219, 1999

Chen,W, Bergerot,I, Elliott,JF, Harrison,LC, Abiru,N, Eisenbarth,GS, Delovitch,TL: Evidence that a peptide spanning the B-C junction of proinsulin is an early Autoantigen epitope in the pathogenesis of type 1 diabetes. *J.Immunol.* 167:4926-4935, 2001

Ciupitu,AM, Petersson,M, O'Donnell,CL, Williams,K, Jindal,S, Kiessling,R, Welsh,RM: Immunization with a lymphocytic choriomeningitis virus peptide mixed with heat shock protein 70 results in protective antiviral immunity and specific cytotoxic T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 187:685-691, 1998

Cnop,M, Welsh,N, Jonas,JC, Jorns,A, Lenzen,S, Eizirik,DL: Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 54 Suppl 2:S97-107, 2005

Crouy-Chanel,A, Hodges,RS, Kohiyama,M, Richarme,G: DnaJ potentiates the interaction between DnaK and alpha-helical peptides. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 233:627-630, 1997

Dahlquist,GG, Ivarsson,S, Lindberg,B, Forsgren,M: Maternal enteroviral infection during pregnancy as a risk factor for childhood IDDM. A population-based case-control study. *Diabetes* 44:408-413, 1995

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.* 25:1056-1062, 1995

Daniel,D, Wegmann,DR: Intranasal administration of insulin peptide B: 9-23 protects NOD mice from diabetes. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 778:371-372, 1996

Daniel,D, Wegmann,DR: Protection of nonobese diabetic mice from diabetes by intranasal or subcutaneous administration of insulin peptide B-(9-23). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:956-960, 1996

Dekker,PJ, Pfanner,N: Role of mitochondrial GrpE and phosphate in the ATPase cycle of matrix Hsp70. *J.Mol.Biol.* 270:321-327, 1997

Dinareello,CA: Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 216:133-165, 1996

Dogan,Y, Akarsu,S, Ustundag,B, Yilmaz,E, Gurgoze,MK: Serum IL-1beta, IL-2, and IL-6 in insulin-dependent diabetic children. *Mediators.Inflamm.* 2006:59206, 2006

Dudek,NL, Thomas,HE, Mariana,L, Sutherland,RM, Allison,J, Estella,E, Agstetra,E, Trapani,JA, Santamaria,P, Lew,AM, Kay,TW, Cytotoxic T-cells from T-cell receptor

transgenic NOD8.3 mice destroy beta-cells via the perforin and Fas pathways. *Diabetes* 55:2412-2418, 2006

Eckenrode,SE, Ruan,QG, Collins,CD, Yang,P, McIndoe,RA, Muir,A, She,JX: Molecular pathways altered by insulin b9-23 immunization. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1037:175-185, 2004

Eggleton,P: Stress protein-polypeptide complexes acting as autoimmune triggers. *Clin.Exp.Immunol.* 134:6-8, 2003

Egwang,TG, Befus,AD, Gauldie,J: Activation of alveolar macrophages following infection with the parasitic nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunology* 54:581-588, 1985

Eisenbarth,GS: Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N.Engl.J.Med.* 314:1360-1368, 1986

Eisenbarth,GS: Type 1 diabetes: molecular, cellular and clinical immunology. *Adv.Exp.Med.Biol.* 552:306-310, 2004

Eizirik,DL, Welsh,M, Strandell,E, Welsh,N, Sandler,S: Interleukin-1 beta depletes insulin messenger ribonucleic acid and increases the heat shock protein hsp70 in mouse pancreatic islets without impairing the glucose metabolism. *Endocrinology* 127:2290-2297, 1990

Eizirik,DL, Mandrup-Poulsen,T: A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 44:2115-2133, 2001

Ellenberg,M: Diabetic foot. *N.Y.State J.Med.* 73:2778-2781, 1973

Elliott,RB, Martin,JM: Dietary protein: a trigger of insulin-dependent diabetes in the BB rat? *Diabetologia* 26:297-299, 1984

Evans,TJ: The role of macrophages in septic shock. *Immunobiology* 195:655-659, 1996

Faris,I, Vagn,NH, Henriksen,O, Parving,HH, Lassen,NA: Impaired autoregulation of blood flow in skeletal muscle and subcutaneous tissue in long-term Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with microangiopathy. *Diabetologia* 25:486-488, 1983

Fearon,DT, Locksley,RM: The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272:50-53, 1996

Fehsel,K, Jallowy,A, Qi,S, Burkart,V, Hartmann,B, Kolb,H: Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide. *Diabetes* 42:496-500, 1993

Felig,P: Combating diabetic ketoacidosis and other hyperglycemic-ketoacidotic syndromes. *Postgrad.Med.* 59:150-153, 1976

Ferguson,SC, Blane,A, Wardlaw,J, Frier,BM, Perros,P, McCrimmon,RJ, Deary,IJ: Influence of an early-onset age of type 1 diabetes on cerebral structure and cognitive function. *Diabetes Care* 28:1431-1437, 2005

Fink,AL: Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Reviews* 79:425-449, 1999

Flynn,GC, Chappell,TG, Rothman,JE: Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science* 245:385-390, 1989

Forrest,JM, Menser,MA, Burgess,JA: High frequency of diabetes mellitus in young adults with congenital rubella. *Lancet* 2:332-334, 1971

Forsius, H, Hiekkala, H, Somerosalo, O: changes of the lens and ocular funduns in juvenile diabetics. *Ann.Paediatr.Fenn.* 10:130-139, 1964

Freiesleben,DB, Bak,P, Pociot,F, Karlsen,AE, Nerup,J: Onset of type 1 diabetes: a dynamical instability. *Diabetes* 48:1677-1685, 1999

Fridlyand,LE, Philipson,LH: Oxidative reactive species in cell injury: Mechanisms in diabetes mellitus and therapeutic approaches. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1066:136-151, 2005

Fullerton,B, Jeitler,K, Seitz,M, Horvath,K, Berghold,A, Siebenhofer,A: Intensive glucose control versus conventional glucose control for type 1 diabetes mellitus. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* 2:CD009122, 2014

Galdiero,M, de l'Ero,GC, Marcatili,A: Cytokine and adhesion molecule expression in human monocytes and endothelial cells stimulated with bacterial heat shock proteins. *Infect.Immun.* 65:699-707, 1997

Gamstorp,I, Shelburne,SA, Jr., Engleson,G, Redondo,D, Traisman,HS: Peripheral neuropathy in juvenile diabetes. *Diabetes* 15:411-418, 1966

Gao,B, Tsan,MF: Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *J.Biol.Chem.* 278:174-179, 2003

Gastpar,R, Gehrmann,M, Bausero,MA, Asea,A, Gross,C, Schroeder,JA, Multhoff,G: Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res.* 65:5238-5247, 2005

Gauldie,J, Richards,C, Northemann,W, Fey,G, Baumann,H: IFN beta 2/BSF2/IL-6 is the monocyte-derived HSF that regulates receptor-specific acute phase gene regulation in hepatocytes. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 557:46-58, 1989

Genevaux,P, Georgopoulos,C, Kelley,WL: The Hsp70 chaperone machines of Escherichia coli: a paradigm for the repartition of chaperone functions. *Mol.Microbiol.* 66:840-857, 2007

Ginsberg-Fellner,F, Witt,ME, Fedun,B, Taub,F, Dobersen,MJ, McEvoy,RC, Cooper,LZ, Notkins,AL, Rubinstein,P: Diabetes mellitus and autoimmunity in patients with the congenital rubella syndrome. *Rev.Infect.Dis.* 7 Suppl 1:S170-S176, 1985

Godebu,E, Summers-Torres,D, Lin,MM, Baaten,BJ, Bradley,LM: Polyclonal adaptive regulatory CD4 cells that can reverse type I diabetes become oligoclonal long-term protective memory cells. *J.Immunol.* 181:1798-1805, 2008

Green, EA, Eynon,EE, Flavell, RA: Local expression of TNFalpha in neonatal NOD mice promotes diabetes by enhancing presentation of islet antigens. *Immunity.* 9:733-743, 1998

Green, EA, Wong, FS, Eshima, K, Mora, C, Flavell, RA: Neonatal tumor necrosis factor alpha promotes diabetes in nonobese diabetic mice by CD154-independent antigen presentation to CD8(+) T cells. *J.Exp.Med.* 191:225-238, 2000

Gurgul-Convey,E, Mehmeti,I, Lortz,S, Lenzen,S: Cytokine toxicity in insulin-producing cells is mediated by nitro-oxidative stress-induced hydroxyl radical formation in mitochondria. *J.Mol.Med.(Berl)* 89:785-798, 2011

Habich,C, Baumgart,K, Kolb,H, Burkart,V: The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins. *J.Immunol.* 168:569-576, 2002

Halbout,P, Briand,JP, Becourt,C, Muller,S, Boitard,C: T cell response to preproinsulin I and II in the nonobese diabetic mouse. *J.Immunol.* 169:2436-2443, 2002

Hanenberg,H, Kolb-Bachofen,V, Kantwerk-Funke,G, Kolb,H: Macrophage infiltration precedes and is a prerequisite for lymphocytic insulitis in pancreatic islets of pre-diabetic BB rats. *Diabetologia* 32:126-134, 1989

Hartl,FU, Martin,J: Molecular chaperones in cellular protein folding. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 5:92-102, 1995

Hartl,FU: Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381:571-579, 1996

Hartl,FU, Hayer-Hartl,M: Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295:1852-1858, 2002

Hehlhans,T, Pfeffer,K: The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115:1-20, 2005

Heinrich,PC, Castell,JV, Andus,T: Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem.J.* 265:621-636, 1990

Hills,CE, Brunskill,NJ: Cellular and physiological effects of C-peptide. *Clin.Sci.(Lond)* 116:565-574, 2009

Hirano,T, Taga,T, Yamasaki,K, Matsuda,T, Tang,B, Muraguchi,A, Horii,Y, Suematsu,S, Hirata,Y, Yawata,H, .: A multifunctional cytokine (IL-6/BSF-2) and its receptor. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* 88:29-33, 1989

Hirshberg,B, Rother,KI, Digon,BJ, III, Lee,J, Gaglia,JL, Hines,K, Read,EJ, Chang,R, Wood,BJ, Harlan,DM: Benefits and risks of solitary islet transplantation for type 1 diabetes using steroid-sparing immunosuppression: the National Institutes of Health experience. *Diabetes Care* 26:3288-3295, 2003

Hoffman,J: Peripheral Neuropathy in Children with Diabetes Mellitus. *Acta Neurologica Scandinavica* 40:3-&, 1964

Holstein,BE, Vesterdal,JH, Sestoft,L: Illness-behaviour, attitude, and knowledge in newly diagnosed diabetics. *Dan.Med.Bull.* 33:165-171, 1986

Honey,GE, Pryse-Davies,J, Roberts,DM: A survey of nephropathy in young diabetics. *Q.J.Med.* 31:473-483, 1962

Huang,Q, Richmond,JF, Suzue,K, Eisen,HN, Young,RA: In vivo cytotoxic T lymphocyte elicitation by mycobacterial heat shock protein 70 fusion proteins maps to a discrete domain and is CD4(+) T cell independent. *J.Exp.Med.* 191:403-408, 2000

Hunt,C, Morimoto,RI: Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82:6455-6459, 1985

Hussain,MJ, Peakman,M, Gallati,H, Lo,SSS, Hawa,M, Viberti,GC, Watkins,PJ, Leslie,RDG, Vergani,D: Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM. *Diabetologia* 39:60-69, 1996

Hyttinen,V, Kaprio,J, Kinnunen,L, Koskenvuo,M, Tuomilehto,J: Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study. *Diabetes* 52:1052-1055, 2003

In't Veld,P: Insulitis in human type 1 diabetes: a comparison between patients and animal models. *Semin Immunopathol* 36:569-579, 2014

Ikeda,T, Hirata,S, Takamatsu,K, Haruta,M, Tsukamoto,H, Ito,T, Uchino,M, Ando,Y, Nagafuchi,S, Nishimura,Y, Senju,S: Suppression of Th1-Mediated Autoimmunity by Embryonic Stem Cell-Derived Dendritic Cells. *PLoS One* 9:e115198, 2014

Iwasaki,A, Medzhitov,R : Regulation of adaptive immunity by the innate immune system.Science. 2010 Jan 15;327(5963)

Jaeckel,E, Lipes,MA, von Boehmer,H: Recessive tolerance to preproinsulin 2 reduces but does not abolish type 1 diabetes. *Nat.Immunol.* 5:1028-1035, 2004

Jalili,RB, Zhang,Y, Hosseini-Tabatabaei,A, Kilani,RT, Khosravi Maharlooeei,M, Li,Y, Salimi Elizei,S, Warnock,GL, Ghahary,A: Fibroblast Cell-Based Therapy for Experimental Autoimmune Diabetes. *PLoS One* 11:e0146970, 2016

Jansen,A, van Hagen,M, Drexhage,HA: Defective maturation and function of antigen-presenting cells in type 1 diabetes. *Lancet* 345:491-492, 1995

Jasinski,JM, Eisenbarth,GS: Insulin as a primary autoantigen for type 1A diabetes. *Clin.Dev.Immunol.* 12:181-186, 2005

Jones,AG, Hattersley,AT: The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes. *Diabet.Med.* 30:803-817, 2013

Jun,HS, Yoon,CS, Zbytnuik,L, van Rooijen,N, Yoon,JW: The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J.Exp.Med.* 189:347-358, 1999

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

Kaas,A, Pflieger,C, Hansen,L, Buschard,K, Schloot,NC, Roep,BO, Mortensen,HB: Association of adiponectin, interleukin (IL)-1ra, inducible protein 10, IL-6 and number

of islet autoantibodies with progression patterns of type 1 diabetes the first year after diagnosis. *Clin.Exp.Immunol.* 161:444-452, 2010

Kajinuma,H, Kanazawa,Y, Sando,H, Hayashi,M, Kawazu,S, Kosaka,K: Human plasma C-peptide immunoreactivity: its correlation with immunoreactive insulin in diabetes, and chronic liver and renal diseases. *Endocrinol.Jpn.* 26:65-73, 1979

Kalkhoff,RK, Kipnis,DM: Studies of the metabolic effects of acute insulin deficiency. I. Mechanism of impairment of hepatic fatty acid and protein synthesis. *Diabetes* 15:443-450, 1966

Kannel,WB, McGee,DL: Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study. *Circulation* 59:8-13, 1979

Kapsenberg,ML, Hilkens,CM, Wierenga,EA, Kalinski,P: The paradigm of type 1 and type 2 antigen-presenting cells. Implications for atopic allergy. *Clin.Exp.Allergy* 29 Suppl 2:33-36, 1999

Karges,W, Pechhold,K, Al Dahouk,S, Riegger,I, Rief,M, Wissmann,A, Schirmbeck,R, Barth,C, Boehm,BO: Induction of autoimmune diabetes through insulin (but not GAD65) DNA vaccination in nonobese diabetic and in RIP-B7.1 mice. *Diabetes* 51:3237-3244, 2002

Kelley,PM, Schlesinger,MJ: Antibodies to two major chicken heat shock proteins cross-react with similar proteins in widely divergent species. *Mol.Cell Biol.* 2:267-274, 1982

Kerner,W, Bruckel,J: Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 122:384-386, 2014

Keskin,O, Bahar,I, Flatow,D, Covell,DG, Jernigan,RL: Molecular mechanisms of chaperonin GroEL-GroES function. *Biochemistry* 41:491-501, 2002

Kim,SH: Maturity-Onset Diabetes of the Young: What Do Clinicians Need to Know? *Diabetes Metab J* 39:468-477, 2015

Kloppel,G, Lohr,M, Habich,K, Oberholzer,M, Heitz,PU: Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv.Synth.Pathol.Res.* 4:110-125, 1985

Knight,RR, Kronenberg,D, Zhao,M, Huang,GC, Eichmann,M, Bulek,A, Wooldridge,L, Cole,DK, Sewell,AK, Peakman,M, Skowera,A: Human β -Cell Killing by Autoreactive Preproinsulin-Specific CD8 T Cells Is Predominantly Granule-Mediated With the Potency Dependent Upon T-Cell Receptor Avidity. *Diabetes* 62:205-213, 2013

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.* 3 Suppl 1:117-120, 1990

Kolb,H: Pathophysiology of type 1 diabetes mellitus. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 107 Suppl 3:S88, 1999

Kolb,H, Mandrup-Poulsen,T: The global diabetes epidemic as a consequence of lifestyle-induced low-grade inflammation. *Diabetologia* 53:10-20, 2010

Kretschmer,K, Heng,TS, von Boehmer,H: De novo production of antigen-specific suppressor cells in vivo. *Nat.Protoc.* 1:653-661, 2006

Kolb H, von Herrath M: Immunotherapy for Type 1 Diabetes: Why Do Current Protocols Not Halt the Underlying Disease Process? *Cell Metabolism* 25:233-241, 2017

Kroncke,KD, Kolb-Bachofen,V, Berschick,B, Burkart,V, Kolb,H: Activated macrophages kill pancreatic syngeneic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 175:752-758, 1991

Lan,MS, Lu,J, Goto,Y, Notkins,AL: Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma. *DNA Cell Biol.* 13:505-514, 1994

Lavy,S, Melamed,E, Cahane,E, Carmon,A: Hypertension and diabetes as risk factors in stroke patients. *Stroke* 4:751-759, 1973

Laws,HW, Harpur,ER, Belmonte,MM, Adams,KW: A long term study of retinal changes in the pre-puberty and puberty onset diabetic. *Can.J.Ophthalmol.* 1:104-111, 1966

Lee,KT, Rabin,ER, Thomas,WA: Fatal acute myocardial infarction in diabetic patients; a comparative study of ninety-four autopsied diabetics with acute myocardial infarction and four hundred six autopsied nondiabetics with acute myocardial infarction, with special reference to age and sex distribution. *AMA.Arch.Intern.Med.* 98:489-494, 1956

Lee,KU, Kim,MK, Amano,K, Pak,CY, Jaworski,MA, Mehta,JG, Yoon,JW: Preferential infiltration of macrophages during early stages of insulinitis in diabetes-prone BB rats. *Diabetes* 37:1053-1058, 1988a

Lee,KU, Pak,CY, Amano,K, Yoon,JW: Prevention of lymphocytic thyroiditis and insulinitis in diabetes-prone BB rats by the depletion of macrophages. *Diabetologia* 31:400-402, 1988b

Lee,KU, Amano,K, Yoon,JW: Evidence for initial involvement of macrophage in development of insulinitis in NOD mice. *Diabetes* 37:989-991, 1988c

Lehmann,PV, Forsthuber,T, Miller,A, Sercarz,EE: Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 358:155-157, 1992

Lenzen,S, Drinkgern,J, Tiedge,M: Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic.Biol.Med.* 20:463-466, 1996

Liberek,K, Marszalek,J, Ang,D, Georgopoulos,C, Zylicz,M: Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:2874-2878, 1991

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

Lowrie,WL, Redfern,WE, Brush,BE: The diabetic foot. *Clin.Orthop.* 6:173-181, 1955

Lu,J, Li,Q, Xie,H, Chen,ZJ, Borovitskaya,AE, Maclaren,NK, Notkins,AL, Lan,MS: Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase, IA-2beta, as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37-kDa tryptic fragment. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:2307-2311, 1996

Lundbaek,K: Diabetic angiopathy: a specific vascular disease. *Lancet* 266:377-379, 1954

Luo,X, Pothoven,KL, McCarthy,D, DeGutes,M, Martin,A, Getts,DR, Xia,G, He,J, Zhang,X, Kaufman,DB, Miller,SD: ECDI-fixed allogeneic splenocytes induce donor-specific tolerance for long-term survival of islet transplants via two distinct mechanisms. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105:14527-14532, 2008

Luo,X, Herold,KC, Miller,SD: Immunotherapy of type 1 diabetes: where are we and where should we be going? *Immunity.* 32:488-499, 2010

Lussow,AR, Barrios,C, Van Embden,J, Van der,ZR, Verdini,AS, Pessi,A, Louis,JA, Lambert,PH, Del Giudice,G: Mycobacterial heat-shock proteins as carrier molecules. *Eur.J.Immunol.* 21:2297-2302, 1991

Maahs,DM, West,NA, Lawrence,JM, Mayer-Davis,EJ: Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol.Metab Clin.North Am.* 39:481-497, 2010

Mace KF, Ehrke MJ, Hori K, Maccubbin DL, Mihich E: Role of Tumor Necrosis Factor in Macrophage Activation and Tumoricidal Activity. *Cancer Res* 48:5427, 1988

MacFarlane,AJ, Strom,A, Scott,FW: Epigenetics: deciphering how environmental factors may modify autoimmune type 1 diabetes. *Mamm.Genome* 20:624-632, 2009

Macleod,JJ: Insulin and diabetes: a general statement of the physiological and therapeutic effect of insulin *Br Med J.* 2:833-835, 1922

Maechler,P, Wollheim,CB: Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. *Nature* 414:807-812, 2001

Malaisse,WJ, Malaisse-Lagae,F, Sener,A, Pipeleers,DG: Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B cell. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 79:927-930, 1982

Mantovani,A, Sica,A, Sozzani,S, Allavena,P, Vecchi,A, Locati,M: The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25:677-686, 2004

Martin,CA, Dorf,ME: Interleukin-6 production by murine macrophage cell lines P388D1 and J774A.1: stimulation requirements and kinetics. *Cell Immunol.* 128:555-568, 1990

Martin,S, Wolf-Eichbaum,D, Duinkerken,G, Scherbaum,WA, Kolb,H, Noordzij,JG, Roep,BO: Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-lymphocyte deficiency. *N.Engl.J.Med.* 345:1036-1040, 2001

Martinez,FO, Sica,A, Mantovani,A, Locati,M: Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 13:453-461, 2008

Mathis,D, Vence,L, Benoist,C: beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature* 414:792-798, 2001

Mayer,MP, Bukau,B: Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol.Life Sci.* 62:670-684, 2005

Mazze,RS, Lucido,D, Shamoon,H: Psychological and social correlates of glycemic control. *Diabetes Care* 7:360-366, 1984

McCall,TB, Palmer,RM, Moncada,S: Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone. *Eur.J.Immunol.* 21:2523-2527, 1991

McIntosh,ED, Menser,MA: A fifty-year follow-up of congenital rubella. *Lancet* 340:414-415, 1992

Menoret,A, Chandawarkar,RY, Srivastava,PK: Natural autoantibodies against heat-shock proteins hsp70 and gp96: implications for immunotherapy using heat-shock proteins. *Immunology* 101:364-370, 2000

Michels,AW, Nakayama,M: The anti-insulin trimolecular complex in type 1 diabetes. *Curr.Opin.Endocrinol.Diabetes Obes.* 17:329-334, 2010

Millar,DG, Garza,KM, Odermatt,B, Elford,AR, Ono,N, Li,Z, Ohashi,PS: Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo. *Nat.Med.* 9:1469-1476, 2003

Miller,SD, Turley,DM, Podojil,JR: Antigen-specific tolerance strategies for the prevention and treatment of autoimmune disease. *Nat.Rev.Immunol.* 7:665-677, 2007

Mills,CD, Kincaid,K, Alt,JM, Heilman,MJ, Hill,AM: M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J.Immunol.* 164:6166-6173, 2000

Morgan,NG, Leete,P, Foulis,AK, Richardson,SJ: Islet inflammation in human type 1 diabetes mellitus. *IUBMB Life* 66:723-734, 2014

Moroi,Y, Mayhew,M, Trcka,J, Hoe,MH, Takechi,Y, Hartl,FU, Rothman,JE, Houghton,AN: Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:3485-3490, 2000

Mosmann,TR, Fong,TA: Specific assays for cytokine production by T cells. *J.Immunol.Methods* 116:151-158, 1989

Motoyoshi,K, Yoshida,K, Hatake,K, Saito,M, Miura,Y, Yanai,N, Yamada,M, Kawashima,T, Wong,GG, Temple,PA, .: Recombinant and native human urinary colony-stimulating factor directly augments granulocytic and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production of human peripheral blood monocytes. *Exp.Hematol.* 17:68-71, 1989

Muraguchi,A, Kishimoto,T, Miki,Y, Kuritani,T, Kaieda,T, Yoshizaki,K, Yamamura,Y: T cell-replacing factor- (TRF) induced IgG secretion in a human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF. *J.Immunol.* 127:412-416, 1981

Mycko,MP, Cwiklinska,H, Szymanski,J, Szymanska,B, Kudla,G, Kilianek,L, Odyniec,A, Brosnan,CF, Selmaj,KW: Inducible heat shock protein 70 promotes myelin autoantigen presentation by the HLA class II. *J.Immunol.* 172:202-213, 2004

Nakayama,M, Abiru,N, Moriyama,H, Babaya,N, Liu,E, Miao,D, Yu,L, Wegmann,DR, Hutton,JC, Elliott,JF, Eisenbarth,GS: Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* 435:220-223, 2005

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

Nerup,J, Mandrup-Poulsen,T, Helqvist,S, Andersen,HU, Pociot,F, Reimers,JI, Cuartero,BG, Karlsen,AE, Bjerre,U, Lorenzen,T: On the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 37 Suppl 2:S82-S89, 1994

Newmeyer,DD, Ferguson-Miller,S: Mitochondria: Releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112:481-490, 2003

Noble,JA, Valdes,AM, Varney,MD, Carlson,JA, Moonsamy,P, Fear,AL, Lane,JA, Lavant,E, Rappner,R, Louey,A, Concannon,P, Mychaleckyj,JC, Erlich,HA, for the Type: HLA Class I and Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes: Results From the Type 1 Diabetes Genetics Consortium. *Diabetes* 59:2972-2979, 2010

Noble,JA, Valdes,AM: Genetics of the HLA Region in the Prediction of Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep* 11:533-542, 2011

Nokoff,N, Rewers,M: Pathogenesis of type 1 diabetes: lessons from natural history studies of high-risk individuals. *Ann N Y Acad Sci* 1281:1-15, 2013

Nylandsted,J, Wick,W, Hirt,UA, Brand,K, Rohde,M, Leist,M, Weller,M, Jaattela,M: Eradication of glioblastoma, and breast and colon carcinoma xenografts by Hsp70 depletion. *Cancer Res.* 62:7139-7142, 2002

Oglesbee,MJ, Herdman,AV, Passmore,GG, Hoffman,WH: Diabetic ketoacidosis increases extracellular levels of the major inducible 70-kDa heat shock protein. *Clin.Biochem.* 38:900-904, 2005

Ohashi,K, Burkart,V, Flohe,S, Kolb,H: Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J.Immunol.* 164:558-561, 2000

Okada,M, Kishimoto,T, Igarashi,T, Teranishi,T, Yamamura,Y: LPS-or 8Br-cyclic AMP-induced production of T cell-activating factor(s) in macrophage tumor cell line J774.1. *J.Immunol.* 120:1097-1101, 1978

Orban,T, Farkas,K, Jalahej,H, Kis,J, Treszl,A, Falk,B, Reijonen,H, Wolfsdorf,J, Ricker,A, Matthews,JB, Tchao,N, Sayre,P, Bianchine,P: Autoantigen-specific regulatory T cells induced in patients with type 1 diabetes mellitus by insulin B-chain immunotherapy. *J.Autoimmun.* 34:408-415, 2010

Oyer,PE, Cho,S, Peterson,JD, Steiner,DF: Studies on human proinsulin. Isolation and amino acid sequence of the human pancreatic C-peptide. *J.Biol.Chem.* 246:1375-1386, 1971

Padgett,LE, Broniowska,KA, Hansen,PA, Corbett,JA, Tse,HM: The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1281:16-35, 2013

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

Pancre,V, Monte,D, Delanoye,A, Capron,A, Auriault,C: Interleukin-6 is the main mediator of the interaction between monocytes and platelets in the killing of *Schistosoma mansoni*. *Eur.Cytokine Netw.* 1:15-19, 1990

Panjwani,NN, Popova,L, Srivastava,PK: Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J.Immunol.* 168:2997-3003, 2002

Park,CR, Bornstein,J, Post,RL: Effect of insulin on free glucose content of rat diaphragm in vitro. *Am.J.Physiol* 182:12-16, 1955

Pepper,AR, Gala-Lopez,B, Ziff,O, Shapiro,AJ: Current status of clinical islet transplantation. *World J.Transplant* 3:48-53, 2013

Perlmutter,DH, Dinarello,CA, Punsal,PI, Colten,HR: Cachectin/tumor necrosis factor regulates hepatic acute-phase gene expression. *J.Clin.Invest* 78:1349-1354, 1986

Persson,YA, Blomgran-Julinder,R, Rahman,S, Zheng,L, Stendahl,O: Mycobacterium tuberculosis-induced apoptotic neutrophils trigger a pro-inflammatory response in macrophages through release of heat shock protein 72, acting in synergy with the bacteria. *Microbes.Infect.* 10:233-240, 2008

Pietropaolo,M, Towns,R, Eisenbarth,GS: Humoral autoimmunity in type 1 diabetes: prediction, significance, and detection of distinct disease subtypes. *Cold Spring Harb.Perspect.Med.* 2: 2012

Pines,N: A clinical study of diabetic retinal angiopathy. *Br J.Ophthalmol.* 34:303-317, 1950

Platz,P, Jakobsen,BK, Morling,N, Ryder,LP, Svejgaard,A, Thomsen,M, Christy,M, Kromann,H, Benn,J, Nerup,J, Green,A, Hauge,M: HLA-D and -DR antigens in genetic analysis of insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 21:108-115, 1981

Porcheray,F, Viaud,S, Rimaniol,AC, Leone,C, Samah,B, Dereuddre-Bosquet,N, Dormont,D, Gras,G: Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin.Exp.Immunol.* 142:481-489, 2005

Prasad,S, Kohm,AP, McMahon,JS, Luo,X, Miller,SD: Pathogenesis of NOD diabetes is initiated by reactivity to the insulin B chain 9-23 epitope and involves functional epitope spreading. *J.Autoimmun.* 39:347-353, 2012

Purcell,AW, Todd,A, Kinoshita,G, Lynch,TA, Keech,CL, Gething,MJ, Gordon,TP: Association of stress proteins with autoantigens: a possible mechanism for triggering autoimmunity? *Clin.Exp.Immunol.* 132:193-200, 2003

Rabin,DU, Pleasic,SM, Shapiro,JA, Yoo-Warren,H, Oles,J, Hicks,JM, Goldstein,DE, Rae,PM: Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. *J.Immunol.* 152:3183-3188, 1994

Rabinovitch,A, Suarez-Pinzon,WL: Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem.Pharmacol.* 55:1139-1149, 1998

Radons,J, Heller,B, Burkle,A, Hartmann,B, Rodriguez,ML, Kroncke,KD, Burkart,V, Kolb,H: Nitric oxide toxicity in islet cells involves poly(ADP-ribose) polymerase activation and concomitant NAD⁺ depletion. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 199:1270-1277, 1994

Rajaiah,R, Moudgil,KD: Heat-shock proteins can promote as well as regulate autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 8:388-393, 2009

Ralph,P, Moore,MA, Nilsson,K: Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J.Exp.Med* 143:1528-1533, 1976

Reichel,G, Bruns,W, Rabending,G: Classification of diabetic neuropathy from pathogenetic aspects. *Endokrinologie.* 79:321-336, 1982

Reis,JS, Amaral,CA, Volpe,CM, Fernandes,JS, Borges,EA, Isoni,CA, Anjos,PM, Machado,JA: Oxidative stress and interleukin-6 secretion during the progression of type 1 diabetes. *Arq Bras.Endocrinol.Metabol.* 56:441-448, 2012

Rendell,M: C-Peptide Levels As A Criterion in Treatment of Maturity-Onset Diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 57:1198-1206, 1983

Retzlaff,C, Yamamoto,Y, Hoffman,PS, Friedman,H, Klein,TW: Bacterial heat shock proteins directly induce cytokine mRNA and interleukin-1 secretion in macrophage cultures. *Infect.Immun.* 62:5689-5693, 1994

Ritossa,F: New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and Dnp in Drosophila. *Experientia* 18:571-&, 1962

Rodin,G: Quality of life in adults with insulin-dependent diabetes mellitus. *Psychother.Psychosom.* 54:132-139, 1990

Roman,E, Moreno,C: Synthetic peptides non-covalently bound to bacterial hsp 70 elicit peptide-specific T-cell responses in vivo. *Immunology* 88:487-492, 1996

Rosen,OM: After Insulin Binds. *Science* 237:1452-1458, 1987

Rosenbaum,P, Kattine,AA, Gottsegen,WL: Diabetic and prediabetic nephropathy in childhood. *Am.J.Dis.Child* 106:83-95, 1963

Rothe,H, Fehsel,K, Kolb,H: Tumour necrosis factor alpha production is upregulated in diabetes prone BB rats. *Diabetologia* 33:573-575, 1990

Rothe,H, Kolb,H: The APC1 concept of type I diabetes. *Autoimmunity* 27:179-184, 1998

Rudiger,S, Germeroth,L, Schneider-Mergener,J, Bukau,B: Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J.* 16:1501-1507, 1997

Rytter,L, Troelsen,S, Beck-Nielsen,H: Prevalence and mortality of acute myocardial infarction in patients with diabetes. *Diabetes Care* 8:230-234, 1985

Scheufler,C, Brinker,A, Bourenkov,G, Pegoraro,S, Moroder,L, Bartunik,H, Hartl,FU, Moarefi,I: Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 101:199-210, 2000

Schlecht,R, Erbse,AH, Bukau,B, Mayer,MP: Mechanics of Hsp70 chaperones enables differential interaction with client proteins. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 18:345-351, 2011

Schoenle,EJ, Schoenle,D, Molinari,L, Largo,RH: Impaired intellectual development in children with Type I diabetes: association with HbA(1c), age at diagnosis and sex. *Diabetologia* 45:108-114, 2002

Schroder,M, Kaufman,RJ: ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 569:29-63, 2005

Scott,FW, Kolb,H: Cows' milk and insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 348:613, 1996

Secrest,AM, Prince,CT, Costacou,T, Miller,RG, Orchard,TJ: Predictors of and survival after incident stroke in type 1 diabetes. *Diab.Vasc.Dis.Res.* 10:3-10, 2013

Shapiro,AM, Lakey,JR, Ryan,EA, Korbitt,GS, Toth,E, Warnock,GL, Kneteman,NM, Rajotte,RV: Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N.Engl.J.Med.* 343:230-238, 2000

Shaw,JE, Sicree,RA, Zimmet,PZ: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res.Clin.Pract.* 87:4-14, 2010

Shilo,M, Wolman,B: Activities of Bacterial Levans and of Lipopolysaccharides in the Processes of Inflammation and Infection. *Br J Exp Pathol* 39:652-660, 1958

Shimizu,J, Kanagawa,O, Unanue,ER: Presentation of beta-cell antigens to CD4⁺- and CD8⁺T cells of non-obese diabetic mice. *J.Immunol.* 151:1723-1730, 1993

Silva DG, Daley SR, Hogan J, Lee SK, Teh CE, Hu DY, Lam KP, Goodnow CC, Vinuesa CG: Anti-Islet Autoantibodies Trigger Autoimmune Diabetes in the Presence of an Increased Frequency of Islet-Reactive CD4 T Cells. *Diabetes* 60:2102-2111, 2011

Sondermann,H, Becker,T, Mayhew,M, Wieland,F, Hartl,FU: Characterization of a receptor for heat shock protein 70 on macrophages and monocytes. *Biol.Chem.* 381:1165-1174, 2000

Sosinowski,T, Eisenbarth,GS: Type 1 diabetes: primary antigen/peptide/register/trimolecular complex. *Immunol.Res.* 55:270-276, 2013

Srivastava,P: Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat.Rev.Immunol.* 2:185-194, 2002

Srivastava,PK, Menoret,A, Basu,S, Binder,RJ, McQuade,KL: Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. *Immunity.* 8:657-665, 1998

Steck,AK, Rewers,MJ: Genetics of type 1 diabetes. *Clin.Chem.* 57:176-185, 2011

Stephens,JW, Root,HF: Treatment of diabetic coma. *Postgrad.Med.* 13:164-173, 1953

Stetten,D, Jr., KLEIN,BV: Effect of insulin level upon lipogenesis. *Fed.Proc.* 5:157, 1946

Stout,RD, Suttles,J: Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J.Leukoc.Biol.* 76:509-513, 2004

Suzue,K, Zhou,X, Eisen,HN, Young,RA: Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into the major histocompatibility complex class I presentation pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:13146-13151, 1997

Swaak,AJ, van Rooyen,A, Nieuwenhuis,E, Aarden,LA: Interleukin-6 (IL-6) in synovial fluid and serum of patients with rheumatic diseases. *Scand.J.Rheumatol.* 17:469-474, 1988

Swaak,AJ, van Rooyen,A, Aarden,LA: Interleukin-6 (IL-6) and acute phase proteins in the disease course of patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol.Int.* 8:263-268, 1989

Tang,Q, Henriksen,KJ, Bi,M, Finger,EB, Szot,G, Ye,J, Masteller,EL, McDevitt,H, Bonyhadi,M, Bluestone,JA: In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J.Exp.Med.* 199:1455-1465, 2004

Tattersall,RB, Fajans,SS: A difference between the inheritance of classical juvenile-onset and maturity-onset type diabetes of young people. *Diabetes* 24:44-53, 1975

Tobian,AAR, Canaday,DH, Harding,CV: Bacterial Heat Shock Proteins Enhance Class II MHC Antigen Processing and Presentation of Chaperoned Peptides to CD4⁺ T Cells. *The Journal of Immunology* 173:5130, 2004a

Tobian,AAR, Canaday,DH, Boom,WH, Harding,CV: Bacterial Heat Shock Proteins Promote CD91-Dependent Class I MHC Cross-Presentation of Chaperoned Peptide

to CD8⁺ T Cells by Cytosolic Mechanisms in Dendritic Cells versus Vacuolar Mechanisms in Macrophages. *The Journal of Immunology* 172:5277, 2004b

Tracey,KJ, Cerami,A: Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. *Crit Care Med.* 21:S415-S422, 1993

Triantafilou,M, Triantafilou,K: Heat-shock protein 70 and heat-shock protein 90 associate with Toll-like receptor 4 in response to bacterial lipopolysaccharide. *Biochem.Soc.Trans.* 32:636-639, 2004

Tsan,MF, Gao,B: Heat shock protein and innate immunity. *Cell Mol.Immunol.* 1:274-279, 2004

Ueno,T, Taguchi,H, Tadakuma,H, Yoshida,M, Funatsu,T: GroEL mediates protein folding with a two successive timer mechanism. *Mol.Cell* 14:423-434, 2004

Valderas,MW, Barrow,WW: Establishment of a method for evaluating intracellular antibiotic efficacy in *Brucella abortus*-infected Mono Mac 6 monocytes. *J.Antimicrob.Chemother.* 61:128-134, 2008

Vanderlugt,CJ, Miller,SD: Epitope spreading. *Curr.Opin.Immunol.* 8:831-836, 1996

Vanderlugt,CL, Miller,SD: Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat.Rev.Immunol.* 2:85-95, 2002

Vassalli,P, Grau,GE, Piguet,PF: TNF in autoimmune diseases, graft-versus-host reactions, and pulmonary fibrosis. *Immunol.Ser.* 56:409-430, 1992

Verge,CF, Gianani,R, Kawasaki,E, Yu,L, Pietropaolo,M, Jackson,RA, Chase,HP, Eisenbarth,GS: Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a

combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 45:926-933, 1996

Verreck,FAW, de Boer,T, Langenberg,DML, van der Zanden,L, Ottenhoff,THM: Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *Journal of Leukocyte Biology* 79:285-293, 2006

Walker,R, Bone,AJ, Cooke,A, Baird,JD: Distinct macrophage subpopulations in pancreas of prediabetic BB/E rats. Possible role for macrophages in pathogenesis of IDDM. *Diabetes* 37:1301-1304, 1988

Wall,JS, Steele,R, de Bodo,RC, Altszuler,N: Effect of insulin on utilization and production of circulating glucose. *Am.J.Physiol* 189:43-50, 1957

Wallin,RP, Lundqvist,A, More,SH, von Bonin,A, Kiessling,R, Ljunggren,HG: Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol.* 23:130-135, 2002

Wallin,RP, Lundqvist,A, More,SH, von Bonin,A, Kiessling,R, Ljunggren,HG: Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol.* 23:130-135, 2002

Ward,JD: The diabetic leg. *Diabetologia* 22:141-147, 1982

Watson,RW, Redmond,HP, Bouchier-Hayes,D: Role of endotoxin in mononuclear phagocyte-mediated inflammatory responses. *J.Leukoc.Biol.* 56:95-103, 1994

Weber,SE, Harbertson,J, Godebu,E, Mros,GA, Padrick,RC, Carson,BD, Ziegler,SF, Bradley,LM: Adaptive islet-specific regulatory CD4 T cells control autoimmune diabetes

and mediate the disappearance of pathogenic Th1 cells in vivo. *J.Immunol.* 176:4730-4739, 2006

Wegmann,DR, Norbury-Glaser,M, Daniel,D: Insulin-specific T cells are a predominant component of islet infiltrates in pre-diabetic NOD mice. *Eur.J.Immunol.* 24:1853-1857, 1994

Wegmann,DR, Eisenbarth,GS: It's insulin. *J.Autoimmun.* 15:286-291, 2000

Welborn,TA, Knuiman,M, McCann,V, Stanton,K, Constable,IJ: Clinical macrovascular disease in Caucasoid diabetic subjects: logistic regression analysis of risk variables. *Diabetologia* 27:568-573, 1984

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

Westerberg,DP: Diabetic ketoacidosis: evaluation and treatment. *Am.Fam.Physician* 87:337-346, 2013

Whicher,JT, Evans,SW: Cytokines in disease. *Clin.Chem.* 36:1269-1281, 1990

Wieland,A, Denzel,M, Schmidt,E, Kochanek,S, Kreppel,F, Reimann,J, Schirmbeck,R: Recombinant complexes of antigen with stress proteins are potent CD8 T-cell-stimulating immunogens. *J.Mol.Med.(Berl)* 86:1067-1079, 2008

Wong,FS, Karttunen,J, Dumont,C, Wen,L, Visintin,I, Pilip,IM, Shastri,N, Pamer,EG, Janeway,CA, Jr.: Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library. *Nat.Med.* 5:1026-1031, 1999

Wool,IG, Cavicchi,P: Insulin regulation of protein synthesis by muscle ribosomes: effect of the hormone on translation of messenger RNA for a regulatory protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 56:991-998, 1966

Wright,BH, Corton,JM, El Nahas,AM, Wood,RF, Pockley,AG: Elevated levels of circulating heat shock protein 70 (Hsp70) in peripheral and renal vascular disease. *Heart Vessels* 15:18-22, 2000

Wright,EL, Quenelle,DC, Suling,WJ, Barrow,WW: Use of Mono Mac 6 human monocytic cell line and J774 murine macrophage cell line in parallel antimycobacterial drug studies. *Antimicrob.Agents Chemother.* 40:2206-2208, 1996

Xue,J, Schmidt,SV, Sander,J, Draffehn,A, Krebs,W, Quester,I, De Nardo,D, Gohel,TD, Emde,M, Schmidleithner,L, Ganesan,H, Nino-Castro,A, Mallmann,MR, Labzin,L, Theis,H, Krau,M, Beyer,M, Latz,E, Freema,TC, Ulas,T, Schultze,JL: Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity.* 2014

Yang,Z, Chen,M, Fialkow,LB, Ellett,JD, Wu,R, Nadler,JL: The novel anti-inflammatory compound, lisofylline, prevents diabetes in multiple low-dose streptozotocin-treated mice. *Pancreas* 26:e99-104, 2003

Yu,L, Robles,DT, Abiru,N, Kaur,P, Rewers,M, Kelemen,K, Eisenbarth,GS: Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: evidence for early determination of subsequent diabetes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:1701-1706, 2000

Zhang,Y, Broser,M, Rom,W: Activation of the interleukin 6 gene by Mycobacterium tuberculosis or lipopolysaccharide is mediated by nuclear factors NF IL 6 and NF-kappa B. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:3632, 1995

Zhu,X, Zhao,X, Burkholder,WF, Gragerov,A, Ogata,CM, Gottesman,ME, Hendrickson,WA: Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272:1606-1614, 1996

Ziegler-Heitbrock,HW, Thiel,E, Futterer,A, Herzog,V, Wirtz,A, Riethmuller,G: Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int.J.Cancer* 41:456-461, 1988

Ziegler-Heitbrock,HW, Blumenstein,M, Kafferlein,E, Kieper,D, Petersmann,I, Endres,S, Flegel,WA, Northoff,H, Riethmuller,G, Haas,JG: In vitro desensitization to lipopolysaccharide suppresses tumour necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 gene expression in a similar fashion. *Immunology* 75:264-268, 1992

Ziegler,AG, Hummel,M, Schenker,M, Bonifacio,E: Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes* 48:460-468, 1999

Ziegler,AG, Schmid,S, Huber,D, Hummel,M, Bonifacio,E: Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA* 290:1721-1728, 2003

7. DANKSAGUNGEN

Herrn Professor Roden danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der Promotion am Deutschen Diabetes Zentrum, Leibniz Institut für Diabetesforschung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Herrn Priv.-Doz. V. Burkart danke ich sowohl für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die hervorragende Betreuung, die wertvollen Ratschläge und Diskussionen sowie für seinen unermüdlichen Einsatz für das Gelingen dieser Arbeit.

Frau W. Fingberg danke ich für die geduldige Einführung in die Grundlagen der Laborarbeit und ihre ständige Bereitschaft meine Fragen zu beantworten und ihre Hilfestellung bei der Durchführung der Experimente.

Danken möchte ich darüber hinaus allen Mitarbeitern des DDZ für die freundliche Aufnahme, das hervorragende Arbeitsklima und die selbstverständliche Diskussionsbereitschaft.

Ein großer Dank gilt weiterhin meiner Familie und meinen Freunden, die eine große moralische Unterstützung beim Gelingen dieser Arbeit dargestellt haben.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum, Vor- und Nachname

Unterschrift