

Inselzellantikörper und Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase (GAD 65) bei Langzeit Typ 1 Diabetikern

Korrelation mit residueller Beta-Zellfunktion, Neuropathie und
HLA-Status

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereiches Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Jens Allendörfer

aus Gießen

Gießen 2000

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik III und Poliklinik
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. R. G. Bretzel

Gutachter: PD Dr. Holl

Tag der Disputation: 14. Februar 2000

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNGEN	1
2. KOLLEKTIVE UND METHODEN	
2.1 Patienten	10
2.2 Humorale Immunmarker	
2.2.1 Immunpräzipitationstest zur Bestimmung der GAD 65 Antikörper	11
2.2.2 Nachweis von ICA durch Immunfluoreszenztechnik	17
2.2.3 HLA Typisierung	17
2.3 Metabolische Parameter	
2.3.1 Bestimmung der residualen Beta-Zell-Funktion	19
2.4 Klinische Parameter	
2.4.1 Diagnostik der peripheren und autonomen Neuropathie	20
2.5 Statistische Methoden	24
3. ERGEBNISSE	
3.1 Etablierung des GAD 65-Antikörper Assays	
3.1.1 Darstellung des GAD 65 Ak Index Wertes	25
3.1.2 Festlegung des Normbereiches	25
3.1.3 Berechnung der Präzision des GAD 65-Antikörper Assays	26
3.1.4 Validierung des GAD 65-Antikörper Assays	27

3.2	Epidemiologische Daten	
3.2.1	Prävalenz von GAD 65 Ak und ICA in den verschiedenen Kollektiven	30
3.2.2	Beziehung zwischen Geschlecht und Autoantikörper (GAD 65 Ak, ICA)	32
3.2.3	Beziehung zwischen Diabetesdauer und Autoantikörpern (GAD 65 Ak, ICA)	34
3.3	Beziehung von GAD 65 Ak bei Langzeit Typ I Diabetikern zu immunologischen und klinischen Parametern	
3.3.1	Beziehung zwischen GAD 65 Ak und ICA	36
3.3.2	Beziehung zwischen GAD 65 Ak und dem HLA-Status	37
3.3.3	Beziehung zwischen GAD 65 Ak und Neuropathie	38
3.4	Residuale Beta-Zellfunktion bei Langzeit Typ I Diabetikern	
3.4.1	Residuale Beta-Zellfunktion und deren Beziehung zu GAD 65 Ak und ICA	39
3.4.2	Residuale Beta-Zellfunktion und deren Beziehung zur Dauer des Diabetes	40
4.	DISKUSSION	
4.1	Epidemiologische Daten	41
4.2	Residuale Beta-Zellfunktion und GAD 65 Ak-Persistenz	43
4.3	Neuropathie und GAD 65 Ak-Persistenz	44
4.4	Genetische Prädisposition und GAD 65 Ak-Persistenz	47
4.5	Konkordanz zwischen GAD 65 Ak und ICA	49
5.	ZUSAMMENFASSUNG	52

6.	LITERATURVERZEICHNIS	53
7.	ANHANG	65

1. EINLEITUNG

Unter der Bezeichnung „Diabetes mellitus“ werden Stoffwechselveränderungen unterschiedlicher Genese zusammengefaßt. Kennzeichen dieser Erkrankung ist eine dauerhafte Erhöhung der Blutzuckerkonzentration oder das Unvermögen des Organismus, zugeführte Kohlenhydrate zeitgerecht zu verwerten. Ursache dafür ist ein absoluter oder relativer Mangel des von der Bauchspeicheldrüse sezernierten Insulins.

Schon vor einigen Jahrtausenden wurden Symptome des Diabetes mellitus beschrieben. So wird um 1500 vor Christus in dem altägyptischen Papyrus Ebers von den Symptomen einer mit erhöhtem Harnfluß einhergehenden Erkrankung berichtet und aus der altindischen Medizin ist die Bezeichnung des „honigsüßen Durchfluß“ als Beschreibung der beim Diabetes mellitus auftretenden Glukosurie überliefert. Obwohl die klinischen Phänomene der Erkrankung seit dem Altertum bekannt waren, wurden die pathophysiologischen Prinzipien als Grundlage der Entwicklung einer gezielten Therapie erst Ende des 19. Jahrhunderts entdeckt.

Minkowski und von Mering konnten im Jahr 1890 durch Exstirpation der Bauchspeicheldrüse eines Hundes den Zusammenhang zwischen Pankreas und Diabetes mellitus nachweisen [MERING & MINKOWSKI 1890]. Bereits im Jahr 1902 konnte Schmidt den „Langerhansschen Inseln“ durch den lichtmikroskopischen Nachweis entzündlicher Veränderungen, der sogenannten Insulitis, eine wesentliche pathogenetische Bedeutung bei der Entstehung des Diabetes mellitus zuschreiben [SCHMIDT 1902]. Zwei Jahrzehnte später wurde Insulin als Produkt der Bauchspeicheldrüse erkannt und mit der ersten gelungenen Insulinextraktion durch Banting und Best 1922 [BANTING & BEST 1922] die Grundlage der bis heute durchgeführten Insulintherapie gelegt.

In Mitteleuropa ist für den sogenannten Typ 1 Diabetes (IDDM) eine Prävalenz von 0,3% und für den Typ 2 Diabetes (NIDDM) etwa 4% anzunehmen [BOTTERMANN 1991].

Nach der Klassifikation der WHO [NATIONAL DIABETES DATA GROUP 1979, WHO 1980] ist unter dem Typ 2 Diabetes die primär nicht insulinabhängige Variante der Erkrankung zu verstehen, die sich überwiegend im mittleren Erwachsenenalter manifestiert. Als Folge einer Kaskade von Hyperalimentation mit konsekutiver Hyperinsulinämie, die eine periphere Insulinresistenz nach sich zieht, ist pathophysiologisch eine Erschöpfung der B-Zellen des

Pankreas zu beobachten [BARKER et al. 1982, GEPTS & FELD 1987, UKPDS 1994, ZIMMET et al. 1992, REAVEN 1988].

Nach heutigem Stand des Wissens handelt es sich bei dem Typ 1 Diabetes hingegen pathophysiologisch um einen Autoimmunprozeß, der zu einer selektiven Zerstörung der insulinproduzierenden B-Zellen der Bauchspeicheldrüse führt, dessen Beginn meist im Kindes- und Jugendalter liegt. [BRETZEL 1988, FEDERLIN 1985, ZIEGLER et al. 1990a, ZIEGLER et al. 1990b]. Das pathomorphologische Korrelat stellt die Insulitis dar. Hierbei kommt es zur Infiltration der pankreatischen Inselzelle mit mononukleären Zellen und zur Inflammation mit selektiver Zerstörung der B-Zellen [CAMPBELL & HARRISON 1990, JANSEN 1977, EGEBERG 1976]. Als Hinweis auf eine genetische Disposition finden sich unter den Erkrankten gehäuft Träger der HLA-Antigene HLA-DR3 und HLA-DR4 [DESCHAMPS 1980, RICH 1985, TILIL 1987, ZIEGLER et al. 1990a]. Weiterhin wurde belegt, daß erstgradige Verwandte von Typ 1 Diabetikern ein erhöhtes Erkrankungsrisiko gegenüber familiär unbelasteten Personen aufweisen [LESLIE & PYKE 1986, TILIL 1987]. Neben den genetischen Faktoren wird auch die Beteiligung von Umweltfaktoren, wie z. B. Ernährungsgewohnheiten [DAHLQUIST et al. 1991, DAHLQUIST et al. 1990, KARJALAINEN et al. 1992, VIRTANEN et al. 1991], klimatischen und geographischen Unterschieden [DIABETES EPIDEMIOLOGY RESEARCH GROUP 1988] und Virusinfektionen [BANATVALA et al. 1985, RAYFIELD & SETO 1978] in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes diskutiert. Zwillingsuntersuchungen bestätigen eine multifaktorielle Genese. So ist zwar das Erkrankungsrisiko mit der genetischen Ähnlichkeit bei eineiigen Zwillingen mit etwa 50% im Vergleich zu zweieiigen Zwillingen mit etwa 20% erhöht, zudem ist das Erkrankungsrisiko des zunächst noch gesunden Zwillings auch vom Alter des Geschwisterteiles zum Zeitpunkt der Diagnose des Diabetes mellitus abhängig [KUMAR et al. 1993, TUN et al. 1994]. Dies und die Tatsache, daß immunologische Phänomene bei ein- und zweieiigen nichtdiabetischen Geschwisterteilen von Typ 1 Diabetikern in gleicher Ausprägung beobachtet wurden, weisen neben der genetischen Prädisposition auch auf die Bedeutung extrinsischer Faktoren hin [PETERSEN 1997].

Beim Typ 1 Diabetes kommt es zu einer immunologisch bedingten Zerstörung der Insulinproduzierenden B-Zellen des Pankreas. Man nimmt heute an, daß dieser Autoimmunreaktion

gegen die körpereigenen B-Zellen eine Störung der Regulation des Immunsystemes zugrundeliegt. Im Bereich der für die Inselzelldestruktion pathogenetisch bedeutsamen zellulären Immunität spielen autoreaktive T-Zellen eine wesentliche Rolle. Diese autoreaktiven T-Lymphozyten sind gegen Epitope körpereigener Antigene der Inselzellen wie z. B. Insulin, GAD65 und GAD67 gerichtet [ROEP 1996]. Die sogenannten T-Suppressor-Zellen (Lymphozyten), unterdrücken normalerweise die Aktivität der autoreaktiven T-Lymphozyten. Kommt es zu einer Aktivierung der autoreaktiven T-Lymphozyten bei gestörter Suppressorfunktion, könnte eine unkontrollierte klonale Expansion autoreaktiver T-Lymphozyten eine Kaskade von spezifischen, gegen die körpereigenen B-Zellen des Pankreas gerichtet, und unspezifischen Entzündungsreaktionen auslösen, was eine Zerstörung der B-Zellen zur Folge hat [RABINOVITCH & SKYLER 1998]. Die Aktivierung von T-Lymphozyten erfolgt nur dann, wenn eine antigenpräsentierende Zelle, wie z. B. Makrophagen, das zuvor „prozessierte“ Antigen, oder wie im Falle des Typ 1 Diabetes, das Autoantigen, zusammen mit MHC (major histocompatibility complex) -Molekülen der Klasse II präsentiert. Die Rolle der MHC Moleküle liegt in der Regulation der Immunantwort durch Präsentation von immunogenen Fragmenten zuvor verarbeiteter Antigene an T-Lymphozyten. Im Tiermodell wurde gezeigt, daß die Inaktivierung von Makrophagen die Ausbildung einer Insulitis und die Entwicklung eines Diabetes verhindern kann [YOON et al. 1998], was dem Prozeß der Antigenpräsentation eine wesentliche pathogenetische Bedeutung zuschreibt. Die an diesem Prozeß beteiligten MHC-Moleküle werden von entsprechenden Genen kodiert, wobei für bestimmte Nucleotidsequenzen der MHC Klasse II kodierenden Gene eine erhöhte Suszeptibilität für Autoimmunerkrankungen gezeigt werden konnte [TODD et al. 1988], was die Hypothese einer gestörten Antigenpräsentation stützt. Doch auch in den der Antigenpräsentation folgenden Abläufen fanden sich bei Typ 1 Diabetikern gehäuft Störungen: Verminderte Aktivität von T-Suppressorzellen (CD8+) gegenüber GAD65 [TOGUN et al. 1997], Anstieg der Zahl zirkulierender CD4 positiver T-Lymphozyten [PETERSEN et al. 1996] und gesteigerte Reaktivität peripher zirkulierender T-Lymphozyten gegen B-Zell-Membranbestandteile [ROEP et al. 1995]. Die genaue Ätiologie der beschriebenen Störungen der zellvermittelten Immunität ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

Neben der zellvermittelten Immunität, die beim Typ 1 Diabetiker zur Insulitis und damit letztlich zur Zerstörung der B-Zellen führt, finden sich beim Typ 1 Diabetiker auch Veränderungen im Bereich der humoralen Immunität, denen weniger eine Rolle in der Ätiologie der Insulitis als vielmehr eine wichtige Markerfunktion für das Autoimmungeschehen zugeschrieben wird [BIEG et al 1995, DEAIZPURUA & HARRISON 1992]. Wesentlicher Bestandteil des humoralen Immunsystems sind die Immunglobuline, auch Antikörper genannt, die von Plasmazellen gebildet werden. Plasmazellen entwickeln sich unter Antigenpräsentation, z. B. durch Makrophagen, in der Regel in Anwesenheit von T-Helferzellen (T-Lymphozyten) aus reifen B-Lymphozyten. Die Aktivierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen und somit die Bildung von Antikörpern ist folglich von einer Antigenpräsentation abhängig. Antikörper gehen eine spezifische Bindung mit einem bestimmten Antigen ein. Bestimmten Subgruppen von Antikörpern ist es möglich durch direkte Aktivierung von Komplementfaktoren die mit dem Antigen verbundene Zelle zu schädigen, andere Antikörper „opsonisieren“ die gebundene Zelle zur Phagozytose durch Makrophagen. Bei Typ 1 Diabetikern werden im Vergleich zu gesunden Personen vermehrt Autoantikörper, gerichtet gegen Bestandteile der pankreatischen Inselzelle gefunden: Insulinrezeptorautoantikörper, Insulinautoantikörper (IAA) und die heterogen zusammengesetzte Familie der Inselzellantikörper (ICA).

Insulinrezeptorautoantikörper konnten zum Manifestationszeitpunkt des Typ 1 Diabetes in etwa 40% nachgewiesen werden [MARON et al. 1983]. Insulinautoantikörper (IAA) werden überwiegend in der prädiabetischen- und der Phase der Manifestation des Diabetes gesehen. Sie stellen, insbesondere bei jüngeren Probanden, einen wichtigen und prädiktiven Marker für eine spätere Diabetesentwicklung dar [ROLL et al. 1994, ROLL & ZIEGLER 1997]. Im Erwachsenenalter sind die IAA seltener zu finden und dies sowohl in der prädiabetischen Phase als auch bei Manifestation eines Typ 1 Diabetes.

Die Inselzellantikörper (ICA) repräsentieren eine heterogene Gruppe von Autoantikörpern, deren bisher eindeutig definierte Subgruppen zum einen IA-2 Antikörper und zum anderen GAD Antikörper darstellen. Auch die Antikörperbindung gegen Insulin trägt zu einem geringen Teil zur ICA-Färbung auf den Gefrierschnitten bei. Weitere Subspezifitäten sind Gegenstand laufender Forschungen.

Vor über 20 Jahren wurden erstmals zytoplasmatische Inselzellantikörper (ICA), gerichtet gegen antigene Strukturen der pankreatischen Inselzellen, bei Patienten mit polyendokrinen

Autoimmunerkrankungen beschrieben [BOTTAZZO et al. 1974]. Dies war der erste serologische Hinweis auf eine autoimmune Ätiologie des Typ 1 Diabetes. Inselzellantikörper (ICA) sind organspezifische Antikörper der IgG Klasse, die mit allen endokrinen Zellen des Pankreas reagieren [BOTTAZZO et al. 1976, LENDRUM & WALKER 1976]. In Seren von frisch manifestierten Diabetikern werden sie in 60-90% der Fälle nachgewiesen, in Risikokollektiven wurden erhöhte ICA-Titer als Diabetesprädictoren identifiziert [BINGLEY et al. 1993, BONIFACIO et al. 1990, BRUINING et al. 1987, JOHNSTON et al. 1989, KARJALAINEN 1990, RILEY et al. 1990]. Anhand der Bindungsmuster ICA positiver Seren im indirekten Immunfluoreszenztest (IFT) können ICA zunächst in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die erste und ursprünglich beschriebene ICA-Gruppe zeichnet sich durch ein diffuses zytoplasmatisches Bindungsmuster aus, welches auch Alpha- und Deltazellen einschließt [GENOVESE et al. 1992, TIMSIT et al. 1992]. ICA einer zweiten Gruppe zeigen ein granuläres zytoplasmatisches Färbemuster, welches einer Bindung an B-Zellen entspricht und daher selektiv erscheint. Dieses Muster ist sehr selten und kommt insbesondere bei nichtdiabetischen Patienten mit polyendokrinen Autoimmunerkrankungen vor [BOTTAZZO et al. 1974]. Verschiedene Untergruppen der ICA können auch nach dem Bindungsverhalten der Antikörper auf Pankreasschnitten verschiedener Spezies [RICHTER et al. 1993] differenziert werden. Zum einen kommen Antikörper vor, die auf humanem oder Rattenpankreas, nicht aber auf Mauspankreas binden und ein betazellspezifisches Bindungsmuster innerhalb der Insel aufweisen. Diese Gruppe ist wahrscheinlich mit einem geringeren Risiko zur Diabetesentwicklung verbunden [CHAILLOUS et al. 1994]. Eine andere Untergruppe der ICA erkennt auch murines (Maus-) Pankreas. Diese auf murinem Pankreas bindenden ICA sind nach derzeitiger Erkenntnis enger mit dem Zeitpunkt der Manifestation des Typ 1 Diabetes assoziiert als die nur auf humanem Gewebe bindenden ICA und lassen sich in der überwiegenden Zahl der Patienten mit Typ 1 Diabetes und deren Verwandten ersten Grades nachweisen [GIANINI et al. 1992]. Eine letzte Gruppe von ICA sind nur auf murinem Pankreas positiv. Über die Bedeutung dieser Spezifität ist bisher wenig bekannt.

Trotz der Bedeutung der ICA für die Diagnostik des Typ 1 Diabetes gab es lange Zeit nur wenig Anhaltspunkte über die Identität der ICA bindenden Antigene. Der Arbeitsgruppe um Bonifacio gelang 1995, zeitgleich mit der Gruppe um Christie, die Identifikation des Inselzellantigens ICA512, Tyrosinphosphatase, gegen welches die sogenannten IA-2 Antikörper

gerichtet sind [BONIFACIO et al. 1995, PAYTON et al. 1995]. Dieser Autoantikörper wird bei 60-70% der erstmanifestierten Typ 1 Diabetikern gefunden [BINGLEY et al. 1997, HAWA et al. 1997]. Im Gegensatz zu den im folgenden dargestellten Autoantikörper gegen GAD 65 werden IA-2-Ak weniger häufig bei älteren erstmanifestierten Typ 1 Diabetikern, dafür bei den unter zwanzigjährigen Diabetikern häufiger als GAD 65-Ak nachgewiesen [MORGENTHALER et al. 1997]. Ein weiterer Unterschied besteht in der deutlich höheren Spezifität der IA-2 Ak bezüglich des Typ 1 Diabetes im Vergleich mit anderen Autoimmunerkrankungen wie dem Stiff-Man-Syndrom oder polyendokrinen Autoimmunerkrankungen, bei denen oft GAD 65-Ak und andere ICA beobachtet werden, selten jedoch IA-2 Ak [MORGENTHALER et al. 1997].

Bereits vor der Identifikation des Inselzellantigens 512 wurde ein weiterer Marker des Autoimmungeschehens in der praediabetischen Phase, ein Antikörper gegen ein M_r64.000 Inselzellantigen, entdeckt [BAEKKESKOV et al. 1982, 1987, 1990], welcher bei nahezu 80% der Patienten mit neu aufgetretenem Typ 1 Diabetes gefunden wurde und als Hochrisikomarker für die zukünftige Entwicklung eines Typ 1 Diabetes gilt [BAEKKESKOV et al. 1987, SEISSLER et al. 1992, THIVOLET et al. 1992]. Die Arbeitsgruppe von Baekkeskov konnte im Jahr 1990 das Antigen als einen Abschnitt des Gammaaminobuttersäure synthetisierenden Enzymes Glutamatdecarboxylase identifizieren [BAEKKESKOV et al. 1990]. Glutamatdecarboxylase (GAD) kommt beim Menschen in mindestens 2 Isoformen vor: GAD 65 mit einem Molekulargewicht von 65000 Dalton ist auf Chromosom 10 kodiert und GAD 67 mit einem Molekulargewicht von 67000 Dalton auf Chromosom 2 [KARLSEN et al. 1991]. GAD wird außer in Betazellen auch in Neuronen exprimiert. Während in Neuronen jedoch beide Isoformen vorkommen, findet sich in den Inselzellen des humanen Pankreas nur GAD 65 [CHRISTGAU et al. 1991]. Für die klinisch-immunologische Diagnostik besitzen GAD 67 Antikörper wegen der geringen Prävalenz von etwa 20% in Seren erstmanifestierter Typ 1 Diabetiker [SEISSLER et al. 1993] zur Zeit keine klinisch-diagnostische Relevanz. Dahingegen findet man GAD 65 Antikörper in etwa 70-80% aller neu erkrankten Typ 1 Diabetiker und kann in 70-90% GAD 65 Antikörper bereits Monate bis Jahre vor der Manifestation eines Typ 1 Diabetes nachweisen [CHRISTIE et al. 1990, SEISSLER et al. 1993]. Nach übereinstimmender Ansicht stellt GAD 65 eines der primären Zielantigene bei der

autoimmunen Insulinitis dar, weshalb diesem Enzym und der dagegen gerichteten Immunantwort eine wesentliche Rolle bei der Entstehung des insulinabhängigen Diabetes mellitus zugeschrieben wird.

In der Literatur fanden sich nur vereinzelt Beschreibungen über die langjährige Persistenz humoraler Autoimmunphänomene [SEISSLER et al. 1993]. Insbesondere GAD 65 Ak ließen sich auch nach längerer Diabetesdauer in einem Teil der Patienten nachweisen. So konnte Kawasaki [KAWASAKI et al. 1994] in einem Kollektiv von 46 Langzeit-Typ 1 Diabetikern in 61% GAD 65 Ak nachweisen, ICA jedoch nur in 24% der Fälle. Rowley fand 1992 in einem Kollektiv von 54 Langzeit-Typ 1 Diabetikern ebenfalls mit 59% GAD 65 Ak positiven Patienten einen überraschend hohen Anteil GAD 65 Ak positiver Fälle, wobei die Diskrepanz zum Nachweis von nur 13% ICA positiver Langzeit-Typ 1 Diabetiker sehr deutlich war [ROWLEY et al. 1992].

Auch wir konnten in einer nicht veröffentlichten Pilotstudie bei Langzeit-Typ 1 Diabetikern mit einer Dauer der Erkrankung von über 10 Jahren immer noch in etwa einem Drittel der Patienten erhöhte GAD 65 Antikörpertiter messen. Die genaue Charakterisierung der persistierenden humoralen Autoimmunantwort bei Langzeit Typ 1 Diabetikern ist auch unter dem Aspekt der Weiterentwicklung neuer Therapieformen des Typ 1 Diabetes, wie zum Beispiel der Inselzelltransplantation, von Interesse. Derzeit stellen Langzeit Typ 1 Diabetiker die Patientenzielgruppe für eine mögliche Inselzelltransplantation dar [BRETZEL et al. 1993]. In Pilotstudien an kleineren Untersuchungskollektiven hat unsere Arbeitsgruppe zeigen können, daß die humoralen Autoimmunphänomene nur zu einem geringen Teil durch Immunsuppression beeinflußt werden [JAEGER et al. 1996], und Patienten mit positiven Antikörperbefunden ein frühzeitigeres Inseltransplantatversagen aufweisen [JAEGER et al. 1997]. Persistierende Autoimmunität, auch nach 20 oder mehr Krankheitsjahren, scheint potentiell zusätzlich zur allogenen Fremderkennung das Überleben des Inseltransplantates im Sinne von „disease recurrence“ zu gefährden. Die vorliegende Studie an dem bisher größten Kollektiv von Langzeit Typ 1 Diabetikern vor geplanter Inselzelltransplantation soll daher neben den unten im einzelnen aufgeführten Fragestellungen die Ausgangsdaten für weiterführende Studien zur Thematik im Zusammenhang mit „disease recurrence“ liefern.

Ätiologisch ist die Persistenz der Autoantikörper unklar. Weshalb ICA und GAD 65 bei Erstmanifestation des Typ 1 Diabetes in einem ähnlich hohen Prozentsatz der Fälle vorliegen und nach Jahren ICA wesentlich seltener als GAD 65 Ak zu finden sind bleibt ebenfalls offen. Das Fortbestehen der Phänomene humoraler Immunität, einschließlich bekannter Untersuchungen über das Vorliegen von ICA bei einem Teil der Langzeit Typ 1 Diabetiker, [NAKANISHI et al. 1990, THEOPANIDES et al. 1978, ROWLEY et al. 1992] macht einen kontinuierlichen antigenen Stimulus als Grundlage der persistenten Immunantwort wahrscheinlich. So wäre vorstellbar, daß eine geringe Menge von sezerniertem C-Peptid ein Hinweis auf Syntheseleistungen der B-Zelle ist, in deren Rahmen auch das in der Inselzelle gebildete Enzym GAD 65 immunogen wirkt und die Bildung von GAD 65 Ak triggert. ICA könnten nach dem gleichen Mechanismus, über eine andere dargebotene Peptidstruktur stimuliert werden. Denkbar ist darüber hinaus die Freisetzung von GAD 65 aus, im Rahmen einer Neuropathie, geschädigten extrazerebralen Neuronen. Auch das Vorhandensein bestimmter MHC Merkmale, die im Rahmen der Antigenpräsentation und somit in der Initiation der Insulitis eine wesentliche Rolle spielen, sollte auf eine Assoziation zur Persistenz der humoralen Immunmarker GAD 65 Ak und ICA untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit sollen daher folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ergeben sich Hinweise dafür, daß eine bei Langzeit Typ 1 Diabetikern bekannte geringe, nicht stoffwechselwirksame Sekretion von C-Peptid [HENDRIKSEN et al. 1977, NAKANISHI et al. 1990], auch als residuale Beta-Zellfunktion bezeichnet, gehäuft bei Patienten mit positiven GAD 65 Antikörpertitern oder positiven ICA auftritt? Dies könnte der residualen Beta-Zellfunktion eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Immunantwort bei Langzeit Typ 1 Diabetikern zuweisen.
2. Besteht ein Zusammenhang zwischen GAD 65 Antikörperpersistenz und autonomer oder peripherer Neuropathie? Möglicherweise stellt der Prozeß der neuronalen Destruktion bei dem Vorliegen einer Neuropathie, der mit der Freisetzung von GAD 65 aus extrazerebralen Neuronen einhergehen könnte [ERDO & WOLF 1990] einen persistierenden antigenen

Stimulus dar. Kaufmann et al. fanden bereits 1992 in einer sehr kleinen Gruppe von Langzeit Typ 1 Diabetikern bei Patienten mit einer Neuropathie gehäuft erhöhte GAD 65 Antikörpertiter [KAUFMANN et al. 1992].

3. Besteht ein Zusammenhang zwischen GAD 65 und ICA Antikörperpersistenz und den bei den Langzeit Typ 1 Diabetikern vorhandenen HLA Klasse II-Merkmalen, denen eine Regulationsfunktion in der humoralen Immunantwort gegen Inselzellantigene bei Typ 1 Diabetikern zugeschrieben wurde [DELAMAIRE et al. 1995]?

4. Lassen sich an dem vorliegenden, bisher größten zur Frage der Prävalenz von GAD 65 - und ICA Antikörpern untersuchten Patientenkollektiv von Langzeit Typ 1 Diabetikern die aus Pilotstudien bekannten Ergebnisse zur Prävalenz, zur Geschlechtsverteilung und zur Diabetesdauer bestätigen?

2. KOLLEKTIVE UND METHODEN

2.1 Patienten

Es wurden 105 insulinabhängige Langzeit-Diabetiker eingeschlossen. Die Patienten wurden im Rahmen des Giessener Screening-Programmes für eine mögliche Inselzelltransplantation in den Jahren 1992-1995 rekrutiert. Einschlusskriterien bestanden in einem gesicherten Typ 1 Diabetes nach WHO Kriterien [NATIONAL DIABETES DATA GROUP 1979, WHO 1980], der sich vor dem 30. Lebensjahr manifestierte und unmittelbar insulinpflichtig war sowie in einer Erkrankungsdauer von länger als 10 Jahren. Der Median des Alters liegt bei 36 Jahren (Spanne 20-60 Jahre), der Median der Dauer des Diabetes bei 21 Jahren (Spanne 10-46). Der Anteil an Frauen beträgt 54%.

Als positive Kontrollgruppe für die Etablierung des GAD 65 Antikörper-Assay wurden Seren von 100 Patienten mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes analysiert, die zum Zeitpunkt der Erstmanifestation in unserer Klinik ambulant oder stationär behandelt wurden. Einschlusskriterium war auch in dieser Gruppe ein gesicherter Typ 1 Diabetes mit Erstmanifestation vor dem 30. Lebensjahr. Der Median des Alters lag bei 21 Jahren (Spanne 13-28 Jahre), der Anteil an Frauen bei 44%.

Die Gruppe gesunder Kontrollpersonen als Negativkontrolle umfasste 100 Probanden. Einschlusskriterium war hier eine negative Familienanamnese für Diabetes mellitus unter den Verwandten ersten Grades. Der Median des Alters lag bei 33 Jahren (Spanne 18-55 Jahre), der Anteil an Frauen bei 47%.

Tabelle 1 Charakterisierung der Kollektive

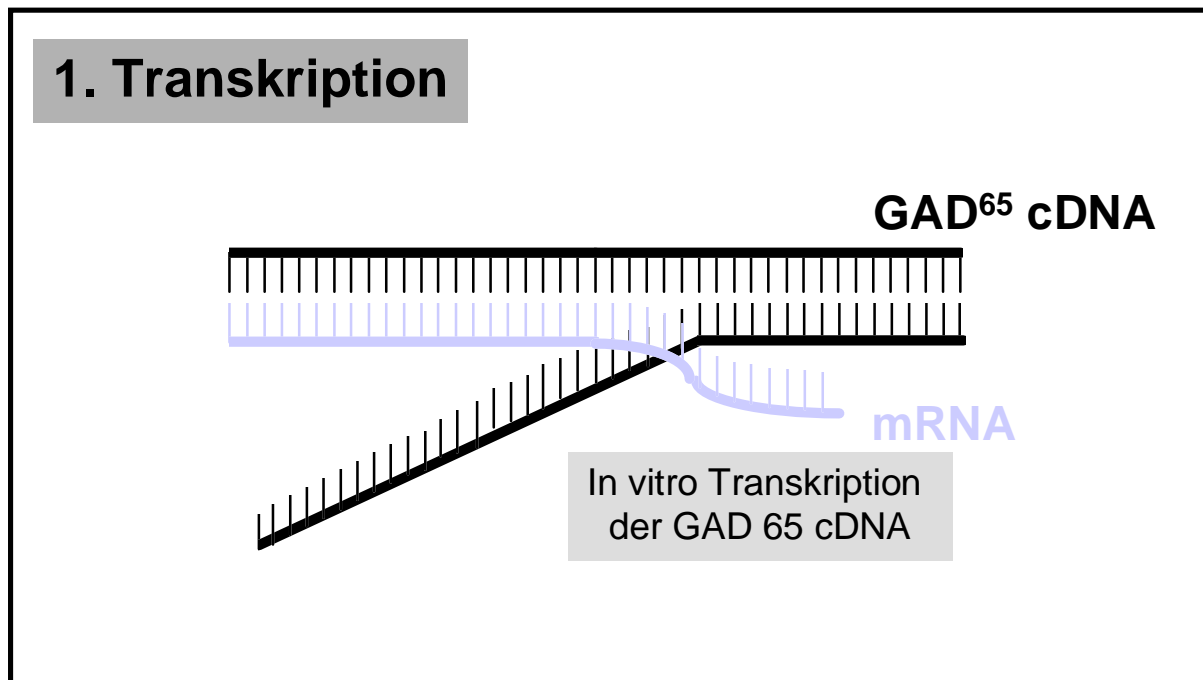
	Kontrollgruppe	neu manifestierte IDDM	Langzeit IDDM
Anzahl (n)	100	100	105
Alter Median (Spanne) in Jahren	33 (18-55)	21 (13-28)	36 (20-60)
Frauen (n)	47	44	57
Diabetesdauer Median (Spanne)	-	-	21 (10-46)

2.2 Humorale Immunmarker

2.2.1 Immunpräzipitationstest zur Bestimmung der GAD 65 Antikörper

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde der GAD 65-Ak-Assay nach dem von Petersen und Mitarbeitern publizierten Protokoll [PETERSEN et al. 1994] im immunologischen Labor der Medizinischen Klinik III etabliert. Es handelt sich um einen Immunpräzipitationstest, bei dem das zuvor in vitro hergestellte Antigen radioaktiv markiert wird und so eine quantitative Analyse durch Messung der Radioaktivität der mit den Antikörpern aus dem Serum der Patienten entstandenen Immunkomplexe gestattet. Die benötigte cDNA wurde von Novo Nordisk A/S Denmark zur Verfügung gestellt. Es folgt die Beschreibung des Testablaufes im Einzelnen:

Abb. 1



I. Transkription

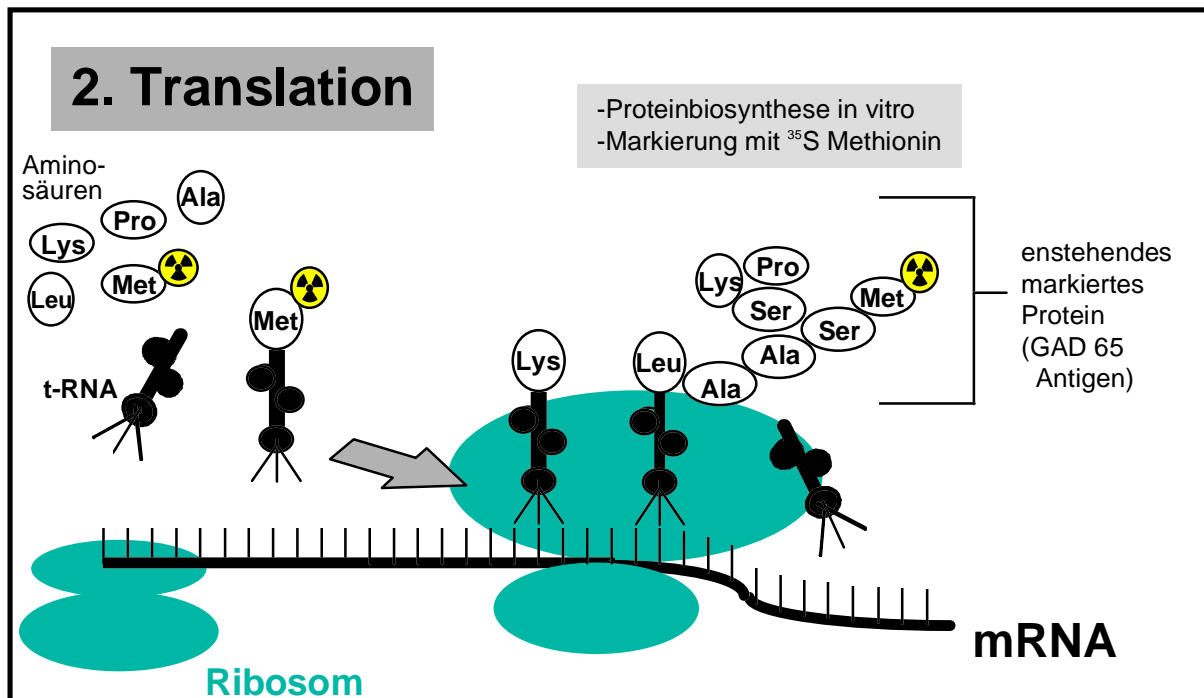
Zunächst wird die Aufbereitung des Nucleotidgemisches auf Eis mittels Pipettieren von jeweils 1 Volumen der 10mM ATP, GTP, UTP, CTP Vorratslösung (Promega Corporation, Madison, USA) in ein steriles Eppendorf-Gefäß (1Vol. = 2,2µl; d.h. Endvolumen 8,8µl) bei Raumtemperatur vorgenommen. Dann wird die lyophilisierte cDNA (kodiert GAD 65) in einem vorgegebenen Volumen aqua dest verdünnt (Konzentration 0.8 µg/µl). Die folgenden

Komponenten sind bei Raumtemperatur in der Reihenfolge der Auflistung in ein steriles Eppendorf-Gefäß zu geben.

- transcription 5x buffer	4.40 µl (Promega Corporation, Madison, USA)
- 100 mM DTT	2.20 µl (Promega Corporation, Madison, USA)
- RNAsin ribonucl. inhibitor (40 u/1µl)	0.55 µl (Promega Corporation, Madison, USA)
- Nucleotidgemisch	4.40 µl (Promega Corporation, Madison, USA)
- linearized template DNA(von Novo)	1.10 µl (Novo Nordisk A/S Denmark)
- T7 polymerase (15-20 u/1µl)	1.10 µl (Promega Corporation, Madison, USA)
- nuleasefreies H ₂ O	8,25 µl (Promega Corporation, Madison, USA)
ENDVOLUMEN	22.0 µl

Nach einem kurzen Mischvorgang erfolgt die Inkubation des Gemisches über 60 min. bei 37 - 40 °C

Abb. 2



II. Translation

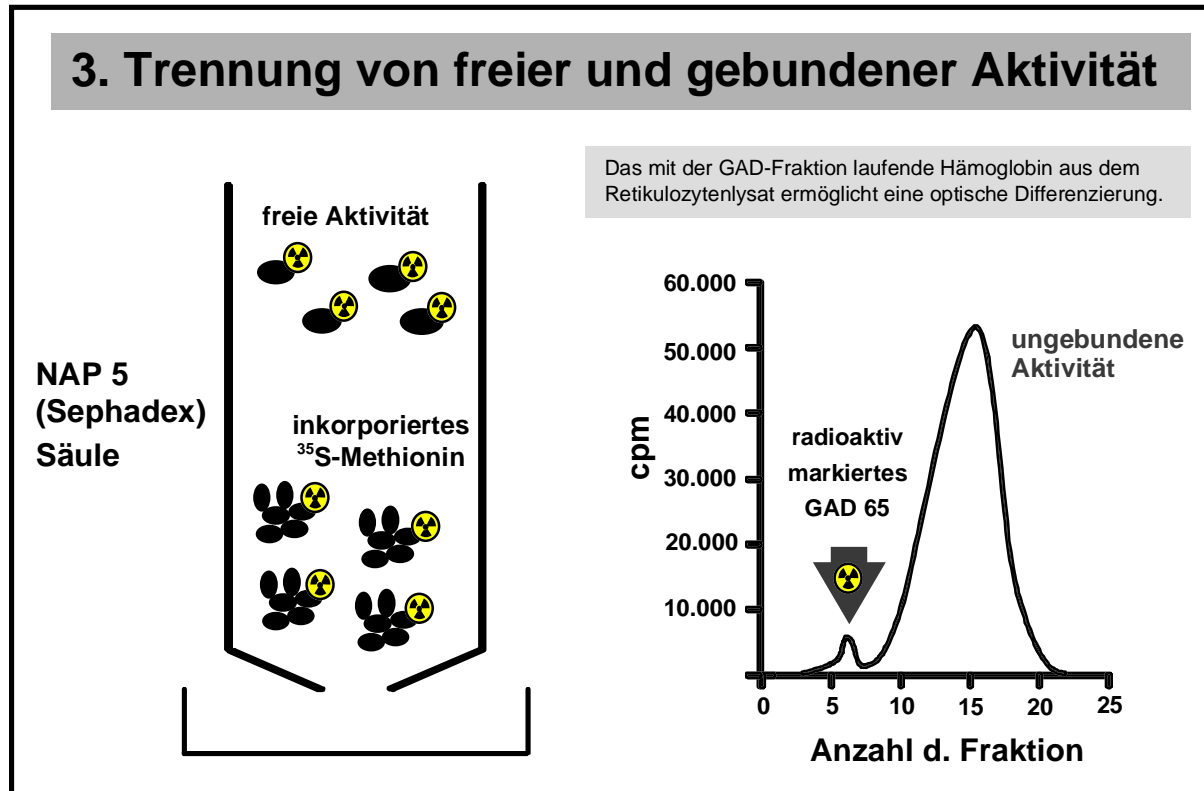
Folgende Reagenzien einschließlich des bereits gewonnenen RNA-Substrates sind in ein steriles 1,5 ml Eppendorf Gefäß zu pipettieren:

- Nuclease treated Lysate	35µl (Promega Corporation, Madison,USA)
- H ₂ O (nucleasefrei)	7µl (Promega Corporation, Madison, USA)
- RNAsin ribonuclease inhibitor 40u/1µl	1µl (Promega Corporation, Madison, USA)
- 1nM amino acid mixture (ohne Methionin)	1µl (Promega Corporation, Madison, USA)

- RNA Substrat in H₂O 4µl (Promega Corporation, Madison, USA)
- ³⁵S-Methionin(1200 Ci/mmol) bei 10 mCi/ml 2µl (Promega Corporation, Madison, USA)
- ENDVOLUMEN 50µl

Unter Beachtung der entsprechenden Strahlenschutzvorschriften wird eine Inkubation bei 30°C für 60 Minuten in einem Bleigefäß vorgenommen.

Abb. 3

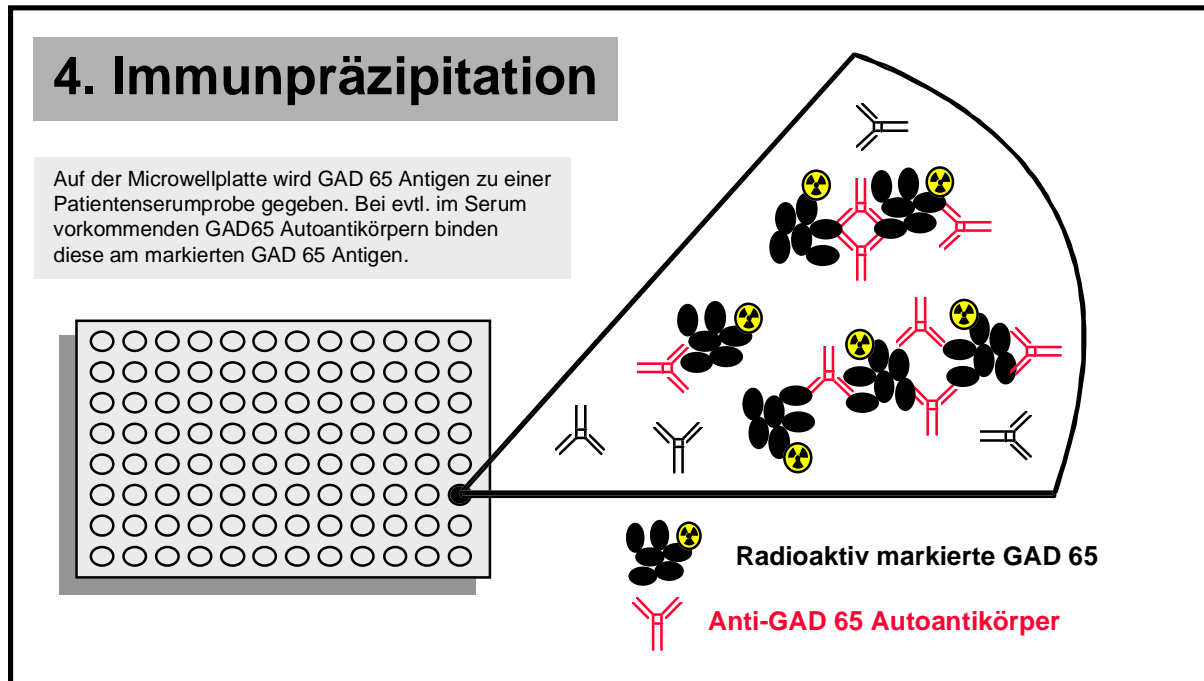


III. Trennung von freier und gebundener Aktivität

Nach der Inkubation wird das Translationsprodukt über eine Sephadex Säule (NAP 5 Column, Pharmacia, Upsala) von der ungebundenen Aktivität getrennt. Nach dem Waschen der Säule mit TBST-Puffer (150mM NaCl; 50mM TRIS-Puffer pH 7,4; 0,1% TWEEN 20) wird die GAD 65 enthaltende Fraktion eluiert, indem das mit 100µl TBST-Puffer versetzte Translationsgemisch (50µl) auf die Oberfläche der Säule gegeben und durch Zugabe von 1ml TBST-Puffer aus der Säule gespült wird. Die aus dem Retikulozytenlysat stammende, an der roten Farbe zu erkennende Hämoglobinfraktion läuft zeitgleich mit der GAD 65 Fraktion durch

die Säule. Die rötlich gefärbte Fraktion wird im Eppendorf Gefäß aufgefangen (~ 10 Tropfen). So erhält man etwa 350µl der GAD 65 enthaltenden Fraktion.

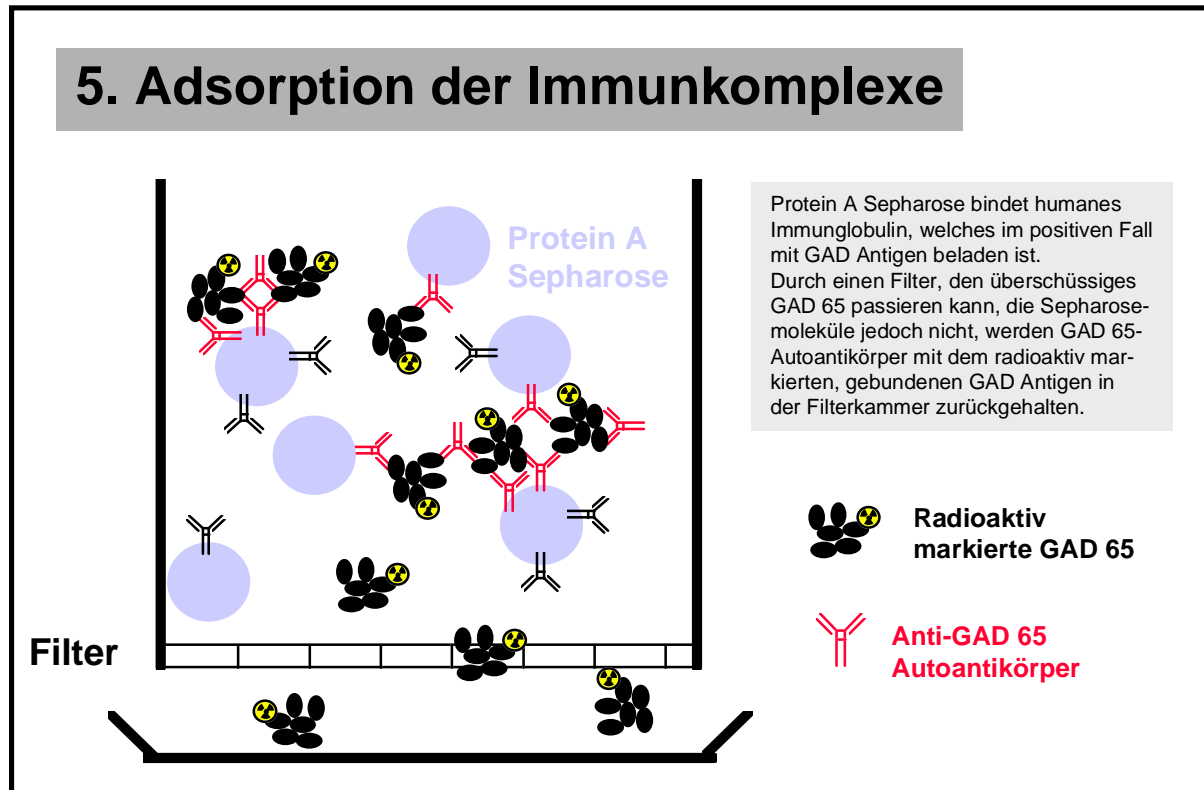
Abb.4



IV. Immunpräzipitation

Jedes zu messende Patientenserum (2µl) wird in jeweils 3 Vertiefungen der 96-Loch Microwell Platte (Millipore Corporation, Bedford, USA) eingegeben. Zusätzlich werden eine bekannte Positivkontrolle, 5 Negativkontrollen sowie Protein A Sepharose ohne Zusatz von Serum aufgebracht. Pro Vertiefung werden zu den Seren 3,5µl Translationsgemisch, in 47µl TBST-Puffer verdünnt, gegeben. Danach wird über 12 Stunden bei 4°C auf einer Rüttelplatte inkubiert. Eventuell im Patientenserum vorhandene GAD 65-Antikörper können Immunkomplexe mit dem radioaktiv markierten Antigen bilden.

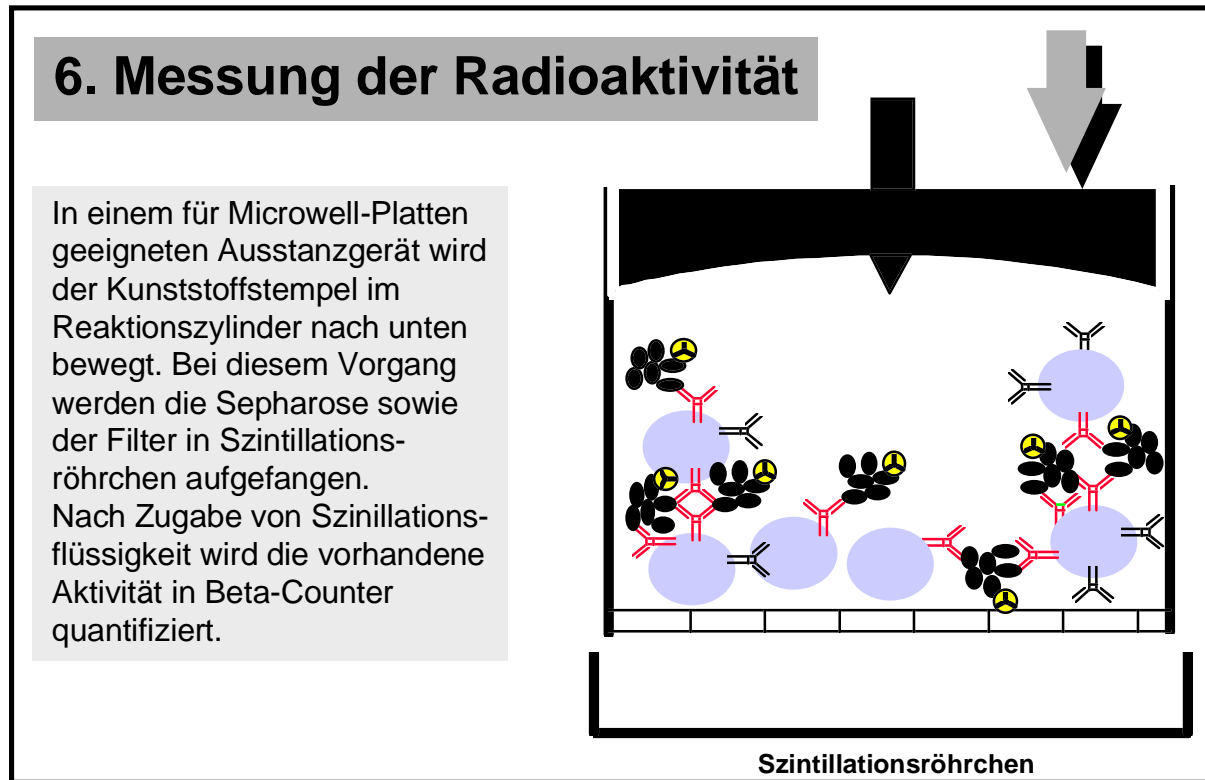
Abb.5



V. Adsorption der Immunkomplexe

Nach der Inkubation werden 7.5mg Protein-A-Sepharose (Pharmacia Biotech, Sweden) verdünnt in 100µl TBST-Puffer in jede Vertiefung der Microwell-Platte, zu den Patientenseren, pipettiert. Nach erneuter Inkubation bei 4 °C für 2 h auf der Rüttelplatte werden alle Proben auf Millipore Filter-Platten (Millipore Corporation, Bedford, USA) aufgebracht. Beim Vorhandensein von GAD 65-Ak werden diese samt gebildeter Immunkomplexe an Protein-A-Sepharose gebunden und können die Membran der Millipore Filter-Platten nicht passieren.

Abb. 6



VI. Messung der Radioaktivität

Nach 10-facher Spülung der Millipore Filter-Platten mit TBST-Puffer werden die Filterplättchen ausgestanzt und in Gefäßen mit Szintillationsflüssigkeit (Liquid Scintillator Aquasafe 300 plus von ZINSSER) aufgefangen. Jede Probe wird dreimal je eine Minute im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen, die Radioaktivität der β -Strahler in counts per minute (CPM) quantifiziert.

Die Quantifizierung der Antikörper erfolgt in GAD 65-Ak Index-Werten:

$$\text{GAD 65 Ak-Index} = \frac{\text{cpm [unbekannte Probe]} - \text{cpm [Negativstandard-Serum]}}{\text{cpm [Positivstandard-Serum]} - \text{cpm [Negativstandard-Serum]}}$$

2.2.2 Nachweis von ICA durch Immunfluoreszenztechnik

Die Bestimmung der ICA (islet cell antibodies) wird nach der Methode von Bonifacio vorgenommen [BONIFACIO et al. 1990]. Hierbei werden 5µm dicke humane Pankreas-Gefrierschnitte der Blutgruppe 0 nach Fixierung mit Aceton mit 20µl unverdünntem Serum beschichtet und 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Schnitte mit PBS-Puffer (bestehend aus: 40g/l NaCl, 5,75g/l Na₂HPO₄, 1g/l KH₂PO₄, 1g/l KCl; pH 7,4) gewaschen und leicht angetrocknet. Zur Detektion der gebundenen Immunkomplexe werden die Schnitte mit 20µl eines 1:50 mit PBS-Puffer verdünnten Fluoreszenzkonjugierten Schaf-Antikörpers gegen humanes IgG (Anti-human IgG, FITC goat; ATAB, Stillwater, MN) überschichtet und 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS werden die Objektträger gesäubert, getrocknet und mit Eindeckmedium gedeckt. Unter dem Fluoreszenz-Mikroskop wird bei grüner Färbung der Inselzellen ein positiver Antikörperbefund notiert. Die Semiquantifizierung in Titerstufen erfolgt durch Verdünnung mit einem standardisierten Referenzserum bis keine Fluoreszenz mehr nachweisbar ist. Die Ergebnisse werden in „Juvenile Diabetes Foundation Units“ (JDF-U) angegeben. In der vorliegenden Arbeit wurden ICA Werte ≥ 10 JDF-U als positiv gewertet. Prüfungen zur Qualitätssicherung werden regelmäßig im Rahmen des „IDW proficiency workshop“ vorgenommen. Im 9.IDW proficiency workshop wurden eine 100%ige Sensitivität und Spezifität erzielt.

2.2.3 HLA Typisierung

Von 86 Patienten wurde der HLA (human leukocyte antigen) - Status bestimmt. Es bestehen keine wesentlichen Unterschiede in den klinischen Merkmalen im Vergleich zu den 19 Patienten deren HLA-Status nicht vorliegt. So liegt der Median der Diabetesdauer der Patienten mit vorliegendem HLA-Status bei 21,5 Jahren, bei den Patienten ohne vorliegenden HLA-Status bei 21 Jahren. Der Median des Alters differiert nur um 2 Jahre, die Verteilung der Geschlechter variiert leicht (s. Tabelle 2).

Tabelle 2 Übereinstimmung der Patienten mit und ohne HLA-Status

Anzahl n der Messungen	Pat. mit bekanntem HLA-Status (n=86)	Pat. mit unbekanntem HLA-Status (n=19)
Frauen	42 (49%)	7 (37%)
Alter (Median)	35	37
Diabetesdauer (Median)	21,5	21

Wir bestimmten folgende Konstellationen von HLA-DR Merkmalen:

1. Gemeinsames Vorkommen von HLA DR 3 und 4 (=HLA DR3/4)
2. Vorkommen von HLA DR 3 ohne HLA DR 4 (=HLA DR3/X)
3. Vorkommen von HLA DR 4 ohne HLA DR 3 (=HLA DR4/X)
4. Fehlen der Merkmale HLA DR 3 und 4 , jedoch anderes HLA DR Merkmal vorhanden (=HLA DR X/X)

Die Typisierung wurde in der Abteilung für Immunhämatologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Zur Anwendung kam ein standardisierter Mikrozytotoxizitätstest [TERASAKI et al. 1978]. Dieser sogenannte „microdroplet lymphocyte cytotoxicity test“ wurde bereits 1964 von Terasaki eingeführt und ist weltweit Methode der Wahl zur Bestimmung von HLA-Antigenen. Mit diesem Verfahren gelingt der serologische Nachweis von HLA Antigenen auf Lymphozyten.

In die Vertiefungen der „Mikrozytotoxizitätsplatten“ wird zunächst ein Mikroliter Antiserum pipettiert, wobei verschiedene Antiseren mit definierter Spezifität, z. B. anti HLA B8, verwendet werden. Anschließend fügt man einen Mikroliter einer vom zu testenden Probanden aus Frischblut gewonnenen Suspension lebender Lymphozyten hinzu. Nach 30 Minuten Inkubation kommen in jede Vertiefung noch fünf Mikroliter Kanninchenserum als Komplementquelle. Nach 60 Minuten werden drei Mikroliter einer Eosinlösung zupipettiert und weitere zwei Minuten später acht Mikroliter einer 35%igen Formalinlösung zur Fixierung der Zellen. Das Ergebnis wird mit einem Umkehrmikroskop im Phasenkontrastverfahren betrachtet. Lysierte Zellen, deren HLA Merkmale vom entsprechenden Serum „erkannt“ wurden sind dunkel gefärbt und angeschwollen, dagegen leuchten die nichtlysierten

Lymphozyten in der Probe unten hell auf und sind kleiner (negatives Ergebnis). Durch das hinzugefügte Formalin bleibt das Ergebnis 24 Stunden ablesbar.

2.3 Bestimmung der residualen Beta-Zellfunktion

Die Blutentnahme zur Bestimmung der C-Peptid-Konzentrationen erfolgte morgens, nachdem die Patienten in der Nacht zuvor nüchtern geblieben waren und 6 Minuten nach intravenöser Stimulation mit 1mg Glucagon. Der Test wurde nur durchgeführt wenn der Nüchternglucosespiegel zwischen 80-160mg/dl lag. Eine residuale Beta-Zell-Funktion wurde diagnostiziert, wenn nach intravenöser Applikation von Glucagon ein signifikanter Anstieg der C-Peptid Werte gemessen werden konnte. Die Positivschwelle wurde in Übereinstimmung mit den von Hendriksen veröffentlichten Kriterien [HENDRIKSEN et al. 1977] festgelegt. Ein signifikanter C-Peptid Anstieg wurde nach diesen Kriterien bei einem Überschreiten des 3-fachen intra-Assay Variationskoeffizienten (10,2%) im Vergleich zum nüchtern-C-Peptidspiegel angenommen.

Auch andere Autoren postulierten Kriterien zur Beurteilung der B-Zell Funktion. Nakanishi et al. modifizierten die Kriterien nach Hendriksen und stimulierte mittels des oralen Glucose-Toleranztestes (oGTT), nahm als Positivschwelle jedoch auch einen Anstieg um den dreifachen Variationskoeffizienten über den Mittelwert der Nüchternmessungen an [NAKANISHI et al. 1990]. In deren Publikation lag der dreifache Variationskoeffizient der Nachweismethode von C-Peptid bei 28,5%.

Der Intra-Assay Variationskoeffizient für niedrig positive Werte betrug in unserem Test (H. Biermann GmbH, Diagnostic Product Corporation, Bad Nauheim, Germany) 3,4%, der inter-Assay Variationskoeffizient für niedrig positive Werte lag bei 10,0%. Das Detektionslimit lag bei 0,05ng/ml. Bei dem verwendeten Verfahren handelt es sich um einen kompetitiven Radioimmunoassay. Proben, Kontrollen und Standards wurden mit ¹²⁵I (Iod) markiertem C-Peptid und dem spezifischen, polyklonalen Antiserum inkubiert. Der Test basiert nun auf der Konkurrenz zwischen dem nichtmarkierten C-Peptid der Proben und dem ¹²⁵I markiertem C-Peptid des Tracers um die limitierte Anzahl von Bindungsstellen der spezifischen Antikörper. Nach Einstellung eines dynamischen Gleichgewichtes werden freie und gebundene Antigene getrennt. Dies erfolgt durch Ausfällung der entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe

mittels eines zweiten Antikörpers in Verbindung mit Polyethylenglykol (PEG) und nachfolgender Zentrifugation. Daraufhin werden die ungebundenen Reaktionspartner durch Dekantieren eliminiert, bevor die Menge gebundener Radioaktivität im Gammazähler gemessen wird. Die gemessenen „counts“ sind der C-Peptid-Konzentration in den Proben indirekt proportional. Die Konzentrationen der unbekanntenen Proben werden aus den erstellten Standardkurven extrapoliert.

2.4 Diagnostik der peripheren und autonomen Neuropathie

Unter der diabetischen Neuropathie versteht man eine klinisch manifeste oder subklinische Erkrankung, die im Rahmen des Diabetes mellitus auftritt und auf keine anderen Ursachen einer peripheren Neuropathie zurückzuführen ist. Die Neuropathie umfaßt Manifestationen im Bereich der somatischen und/oder autonomen Anteile des peripheren Nervensystems [CONSENSUS STATEMENT: SAN ANTONIO CONFERENCE ON DIABETES NEUROPATHY 1988]. Die diabetische Neuropathie wird als die häufigste Neuropathieform in den westlichen Industrieländern angesehen [GREENE et al. 1990] und trägt als essentieller Faktor zur Pathogenese des diabetischen Fußes bei [BOULTON 1990]. Die Beteiligung des autonomen Nervensystems kann mit einer erhöhten Mortalität einhergehen und hat häufig eine erektile Impotenz sowie schwerwiegende physische Beeinträchtigungen wie orthostatische Hypotonie, Stuhlinkontinenz oder Blasenlähmung und zum Teil lebensbedrohliche Komplikationen wie den stummen Myokardinfarkt oder plötzlichen Tod zur Folge [ZIEGLER & GRIES 1994]. Da eine Klassifikation der diabetischen Neuropathie nach pathogenetischen Gesichtspunkten noch nicht möglich ist erfolgt die Einteilung der verschiedenen Organmanifestationen nach klinischen Kriterien. Eine im klinischen Alltag praktikable Klassifikation wurde von Thomas [THOMAS & ELIASSON 1986] vorgeschlagen:

Klassifikation der diabetischen Neuropathie

1. Symmetrische Polyneuropathien

- Sensible oder sensomotorische Polyneuropathie
- Akute oder subakute motorische Neuropathie
- Autonome Neuropathie

2. Fokale und multifokale Neuropathien

- Kraniale Neuropathie
- Mononeuropathie des Stammes und der Extremitäten
- Proximale motorische Neuropathie (Synonyme: diabetische Amyotrophie, lumbosakrale Plexusneuropathie)

Die häufigste Form der diabetischen Neuropathie ist die vorwiegend sensible, symmetrisch-distale Polyneuropathie. Sie manifestiert sich insbesondere in den distalen Abschnitten der unteren, nicht selten aber auch der oberen Extremitäten mit typischen Schmerzen, Parästhesien, Hyperästhesien und Taubheitsgefühl. Typisch ist die nächtliche Exazerbation der Beschwerden sowie ihre Besserung beim Gehen. Klinisch fallen unter anderem abgeschwächte oder fehlende Muskeldehnungsreflexe, Sensibilitätsstörungen, Pallhypästhesie und herabgesetzte Thermästhesie sowie verlangsamte Nervenleitgeschwindigkeit auf.

Deutlich seltener sind die fokalen und multifokalen Neuropathien mit asymmetrischen Ausfällen einzelner oder mehrerer Hirnnerven, thorakoabdominaler Nervenwurzeln und peripherer Nerven. In diese Kategorie miteinbezogen werden darüberhinaus die Syndrome der diabetischen lumbosakralen „Plexus Neuropathie“ (Amyotrophie) mit plötzlich auftretenden heftigen Schmerzen und Paresen (M. quadrizeps) und der sehr viel selteneren „Plexus-Brachialis-Neuropathie“ [GREENE et al. 1990].

Die autonome diabetische Neuropathie (ADN) manifestiert sich durch vielfältige Funktionsstörungen, die häufig keine Symptome verursachen. Prinzipiell kann jedes autonom innervierte Organ von der ADN betroffen sein. Sie kann in eine subklinische ADN, die nur durch Tests diagnostiziert wird und in eine klinische ADN, die mit Symptomen einhergeht eingeteilt werden. Geordnet nach Organsystemen können folgende Manifestationen einer

autonomen diabetische Neuropathie gefunden werden [PROCEEDINGS OF A CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE 1992]:

Kardiovaskuläres System

- Ruhetachykardie, Reduktion der Herzfrequenzvariabilität und der zirkadianen Frequenz- und Blutdruckrhythmik, schmerzarme Myokardischämien bzw. Infarkte, orthostatische Hypotonie, verminderte Belastungstoleranz.

Respiratorisches System

- Zentrale Fehlregulation der Atmung mit herabgesetztem Atemantrieb gegenüber Hyperkapnie bzw. Hypoxämie.

Gastrointestinaltrakt

- Störungen der Ösophagusmotilität, diabetische Gastroparese, Gallenblasenatonie, diabetische Enteropathie (Diarrhoe), Hypomotilität des Kolons (Obstipation), anorektale Dysfunktion (Inkontinenz).

Urogenitaltrakt

- Diabetische Zystopathie (Blasenentleerungsstörung), erektile Impotenz, retrograde Ejakulation.

Thermoregulation

- Störungen der Sudorimotoren (distale Hypo- oder Anhidrose, „gustatorisches Schwitzen“) und Vasomotoren (Vasodilatation, arteriovenöse Shunts, neuropathisches Ödem).

Pupillenmotorik

- Pupillenreflexstörungen, verminderte Dunkeladaptation.

Neuroendokrines System

- Hypoglykämieassoziierte Dysfunktion (Reduktion oder Fehlen der hormonellen Gegenregulation und Hypoglykämiewahrnehmung), verminderte Katecholaminsekretion unter orthostatischer und körperlicher Belastung.

Tests zur Diagnostik einer autonomen diabetischen Neuropathie sollen für Untersucher und Untersuchten einfach durchführbar sein, eine hohe Sensitivität und Spezifität zeigen sowie nicht invasiv und gut reproduzierbar sein [GENOVELY & PFEIFFER 1988]. Für die heute übliche Messung der Herzfrequenzvariabilität sind diese Anforderungen erfüllt, weshalb auch

in der vorliegenden Arbeit die Diagnose der autonomen diabetischen Neuropathie aufgrund der Ergebnisse einer computergestützten Testbatterie (Fa. Proscience/Linden) zur Herzfrequenzvariabilität unter verschiedenen Bedingungen gestellt wurde.

Die Untersuchung der Herzfrequenzvariabilität kann mit der Standardanalyse im Zeitbereich sowie mit Hilfe der Spektralanalyse im Frequenzbereich erfolgen. Mit der Spektralanalyse können die einzelnen Periodizitäten, aus denen sich biologische Rhythmen zusammensetzen, charakterisiert werden. Diese Methode erlaubt eine Auftrennung der Herzfrequenzvariabilität in ihre verschiedenen Komponenten, das heißt in sinusoidale Funktionen von unterschiedlicher Frequenz. Hierdurch kann der jeweilige sympathische und parasympathische Einfluß auf das Herz weitgehend getrennt quantifiziert werden [AKSELROD et al. 1981]. Das Leistungsspektrum der Herzfrequenzvariabilität besteht im wesentlichen aus drei Peaks, die im niedrigen, mittlerem und hohen Frequenzbereich anzusiedeln sind. Das Leistungsspektrum im Niederfrequenzband wird überwiegend durch das sympathische Nervensystem beeinflusst. Die mittelfrequente Herzfrequenzvariabilität wird durch das parasympathische und das sympathische System vermittelt, während die hochfrequente Herzfrequenzvariabilität parasympathisch beeinflusst wird. Da die spektralanalytische Untersuchung der Herzfrequenzvariabilität unter Ruhebedingungen durchgeführt wird, hat sie den Vorteil, daß sie keine aktive Mitarbeit des Patienten erfordert. Bei der Beurteilung der Herzfrequenzvariabilität sind physiologische Einflußgrößen wie Alter, Herzfrequenz, Atemfrequenz, Blutdruck, Gewicht, Körperposition, Tageszeit und Nahrungsaufnahme zu berücksichtigen. Als pathophysiologische diabetesunabhängige Einflußfaktoren sind Streßzustände, Dehydratation, Genußmittel (Kaffee, Nikotin), Herz- Kreislaufwirksame Pharmaka, kardiale Erkrankungen sowie primäre und sekundäre Formen der autonomen Dysfunktion (Alkoholismus, Urämie, Vitamin B12-Mangel, Malignome, AIDS) zu beachten. Um akute Einflüsse auszuschalten, sollten vor Durchführung der autonomen Funktionsdiagnostik innerhalb von acht Stunden keine Hypoglykämie und innerhalb der letzten fünf Tage keine ketotische Stoffwechsellage vorgelegen haben.

Die Testbatterie umfaßte fünf Parameter:

1. Herzfrequenzvariabilität in Ruhe (Standard- und Spektralanalyse)
2. Herzfrequenzvariabilität unter tiefer Respiration (Expirations-/Inspirations-Quotient)

3. Herzfrequenzvariabilität nach dem Aufstehen (Maximum/Minimum 30:15-Quotient)
4. Herzfrequenzvariabilität während des Valsalva-Manövers
5. Blutdruckreaktion im Orthostase-Test

Wenn in drei oder mehr der Untersuchungen der Testbatterie die von Ziegler publizierten Grenzwerte [ZIEGLER & GRIES 1994] überschritten wurden erfolgte die Diagnose einer autonomen Neuropathie.

Die Diagnose einer peripheren Neuropathie wurde nach der klinisch-neurologischen Untersuchung einschließlich Reflexstatus, Vibrations- und Temperaturempfinden sowie der Kontrolle nach Ulzera der Füße gestellt, wenn Veränderungen im Sinne der oben beschriebenen Symptome nachgewiesen werden konnten.

Für die vorliegende Auswertung wurden folgende Kategorien gebildet: autonome Neuropathie vorhanden/nicht vorhanden, periphere Neuropathie vorhanden/nicht vorhanden, gleichzeitiges Vorliegen peripherer und autonomer Neuropathie.

2.5 Statistische Methoden

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Programmpaket SPSS (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) mit freundlicher Unterstützung durch die Arbeitsgruppe Statistik des Institutes für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen. In der deskriptiven Statistik wurden Ergebnisse als arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichung oder als Median dargestellt. Zur Signifikanzprüfung kam der „two tailed Fishers exact test“ zur Anwendung, für den Vergleich von mehr als 2 Stichproben wurde als Rangsummentest der U-Test nach Wilcoxon, Mann und Withney verwendet. Die Beziehung zwischen GAD 65 Antikörper-Index-Werten und anderen bivariaten Grundgesamtheiten wurde mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman beschrieben. Die Signifikanzschwelle liegt bei $p < 0,05$.

3. ERGEBNISSE

3.1. Etablierung des GAD 65-Antikörper-Assays

3.1.1 Erläuterung des GAD 65-Ak-Index-Wertes

Von jedem zu messendem Serum wurden drei Proben auf die Microwellplatte pipettiert. Am Ende des Testablaufes lagen also jeweils drei Meßwerte für einen Patienten in cpm (counts per minute) vor. Nun wurde der Mittelwert aus den drei vorliegenden Messungen in cpm gebildet. Dieser Wert wurde an der Stelle für die unbekannte Probe in die untenstehende Formel eingesetzt.

$$\text{GAD 65 Ak-Index} = \frac{\text{cpm [unbekannte Probe]} - \text{cpm [Negativstandard-Serum]}}{\text{cpm [Positivstandard-Serum]} - \text{cpm [Negativstandard-Serum]}}$$

Der Wert für die cpm des Negativstandard-Serums wurde aus den Mittelwerten von fünf definierten Negativkontrollseren gemittelt, die in jedem Testansatz mitgeführt wurden. Ebenso wurde auch eine definierte Positivkontrolle in jedem Ansatz mitgeführt, deren Mittelwert in cpm in die beschriebene Formel einzusetzen war.

Durch die Konstellation der Formel ist gewährleistet, daß trotz möglicher Schwankungen in der Aktivität des verwendeten Beta-Strahlers reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden, da das Verhältnis zwischen maximaler Radioaktivität und minimaler Radioaktivität durch dieselben, in jedem Ansatz verwendeten Positiv- und Negativkontrollen in jedem durchgeführten Test gleich ist.

3.1.2 Festlegung des Normbereiches

Anhand der Untersuchung von 100 Seren der beschriebenen gesunden Probanden (Negativkontrolle) wurde zunächst ein Referenzbereich bzw. eine obere Normgrenze bestimmt. Zur Festsetzung des Normbereiches wählten wir die 2-fache Standardabweichung des Mittelwertes des GAD Ak-Index-Werte der Negativkontrollen. Bei einer Normalverteilung der GAD Ak-Index-Werte, die gegeben ist, sollten 95% der Werte in dem festgelegten Intervall liegen. Die für die Negativkontrollgruppe ermittelten GAD Ak-Index-Werte lagen zu 97% in

dem festgelegten Normbereich, die drei darüber liegenden Werte befanden sich noch innerhalb der dreifachen Standardabweichung vom Mittelwert der GAD Ak-Index-Werte der Negativkontrollen.

Diese Festsetzung der Obergrenze, oder auch als „cut off“ zu bezeichnen, garantiert mit einer 2-fachen Standardabweichung vom Mittelwert eine ausreichend hohe Sicherheit zur Vermeidung von falsch positiven Ergebnissen ohne jedoch „schwach positive“ Messwerte zu ignorieren.

3.1.3 Berechnung der Präzision

Unabdingbare Voraussetzung zur Interpretation von Meßwerten, insbesondere solcher, die durch ein neu etabliertes Verfahren gewonnen werden, ist die Kenntnis der Präzision eines Testes. Durch die Ermittlung der Präzision wird das Ausmaß zufälliger und unvermeidbarer Abweichungen der Analysenwerte innerhalb eines Testansatzes (Intra-Assay-Variationskoeffizient), sowie von Tag zu Tag (Inter-Assay-Variationskoeffizient) bestimmt.

Der Intra-Assay-Variationskoeffizient beschreibt die Präzision, bzw. die Reproduzierbarkeit einzelner Meßergebnisse in einer Serie, d. h. unter identischen Bedingungen und am selben Tag.

Zur Bestimmung des Intra-Assay-Variationskoeffizienten wurde ein üblicherweise als Positivstandard verwendetes Serum innerhalb eines Testansatzes unter identischen Versuchsbedingungen 10-fach getestet.

Der Variationskoeffizient errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Variationskoeffizient in \%} = \frac{\text{Standardabweichung/Mittelwert}}{\sqrt{\text{Anzahl der Messungen}}} \times 100$$

Tabelle 3: Intra-Assay-Variationskoeffizient

Anzahl n der Messungen	Mittelwert in cpm	Standardabweichung	Variationskoeffizient in Prozent
10	2481,78	398,9	5

Der relative Intra-Assay-Variationskoeffizient des etablierten Tests für positive Proben liegt bei **5%** (n = 10).

Der Inter-Assay-Variationskoeffizient beschreibt die Präzision einzelner Meßergebnisse unter wechselnden Bedingungen, d. h. an verschiedenen Tagen, mit verschiedenen Reagenzien usw.. Zur Bestimmung des Inter-Assay-Variationskoeffizienten wurden die zu jedem Testansatz mitgeführten Kontrollseren herangezogen. Die Berechnung des Variationskoeffizienten erfolgte nach der oben angegebenen Formel.

Tabelle 4: Inter-Assay-Variationskoeffizient

Anzahl n der Messungen	Mittelwert in GAD-Ak-Index-Werten	Standardabweichung	Variationskoeffizient in Prozent
6	0,3185	0,1209	15

Der relative Inter-Assay-Variationskoeffizient des etablierten Tests für positive Proben liegt bei **15%** (n = 6).

3.1.4 Validierung des GAD 65-Antikörper Assays

Die Brauchbarkeit eines Testverfahrens, seine Validität, ist definiert als Übereinstimmung zwischen dem Testergebnis und dem, was zu messen beabsichtigt war. Die Validität eines Testes ist optimal, wenn alle Kranken als krank erkannt werde (=hohe Sensitivität), zugleich aber alle Gesunden beim Test negativ bleiben (=hohe Spezifität). In der Realität wird es aber immer Kranke geben, die nicht als solche erkannt werden und Gesunde, die als krank apostrophiert werden. Die Berechnung von Sensitivität und Spezifität erfolgt nach folgenden Formeln:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{richtig positive Testergebnisse}}{\text{richtig positive} + \text{falsch negative Testergebnisse}}$$

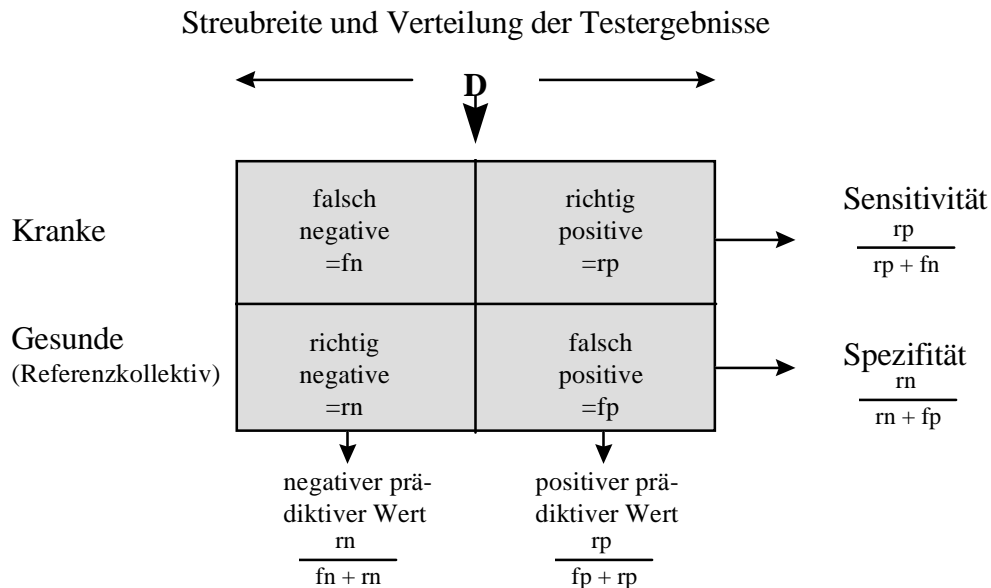
$$\text{Spezifität} = \frac{\text{richtig negative Testergebnisse}}{\text{richtig negative} + \text{falsch positive Testergebnisse}}$$

Bei jedem Test muß ein Kompromiß zwischen Sensitivität und Spezifität gefunden werden. Setzt man den Diskriminationswert (also den Grenzwert zwischen mutmaßlich gesund und mutmaßlich krank, auch als „cut off“ bezeichnet) höher, so steigt die Spezifität und die Sensitivität nimmt ab, beim Herabsetzen des Diskriminationswertes findet sich die gegenläufige Entwicklung.

Weitere wichtige Begriffe in der Validierung eines Testverfahrens sind der positive und der negative prädiktive Wert. Der positive prädiktive Wert beantwortet die praktisch wichtige Frage, welcher Anteil der positiven Testergebnisse tatsächlich mit der gesuchten Krankheit einhergeht, der negative prädiktive Wert sagt dementsprechend aus, wie sicher ein negatives Ergebnis einen Gesunden identifiziert.

Aus der dargestellten Vierfeldermatrix (Abb. 7) ergibt sich, daß Sensitivität und Spezifität unter festgelegten Testbedingungen von der Zahl der Kranken bzw. der Prävalenz der Krankheit unabhängig sind. Die Auswahlkriterien für die beiden Kollektive „Kranke“ und „Referenzpopulation“ (gesunde Kontrollen), haben jedoch bei klinischen Fragestellungen eine entscheidende Bedeutung für die prädiktiven Werte bei verschiedenen Diskriminationswerten [DÖRNER 1989].

Abb. 7 Auswertung eines binären Testes als Vierfeldermatrix
 („D“ symbolisiert den Diskriminationswert, sog. „cut off“)



Aus diesen Zusammenhängen ergeben sich folgende Anforderungen an das Referenzkollektiv der „Kranken“ [DÖRNER 1989]: Der Krankheitsgrad muß der klinischen Situation entsprechen, bei der das Testverfahren eingesetzt werden soll und das Referenzkollektiv muß für die betreffende klinische Situation differentialdiagnostisch relevant sein.

Um in der Etablierung des GAD 65 Ak-Assays diesen Anforderungen gerecht zu werden erfolgte die Analyse eines Kollektives von 100 erstmanifestierten Typ 1 Diabetikern und die Teilnahme am ersten internationalen „IDW proficiency workshop on standardisation of GAD-Antibodies“.

Wie im Ergebnisteil dargestellt konnten wir an dem Kollektiv der erstmanifestierten Typ 1 Diabetiker die nach der Literatur zu erwartende Prävalenz nachvollziehen. In 79 % (79 von 100) der Patienten konnten mit dem hier verwendeten Assay positive GAD 65 Ak-Index-Werte gemessen werden. Petersen wies mit dem gleichen Verfahren in 77 von 100 erstmanifestierten Typ 1 Diabetikern GAD 65 Antikörper nach [PETERSEN et al. 1994], Seissler fand ebenfalls mittels eines Immunpräzipitationstestes in 13 von 15 (87%) erstmanifestierten Typ 1 Diabetikern GAD 65 Antikörper [SEISSLER et al. 1993]. Auch an einem größeren Kollektiv von 225 Schulkindern mit neu aufgetretenem Typ 1 Diabetes gelang der Nachweis von GAD

65 Antikörpern in 75% [BINGLEY et al. 1997]. Es wurden nur Untersuchungen aus der Literatur ausgewählt, die einen Immunpräzipitationstest als Nachweisverfahren verwendeten, da diese Methode als Goldstandard in der Detektion von GAD 65 Antikörpern gilt, wie auch im ersten und zweiten internationalen Glutamatdecarboxylase-Antikörper-workshop gezeigt werden konnte [SCHMIDLI et al 1994a, SCHMIDLI et al 1994b]. Im zweiten internationalen Glutamatdecarboxylase-Antikörper-workshop wurde für Radioimmunpräzipitationsverfahren (26 von 52 teilgenommenen Assays) eine mittlere Sensitivität von 76% und eine mittlere Spezifität von 89% erreicht.

Anlässlich der Teilnahme am ersten internationalen „IDW proficiency workshop on standardisation of GAD-Antibodies“ ließ sich mit dem in der vorliegenden Arbeit etablierten Assay eine Spezifität von 91% und eine Sensitivität von 86% erzielen.

3.2 Epidemiologische Daten

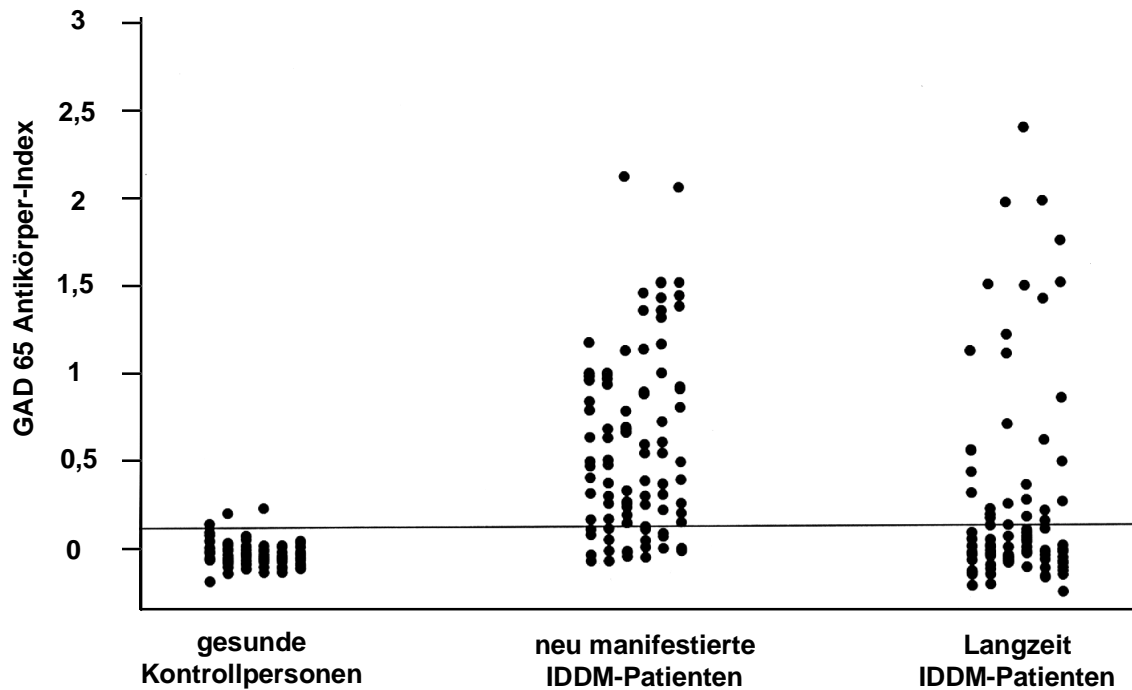
3.2.1 Prävalenz von GAD 65 Ak und ICA in den verschiedenen Kollektiven

Die Prävalenz von GAD 65 Antikörper in unserer stoffwechselgesunden Kontrollpopulation betrug 3%. Der gemessene GAD Ak-Index der positiv gemessenen Probanden (3 von 100) lag noch innerhalb der 3-fachen Standardabweichung und ist somit als schwach positiv zu werten (s. Abb. 8).

In der Gruppe der erstmanifestierten Typ 1 Diabetiker (n=100) fanden sich bei 79% der Patienten positive GAD Ak-Index-Werte. Die Langzeit Typ 1 Diabetiker (n=105) wiesen in 32% positive GAD Index-Werte auf (s. Abb. 8). In der Gruppe der erstmanifestierten Typ 1 Diabetiker können also, statistisch signifikant, häufiger erhöhte GAD 65 Antikörpertiter gemessen werden ($p < 0,001$) als in der Population der Langzeit Typ 1 Diabetiker.

Inselzellantikörper (ICA) ließen sich bei frisch manifestierten in 81% nachweisen und in der Gruppe der Langzeit Typ 1 Diabetiker in 20 % (21 von 105). Tabelle 5 zeigt die Prävalenz von GAD 65 Ak und ICA in den verschiedenen Kollektiven im Überblick.

Abb. 8 Prävalenz der GAD 65 Autoantikörper



(Die durchgezogene horizontale Linie stellt die Positivschwelle dar, sie entspricht dem Mittelwert zuzüglich der 2-fachen Standardabweichung der Gruppe gesunder Kontrollpersonen)

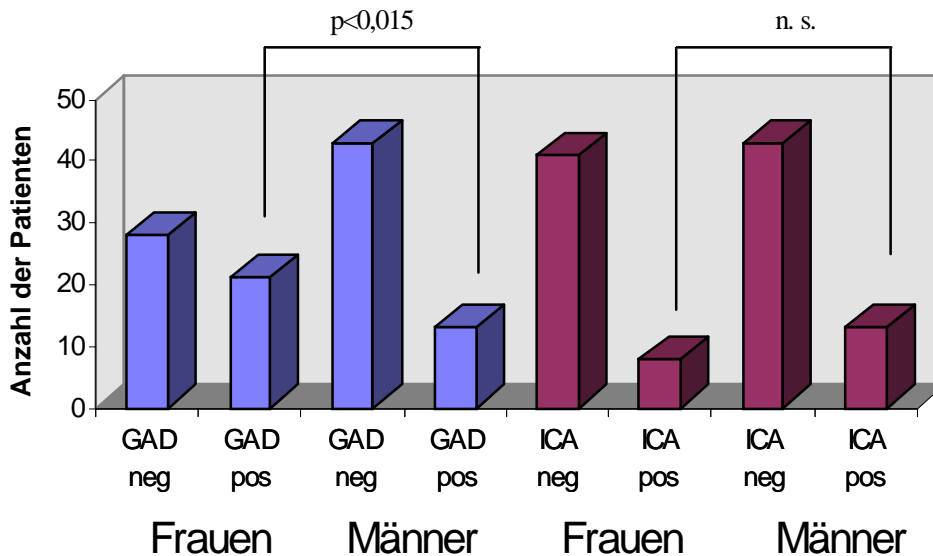
Tabelle 5 Prävalenz der bestimmten Autoantikörper

	Kontrollgruppe	neu manifestierte IDDM	Langzeit IDDM
Anzahl (n)	100	100	105
positiver GAD 65 Ak-Index	3 (3%)	79 (79%)	34 (32%)
positive ICA	2 (2%)	81 (81%)	21(20%)

3.2.2 Beziehung zwischen Geschlecht und GAD 65 Ak

In der Gruppe der Langzeit Typ 1 Diabetiker (n=105) wurden bei 21 von 49 Frauen und bei 13 von 56 Männern positive GAD 65 Antikörpertiter gemessen. Somit fanden sich in der vorliegenden Population von Langzeit Typ 1 Diabetikern bei Frauen signifikant häufiger (43% der Frauen versus 23% der Männer, $p < 0,015$), positive GAD 65 Antikörpertiter, s. Abb. 9.

Abb. 9 Geschlechtsabhängige Verteilung positiver ICA und GAD 65 Ak-Index Werte



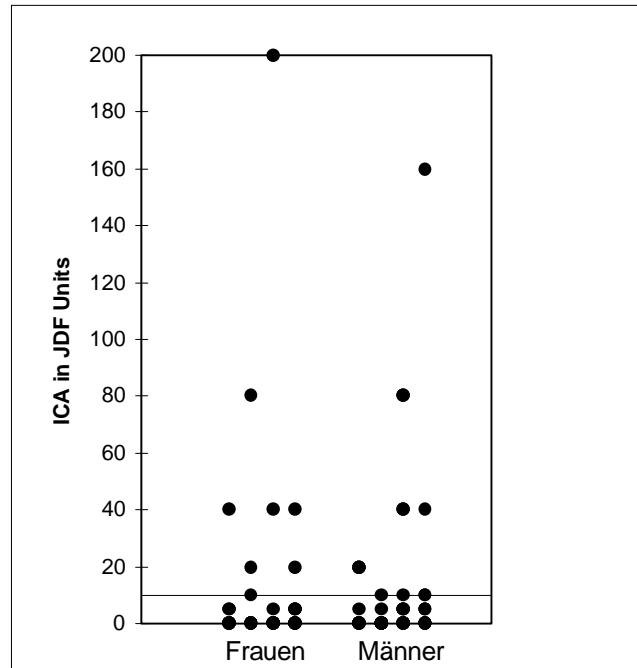
(GAD 65 Ak sind signifikant häufiger bei Frauen zu finden, für ICA zeigen sich keine geschlechtsspezifischen, statistisch relevanten Unterschiede in der Verteilung)

Ein statistischer Zusammenhang zwischen Geschlecht und ICA zeigte sich nicht. ICA ließen sich bei 8 von 49 Frauen (16%) und bei 13 von 56 Männern (23%) in der Gruppe der Langzeit Typ 1 Diabetiker nachweisen.

Da wir bereits statistisch signifikante Unterschiede in der Geschlechtsverteilung bei positiven GAD 65 Ak-Index Werten sahen, untersuchten wir auch, ob Frauen in der Quantität des positiven Einzelwertes gegenüber Männern höhere Werte aufweisen. Wieder fand sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Höhe des positiven GAD 65 Ak-Index Wertes und dem weiblichen Geschlecht ($p < 0,016$).

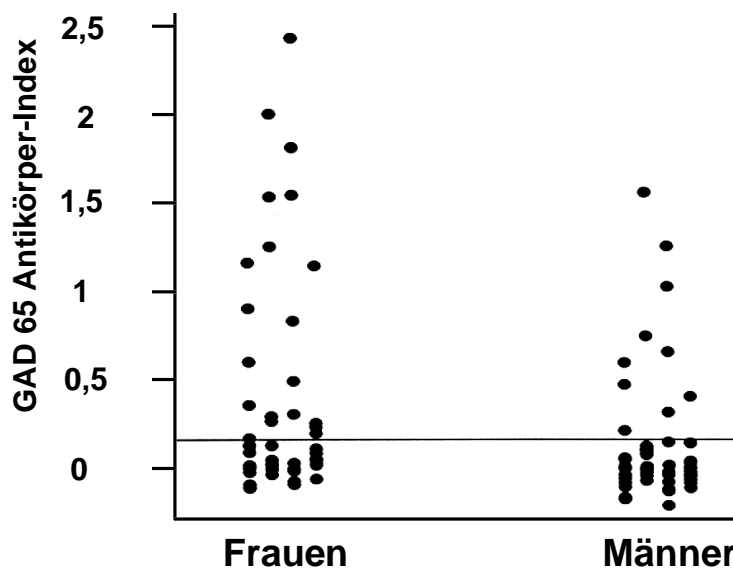
Für die ICA ließ sich weder ein statistisch bedeutsamer Zusammenhang zwischen positivem Nachweis der ICA, noch der Höhe der positiven ICA (nach Titerstufen in JDF-Units) zum Geschlecht der Patienten zeigen (s. Abb. 9 und 10).

Abb. 10 Geschlechtsverteilung der ICA-Werte in JDF Units



(Die durchgezogene horizontale Linie stellt die Positivschwelle dar, sie entspricht 10 JDF-Units. Für die Höhe der positiven ICA-Werte zeigt sich kein geschlechtspezifischer, statistisch relevanter Unterschied in der Verteilung)

Abb. 11 Geschlechtsverteilung der GAD 65 Ak-Index-Werte

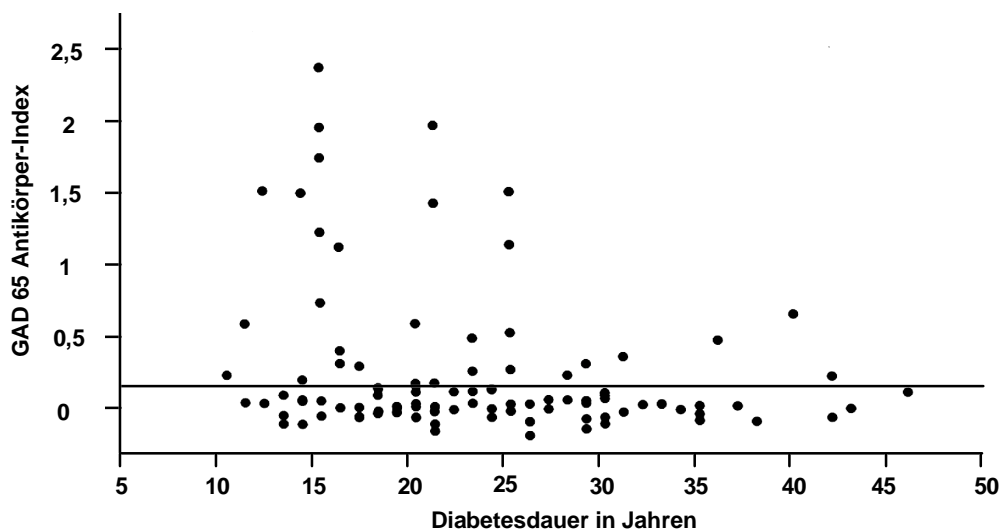


(Die durchgezogene horizontale Linie stellt die Positivschwelle dar, sie entspricht dem Mittelwert zuzüglich der 2-fachen Standardabweichung der Gruppe gesunder Kontrollpersonen.)

3.2.3 Beziehung zwischen Diabetesdauer und Autoantikörpern (GAD 65, ICA)

Der Median der Dauer des Diabetes betrug in der Population der Langzeit Typ 1 Diabetiker 21 Jahre (Spanne 10-46 Jahre). Wir fanden eine negative Korrelation zwischen der Dauer der Erkrankung und der Nachweisbarkeit positiver GAD 65 Antikörper Index-Werte (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman $r = -0,22$; $p < 0,01$) sowie der Höhe der GAD 65 Antikörper Index-Werte (s. Abb. 12). Für die negative Beziehung der Höhe der GAD 65 Antikörper Index-Werte zur Diabetesdauer fand sich ein Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman von $-0,22$ ($p < 0,02$).

Abb. 12 Beziehung zwischen Diabetesdauer und GAD 65 Ak-Index

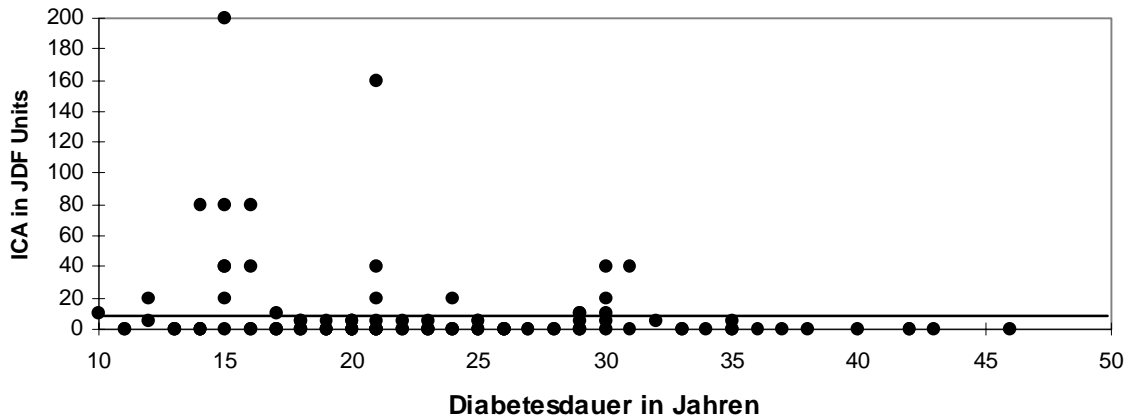


(Die durchgezogene horizontale Linie stellt die Positivschwelle dar, sie entspricht dem Mittelwert zuzüglich der 2-fachen Standardabweichung der Gruppe gesunder Kontrollpersonen)

Positive Titer von ICA zeigten ebenfalls eine, wenn auch schwächere, negative Korrelation zur Dauer des Diabetes ($r = -0,32$; $p < 0,05$), wie in Abb. 13 dargestellt. Mit zunehmender Dauer der Erkrankung nimmt in der hier untersuchten Gruppe von Langzeit Typ 1 Diabetikern die Prävalenz der beiden gemessenen humoralen Marker ab. Faßt man die Patienten nach der Dauer des Diabetes in Gruppen von fünf Jahren zusammen (d. h. alle Patienten mit 10-15 Jahren Diabetesdauer, danach eine Gruppe mit 15-20 Jahren, usw.) und trägt die Anzahl der autoantikörperpositiven Patienten gegen die Zeit auf, findet man den Trend, daß ICA über die Zeit einen rascheren Abfall als GAD 65 Ak zeigen (s. Abb. 14). Da in der vorliegenden Arbeit

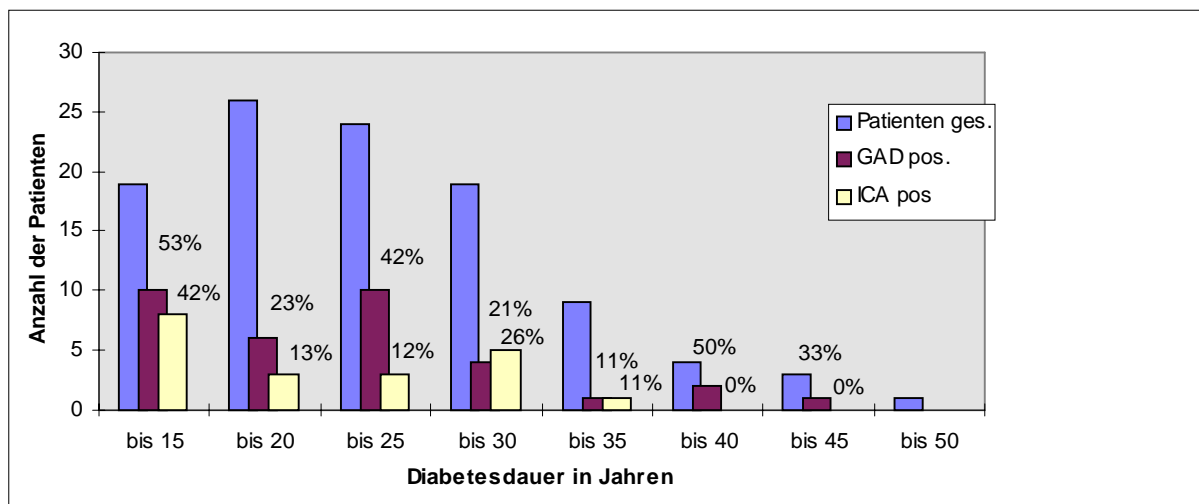
eine Querschnittsuntersuchung vorgenommen wurde, läßt sich keine endgültige Aussage über den zeitlichen Verlauf der Antikörperphänomene machen. Dies muß Längsschnittuntersuchungen vorbehalten bleiben.

Abb. 13 Beziehung zwischen Diabetesdauer und ICA



(Die durchgezogene horizontale Linie stellt die Positivschwelle dar, sie entspricht 10 JDF-Units. Es findet sich eine negative Beziehung der Nachweisbarkeit der ICA zur Dauer des Diabetes mit $r = -0,32$ und $p < 0,05$)

Abb. 14 Nachweisbarkeit von GAD 65 Ak und ICA in Abhängigkeit der Diabetesdauer



(Die 1. Säule repräsentiert die Gesamtzahl der Patienten in einer Gruppe ähnlich langer Diabetesdauer, die mittlere die Zahl GAD 65 Ak positiver, die letzte Säule ICA positive Patienten. Der jeweils obere Prozentwert gibt die GAD 65 Ak positiven Patienten im Verhältnis zu allen Patienten einer Gruppe wieder, die untere Prozentzahl den Anteil ICA positiver Patienten)

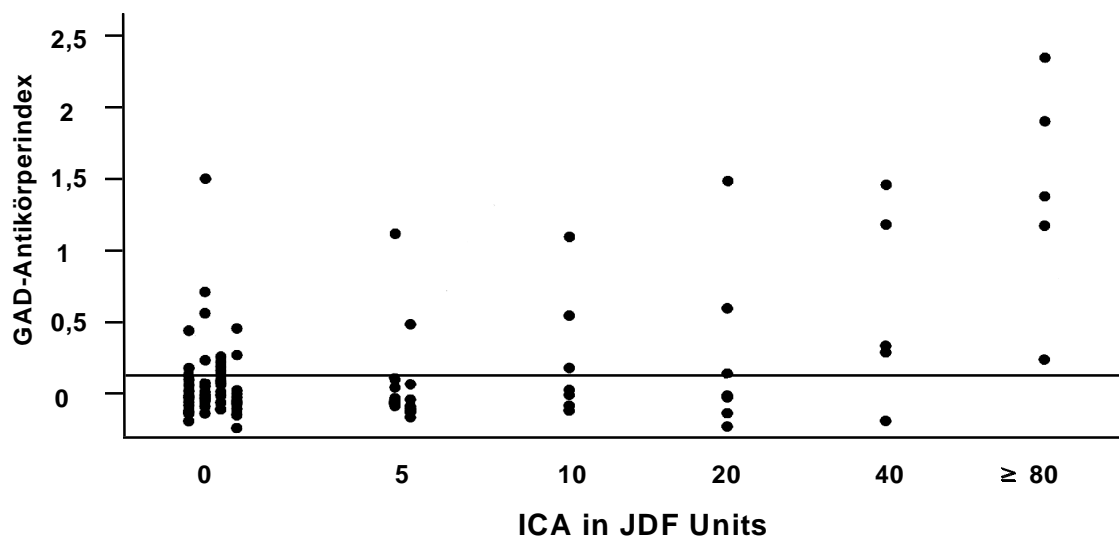
Das Alter zum Zeitpunkt der Erstmanifestation des Diabetes zeigte keinen statistischen Zusammenhang mit dem Auftreten positiver GAD 65 Antikörpertiter.

3.3 Beziehung von GAD 65 Ak bei Langzeit Typ 1 Diabetikern zu immunologischen und klinischen Parametern

3.3.1 Beziehung zwischen GAD 65 Ak und ICA

In 20% (n=21 von 105) der Langzeit Typ 1 Diabetiker konnten ICA Werte ≥ 10 JDF-U gemessen werden, die als positiv gewertet wurden (s. Abb 10). Es fand sich ein positiver, statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorkommen positiver GAD 65 Ak-Index Werte und positiven ICA Werten ($p < 0,05$). Darüberhinaus besteht ein positiver, statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der GAD 65 Ak-Index Werte und der Höhe ICA JDF-U-Titerstufen ($p < 0,01$). Patienten mit ICA Titern ab 40 JDF-U wiesen in fast allen Fällen auch positive GAD 65 Ak-Index Werte auf (9 von 10 Pat. mit ≥ 40 JDF-U).

Abb. 15 Beziehung zwischen GAD 65 Ak-Index und Höhe der ICA Titer (JDF units)



(Die durchgezogene horizontale Linie stellt die Positivschwelle dar, sie entspricht dem Mittelwert zuzüglich der 2-fachen Standardabweichung der Gruppe gesunder Kontrollpersonen.)

3.3.2 Beziehung zwischen GAD 65 Ak und dem HLA-Status

In der Gruppe der Langzeit Typ 1 Diabetiker konnte in 47% (n=40) das HLA Merkmal DR 4/X und in 22% (n=19) das HLA Merkmal DR 3/X beobachtet werden („X“ steht für ein vorhandenes HLA DR-Merkmal außer HLA DR 3 und 4). Die gleichzeitige Expression der HLA Antigene DR3 und DR4 lag in 23% (n=20) der Fälle vor (s. Tabelle 6). Für keines der beschriebenen HLA Merkmale ließ sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit positiven GAD 65 Ak Index-Werte oder der Höhe der gemessenen GAD 65 Ak-Index-Werte feststellen (s. Tabelle 6). Ebenso wenig konnte für positive ICA ein statistischer Zusammenhang zur Ausprägung eines HLA DR Merkmals belegt werden.

Tabelle 6 Häufigkeit der HLA-DR Phänotypen bei Vorkommen oder Fehlen von GAD 65 und ICA-Autoantikörpern

	n (%)	DR 3/X	DR 4/X	DR 3/4	DR X/X
Patienten	86	19 (22%)	40 (47%)	20 (23%)	7 (8%)
GAD 65 Ak pos.	28 (33)	5	13	6	4
GAD 65 Ak neg.	58 (67)	14	27	14	3
ICA pos.	15 (17)	2	7	4	2
ICA neg.	71 (83)	17	33	16	5

(X bedeutet ein HLA-DR Antigen außer HLA-DR 3 oder HLA-DR 4)

3.3.3 Beziehung zwischen GAD 65 Ak und Neuropathie

Die Diagnose einer autonomen diabetischen Neuropathie wurde in 67% (74/105), die Diagnose einer peripheren diabetischen Neuropathie in 79% (87/105) der Patienten mit Langzeit-Typ 1 Diabetes gestellt. Das kombinierte Auftreten von peripherer und autonomer diabetischer Neuropathie lag in 63% (66/105) der Fälle vor. Ein statistischer Zusammenhang zwischen den einzelnen Formen oder dem gemeinsamen Vorliegen der Neuropathien und dem Auftreten positiver GAD 65 Ak-Index-Werte oder positiver ICA-Werte konnte nicht gefunden werden. Auch zwischen der Höhe der positiven GAD 65 Ak-Index-Werte und den verschiedenen vorliegenden Neuropathien war nach statistischer Prüfung kein Zusammenhang ersichtlich (s. Tab. 7).

Tabelle 7 Prävalenz von GAD 65 Ak und ICA mit peripherer Neuropathie (PNP) und autonomer Neuropathie (ANP)

	n (%)	PNP pos	PNP neg	ANP pos	ANPneg
Patienten	105	83 (79%)	22 (21%)	70 (67%)	35 (33%)
GAD 65 Ak pos.	34 (32)	27	7	25	9
GAD 65 Ak neg.	71 (68)	56	15	45	26
ICA pos.	21 (20%)	16	5	15	6
ICA neg.	84 (80%)	67	17	55	29

3.4 Residuale Beta-Zellfunktion bei Langzeit Typ 1 Diabetikern

3.4.1 Residuale Beta-Zellfunktion und deren Beziehung zu GAD 65 Ak und ICA

Nach Stimulation mit 1mg Glucagon intravenös waren bei 23% (24 von 105) der Patienten im Vergleich zum vorher bestimmtem Nüchternwert niedrig positive C-Peptid Konzentrationen messbar, was nach den Kriterien von Hendriksen [HENDRIKSEN et al. 1977] als eine residuale Beta Zell Funktion aufzufassen ist. Bei 9 von diesen 24 Patienten ließen sich erhöhte GAD 65 Antikörpertiter nachweisen (s. Tabelle 8), bei 3 Patienten wurden erhöhte ICA-Titer gemessen. In der Gruppe der Patienten ohne C-Peptid-Sekretion nach Stimulation (n=81, 77%) fanden wir 25 Patienten mit erhöhten GAD 65 Antikörper-Indizes sowie 18 Patienten mit positiven ICA Werten. Es fand sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen residueller Beta-Zell Funktion und erhöhten GAD 65 oder ICA Antikörpertitern. Auch in der Verteilung der Höhe der GAD 65 Ak-Indizes war kein statistischer Unterschied zwischen den Patienten mit oder ohne residuale Beta-Zellfunktion.

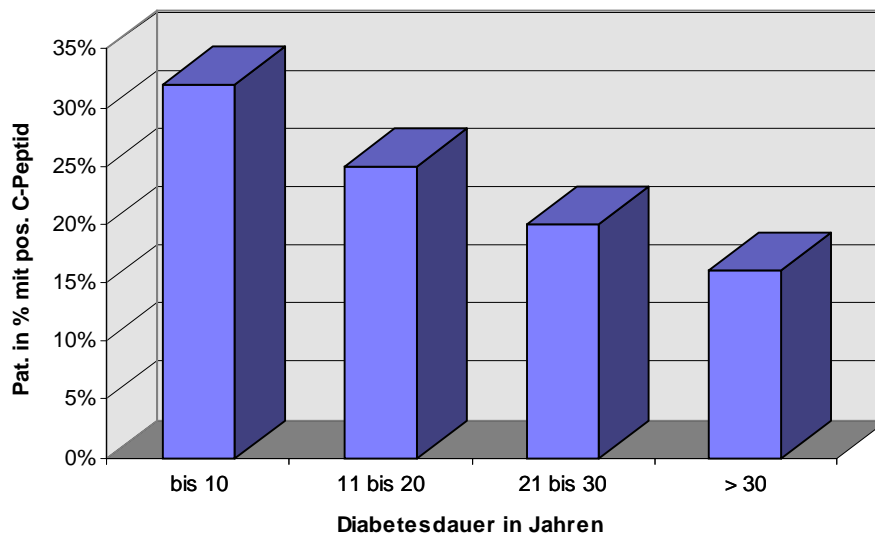
Tabelle 8 Prävalenz von GAD 65 Autoantikörpern und Inselzellantikörpern (ICA) bei Patienten mit residueller C-Peptid Sekretion im Glucagon-Test

	n (%)	C-Peptid pos.	C-Peptid neg.
Patienten	105	24 (23)	81 (77)
GAD 65 Ak pos.	34 (32)	9	25
GAD 65 Ak neg	71 (68)	15	56
ICA pos.	21 (20)	3	18
ICA neg.	84 (80)	21	63

3.4.2 Residuale Beta-Zellfunktion und deren Beziehung zur Dauer des Diabetes

In Übereinstimmung mit der oben angegebenen Definition einer residualen Beta-Zellfunktion [HENDRIKSEN et al. 1977] ließ sich diese bei 23% (n=24 von 105) der Langzeit-Typ 1 Diabetiker finden. Der Median der Diabetesdauer lag bei 21 Jahren (Spanne 10-46 Jahre). Werden die Patienten in Gruppen nach der Dauer des Diabetes in Dekaden eingeteilt so finden sich in der Gruppe der Patienten, deren Erkrankung seit 10 Jahren besteht 32% C-Peptid Responder, in der Gruppe, die seit 11-20 Jahren erkrankt ist 25%, in der Gruppe, die seit 21-30 Jahren erkrankt ist 20% und in der Population der vor über 30 Jahren an Diabetes Erkrankten 16% mit residualer Beta-Zellfunktion (s. Abb. 16).

Abb. 16 C-Peptid Sekretion und Diabetesdauer



(Die Grafik zeigt das Vorkommen einer residualen Beta-Zellfunktion über die Dauer des Diabetes. In die vier Gruppen wurden die Patienten je nach Dauer des Diabetes in Zehnjahresschritten eingeteilt)

4. DISKUSSION

4.1 Epidemiologische Daten

Über die Prävalenz von GAD 65 Antikörpern bei Patienten mit langjährigem Typ 1 Diabetes liegen verschiedene Angaben vor. In einer asiatischen Population von Langzeit Typ 1 Diabetikern mit einer Erkrankungsdauer von 3-28 Jahren wurden in 61% der Fälle positive GAD 65 Antikörpertiter beschrieben, wobei nur 21% der Patienten erhöhte ICA Werte aufwiesen [KAWASAKI et al 1994]. In einem Kollektiv australischer Langzeit Typ 1 Diabetiker, deren Diabetes zwischen 3-42 Jahren bestand, werden GAD 65 Antikörper bei 59% als positiv angegeben, ICA in 13% [ROWLEY 1992].

Prävalenzen von GAD 65 Antikörpern in dieser Höhe konnten wir in unserem, einem der größten zu dieser Fragestellung untersuchten Kollektive, nicht beobachten. Wir fanden lediglich in 32% der Fälle positive GAD 65 Antikörpertiter bei einem Median der Diabetesdauer von 21 Jahren. Möglicherweise ist dieser Unterschied durch die große Spanne der Erkrankungsdauer von 10-46 Jahren zu erklären. Wir fanden eine negative Korrelation zwischen Dauer des Diabetes und positiven GAD 65 Antikörpern sowie auch der Höhe der GAD 65 Antikörperindex-Werte. Dies legt einen Abfall der GAD 65 Antikörpertiter im Laufe der Erkrankung über Jahre nahe. In einer kürzlich erschienen Längsschnittuntersuchung an Kindern und Heranwachsenden mit Typ 1 Diabetes über einen Zeitraum von 10 Jahren wurden unsere Ergebnisse bestätigt [SAVOLA et al. 1998]. So fanden die Autoren zum Manifestationszeitpunkt in 81% der Patienten GAD 65 Antikörper, in den Messungen nach 2 und 5 Jahren nahm die Zahl der GAD 65 Antikörper positiven Befunde stetig ab und nach 10 Jahren wurden nur noch in 30% GAD 65 Antikörper nachgewiesen. Möglicherweise spielen auch die ethnischen Unterschiede eine Rolle, wie von Zimmet und Mitarbeitern postuliert wurde [ZIMMET et al. 1993], denn Seissler und Mitarbeiter wiesen in einer kleineren deutschen Population von Langzeit Typ 1 Diabetikern mit einer Diabetesdauer von mehr als 10 Jahren in 25% (8/32) GAD 65 Antikörper nach [SEISSLER et al 1993], was den in dieser Arbeit vorliegenden Zahlen in etwa entspricht. Eine niedrige Sensitivität unseres Assays ist zur Erklärung der Unterschiede sehr unwahrscheinlich, da in dem Kollektiv von erstmanifestierten Typ 1 Diabetiker in 79% der Fälle positive GAD 65 Antikörpertiter gemessen wurden, was nach bisherigen Arbeiten zu erwarten ist [SEISSLER et al 1993, CHRISTIE 1990].

Neben der Persistenz von GAD 65 Ak bei Langzeit Typ 1 Diabetikern fanden wir in unserem Kollektiv in 20% ICA (Titerhöhe ≥ 10 JDF Units). Frühere Arbeiten erbrachten ähnliche Relationen. So wiesen Rowley [ROWLEY et al. 1992] und Kawasaki [KAWASAKI et al. 1994] 13% bzw. 24% ICA positive Langzeit Typ 1 Diabetiker in ihren Populationen nach. In beiden Untersuchungen der letztgenannten Autoren fällt ein deutlicher Unterschied zwischen GAD 65 Ak Nachweis in mehr als 50% und den beschriebenen Größenordnungen positiver ICA bei Langzeit Typ 1 Diabetikern auf. Ein Grund für den im Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung hohen Anteil GAD 65Ak positiver Patienten könnte in der Methodik des Nachweisverfahrens für GAD 65 Ak liegen. Wir verwendeten den im Methodenteil beschriebenen Immunpräzipitationstest mit rekombinanter humaner GAD, der als Methode nach den internationalen GAD-workshops [SCHMIDLI et al 1994a, SCHMIDLI et al 1994b] als das valideste Nachweisverfahren für GAD 65 Ak gilt. In den Arbeiten der zitierten Autoren kamen die heute nur noch selten verwendeten Radioimmunoassays mit nativem Gehirnextrakt vom Schwein als GAD-Quelle zum Einsatz. Da im Gehirn auch GAD 67 vorkommt und es zudem bei anderen Spezies bei unzureichender Reinigung des Hirnmaterials möglicherweise zusätzliche Bindungsstellen für humane GAD 65 Ak gibt, wären falsch positive Ergebnisse denkbar.

Ein Zusammenhang zwischen weiblichem Geschlecht und der Prävalenz von GAD 65 Antikörpern bei den Langzeit Typ 1 Diabetikern ließ sich analog den Ergebnissen anderer Autoren [MARTINO et al. 1991, SCHMIDLI et al. 1994c] auch in der vorliegenden Untersuchung nachweisen. Schmidli et al. [SCHMIDLI et al. 1994c] fanden bei Frauen im Alter von über 12 Jahren signifikant höhere GAD 65 Antikörpertiter als bei Männern, unabhängig davon, ob es sich um erstmanifestierte Patientinnen oder solche mit einem bereits länger bestehenden Typ 1 Diabetes handelte. Für ICA konnten Schmidli et al. keinen statistischen Zusammenhang zum weiblichen Geschlecht nachweisen. In unserem Kollektiv der Langzeit Typ 1 Diabetiker mit 57 Frauen sahen wir zwar den statistischen Zusammenhang von positiven GAD 65 Ak und der Höhe der GAD 65 Ak Index Werte. Eine auch von uns untersuchte Beziehung von ICA zum Geschlecht ließ sich aber nicht eruieren. Dennoch wurde für ICA in größeren Kollektiven eine positive Korrelation zum weiblichen Geschlecht

beschrieben [MONTANA et al. 1991], was auf einen geschlechtsspezifischen Unterschied der humoralen Immunantwort bei Typ 1 Diabetikern hinweist.

GAD 65 Antikörper lassen sich, verglichen mit anderen Autoantikörpern wie ICA, häufiger bei Langzeit Typ 1 Diabetikern nachweisen [KAWASAKI et al. 1992, ROWLEY et al. 1992]. Dieses Phänomen wirft die Frage nach Art und Ursache des zugrundeliegenden Stimulus für die gegen GAD 65 gerichtete Autoimmunreaktion bei Langzeit Typ 1 Diabetikern auf. Im Folgenden sollen auf der Grundlage der Eingangüberlegungen, daß wahrscheinlich eine andauernde Präsentation der antigenen Struktur die GAD 65 Antikörperproduktion triggert und den erhobenen Daten drei mögliche Auslösemechanismen diskutiert werden:

4.2 Residuale Beta-Zellfunktion und Persistenz von GAD 65 Ak und ICA

GAD 65 wird in Nervenzellen und Inselzellen des Pankreas exprimiert. Es wäre denkbar, daß eine geringe, noch sekretionsfähige Menge an insulinproduzierenden Betazellen einen Auslösemechanismus für die dauerhafte Immunantwort gegen GAD 65 darstellt. Die sezernierten Mengen an C-Peptid sind zwar nicht mehr stoffwechselwirksam, zeigen jedoch vitale B-Zellen an, die antigene Strukturen wie GAD 65 exprimieren, dem Immunsystem präsentieren und die humorale Immunantwort aufrechterhalten könnten.

C-Peptid ist als Indikator der Betazellfunktion etabliert. Die quantitative Beurteilung der Sekretionsleistung der Inselzellen wird durch den Vergleich der C-Peptid Werte vor und nach einer intravenösen Stimulation mit Glucagon ermöglicht. Selbst eine geringe, nicht metabolisch wirksame Sekretion kann zuverlässig nachgewiesen werden. Hendrikson und Mitarbeiter beschrieben eine enge Korrelation zwischen C-Peptid-Sekretion nach Stimulation mit Glucagon verglichen mit einer standardisierten Mahlzeit und definierten Kriterien, die eine residuale Betazellfunktion bei Langzeit Typ 1 Diabetikern anzeigen [HENDRIKSEN et al. 1977]. In Übereinstimmung mit diesen Kriterien konnten wir bei 23% der Langzeit Typ 1 Diabetiker eine residuale Betazellfunktion nachweisen. Hendriksen und Mitarbeiter fanden in einem ähnlichen Patientenkollektiv mit einer mittleren Diabetesdauer von 12 Jahren in 42% eine positive C-Peptid-Reaktion [HENDRIKSEN et al. 1977], Nakanishi und Mitarbeiter stellten, unter Anwendung modifizierter Nachweiskriterien, nach einer mittleren Diabetesdauer

von 9 Jahren in 66% eine positive Sekretion fest [NAKANISHI et al. 1990]. Unter Berücksichtigung der deutlich längeren Diabetesdauer unseres Kollektives mit einem Median 21 Jahren, scheinen die Werte des in dieser Arbeit untersuchten Kollektives der Langzeit Typ 1 Diabetiker in Übereinstimmung mit den früher publizierten Zahlen zu sein, da Hendriksen bereits eine negative Korrelation zwischen C-Peptid-Antwort und Dauer des Diabetes beschrieb.

Ein Zusammenhang zwischen residualer Betazellfunktion und positiven GAD 65 Antikörpertitern ließ sich in der untersuchten Population der Langzeit-Diabetiker statistisch nicht nachweisen. Auch zur Höhe der GAD 65 Antikörper-Index-Werte bestand keine Korrelation. Bestätigt werden diese Ergebnisse ebenfalls durch die kürzlich erschienene Arbeit der finnischen Gruppe um Knip [SAVOLA et al. 1998].

Wenn für die Bildung von GAD 65 Ak die residuale B-Zellfunktion als Trigger postuliert wurde, ist gleiches auch für ICA vorstellbar. Bereits 1985 wurde in einer Longitudinalstudie bei Typ 1 Diabetikern ein Zusammenhang zwischen ICA Positivität und C-Peptid Spiegeln gesehen [MARNER et al. 1985]. Untersuchungen bei erstmanifestierten, insbesondere jungen Typ I Diabetikern weisen den ICA einen prädiktiven Wert im Bezug auf eine raschere Progression der Erkrankung einhergehend mit einem Abfall der C-Peptid Konzentration im Serum zu [SCHIFFRIN et al. 1992].

In unserem Kollektiv von Langzeit Typ 1 Diabetikern zeigten sich in der Gruppe der C-Peptid Responder nicht vermehrt Patienten mit positivem Nachweis von ICA.

In dem untersuchten Kollektiv ergab sich kein Hinweis darauf, daß die Persistenz der humoralen Marker GAD 65 Antikörper und ICA von der residualen Betazellfunktion abhängig sein könnte.

4.3 Neuropathie und Persistenz von GAD 65 Ak und ICA

Nachdem sich keine Hinweise ergeben haben, die die pankreatische Betazellfunktion für eine anhaltende Immunantwort gegen GAD 65 verantwortlich machen könnten, ist ein möglicher extrapancreatischer Auslöser zu diskutieren. Bekanntermaßen wird die Isoform GAD 65 auch im Gehirn und peripheren Neuronen exprimiert [ERDO & WOLFF 1990]. Es sollte deshalb nach Hinweisen auf eine Beteiligung peripherer Nerven an der Aufrechterhaltung der

Immunreaktion gegen GAD 65 gefahndet werden. Eine Vergesellschaftung von Schäden an neuronalen Strukturen und der Erkrankung Diabetes besteht in der bei Langzeit Typ 1 Diabetikern oft zu beobachtenden peripheren und autonomen Neuropathie [RILEY et al 1990, STRACKE & FEDERLIN 1993], die sich auch in unserer Population nachweisen ließ. Eine periphere Neuropathie bestand in 79%, eine autonome Neuropathie in 67% der Fälle.

Frühere morphometrische Untersuchungen von Biopsiematerial peripherer Nerven zeigten eine reduzierte Dichte myelinisierter und nicht myelinisierter Nervenfasern in Verbindung mit histologischen Zeichen einer „Wallerschen Degeneration“ sowie fokale Läsionen an Peri- und Epineurium, die am ehesten einer ischämischen Ätiologie zuzuordnen sind [GREENE et al. 1992, JOHNSON et al 1988]. Klinische Studien machen die Hyperglykämie als grundlegende Bedingung der diabetischen Neuropathie wahrscheinlich. Der genaue pathophysiologische Mechanismus ist jedoch noch nicht verstanden. Verschiedene Möglichkeiten werden diskutiert: Veränderter Metabolismus von Polyol, Lipiden und Aminosäuren, vaskuläre Insuffizienz, vermehrter Anfall freier Radikale, gestörte axonale Übertragung und trophische Störungen der Nerven [FELDMANN et al. 1997]. Daneben ergeben sich auch Hinweise auf eine immunologische Ätiologie: Man fand an Nervenbiopsien Veränderungen, die typisch für Vaskulitiden im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen sind [DYCK & GIANNINI 1996], konnte in postmortalen Untersuchungen an Patienten mit autonomer diabetischer Neuropathie lymphozytäre Infiltrationen sympathischer Ganglien sehen [DUCHEN et al. 1980] und entdeckte bereits zum Zeitpunkt der Diagnose des Typ 1 Diabetes Autoantikörper gegen sympathische Ganglien [RABINOWE et al. 1989].

Kaufmann und Mitarbeiter formulierten die interessante Hypothese eines molekularen Mimikri auf dem Boden einer weitgehenden Analogie der Aminosäuresequenz von GAD 65 und dem P2-C Protein des Coxsackievirus, welches gehäuft bei der Manifestation des Typ 1 Diabetes gefunden wurde [KAUFMANN et al. 1992]. Aufgrund der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz könnten sich Antikörper, die gegen das Virusprotein gebildet wurden auch gegen bestimmte analoge Epitope der GAD 65 richten und so über einen entzündlichen Prozeß zu Funktionsstörungen am Nervensystem, beispielsweise zu einer peripheren oder autonomen Neuropathie, führen. Diese Hypothese stützend konnte Kaufmann bei 8 von 9 Langzeit Typ 1 Diabetikern mit sensorischer Neuropathie erhöhte GAD 65 Antiköpertiter nachweisen.

Doch selbst wenn keine primäre Virusinfektion vorliegt ist eine Freisetzung von GAD 65 aus Neuronen, die durch einen anderen der Neuropathie zugrundeliegenden Mechanismus geschädigt wurden, als dauerhafter Stimulus für die Bildung von Autoantikörpern gegen GAD 65 denkbar.

An der in dieser Arbeit untersuchten Population von Langzeit Typ 1 Diabetikern ließen sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Formen oder dem Vorkommen der Neuropathie überhaupt und positiven GAD 65 Antikörpertitern oder der Höhe der GAD 65 Antikörper-Index-Werte finden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen, die 39 bzw. 133 Langzeit Typ 1 Diabetiker zu dieser Fragestellung untersuchten [TEOPHANIDES et al. 1978]. In einer Arbeit von Muhr et al. [MUHR et al. 1997] wurden 96 Langzeitdiabetiker untersucht, von denen 41 an einer autonomen Neuropathie litten. Ausgehend von der oben formulierten Hypothese, daß durch neuronale Läsionen eine humorale Immunantwort unterhalten werden könnte oder GAD selbst in der Pathogenese der Neuropathie involviert ist, wurden Beziehungen von GAD, ICA und IA 2 zur autonomen Neuropathie untersucht. Ein statistischer Zusammenhang wurde zu keinem der humoralen Marker gefunden. Lediglich die auch untersuchten Autoantikörper gegen sympathische Ganglien ließen sich bei nachgewiesener autonomer Neuropathie vermehrt, aber noch nicht statistisch signifikant häufiger, nachweisen. Diese Ergebnisse lassen die Hypothese einer Immunantwort gegen GAD 65, die durch Freisetzung neuronaler GAD 65 unterhalten werden soll, nicht belegen.

Die Inselzellantikörper sind zwar nach bisherigem Stand des Wissens nicht gegen neuronale Strukturen gerichtet, könnten aber als Marker eines schwelenden Autoimmunprozesses, in dessen Rahmen es zu immunologisch vermittelten Läsionen von Nervengewebe kommt, fungieren. So fand Krendel et al. [KRENDEL et al. 1995] in einer Gruppe Typ 1 Diabetikern mit Symptomen und elektrophysiologischen Zeichen einer demyelinisierenden Neuropathie, die gleichen histologischen Veränderungen, die bei der sogenannten chronisch inflammatorisch demyelinisierenden Polyneuropathie (CIDP), eine als Autoimmunerkrankung einzuordnende Erkrankung, auftreten. Möglicherweise spielt für einige Formen der diabetische Neuropathie der gleiche, bislang nicht aufgeklärte Mechanismus eine Rolle, durch den auch die CIDP ausgelöst wird. Vor einem solchen Hintergrund wäre eine Markerfunktion für ICA zu sehen.

Bei der statistischen Prüfung dieser Hypothese fand sich jedoch kein Zusammenhang zwischen positiven ICA und einer Form der Neuropathie bzw. dem Auftreten einer Neuropathie überhaupt, so daß den humoralen Markern ICA und GAD 65 Ak weder eine prädiktive noch eine diagnostische Bedeutung im Zusammenhang mit der autonomen und peripheren Neuropathie zukommt.

4.4 Genetische Prädisposition und Persistenz von GAD 65 Ak und ICA

Weder residuale Betazellfunktion noch neuronale GAD scheinen geeignet, die bei unseren Patienten bestehende persistierende humorale Immunantwort gegen GAD 65 zu erklären. Deshalb wurde in dieser Arbeit nach Hinweisen auf einen Zusammenhang zwischen genetisch determinierten HLA-Merkmalen der Klasse II und persistenten GAD 65 Antikörpertitern gesucht.

Für Träger der HLA-Merkmale DR3 und DR4 konnte eine erhöhte Suszeptibilität für Typ I Diabetes gezeigt werden [ERLICH 1990, PLATZ et al. 1981, WOLF et al. 1983]. Auch in der vorliegenden Population der Langzeit Typ 1 Diabetiker fanden wir, wie erwartet, einen hohen Anteil von Patienten mit DR3 und/oder DR4 Haplotypen (s. Tab. 4). Delamaire und Mitarbeiter fanden eine geringere Prävalenz von GAD 65 Antikörpern bei HLA DR4 positiven Patienten sowie eine fehlende Assoziation von HLA DR oder DQ Allelen und positiven ICA. Sie schlossen, daß die Heterogenität der humoralen Immunantwort bei Typ 1 Diabetikern von HLA-Klasse II Genen kontrolliert wird [DELAMAIRE et al 1995]. Von einem australischen Kollektiv wird kein Unterschied in der GAD 65 Antikörperproduktion zwischen DR3 und DR4-Merkmalsträgern berichtet, eine höhere Antikörperprävalenz habe sich jedoch bei Diabetikern mit dem gleichzeitigen Vorkommen von HLA-DR3 und DR4 gezeigt [SERJEANTSON et al. 1992].

In der vorliegenden Arbeit konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer bestimmten Kombination oder dem einzelnen Auftreten von HLA DR-Merkmalen und der Prävalenz von GAD 65 Antikörpern bzw. der Höhe der GAD 65 Antikörper-Index-Werte gefunden werden. Möglicherweise ist dieser Unterschied zu den zitierten Ergebnissen im Zusammenhang mit der geringen Anzahl von 86 Patienten mit HLA-Typisierung zu sehen, die

weiter in Gruppen mit und ohne Prävalenz von GAD 65 Antikörpern und nach den verschiedenen HLA DR-Merkmalen unterteilt wurden (s. Tab. 6/S. 42).

Nach weiteren mittlerweile vorliegenden Resultaten ergibt sich ein heterogenes Bild. In einer kleinen Gruppe von spanischen Typ I Diabetikern mit einer mittleren Erkrankungsdauer von elf Jahren und deren erstgradigen Verwandten wurde keine Beziehung zwischen HLA-DR-Merkmalen und GAD 65 Antikörpern entdeckt [SERRANO-RIOS et al. 1996]. In einer japanischen Population konnte ein Zusammenhang zwischen GAD 65 Antikörpern und HLA DR9-DQ9 bei länger bestehendem Typ 1 Diabetes, jedoch nicht zu HLA-DR3 und 4 gefunden werden [SUGIHARA et al. 1997].

Die Arbeitsgruppe um Bonifacio wies in einer Gruppe von 160 Typ 1 Diabetikern bei HLA DR3 Phänotypen eine erhöhte Prävalenz und höhere Titer der GAD 65 Antikörper nach [GENOVESE et al. 1996].

In der zuletzt zitierten Publikation wurde auch die Beziehung der HLA DR-Merkmale zu dem erst 1995 identifizierten IA-2 Autoantikörper untersucht. Dieser, mit dem Inselzellantigen Tyrosinphosphatase reagierende Autoantikörper zeigt bei neu aufgetretenem Typ 1 Diabetes eine etwas niedrigere Prävalenz als GAD 65 Antikörper, hat jedoch eine höhere Spezifität für den Typ 1 Diabetes [HAWA et al 1997, MORGENTHALER et al. 1997]. Hinweise auf die schon für GAD 65 Autoantikörper vermutete Regulation durch HLA DR kodierende Gene konnte für IA-2 eindrucksvoll dargestellt werden. HLA DR4 Merkmalsträger hatten hochsignifikant häufiger IA-2 Antikörper als die für HLA DR4 negativen Typ 1 Diabetiker [GENOVESE et al. 1996].

Beziehungen zwischen HLA Merkmalen, insbesondere HLA DR, und ICA wurden schon vor Jahrzehnten untersucht. Bis heute ließen sich jedoch keine reproduzierbaren statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen HLA DR Merkmalen und ICA nachweisen [DELAMAIRE et al 1995, ZIEGLER et al. 1991, NEWMAN et al. 1989]. Dies ist nicht überraschend, da wir heute wissen, daß es sich bei den ICA um eine Familie verschiedener Antikörper handelt. Es wäre unwahrscheinlich, daß die Immunantwort gegen verschiedene B-Zellantigene, vermittelt durch HLA Klasse II -Moleküle von nur einem Genlocus ausgehen sollte, was ja mit der Annahme eines Zusammenhanges zwischen ICA und einem bestimmten HLA Merkmal impliziert wird. Erwartungsgemäß fanden wir in dem Kollektiv der

untersuchten Langzeit Typ 1 Diabetiker keinen statistischen Zusammenhang zwischen ICA und den bestimmten HLA DR-Molekülen.

Die bereits beschriebene enge Korrelation zwischen dem gegen das Inzellsantigen ICA 512 gerichteten Autoantikörper IA-2 und HLA DR4 wird durch aktuelle Arbeiten untermauert [SANJEEVI et al. 1998, CHILDHOOD DIABETES IN FINLAND STUDY GROUP 1998]. Auch für IAA und GAD 65 Ak wurde eine Korrelation zu jeweils verschiedenen HLA DQ Molekülen gezeigt [SANJEEVI et al. 1998].

Diese Ergebnisse tragen der Heterogenität der Familie der Inselzellantikörper Rechnung und legen nahe, daß die durch HLA Klasse II Merkmale vermittelte Immunantwort gegen verschiedene B-Zellautoantigene von verschiedenen Genabschnitten reguliert wird.

4.5 Konkordanz zwischen GAD 65 Ak und ICA

In einer jüngst publizierten Arbeit untersuchten Savola und Mitarbeiter die Persistenz humoraler Marker bei einer Gruppe von 90 Typ 1 Diabetikern in einem longitudinalen Studiendesign [SAVOLA et al. 1998]. Zum Zeitpunkt der Diagnose sowie zwei, fünf und zehn Jahre später wurden GAD 65 Ak, ICA und IA-2 bestimmt. Bei überwiegend im Kindesalter manifestierten Diabetikern ließen sich initial, wie erwartet, in 62-81% der Patienten die beschriebenen Autoantikörper nachweisen. Mit zunehmender Dauer des Diabetes zeigten ICA, GAD 65 Ak und IA-2 einen gleichförmigen kontinuierlichen Abfall in ihrer Prävalenz.

In 67% der Fälle der von Savola et al. dargestellten Population fand sich nach 10 Jahren noch mindestens ein positiver Antikörper, in 42 % noch zwei oder mehr. Daraus läßt sich eine Konkordanz der humoralen Marker ablesen.

Die Mehrheit der Patienten in der von uns untersuchten Population mit positiven ICA wiesen auch GAD 65 Antikörper auf. Darüber hinaus bestand eine positive Korrelation ($p < 0,01$) zwischen der Höhe der ICA Titerstufe in JDF Units und den GAD 65 Antikörper-Index-Werten. So fanden wir bei 9 von 10 Patienten mit ICA Titerstufen ≥ 40 JDF Units positive GAD Ak-Index-Werte. Umgekehrt waren in der Gruppe der hier untersuchten Langzeit Typ 1 Diabetiker bei einigen der GAD 65 Ak positiven Patienten keine ICA nachzuweisen. In den 34

Fällen positiver GAD 65 Ak lagen in nur 12 Fällen, das entspricht 35%, positive ICA vor. Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigen diese Relationen [ZANONE et al. 1994, SEISSLER et al 1993]. Der Unterschied könnte Ausdruck einer besseren Sensitivität des Radioimmunpräzipitationstestes mit der Verwendung von radiomarkiertem nativen Protein gegenüber der immunhistochemischen Methode zur Detektion von ICA sein. Die Tatsache des Vorliegens höherer GAD Ak-Index-Werte bei ICA positiven Patienten stützt diese Theorie. Ein Grund für die höhere Sensitivität des Immunpräzipitationstestes zum Nachweis von GAD könnte in der Tertiärstruktur von GAD 65 begründet sein. In der immunhistochemischen Nachweismethode von ICA kommen Pankreasgewebsschnitte zum Einsatz, in denen das GAD Molekül in teilweise denaturierter Form vorliegt. Da in Antikörperbindungsstudien demonstriert werden konnte, daß GAD 65 Antikörper aus Seren von Typ 1 Diabetikern denaturiertes und damit lineares GAD nicht mehr erkennen können [BAEKESKOV et al 1990], wird die Überlegenheit des Immunpräzipitationstestes klar, da hier die Epitope in einer flüssigen Phase und somit in der ursprünglichen Tertiärstruktur dargeboten werden.

Die hohe Rate gemeinsamen Auftretens von ICA und GAD 65 Ak führte zu der Hypothese, daß diese insellzellspezifischen Antikörper Ausdruck derselben Immunantwort sein könnten [KAWASAKI et al. 1994]. Unter Verwendung monoklonaler GAD 65 Ak, hergestellt aus dem Serum eines Typ 1 Diabetikers, war es möglich nachzuweisen, daß GAD 65 Ak und ICA entgegen der bis zu diesem Zeitpunkt vorherrschenden Auffassung zum Teil identische Antigene erkennen. Alle humanen monoklonalen Antikörper wiesen sowohl ein für ICA typisches Immunfluoreszenzmuster als auch Immunreaktivität gegen GAD auf. Bestätigung fand die Hypothese einer Teilidentität zwischen ICA und GAD in Blockierungsstudien mit humanem rekombinantem GAD, bei denen in einigen Seren die Bindung der ICA durch Präinkubation mit GAD 65 inhibiert werden konnte [RICHTER et al. 1993].

Auch die in der Einleitung beschriebenen verschiedenen Bindungsmuster von ICA an Pankreasschnitten unterschiedlicher Spezies lassen sich durch diese Untersuchungsbefunde erklären. GAD 65 kommt im Mauspankreas nur in geringsten Konzentrationen vor, womit die differenziellen Bindungsmuster ICA positiver Seren erklärt werden könnten [KIM et al 1993].

Weitere immunhistochemische Befunde und Absorptionstudien deuten auf eine heterogene Bindungsspezifität der ICA und damit auf eine ebenfalls heterogene Zusammensetzung der

betazellulären Zielantigene beim Typ 1 Diabetes hin [GENOVESE et al. 1992, TIMSIT et al. 1992, RICHTER et al. 1993].

Die Beschreibung der persistierenden Autoimmunität gegen GAD 65 und ICA, die im Zentrum dieser Arbeit steht, hat noch einen wichtigen Aspekt. Unsere Arbeitsgruppe fand in einer Untersuchung eines kleinen Kollektives von Langzeit-Typ 1 Diabetikern unter Immunsuppression abfallende ICA-Titer, jedoch unverändert weiterbestehende GAD 65 Ak Titer [JAEGER et al. 1996]. Ausgehend von der Beobachtung, daß trotz Immunsuppression Autoimmunität gegen Inselzellstrukturen existiert, wurden bei 23 Inselzelltransplantierten Langzeit Typ 1 Diabetikern die Funktion des Inseltransplantates in Abhängigkeit des Autoantikörperstatus untersucht. Wir fanden die Überlebenszeit des Transplantates in der Gruppe der GAD 65 Ak positiven Patienten, im Vergleich zu den GAD 65 Ak negativen Diabetikern, signifikant verkürzt [JAEGER et al. 1997]. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde die Hypothese formuliert, daß die anhaltende Autoimmunität gegen GAD 65 das Überleben des Inseltransplantates im Sinne einer „disease recurrence“ gefährdet. Sollte sich diese Hypothese in zukünftigen Studien bestätigen, so könnte mit der Bestimmung von GAD 65 Ak ein Risikokollektiv im Hinblick auf eine Gefährdung des Inseltransplantates identifiziert werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Eine über Jahre anhaltende humorale Autoimmunität gegen das Enzym Glutamatdecarboxylase (GAD) wurde bei einer nicht unwesentlichen Anzahl von Langzeit Typ 1 Diabetikern beschrieben. Die Ursache des anhaltenden Stimulus für diese Autoimmunreaktion konnte bisher nicht gefunden werden.

Da die Isoform GAD 65 hauptsächlich in den Inselzellen des Pankreas und Teilen des Nervensystems exprimiert wird, wurden in der vorliegenden Arbeit 105 Langzeit Typ 1 Diabetiker auf das Vorkommen von GAD 65 Autoantikörper und Inselzellantikörper sowie deren Beziehung zu residualer Betazellfunktion, peripherer oder autonomer Neuropathie und HLA DR Status untersucht. Zusätzlich untersuchten wir 100 gesunde Kontrollpersonen und 100 neu manifestierte Typ 1 Diabetiker auf die Prävalenz von GAD 65 Autoantikörper mit einem im Rahmen dieser Arbeit etablierten Radioimmunpräzipitationstest.

1. Eine residuale Betazellfunktion wurde bei 23% der Langzeit Typ 1 Diabetiker nachgewiesen. GAD 65 Antikörper oder Inselzellantikörper zeigten kein häufigeres, statistisch signifikantes Auftreten mit residualer Betazellfunktion.

2. In der Population der Langzeit Typ 1 Diabetiker wurde eine periphere Neuropathie in 79%, eine autonome Neuropathie in 67% der Fälle diagnostiziert. GAD 65 Antikörper oder Inselzellantikörper ließen sich bei Patienten mit peripherer oder autonomer Neuropathie nicht häufiger als bei Patienten ohne Neuropathie nachweisen.

3. In der vorliegenden Arbeit konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer bestimmten Kombination oder dem einzelnen Auftreten von HLA DR-Merkmalen und der Prävalenz von GAD 65 Antikörpern oder Inselzellantikörpern gefunden werden.

4. Autoantikörper gegen GAD 65 fanden sich in 32% der Langzeit Typ 1 Diabetiker, Inselzellantikörper in 20%. Zwischen der Prävalenz von GAD 65 Autoantikörpern und dem Vorkommen von Inselzellantikörpern sowie dem weiblichen Geschlecht bestand ein positiver statistischer Zusammenhang. Die Höhe der GAD 65 Autoantikörper-Index Werte zeigte eine negative Korrelation zur Dauer des Diabetes. Die humorale Immunantwort gegen GAD war assoziiert mit der Prävalenz höherer ICA Titer und zeigte einen langsameren Abfall über die Zeit als ICA. Diese Befunde entsprechen im wesentlichen den Ergebnissen früherer Pilotstudien.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Akselrod SD, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Barger AC, Cohen RL (1981). Power spectrum analysis of heart rate fluctuations: a quantitative probe of beat to beat cardiovascular control. *Science* 213: 220-222
- Baekkeskov S, Anstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, De Camilli P (1990). Identifikation of the 64K autoantigen in insulin dependent diabetes as the GABA-synthesising enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347: 151-156
- Baekkeskov S, Landin-Olsson M, Kristensen JK, Srikanta J, Bruining GJ, Mandrup-Poulsen T, Beauford CD, Soeldner JS, Eisenbarth G, Lindgren F, Sundquist G, Lernmark A (1987). Antibodies to a 64000-Mr islet cell antigen precede the clinical onset of insulin dependent diabetes. *J Clin Invest* 79: 926-934
- Baekkeskov S, Nielsen JH, Marnier B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark A (1982). Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate specific human pancreatic islet cell proteins. *Nature* 298: 167-169
- Banatvala JE, Scherthaner G, Schober E, DeSilva LM, Bryant J, Borckenstein M, Brown D, Menser MA, Silink M (1985). Coxsackie B, mumps, rubella and cytomegalovirus specific IgM responses in juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus in Britain, Austria and Australia. *Lancet* 1: 1409-1412
- Banting FG, Best CH (1922). The internal secretion of the pancreas. *J Lab Clin Med* 7: 251-266
- Barker CF, Naji A, Perloff L, Dafoe DC, Bartlett S (1982). Animal models of diabetes and immunological problems with islet allografts. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 28: 691-699
- Bieg S, Seissler J, Scherbaum WA (1995). Zytoplasmatische Inselzellantikörper und GAD-Antikörper in der Diabetesdiagnostik. *Med. Klin.* 90: 594-598
- Bingley PJ, Bonifacio E, Williams AJ, Genovese S, Bottazzo GF, Gale EA (1997). Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes* 46: 1701-1710
- Bingley PJ, Bonifacio EA, Gale EA (1993). Can we really predict IDDM? *Diabetes* 42: 213

- Bonifacio E, Bingley PJ, Shattock M, Dean BM, Dunger D, Gale EAM, Bottazzo GF (1990). Quantification of islet cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 335: 147-149
- Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E (1995). Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40K autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *J Immunol* 155: 5419-5426
- Bottazzo GF, Doniach D, Pouplard A (1976). Humoral autoimmunity in diabetes mellitus. *Acta Endocrinol suppl.* 205: 55-61
- Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D (1974). Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 2: 1279-1283
- Bottermann P (1991). Diabetes mellitus. In: Classen M, Diel V, Kochsiek K (eds). *Innere Medizin.* Urban und Schwarzenberg, München: 779-797
- Boulton AJM (1990): The diabetic foot: neuropathic in aetiology? *Diabetic Med* 7: 852-858
- Bretzel RG (1988). Grundlagen der Immuntherapie des insulinpflichtigen Diabetes mellitus. *Wiener Klin Wochenschr* 100: 435-442
- Bretzel RG, Browatzki CC; Schultz A, Brandhorst H, Klitscher D, Bollen CC, Raptis G, Friemann S, Ernst W, Rau WS, Hering BJ (1993). Klinische Inseltransplantation bei Diabetes mellitus. Erkenntnisse aus dem Inselzelltransplantationsregister und Erfahrungen am Zentrum Gießen. *Diab Stoffw* 2: 378-390.
- Bruining, GJ, Molenaar JL, Grobde DE, Hofmann A, Scheffer GJ, Bruining HA, De Bruin AM, Valkenburg HA (1987). Ten year follow up study of islet cell antibodies and childhood diabetes mellitus. *Lancet* 1: 1100
- Campbell IL, Harrison LC (1990). Molecular pathology of type 1 diabetes. *Mol Biol Med* 7: 299-309
- Chaillous FM, Delamaire M. et al. (1994). Combined analysis of islet cell antibodies which cross-react with mouse pancreas, antibodies to the Mr 64.000 islet protein, and antibodies to glutamate decarboxylase in subjects at risk for IDDM. *Diabetologia* 37: 491
- Childhood Diabetes in Finland Study Group (1998). IA-2 antibodies - a sensitive marker of IDDM with clinical onset in childhood and adolescence. *Diabetologia* 41: 424-429
- Christgau S, Schierbeck H, Aanstoot HJ, Aargaad L, Begley K, Kofod H, Hejnaes K, Baekkeskov S (1991). Pancreatic beta-cells express two autoantigenic forms of glutamic

acid decarboxylase, a 65-kDa hydrophilic form and a 64-kDa amphiphilic form which can be both membrane-bound and soluble. *J Biol Chem* 266: 21257-64

Christie M, Danemann D, Cliampagne P, Delovitch TL (1990). Persistence of serum antibodies to 64.000 Mr islet cell protein after onset of type I diabetes. *Diabetes* 39: 653

Consensus statement: Report and recommendations of the San Antonio conference on diabetes neuropathy (1988). *Diabetes Care* 11: 592-597

Dahlquist G, Blom L, Lönberg G (1991). The Swedish childhood diabetes study - a multivariate analysis of risk determinants for diabetes in different age groups. *Diabetologia* 34: 757-762

Dahlquist G, Blom L, Persson LA, Sandström A, Wall S (1990). Dietary factors and risk of developing insulin dependent diabetes in childhood. *Br Med J* 300: 1302-1306

DeAizpurua HJ, Harrison LC (1992). Glutamic acid decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diab Metab Rev* 8: 133-147

Delamaire M, Timsit J, Caillat-Zucman S, Maugeudre D, Roussely H, Semana G, Yamamoto AM, van Endert P, Boitard C, Genetet B, Bach JF (1995). HLA associated heterogeneity of the humoral response to islet antigens in insulin-dependent diabetes. *J. Autoimmun* 8: 645-657

Deschamps I, Lestrade H, Bonaiti C, Schmid M, Busson M, Benajam A, Marcelli-Barge A, Hors J (1980). HLA genotype studies in juvenile insulin-dependent diabetes. *Diabetologia* 19: 189-193

Diabetes Epidemiology Research Group (1988). Geographic patterns of childhood insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 37: 1113-1119

Dörner K (1989). Befunderstellung aus Analyseergebnissen. In: Dörner K, ed: *Klinische Chemie*, Enke Verlag, Stuttgart: 37-44

Duchen LW, Anjorin NA, Watkins PJ, Mackay JD (1980). Pathology in autonomic neuropathy in diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 92: 301-303

Dyck PJ, Giannini C (1996). Pathologic alterations in the diabetic neuropathies of humans: a review. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 1181-1193

Egeberg J, Junker K, Kromann H, Nerup J (1976). Autoimmune insulinitis. Pathological findings in experimental animal models and juvenile diabetes mellitus. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 205:129-137

- Erdo SL, Wolff JR (1990). Gamma-aminobutyric acid outside the mammalian brain. *J Neurochem* 54: 363-372
- Erlich HA (1990). HLA class II polymorphism and genetic susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Curr Top Microbiol Immunol* 164: 41-55
- Federlin K (1985). Diabetes mellitus und Immunologie - eine vielfältige Wechselbeziehung. *Immun Infekt* 13: 193-199
- Feldman EL, Stevens MJ, Greene DA (1997). Pathogenesis of diabetic neuropathy. *Clin Neurosci* 4: 365-370
- Genovely H, Pfeiffer MA (1988). RR-Variation: the autonomic Test of choice in diabetes. *Diabetes Metab Rev* 3: 255-271
- Genovese S, Bonfanti R, Bazzigaluppi E, Lampasona V, Benazzi E, Bosi E, Chiumello G, Bonifacio E (1996). Association of IA-2 autoantibodies with HLA DR4 phenotypes in IDDM. *Diabetologia* 39: 1223-1226
- Genovese S, Bonifacio E, McNally JM, Dean BM, Wagner R, Bosi E, Gale EAM, Bottazzo JF (1992). Distinct cytoplasmic islet cell antibodies with different risks for type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*: 385
- Gepts W, Veld PA (1987). Islet morphologic changes. *Diab Metabol Rev* 3: 859-872
- Gianini R, Pugliese A, Bonner-Weir A, Shiffrin J, Soeldner S, Erlich H, Awdeh CA, Jackson RA, Eisenbarth GS (1992). Prognostically significant heterogeneity of cytoplasmic islet cell antibodies in relatives of patients with type I diabetes. *Diabetes* 41: 347
- Greene DA, Sima AA, Stevens MJ, Feldman EL, Lattimer SA (1992). Complications: neuropathy, pathogenetic considerations. *Diabetes Care* 15: 1902-1925
- Greene DA, Sima AAF, Albers JW, Pfeifer MA (1990): Diabetic Neuropathy. In: Rifkin H, Porte D eds: *Diabetes mellitus*. New York: Elsevier: 710-755
- Hawa M, Rowe R, Lan MS, Notkins AL, Pozzilli P, Christie MR, Leslie RD (1997). Value of antibodies to islet protein tyrosine phosphatase-like molecule in predicting type 1 diabetes. *Diabetes* 46: 1270-1275
- Hendriksen C, Faber OK, Drejer J, Binder C (1977). Prevalence of residual B-cell function in insulin-treated diabetics evaluated by the plasma C-peptide response to intravenous glucagon. *Diabetologia* 13: 615-619

- Jaeger C, Brendel MD, Hering BJ, Eckhard M, Bretzel RG (1997). Progressive islet graft failure occurs significantly earlier in autoantibody positive than in autoantibody negative IDDM recipients of intrahepatic islet allografts. *Diabetes* 46: 1907-1910.
- Jaeger C, Hering BJ, Dyrberg T, Federlin K, Bretzel RG (1996). Islet cell antibodies and GAD 65 antibodies in IDDM patients undergoing kidney and islet after kidney transplantation. *Transplantation* 62: 424-426.
- Jansen FK, Muntefering H, Schmidt WA (1977). Virus induced diabetes and the immune system. I. Suggestion that appearance of diabetes depends on immune reactions. *Diabetologia* 13:545-9
- Johnson PC, Doll SC, Cromey DW (1986). Pathogenesis of diabetic neuropathy. *Ann Neurol* 19: 450-457
- Johnston C, Millward BA, Hoskins P, Leslie RDG, Bottazzo GF, Pyke DA (1989). Islet cell antibodies as predictor of the later development of type 1 (insulin dependent) diabetes. *Diabetologia* 32: 382
- Karjalainen J, Martin JM, Knip M, Ilonen J, Robinson BH, Savilahti EK, Akerblom HK, Dosch HM (1992). A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin dependent diabetes mellitus. *New Engl J Med* 327: 302-307
- Karjalainen JK (1990). Islet cell antibodies as predictive markers for IDDM in children with high background incidence of disease. *Diabetes* 39: 1144
- Karlsen AE, Hagopian WA, Grubin CE, Dube S, Disteché CM, Adler DA, Bärmeier H, Mathewes S, Grant FJ, Foster D, Lernmark A (1991). Cloning and primary structure of a human islet isoform of glutamic acid decarboxylase from chromosome 10. *Proc Natl Acad Sci (Wash.)* 88: 8337-41
- Kaufmann DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, Atkinson MA, Maclaren NK, Tobin AJ (1992). Autoimmunity of two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 89: 283-292
- Kawasaki E, Moriuchi R, Takino H, Okuno S, Takao Y, Maeda Y, Yokota A, Yamamoto H, Chikuba N, Akazawa S (1992). Autoantibodies to 64,000-M(r) islet cell protein in long-term type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 35: 748-752
- Kawasaki E, Takino H, Yano M, Uotani S, Matsumoto K, Yamaguchi Y, Akazawa S, Nagataki S (1994). Evaluation of islet specific autoantibodies in Japanese Patients with

IDDM: A comparison between autoantibodies to glutamic acid decarboxylase, autoantibodies to 64kDa islet cell protein and islet cell antibodies. *J Autoimmun* 7: 791-802

Kim J, Richter W, Aanstoot HJ, Shi Y, Fu Q, Rayotte R, Warnock G, Baekkeskov S (1993). Differential Expression of GAD 65 and GAD 67 in human, rat and mouse pancreatic islets. *Diabetes* 42: 1799

Krendel DA, Costigan DA, Hopkins LC (1995). Successful treatment of neuropathies in patients with diabetes mellitus. *Arch Neurol* 52:1053-1061

Kumar D, Gemayel NS, Deapen D, Kapadia D, Yamashita PH, Lee M, Dwyer JH, Roy-Burman P, Bray GA, Mack TM (1993). North-American twins with IDDM. Genetic, etiological, and clinical significance of disease concordance according to age, zygosity, and the interval after diagnosis in first twin. *Diabetes* 42: 1351-63

Lendrum R, Walker G (1976). Islet-cell antibodies in diabetes mellitus. *Lancet* 2: 1273-1276

Leslie RDG, Pyke DA (1986). The genetics of diabetes. In: Alberti KGMM, Krall LP (eds.), *The Diabetes Annual* 3. Amsterdam, Elsevier: 39-54

Marner B, Agner T, Binder C, Lernmark A, Nerup J, Mandrup-Poulsen T, Walldorff S (1985). Increased reduction in fasting C-peptide is associated with islet cell antibodies in type I (insulin dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 28: 875-880

Maron R, Elias D, de Jongh BM, Bruining GJ, van Rood JJ, Shechter Y, Cohen IR (1983). Autoantibodies to the insulin receptor in juvenile onset insulin-dependent diabetes. *Nature* 303: 817-8

Martino GV, Tappaz ML, Braghi S, Dozio N, Canal N, Pozza G, Bottazzo GF, Grimaldi LM, Bosi E (1991). Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase (GAD) detected by an immuno-trapping enzyme activity assay: relation to insulin-dependent diabetes mellitus and islet cell antibodies. *J Autoimmun* 4: 915-923

Mering JV, Minkowski O (1890). Diabetes mellitus nach Pankreasextirpation. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 26: 371-374

Montana E, Fernandez-Castaner M, Rosel P, Gomez J, Soler J (1991). Age, sex and ICA influence on beta-cell secretion during the first year after the diagnosis of type 1 diabetes mellitus. *Diabete Metab* 17: 460-468

Morgenthaler NG, Seissler J, Achenbach P, Glawe D, Payton M, Meinck HM, Christie MR, Scherbaum WA (1997). Antibodies to the tyrosine phosphatase-like protein IA-2 are highly

associated with IDDM, but not with autoimmune endocrine diseases or stiff man syndrome.

Autoimmunity 1997;25: 203-211

Muhr D, Mollenhauer U, Ziegler AG, Haslbeck M, Standl E, Schnell O (1997). Autoantibodies to sympathetic ganglia, GAD, or tyrosine phosphatase in longterm IDDM with and without ECG-based cardiac autonomic neuropathy. *Diabetes Care* 20: 1009-1012

Nakanishi K, Kobayashi T, Miyashita H, Ohkubo M, Sugimoto T, Murase T, Kosaka K, Inouye K, Kono M (1990). Relationship among islet cell antibodies, residual beta cell function and metabolic control in patients with IDDM of long duration: Use of a sensitive C-peptide radioimmunoassay. *Metabolism* 39: 925-930

National Diabetes Data Group (1979). Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 28: 1039

Newman B, Selby J, Lee M, King MC (1989). Genetic epidemiology of persistent islet cell antibodies among IDDM patients. *Genet Epidemiol* 6: 123-126

Payton MA, Hawkes CJ, Christie MR (1995). Relationship of the 37.000- and 40.000-M(r) tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 (ICA512). *J Clin Invest* 96: 1506-1511.

Petersen JS, Hejnaes KR, Moody A, Karlsen AE, Marshall MO, Hoier-Madsen M, Boel E, Michelsen BK, Dyrberg T (1994). Detection of GAD 65 antibodies in diabetes and other autoimmune diseases using a simple radioligand assay. *Diabetes* 43: 459-467

Petersen JS, Kyvik KO, Bingley PJ, Gale EA, Green A, Dyrberg T, Beck-Nielsen H (1997). Population based study of prevalence of islet cell autoantibodies in monozygotic and dizygotic Danish twin pairs with insulin dependent diabetes mellitus. *BMJ* 314: 1575-9

Petersen LD, Duinkerken G, Bruining GJ, van Lier RA, de Vries RR, Roep BO (1996). Increased numbers of in vivo activated T cells in patients with recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. *J Autoimmun* 9: 731-7

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

Proceedings of a consensus development conference on standardized measures in diabetic neuropathy (1992). Autonomic nervous system testing. *Diabetes Care* 15 Suppl: 1095-1103

- Rabinovitch A, Skyler JS (1998). Prevention of type 1 diabetes. *Med Clin North Am* 82: 739-755
- Rabinowe SL, Brown FM, Watts M, Kadrofske MM, Vinik AI (1989). Anti-sympathetic ganglia antibodies and postural blood pressure in IDDM subjects of varying duration and patients at high risk of developing IDDM. *Diabetes Care* 12: 1-6
- Rayfield EJ, Seto Y (1978). Viruses and the pathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes* 27: 1126
- Reaven GM (1988). Role of insulin resistance in human diseases. *Diabetes* 37: 1595-607
- Rich S, O'Neill G, Dalmasso AP, Nerl C, Barbosa J (1985). Complement and HLA. Further definition of high-risk haplotypes in insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 34: 504-509
- Richter W, Seissler J, Northemann W, Wohlfahrt S, Meinck HJ, Scherbaum WA (1993). Cytoplasmic islet cell antibodies recognize distinct islet antigens in type I diabetes but not in Stiff-man syndrom. *Diabetes* 42: 1642
- Riley WJ, Maclaren NK, Kirscher J, Spillar RP, Silverstein JH, Schatz DA, Schwartz S, Malone J, Shah S, Vadheim C, Rotter JI (1990). A prospective study of development of diabetes in relatives of patients with insulin dependent diabetes. *New Engl J Med* 323: 1167
- Roep BO (1996). T-cell responses to autoantigens in IDDM. The search for the Holy Grail. *Diabetes* 45: 1147-56
- Roep BO, Kallan AA, Duinkerken G, Arden SD, Hutton JC, Bruining GJ, de Vries RR (1995). T-cell reactivity to beta-cell membrane antigens associated with beta-cell destruction in IDDM. *Diabetes* 44: 278-83
- Roll U, Christie MR, Standl E, Ziegler AG (1994). Associations of anti - GAD antibodies with islet cell antibodies and insulin autoantibodies in first - degree relatives of type I diabetic patients. *Diabetes* 43: 154-160.
- Roll U, Ziegler AG (1997). Combined antibody screening for improved prediction of IDDM - Modern strategies. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105: 1-14.
- Rowley MJ, Mackay IR, Chen QY, Knowles WJ, Zimmet PZ (1992). Antibodies to glutamic acid decarboxylase discriminate major types of diabetes mellitus. *Diabetes* 41: 548-551
- Sanjeevi CB, Hagopian WA, Landin Olson M, Kockum I, Woo W, Palmer JP, Lernmark A, Dahlquist G (1998). Association between autoantibody markers and subtypes of DR4 and

DR4-DQ in Swedish children with insulin dependent diabetes reveals closer association of tyrosine pyrophosphatase autoimmunity with DR4 than DQ8. *Tissue Antigen* 51: 281-286

Savola K, Sabbah E, Kulmala P, Vähäsalo P, Ilonen J, Knip M (1998). Autoantibodies associated with Type I diabetes mellitus persist after diagnosis in children. *Diabetologia* 41: 1293-1297

Schiffrin A, Suissa S, Weitzner G, Poussier P, Lalla D (1992). Factors predicting course of B-cell function in IDDM. *Diabetes Care* 15: 997-1001

Schmidli RS, Colman PG, Bonifacio E, and participating laboratories (1994b). Disease sensitivity and specificity of 52 assays for glutamic acid decarboxylase antibodies. The second international glutamic acid decarboxylase antibody workshop. *Diabetes* 43: 1005-1009

Schmidli RS, Colman PG, Bonifacio E, Bottazzo GF, Harrison LC, and participating laboratories (1994a). High level of concordance between assays for glutamic acid decarboxylase antibodies. The first international glutamic acid decarboxylase antibody workshop. *Diabetes* 43: 1005-1009

Schmidli RS, DeAizpurua HJ, Harrison LC, Colman PG (1994c). Antibodies to glutamic acid decarboxylase in at-risk and clinical insulin-dependent diabetic subjects: relationship to age, sex and islet cell antibody status, and temporal profile. *J Autoimmun* 7: 55-66

Schmidt, MB (1902). Ueber die Beziehung der Langerhansschen Inseln des Pankreas zum Diabetes mellitus. *Münch. Med. Wochenschr.* 49: 51

Seissler J, Amann J, Mauch L, Haubruck H, Wolfahrt S, Bieg S, Richter W, Holl R, Heinze E, Northemann W, Scherbaum WA (1993). Prevalence of autoantibodies to the Mr 65.000 and Mr 67.000 isoforms of glutamate decarboxylase (GAD) in insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*: 1394

Seissler J, Hering B, Richter W, Glueck M, Yassin N, Bretzel RG, Boehm BO, Federlin K, Scherbaum WA (1992). Antibodies to the 64000-Mr (64K)protein in islet cell antibody positive non-diabetic individuals indicate high risk for beta-cell function. *Diabetologia* 35: 550

Serjeantson SW, Kohonen-Corish MRJ, Rowley MJ, Mackay IR, Knowles W, Zimmet P (1992). Antibodies to glutamic acid decarboxylase are associated with HLA-DR genotypes

in both Australiens and Asiens with type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 35: 996-100

Serrano-Rios M, Gutierrez-Lopez MD, Perez-Bravo F, Martinez MT, Antona J, Rowley M, Mackay I, Zimmet P (1996). HLA-DR, DQ and anti-GAD antibodies in first degree relatives of type I diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 34 Suppl: 133-139

Stracke H, Federlin K. Diagnosis and therapy of diabetic polyneuropathy (1993). *Z Gesamte Inn Med* 48: 259-261

Sugihara S, Sakamaki T, Konda S, Murata A, Wataki K, Kobayashi Y, Minamitani K, Miyamoto S, Sasaki N, Niimi H (1997). Association of HLA-DR, DQ genotype with different beta-cell functions at IDDM diagnosis in Japanese children. *Diabetes* 46: 1893-1897

Terasaki PE, Bernoco D, Park MS, Ozturk G, Iwai Y (1978). Microdroplet testing for HLA-A, HLA-B, HLA-C and HLA-D antigens. *Am. J. Clin. Pathol* 69: 103-120

Theophanides CG, Pyke DA, Watkins PJ (1978). Islet function in diabetics with persistent islet cell antibodies. *Diabetes* 27 Suppl 1:265-266

Thivolet CH, Tappaz M, Durand A, Petersen J, Stefanutti A, Chatelain P, Vialettes B, Scherbaum WA, Orgiazzi J (1992). Glutamic acid decarboxylase (GAD) autoantibodies are additional predictive markers of type I (insulin dependent) diabetes mellitus in high risk individuals. *Diabetologia* 35: 570

Thomas PK, Eliasson SG (1986): Diabetic neuropathy. In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge R eds: *Peripheral neuropathy Philadelphia: Saunders: 1773-1810*

Tilil H, Köbberling J (1987). Age corrected empirical genetic risk estimates for first degree relatives of IDDM patients. *Diabetes* 36: 93-99

Timsit J, Caillat-Zucman S, Blondel H, Chedin P, Bach JF, Boitard C (1992). Islet cell heterogeneity among type I (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 35: 792

Todd JA, Acha-Orbea H, Bell JI, Chao N, Fronck Z, Jacob CO, McDermott M, Sinha AA, Timmerman L, Steinman L, et al. (1988). A molecular basis for MHC class II-associated autoimmunity. *Science* 240: 1003-9

Togun RA, Resetskova E, Kawai K, Enomoto T, Volpe R (1997). Activation of CD8+ T lymphocytes in insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Immunol Immunopathol* 82: 243-9

- Tun RY, Peakman M, Alviggi L, Hussain MJ, Lo SS, Shattock M, Pyke DA, Bottazzo GF, Vergani D, Leslie RD (1994). Importance of persistent cellular and humoral immune changes before diabetes develops: prospective study of identical twins. *BMJ* 308: 1063-1068
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) (1994). XI: Biochemical risk factors in type 2 diabetic patients at diagnosis compared with age-matched normal subjects. *Diabet Med* 11: 534-544
- Virtanen SM, Räsänen L, Aro A, Lindström J, Sippola H, Lounamaa R, Toivanen L, Tuomilehto J, Akerblom HK (1991). Infant feeding in finish children < 7 yr of age with newly diagnosed IDDM. *Diabetes Care* 14: 415-417
- WHO-Expert Committee on diabetes mellitus. Second report (1980). WHO Technical Report Series No. 646, Genf; WHO.
- Wolf E, Spencer KM, Cudworth AG (1983). The genetic susceptibility to type 1 (insulin-dependent) diabetes: analysis of the HLA-DR association. *Diabetologia* 24: 224-230
- Yoon JW, Jun HS, Santamaria P (1998). Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. *Autoimmunity* 27: 109-22
- Zanone MM, Petersen JS, Peakman M, Mathias CJ, Watkins PJ, Dyrberg T, Vergani D (1994). High prevalence of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in long-standing IDDM is not a marker of symptomatic autonomic neuropathy. *Diabetes* 43: 1146-1151
- Ziegler AG, Eisenbarth GS (1990a). Immunology of diabetes. In: Alberti KGMM, Krall LP (eds.), *The Diabetes Annual* 5. Amsterdam, Elsevier Science Publishers: 22-50
- Ziegler AG, Jackson RA, Soeldner JS, Eisenbarth GS (1990b). Predicting Type I Diabetes. *Diabetes Care* 13: 762-775
- Ziegler AG, Rabl W, Standl E (1991). Insulin autoantibodies (IAA) and islet cell antibody (ICA) in recently appearing diabetes mellitus type I. Association with age of manifestation and HLA phenotype. *Dtsch Med Wochenschr* 116: 1737-41
- Ziegler D, Gries FA (1994): Diagnostik und Therapie der kardiovaskulären autonomen diabetischen Neuropathie. *Diab Stoffw* 3: 22-31
- Zimmet PZ, Collins VR, Dowse GK, Knight LT (1992). Hyperinsulinaemia in youth is a predictor of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 35: 534-541

Zimmet PZ, Rowley MJ, Machay JR, Knowles J, Chen QY, Chapman H, Serjeantson SW (1993). The ethnic distribution of antibodies to glutamic acid decarboxylase: presence and levels in insulin-dependent diabetes mellitus in European and Asian subjects. *J Diab Comp* 7: 1-7

7. ANHANG

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen:

- Abb. 1: Schema zur Transkription der GAD 65 kodierenden DNA
- Abb. 2: Schema zur Translation der GAD 65 kodierenden messenger RNA
- Abb. 3: Schema zur Trennung von freier und an GAD 65 gebundener Aktivität
- Abb. 4: Schema zur Immunpräzipitation der GAD 65 Antikörper
- Abb. 5: Schema zur Adsorption der GAD 65 Immunkomplexe
- Abb. 6: Schema zur Bestimmung der Radioaktivität zur Quantifizierung der GAD 65 Antikörper
- Abb. 7: Auswertung eines binären Testes als Vierfeldermatrix
- Abb. 8: Prävalenz der GAD 65 Autoantikörper
- Abb. 9: Geschlechtsabhängige Verteilung positiver ICA und GAD 65 Ak-Index Werte
- Abb. 10: Geschlechtsverteilung der ICA-Werte in JDF Units
- Abb. 11: Geschlechtsverteilung der GAD 65 Ak-Index Werte
- Abb. 12: Beziehung zwischen Diabetesdauer und GAD 65 Ak-Index
- Abb. 13: Beziehung zwischen Diabetesdauer und ICA

Abb. 14: Nachweisbarkeit von GAD 65 Ak und ICA in Abhängigkeit der Diabetesdauer

Abb. 15: Beziehung zwischen GAD 65 AK-Index und Höhe der ICA Titer

Abb. 16: C-Peptid Sekretion und Diabetesdauer

Tabellen

Tabelle 1: Charakterisierung der Kollektive

Tabelle 2: Übereinstimmung der Patienten mit und ohne HLA-Status

Tabelle 3: Intra-Assay-Variationskoeffizient

Tabelle 4: Inter-Assay-Variationskoeffizient

Tabelle 5: Prävalenz der bestimmten Autoantikörper

Tabelle 6: Häufigkeit der HLA-DR Phänotypen bei Vorkommen oder Fehlen von GAD 65 und ICA Autoantikörpern

Tabelle 7: Prävalenz von GAD 65 Ak und ICA mit peripherer Neuropathie (PNP) und autonomer Neuropathie (ANP)

Tabelle 8: Prävalenz von GAD 65 Ak und ICA bei Patienten mit residualer C-Peptid Sekretion im Glucagon-Test

Publikationsverzeichnis

Originalarbeit:

Jaeger C, Allendörfer J, Hatzigelaki E, Dyrberg T, Bergis KH, Federlin K, Bretzel RG (1997). Persistent GAD 65 antibodies in longstanding IDDM are not associated with residual betacell function, neuropathy or HLA-DR status. Hormon Metabolic Research 29: 510-515.

Kongressbeiträge:

Jaeger C, Allendörfer J, Hatzigelaki E, Federlin K, Bretzel RG: High concordance of GAD 65 antibodies and islet cell antibodies in recent onset IDDM patients and in IDDM of long duration. 16th IDF Congress in Helsinki, Finland 20-25 July, 1997 (Poster). Abstract in Diabetologia 40 Suppl. 1: 277.

Jaeger C, Allendörfer J, Hatzigelaki E, Dyrberg T, Bergis KH, Federlin K, Bretzel RG (1997). Persistent GAD 65 antibodies in longstanding IDDM are not associated with residual betacell function, neuropathy or a certain HLA-DR status. 16th IDF Congress in Helsinki, Finland 20-25 July, 1997 (Poster). Abstract in Diabetologia 40 Suppl. 1: 292.

Jaeger C, Allendörfer J, Dyrberg T, Petersen JS, Hering BJ, Bretzel RG, Federlin K: ICA but not GAD 65 autoantibodies are affected by immunosuppressive therapy following kidney transplantation in IDDM patients. 31 Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes EASD in Stockholm 1995 (Poster). Abstract in Diabetologia 38 Suppl 1: 100.

Lebenslauf

geboren am 08.04.1967 in Gießen; verheiratet, drei Kinder

Grundschule in Alten-Buseck	1973-1977
Landgraf-Ludwig-Gymnasium in Gießen	1977-1986
Allgemeine Hochschulreife	1986
Zivildienst in der Krankenpflege im St. Josefs Krankenhaus in Gießen	1986-1988

Beruflicher Werdegang

Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen	1988-1995
Experimenteller Teil der vorliegenden Dissertation an der Med. Klinik III und Poliklinik der Justus Liebig Universität Gießen	1994-1995
Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung	24.04.1995
Arzt im Praktikum: Abteilung für Allgemeinpsychiatrie am Psychiatrischen Krankenhaus Gießen (PKH)	01.07.-31.12.1995
Asklepios Neurologische Klinik Bad Salzhausen, Rehabilitations- und Akutabteilung	01.01.-31.12.1996
Approbation als Arzt	02.01.1997
Assistenzarzt der Stroke Unit der Akutabteilung der Neurologischen Klinik Bad Salzhausen Rehabilitationsabteilung	01/1997 - 04/1999 seit 01.05.1999

Danksagungen

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Federlin für die Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation und die Bereitstellung der Laboratorien.

Herrn Prof. Dr. med. R. G. Bretzel danke ich für die Übernahme der Dissertation nach der Emeritierung von Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Federlin und die Hinweise bei der Durchsicht des Manuskriptes.

Herrn Dr. med. C. Jaeger danke ich herzlich für die hervorragende Betreuung, der durch seine motivierende Unterstützung und stetige Diskussionsbereitschaft ein produktives und angenehmes Arbeiten ermöglichte und so ganz wesentlich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen hat.

Ebenfalls möchte ich den Mitarbeitern des Immunologischen Laboratoriums der Medizinischen Klinik III und Poliklinik herzlich danken, stellvertretend sei Herr M. Stein genannt, die durch ihre Hilfsbereitschaft und durch technische Unterstützung im Laboralltag unentbehrlich waren.

Dem Hochschulrechenzentrum gilt mein Dank für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der vorliegenden Dissertation.