

Aus der III. Medizinischen Abteilung des Akademischen Lehrkrankenhauses  
München-Schwabing  
Vorstand: Professor Dr. Eberhard Standl

und aus der klinisch-experimentellen Abteilung  
des Instituts für Diabetesforschung  
Leitung: Professor Dr. Anette-G. Ziegler

**Charakterisierung der humoralen Autoimmunität  
im Verlauf der präklinischen Phase  
des Typ 1 Diabetes**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Katharina Warncke  
aus  
München

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Anette-G. Ziegler  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Reincke

Mitberichtersteller: Prof. Dr. B. Göke  
Prof. Dr. Th. Brocker  
Prof. Dr. A. Roscher

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Peter Achenbach

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.05

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Zielstellung</b> .....	<b>6</b>
<b>3. Grundlagen des Typ 1 Diabetes</b> .....	<b>7</b>
<b>4. Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
4.1. Untersuchungsgruppen .....	18
4.2. Methoden .....	19
4.2.1. Radioimmunoassays .....	20
4.2.1.1. Bestimmung der Inselautoantikörper GADA und IA-2A .....	20
4.2.1.2. Bestimmung der Autoantikörper gegen Insulin.....	21
4.2.1.3. Bestimmung der Epitop-Spezifitäten .....	21
4.2.1.4. Analyse der IgG Subklassen und Isotypen der Antikörper .....	24
4.2.2. Statistik.....	25
<b>5. Ergebnisse</b> .....	<b>26</b>
5.1. Autoantikörper-Dynamik im Verlauf .....	26
5.1.1. Anzahl und Spezifität der Autoantikörper im Verlauf.....	26
5.1.2. Autoantikörper-Titer im Verlauf .....	29
5.1.3. Epitop-Spezifität von GADA und IA-2A im Verlauf.....	32
5.1.4. IgG Subklassen und Isotypen von GADA, IA-2A und IAA im Verlauf .....	34
5.1.5. Assoziation zwischen Autoantikörper-Titer, Subklassen- und Epitop-Spezifität ..	37
5.2. Risiko für Typ 1 Diabetes bei erstgradig Verwandten .....	39
5.2.1. Verwandtschaftsgrad, Geschlecht, Alter und assoziiertes Diabetesrisiko .....	39
5.2.2. Autoantikörper-Anzahl und assoziiertes Diabetesrisiko.....	40
5.2.3. Antikörper-Spezifität und assoziiertes Diabetesrisiko .....	41

5.2.4. Autoantikörper-Titer, Titerdynamik und assoziiertes Diabetesrisiko.....	43
5.2.5. Epitop-Spezifität, Subklassen und Isotypen und assoziiertes Diabetesrisiko .....	47
5.2.5.1. Epitop- und Subklassen-Spezifität von GADA und assoziiertes Risiko.....	47
5.2.5.2. Epitop-Spezifität von IA-2A und assoziiertes Risiko .....	47
5.2.5.3. Subklassen- und Isotypen-Spezifität von IA-2A und assoziiertes Risiko .....	49
5.2.5.4. Subklassen-Spezifität von IAA und assoziiertes Risiko .....	51
5.2.6. Autoantikörper und assoziiertes Risiko – Multivariate Analyse .....	53
5.3. Autoantikörper bei Personen mit schneller Diabetes-Progression bzw. mit langem Follow-up ohne Entwicklung von Typ 1 Diabetes.....	55
5.3.1. Alter, Autoantikörper-Anzahl und –Spezifitäten.....	55
5.3.2. Autoantikörper-Titer bei Verwandten mit T1D-Progression und -Protektion .....	56
5.3.3. Epitop- und Subklassen-Spezifität von GADA .....	57
5.3.4. Epitop- und Subklassen-Spezifität von IA-2A .....	57
5.3.5. Subklassen-Spezifität von IAA .....	59
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>60</b>
<b>7. Zusammenfassung .....</b>	<b>69</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
<b>9. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>Vorveröffentlichungen .....</b>	<b>85</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>86</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>87</b>

## 1. Einleitung

Der insulinpflichtige Diabetes mellitus Typ 1 (Typ 1 Diabetes) ist eine chronische Erkrankung, die durch eine selektive, autoimmune Zerstörung der Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas entsteht (40). In Deutschland leiden ungefähr 0,3% der Bevölkerung an Typ 1 Diabetes. Weltweit hat die Zahl der Neuerkrankungen in den letzten Jahren stetig zugenommen (99). Typ 1 Diabetes kann in jedem Alter auftreten (70). Etwa 40% der Patienten entwickeln die Erkrankung bereits vor dem zwanzigsten Lebensjahr. Anstiege in der Inzidenz werden im Alter von 2, 4-6 und 10-14 Jahren beobachtet (98). Damit ist der Typ 1 Diabetes eine der häufigsten und schwerwiegendsten, chronischen Erkrankungen bei Kindern. Die Spätfolgen des Typ 1 Diabetes wie terminale Niereninsuffizienz, Blindheit, Amputationen und kardiovaskuläre Erkrankungen verursachen bei vielen Langzeitpatienten erhebliche individuelle Einschränkungen in der Lebensqualität und stellen eine jährliche sozioökonomische Belastung in Milliardenhöhe dar. Deshalb ist die Suche nach Interventionstherapien zur Prävention der Erkrankung heute eine der vorrangigen Herausforderungen in der medizinischen Forschung.

Die genaue Ätiologie und Pathogenese der Erkrankung ist bisher nicht bekannt. Die klinische Manifestation des Typ 1 Diabetes stellt einen Zeitpunkt in der Krankheitsentwicklung dar, an dem nur noch etwa 10-20% der ursprünglichen  $\beta$ -Zell-Masse vorhanden ist (40, 42), und der Blutzuckerspiegel aufgrund des Insulinmangels nicht mehr ausreichend reguliert werden kann. Der autoimmune Prozess der  $\beta$ -Zellzerstörung vollzieht sich jedoch bereits vor Manifestation der Erkrankung über einen individuell variablen Zeitraum von wenigen Monaten bis zu mehreren Jahren, und setzt sich auch danach noch bis zum vollständigen Verlust aller  $\beta$ -Zellen fort (8, 9, 72). Da bislang keine Möglichkeit zur routinemäßigen Bestimmung der  $\beta$ -Zell-Masse in vivo besteht, können Aussagen zur Progression der  $\beta$ -Zellzerstörung in der präklinischen Phase des Typ 1 Diabetes nur indirekt über die Bestimmung von metabolischen und immunologischen Markern getroffen werden. Eine Autoimmunreaktion gegenüber den  $\beta$ -Zellen kann heute schon frühzeitig durch die Messung von Autoantikörpern im Serum erkannt werden; und zwar noch bevor erste metabolische Störungen im intravenösen oder oralen Glukosetoleranztest auftreten. Diese Fähigkeit zur Früherkennung von Inselautoimmunität ermöglicht es prinzipiell, betroffene Personen zu einem Zeitpunkt zu identifizieren, an dem

noch eine ausreichende  $\beta$ -Zell-Masse vorhanden ist, und ihnen die Teilnahme an Immuninterventionsstudien zur Prävention der Erkrankung anzubieten.

Die derzeit am besten untersuchten und für die Diabetesprädiktion verwendeten Immunmarker sind die Autoantikörper gegen Insulin (IAA), Glutamat-Decarboxylase (GADA) und das Protein Tyrosin Phosphatase (PTP)-homologe Inselzellantigen IA-2 (IA-2A). Der alleinige Nachweis dieser Inselautoantikörper im Serum ist jedoch nicht zwangsläufig mit einer schnellen Diabetesentwicklung verbunden. So ist bei einigen Personen mit einem familiären Diabetesrisiko das Auftreten einzelner Autoantikörper zu beobachten, die zum Teil im weiteren Verlauf wieder verschwinden (transiente Antikörper), aber auch über viele Jahre im Serum persistieren können, ohne jedoch ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes darzustellen. Das individuelle Risiko erhöht sich allerdings deutlich, sobald mehrere Autoantikörper nachweisbar sind (8, 14, 15, 48, 69, 73, 74, 110, 111, 124). Etwa die Hälfte aller Personen mit drei positiven Markern entwickelt innerhalb von 5 Jahren Diabetes. Die Entwicklung multipler Inselautoantikörper erscheint daher als ein bedeutender Schritt in der Pathogenese der Erkrankung, der Aussagen über die Progredienz der Krankheitsentwicklung zulässt. Es wird gleichzeitig aber auch deutlich, dass der bloße Nachweis von mehreren Autoantikörpern bei einem Teil der betroffenen Personen eine schnelle Progression der  $\beta$ -Zellzerstörung nicht vorhersagen kann. Eine detailliertere Charakterisierung der humoralen Immunantwort erscheint deshalb zur besseren Diskriminierung des Risikos bei Autoantikörper-positiven Personen, und besonders im Hinblick auf die Rekrutierung von „geeigneten“ Teilnehmern für Immuninterventionsstudien, als sinnvoll.

Die Bestimmung zusätzlicher Marker wie Titer, Epitop- und Immunglobulin-Subklassenspezifität von Inselautoantikörpern bietet eine viel versprechende Möglichkeit zur besseren Einschätzung des Risikos einer Diabetesentwicklung bei erstgradig Verwandten von Patienten mit Typ 1 Diabetes. Bisher wurden diese Parameter nur von wenigen Arbeitsgruppen untersucht, und die vorliegenden Studien konzentrierten sich zudem meist auf die Analyse einzelner Marker (z.B. IgG Subklassen oder Epitop-Spezifität von Inselautoantikörpern). Ein derartiges Studiendesign bietet jedoch nicht die Möglichkeit, den komplexen Charakter der humoralen Autoimmunantwort und eine eventuelle Interaktion von verschiedenen Markern zu erkennen, wodurch wesentliche pathogenetische Zusammenhänge verborgen bleiben könnten.

In der vorliegenden Arbeit werden erstmalig die Dynamik und das Zusammenspiel

verschiedener Autoantikörper-Charakteristika bei erstgradig Verwandten über einen langen Zeitraum untersucht. Dazu wird die humorale Immunantwort in 423 Verlaufsseren von 143 Autoantikörper-positiven Verwandten aus der Bart's Oxford und Münchner Familienstudie analysiert. Dieses Studienkollektiv stellt die weltweit größte und am längsten prospektiv nachverfolgte Kohorte von Inselautoantikörper-positiven Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes dar. Antikörper-Titer, IgG Subklassen und Isotypen sowie die Epitop-Spezifitäten der Diabetes-assoziierten Autoantikörper gegen Insulin, Glutamat-Decarboxylase und IA-2 werden bestimmt und im Hinblick auf ihren prädiktiven Wert für die Entwicklung von Typ 1 Diabetes in univariaten und multivariaten Time-to-Event Analysen untersucht. Die Größe der Studienkohorte, der lange Beobachtungszeitraum und die Komplexität der Analyse erlauben einen bisher einzigartigen Einblick in den Verlauf der humoralen Autoimmunität bei Personen mit familiärer Diabetesbelastung und ermöglichen die Identifizierung potentieller neuer Screening-Parameter zur besseren Einschätzung der Progression des Typ 1 Diabetes.

## 2. Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit soll die humorale Autoimmunantwort gegenüber Inselantigenen bei erstgradig Verwandten von Patienten mit Typ 1 Diabetes im Verlauf charakterisiert werden. Die Arbeit soll zum besseren Verständnis der Pathogenese des Typ 1 Diabetes und zur besseren Prädiktion der Erkrankung beitragen.

Spezifische Fragestellungen:

- 1) Sind Verlaufsuntersuchungen bei Autoantikörper-positiven Personen hinsichtlich der Prädiktion des Typ 1 Diabetes notwendig, oder ist ein initiales, einmaliges Screening auf bestimmte Autoantikörper-Charakteristika ausreichend, um das Diabetesrisiko einschätzen zu können?
- 2) Welche Antikörper und/ oder Antikörper-Kombinationen sind mit einem erhöhten bzw. verminderten Diabetesrisiko assoziiert? Gehen Diabetes-assoziierte Antikörper im Verlauf wieder verloren? Tragen die Bestimmung der Epitop-Spezifität von GADA und IA-2A sowie die Bestimmung von Antikörper-Subklassen und -Isotypen zu einer Verbesserung der Prädiktion des Typ 1 Diabetes bei?
- 3) Bleiben die im initialen Screening ermittelten Autoantikörper-Profile individuell stabil, oder können im Verlauf spezifische (regelmäßige) Veränderungen in den Profilen beobachtet werden? Gibt es altersabhängige Unterschiede hinsichtlich der Autoantikörperprofile im Verlauf? Inwieweit lassen sich daraus Aussagen zur Progression des Autoimmunprozesses treffen?
- 4) Ist das Autoimmungeschehen in der prädiabetischen Phase ein langsam progredient fortschreitender, "linearer" Prozess oder gibt es dynamische Verläufe mit Neuentwicklung und Verlust von Antikörpern? Gibt es Schwankungen und Spitzenwerte (Peaks) im Autoantikörper-Titer, die auf eine besondere (Re-)Aktivierung des Immunsystems schließen lassen? Lassen sich spezifische Muster im gemeinsamen Auftreten (Titeranstieg) bzw. gemeinsamen Verschwinden (Titerabnahme) von bestimmten Antikörper-Subklassen/ Isotypen zusammen mit bestimmten Epitop-Spezifitäten erkennen?
- 5) Wie unterscheiden sich Autoantikörper-Spezifitäten und -verläufe von Personen, die innerhalb kurzer Zeit (<5 Jahre) nach Antikörper-Detektion einen Typ 1 Diabetes entwickeln, von den Reaktionsmustern Autoantikörper-positiver Personen, die über lange Zeit (>10 Jahre) Antikörper aufweisen und dennoch keinen Typ 1 Diabetes entwickeln?

### 3. Grundlagen des Typ 1 Diabetes

#### Ätiologie und Pathogenese

Typ 1 Diabetes (T1D) ist eine chronische, multifaktorielle Autoimmunerkrankung. Es wird vermutet, dass neben einer genetischen Prädisposition bisher noch unbekannte exogene Faktoren am Auftreten einer gestörten Immunregulation beteiligt sind. Verwandte ersten Grades von Erkrankten haben gegenüber der Normalbevölkerung ein 10fach erhöhtes Risiko, an Diabetes zu erkranken (39). Bei Geschwistern ist das Erkrankungsrisiko von der Übereinstimmung im HLA-Typ abhängig und schwankt zwischen 1% (keine Übereinstimmung) und 20% (homozygote Übereinstimmung im HLA-Typus mit diabetischem Geschwisterkind). Für einige Genotypen besteht ein sehr hohes Risiko, Antikörper gegen Inselzellantigene und letztendlich T1D zu entwickeln (z.B. DRB1\*0302-DQA1\*0301/DRB1\*0201-DQA1\*0501). Dagegen zeigen andere Haplotypen nur eine geringe Assoziation mit T1D oder wirken gar protektiv (z.B. DRB1\*0602-DQA1\*0102) (90).

Die Diabetes-Konkordanz eineiiger Zwillinge von 40-50% legt nahe, dass der Ausbruch der Erkrankung neben genetischen auch von exogenen Faktoren beeinflusst wird. Eine Reihe von Faktoren werden als Auslöser für Typ 1 Diabetes diskutiert (43): Stlldauer und Stillhäufigkeit, frühe Exposition gegenüber Kuhmilch oder glutenhaltiger Nahrung, virale Infektionen, Impfungen. Bislang konnte keiner der Faktoren signifikant in Zusammenhang mit der Krankheitsmanifestation gebracht werden (33, 59, 89). In zwei kürzlich publizierten Arbeiten wurde jedoch eine Assoziation zwischen dem Auftreten von Inselzell-Autoimmunität bei Kleinkindern und einer frühen Gabe von Gluten bzw. Getreidebestandteilen in der Säuglingsernährung beobachtet (88, 125).

Pathologisch-anatomisch liegt dem Typ 1 Diabetes eine Zerstörung der Insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas zugrunde. Dem Ausbruch der Erkrankung geht eine monate- bis jahrelange Phase der prädiabetischen Insulitis voraus, in der die Inseln mit einer heterogenen Zellpopulation aus CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen sowie dendritischen Zellen infiltriert werden (24, 53, 61). Vom Beginn der Zerstörung der Zellen bis zum Ausbruch der Erkrankung können Jahre vergehen, da kleine Mengen Insulin ausreichen, die Glucosehomöostase im Körper aufrecht zu erhalten. Erst wenn der größte Teil der  $\beta$ -Zellen zerstört ist - nach histologischen Untersuchungen bis zu 90% - reicht die Insulin-

Produktion der verbleibenden Zellen nicht mehr aus, und der Typ 1 Diabetes wird klinisch manifest (42).

Es wird vermutet, dass sich die Autoimmunreaktion initial gegen einzelne Inselzellantigene richtet, und dass im Verlauf der  $\beta$ -Zellzerstörung weitere Bestandteile der Inselzellen vom Immunsystem als Autoantigene erkannt werden. Die Ausweitung der Autoimmunreaktion gegen verschiedene Zielantigene (Antigenspreading) könnte dabei sogar von einer „Immunisierung“ gegen ein definiertes, aber möglicherweise in Abhängigkeit von Alter und Umwelteinflüssen individuell variables „primäres“ Antigen ausgehen. Die Daten der BABYDIAB Studie liefern Hinweise darauf, dass Insulin dieses initiale Inselzellantigen bei Kleinkindern darstellen könnte (124).

Bereits viele Jahre vor Ausbruch der Erkrankung sind Autoantikörper gegen Inselantigene im peripheren Venen- und Kapillarblut nachweisbar (15). Im Gegensatz zu gegen Inselantigene gerichteten T-Zellen, die im peripheren Blut derzeit nur mit großer Schwierigkeit zu detektieren sind (7), können gegen Inselzellantigene gerichtete Autoantikörper im peripheren Blut mit sensitiven und international standardisierten Methoden gemessen werden. Deshalb ist die Messung von Autoantikörpern als Mittel zur Erfassung von Autoimmunität in der prädiabetischen Phase geeignet und wird für die Diagnostik und Prädiktion des Typ 1 Diabetes genutzt.

#### Typ 1 Diabetes assoziierte Autoantikörper

Die für Diagnostik und Prädiktion des Typ 1 Diabetes derzeit bedeutendsten humoralen Marker sind Autoantikörper gegen Insulin (IAA) (91), Glutamatdecarboxylase (GAD) (10), die Protein Tyrosin Phosphatase (PTP)-homologen Proteine IA-2 (ICA 512) (76, 97) und IA-2 $\beta$  (Phogrin) (82, 119) sowie die cytoplasmatischen Inselzellantikörper (ICA) (25). Die Bestimmung von Autoantikörpern gegen diese Hauptzielantigene stellt eine wesentliche Grundlage zur Abschätzung des Risikos für T1D bei nicht-diabetischen Personen dar.

Darüber hinaus sind in den letzten 20 Jahren eine Reihe von Zielantigenen von Antikörpern und zum Teil auch von autoreaktiven T-Zellen identifiziert worden. Die Immunreaktionen gegenüber diesen Antigenen sind allerdings weniger sensitiv und/ oder spezifisch für den Typ 1 Diabetes bzw. wurden bisher in nur wenigen Studien reproduziert. Als Kandidaten-Antigene, die in neuroendokrinen Zellen vorkommen, wurden

beschrieben: Proinsulin (71), Carboxypeptidase H (29), ein Inselzellautoantigen von 69 kDa (ICA 69) (94), ein Antigen von 38 kDa (Glima 38) (1), Insel-Amyloid-Polypeptid-Precursor Protein (preproIAPP) (92), ein  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein S100 $\beta$  (121), das Lipid Antigen Sulfatide (27) sowie die Ganglioside GM2-1 (38) und GT3 (46). Weitere Proteine, die nicht ausschließlich in neuroendokrinen Zellen vorkommen, sind als Ziele humoraler und/ oder zellulärer Immunantwort beschrieben: DNA-Topoisomerase II (31), die Hitzeschockproteine (HSP) HSP 60 (3), HSP 70 (4) und HSP 90 (96), der membran-assoziierte Glucose-Transporter 2 (GLUT2) (60), ein mitochondriales Inselzellantigen von 38 kDa (Imogen 38) (6), und die Transkriptionsfaktoren Jun-B (56) und SOX 13 (63). Darüber hinaus existieren drei Kandidatenantigene neuroendokrinen Ursprungs, gegen die eine Immunreaktion bisher nur in der NOD-Maus gezeigt werden konnte: Das im Zytosol befindliche Protein Peripherin (18), sowie die beiden erst vor kurzem identifizierten Proteine Hepatocarcinoma-Intestine-Pankreas/ Pankreas-assoziiertes Protein (HIP/ PAP) (50) und das Insel-spezifische Glucose-6-Phosphatase homologe Protein (IGRP) (78). Diese Antigene und ihre Relevanz im Hinblick auf den Typ 1 Diabetes sind noch Gegenstand der Forschung und werden derzeit nur im Rahmen experimenteller Studien und nicht als Parameter für Diagnostik und Prädiktion des T1D eingesetzt.

#### Antikörper gegen Insulin (IAA)

Autoantikörper gegen körpereigenes Insulin wurden bereits 1983 (91) im Serum von noch nicht mit Insulin behandelten, neu diagnostizierten Personen mit T1D entdeckt. Insulin ist das einzige bisher bekannte  $\beta$ -Zell-spezifische humorale Antigen. Die Epitope, die von Insulin-Autoantikörpern erkannt werden, werden auf der A-Kette (Aminosäure 8-13) und auf der B-Kette (AS 1-3) des Moleküls vermutet (30).

IAA spielen insbesondere in der Diagnostik und Prädiktion des Typ 1 Diabetes bei Kindern eine wichtige Rolle. Es besteht eine inverse Korrelation zwischen dem Alter des Auftretens von Insulin-Autoantikörpern und dem Alter bei Diabetes-Manifestation (116, 124). IAA sind bei Kleinkindern häufig die ersten detektierbaren Antikörper und sind deshalb ein wichtiges Instrument zur Diabetes-Früherkennung (123). Die Frequenz von IAA in der Normalbevölkerung (Schulkinder) beträgt ca. 3,0% (111) und bei den erstgradig Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes 2,5-6,7%. (69). IAA werden bei 50-70% (114, 116) der neu entdeckten, noch nicht mit Insulin behandelten Typ 1 Diabetiker gefunden, bei Patienten mit einem Manifestationsalter unter 5 Jahren beträgt die

Prävalenz von IAA annähernd 100% (116). Der frühere „Goldstandard“ zur Messung von Insulin-Autoantikörpern, der PEG- (Polyäthylenglykol) Assay nach Soeldner (115), war aufwändig in der Durchführung (Zeitaufwand: eine Woche) und benötigte eine relativ große Serummenge (600µl). Letzteres erschwerte vor allem die Bestimmung der IAA bei Kleinkindern. Mit neuen Mikroassays, die mit einer Serummenge von insgesamt 20µl durchgeführt werden und weniger Inkubationszeit benötigen (drei Tage), können Insulin-Autoantikörper inzwischen ebenso sensitiv und spezifisch nachgewiesen werden (85, 120).

#### Antikörper gegen Glutaminsäuredecarboxylase (GADA)

GAD (Glutaminsäuredecarboxylase) ist ein häufiges Ziel der humoralen und zellulären Immunantwort beim Typ 1 Diabetes (41). Ein zuvor als 64 kDa Antigen beschriebenes Protein wurde 1990 als das  $\gamma$ -Amino-Buttersäure (GABA) synthetisierende Enzym identifiziert (10) und wird sowohl in Inselzellen als auch in Hirnhomogenaten gefunden. Es existieren 2 Isoformen von GAD: GAD 65 mit einem Molekulargewicht von 65 kDa und einer Länge von 585 Aminosäuren und GAD 67 mit einem Molekulargewicht von 67 kDa und einer Länge von 593 AS (52, 64), deren Aminosäuresequenz zu 70% identisch ist. Etwa 80% der Patienten mit T1D sind zum Zeitpunkt der klinischen Manifestation GADA-positiv. 3% der Normalbevölkerung und 6-13% der erstgradig Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes weisen Antikörper gegen GAD auf. GADA werden bei bis zu 90% der prädiabetischen Personen detektiert (13, 19, 52, 106, 118). GAD-Antikörper treten jedoch auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wie dem Stiffman-Syndrom und dem polyendokrinen Syndrom auf (79, 107, 109, 112). GADA-Positivität kennzeichnet darüber hinaus eine Sonderform des Typ 1 Diabetes, den LADA (latent autoimmune diabetes in adults), die meist nach dem 40. Lebensjahr auftritt und klinisch oft als Typ 2a Diabetes eingestuft wurde (80, 101, 113). Um die Spezifität von GADA als diagnostischen Marker für T1D zu erhöhen, wurde versucht, einzelne Epitope in der Aminosäuresequenz zu detektieren, die das Risiko für die einzelnen mit GADA-Positivität verbundenen Erkrankungen näher charakterisieren (Abbildung 1). Als primäre Ziele von Autoreaktivität beim Typ 1 Diabetes wurden bisher die mittlere Sequenz (AS 235-442 und AS 96-249) und die c-terminale Domäne von GAD 65 (AS 436-585) identifiziert (35). Der n-terminale Bereich (AS 1-100) wird bisherigen Studien zufolge eher zu einem späteren Zeitpunkt in der prädiabetischen Phase als Antigen erkannt (20). Es wird angenommen, dass Reaktivität gegen GAD 67 zum großen Teil auf einer Kreuzreaktivität mit Epitopen, die sowohl GAD

65 als auch GAD 67 aufweisen, beruht (51). Bonifacio et al. zeigten, dass Reaktivität gegen GAD 67 auch unabhängig von Reaktivität gegen GAD 65 existiert (20). Man geht davon aus, dass sich Typ 1 Diabetes assoziierte Autoreaktivität in erster Linie gegen Epitope auf dem GAD 65 Molekül richtet, während beim polyendokrinen Syndrom und beim Stiffman-Syndrom häufig beide Isoformen als Antigene erkannt werden (28, 104). Bislang ist es jedoch nicht gelungen, aufgrund von Reaktivität gegen bestimmte Epitope von GAD sicher zwischen dem mit GADA-Positivität assoziierten Risiko für Typ 1 Diabetes, dem Stiffman-Syndrom und dem polyendokrinen Syndrom zu differenzieren (108). Insgesamt sind GAD-Antikörper im Vergleich mit anderen Diabetes-assoziierten Antikörpern sehr sensitive, aber weniger spezifische Marker zur Prädiktion des Typ 1 Diabetes.

#### Antikörper gegen IA-2 und IA-2 $\beta$ (IA-2A)

Die PTP-homologen Proteine IA-2 (ICA 512) und IA-2 $\beta$  (Phogrin) sind als transmembranäre Proteine in sekretorischen Vesikeln lokalisiert. IA-2 und IA-2 $\beta$  gehören zur Familie der Protein Tyrosin Phosphatasen und sind durch das Vorhandensein einer PTPase-ähnlichen, enzymatisch inaktiven Domäne gekennzeichnet (76, 77, 82, 119). Beide Moleküle bestehen aus 3 Regionen: dem extrazellulären oder luminalen Bereich (Aminosäure 1-576), dem hydrophoben, transmembranären Bereich (AS 577-600) und einem intrazellulären oder zytoplasmatischen Bereich (AS 601-979). Letzterer beginnt mit einer juxtamembranären Region (AS 601-682), an den sich die PTP-Domäne anschließt (AS 683-979 für IA-2 und 683-1033 für IA-2 $\beta$ ). Beide Moleküle zeigen zu 80% Sequenzhomologie in ihren PTP-Domänen, zu weniger als 50% im juxtamembranären Teil und zu 10% im extrazellulären Bereich. Antikörper-Reaktivität wurde nur gegen die zytoplasmatischen Anteile von IA-2 und IA-2 $\beta$  nachgewiesen (75), wobei Epitope auf dem IA-2 Molekül wahrscheinlich die primären Ziele der Autoreaktivität gegen PTP beim Typ 1 Diabetes darstellen (21). Für die Bindung an die PTP-Domäne von IA-2 wurde die Sequenz AS 795-889 als das primäre Ziel von Autoreaktivität identifiziert. Antikörper, die IA-2 $\beta$  erkennen, sind meist gegen gemeinsame Domänen der PTP-Region von IA-2 und IA-2 $\beta$  gerichtet (kreuzreaktive Antikörper). IA-2 $\beta$ -selektive Antikörper werden nur selten detektiert und sind immer gegen die PTP-Domäne gerichtet. Für die Reaktivität gegen die juxtamembranäre (JM-) Domäne von IA-2 sind insbesondere die Sequenzen AS 611-620 (JM 1) und AS 621-630 (JM 2) entscheidend. Neuere Studien zeigten, dass Autoreaktivität

gegen diese beiden Sequenzen unabhängig voneinander und jeweils mit bestimmten HLA-Typen assoziiert ist (11). Antikörper gegen die JM-Region von IA-2 $\beta$  wurden bislang nicht nachgewiesen (21) (Abbildung 1).

Etwa 60% der neu entdeckten Patienten weisen IA-2A auf, IA-2 $\beta$  Antikörper kommen nur bei 40% der Personen mit T1D vor. 2% der Normalbevölkerung und 2-4% der erstgradig Verwandten von Personen mit T1D weisen IA-2 Antikörper auf. IA-2A sind häufiger bei Krankheitsmanifestation im Erwachsenenalter als bei Kindern nachweisbar (69, 81, 106, 111). Antikörper gegen IA-2 sind spezifischer für T1D als GADA, da sie weniger häufig bei anderen autoimmunen Erkrankungen gefunden werden (83). IA-2A treten im Vergleich zu GADA und IAA erst zu einem späteren Zeitpunkt in der prädiabetischen Phase auf. Sie sind von besonderer Bedeutung, da ihr Nachweis mit einem hohen Risiko für die schnelle Entwicklung eines Typ 1 Diabetes verbunden ist (32).

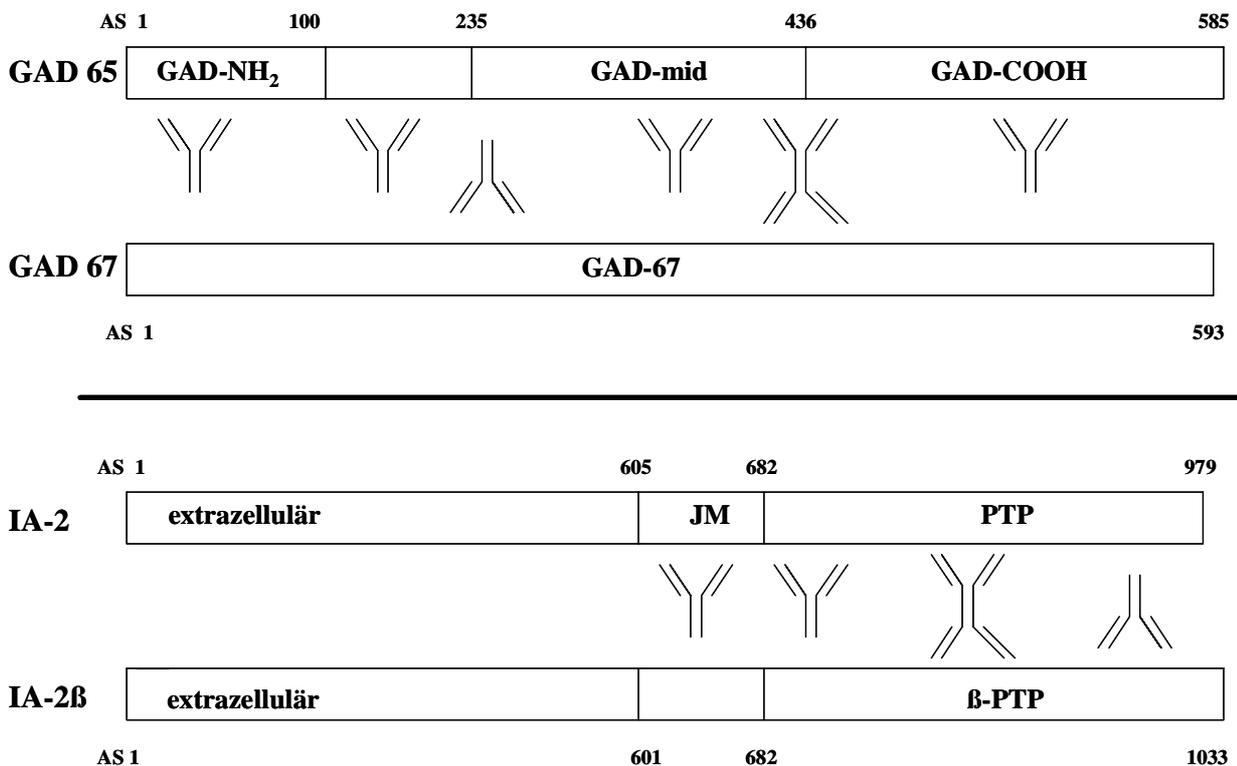


Abbildung 1 Epitop-Spezifitäten innerhalb der Moleküle GAD 65/67 und IA-2/IA-2 $\beta$

### Cytoplasmatische Inselzell-Autoantikörper (ICA)

Inselzell-Antikörper (ICA) wurden 1974 von Bottazzo entdeckt (25). Sie sind gegen verschiedene Antigene aus dem Zytoplasma endokriner Zellen in den pankreatischen Inseln gerichtet. ICA lassen sich mit indirekter Immunfluoreszenz auf Schnitten von humanem Pankreas der Blutgruppe 0 nachweisen (47) und werden in international standardisierten JDF-U (JDF: Juvenile Diabetes Foundation) angegeben. ICA repräsentieren eine heterogene Gruppe von Autoantikörpern mit multiplen und variablen Zielmolekülen (45). GAD und IA-2 stellen dabei zwei Hauptziele der ICA-Reaktivität dar, machen jedoch nicht in jedem Fall die gesamte ICA-Bindung aus. Deswegen wird vermutet, dass noch weitere ICA-Antigene existieren. Die Prävalenz von ICA bei Krankheitsmanifestation und in der prädiabetischen Phase beträgt 70-90% (17, 19, 49, 52, 62, 103). Die Bestimmung von ICA ist aufwändig und stark von der subjektiven Bewertung durch den Untersucher abhängig und wurde deshalb in groß angelegten Screening-Programmen durch die kombinierte Testung von GADA, IA-2A und IAA abgelöst (16). Zur Diagnostik des Autoimmundiabetes nach dem 40. Lebensjahr (LADA; latent autoimmune diabetes in adults) sind die ICA jedoch nach wie vor von Bedeutung, da sie neben GADA die bei dieser Diabetesform am häufigsten nachweisbaren Autoantikörper sind (80).

### Autoantikörper-Subklassen und -Isotypen beim Typ 1 Diabetes

Die autoimmune Zerstörung der Inselzellen ist eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion, an der sowohl CD4+-Helferzellen als auch CD8+-zytotoxische T-Zellen beteiligt sind. Basierend auf dem Modell der Zytokin-Produktion wurden zwei Arten von Phänotypen von CD4+-T-Helferzellen definiert, TH1- und TH2-Zellen (2). TH1-Zellen vermitteln eine inflammatorische Zell-vermittelte Immunantwort mittels Sekretion von IFN $\gamma$ , TNF $\beta$  und Interleukin 2. Die TH2-Antwort ist mit einer humoralen Immunantwort, vermittelt durch IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13, assoziiert. Beim Typ 1 Diabetes geht man von einer Zerstörung der  $\beta$ -Zellen durch eine IL-12-vermittelte TH1-Immunantwort aus, die pathogenetische Rolle von TH2-Zellen ist dagegen noch nicht umfassend untersucht (100). Wegen der sehr geringen Konzentration von Inselantigen-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut ist der Nachweis von T-Zell-Antworten, die Messung der Proliferation von T-Zellen und der Cytokin-Sekretion gegen die wichtigsten T1D-spezifischen Antigene schwierig. Problematisch ist auch die Unterscheidung quantitativer spezifischer T-Zell-

Antworten von Patienten und Kontrollpersonen. Obwohl in den letzten Jahren durch die Entwicklung neuer Methoden wie ELISpot-Assay und Tetramer-Analyse Fortschritte in der Diabetesforschung gemacht wurden, sind Qualität und Standardisierung der Tests noch nicht mit der international standardisierten Messung von Autoantikörpern vergleichbar. Eine alternative Möglichkeit, TH1- und TH2-Immunantworten zu bestimmen, besteht in der Messung von Immunglobulin-Subklassen und -Isotypen von Autoantikörpern (68). Erste Studienergebnisse zeigen, dass die Immunantwort gegen IA-2 und GAD meist aus IgG1 besteht. Dies spricht für eine zytotoxische, TH1-spezifische Immunantwort (22, 34, 55, 93). Dennoch entwickeln nicht alle Personen, die IgG1 aufweisen, Typ 1 Diabetes. Die Ergebnisse der Studien, die sich mit den als protektiv geltenden IgG4 Subklassen beschäftigen, führten zu widersprüchlichen Ergebnissen (22, 105). Bislang konnte noch nicht bewiesen werden, ob der Nachweis spezifischer Autoantikörper-Subklassen im Serum den Typ der zellulären Immunantwort gegen Inselzellantigene reflektiert.

## Bisherige Studienergebnisse und Stand der Forschung

Die Inselzellantikörper ICA, GADA und IA-2A sowie IAA wurden bereits relativ umfassend als primäre Screeningparameter zur Erkennung von Inselautoimmunität untersucht, und die Ergebnisse von verschiedenen Forschergruppen weltweit unterstreichen die Bedeutung dieser Autoantikörper für Diagnostik und Prädiktion des T1D.

Die 1989 am Institut für Diabetesforschung in München initiierte BABYDIAB-Studie beobachtet Kinder von Personen mit T1D prospektiv von Geburt an hinsichtlich der Entwicklung von Inselautoimmunität und T1D (58). Aus den Ergebnissen dieser Studie geht hervor, dass die IAA häufig bei Kleinkindern als erste Autoantikörper in einem noch frühen Stadium der Inselzellzerstörung auftreten. Die Mehrzahl der Kinder, bei denen IAA innerhalb der ersten Lebensjahre im Serum nachweisbar sind, entwickeln in der Folge zusätzliche Autoantikörper (GADA, IA-2A, ICA) und danach gewöhnlich T1D. Das Risiko einer Diabetesentwicklung erhöht sich dabei zusätzlich, wenn Kinder bereits frühzeitig (vor dem ersten bzw. zweiten Lebensjahr) multiple Inselautoantikörper entwickeln. Die BABYDIAB-Studie konnte darüber hinaus zwei unterschiedliche Formen von Inselautoimmunität beobachten: Eine Gruppe von Kindern wies zunächst einen Autoantikörper auf und zeigte eine sukzessive Ausweitung der Immunantwort auf andere Antigene, während die andere Gruppe bereits in der ersten Probe multiple Autoantikörper aufwies, was entweder für ein sehr rasches und nicht erfasstes Spreading oder für die simultane Entwicklung von Antikörpern spricht. Bei älteren Antikörper-positiven Verwandten aus der Münchner Familienstudie wurde in einer 1998 publizierten Studie ein erhöhtes Diabetes-Risiko im Zusammenhang mit hohen Titern im GAD/ IA-2-Kombinationsassay, sowie Auftreten von IA-2A und IAA, beobachtet (37).

Die Gruppe um Knip aus Finnland, dem Land mit der höchsten Prävalenz des Typ 1 Diabetes, befasst sich vor allem mit Geschwisterkindern von Personen mit T1D und konnte ebenfalls bestätigen, dass Insulin-Autoantikörper meist als erste Antikörper im Rahmen des Zerstörungsprozesses der  $\beta$ -Zelle nachweisbar sind (67). Diese Gruppe zeigte in einer weiteren Studie, die Antikörper-positive Personen über einen längeren Zeitraum verfolgt, dass sich multiple Antikörper häufig erst im Verlauf entwickeln und dass einmal positive Antikörper, häufig IAA, wieder verloren werden können (inverse Serokonversion; 102). Diese Studie beschreibt jedoch nur das zeitliche Auftreten der Autoantikörper und nicht das assoziierte Risiko für Typ 1 Diabetes.

Mehrere Forschergruppen aus den USA, insbesondere die Gruppe um Eisenbarth, beschäftigen sich seit Jahren mit Diagnostik und Prävention des T1D mit Hilfe von Autoantikörpern. 1996 beobachteten Verge et al. ein signifikant erhöhtes Risiko für T1D mit wachsender Anzahl der Autoantikörper GADA, IA-2A und IAA (117). Daten aus der kürzlich veröffentlichten DPT-1-Studie (69), deren Kollektiv sich aus erstgradig Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes rekrutiert, zeigen, dass die kombinierte Testung von GADA und ICA die höchste Sensitivität bezüglich der Vorhersage von T1D besitzt.

Im Rahmen der Bart's Oxford und Bart's Windsor Studie aus England werden seit 1978 Autoantikörper bei Eltern und Geschwistern von Personen mit T1D untersucht. Bisher veröffentlichte Ergebnisse zeigten, dass Personen mit ICA alleine ein signifikant geringeres Erkrankungsrisiko haben als Personen mit zusätzlichen Autoantikörpern (44).

Die Anzahl von Studien, in denen die Epitop-Spezifität von Inselautoantikörpern hinsichtlich des prädiktiven Werts für T1D untersucht wurde, ist immer noch sehr limitiert. Naserke zeigte 1998, dass IA-2A-positive Kinder häufig intramolekulares Spreading zeigen und dass Reaktivität gegen die juxtamembranäre Region von IA-2 mit einem signifikant erhöhten Diabetesrisiko assoziiert ist (86). Dagegen wurde ein Epitop-Spreading bei älteren erstgradig Verwandten in dieser Studie nur sehr selten beobachtet. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Reaktivität gegen mehr als ein IA-2 Epitop mit einem erhöhten Risiko verbunden ist (21). Bei einer Untersuchung von Antikörpern gegen Epitope von GAD bei Kindern der BABYDIAB-Studie wurde häufig eine Ausweitung der Ak-Reaktivität von mittleren und c-terminalen Epitopen hin zu n-terminalen Epitopen beobachtet. Antikörper gegen GAD-Epitope, die mit Diabetes-Progression assoziiert sind, konnten bisher nicht identifiziert werden (20).

Eine Untersuchung der Antikörper-Subklassen der Münchner BABYDIAB-Studie zeigte, dass GADA und IA-2A von einer IgG1-Antwort dominiert werden. Dagegen erstreckte sich die Immunantwort gegen Insulin auf die Subklassen IgG1 und IgG4. Das Auftreten einer möglicherweise TH-2-assoziierten IgG4-Antwort war in dieser Kohorte jedoch nicht mit einer Diabetes-Protektion in Verbindung zu bringen (22). In einer anderen Studie mit erstgradig Verwandten wurde das Auftreten von gegen IA-2A gerichteten IgG4 Antikörpern allerdings mit einer Diabetes-Protektion assoziiert (105). Couper et al. beobachteten ebenfalls eine erhöhte Prävalenz von IgG4 und IgG2 (allerdings bei GAD-Antikörpern) bei erstgradig Verwandten, die *keinen* Typ 1 Diabetes entwickelten (34).

Eine kürzlich veröffentlichte Studie aus Finnland zeigte, dass eine IgG1- und IgG3-Immunantwort gegen Insulin eher mit der Entwicklung von T1D assoziiert ist, während IAA-positive Personen, die IgG3 nicht aufweisen, eher vor der Krankheitsmanifestation geschützt sind (57).

## **4. Material und Methoden**

### **4.1. Untersuchungsgruppen**

Im Folgenden werden die beiden Studien vorgestellt, aus deren Kollektiv die Probanden für die vorliegende Arbeit ausgewählt wurden: die Münchner Familienstudie und die Bart's Oxford Studie. Beide sind prospektive Studien, die die Entwicklung von Typ 1 Diabetes bei erstgradig Verwandten von Personen mit T1D untersuchen.

Im Rahmen der Münchner Familienstudie, die seit 1989 in der Abteilung Immunologie am Institut für Diabetesforschung durchgeführt wird (37), werden bei nicht-diabetischen Verwandten ersten Grades von Personen mit Typ 1 Diabetes Autoantikörper gegen die Inselzellantigene GAD und IA-2 sowie gegen Insulin untersucht. Bei einem positiven Antikörperbefund wird das Ergebnis durch wiederholte Analyse der gleichen Probe überprüft. Der Antikörperstatus wird bei Ak-positiven Personen im jährlichen Abstand kontrolliert. Antikörper-negative Personen werden nach mehreren Jahren zu einer erneuten Blutabnahme aufgefordert.

In der Bart's Oxford Studie (16) werden seit 1985 die Seren von Eltern und Geschwistern von Patienten mit T1D mit Diabetes-Manifestation vor dem 21. Lebensjahr auf Inselzellantikörper (ICA), GADA, IA-2A und IAA untersucht. Wie in der Münchner Studie werden Antikörper-positive Probanden in regelmäßigen Abständen kontrolliert und Antikörper-negativen Personen wird nach mehreren Jahren eine erneute Blutentnahme empfohlen.

Für die vorliegende Studie wurden nur Verwandte mit mindestens einem positiven Antikörper (GADA, IA-2A, IAA) ausgewählt, von denen mindestens zwei Blutproben verfügbar waren. Das waren insgesamt 143 Verwandte: 74 Mitglieder der Münchner Familienstudie und 69 Personen aus der Bart's Oxford Studie. Die Nachverfolgungszeit der Personen endete entweder mit deren Diabetes-Manifestation oder mit einem letzten Kontakt im März 2003 (Studienendpunkt). Zu diesem Zeitpunkt wurde nach einer inzwischen eingetretenen Diabetesentwicklung gefragt und eine erneute Blutprobe angefordert. Insgesamt wurden 423 Blutproben untersucht. Die mediane Nachverfolgungszeit von der ersten Probe bis zum letzten Kontakt (März 03) bzw. bis zur Diabetes-Manifestation betrug 6,1 Jahre (25.-75. Quartile 4,1-10,8 Jahre). Das mediane Alter der Personen war 15,3 Jahre (8,3-33,1 Jahre) bei Eintritt in die Studie. Bis zum heutigen Zeitpunkt entwickelten 44 (30,8%) Verwandte Typ 1 Diabetes (pathologischer

oralen Glucose Toleranz Test). Bei Krankheits-Manifestation betrug das mediane Alter 18,8 Jahre (12,3-48,4 Jahre) (Tabelle 1).

**Tabelle 1** Charakterisierung des untersuchten Kollektivs

	<b>gesamt</b>	<b>München</b>	<b>Oxford</b>
<b>Anzahl Verwandter</b>	143	74	69
<b>Kinder/ Eltern/ Geschw. von T1D-Patient</b>	49/ 41/ 53	49/ 3/ 22	-/ 38/ 31
<b>Diabetes entwickelt</b>	44	25	19
<b>Follow-up-Zeit* nach erstem Screening</b>	6,1 (4,1-10,8)	5,0 (3,5-7,4)	9,2 (5,0-13,0))
<b>Medianes Alter* bei erstem Screening</b>	15,3 (8,3-33,1)	10,5 (7,0-18,3)	28,9 (13,7-40,3)

\* In Jahren (25.-75. Quartile)

## 4.2. Methoden

Zunächst wurden alle Proben einer Person jeweils im Radioimmunoassay auf Antikörper gegen GAD, IA-2 und Insulin getestet. Dabei erfolgte die Untersuchung aller Follow-up Proben einer Person jeweils im selben Testansatz, um Fehler durch inter-Assay Variabilität zu reduzieren und eine optimale Vergleichbarkeit der gemessenen Antikörpertiter sowie die Beurteilung von Dynamik und Verlauf zu ermöglichen. Bei positivem Ak-Befund wurden Epitop-Spezifitäten der Autoantikörper (GADA, IA-2A) und Subklassen (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 für IAA) bestimmt. Bei Ergebnissen mit sehr niedrigem Titer sind Epitop-Spezifitäten der Antikörper und Antikörper-Subklassen nicht detektierbar und wurden aus diesem Grund nicht bestimmt. Seren mit sehr hohen Antikörpertitern wurden mit Puffer titriert, bis ihre Titer innerhalb der Standardkurve lagen, und das Ergebnis mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert. Die Grenzen für Positivität wurden anhand der 99. Perzentile eines Kontrollkollektivs festgelegt. Die Schwellenwerte betragen 8,5 units (25 WHO U/ml) für GADA, 2,5 U (4 WHO U/ml) für IA-2A und 1,5 U für IAA. Bei Verwendung dieser Grenzwerte für Positivität hatten die Assays im ersten DASP Proficiency Workshop (12) Sensitivitäten und Spezifitäten von 80% und 94% (GADA), 58% und 100% (IA-2A), und 30% und 98% (IAA).

#### 4.2.1. Radioimmunoassays

##### 4.2.1.1. Bestimmung der Inselautoantikörper GADA und IA-2A

Herstellung von <sup>35</sup>S markiertem Antigen

Autoantikörper gegen GAD65/67 (GADA) und IA-2 (IA-2A) wurden mit Protein A/G Radioimmunoassays unter Verwendung von [<sup>35</sup>S]-Methionin-markiertem, in vitro translatiertem rekombinantem humanem GAD65 und IA-2 bestimmt (124). Dazu wurde die cDNA für GAD im Vektor pEX9 (Dr. A. Lernmark, Karolinska Hospital, Stockholm, Schweden) und die cDNA für IA-2 im Vektor pGEM-4Z (Dr. M.R. Christie, King's College, London, UK) kloniert. Die Antigene wurden jeweils in vitro mittels eines kommerziell erhältlichen Kits (TNT SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System; Promega, Madison, WI) in Anwesenheit von [<sup>35</sup>S]-Methionin (Amersham, UK) transkribiert und translatiert. Es wurden 2µl DNA in den Reaktionsmix eingesetzt und der fertige Ansatz für 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Danach wurde die Probe in 100µl TBST-Puffer (50mM Tris, 150mM NaCl, 1% Tween 20, pH 7,4) aufgenommen und überschüssiges [<sup>35</sup>S]-Methionin auf Gelchromatographiesäulen abgetrennt. 2µl wurden in 2ml Szintillationsflüssigkeit (Optiflour) pipettiert und die inkorporierte Radioaktivität im β-Counter gemessen. Danach wurde das markierte Antigen bei -20°C gelagert.

Assay zur Detektion der Autoantikörper gegen GAD und IA-2

2µl Patientenserum wurden jeweils im Doppelansatz in die wells einer 96er deep well Platte pipettiert. Aliquots mit ca. 20 000 cpm des jeweiligen Antigens in 25µl TBST-Puffer (50mM Tris, 150mM NaCl, 1% Tween 20, pH 7,4) wurden zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Isolierung der Immunpräzipitate wurden pro well 1,5mg Protein-A-Sepharose in 50µl TBST-Puffer hinzugefügt. Anschließend wurde der Ansatz für eine Stunde bei 4°C rüttelnd auf einem Orbital-Mixer inkubiert. Danach wurde die Sepharose in den Platten fünfmal mit eiskaltem TBST-Puffer gewaschen. Dazu wurde 800µl eiskalter TBST-Puffer mit einem ELISA-Washer-Aufsatz zugegeben, die Platten für 5 Minuten bei 2000 U/ min zentrifugiert und der Überstand mit einem weiteren ELISA-Washer-Aufsatz bis auf 100µl abgesaugt. Nach dem Waschen wurden die Pellets im verbleibenden TBST resuspendiert und in Meßplatten überführt. Pro well wurden 150µl Szintillationsflüssigkeit (Microscint; Packard, Meriden, CT) hinzugefügt. Die Platten

wurden mit Folie versiegelt und mit Alufolie gegen Lichteinfall geschützt. Nach erneuter rüttelnder Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Platten abschließend in einem Szintillationscounter (Top Count; Packard) gemessen. In jedem Assay wurde zusätzlich die aufsteigende Verdünnungsreihe einer Positivkontrolle gemessen. Anhand einer Standardkurve wurden so den gemessenen Proben units zugeordnet (5).

#### **4.2.1.2. Bestimmung der Autoantikörper gegen Insulin**

Autoantikörper gegen Insulin (IAA) wurden unter Verwendung von <sup>125</sup>I-markiertem Insulin bestimmt (84). Alle Schritte des Assays wurden mit eiskaltem TBT-Puffer (50mM Tris, 1% Tween 20, pH 8) durchgeführt. Serum (5µl) wurde in einem Gesamtvolumen von 55µl mit 22000 cpm A14-<sup>125</sup>I-markiertem humanem Insulin in Parallelansätzen mit bzw. ohne nicht-markiertem Insulin (8 U/ml) in Rundbodenröhrchen angesetzt und für 72 Stunden bei 4°C inkubiert. Durch Zugabe von vorgequollener 10%iger Protein A- und 5%iger Protein G-Sepharose in 50µl TBT und einstündiger Inkubation bei 4°C auf einem Orbital-Schüttler wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe präzipitiert. Nach viermaligem Waschen mit jeweils 1,5ml Puffer wurde die Radioaktivität des Sepharose-Pellets neun Minuten in einem Gamma-Zähler gemessen.

Für die Berechnung wurde die Differenz zwischen uninhibiertem und mit nicht-markiertem Insulin (8 U/ml) inhibiertem Messwert ermittelt. Alle Proben, für die sich ein negatives delta cpm ergab, bekamen 0,0 U zugewiesen. Die Ergebnisse der anderen Proben wurden mit den aktuellen Messwerten einer geometrischen Standardkurve (1:2, 9 Verdünnungen einer Positivkontrolle) ins Verhältnis gesetzt (5).

#### **4.2.1.3. Bestimmung der Epitop-Spezifitäten**

Bestimmung der Epitop-Spezifität von GADA

Konstrukte

Folgende Konstrukte wurden für die Bestimmung von Autoantikörpern gegen Epitope von GAD verwendet (20): GAD 65<sub>1-95</sub>/GAD 67<sub>102-593</sub>-chimäre Konstrukte (NH<sub>2</sub>-terminale GAD 65-Epitope, GAD-NH<sub>2</sub>), GAD 67<sub>1-101</sub>/GAD 65<sub>96-444</sub>/GAD 67<sub>453-593</sub>-chimäre Konstrukte (mittlere GAD 65-Epitope, GAD-MID) und GAD 67<sub>1-452</sub> /GAD 65<sub>445-585</sub>-chimäre

Konstrukte (COOH-terminale GAD 65 Epitope; GAD-COOH).

### Radioimmunoassay

Für die Messung der Epitop-Spezifitäten von Ak gegen GAD wurde gereinigte Plasmid DNA der GAD-Konstrukte durch Quantum Prep Spin Column Präparation (Bio-Rad, Hercules, CA) hergestellt, *in vitro* unter Verwendung des TnT™ SP6 Coupled Retikulozyten Lysat Systems in Anwesenheit von [<sup>35</sup>S]-Methionin (Amersham International, Bucks, UK) transkribiert und translatiert, und im Radioimmunoassay verwendet. Der Radioimmunoassay zur Detektion der Antikörper gegen Epitope von GAD wurde analog dem unter 4.2.1.1. beschriebenen Assay zur Analyse der Immunantwort gegen GAD und IA-2 durchgeführt. Alle Proben, die deutlich GADA-positiv waren (>10 U), wurden auf Reaktivität gegen folgende Epitop-Spezifitäten von GAD untersucht (20): GAD-mid (AS 240-440), den n-terminalen Teil (AS 1-95), den c-terminalen Teil (AS 440-585) sowie auf Antikörper gegen GAD 67. Die Ergebnisse wurden als units anhand einer Standardkurve ermittelt. Diese bestand aus einer Verdünnungsreihe aus der Probe eines Patienten mit Stiffman-Syndrom und sehr hohen Autoantikörper-Titern, verdünnt mit Antikörper-negativem Serum, die in jedem Assay gemessen wurde. Der obere Wert von 50 Kontrollseren wurde als Grenze für Positivität für jedes Konstrukt verwendet (GAD-NH<sub>2</sub>: 10 U; GAD-MID: 15 U; GAD-COOH: 8 U; GAD 67: 12 U).

### Bestimmung der Epitop-Spezifität von IA-2A

#### Konstrukte

Für die Bestimmung der Epitop-Spezifitäten von Ak gegen IA-2 wurden folgende Konstrukte verwendet (21): Das IA-2<sub>605-979</sub>-Konstrukt (IA-2ic) zur Bestimmung von IA-2-Autoantikörpern, das IA-2<sub>605-682</sub>/IA-2 $\beta$ <sub>741-1033</sub>-Konstrukt (IA2-JM) zur Identifikation von Antikörpern, die mit der juxtamembranären Region (JM) von IA-2 reagieren, das IA-2<sub>687-979</sub>-Konstrukt (IA2-PTP) zur Bestimmung von Antikörpern gegen die PTP-Region von IA-2 und das IA-2 $\beta$ <sub>741-1033</sub> (IA-2 $\beta$ -PTP)-Konstrukt zur Bestimmung von Antikörpern gegen die PTP-Region von IA-2 $\beta$ . Diese Konstrukte wurden in den pSP64 polyA (IA-2ic) oder pGEM-T (IA2-JM, IA2-PTP, IA2 $\beta$ -PTP) Klonierungsvektoren (Promega) unter Kontrolle des SP6 Promoters hergestellt. IA-2<sub>687-979</sub>, IA-2 $\beta$ <sub>741-1033</sub> und IA-2<sub>605-682</sub> wurden außerdem in den pTRC-His bakteriellen Expressionsvektor (Invitrogen, San Diego, CAL) kloniert und

für Konkurrenzexperimente verwendet.

### Radioimmunoassay

Der Assay zur Bestimmung der Epitop-Spezifität von Ak gegen IA-2 wurde ebenfalls analog zu dem unter 4.2.1.1. beschriebenen Radioimmunoassay durchgeführt. Die obere Perzentile von 80 Kontrollseren wurde für jedes Konstrukt als Grenzwert für Positivität verwendet (11 U für JM und jeweils 3 U für IA2-PTP und IA-2 $\beta$ -PTP). Antikörper, die spezifisch gegen die PTP-Regionen von IA-2 und IA-2 $\beta$  gerichtet waren, sowie kreuzreagierende Antikörper gegen die PTP-Domänen von IA-2 und IA-2 $\beta$  wurden in Konkurrenzversuchen mit der jeweils anderen bakteriell exprimierten PTP-Region im Standard-Radioimmunoassay identifiziert (21). Für die Konkurrenz wurden die zu testenden Seren eine Stunde lang bei 4°C mit 10 $\mu$ g rekombinantem Protein oder mit Kontrollpuffer präinkubiert, bevor radioaktiv markiertes Antigen zugegeben und der Assay ausgeführt wurde. Anhand der kombinierten Ergebnisse aus direkten Bindungs- und Konkurrenzversuchen wurden die Antikörper in vier Bindungsregionen eingeteilt:

Antikörper gegen Epitope innerhalb der juxtamembranären Region von IA-2 (IA2-JM)

Antikörper gegen Epitope innerhalb der PTP-Domäne von IA-2 (IA-2-PTP), die nicht in der PTP-Domäne von IA-2 $\beta$  vorkommen

Antikörper gegen Epitope in der PTP-Region von IA-2 und IA-2 $\beta$  (kreuzreagierende Ak)

Antikörper gegen Epitope innerhalb der PTP-Domäne von IA-2 $\beta$  (IA-2 $\beta$ -PTP-spez.), die nicht in der PTP-Domäne von IA-2 vorkommen

Der Nachweis von JM-Spezifität in einem Serum wurde als positiv beurteilt, wenn die direkte Bindung einen Wert >11 U ergab und diese Bindung durch Inhibition mit rekombinantem IA-2<sub>605-682</sub> einen Wert von <11 U hatte. IA-2-PTP-Spezifität wurde dann als positiv gewertet, wenn nur Bindung an IA-2-PTP und nicht an IA-2 $\beta$ -PTP gemessen wurde oder wenn die Bindung an IA-2-PTP auch bei Inhibition mit unmarkiertem IA-2 $\beta$ -PTP einen Wert >3 U behielt. IA-2 $\beta$ -Spezifität wurde als nachgewiesen beurteilt, wenn bei einer Probe nur Bindung an IA-2 $\beta$ -PTP und nicht an IA-2-PTP gemessen wurde oder wenn die Bindung an IA-2 $\beta$ -PTP auch bei Inhibition mit unmarkiertem IA-2-PTP einen Wert >3 U behielt. IA-2-PTP/ IA-2 $\beta$ -PTP Kreuzreaktivität galt dann als nachgewiesen, wenn die Bindung an radioaktives IA-2-PTP zumindest teilweise (>10% im Vergleich mit

Kontrollpuffer) durch rekombinantes IA-2 $\beta$ -PTP inhibiert wurde *und* die Bindung an radioaktives IA-2 $\beta$ -PTP zumindest teilweise (>10%) durch rekombinantes IA-2-PTP inhibiert werden konnte.

#### 4.2.1.4. Analyse der IgG Subklassen und Isotypen der Antikörper

Subklassen und Isotypen von IAA, GADA und IA-2A wurden unter Verwendung von Subklassen- oder Isotypen-spezifischen biotinylierten, monoklonalen anti-humanen Antikörpern der Maus (PharMingen, San Diego, CA) bestimmt. Folgende Antikörper wurden verwendet: Mouse-anti-human IgG1 (clone G17-1), -IgG2 (clone G18-21), -IgG3 (clone G18-3), -IgG4 (clone JDC-14), -IgA1/ IgA2 (clone G20-359), -IgM (clone G20-127), -IgE (clone G7-26), sowie Mouse-anti-rat IgM (clone G53-238). Die Antikörper wurden an Sepharose 4B Streptavidin Beads (Zymed, San Francisco, CA) gebunden (22).

Für die Messung der IgG Subklassen von IAA wurden 5  $\mu$ l Serum mit 1159 nU  $^{125}$ I-markiertem Insulin (Aventis, Frankfurt, Deutschland; spezifische Aktivität 360  $\mu$ Ci/  $\mu$ g) in 25  $\mu$ l 50mM Tris und 1% Tween 20 (TBT Puffer) bei 4°C für 72 Stunden inkubiert. Danach wurden je 50  $\mu$ l einer Suspension aus an Sepharosebeads gekoppelten Antikörpern zugegeben, eine Stunde bei 4°C rüttelnd inkubiert, fünfmal mit eiskaltem TBT-Puffer gewaschen und anschließend für 10 Minuten im Gamma-Zähler Cobra 2 (Canberra-Packard) gemessen. Unspezifische Bindung wurde für jedes Serum unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen rat-IgM bestimmt. Die Ergebnisse wurden als nU gebundenes Insulin/ ml Serum wie folgt berechnet: [(IgG Subklassen-spezifische cpm minus anti-rat IgM-spezifische cpm)/ (totale cpm pro Röhrchen)] x 1159 x 200. Der Grenzwert für Positivität lag für alle Subklassen bei 150nU/ ml.

Zur Bestimmung der Subklassen und Isotypen von GADA und IA-2A wurden zunächst 2  $\mu$ l Serum mit 25000 cpm [ $^{35}$ S]-Methionin-markiertem in vitro transkribiertem und translatiertem Antigen in 25  $\mu$ l von 50 mM Tris, 150 mM NaCl und 1% Tween 20 (TBST-Puffer; pH 7,4) über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 50  $\mu$ l an Sepharosebeads gekoppelte Antikörper zugegeben, eine Stunde lang bei 4°C rüttelnd inkubiert, fünfmal mit eiskaltem TBST-Puffer gewaschen und abschließend im TopCount Mikroplatten-Zähler (Canberra-Packard) gemessen. Die Messergebnisse wurden als delta cpm (IgG- oder Isotypen-spezifische cpm minus anti-rat IgM cpm) ausgedrückt und in

einen standard deviation score (SDS) konvertiert, der wie folgt berechnet wurde: [(IgG Subklassen oder Isotypen-spezifische delta cpm minus Subklassen-oder Isotypen-spezifischer Mittelwert-cpm der Kontrollen)/ Standardabweichung der Kontrollen]. Die Detektionsgrenze für alle Subklassen und Isotypen lag bei 3 SDS-Einheiten. Diese Grenze wurde von keiner der Kontrollpersonen erreicht.

#### **4.2.2. Statistik**

Antikörper und ihre Assoziation wurden mit dem  $\chi^2$ - oder Fisher's- Exakt Test, falls erforderlich, verglichen. Zur Analyse normal verteilter kontinuierlicher Variablen wurde Student's t-Test, bei nicht normal verteilten Variablen der Mann-Whitney-U Test verwendet.

Das kumulative Risiko für Typ 1 Diabetes wurde mit Lifetable-Analysen berechnet. Die Follow-up-Zeit begann mit dem Datum des ersten detektierten positiven Antikörpers und endete mit dem Tag der Diabetes-Manifestation oder mit dem Tag des letzten Kontakts (März 03). Für quantitative Analysen wurden die Antikörper in Titerkategorien in Abhängigkeit vom Grenzwert für Positivität jedes Assays eingeteilt (Kat. 1: 3-facher cut-off, Kat. 2: 3- bis 10-facher cut-off, Kat. 3: 10- bis 100-facher cut-off und Kat. 4: über 100-facher cut-off). Das kumulative Risiko für die Entwicklung von Typ 1 Diabetes wurde für jede Antikörper-Charakteristik (Anzahl, Spezifität, Kombination, Epitop-Spezifitäten von GADA und IA-2A, Subklassen und Isotypen, sowie deren Anzahl, Kombination und Titer) bestimmt. Konfidenzintervalle (95% CI) wurden aus der Standardabweichung berechnet. Unterschiede im kumulativen Risiko, Typ 1 Diabetes zu entwickeln, wurden mit dem Wilcoxon- (Gehan-) Test berechnet. Wurden mehr als zwei Gruppen verglichen, wurde der p-Wert mit der Anzahl der durchgeführten Vergleiche multipliziert (Bonferroni-Korrektur). Mit Hilfe von Cox's Proportional Hazard's Model wurden die in der univariaten Analyse als signifikant identifizierten Parameter in eine multivariate Analyse eingeschlossen. Die relativen Risiken wurden mittels Einschluß der Variablen in das Modell unter Berücksichtigung der Zeit und der Kovariaten getestet. Für alle Analysen wurde ein p-Wert von  $\leq 0,05$  als signifikant betrachtet.

Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Softwarepaket „Statistical Package for Social Sciences“ (SPSS) durchgeführt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Autoantikörper-Dynamik im Verlauf

#### 5.1.1. Anzahl und Spezifität der Autoantikörper im Verlauf

GADA, IA-2A und IAA wurden in den Seren von 143 erstgradig Verwandten über einen medianen Zeitraum von 6,1 Jahren (25.-75. Quartile 4,1-10,8 J.) bestimmt. In der jeweils ersten verfügbaren Serumprobe wiesen 81 Personen (56,7%) einen positiven Antikörper, 43 Verwandte (30,1%) zwei Antikörper und 19 Personen (13,3%) drei Antikörper auf. Die Prävalenzen der einzelnen Autoantikörper-Spezifitäten zu Studienbeginn und im Verlauf sind zusammenfassend in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2** Autoantikörper-Spezifitäten zu Beginn und im Verlauf; Insulin-Autoantikörper wurden signifikant häufiger verloren als IA-2A und GADA; Entwicklung von IA-2A häufig erst im Verlauf

(n = 143)	Autoantikörper-Spezifität		
	IAA	GADA	IA-2A
<b>Ak-positive in der ersten Probe</b>	54 (37,8%)	120 (83,9%)	50 (35,0%)
<b>Konstant Ak-positiv</b>	40 (28,0%)	116 (81,1%)	47 (32,9%)
<b>Verlust von Ak</b>	14 (9,8%) <sup>a</sup>	4 (2,8%)	3 (2,1%)
<b>Entwicklung von Ak</b>	5 (3,5%)	5 (3,5%)	10 (7,0%)
<b>Konstant Ak-negativ</b>	84 (58,7%)	18 (12,6%)	83 (58,0%)
<b>Ak-positive in der letzten Probe</b>	45 (31,4%)	121 (84,6%)	57 (39,9%)

<sup>a</sup>p<0,01 vs. Verlust von IA-2A, p<0,0001 vs. Verlust von GADA

Bei 16 Personen (11,2%) erhöhte sich die Anzahl positiver Antikörper im Verlauf. Von ihnen entwickelten 56,3% (n=9) IA-2A, 31,3% (n=5) IAA und 18,8% (n=3) GADA. Intermolekulares Antikörper-Spreading ereignete sich nach einer medianen Follow-up-Zeit

von 2,8 Jahren (25.-75. Q. 0,7-5,4 Jahre). Sechs Personen, die in der ersten Probe einen positiven Autoantikörper aufwiesen, entwickelten eine weitere Autoantikörper-Spezifität, neun Personen mit initial zwei Autoantikörpern entwickelten zusätzlich einen dritten. Eine Person entwickelte zwei zusätzliche Autoantikörper. 7 der 16 Verwandten entwickelten nach einer medianen Beobachtungszeit von 1,5 Jahren (0,3-3,0 Jahre) nach Autoantikörper-Spreading Typ 1 Diabetes (Tabelle 3).

**Tabelle 3** Intermolekulares Spreading bei 16 erstgradig Verwandten, die im Verlauf zusätzliche Autoantikörper (fett gedruckt) entwickelten

ID	Alter bei Studien-Beginn (Jahre)	Ak in der ersten Serum-Probe	Zeit bis Ak-Spreading (Jahre)	Ak in der letzten Serum-Probe	Follow-up-Zeit nach Spreading (Jahre)	Alter bei Studien-Ende (Jahre)
1032	2,5	GADA, IAA	0,9	GADA, <b>IA-2A</b> , IAA	0,6	4,0 (DM)
1384	9,1	GADA	0,2	GADA, <b>IAA</b>	0,0	9,3 (DM)
1827	9,1	GADA, IA-2A	0,3	GADA, IA-2A, <b>IAA</b>	0,0	9,4 (DM)
2492	52,5	IAA	6,5	<b>GADA, IA-2A</b> , IAA	2,9	61,9 (DM)
5761	3,7	GADA, IAA	1,5	GADA, <b>IA-2A</b> , IAA	2,7	7,9 (DM)
CK	37,3	IA-2A	1,7	<b>GADA</b> , IA-2A	0,0	39,0 (DM)
5884	16,6	IAA, IA-2A	3,0	<b>GADA</b> , IA-2A, IAA	2,5	22,1 (DM)
3522	10,3	GADA	0,3	GADA, <b>IAA</b>	4,0	14,6
5530	12,0	GADA, IA-2A	2,6	GADA, IA-2A, <b>IAA</b>	1,8	16,4
5365	7,5	GADA, IAA	3,3	GADA, <b>IA-2A</b> , IAA	2,6	13,4
5701	6,7	GADA, IAA	0,6	GADA, <b>IA-2A</b> , IAA	1,0	8,3
1179	7,1	GADA, IAA	10,7	GADA, <b>IA-2A</b> , IAA	0,1	17,9
CN	11,2	GADA	6,6	GADA, <b>IA-2A</b>	0,0	17,8
CT	13,7	GADA	5,8	GADA, <b>IA-2A</b>	0,0	19,5
CY	7,8	GADA	4,0	GADA, <b>IA-2A</b>	0,0	11,8
CZ	32,0	GADA, IA-2A	3,0	GADA, IA-2A, <b>IAA</b>	0,0	35,0

Bei 16 Personen verringerte sich die Anzahl positiver Autoantikörper im Verlauf (Tabelle 4). 11 Personen (68,8%) verloren IAA-Reaktivität, 4 Personen (25,0%) IA-2A und 3 Personen (18,8%) GADA. 3 Personen (18,8%), die Autoantikörper im Verlauf verloren, entwickelten T1D. 111 Personen (77,6%), wiesen über den gesamten Studienverlauf eine konstante Anzahl von Autoantikörpern auf.

**Tabelle 4** Verlust von Autoantikörpern bei 16 erstgradig Verwandten (verlorene Antikörper fett gedruckt)

ID	Alter bei Studien-Beginn (Jahre)	Ak in der ersten Serum-Probe	Zeit bis Ak-Verlust (Jahre)	Ak in der letzten Serum-Probe	Follow-up-Zeit nach Verlust (Jahre)	Alter bei Studien-Ende (Jahre)
1443	8,2	GADA, IA-2A, IAA	2,9	GADA, IA-2A	1,7	12,8 (DM)
CI	10,6	GADA, IA-2A, IAA	0,7	GADA, IA-2A	1,5	12,8 (DM)
BK	34,6	GADA, IA-2A	4,3	GADA	2,1	41,0 (DM)
1107	15,8	IAA	0,9	-	8,3	25,0
1686	13,3	GADA, IAA	3,3	GADA	2,0	18,6
2448	13,8	GADA, IA-2A, IAA	1,2	GADA	9,9	24,9
2840	7,9	GADA, IA-2A, IAA	0,9	GADA	3,4	12,2
3506	10,9	GADA, IAA	4,9	GADA	3,4	19,2
4065	7,9	GADA, IA-2A, IAA	1,1	GADA, IA-2A	3,2	12,2
4357	7,7	GADA, IAA	5,8	GADA	1,2	14,7
AF	13,7	GADA, IA-2A, IAA	7,1	GADA, IA-2A	7,6	28,2
AH	20,3	IA-2A	5,7	-	5,2	31,2
AV	19,7	GADA	7,7	-	3,8	31,2
BA	47,1	GADA	1,8	-	9,7	58,6
CH	16,3	GADA, IA-2A, IAA	2,1	GADA, IA-2A	0,3	18,8
DB	50,1	GADA, IA-2A	1,3	IA-2A	0,8	52,1

Das Auftreten von IAA war signifikant mit einem jüngeren Alter bei Studieneinschluß assoziiert (medianes Alter der IAA-positiven Verwandten 10,8 Jahre, 25.-75. Quartile 7,0-15,9 J. vs. 23,2 Jahre, 10,8-38,0 J. bei IAA-negativen;  $p=0,001$ ). Für das Auftreten von GADA (medianes Alter der GADA-positiven 15,6 Jahre, 9,1-31,8 J., vs. 13,9 Jahre, 6,6-35,5 J. bei GADA-negativen) und IA-2A (medianes Alter der IA-2A-positiven Verwandten 14,7 Jahre, 8,8-29,3 J. vs. 15,8 Jahre, 8,0-36,8 J. bei IA-2A-negativen Verwandten) wurde keine signifikante Assoziation mit dem Alter beobachtet.

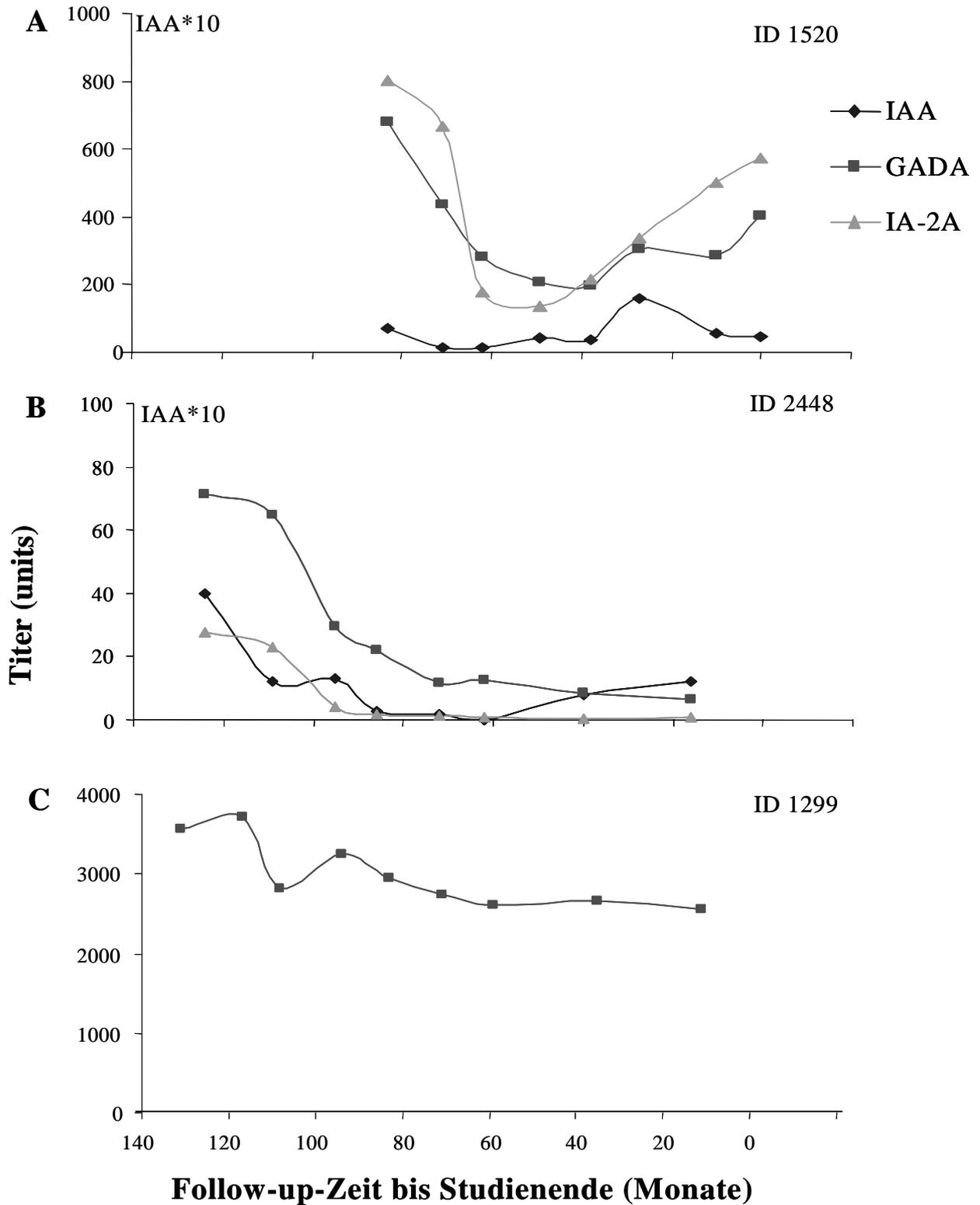
### 5.1.2. Autoantikörper-Titer im Verlauf

Autoantikörper-Titer von GADA, IA-2A und IAA wurden in units quantifiziert und in aufsteigende Kategorien unterteilt (siehe „Statistik“ im Methodenteil). Das Auftreten der individuellen Titerkategorien in der ersten Probe unterschied sich für alle drei Antikörper nicht signifikant vom Auftreten in der letzten Probe.

Die Titerkategorie veränderte sich zwischen der ersten und der letzten Probe bei 42 (33,6%) GADA-positiven Verwandten, 29 Verwandten mit IA-2A (48,3%) und bei 41 Personen mit Insulin-Autoantikörpern (68,3%;  $p < 0,0001$  vs. GADA und  $p < 0,5$  vs. IA-2A). Der Anteil an Personen, deren Antikörpertiter im Verlauf zunahm (Wechsel in eine höhere Titerkategorie), unterschied sich zwischen den einzelnen Antikörper-Spezifitäten nicht signifikant (IAA: 25%, GADA: 17%, IA-2A: 30%;  $p = 0,054$  vs. GADA). Dagegen fiel der Titer bei Verwandten mit Insulin-Autoantikörpern signifikant häufiger ab (43%; Wechsel in eine niedrigere Kategorie) als bei Verwandten mit GADA (17%;  $p < 0,0005$ ) und IA-2A (18%;  $p < 0,01$ ).

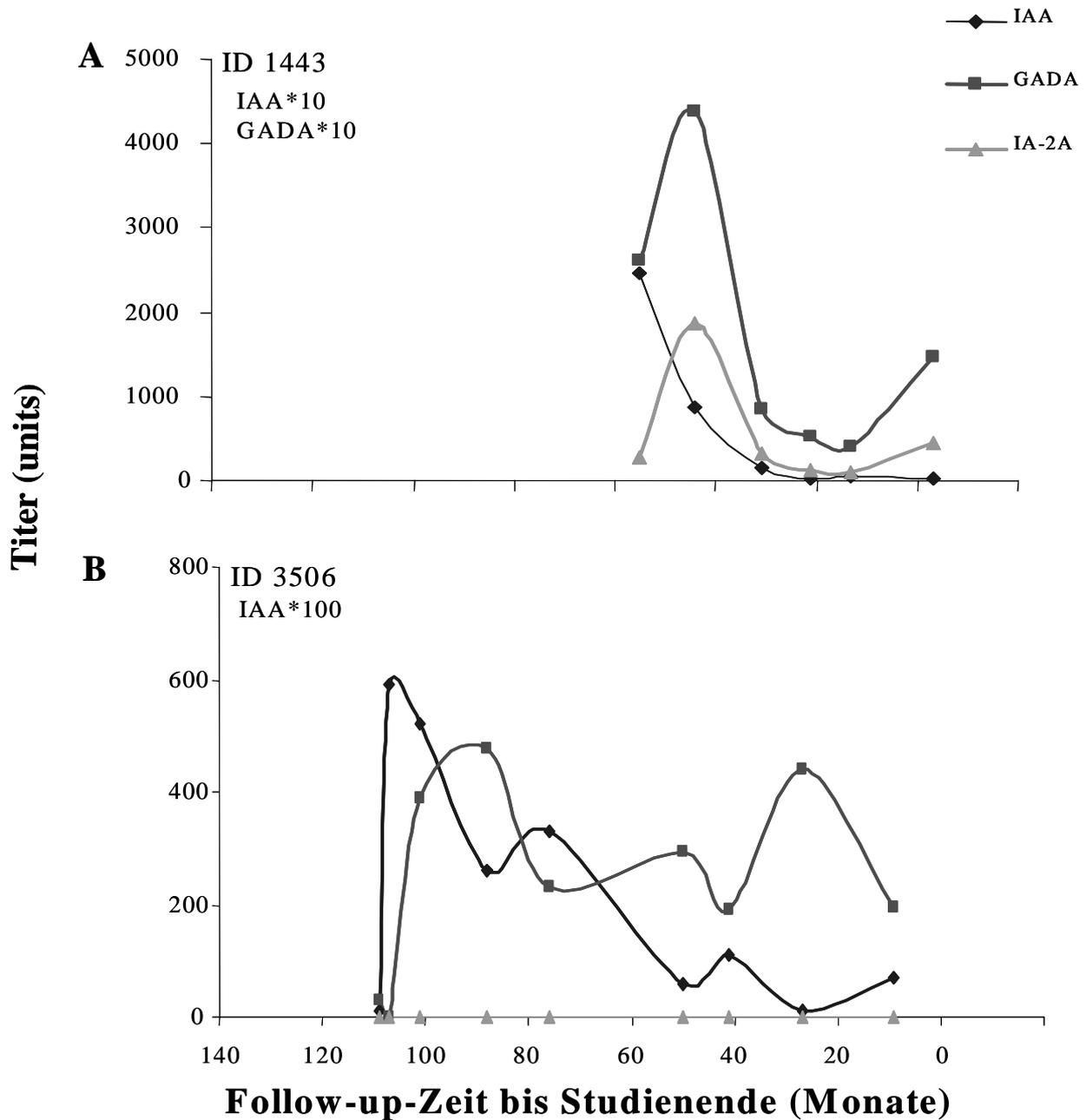
Bei den Autoantikörper-positiven Verwandten konnten drei unterschiedliche Verlaufstypen beobachtet werden (Abbildung 2):

Eine Gruppe von Verwandten (Gruppe 1;  $n = 56$ ) war durch multiple Autoantikörper und sehr dynamische Verläufe mit zu- und abnehmenden Titern und Titerpeaks charakterisiert und zeigte häufig Autoantikörper-Spreading (Abb.2A). Aus dieser Gruppe entwickelten 27 Personen (48,2%) Typ 1 Diabetes. Eine zweite Gruppe von Verwandten (Gruppe 2;  $n = 16$ ) wies zu Studienbeginn mehrere positive Autoantikörper mit zum Teil hohen Titern auf, verlor alle bis auf einen persistierenden Autoantikörper, dessen Titer im weiteren Verlauf stabil blieb (Abb. 2B). 6 Personen (37,5%) aus Gruppe 2 erkrankten. Eine dritte Gruppe (Gruppe 3,  $n = 62$ ) wies über einen langen Zeitraum nur einen positiven Autoantikörper auf (92% GADA, 8% IAA). Diese Verwandten hatten teilweise hohe Antikörpertiter, zeigten jedoch kaum Titerdynamik oder Antikörper-Spreading (Abb.2C). 8 Verwandte aus Gruppe 3 entwickelten T1D (12,9% vs. 48,2% aus Gruppe 1;  $p < 0,0001$ ). Personen aus Gruppe 3 waren bei Studieneinschluß signifikant älter (medianes Alter 25,2 Jahre, 25.-75. Quartile 12,5-40,8 J.) als Personen mit dynamischen Verläufen (Gruppe 1, medianes Alter 11,8 Jahre, 8,0-19,1 J.,  $p < 0,001$ ) und Verwandte aus Gruppe 2 (medianes Alter 13,1 Jahre, 8,5-20,4 J.,  $p = 0,02$ ). 9 Verwandte (Gruppe 4) konnten in keine der Verlaufsgruppen eingeordnet werden. Sie hatten ausschließlich IAA ( $n = 5$ ) oder IA-2A ( $n = 4$ ) mit niedrigem Titer und kurzem Verlauf (medianer Verlauf 3,2 Jahre; T1D  $n = 3$ ).



**Abbildung 2** Exemplarische Darstellung der 3 unterschiedlichen Ak-Verläufe: eine Gruppe (A) zeigte einen dynamischen Verlauf und multiple Autoantikörper, eine zweite Gruppe (B) zu Beginn multiple, im Verlauf aber nur einen Antikörper auf stabilem Titerniveau, während eine dritte Gruppe (C) über einen langen Zeitraum nur GADA aufwies; Zeitpunkt 0: Studienendpunkt

In der Gruppe mit multiplen Autoantikörpern (Gruppe 1) wiesen GADA, IA-2A und IAA zum Teil individuell parallele Titer-Verläufe auf. Es gab Personen mit zeitgleichem Titeranstieg bzw. -abfall, deren Antikörperdynamik ähnlich verlief (Abb.3A). Im Gegensatz dazu wurde bei einigen Personen zeitgleiche gegenläufige Antikörper-Dynamik beobachtet (Abb.3B).



**Abbildung 3** Exemplarische Beispiele für parallele und inverse Autoantikörper-Verläufe: ID 1443 zeigt einen parallelen Verlauf von GADA und IA-2A (A); bei ID 3506 verlaufen GADA und IAA invers (B); Zeitpunkt 0: Studienendpunkt

### 5.1.3. Epitop-Spezifität von GADA und IA-2A im Verlauf

Die Epitop-Spezifität wurde bei 125 GADA- und 58 IA-2A-positiven Verwandten im Verlauf bestimmt (bei 2 IA-2A-positiven Personen war kein Serum zur Messung der Epitop-Spezifitäten verfügbar). Die Mehrheit der Verwandten (91,2% der GADA-positiven, 77,6% der IA-2A-positiven) zeigte im gesamten Verlauf Reaktivität gegenüber einer konstanten Anzahl von Epitop-Spezifitäten von GAD oder IA-2 (Tabelle 5).

**Tabelle 5** Entwicklung der Reaktivität gegen Epitop-Spezifitäten von GAD und IA-2 (quantitativ)

Epitop-Spezifitäten in erster vs. letzter Probe	GADA (%), n=125	IA-2A (%), n=58
$\leq 1 - \leq 1$	23 (18,4)	17 (29,3)
$\geq 2 - \leq 1$	4 (3,2)	2 (3,4)
$\leq 1 - \geq 2$	7 (5,6)	11 (19,0)
$\geq 2 - \geq 2$	91 (72,8)	28 (48,3)

Reaktivität gegenüber mehreren Epitopen war mit hohen Antikörpertitern von GADA bzw. IA-2A assoziiert.

GAD-spezifische Autoantikörper erkannten in der Mehrheit der Fälle die c-terminale (GAD-COOH) und die mittlere Region (GAD-mid) des Moleküls, während die n-terminale Region (GAD-NH<sub>2</sub>) und GAD 67 relativ selten erkannt wurden. Bei 22 Personen (17,6% ) weitete sich die Immunantwort im Verlauf auf zusätzliche Regionen von GAD aus (intramolekulares Spreading), 16 Verwandte (12,8%) verloren Reaktivität gegenüber Epitop-Spezifitäten von GAD (Tabelle 6).

Autoantikörper gegen IA-2 waren meist gegen die JM-Region, gegen die PTP-Region von IA-2 und gegen Epitope in der PTP-Region von IA-2 und IA-2 $\beta$  gerichtet (kreuzreaktive Autoantikörper). Alleinige Reaktivität gegen die PTP-Region von IA-2 $\beta$  ohne gleichzeitige Reaktivität gegen die PTP-Region von IA-2 trat nie auf. 15 Personen wiesen intramolekulares Spreading auf zusätzliche Regionen von IA-2 auf. Dabei weitete sich die Immunantwort meist auf die JM-Region aus (38-JM-positive Personen in der letzten vs. 26 JM-positiv in der ersten Probe). 8 Personen verloren Reaktivität gegen Epitope von IA-2. Ein generelles Epitop-Spreadingmuster wurde weder für IA-2- noch für GAD-Epitope beobachtet (Tabelle 7).

**Tabelle 6** Autoantikörper gegen GAD-spezifische Epitope in der ersten und letzten Serum-Probe von 125 GADA-positiven erstgradig Verwandten; Entwicklung und Verlust der Reaktivität gegen Epitop-Spezifitäten von GAD

<b>Autoantikörper gegen Epitope von GAD</b>				
<b>(n = 125)</b>	<b>COOH</b>	<b>MID</b>	<b>NH<sub>2</sub></b>	<b>GAD-67</b>
<b>Ak-positive erste Probe</b>	98 (78,4%)	104 (83,2%)	34 (27,2%)	31 (24,8%)
<b>Konstant Ak-positiv</b>	92 (73,6%)	100 (80%)	26 (20,8%)	25 (20,0%)
<b>Verlust von Ak</b>	6 (4,8%)	4 (3,29%)	8 (6,4%)	6 (4,8%)
<b>Entwicklung von Ak</b>	5 (4,0%)	10 (8,0%)	11 (8,8%)	9 (7,2%)
<b>Konstant Ak-negativ</b>	22 (17,6%)	11 (8,8%)	80 (64,0%)	85 (59,4%)
<b>Ak-positive letzte Probe</b>	97 (77,6%)	110 (88,0%)	37 (29,6%)	34 (27,2%)

**Tabelle 7** Autoantikörper gegen IA-2-spezifische Epitope in der ersten und letzten Serum-Probe von 58 IA-2A-positiven Verwandten; Entwicklung und Verlust der Reaktivität gegen Epitop-Spezifitäten von IA-2

<b>Autoantikörper gegen Epitope von IA-2</b>				
<b>(n = 58)</b>	<b>JM</b>	<b>PTP</b>	<b>kreuzreaktiv</b>	<b>IA-2β-spez.</b>
<b>Ak-positive erste Probe</b>	26 (44,8%)	38 (64,4%)	29 (50,0%)	6 (10,2%)
<b>Konstant Ak-positiv</b>	24 (40,7%)	32 (55,1%)	29 (50,0%)	5 (8,5%)
<b>Verlust von Ak</b>	2 (3,4%)	6 (10,3%)	-	1 (1,7%)
<b>Entwicklung von Ak</b>	14 (23,7%)	2 (3,4%)	6 (10,3%)	-
<b>Konstant Ak-negativ</b>	18 (31,0%)	20 (33,9%)	23 (39,7%)	52 (89,7%)
<b>Ak-positive letzte Probe</b>	38 (64,4%)	34 (57,6%)	35 (59,3%)	5 (8,5%)

#### 5.1.4. IgG Subklassen und Isotypen von GADA, IA-2A und IAA im Verlauf

Antikörper-Subklassen und -Isotypen wurden in den Verlaufsseren von 55 IAA-, 125 GADA- und 58 IA-2A-positiven Verwandten bestimmt (bei 2 IA-2A-positiven Personen war kein Serum zur Messung der Subklassen/ Isotypen verfügbar).

IgG1 war bei der Immunantwort gegen GAD, IA-2 und Insulin die am häufigsten detektierte Subklasse. Nur eine GADA-positive Person (IgG2) und vier IA-2A-positive Personen (3 IgA, 1 IgG2 und IgG4) wiesen in Verlaufsproben Subklassen bzw. Isotypen auf, ohne IgG1 zu exprimieren. Dagegen traten bei der Immunantwort gegen Insulin Subklassen anderer Spezifitäten häufig auch ohne IgG1 auf: 11 Verwandte wiesen von Beginn an oder im Verlauf Subklassen-spezifische Antikörper ohne IgG1 auf (eine Person IgG2, 3 IgG3, 7 IgG4). Im Vergleich zu GADA und IA-2A traten Antikörper der Subklasse IgG3 bei Insulin-Autoantikörpern prozentual am häufigsten auf.

In der ersten Serumprobe wiesen 56 GADA-positive (44,8%), 25 IA-2A-positive (43,1%) und 22 IAA-positive (40,0%) Verwandte nur eine Subklasse auf. Dies war bei GADA immer IgG1, bei IA-2A in 24 Fällen (96,0%) IgG1 und einmal (4,0%) IgA, dagegen bei Insulin-Autoantikörpern in 14 Fällen (63,6%) IgG1, einmal IgG2 (4,5%), bei drei Personen (13,6%) IgG3 und in 4 Fällen (18,2%) IgG4. 64 GADA-positive (51,2%), 29 IA-2A-positive (50,0%) und 16 IAA-positive (29,6%) Personen wiesen in ihrer ersten Serumprobe bereits mehrere Subklassen auf. Dabei wies IgG1 die häufigste Frequenz auf, gefolgt von IgG4, IgG2, IgA und IgM bzw. IgG3 (IAA). Die meisten Verwandten hatten im Verlauf eine konstante Anzahl an Subklassen.

Bei 16 IAA-positiven Personen wurden trotz Reaktivität gegen Insulin keine Subklassen detektiert. 23 IAA-positiv Verwandte verloren im Verlauf Autoantikörper-Subklassen. Dies war jedoch häufig mit einem Titerabfall bzw. dem vollständigen Verlust der Reaktivität gegen Insulin verbunden (Tabelle 8, Tabelle 9, Tabelle 10).

**Tabelle 8** Autoantikörper-Subklassen bei 55 IAA-positiven erstgradig Verwandten in der ersten und letzten Probe; Entwicklung und Verlust von Subklassen im Verlauf

(n = 55)	IAA-spezifische Subklassen			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
<b>Ak-positive erste Probe</b>	29 (52,7%)	12 (21,8%)	13 (23,6%)	13 (23,6%)
<b>Konstant Ak-positiv</b>	14 (25,5%)	4 (7,3%)	8 (14,5%)	9 (16,4%)
<b>Verlust von Ak</b>	15 (27,3%)	8 (14,6%)	5 (9,1%)	4 (7,3%)
<b>Entwicklung von Ak</b>	5 (9,1%)	2 (3,6%)	1 (1,8%)	3 (5,4%)
<b>Konstant Ak-negativ</b>	21 (38,2%)	41 (74,5%)	41 (74,5%)	39 (70,9%)
<b>Ak-positive letzte Probe</b>	19 (34,5%)	6 (10,9%)	9 (16,4%)	12 (21,8%)

**Tabelle 9** Autoantikörper-Subklassen und -Isotypen bei 125 GADA-positiven Verwandten in der ersten und letzten Probe; Entwicklung und Verlust von Subklassen/ Isotypen im Verlauf

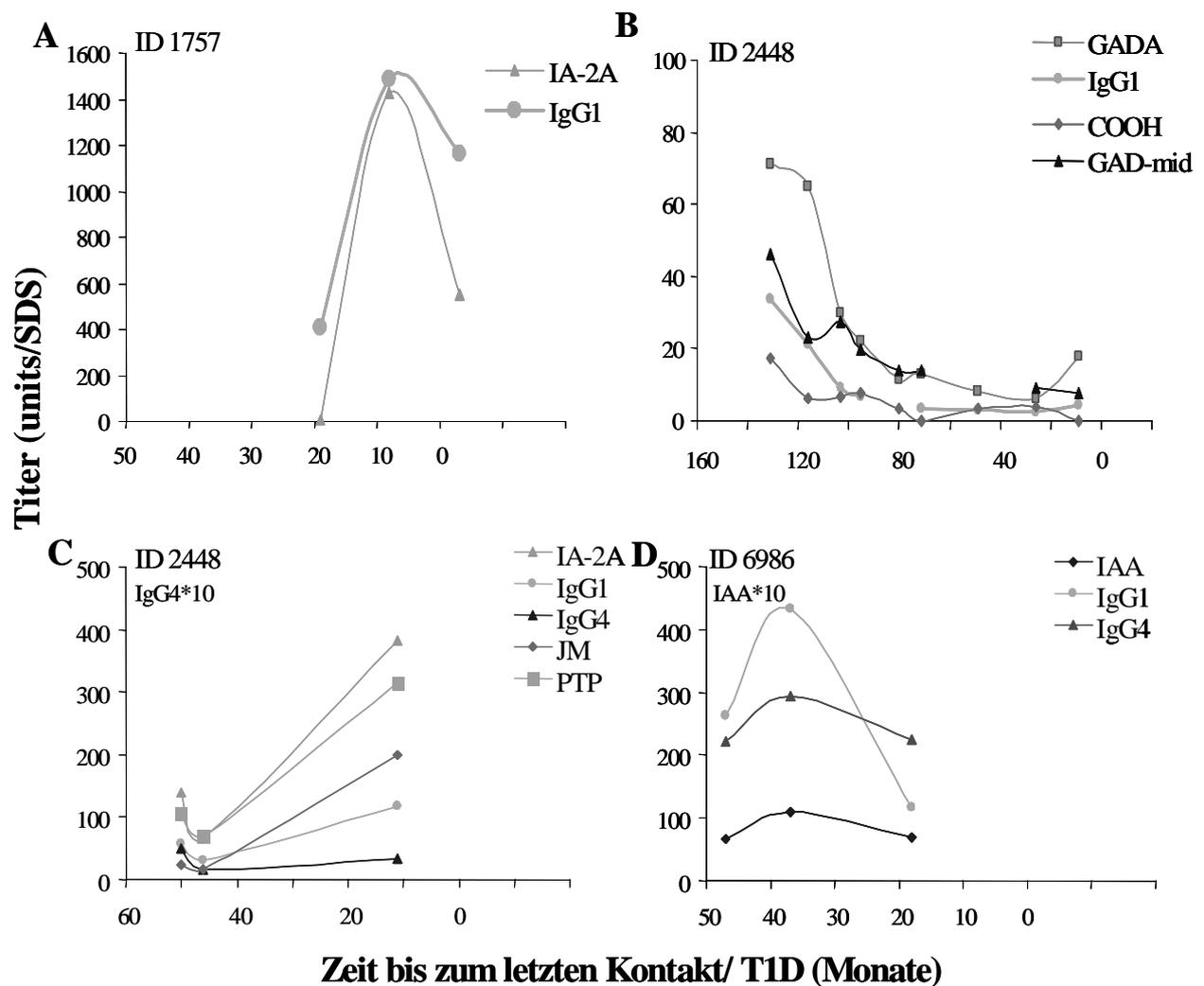
(n = 125)	GADA-Subklassen und -Isotypen						
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgM	IgE
<b>erste Probe</b>	120 (96,0%)	27 (21,6%)	4 (3,2%)	48 (38,4%)	22 (17,6%)	21 (16,8%)	2 (1,6%)
<b>Konstant pos.</b>	115 (92,0%)	15 (12,0%)	2 (1,6%)	33 (26,4%)	15 (12,0%)	16 (12,8%)	-
<b>Ak-Verlust</b>	5 (4,0%)	12 (9,6%)	2 (1,6%)	15 (12,0%)	7 (5,6%)	5 (4,0%)	2 (1,6%)
<b>Ak-Entwicklung</b>	3 (2,4%)	15 (12,0%)	4 (3,2%)	11 (8,8%)	11 (8,8%)	6 (4,8%)	2 (1,6%)
<b>Konstant neg.</b>	2 (1,6%)	83 (66,4%)	117 (93,6%)	66 (52,8%)	92 (73,6%)	98 (78,4%)	121 (96,8%)
<b>letzte Probe</b>	118 (94,4%)	30 (24,0%)	6 (4,8%)	44 (35,2%)	26 (20,8%)	22 (17,6%)	2 (1,6%)

**Tabelle 10** Autoantikörper-Subklassen und -Isotypen bei 58 IA-2A-positiven Verwandten in der ersten und letzten Probe; Entwicklung und Verlust von Subklassen/ Isotypen im Verlauf

<b>(n = 58)</b>	<b>IA-2A-Subklassen und -Isotypen</b>						
	<b>IgG1</b>	<b>IgG2</b>	<b>IgG3</b>	<b>IgG4</b>	<b>IgA</b>	<b>IgM</b>	<b>IgE</b>
<b>erste Probe</b>	53 (91,4%)	21 (36,2%)	4 (3,2%)	24 (41,4%)	10 (17,2%)	6 (10,3%)	-
<b>Konstant pos.</b>	48 (82,7%)	18 (31,0%)	3 (2,4%)	22 (37,9%)	6 (10,3%)	3 (2,4%)	-
<b>Ak-Verlust</b>	5 (8,6%)	3 (5,2%)	1 (1,7%)	2 (3,4%)	4 (6,8%)	3 (5,2%)	-
<b>Ak-Entwicklung</b>	2 (3,4%)	3 (5,2%)	3 (5,2%)	6 (10,3%)	10 (17,2%)	7 (12,1%)	-
<b>Konstant neg.</b>	3 (5,2%)	34 (58,6%)	51 (87,9%)	28 (48,3%)	38 (65,5%)	45 (77,6%)	58 (100%)
<b>letzte Probe</b>	50 (86,2%)	21 (36,2%)	6 (4,8%)	28 (48,3%)	16 (27,6%)	10 (17,2%)	-

### 5.1.5. Assoziation zwischen Autoantikörper-Titer, Subklassen- und Epitop-Spezifität

IgG1 hatte bei der Immunantwort gegen GAD, IA-2 und Insulin die höchste Prävalenz (63,0% der IAA-, 98,4% der GADA-, 94,8% der IA-2A-positiven Verwandten). Titerveränderungen der 3 Antikörper wurden häufig von Veränderungen von IgG1 begleitet. Zusätzliche Subklassen und Epitop-Spezifitäten entwickelten sich häufig gleichzeitig mit einem Titeranstieg. Es gab jedoch auch Fälle, in denen sich Epitop- oder Subklassenspreading ohne Titeranstieg ereigneten (Abbildung 4).



**Abbildung 4** Exemplarische Verläufe: Titerveränderungen von IA-2A, GADA, IAA wurden häufig von Titerveränderungen von IgG1 (A-D), Änderungen der Epitop-Spezifitäten (B; hier vor allem COOH und GAD-mid; C; JM und PTP) bzw. weiteren Ak-spezifischen Subklassen (A-D) begleitet; Zeitpunkt 0: Studienendpunkt

Bei 7 IA-2A-positiven Verwandten entwickelten sich Antikörper vom Typ IgM im Verlauf. Bei IA-2A wurde zwischen Epitop- und Subklassen-Spreading ein deutlicher Zusammenhang beobachtet. 16 Verwandte entwickelten zusätzliche Subklassen und 15 Verwandte zeigten Epitop-Spreading; in 11 Fällen ereignete sich das Spreading gleichzeitig. Häufig war das Neuauftreten von Antikörpern gegen die JM-Region mit neuen Autoantikörpern vom Typ IgM oder IgA assoziiert (Tabelle 11). Eine derartige Assoziation war bei GADA nicht nachweisbar.

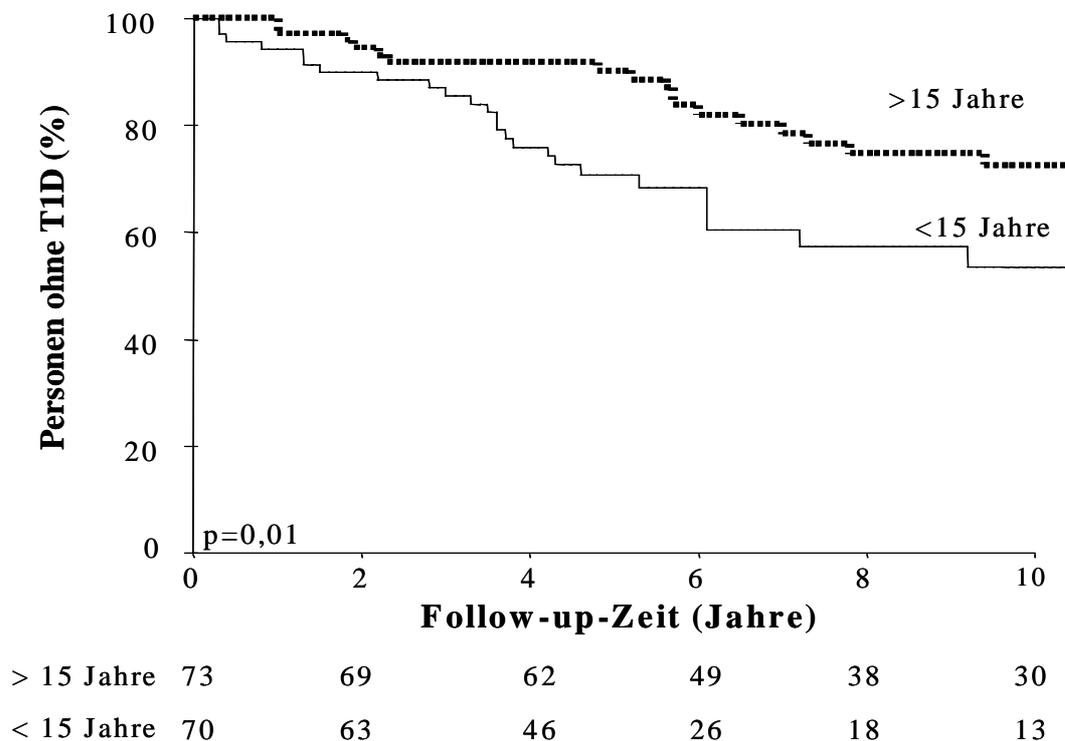
**Tabelle 11** Entwicklung von Autoantikörpern gegen Epitope von IA-2 und Subklassen/ Isotypen von IA-2A zum selben Zeitpunkt

<b>ID</b>	<b>Alter bei erster IA-2A-Reaktivität</b>	<b>Entwickelte Subklassen</b>	<b>Entwickelte Epitop-Spez.</b>	<b>Entwicklung des IA-2A-Titers (Kat.)</b>	<b>Alter bei DM/ letztem Kontakt</b>
1443	8,2	IgM	JM	3/ 3	12,8 (DM)
5647	6,5	IgM	JM	3/ 3	10,2 (DM)
AA	12,0	IgG4	x-react	2/ 2	15,6 (DM)
AB	4,5	IgG1,IgG2, IgG3,IgG4	x-react	3/ 2	8,7 (DM)
AT	30,5	IgM	JM	3/ 2	32,7 (DM)
CK	37,3	IgM, IgA	JM	3/ 2	39,0 (DM)
CP	43,3	IgA	JM	2/ 2	50,5 (DM)
CZ	32,0	IgA	JM	2/ 3	35,0 (DM)
AL	30,5	IgA	JM	2/ 2	54,6
AX	37,3	IgA	JM	1/ 1	50,7
BP	33,9	IgA, IgM	x-react	3/ 3	40,4

## 5.2. Risiko für Typ 1 Diabetes bei erstgradig Verwandten

### 5.2.1. Verwandtschaftsgrad, Geschlecht, Alter und assoziiertes Diabetesrisiko

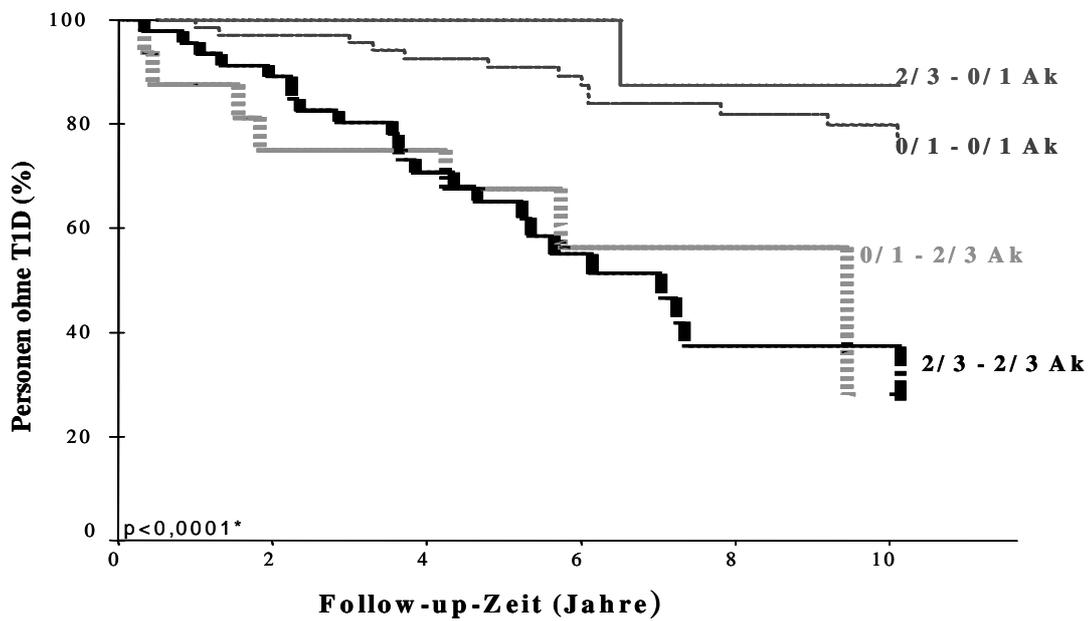
44 Verwandte entwickelten im Verlauf der Studie Typ 1 Diabetes. Das kumulative Erkrankungsrisiko über 10 Jahre betrug 36,1% (CI 27,0-45,6). Verwandtschaftsgrad und Geschlecht waren nicht signifikant mit der Entwicklung von T1D assoziiert. Kinder (10-Jahres-Risiko 41,0%, CI 22,6-59,4) und Geschwister (38,8%, CI 24,1-53,5) hatten ein etwas höheres Risiko als Eltern (27,7%, CI 12,9-42,5;  $p=0,8$ ) von Personen mit Typ 1 Diabetes, und Frauen erkrankten etwas häufiger als Männer (10-Jahres-Risiko 41,6%, CI 26,5-56,7 gegenüber 31,1%, CI 16,8-45,6,  $p=0,9$ ). Dagegen wiesen Verwandte, die bei Studieneintritt unter 15 Jahre alt waren, ein signifikant erhöhtes Risiko gegenüber Personen auf, die über 15 Jahre alt waren (46,5%, CI 31,5-61,5 und 27,5%, CI 16,1-38,9,  $p=0,01$ ). Von 70 Verwandten unter 15 Jahren erkrankten 25; dagegen entwickelten von 73 Verwandten über 15 Jahren 19 Personen T1D (Abbildung 5).



**Abbildung 5** Lifetable-Analyse: Verwandte, die bei Studieneintritt unter 15 Jahre alt waren (untere Kurve) hatten ein signifikant höheres Risiko, innerhalb von 10 Jahren an Typ 1 Diabetes zu erkranken, als Verwandte, die bei Studienbeginn älter als 15 Jahre alt waren (obere Kurve)

### 5.2.2. Autoantikörper-Anzahl und assoziiertes Diabetesrisiko

Verwandte, die von Beginn an zwei oder drei positive Antikörper aufwiesen oder diese Anzahl im Verlauf entwickelten (n= 62, T1D: n= 30), hatten ein höheres kumulatives Risiko über 10 Jahre (64,2%, CI 48,6-81,0) als Verwandte, die konstant für einen der Antikörper GADA, IA-2A, IAA positiv waren oder bei denen sich die Ak-Anzahl im Verlauf auf  $\leq 1$  verringerte (19,3%, CI 9,7-28,9; n=81, T1D: n=14; p<0,0001). Das Erkrankungsrisiko bestand bereits bei zwei positiven Ak. Ein dritter positiver Antikörper-Befund erhöhte das Risiko nicht signifikant (77,6% vs. 55,5%, p=0,6). Im Einzelnen hatten Verwandte, die ausgehend von einem positiven Ak multiple Ak entwickelten, ein signifikant höheres Risiko als Verwandte, die konstant einen Ak aufwiesen (kumulatives 10-Jahres-Risiko 71,9%, n= 16, DM+=7 vs. 20,2%, n=70, DM+=13; p=0,02). Verwandte, die konstant zwei oder mehr Ak aufwiesen, hatten ein signifikant erhöhtes Risiko gegenüber Verwandten, die konstant einen Ak aufwiesen (62,7% vs. 20,2%; p=0,0001) und ein erhöhtes Risiko gegenüber Personen, die ausgehend von mehreren Ak alle bis auf einen verloren (62,7% vs. 12,5%, p=0,055) (Abbildung 6).



**Abbildung 6** Verwandte mit  $\geq 2$  positiven Antikörpern zu Beginn oder im Verlauf (grüne und schwarze Kurven) hatten ein signifikant höheres Diabetesrisiko als Personen, die konstant nur einen Antikörper hatten oder bei denen sich die Ak-Anzahl im Verlauf auf  $\leq 1$  verringerte (blaue und rote Kurven); \* p-Wert für 2 oder 3 Ak konstant/ Entwicklung von 2 oder 3 Ak im Verlauf gegenüber 1 Ak konstant/ Abnahme auf  $\leq 1$  Ak im Verlauf berechnet

5 Verwandte verloren im Verlauf alle Antikörper, die initial positiv waren. Dies waren in zwei Fällen GADA, bei je einer Person IA-2A bzw. IAA und ein Verwandter verlor GADA und IAA. 76 Verwandte hatten im Verlauf einen positiven Antikörper oder verloren alle bis auf einen Antikörper. 56 Personen aus dieser Gruppe hatten von Beginn bis zum Ende des Follow-up nur GAD-Antikörper; 9 von ihnen entwickelten Typ 1 Diabetes (16,1%). 11 Verwandte hatten ausschließlich gegen Insulin gerichtete Autoantikörper; aus dieser Gruppe entwickelte keine Person T1D (0%). Von vier Verwandten, die nur IA-2A aufwiesen, erkrankten zwei Personen (50,0%).

Das Risiko für Typ 1 Diabetes bei Personen aus der Risikogruppe mit 2 oder 3 Antikörpern im Verlauf war nicht signifikant mit der Spezifität der positiven Antikörper assoziiert.

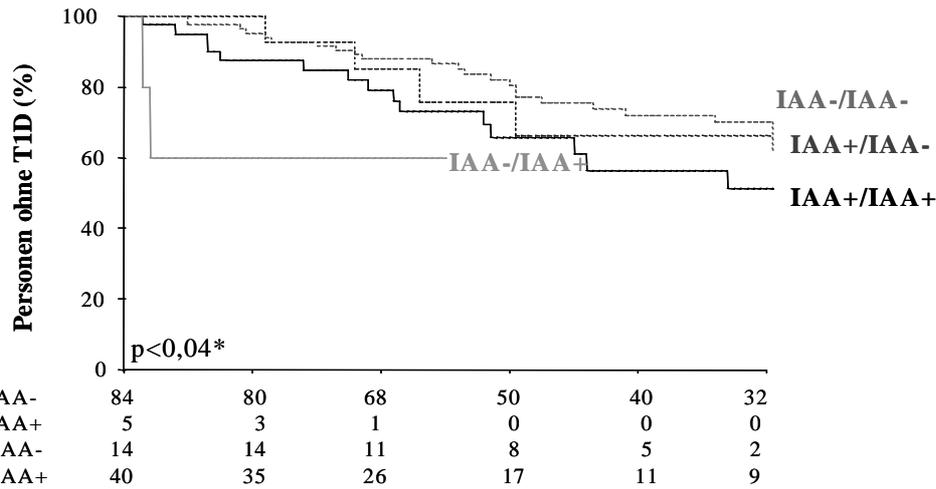
Ob die Anzahl von 2 oder 3 Autoantikörpern, die mit hohem Risiko behaftet war, von Beginn an vorhanden war oder sich erst im Verlauf entwickelte, war für das assoziierte Risiko nicht von Bedeutung. So hatten Personen mit 2 oder 3 Antikörpern von Beginn an ein Risiko von 62,7% (CI 30,4-100), im Verlauf von 10 Jahren zu erkranken. Das Risiko von Verwandten, die zu Beginn nur einen positiven Antikörper hatten und den zweiten bzw. dritten Ak erst im Verlauf entwickelten, war 71,8% (CI 30,4-100;  $p=0,9$ ). Verwandte, die über den gesamten Zeitraum konstant nur einen positiven Antikörper aufwiesen, hatten ein ähnlich niedriges Risiko wie Personen, deren Antikörper-Anzahl im Verlauf auf  $\leq 1$  Ak abnahm.

### **5.2.3. Antikörper-Spezifität und assoziiertes Diabetesrisiko**

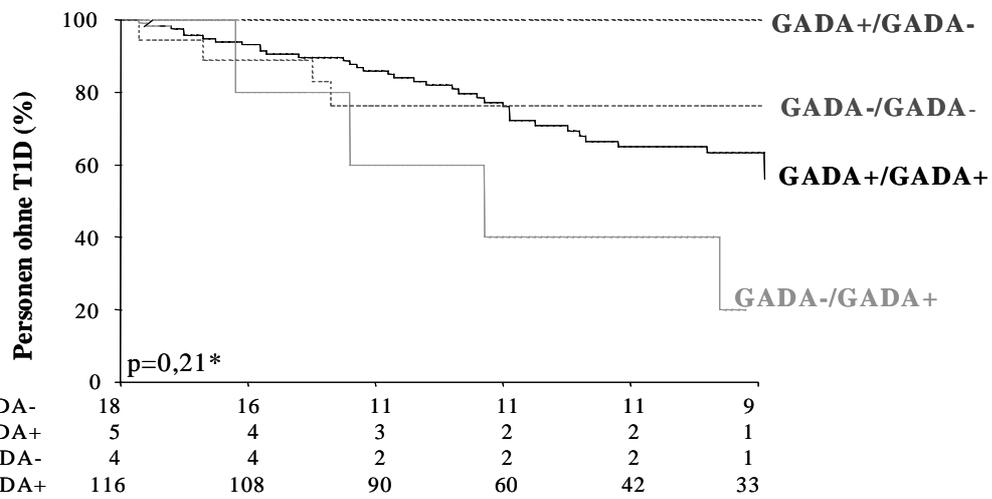
Das kumulative Risiko von Verwandten, innerhalb von 10 Jahren an T1D zu erkranken, war bei Personen, die von Beginn an Antikörper gegen IA-2 oder Insulin aufwiesen oder diese im Verlauf entwickelten, signifikant erhöht ( $p<0,0001$  für IA-2A und  $p<0,04$  für IAA). Dagegen waren Autoantikörper gegen GAD nicht signifikant mit der Entwicklung von Typ 1 Diabetes assoziiert (Abbildung 7).

Ergebnisse

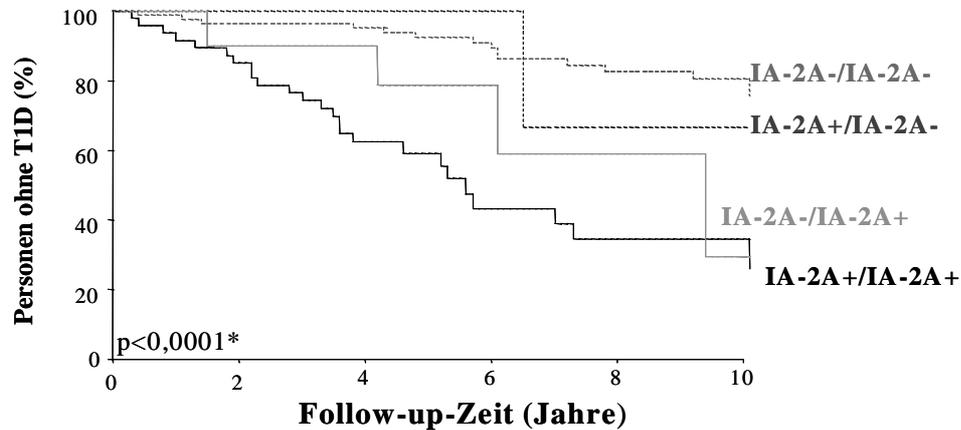
**IAA**



**GADA**



**IA-2A**



**Abbildung 7** Lifetable-Analysen: Kumulatives Risiko für Typ 1 Diabetes innerhalb von 10 Jahren bei Personen, die Autoantikörper-Spezifitäten von Beginn an aufwiesen bzw. im Verlauf entwickelten (schwarze und grüne Kurven) oder nie aufwiesen bzw. im Verlauf verloren (rote und blaue Kurven); \*p-Werte jeweils für konstante/ im Verlauf entwickelte Ak (schwarze und grüne Kurven) gegenüber keinen Nachweis/ Verlust von Ak (rote und blaue Kurven)

Verwandte, die IA-2A und IAA von Beginn an aufwiesen, hatten ein ähnlich hohes Risiko wie Personen, die diese Antikörper-Spezifitäten erst im Verlauf entwickelten. Verwandte, die GADA aufwiesen, hatten im Vergleich zu Verwandten ohne GADA kein erhöhtes Risiko für T1D. 47 Verwandte wiesen konstant von Beginn an IA-2A auf. Von ihnen erkrankten 25 (53,2%), und diese Personengruppe hatte ein kumulatives Risiko von 65,4% (CI 47,9-82,9). Verwandte, die diese Antikörper-Spezifität erst im Verlauf entwickelten, hatten ein Risiko von 70,5% (CI 25,2-100),  $p=0,2$ . Genauso war das Risiko für Personen, die diesen Antikörper nie aufwiesen ähnlich niedrig wie das von Verwandten, die IA-2A im Verlauf verloren (19,5% und 33,3%,  $p=0,7$ ). Das Risiko von Verwandten mit Autoantikörpern gegen Insulin war nicht abhängig davon, ob der Antikörper von Beginn an vorhanden war oder sich im Verlauf entwickelte (40% vs. 48,8% über 10 Jahre,  $p=0,2$ ). Die Wahrscheinlichkeit, an T1D zu erkranken, war bei Personen, die nie IAA aufwiesen ähnlich niedrig wie bei Verwandten, die Insulin-Autoantikörper verloren (30,2% vs. 33,8%,  $p=0,7$ ).

#### **5.2.4. Autoantikörper-Titer, Titerdynamik und assoziiertes Diabetesrisiko**

Das Risiko für Typ 1 Diabetes war bei Personen erhöht, die in der ersten und letzten Probe konstant hohe IA-2A- oder IAA-Titer hatten. Dagegen war das GADA-assoziierte Erkrankungsrisiko unabhängig von der Titerhöhe. Verwandte, deren IA-2A-Titer konstant hoch war oder zur letzten Probe hin anstieg (Kat. 2 oder 3) hatten ein signifikant höheres Erkrankungsrisiko als Verwandte, die konstant niedrige Titer (Kat. 1) aufwiesen oder deren Titer sich zum Ende des Follow-up verringerte. Ebenso war das Risiko für Verwandte mit konstant hohem IAA-Titer signifikant erhöht (Tabelle 12).

**Tabelle 12** Verteilung der Titerkategorien für IAA, GADA, IA-2A in der ersten Probe und im Verlauf und assoziiertes Risiko für T1D

Variable	T1D (n)	10-Jahres-Risiko ( $\pm$ SE)	Hazard Ratio (95% CI)	p
<b>Autoantikörper-Titer in der ersten Probe</b>				
<b>IAA</b>				<b>&lt; 0,001</b>
Kat. 1 (n=22)	6	34 $\pm$ 23	1*	
Kat. 2 (n=20)	3	27 $\pm$ 27	0,6 (0,2-2,5)	0,52
Kat. 3 (n=12)	10	91 $\pm$ 18	5,9 (2,1-16,7)	<b>&lt; 0,001</b>
<b>GADA</b>				<b>0,25<sup>1</sup></b>
Kat. 1 (n=18)	3	20 $\pm$ 21	1*	
Kat. 2 (n=30)	7	28 $\pm$ 18	1,3 (0,3-4,9)	0,73
Kat. 3 (n=57)	21	45 $\pm$ 16	2,4 (0,7-8,1)	0,16
Kat. 4 (n=15)	5	36 $\pm$ 26	2,7 (0,7-11,5)	0,17
<b>IA-2A</b>				<b>0,01</b>
Kat. 1 (n=9)	3	33 $\pm$ 39	1*	
Kat. 2 (n=22)	9	53 $\pm$ 26	1,4 (0,4-5,0)	0,65
Kat. 3 (n=19)	14	89 $\pm$ 19	4,1 (1,2-14,8)	<b>0,03</b>
<b>Autoantikörper-Titer im Verlauf**</b>				
<b>IAA</b>				<b>0,023</b>
A (niedrig) (n=50)	16	42 $\pm$ 17	1,4 (0,8-2,7)	
B (hoch) (n=9)	5	75 $\pm$ 39	3,6 (1,4-9,5)	
<b>GADA</b>				<b>0,18</b>
C (niedrig) (n=53)	14	31 $\pm$ 14	1,2 (0,4-3,6)	
D (hoch) (n=72)	26	47 $\pm$ 16	2,0 (0,7-5,7)	
<b>IA-2A</b>				<b>&lt; 0,0001</b>
E (niedrig) (n=12)	3	27 $\pm$ 32	1,7 (0,5-5,8)	
F (hoch) (n=48)	27	83 $\pm$ 17	6,3 (3,2-12,1)	

\* Referenzvariable für Cox-Modell

\*\* Referenzvariable IAA, GADA, IA-2A neg.

<sup>1</sup>p < 0,05 für Kat. 1 und 2 vs. Kat. 3 und 4

A - negativ oder niedriger Titer (Kat. 1/ 2) in erster und letzter Probe

B - konstant hoher Titer (Kat. 3) in erster oder letzter Probe

C - negativ oder niedriger Titer (Kat. 1/ 2) in letzter Probe

D - Titeranstieg oder konstant hoher Titer (Kat. 3/ 4) in letzter Probe

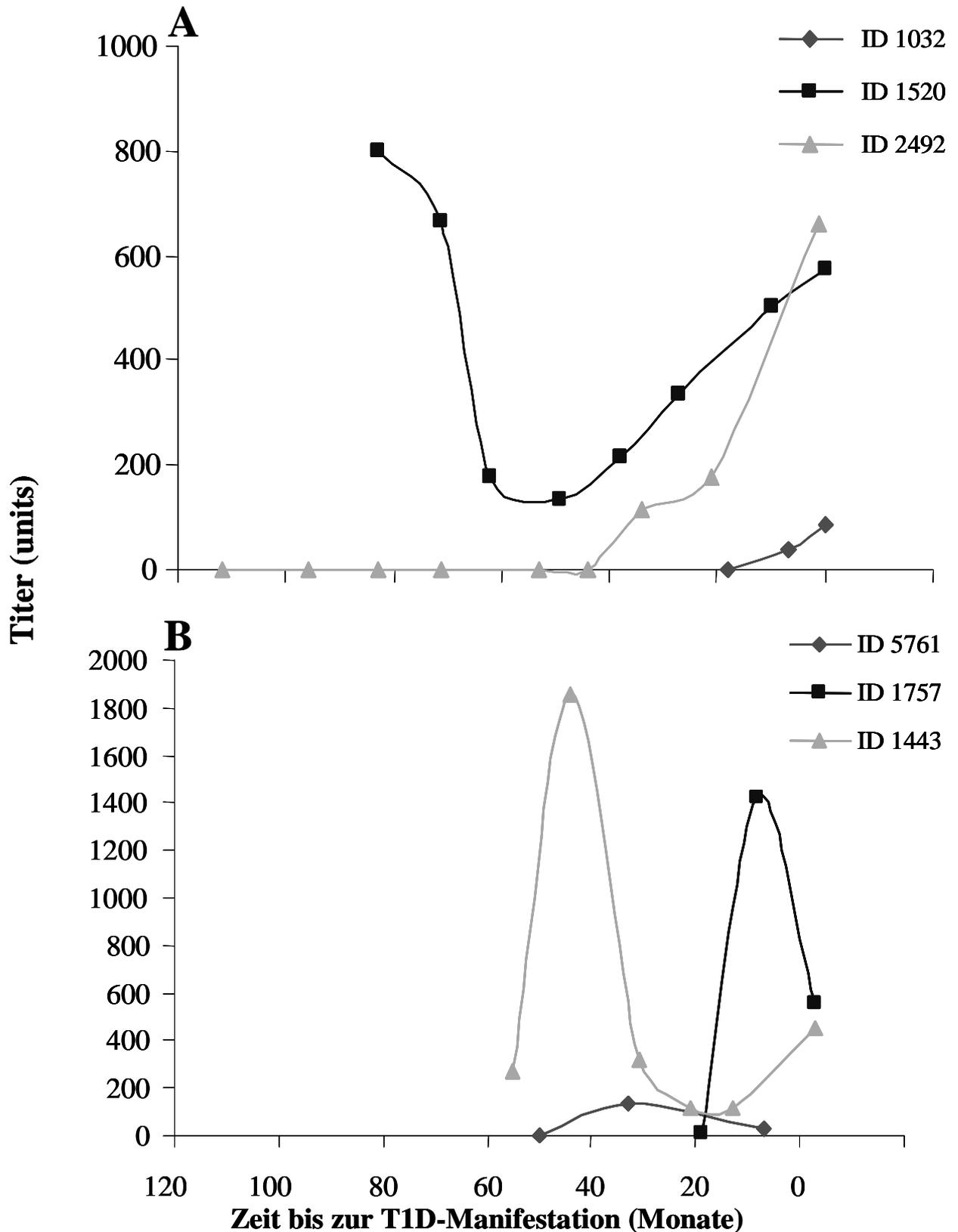
E - negativ oder niedriger Titer (Kat. 1) in letzter Probe

F - Titeranstieg oder konstant hoher Titer (Kat. 2/ 3) in letzter Probe

Bei 11 von 30 IA-2A-positiven Verwandten (36,7%), die Typ 1 Diabetes entwickelten, wurde innerhalb von 2 Jahren vor Krankheitsmanifestation ein signifikanter Titeranstieg ( $>50$  U) von IA-2A beobachtet, und 5 Personen (16,7%) zeigten innerhalb von 4 Jahren vor Diagnosestellung einen Titerpeak ( $>100$  U) von IA-2A (Abbildung 8).

Darüber hinaus wiesen 5 Personen (16,7%), bei denen nur 2 Proben vorhanden waren, einen deutlichen Titerabfall von über 100 U innerhalb von 4 Jahren vor Krankheitsausbruch auf, was ebenfalls auf einen wahrscheinlichen Titerpeak in diesem Zeitraum vor der Krankheits-Manifestation schließen lässt. Dagegen zeigte keine IA-2A-positiv Person, die keinen Diabetes entwickelte, derartige Titer Spitzen, trotz der Präsenz von GADA-Peaks.

Das Risiko für Typ 1 Diabetes war hoch bei Personen mit einem Titeranstieg ( $>50$  U) oder Titerpeak ( $>100$  U) von IA-2A innerhalb von 4 Jahren vor Studienende (65,6%,  $n=32$ ) gegenüber IA-2A-positiven Personen ohne Titeranstieg und Peaks (32,1%,  $n=28$ ;  $p=0,08$ ) und IA-2A-negativen Verwandten (16,9%,  $n=83$ ;  $p=0,0001$ ). Für GADA und IAA konnte keine signifikante Assoziation zwischen Titerdynamik und der Entwicklung von T1D beobachtet werden.



**Abbildung 8** Titeranstieg (A) und Titerpeak (B) von IA-2A wurden häufig bis zu zwei bzw. vier Jahren vor Manifestation von T1D beobachtet; alle hier dargestellten Personen hatten multiple positive Autoantikörper (hier nur Darstellung von IA-2A); T1D-Manifestation zum Zeitpunkt 0

## **5.2.5. Epitop-Spezifität, Subklassen und Isotypen und assoziiertes Diabetesrisiko**

### **5.2.5.1. Epitop- und Subklassen-Spezifität von GADA und assoziiertes Risiko**

Zwischen einzelnen Charakteristika von GADA (Epitop-Spezifität, Subklassen und Isotypen) und dem Risiko für Typ 1 Diabetes bestand bei GADA-positiven Verwandten kein signifikanter Zusammenhang. 56 Personen wiesen über den gesamten Verlauf ausschließlich Autoantikörper gegen GAD auf. 9 Personen aus dieser Gruppe erkrankten, während 47 keinen T1D entwickelten. Zwischen beiden Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied bezüglich GADA-Charakteristika beobachtet.

### **5.2.5.2. Epitop-Spezifität von IA-2A und assoziiertes Risiko**

Das Auftreten von Antikörpern gegen die PTP-Domäne von IA-2 oder IA-2 $\beta$  war immer mit hohem Risiko für Typ 1 Diabetes verbunden, insbesondere dann, wenn IA-2-/ IA-2 $\beta$ -kreuzreagierende Antikörper initial vorhanden waren oder sich im Verlauf entwickelten. Dabei traten IA-2 $\beta$ -spezifische Autoantikörper nie allein, sondern immer in Verbindung mit kreuzreagierenden Ak auf. Einmal entwickelte IA-2 $\beta$ -Autoantikörper gingen im Verlauf nie verloren. Von 35 Verwandten, die IA-2 $\beta$ -Antikörper aufwiesen, entwickelten 23 Personen Typ 1 Diabetes (Tabelle 13). IA-2 $\beta$ -Antikörper entwickelten sich bei 5 IA-2A-positiven Personen nach einer medianen Follow-up-Zeit von 2,6 Jahren (Bereich 1,5-4,9). Verwandte mit IA-2 $\beta$ -Ak entwickelten nach 2,3 Jahren (Bereich 0,1-7,3) T1D. IA-2 $\beta$ -Autoantikörper traten meist in Verbindung mit anderen Antikörpern auf. Das Risiko für Typ 1 Diabetes für Personen mit IA-2 $\beta$ -Ak war jedoch unabhängig vom Auftreten von Antikörpern gegen weitere Epitop-Spezifitäten. 6 von 29 IA-2A-positiven Verwandten, die im Verlauf der Studie T1D entwickelten, wiesen IA-2 $\beta$ -Ak nicht auf. Diese 6 Verwandten wiesen in 2 Fällen Antikörper gegen IA-2-PTP und IA-2-JM auf, in je einem Fall nur PTP- bzw. JM-Antikörper und bei 2 Personen wurde keine Epitop-spezifische Reaktivität nachgewiesen; alle 6 Personen waren zusätzlich GADA-positiv, eine Person wies zusätzlich IAA auf.

**Tabelle 13** Epitop-Spezifitäten und Risiko für T1D bei 58 IA-2A-positiven Verwandten; Einteilung nach Personen, die Ak permanent aufwiesen oder im Verlauf entwickelten (Ak+) und Personen, die Ak nie aufwiesen oder verloren (Ak-); signifikante Werte fett gedruckt

	Anzahl	T1D-Entwicklung (%)	kum. 10-Jahres-Risiko (CI)	p
IA-2-PTP+	34	20 (58,8%)	76,9% (57,3-96,5)	<b>&lt; 0,05</b>
IA-2-PTP-	24	9 (37,5%)	44,1% (19,8-64,4)	
IA-2 $\beta$ -PTP*+	35	23 (65,7%)	82,7% (65,1-100)	<b>0,004</b>
IA-2 $\beta$ -PTP*-	23	6 (26,1%)	33,7% (7,9-59,5)	
IA-2-JM+	38	17 (44,70%)	56,8% (36,0-77,6)	0,21
IA-2-JM-	20	12 (60,0%)	72,4% (48,5-96,3)	
IA-2 $\beta$ -spez+	5	3 (60,0%)	60,0% (18,8-100)	0,23
IA-2 $\beta$ -spez-	53	26 (51,0%)	61,6% (44,8-78,4)	

\* beinhaltet alle Personen mit  $\beta$ -PTP ( $\beta$ -PTP-spez. und kreuzreagierende AK gegen PTP und  $\beta$ -PTP)

Ob sich Epitop-Spezifitäten (gegen PTP bzw. IA-2 $\beta$ ) erst im Verlauf entwickelten oder von Beginn an positiv waren, hatte keinen Einfluss auf das T1D-Risiko (Tabelle 14).

**Tabelle 14** Risiko für T1D bei erstgradig Verwandten, die IA-2-PTP bzw. - $\beta$ -PTP-Autoantikörper von Beginn an aufwiesen/ im Verlauf entwickelten oder nie aufwiesen/ verloren

	Anzahl	T1D-Entwicklung (%)	kum. 10-Jahres-Risiko (CI)	p
PTP konstant pos.	32	18 (56,2%)	59,5% (38,4-80,6)	0,36
PTP entwickelt	2	2 (100,0%)	100%	
PTP konstant neg.	20	7 (35,0%)	43,9% (18,4-69,4)	0,41
PTP verloren	4	2 (50,0%)	33,3% (0-100)	
IA-2 $\beta$ konstant pos.	29	19 (65,5%)	88,8% (69,6-100)	0,13
IA-2 $\beta$ entwickelt	6	4 (66,7%)	100%	
IA-2 $\beta$ konstant neg.	23	6 (26,1%)	31,2% (7,0-55,4)	-
IA-2 $\beta$ verloren	-	-	-	

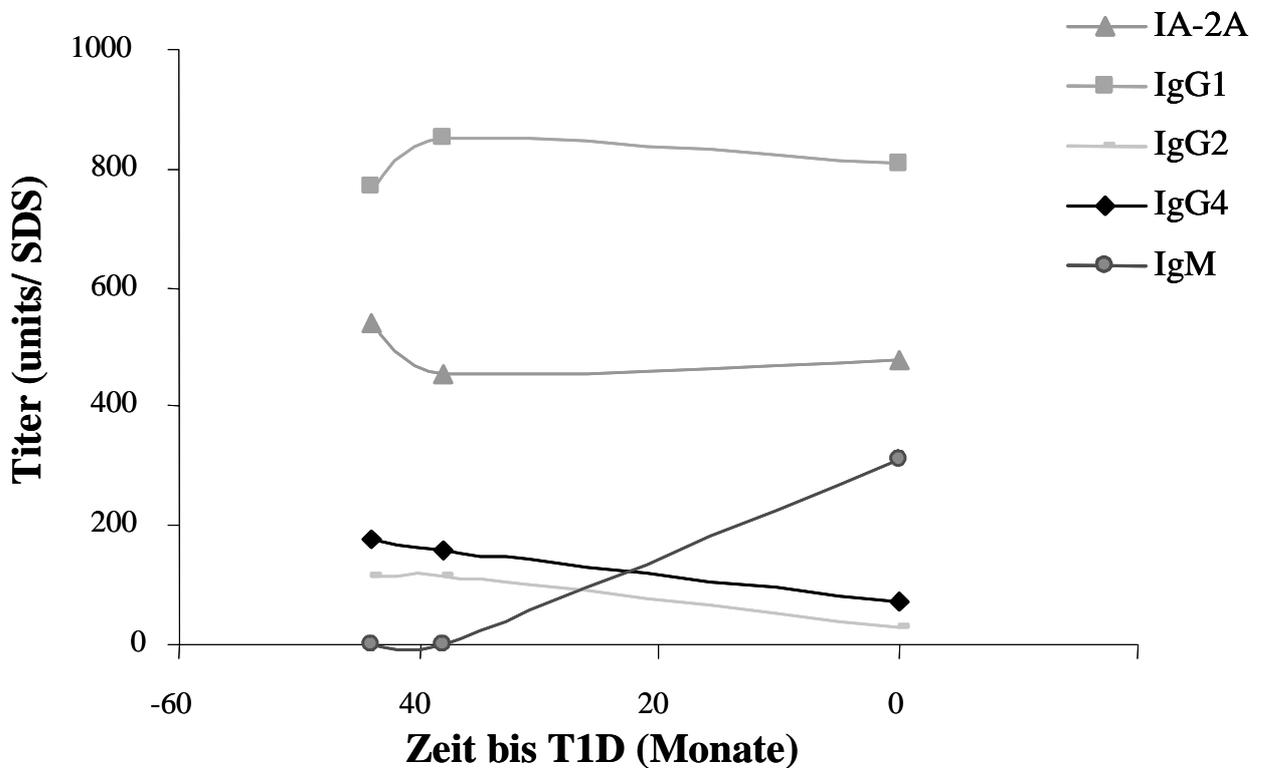
### **5.2.5.3. Subklassen- und Isotypen-Spezifität von IA-2A und assoziiertes Risiko**

Bei der Auswertung der einzelnen IA-2A-Subklassen im Hinblick auf das Diabetes-Risiko wurde ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von IgG1, IgG2, IgG4 und IgM und der Manifestation eines Typ 1 Diabetes beobachtet. IgG1 trat jedoch bei fast allen Personen auf, die IA-2A aufwiesen. Nur 9 Personen waren nie positiv für IgG1 oder verloren diese Subklasse im Verlauf; das T1D-Risiko für diese 9 Verwandten war über 10 Jahre 22,2%. Bei 5 der IgG1-negativen Personen war der IA-2A-Titer niedrig (Kat. 1), bei 3 im mittleren Bereich und nur eine Person verlor IA-2A-IgG1 trotz gleich bleibend hohem IA-2A-Titer (Kat.3). Bei 18 Personen traten die Subklassen IgG2 und IgG4 gemeinsam über den gesamten Beobachtungszeitraum auf; von ihnen erkrankten 12 (66,7%). 13 Verwandte hatten nur eine der beiden Subklassen; 10 (76,9%) von ihnen entwickelten Typ 1 Diabetes. Das Risiko von Verwandten mit IgG2 und IgG4 war gegenüber Personen, die nur eine der beiden Subklassen aufwiesen, nicht signifikant erhöht. Verwandte mit IgG2 und/ oder IgG4 hatten über 10 Jahre ein kumulatives Erkrankungsrisiko von 91,0%. Dagegen hatten Verwandte mit IA-2 Antikörpern, die keine der beiden Subklassen aufwiesen, ein Risiko von 28,6%. Neben der Subklassen-Spezifität war noch das Auftreten multipler Subklassen mit erhöhtem Risiko verbunden (Tabelle 15).

Der Zeitpunkt des Auftretens von IgG1, IgG2, IgG4 und IgM im Hinblick auf das Risiko war nur bei IgM von Bedeutung: 7 Personen, die IgM im Verlauf entwickelten, erkrankten nach einer medianen Beobachtungszeit von 0,4 Jahren (Bereich 0,0-1,2 Jahre) nach Auftreten dieses Markers (Abbildung 9). Dagegen blieben Personen, die IA-2A-IgM von Beginn an aufwiesen, diabetesfrei. IgM entwickelte sich nach einer medianen Follow-up-Zeit von 1,7 Jahren (0,4-2,4 J.) bei IA-2A-positiven Verwandten.

**Tabelle 15** Risiko für T1D bei 58 IA-2A-positiven Verwandten in Abhängigkeit von Subklassen-Spezifität und -Anzahl; Einteilung nach Personen, die Ak permanent aufwiesen/ im Verlauf entwickelten (Ak+) und Personen, die Ak nie aufwiesen/ im Verlauf verloren (Ak-); signifikante Werte fett gedruckt

	Anzahl	T1D-Entwicklung (%)	kum. 10-Jahres-Risiko (CI)	p
IgG1+	49	27 (55,1%)	70,2% (53,8-86,9)	<b>0,03</b>
IgG1-	9	2 (22,2%)	14,3% (0,0-40,3)	
IgG2+	21	15 (71,4%)	87,8% (67,8-100)	<b>0,0001</b>
IgG2-	37	14 (37,8%)	47,3% (27,5-67,1)	
IgG4+	28	19 (67,9%)	80,7% (63,4-98,0)	<b>0,02</b>
IgG4-	30	10 (33,4%)	37,7% (17,3-58,1)	
IgG2/ 4+	31	22 (71,0%)	91,0% (75,9-100)	<b>0,0007</b>
IgG2/ 4-	27	7 (26,0%)	28,6% (8,6-48,6)	
IgM+	10	7 (70,0%)	100%	<b>0,03</b>
IgM-	48	22 (45,8%)	57,3% (49,9-74,7)	
≥2 Subklassen	31	21 (67,7%)	84,7% (67,4-100)	<b>0,002</b>
≤2Subklassen	27	8 (29,6%)	33,9% (11,7-55,0)	



**Abbildung 9** Exemplarischer Verlauf eines IA-2A-positiven Verwandten (ID5647) mit den Risiko-Subklassen IgG2, IgG4 und IgM; diese Person erkrankte einen Monat nach dem ersten positiven Befund für IA-2A-IgM an Typ 1 Diabetes (Manifestation zum Zeitpunkt 0)

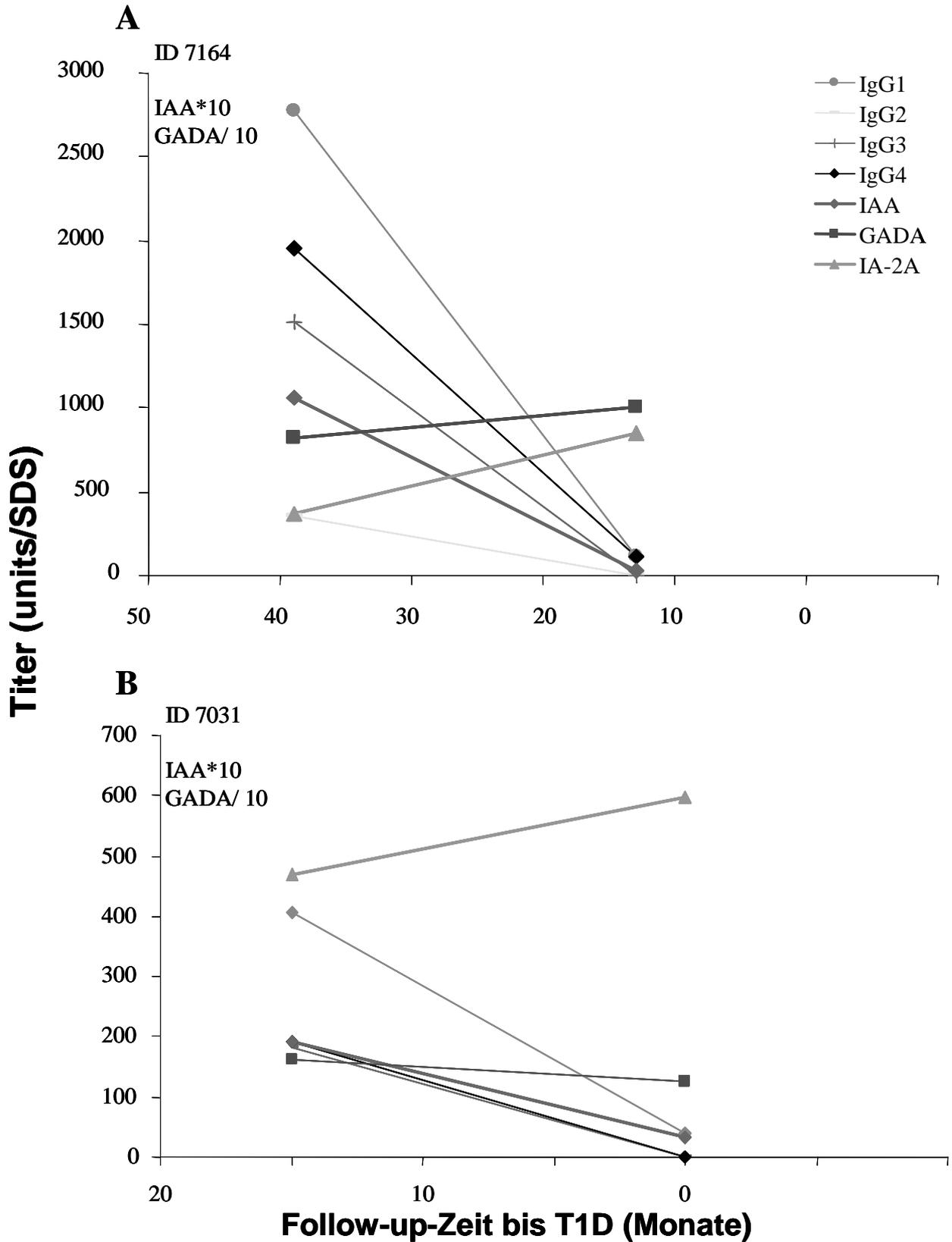
#### 5.2.5.4. Subklassen-Spezifität von IAA und assoziiertes Risiko

Bezüglich der Dynamik der IAA-spezifischen Subklassen im Verlauf konnte keine signifikante Assoziation mit der Krankheitsentwicklung von Typ 1 Diabetes gefunden werden (Tabelle 16). Maßgeblich hierfür war, dass Autoantikörper gegen Insulin im Verlauf verloren wurden oder der IAA-Titer abfiel. Das Risiko für Typ 1 Diabetes war jedoch signifikant erhöht, wenn IgG2 oder IgG4 in der ersten Ak-positiven Probe positiv waren (58,3% für IgG2-positive in der ersten Probe vs. 25% für IgG2-negative Personen,  $p=0,03$  und 61,5% für IgG4-positive in der ersten Probe vs. 23,1% für IgG4-negative Verwandte,  $p=0,03$ ).

**Tabelle 16** Anzahl der Subklassen-spezifischen Antikörper und assoziiertes Diabetes-Risiko bei 55 IAA-positiven Verwandten; Einteilung nach Personen, die Subklassen permanent aufwiesen/ im Verlauf entwickelten (Ak+) und Personen, die Subklassen nie aufwiesen/ verloren (Ak-)

	Anzahl	T1D-Entwicklung (%)	kum. 10-Jahres-Risiko (CI)	p
IgG1+	20	7 (31,4%)	50,3% (22,6-78,5)	0,61
IgG1-	35	11 (35,0%)	36,0% (18,2-53,8)	
IgG2+	6	3 (50,0%)	33,3% (0-71,0)	0,1
IgG2-	49	15 (30,6%)	39,8% (22,7-56,9)	
IgG3+	9	3 (33,3%)	33,3% (2,5-64,1)	0,45
IgG3-	46	15 (32,6%)	44,7% (25,8-63,6)	
IgG4+	12	6 (50,0%)	74,3% (35,2-100)	0,18
IgG4-	43	12 (27,9%)	35,3% (18,0-52,6)	
IgG2/ IgG4+	15	7 (46,7%)	74,9% (37,7-100)	0,11
IgG2/ IgG4-	40	11 (27,5%)	34,4% (16,8-52,4)	

Der Verlust von Subklassen war regelmäßig mit einem Titerabfall (in 12 von 23 Fällen verringerte sich zeitgleich die Titerkategorie von IAA), in 4 Fällen (17,4%) mit dem Verlust von IAA assoziiert. Von 8 Personen, die IAA-IgG2 verloren, erkrankten 5 (62,5%), von 5 Personen, die IgG3 verloren, 3 (60%) und von 4 Verwandten, die IgG4 verloren, entwickelten 3 (75%) T1D. 2 Personen verloren alle IAA-Subklassen, der IAA-Titer fiel ab, gleichzeitig stiegen GADA und/ oder IA-2A an und 11 bzw. 1 Monat später entwickelte sich Typ 1 Diabetes (Abbildung 10).



**Abbildung 10** Zwei Verwandte verloren alle IAA-Subklassen, gleichzeitig stieg der IA-2A-/ GADA-Titer an, und kurze Zeit später entwickelte sich T1D; A: ID 7164 (Alter 3,7 Jahre bei Manifestation) und B: ID 7031 (Alter 10,3 Jahre); Manifestation von T1D zum Zeitpunkt 0 (Legende oben rechts für Abbildungen A und B)

### **5.2.6. Autoantikörper und assoziiertes Risiko – Multivariate Analyse**

Parameter, die in der univariaten Analyse signifikant mit der Entwicklung von Typ 1 Diabetes assoziiert waren (Anzahl der Autoantikörper, IA-2A-Titer im Verlauf, die IA-2A-Subklassen IgG2, IgG4 und/ oder IgM und Reaktivität gegen IA-2 $\beta$ ), wurden in einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse getestet. Im multivariaten Modell standen lediglich IA-2A-Subklassen weiterhin signifikant mit einem erhöhten Risiko für T1D in Zusammenhang. Die übrigen Marker waren in der multivariaten Analyse nicht länger signifikant (Tabelle 17).

**Tabelle 17** Risiko für T1D bei erstgradig Verwandten – multivariate Cox-Regressions-Analyse; n=141 (bei 2 IA-2A-positiven Verwandten war kein Serum zur Messung von Subklassen- und Epitop-Spezifitäten verfügbar, deshalb wurden sie aus der multivariaten Analyse ausgeschlossen); A: signifikante Variablen in der univariaten Analyse; B: nach Einschluß in das schrittweise Cox-Modell waren nur IA-2A-Subklassen/ -Isotypen signifikant mit Risiko für Typ 1 Diabetes assoziiert; signifikante Werte fett gedruckt

**A**

Signifikante Variablen vor Einschluß in das Cox-Modell	n	T1D (n)	rel. Risiko (CI)	Signifikanz(p)
<b>Ak-Anzahl</b>				<b>&lt; 0,001</b>
≤ 1 Ak im Verlauf *	79	12		
≥ 2 Ak im Verlauf	62	32	5,1 (2,6-10,0)	
<b>IA-2A-Titer</b>				<b>&lt; 0,001</b>
Kategorie 1 im Verlauf	12	3	1,2 (0,3-5,3)	
Kategorie 2 oder 3 im Verlauf	47	27	6,3 (3,2-12,1)	
IA-2A neg.*	82	14		
<b>IA-2A-Subklassen</b>				<b>&lt; 0,001</b>
IgG2/ IgG4/ IgM positiv	31	22	9,3 (4,6-18,7)	
IgG2/ IgG4 /IgM negativ	27	7	2,0 (0,8-4,9)	
IA-2A neg.*	83	15		
<b>IA-2β-PTP-AK</b>				<b>&lt; 0,001</b>
IA-2β-PTP Ak positiv	35	23	7,7 (3,9-15,1)	
IA-2β-PTP Ak negativ	23	6	2,0 (0,8-5,3)	
IA-2A neg.*	83	15		

\* Referenzvariable

**B**

Signifikante Variablen nach Einschluß in das Cox-Modell	relatives Risiko (CI)	Signifikanz (p)
<b>IA-2A-Subklassen</b>		<b>&lt; 0,001</b>
IgG2/ IgG4/ IgM positiv	9,3 (4,6-18,7)	<b>&lt;0,001</b>
IgG2/ IgG4/ IgM negativ	2,0 (0,8-4,9)	0,14
<b>Nicht mehr signifikante Variablen nach Einschluß von IA-2A-Subklassen in das Cox-Modell</b>		
		<b>Signifikanz (p)</b>
<b>≥ 2 Ak im Verlauf</b>		0,17
<b>IA-2A-Titer im Verlauf</b>		0,61
<b>IA-2β-PTP-AK</b>		0,12

### **5.3. Autoantikörper bei Personen mit schneller Diabetes-Progression bzw. mit langem Follow-up ohne Entwicklung von Typ 1 Diabetes**

26 von 44 Personen (59,1%), die Typ 1 Diabetes entwickelten, erkrankten nach weniger als 5 Jahren Follow-up-Zeit (Median 2,2 Jahre, Bereich 0,2-4,8 J.; „Progressors“). Demgegenüber standen 41 von 99 Personen (41,4%) ohne T1D-Manifestation, die über mehr als 10 Jahre verfolgt wurden und keinen Typ 1 Diabetes entwickelten (mediane Nachverfolgungszeit 12,5 Jahre, Bereich 10,4-16,4 J.; „Non-Progressors“). Beide Gruppen wurden miteinander verglichen, um mit Diabetes-Progression und -Protektion assoziierte Faktoren genauer zu analysieren.

#### **5.3.1. Alter, Autoantikörper-Anzahl und –Spezifitäten**

Die 26 „Progressors“ waren bei Studieneinschluß im Median 9,9 Jahre alt (25.-75. Quartile 7,5-25,0 J.) und damit signifikant jünger als die „Non-Progressors“, die im Median 23,7 Jahre alt (13,9-40,3 J.) waren ( $p=0,001$ ).

Aus der Gruppe der „Progressors“ hatten 20 (76,9%) von Beginn an oder im Verlauf 2 oder 3 positive Antikörper. 6 Verwandte wiesen nur einen Antikörper auf; in 3 Fällen handelte es sich hierbei um GADA, bei 2 Personen um IA-2A und bei einem Verwandten um IAA. Beide Verwandte mit alleiniger IA-2A-Positivität und Diabetes-Progression wiesen kreuzreagierende Antikörper sowie IgG1 auf, eine Person zusätzlich IgG2, IgG4 und Antikörper gegen die PTP-Domäne von IA-2. Dagegen hatten von 41 „Non-Progressors“ 35 (85,4%) nur einen Antikörper (26 GADA, 2 IA-2A, 7 IAA) und 6 mehr als einen positiven Antikörper ( $p<0,001$ ). Die Verwandten mit alleiniger Reaktivität für IA-2A hatten keine kreuzreagierenden Antikörper und keine Antikörper der Subklassen-Spezifitäten IgG2, IgG4 oder IgM.

Personen mit schneller Manifestation wiesen in 76,9% der Fälle (20 von 26) IA-2A und in 46,2% (12 von 26) Autoantikörper gegen Insulin auf. Dagegen hatten aus der Gruppe der „Non-Progressors“ 7 Personen (17,1%) IA-2A und 9 (22%) IAA. 22 von 26 Personen (84,6%) mit Diabetes-Progression und 31 von 41 Fällen (75,6%) ohne T1D-Entwicklung hatten von Beginn an oder im Verlauf Antikörper gegen GAD (n.s.; Tabelle 18).

**Tabelle 18** Antikörper-Anzahl und -Spezifitäten bei Verwandten mit Diabetes-Progression innerhalb von 5 Jahren (n=26) und Verwandten mit einer Nachverfolgungszeit über 10 J. ohne Entwicklung von T1D (n=41); Einteilung nach Personen, die Ak permanent aufwiesen/ im Verlauf entwickelten (Ak+) und Personen, die Ak nie aufwiesen/ verloren (Ak-); signifikante Werte fett gedruckt

	Personen mit T1D-Progression (%)	mit T1D-Protektion (%)	p *
≥ 2 Ak	20 (76,9%)	6 (14,6%)	<b>&lt; 0,001</b>
≤ 2 Ak	6 (23,1%)	35 (85,4%)	
IAA+	12 (46,2%)	9 (22,0%)	<b>0,04</b>
IAA-	14 (53,8%)	32 (78,0%)	
IA-2A+	20 (76,9%)	7 (17,1%)	<b>&lt; 0,001</b>
IA-2A-	6 (23,1%)	34 (82,9%)	
GADA+	22 (84,6%)	31 (75,6)	0,38
GADA-	4 (15,4%)	10 (24,4%)	

\* p-Werte wurden mit dem  $\chi^2$ -test bzw. Fisher's Exact Test berechnet

### 5.3.2. Autoantikörper-Titer bei Verwandten mit T1D-Progression und -Protektion

Personen aus der Gruppe der „Progressors“ hatten in der ersten Ak-positiven Probe signifikant höhere Autoantikörper-Titer als Verwandte aus der Gruppe der „Non-Progressors“. „Progressors“ wiesen in der ersten Probe einen medianen IAA-Titer von 17,6 units auf (25.-75. Quartile 4,4-52,1 U), während der IAA-Titer der „Non-Progressors“ im Median 2,5 U (2,2-7,1 U) betrug (p=0,03). GADA-Titer in der ersten Probe waren bei den „Progressors“ ebenfalls signifikant erhöht (im Median 116,2 U, 25.-75. Quartile 74,4-610,5 U vs. 67,9 U, 25,9-93,3 U, bei den „Non-Progressors“; p=0,02), ebenso wie der Titer von IA-2A (im Median 244,0 U, 25.-75. Quartile 90,8-468,0 U, vs. 31,8 U, 12,7-86,6 U; p=0,003). Verwandte, die im Verlauf T1D entwickelten, zeigten häufig charakteristische Autoantikörper-Verläufe: Meist waren über einen längeren Zeitraum multiple Autoantikörper vorhanden, IA-2A war positiv und zeigte vor Manifestation der Erkrankung einen Titerpeak oder -anstieg. Insgesamt hatten diese Personen meist höhere Titer, insbesondere IA-2A, und entwickelten häufig IA-2A-IgM. Ebenso konnte der parallele Verlauf von 2 positiven Autoantikörpern innerhalb eines Zeitraums oft beobachtet werden. Verwandte, die trotz langem Follow-up keinen T1D entwickelten, wiesen dagegen in den meisten Fällen nur einen positiven Autoantikörper (GADA) auf (vgl. Abbildung 2, Abbildung 3, Abbildung 8).

### 5.3.3. Epitop- und Subklassen-Spezifität von GADA

„Progressors“ und „Non-Progressors“ unterschieden sich weder in der Epitop- noch in der Subklassen-Spezifität von GADA. In beiden Gruppen waren Antikörper gegen den mittleren Teil (GAD-mid) und c-terminalen Teil (GAD-COOH) von GAD häufig vorhanden und Antikörper gegen GAD 67 und gegen die n-terminale Domäne von GAD (GAD-NH<sub>2</sub>) traten eher selten auf. Ebenso war IgG1 in beiden Gruppen häufig und die übrigen Subklassen vergleichsweise selten positiv (Tabelle 19).

**Tabelle 19** Anzahl (%) von GADA-positiven Personen mit rascher Diabetesentwicklung (n=22) und langem Verlauf ohne Diabetes-Progression (n=31), die Ak gegen GAD-spezifische Epitope bzw. Subklassen/ Isotypen von Beginn an konstant aufwiesen bzw. im Verlauf entwickelten

	<b>Personen mit T1D-Progression (%)</b>	<b>mit T1D-Protektion (%)</b>
GAD-COOH	18 (81,8%)	22 (68,8%)
GAD-mid	19 (86,4%)	25 (78,1%)
GAD-NH <sub>2</sub>	5 (22,7%)	14 (43,8%)
GAD-67	6 ( 27,3%)	7 (21,9%)
GADA-IgG1	20 (90,9%)	31 (96,9%)
GADA-IgG2	6 (27,3%)	7 (21,9%)
GADA-IgG4	7 (31,8%)	8 (25,0%)
GADA-IgM	3 (13,6%)	4 (12,5%)
GADA-IgA	3 (13,6%)	7 (21,9%)

### 5.3.4. Epitop- und Subklassen-Spezifität von IA-2A

20 IA-2A-positive Personen, bei denen Subklassen und Epitop-Spezifitäten von IA-2A gemessen wurden, entwickelten innerhalb von 5 Jahren Typ 1 Diabetes, während 9 IA-2A-positive Verwandte über mehr als 10 Jahre diabetesfrei blieben. Aus der „Progressor“-Gruppe wiesen 17 Personen (85,0%) Ak gegen IA-2 $\beta$  (kreuzreaktive Ak) auf. Diese Spezifität war nur bei 22,2% (n=2) aus der Gruppe der „Non-Progressors“ von Beginn an oder im Verlauf vorhanden (p=0,002). Aus der Gruppe mit Diabetes-Progression hatten 15 (75,0%) Antikörper gegen die PTP-Domäne von IA-2. Nur 3 Verwandte (33,3%) aus der „Non-Progressor“-Gruppe wiesen Ak gegen IA-2-PTP auf (p<0,05). Für IA-2-JM-Ak wurde kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen beobachtet (Tabelle 20).

**Tabelle 20** Anzahl (%) von IA-2A-positiven Personen mit rascher Diabetesentwicklung (n=20) und langem Verlauf ohne Diabetes-Progression (n=9); Einteilung nach Personen, die Antikörper gegen IA-2-spezifische Epitope permanent aufwiesen/ im Verlauf entwickelten (Ak+) und Personen, die Ak nie aufwiesen/ im Verlauf verloren (Ak-); signifikante Werte fett gedruckt

	Personen mit T1D-Progression (%)	mit T1D-Protektion (%)	p*
JM+	12 (60,0%)	6 (66,7%)	0,4
JM-	8 (40,0%)	3 (33,3%)	
PTP+	15 (75,0%)	3 (33,3%)	<0,05
PTP-	5 (25,0%)	6 (66,7%)	
kreuzreaktiv+	17 (85,0%)	2 (22,2%)	0,002
kreuzreaktiv-	3 (15,0%)	7 (77,8%)	
IA-2 $\beta$ -PTPspez.+	3 (15,0%)	-	0,001
IA-2 $\beta$ -PTPspez.-	17 (85,0%)	9 (100,0%)	

\* p-Werte wurden mit dem  $\chi^2$ -test bzw. Fisher's Exact Test berechnet

Ähnlich verhielt es sich bei den IA-2A-spezifischen Subklassen: Die mit hohem Risiko assoziierten Subklassen IgG1, IgG2, IgG4 und IgM waren in der Gruppe mit Diabetes-Progression innerhalb von 5 Jahren signifikant häufiger vorhanden (Tabelle 21).

**Tabelle 21** Anzahl (%) von IA-2A-positiven Personen mit rascher Diabetesentwicklung (n=20) und langem Verlauf ohne Diabetes-Progression (n=9); Einteilung nach Personen, die IA-2A-spezifische Subklassen/ Isotypen permanent aufwiesen/ im Verlauf entwickelten (Ak+) oder nie aufwiesen/ verloren (Ak-); signifikante Werte fett gedruckt

	Personen mit T1D-Progression (%)	mit T1D-Protektion (%)	p*
IgG1+	19 (95,0%)	6 (66,7%)	0,08
IgG1-	1 (5,0%)	3 (33,3%)	
IgG2+	13 (65,0%)	-	0,001
IgG2-	7 (35,0%)	9 (100,0%)	
IgG4+	14 (70,0%)	1 (11,1%)	0,005
IgG4-	6 (30,0%)	8 (88,9%)	
IgG2/ IgG4+	16 (80,0%)	1 (11,1%)	0,001
IgG2/ IgG4-	4 (20,0%)	8 (88,9%)	
IgM+	8 (40,0%)	-	0,03
IgM-	12 (60,0%)	9 (100,0%)	

\* p-Werte wurden mit dem  $\chi^2$ -test bzw. Fisher's Exact Test berechnet

### 5.3.5. Subklassen-Spezifität von IAA

13 Verwandte, bei denen IAA-spezifische Subklassen bestimmt waren, entwickelten innerhalb von 5 Jahren Typ 1 Diabetes. 11 Verwandte blieben länger als 10 Jahre diabetesfrei. Keine Person aus der „Non-Progressor“-Gruppe wies IgG2 und/ oder IgG4 auf. Diese Beobachtung war jedoch nicht signifikant mit Diabetes-Protektion verbunden (Tabelle 22).

**Tabelle 22** Anzahl von Personen mit IAA-spezifischen Subklassen und rascher Diabetes-Progression (n=13) bzw. über 10-jährigem Verlauf ohne Entwicklung von T1D

	<b>Personen mit T1D-Progression (%)</b>	<b>mit T1D-Protektion (%)</b>
IgG1	4 (30,8%)	5 (45,5%)
IgG2	3 (23,1%)	-
IgG3	3 (23,1%)	3 (27,3%)
IgG4	4 (30,8%)	-

## 6. Diskussion

Dem Diabetes mellitus Typ 1 liegt eine autoimmune Zerstörung der  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas zugrunde. Sowohl T-Lymphozyten als auch B-Lymphozyten sind für die Pathogenese der Erkrankung von Bedeutung. Zudem stellen Autoantikörper wichtige Marker für das Ausmaß der  $\beta$ -Zellzerstörung dar. Sie können aus dem peripheren Blut gewonnen und mit international standardisierten Methoden gemessen werden. Mit Hilfe von Autoantikörper-Diagnostik kann das Erkrankungsrisiko von erstgradig Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes vorhergesagt werden. Auf diese Weise können Personen mit sehr hohem Risiko identifiziert und in Präventionsprogramme eingeschlossen werden. Bisher sind die Autoantikörper ICA, IA-2A, GADA und IAA für Diagnostik und Prädiktion des Typ 1 Diabetes etabliert. Die vorliegende Arbeit untersucht die humorale Immunantwort bei erstgradig Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes im Verlauf und charakterisiert die Titerdynamik sowie die Epitop- und Subklassenspezifität der Autoantikörper. Epitop-Spezifität und Subklassen von Inselautoantikörpern wurden im Verlauf der prädiabetischen Phase bei Verwandten bisher kaum untersucht, sind aber sowohl für das Verständnis der Pathogenese des T1D als auch als zusätzliche diagnostische Marker von großem Interesse. In keiner bisherigen Studie wurden an einer vergleichbaren Anzahl von Antikörper-positiven Personen so viele Antikörper-Charakteristika (Antikörper, Titer, Epitop-Spezifitäten, Subklassen/ Isotypen) untersucht. Eine weitere Stärke der vorliegenden Arbeit ist die relativ lange Follow-up-Zeit, in der die Verwandten beobachtet wurden. In bisher veröffentlichten Publikationen wurden Autoantikörper meist nur zu einem Zeitpunkt gemessen. Dagegen ermöglicht die vorliegende Untersuchung mit dem langen Verlauf und mehreren gemessenen Proben von jeder Person die optimale Beurteilung der Veränderungen von Antikörper-Prävalenzen und -Titer.

Die Daten der vorliegenden Studie zeigen, dass humorale Autoimmunität bei den meisten Verwandten ein chronisch progredienter Prozess ist, und sich die Prävalenzen von Inselautoantikörpern im Wesentlichen nicht ändern. Bei 16 Personen wurde intermolekulares Autoantikörper-Spreading beobachtet. Spreading zeigte sich häufig bei Kindern und Jugendlichen (13 von 16 Personen mit Spreading waren unter 18 Jahren). Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass sich neue Autoantikörper auch im Erwachsenenalter entwickeln können. So entwickelte eine Person der Studienkohorte im Alter von 52 Jahren erstmals Autoantikörper gegen Insulin, gefolgt von GAD-Antikörpern

im Alter von 56 Jahren, schließlich IA-2A mit 59 Jahren, ehe sich mit 61 Jahren ein insulinpflichtiger Typ 1 Diabetes manifestierte. Die vorliegenden Daten bestätigen die Ergebnisse zweier weiterer Studien, die Antikörper-Spreading im Erwachsenenalter beobachteten (26, 122). Die Annahme, dass Autoantikörper gegen Insulin oftmals frühe Autoantikörper darstellen und im Verlauf häufiger verloren werden, während sich IA-2A erst im Verlauf der Autoimmunität entwickeln (66, 124), wird durch unsere Ergebnisse bestätigt: 11 von 16 Personen mit Ak-Verlust verloren IAA (69%) und 9 von 16 Personen mit Antikörper-Spreading entwickelten IA-2A (56%). Es ist möglich, dass sich IA-2A nur entwickeln oder der Titer von IA-2A nur dann ansteigt, wenn bereits aktive oder passive  $\beta$ -Zellzerstörung stattfindet. Diese Hypothese wird durch eine Studie gestützt, bei der allogene Inseln Personen mit langem Diabetes-Verlauf transplantiert wurden: Bei diesen Personen wurde GADA sofort nach Inselzell-Exposition detektiert, während IA-2A nur dann aktiviert wurden, wenn bereits Allo-Immunität nachgewiesen wurde (23). Bei den meisten Verwandten war die Immunantwort gegen Typ 1 Diabetes-assoziierte Antigene stabil. Bei rund 11% der Verwandten (n=16) wurde jedoch Spreading beobachtet, das in jedem Alter auftreten kann.

Autoantikörper-Dynamik mit Titer-Verläufen ist bisher in erster Linie bei Kindern untersucht worden. Es wurde bereits gezeigt, dass es sich hierbei um einen dynamischen Prozess mit Autoantikörper-Spreading und Titerschwankungen handelt (124). Die hier erhobenen Daten sprechen für unterschiedliche Verläufe von Autoimmunität. Zum einen existiert die beschriebene dynamische Form mit multiplen Autoantikörpern, inter- und intramolekularem Spreading, an- und abschwelenden Titern, die in der Studienkohorte signifikant häufiger bei Kindern und Jugendlichen, aber vereinzelt auch bei Erwachsenen beobachtet wurde. Daneben trat ein chronischer Typ mit nur einem positiven Autoantikörper (meist GADA) auf, der über Jahre positiv blieb, und dessen Titer sich nur unwesentlich änderte. Die chronische Form wurde in erster Linie bei Erwachsenen beobachtet. Darüber hinaus gab es Verwandte, die zunächst mehrere Autoantikörper aufwiesen, alle bis auf einen verloren und im Verlauf den chronischen Typ entwickelten. Eine mögliche Erklärung für die dynamische Form ist zum einen das noch nicht ausgereifte Immunsystem bei kleinen Kindern; zum anderen wäre es möglich, dass das Immunsystem durch exogene Faktoren (z.B. Impfungen, Infektionen) zur Produktion von Antikörpern gegen weitere Antigene stimuliert wird. Letztgenannte Hypothese könnte das Vorkommen des dynamischen Typs auch im Erwachsenenalter erklären. Der chronischen Form könnte eine gegen ein im Zerstörungsprozess weniger bedeutendes Antigen (GAD)

gerichtete Immunreaktion zugrunde liegen, die weniger aggressiv verläuft. Eine mögliche Erklärung ist eine spezifische Reaktion, die nicht in  $\beta$ -Zellzerstörung und Typ 1 Diabetes endet. Die Titerdynamik beinhaltet bei dieser Studienkohorte also im Wesentlichen drei Typen, den dynamischen Typ bei jungen Verwandten, den chronischen Typ, den vor allem ältere Verwandte aufwiesen und eine dritte Verlaufsform, die zunächst wie die dynamische Form imponiert, aber im Verlauf nur einen stabilen positiven Autoantikörper wie die chronische Form zeigt.

Autoantikörper gegen Epitope von GAD waren meist gegen die mittlere und c-terminale Region gerichtet, während die n-terminale Region und GAD 67 selten erkannt wurden. Dabei war die Immunantwort gegen die beiden Haupt-Epitope (GAD-c-terminal und GAD-mid) meist von stärkerer Intensität, was sich in höheren Antikörpertitern als bei Antikörpern gegen GAD-NH<sub>2</sub> und GAD 67 ausdrückte. Spreading konnte häufig beobachtet werden. Häufig entwickelten sich zunächst Antikörper gegen die Haupt-Epitope GAD-c-terminal und GAD-mid und im Verlauf Autoantikörper mit geringerem Titer gegen GAD-NH<sub>2</sub>. Ein festes Spreading-Muster wurde jedoch nicht beobachtet. Demnach sind die mittlere und c-terminale GAD-Region die primären Ziele der GAD-spezifischen Immunantwort, während die n-terminale Region erst später im Verlauf erkannt wird. Die Beobachtungen sind mit bisher durchgeführten Untersuchungen der GAD-Epitop-spezifischen Reaktivität bei Kindern der BABYDIAB-Studie (20) und bei Personen mit Typ 1 Diabetes und Schilddrüsenerkrankungen (95) konkordant.

Die Analyse der Immunantwort gegen Epitope von IA-2 zeigte überraschende neue Ergebnisse. In einer 1998 von Naserke et al. publizierten Studie wurde Reaktivität bei Kindern meist ausgehend von Autoantikörpern gegen JM mit Spreading zu den PTP-Regionen von IA-2 und IA-2 $\beta$  beobachtet. Bei älteren Verwandten wurde Spreading in dieser Studie nur ein einziges Mal beobachtet. JM wird als frühes Ziel der Immunreaktion gegen IA-2 beschrieben (86). Kawasaki et al. beobachteten dagegen Autoantikörper gegen die JM-Region eher bei Erwachsenen (65). Unsere Daten zeigen, dass Antikörper-Spreading auch bei älteren Verwandten auftreten kann und sich meist von den PTP-Regionen auf die JM-Region ausdehnt (14 von 58 IA-2A-positiven Verwandten entwickelten Autoantikörper gegen die JM-Region im Verlauf). Über die Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien kann nur spekuliert werden. Möglicherweise werden bei Kindern, die T1D entwickeln, eher PTP-Regionen erkannt, während Autoantikörper bei Erwachsenen mit neu diagnostiziertem Typ 1 Diabetes häufiger mit der JM-Region reagieren. Eine weitere wichtige Beobachtung war, dass die mit hohem Risiko

assoziierten kreuzreaktiven Autoantikörper gegen die PTP-Domänen von IA-2 und IA-2 $\beta$  in keinem Fall im Verlauf wieder verloren wurden. Deshalb stellen sie einen idealen zusätzlichen Marker zur Stratifizierung des Risikos für Typ 1 Diabetes dar.

Zusammenfassend ist also die GAD-Epitop-spezifische Immunantwort in erster Linie gegen GAD-mid und die c-terminale Region von GAD gerichtet, wie bereits bekannt. Dagegen trat bei der Epitop-spezifischen Immunantwort gegen IA-2 ein bisher nicht beobachtetes Spreadingmuster ausgehend von PTP-Regionen auf die JM-Region auf.

Die Subklassen-spezifische Immunantwort ist bisher beim Typ 1 Diabetes kaum untersucht worden. Die BABYDIAB-Studie zeigte eine Dominanz von IgG1 bei GADA, IA-2A und IAA; andere Subklassen, insbesondere IgG4, wurden in erster Linie bei IAA beobachtet (22). Auch in weiteren Veröffentlichungen wurde IgG1 als dominierende Subklasse beschrieben (87). Unsere Daten stimmen insofern mit bisherigen Veröffentlichungen überein, dass IgG1 die Subklassen-spezifische Immunantwort dominierte. Andere Subklassen traten am häufigsten bei Insulin-Autoantikörpern auf. Dies waren meist IgG3 und IgG4 (8 bzw. 9 Fälle konstant positiv). Eine überraschende Beobachtung war die Entwicklung der Isotypen IgM und IgA bei ca. 10% der GADA-positiven und bei ca. 15-20% der IA-2A-positiven Verwandten im Verlauf. Dem Auftreten von IgA könnte eine mögliche Beteiligung der Darmmukosa (IgA) zugrunde liegen. Die Entwicklung von IgM könnte mit einer neu aufgetretenen Infektion oder mit Reaktivität gegen bislang nicht erkannte Epitope (5 von 7 Personen, die IgM entwickelten, entwickelten zeitgleich eine neue Epitop-Spezifität) zusammenhängen. Das Auftreten der Isotypen IgM und IgA im Zusammenhang mit Typ 1 Diabetes ist bisher in dieser Häufigkeit noch nie beschrieben worden. Bisher wurde IgA lediglich bei wenigen Einzelpersonen beobachtet (22).

Unsere Beobachtungen legen nahe, dass das Auftreten multipler Subklassen mit dem Autoantikörper-Titer von GADA, IA-2A oder IAA korreliert, da sie sich meist zusammen mit einem Titeranstieg entwickelten. Insgesamt ist also IgG1 die dominierende Subklasse, das Auftreten multipler Subklassen und Isotypen meist an einen sich verändernden Antikörpertiter gebunden und die Prävalenz von IgA und IgM im Zusammenhang mit Typ 1 Diabetes eine interessante und neue Beobachtung.

Das Erkrankungsrisiko war bei erstgradig Verwandten unter 15 Jahren signifikant höher als bei Personen über 15 Jahren. Eine gehäufte Erkrankungsprävalenz bei jüngeren Ak-positiven Personen wurde auch in bisher publizierten Verwandtenstudien beobachtet (122). Ein signifikant erhöhtes Risiko für Typ 1 Diabetes beim Auftreten von 2 oder 3 positiven

Autoantikörpern im Vergleich zu Personen mit nur einem positiven Autoantikörper bestätigt bislang publizierte Ergebnisse und entspricht der Empfehlung in den Leitlinien der Immunology of Diabetes Society (IDS), Personen mit mehr als einem Autoantikörper als Hochrisikogruppe zu betrachten (14). 16 Verwandte entwickelten im Verlauf ausgehend von einem positiven Autoantikörper zusätzliche Autoantikörper. Diese Verwandten hatten im Vergleich zu Personen mit einem Ak, die *keine* zusätzlichen Antikörper entwickelten, ein signifikant erhöhtes Erkrankungsrisiko. Dies unterstreicht die Bedeutung der Verlaufskontrolle, die es ermöglicht, das gegebenenfalls veränderte Erkrankungsrisiko von Verwandten, die bei der ersten Screening-Untersuchung nur einen positiven Autoantikörper aufweisen und somit der Gruppe mit niedrigem Risiko angehören, im Verlauf zu beurteilen. Personen mit 3 Autoantikörpern hatten gegenüber Verwandten mit 2 Antikörpern in dieser Studienkohorte allerdings kein erhöhtes Erkrankungsrisiko, wie es von Verge 1996 bei einer anderen Studienkohorte beschrieben wurde (117). Auffällig war die Beobachtung, dass Verwandte mit nur einem einzigen Antikörper immer dann keinen T1D entwickelten, wenn sie IAA aufwiesen, während Personen mit ausschließlicher Reaktivität gegen GAD oder IA-2 zu einem geringen Prozentsatz erkrankten. Möglicherweise stellt Insulin bei diesen Verwandten das primäre Antigen im Zerstörungsprozess der  $\beta$ -Zellen dar, eine alleinige Autoimmunantwort gegen Insulin reicht jedoch zur Entwicklung eines Typ 1 Diabetes nicht aus. Zur Krankheitsprogression scheint ein Spreading auf weitere Antigene erforderlich zu sein. Diese Hypothese wird auch durch die Beobachtung bei zwei Personen (ID 7164 und ID 7031) gestützt, die Insulin-Subklassen verloren und einen fallenden IAA-Titer aufwiesen, gleichzeitig einen Titeranstieg von IA-2A zeigten und kurze Zeit später Typ 1 Diabetes entwickelten. Warum ein geringer Prozentsatz der Personen, die nur GADA bzw. nur IA-2A aufwiesen, erkrankte, während andere keinen T1D entwickelten, kann mit den vorliegenden Daten nicht geklärt werden. 2 von 4 Verwandten, die IA-2A als einzigen Antikörper aufwiesen und 9 von 56 Verwandten mit alleiniger GADA-Positivität erkrankten. Zwischen GADA-positiven Verwandten mit und ohne Diabetes-Progression wurden weder signifikante Unterschiede im Alter noch in GADA-Titer, GADA-spezifischen Subklassen/ -Isotypen oder Epitop-Spezifitäten beobachtet.

Neben der Präsenz von mehr als einem positiven Autoantikörper war die Präsenz von IA-2A mit hohem Risiko für Typ 1 Diabetes assoziiert ( $p < 0,0001$ ), insbesondere bei hohem Titer. IA-2 wurde als Autoantigen, das zu einem späten Zeitpunkt der Autoimmunantwort von Antikörpern erkannt wird, beschrieben (66). In der Studienkohorte, die in der

vorliegenden Arbeit untersucht wurde, trat ein Titerpeak oder -anstieg signifikant häufiger bei Personen mit Diabetes-Manifestation auf und wurde bei IA-2A-positiven Verwandten ohne Diabetes-Progression nie beobachtet. Die in einer kürzlich erschienenen Publikation postulierte These, dass IA-2A ein stärkerer Prädiktor für Typ 1 Diabetes sei als die Präsenz multipler Autoantikörper (36), kann durch die hier vorliegenden Daten nicht bestätigt werden. Bei Personen mit zwei oder drei positiven Autoantikörpern war das Risiko unabhängig von der Spezifität der Antikörper und bei Präsenz von IA-2A nicht signifikant erhöht. Innerhalb der Gruppe der IA-2A-positiven Verwandten hatten diejenigen mit Antikörpern gegen die PTP-Domäne von IA-2 $\beta$  ein signifikant erhöhtes Risiko ( $p=0,004$  vs. IA-2A-positiv ohne IA-2 $\beta$ -Ak). Dies bestätigt eindrucksvoll die bereits 1994 von Christie et al. erstmalig an einer kleineren Studienkohorte beobachtete Assoziation zwischen Diabetes-Progression und dem Auftreten von Autoantikörpern gegen ein 37-kD Inselantigen (IA-2 $\beta$ ) (32). Dagegen wurden 1998 von Naserke et al. Autoantikörper gegen die JM-Region von IA-2 als Diabetes-assoziierte Antikörper beschrieben (86). Eine mögliche Erklärung ist, dass bei dieser Studie Autoantikörper bei Kindern untersucht wurden. In der vorliegenden Studie sind jedoch Verwandte aller Altersstufen vertreten. Möglich wäre, dass Autoantikörper gegen IA-2 $\beta$  erst spät in der prädiabetischen Phase bzw. im Erwachsenenalter auftreten (81). Dafür spricht, dass Autoantikörper gegen IA-2 $\beta$  in keinem Fall wieder verloren wurden. Bei bisher unterschiedlichen Ergebnissen aus verschiedenen Publikationen sind weitere Studien mit größeren Fallzahlen notwendig, um die IA-2-Epitop-spezifische Reaktivität in verschiedenen Altersstufen und damit assoziiertes Risiko für T1D genauer zu analysieren. Verwandte mit Reaktivität gegen mehr als ein Epitop von IA-2 hatten ebenfalls ein signifikant erhöhtes Risiko. Dieses Ergebnis wird durch eine weitere Studie (21) bestätigt und ist am ehesten durch höhere Titer, die eine ausgeprägtere Immunreaktion widerspiegeln, erklärbar.

Die Analyse der Subklassen-spezifischen Immunantwort gegen IA-2 brachte überraschende neue Ergebnisse. Aufgrund bisheriger Hypothesen, die Antikörper-Subklassen im Zusammenhang mit Cytokinen, die die Subklassen-Antwort beeinflussen, bringen, und aufgrund der TH1- und TH2-Paradigmen, müsste IgG4 mit einem geringen Risiko für Typ 1 Diabetes einhergehen (105). Die Ergebnisse bei der vorliegenden Studienkohorte zeigen jedoch, dass IA-2A-IgG2 und -IgG4 mit einem signifikant *erhöhten* Risiko für Typ 1 Diabetes assoziiert sind. Wir favorisieren die Annahme, dass der Autoantikörper-Titer der wichtigste Prädiktor für die Diabetesentwicklung ist, während multiple Autoantikörper-Subklassen und Epitop-Reaktivität eine starke Titer-assoziierte

Immunreaktion widerspiegeln und demnach zusätzliche Risikofaktoren darstellen. Ein überraschendes und neues Ergebnis war die sehr schnelle Diabetesentwicklung bei allen Personen, die IgM im Verlauf entwickelten oder einen Titeranstieg von IA-2A-IgM zeigten. Bisher wurden IgM-Isotypen noch nie in signifikantem Zusammenhang mit Typ 1 Diabetes beobachtet. Möglicherweise entwickeln sich IgM als Immunglobuline der Erstantwort genau dann, wenn neue antigene Strukturen erkannt werden. Hierbei könnte es sich um Epitop-Spezifitäten von IA-2, aber auch um andere Faktoren, die das Immunsystem beeinflussen (z.B. virale Infektionen) handeln. Ob IA-2A-IgM wirklich als Prädiktoren für eine sehr rasche Entwicklung von Typ 1 Diabetes betrachtet werden können, müssen Untersuchungen mit großen Fallzahlen zeigen. IA-2A war bei vorliegendem Kollektiv stärkster Prädiktor für Typ 1 Diabetes, insbesondere bei hohem Titer, Reaktivität gegen IA-2 $\beta$  und Präsenz der Subklassen IgG2, IgG4 und IgM.

Neben IA-2A war die Präsenz von Autoantikörpern gegen Insulin mit signifikant erhöhtem Risiko für Typ 1 Diabetes assoziiert (17 von 45 IAA-positiven Verwandten entwickelten Typ 1 Diabetes;  $p < 0,04$ ). Das Risiko für Typ 1 Diabetes stieg mit höheren Titerkategorien. Einzelne IAA-Subklassen waren im Verlauf, im Gegensatz zu IA-2A-Subklassen, nicht mit signifikant höherem Risiko verbunden. IAA-positive Personen, die erkrankten, wiesen alle zusätzliche Autoantikörper im Serum auf; dagegen erkrankte keine von 11 Personen, die nur IAA aufwiesen. Darüber hinaus waren IAA-positive Verwandte signifikant jünger als Verwandte ohne diese Antikörper. Dieses Ergebnis bestätigt Beobachtungen aus einer von Yu et al. publizierten Studie, derzufolge IAA als erste Antikörper auftreten (122). Möglicherweise wird der autoreaktive Prozess von Autoantikörpern gegen Insulin initiiert. In der Folge dehnt sich die Immunreaktion auf weitere Autoantigene aus, ehe sich die Erkrankung Typ 1 Diabetes manifestiert.

Im Gegensatz zu IA-2A und IAA war die Präsenz von GAD-spezifischen Autoantikörpern nicht signifikant mit Diabetes-Protektion oder -Progression assoziiert. Weder GADA-Titer noch GADA-spezifische Subklassen oder Epitop-spezifische Autoantikörper wurden im Zusammenhang mit der Entwicklung von T1D gesehen. Diese Beobachtungen stimmen mit einer im Jahr 2000 publizierten Studie bei Kindern der BABYDIAB Studie überein (20). Eine andere Gruppe zeigte, dass GADA-Titer invers mit dem Ausmaß der T-Zellantwort korreliert sind, und demzufolge Personen mit Diabetes-Protektion hohe GADA-Titer mit geringer T-Zell-Immunantwort aufweisen (54). In der hier vorliegenden Studie wurden keine T-Zell-Reaktivitäten gegen Inselantigene untersucht, die ermittelten Daten stimmen jedoch mit den Ergebnissen der oben genannten Studie insofern nicht

überein, dass zwischen GADA-Titer und Diabetes-Protektion kein signifikanter Zusammenhang beobachtet werden konnte. Die Studienkohorte aus der Münchner Familienstudie und Bart's Oxford Studie zeigte dagegen ein hohes Diabetesrisiko für Personen mit hohen IA-2A- und IAA-Titern. GADA wirkte eher als zusätzlicher Risikomarker zu IA-2A und IAA, hatte jedoch allein keinen prognostischen Stellenwert.

Die multivariate Analyse zeigte, dass der IA-2A-Subklassen-Status die Risiko-Einschätzung in Anwesenheit der anderen signifikant Risiko-assoziierten Parameter verbessert und sogar dem Titer von IA-2A als Risikomarker überlegen ist. Der Grund für diese Bedeutung der Subklassen ist unklar. Möglich wäre, dass die Subklassen-Charakteristika bestimmte Mechanismen, die der Entstehung von T1D zugrunde liegen, widerspiegeln oder die Genauigkeit der Messung von Autoantikörper-Titern verbessern. Diese könnten falsch niedrig erscheinen, wenn Antikörper an multiple Epitope binden. Unsere Arbeitsgruppe favorisiert die Hypothese, dass der Titer der Marker mit dem höchsten Stellenwert für das Risiko für T1D ist, und dass multiple Subklassen und Positivität für IA-2 $\beta$  als zusätzliche bestätigende Marker zu hohen Titern agieren.

Zwischen Personen, die über 10 Jahre Antikörper-positiv waren, ohne Typ 1 Diabetes zu entwickeln, und Verwandten, die innerhalb kurzer Zeit (<5 Jahre) erkrankten, wurden signifikante Unterschiede gefunden. Alle genannten Diabetes-assoziierten Marker wurden bei Personen mit rapider Diabetesentwicklung signifikant häufiger beobachtet als bei Verwandten, die über 10 Jahre diabetesfrei blieben. Verwandte, die innerhalb kurzer Zeit erkrankten, wiesen häufig 2 oder 3 positive Autoantikörper, IA-2A und Titeranstieg vor Manifestation und Titerschwankungen auf. Dagegen hatten Personen ohne Diabetesentwicklung meist GAD-Autoantikörper mit konstantem Autoantikörper-Titer. Autoantikörper-Titer und -Prävalenzen wurden bisher noch nie über einen so langen Zeitraum untersucht wie in der vorliegenden Studie. Der Mechanismus, der dazu führt, dass einige Personen stabile Verläufe zeigen, während andere multiple Autoantikörper und Spreading auf andere Antigene (IA-2A) aufweisen und letztlich erkranken, kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht geklärt werden. Eine nahe liegende Erklärung ist eine Assoziation zum HLA-Typ oder der Einfluss exogener Faktoren (Infektionen, Ernährung, andere Autoimmunerkrankungen), die das Immunsystem modulieren.

Ein mögliches Modell, Diabetesentwicklung und -Protektion aufgrund der erhobenen Daten mit bestmöglicher Sensitivität und Spezifität vorherzusagen, könnte folgende Schritte beinhalten:

Messung von GADA, IA-2A und Insulin-Autoantikörpern. Diese Tests sind international standardisiert und mit vergleichsweise geringem Arbeits- und Kostenaufwand durchzuführen. Durch Messung der Titer von IA-2A und IAA kann das individuelle Risiko bei positiven Personen noch näher spezifiziert werden.

Messung von IA-2 $\beta$  bei IA-2A-positiven Personen. Die quantifizierte Messung von IA-2A ist inzwischen international standardisiert, und es kann erwartet werden, dass die Messung von Antikörpern gegen IA-2 $\beta$  ebenso schnell etabliert werden könnte.

Jährliche Wiederholung der Tests bei Autoantikörper-positiven Personen. Die vorliegende Studie zeigt, dass sich Diabetes-assoziierte Antikörper während des Follow-up entwickeln oder verschwinden, und dass sich das Risikoprofil bei Personen mit Entwicklung oder Verlust von Autoantikörpern im Verlauf verändert. Nur durch die jährliche Bestimmung kann das individuelle Risiko bei Ak-positiven Personen individuell optimal evaluiert werden.

Die Messung der Autoantikörper-Subklassen ist im Vergleich zur Messung der Autoantikörper und Epitop-Spezifität der Antikörper teurer und schwieriger zu standardisieren. Deshalb und aufgrund der Tatsache, dass Autoantikörper-Subklassen noch nicht umfassend an größeren Studienkollektiven erforscht sind, ist eine routinemäßige Messung von Subklassen zu Screeningzwecken zum aktuellen Zeitpunkt nicht zu empfehlen.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass sich die mit hohem Risiko verbundenen Marker IA-2A, IA-2 $\beta$ , IAA, und Diabetes-assoziierte Autoantikörper-Subklassen in einigen Fällen erst im Verlauf entwickeln. 16 Personen entwickelten GADA, IAA, oder IA-2A erst während des Follow-up. 3 von 7 Verwandten, die im Verlauf die kritische Anzahl von  $\geq 2$  Ak entwickelten, erkrankten an T1D. Häufig wurde ein Titeranstieg von IA-2A vor der Diabetes-Manifestation beobachtet. Bei Personen, die initial keine Hochrisiko-Konstellationen aufwiesen, änderte sich das Risikoprofil, wenn Diabetes-assoziierte Autoantikörper-Charakteristika im Verlauf entwickelt wurden und war dann vergleichbar mit dem Risiko von Personen, bei denen von Beginn an eine Hochrisiko-Konstellation vorlag. Die Autoantikörper-Bestimmung aus einer einzelnen Blutprobe kann zwar einen Ausgangswert für das individuelle Risiko liefern, ist aber nicht ausreichend, da sich das Risikoprofil bei einigen Personen im Verlauf verändert. Zur Diagnostik und Prädiktion des individuellen Diabetes-Risikos sollten nach Möglichkeit jährlich Diabetes-assoziierte Marker und deren Antikörper-Titer untersucht werden.

## 7. Zusammenfassung

Inselzell-Autoimmunität tritt gehäuft bei erstgradig Verwandten von Patienten mit Typ 1 Diabetes auf und ist durch den Nachweis von Autoantikörpern im Serum gekennzeichnet. Autoantikörper-positive Personen weisen ein erhöhtes Erkrankungsrisiko auf, entwickeln jedoch nicht in jedem Fall Typ 1 Diabetes. Die Dynamik von Autoantikörpern im Autoimmunprozess, und insbesondere die Dynamik einzelner Autoantikörper-Charakteristika wie Titer, Immunglobulin-Subklassen- und Epitop-Spezifität wurden bisher im individuellen Verlauf von prädiabetischen Personen nur wenig untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei Personen mit einem familiären Diabetesrisiko Veränderungen der Inselautoantikörper-Profile im Verlauf analysiert und Reaktionsmuster identifiziert, die auf eine Diabetes-spezifische Dynamik hinweisen.

Die Verlaufsseren (n=423) von 143 Inselautoantikörper-positiven, nicht-diabetischen Verwandten aus der Münchner- und der Bart's Oxford-Familienstudie (medianes Alter bei Studieneinschluss: 15,3 Jahre; medianer Beobachtungszeitraum: 6,1 Jahre) wurden auf Autoantikörper gegen Insulin (IAA), GAD65 (GADA) und IA-2 (IA-2A) untersucht und hinsichtlich der Antikörper-Titer, dem Auftreten von Antikörper-Subklassen (IgG1 - 4, IgA, IgM, IgE) sowie der Antikörper-Epitop-Spezifität charakterisiert. In univariaten und multivariaten Analysen wurden alle Autoantikörper-Charakteristika bezüglich ihres prädiktiven Werts für die Vorhersage der Entwicklung eines Typ 1 Diabetes untersucht.

Folgende signifikante Befunde konnten erhoben werden:

1) Die Mehrheit der Verwandten (n=111; 78%) wies über den gesamten Beobachtungszeitraum eine konstante Anzahl an positiven Autoantikörpern auf. Bei jeweils 16 Verwandten (11%) erhöhte (davon 56% IA-2A, 31% IAA, 19% GADA) bzw. verringerte (davon 69% IAA, 25% IA-2A, 19% GADA) sich die Anzahl positiver Autoantikörper im Verlauf. Das Auftreten von IAA war signifikant mit einem jüngeren Alter der Verwandten bei Studieneinschluss assoziiert (p=0,001).

2) Es wurden drei typische Verlaufsmuster bei Autoantikörper-positiven Verwandten beobachtet: A) Personen mit multiplen positiven Autoantikörpern und sehr dynamischen Verläufen mit zu- und abnehmenden Antikörpertitern, dem Auftreten hoher Titerpeaks und häufigem Autoantikörper-Spreading (n=56; davon 48% Diabetes entwickelt); B) Personen

mit multiplen positiven Autoantikörpern mit zum Teil hohen Titern zu Studienbeginn, die im Verlauf alle bis auf einen persistierenden Autoantikörper verloren (n=16; davon 38% Diabetes entwickelt); C) Personen mit nur einem positiven Autoantikörper (in 92% GADA) mit zum Teil konstant hohen Antikörpertitern, jedoch wenig Titerdynamik im Verlauf und einem signifikant höheren medianen Alter bei Studieneinschluss (n=62; davon 13% Diabetes entwickelt). Neun Personen konnten keinem dieser Verlaufsmuster zugeordnet werden.

3) Die Mehrheit der Verwandten zeigte über den gesamten Studienverlauf eine konstante Anzahl an Epitop-Spezifitäten von GADA (91% der GADA positiven Personen) oder IA-2A (78% der IA-2A positiven Personen). Dominante GAD-Epitope wurden in der c-terminalen (GAD-COOH) und mittleren (GAD-mid) Domäne des Moleküls erkannt. Bei 18% der GADA-positiven Verwandten konnte im Verlauf ein intramolekulares Spreading der Immunantwort gegen weitere GAD-Epitope beobachtet werden, bei 13% verringerte sich dagegen die Anzahl erkannter Epitope. Dominante Epitope auf dem IA-2 Molekül waren in der JM-Region sowie der PTP-Region von IA-2 und IA-2 $\beta$  lokalisiert. Ein intramolekulares Spreading wiesen 25% der IA-2A-positiven Verwandten auf. Dabei weitete sich die Immunantwort im Verlauf meist auf die JM-Region aus. Einmal entwickelte Reaktivität gegenüber IA-2 $\beta$  Epitopen ging als einziger Marker im Verlauf nicht wieder verloren. Insgesamt war eine GADA- bzw. IA-2A-Reaktivität gegen multiple Epitope mit hohen Autoantikörper-Titern assoziiert. Ein generelles, signifikantes Epitop-Spreadingmuster wurde weder für IA-2A noch für GADA beobachtet.

4) IgG1 war bei der Immunantwort gegen GAD, IA-2 und Insulin jeweils die dominante Antikörper-Subklasse und wurde bei GADA bzw. IA-2A positiven Verwandten in fast 100% nachgewiesen. Die Subklassen IgG2 und IgG4 wurden in 20-40% aller Inselautoantikörper-positiven Verwandten detektiert. Das Auftreten von IgG3 war selten für GADA und IA-2A (<5%), und unterschied sich für IAA in seiner Frequenz nicht vom Auftreten von IgG2 und IgG4 (20-30%). Die Mehrheit der Verwandten hatte im Verlauf eine konstante Anzahl an Subklassen.

5) Titerveränderungen aller Autoantikörper-Spezifitäten wurden häufig von Veränderungen im IgG1 Titer begleitet, und zusätzliche Subklassen und Epitop-Spezifitäten entwickelten sich häufig gleichzeitig mit einem Titeranstieg. Bei 16 Verwandten traten im Verlauf neue IA-2A Subklassen auf, 15 IA-2A positive Verwandte zeigten ein Epitop-Spreading, und in 11 Fällen ereignete sich dieses Subklassen-/ Epitop-

Spreading gleichzeitig. Auffällig war eine Assoziation zwischen dem Neuauftreten von IA-2A gegen die JM-Region und dem Neuauftreten von IA-2A-IgM oder -IgA.

6) Im Beobachtungszeitraum entwickelten 44 Verwandte Typ 1 Diabetes (36% kumulatives 10-Jahres Diabetesrisiko). Verwandtschaftsgrad und Geschlecht waren nicht signifikant mit der Entwicklung von Typ 1 Diabetes assoziiert, dagegen war ein Alter unter 15 Jahren bei Studieneintritt signifikant mit erhöhtem Diabetesrisiko verbunden (47% vs. 28% bei Alter >15 Jahren;  $p=0,01$ ).

7) Die Entwicklung von Typ 1 Diabetes war mit einer Ausweitung der Immunantwort gegen multiple Zielantigene (Autoantikörper-Spreading) assoziiert. Verwandte, die im Verlauf multiple (>1) Inselautoantikörper entwickelten, wiesen ein signifikant erhöhtes 10-Jahres Diabetesrisiko auf (64% vs. 19% bei  $\leq 1$  Antikörper im Verlauf,  $p<0,0001$ ). Ein hohes Diabetesrisiko bestand bereits bei zwei positiven Antikörpern, ein dritter positiver Antikörper erhöhte das Risiko nicht signifikant ( $p=0,6$ ). Verwandte, die ausgehend von einem Autoantikörper erst im Verlauf multiple Autoantikörper entwickelten, hatten ein ähnlich hohes Erkrankungsrisiko wie Personen, die bereits zu Beginn des Follow-up multiple Autoantikörper aufwiesen (72% bzw. 63%).

8) Das Diabetesrisiko war signifikant mit dem Auftreten von IA-2A (65% bei IA-2A+ ,  $n=57$ , vs. 20% bei IA-2A-,  $n=86$ , in letzter Verlaufsprobe,  $p<0,0001$ ) und IAA (41% bei IAA+ ,  $n=45$ , vs. 31% bei IAA-,  $n=98$ , in letzter Verlaufsprobe,  $p<0,04$ ) assoziiert, und hohe Titer von IA-2A ( $p=0,01$ ) oder IAA ( $p=0,001$ ) stratifizierten das Diabetesrisiko innerhalb der Antikörper-positiven Personen. Das Risiko erhöhte sich bei IA-2A positiven Verwandten noch zusätzlich, wenn die Subklassen IgG2 und/ oder IgG4 (91%,  $p=0,0007$ ), IA-2A-IgM (100%,  $p<0,05$ ), sowie Antikörper-Reaktivität gegen die PTP-Region (77%,  $p<0,05$ ) des Moleküls auftraten. Insbesondere PTP-reaktive, IA-2-/IA-2 $\beta$ -kreuzreaktive Antikörper waren mit einem hohen Diabetesrisiko verbunden (83%,  $p=0,004$ ). Verwandte mit einem IA-2A Titeranstieg (>50 U) oder hohen Titerpeaks (>100 U) innerhalb von 4 Jahren vor Studienende (66%,  $n=32$ ) wiesen gegenüber IA-2A-positiven Personen ohne signifikante Titerdynamik (32%,  $n=28$ ;  $p=0,08$ ) und IA-2A-negativen Verwandten (17%,  $n=83$ ;  $p=0,0001$ ) ebenfalls ein erhöhtes Diabetesrisiko auf.

9) Das Auftreten der IAA Subklassen IgG2 und/ oder IgG4 war signifikant mit Diabetesprogression verbunden (58% für IgG2+ vs. 25% für IgG2-,  $p=0,03$  und 62% für IgG4+ vs. 23% für IgG4-,  $p=0,03$ ); und zwar unabhängig vom IAA-Status im weiteren Verlauf.

10) GADA-Charakteristika (Titer, Epitop-Spezifität, Subklassen und Isotypen) trugen nicht signifikant zur Stratifizierung des Diabetesrisikos der Verwandten bei.

11) Parameter, die in der univariaten Analyse signifikant mit der Entwicklung von Typ 1 Diabetes assoziiert waren (Anzahl der Autoantikörper, IA-2A-Titer im Verlauf, die IA-2A-Subklassen IgG2, IgG4 und/ oder IgM und Reaktivität gegen IA-2 $\beta$ ), wurden in einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse getestet. In diesem multivariaten Modell waren die IA-2A-Subklassen die einzigen signifikanten Prädiktoren des Diabetesrisikos, und keiner der anderen Marker trug unabhängig davon zur Verbesserung der Risikovorhersage bei.

12) 26 Verwandte entwickelten in weniger als 5 Jahren Follow-up Typ 1 Diabetes (Median 2,2 Jahre, „Progressors“), und 41 Verwandte entwickelten keinen Typ 1 Diabetes in mehr als 10 Jahren Follow-up (Median 12,5 Jahre, „Non-Progressors“). „Progressors“ waren signifikant jünger als „Non-Progressors“ ( $p=0,001$ ), entwickelten in 77% multiple Autoantikörper (vs. 15% „Non-Progressors“,  $p<0,001$ ), hatten signifikant höhere Autoantikörper-Titer ( $p<0,5$ ) und wiesen häufiger Autoantikörper gegen IA-2 $\beta$  (85% der IA-2A+ „Progressors“, vs. 22% der IA-2A+ „Non-Progressors“,  $p=0,002$ ) und gegen die PTP-Domäne von IA-2 (75% der IA-2A+ „Progressors“, vs. 33% der IA-2A+ „Non-Progressors“,  $p<0,05$ ) sowie die IA-2A Subklassen IgG2 (65% vs. 0%,  $p=0,001$ ), IgG4 (70% vs. 11%,  $p=0,005$ ) und IgM (40% vs. 0%,  $p=0,03$ ) auf.

Die ermittelten Daten unterstreichen die Bedeutung von Verlaufsuntersuchungen bei Autoantikörper-positiven Verwandten, da sich die Antikörper- und damit auch die individuellen Risikoprofile im Verlauf des Autoimmunprozesses verändern können. Dabei ist bemerkenswert, dass eine relevante Veränderung fast ausschließlich eine Erhöhung des Diabetesrisikos darstellt. Ein Teil der Verwandten, deren initiales Risiko relativ gering ist, können demzufolge Immunmarker im Verlauf entwickeln, die mit einem erhöhten Risiko assoziiert sind. Dagegen weisen Verwandte, die im Verlauf Immunmarker verlieren, meist bereits im initialen Screening ein relativ geringes Diabetesrisiko auf. Autoantikörper-positive Verwandte mit initial hohem Diabetesrisiko haben fast immer auch im Verlauf ein hohes Erkrankungsrisiko bzw. entwickeln Typ 1 Diabetes.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit tragen zum besseren Verständnis der Pathogenese des Typ 1 Diabetes bei und weisen auf neue diagnostische Immunmarker hin, die für die Rekrutierung von Teilnehmern an Immuninterventionsstudien zur Prävention der Erkrankung Bedeutung erlangen könnten.

## 8. Literaturverzeichnis

- (1) Aanstoot HJ, Kang SM, Kim J, Lindsay LA, Roll U, Knip M, Atkinson M, Mose-Larsen P, Fey S, Ludvigsson J, et al. 1996. Identification and characterization of glima 38, a glycosylated islet cell membrane antigen, which together with GAD65 and IA2 marks the early phases of autoimmune response in type 1 diabetes. *J Clin Invest* 97: 2772-83.
- (2) Abbas AK, Murphy KM, Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-93.
- (3) Abulafia-Lapid R, Elias D, Raz I, Keren-Zur Y, Atlan H, Cohen IR. 1999. T cell proliferative responses of type 1 diabetes patients and healthy individuals to human hsp60 and its peptides. *J Autoimmun* 12: 121-9.
- (4) Abulafia-Lapid R, Gillis D, Yosef O, Atlan H, Cohen IR. 2003. T cells and autoantibodies to human HSP70 in Type 1 diabetes in children. *J Autoimmun* 20: 313-21.
- (5) Achenbach P, Warncke K, Reiter J, Naserke HE, Williams AJ, Bingley PJ, Bonifacio E, Ziegler AG. 2004. Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics. *Diabetes* 53: 384-92.
- (6) Arden SD, Roep BO, Neophytou PI et al. 1996. Imogen 38: a novel 38-kD islet mitochondrial autoantigen recognized by T cells from a newly diagnosed type 1 diabetic patient. *J Clin Invest* 97: 551-61.
- (7) Atkinson M, Honeyman M, Peakman M, Roep B. 2000. T-cell markers in type 1 diabetes: progress, prospects and realistic expectations. *Diabetologia* 43: 819-20.
- (8) Atkinson M, Eisenbarth GS. 2001. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358: 221-9.
- (9) Bach JF. 1994. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocrine Reviews* 15(4): 516-42.
- (10) Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, DeCamilli P, Camilli PD. 1990. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347: 151-6.
- (11) Bearzatto M, Naserke H, Piquer S, Koczwara K, Lampasona V, Williams A, Christie M, Bingley P, Ziegler AG, Bonifacio E. 2002. Two distinctly HLA-associated contiguous linear epitopes uniquely expressed within the islet antigen 2 molecule are major autoantibody epitopes of the diabetes-specific tyrosine phosphatase-like protein autoantigens. *J Immunol* 168: 4202-8.
- (12) Bingley PJ, Bonifacio E, Mueller PW. 2003. Diabetes antibody standardization programme: first assay proficiency evaluation. *Diabetes* 52: 1128-36.

- (13) 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: 1701-10.
- (14) Bingley PJ, Bonifacio E, Ziegler AG, Schatz DA, Atkinson MA, Eisenbarth GS. 2001. Proposed guidelines on screening for risk of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24: 398.
- (15) Bingley PJ, Christie MR, Bonifacio E, Bonfanti R, Shattock M, Fonte MT, Bottazzo GF, Gale EA. 1994. Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. *Diabetes* 43: 1304-10.
- (16) Bingley PJ, Williams AJK, Gale EAM. 1999. Optimized autoantibody-based risk assessment in family members. *Diabetes Care* 22: 1796-801.
- (17) Boehm BO, Manfras B, Seissler J, Schoffling K, Gluck M, Holzberger G, Seidl S, Kuhl P, Trucco M, Scherbaum WA. 1991. Epidemiology and immunogenetic background of islet cell antibody-positive nondiabetic schoolchildren. Ulm-Frankfurt population study. *Diabetes* 40: 1435-9.
- (18) Boitard C, Villa MC, Becourt C, Gia HP, Huc C, Sempe P, Portier MM, Bach JF. 1992. Peripherin: An islet antigen that is cross-reactive with nonobese diabetic mouse class 2 gene products. *Proc Natl Acad Sci* 89: 172-6.
- (19) Bonifacio E, Genovese S, Braghi S, Bazzigaluppi E, Lampasona V, Bingley PJ, Rogge L, Pastore MR, Bognetti E, Bottazzo GF, et al. 1995. Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity. *Diabetologia* 38: 816-22.
- (20) Bonifacio E, Lampasona V, Bernasconi L, Ziegler AG. 2000. Maturation of the humoral autoimmune response to epitopes of GAD in preclinical childhood type 1 diabetes. *Diabetes* 49: 202-8.
- (21) Bonifacio E, Lampasona V, Bingley PJ. 1998. IA-2 (Islet cell antigen 512) is the primary target of humoral autoimmunity against type 1 diabetes-associated tyrosine phosphatase autoantigens. *J Immunol* 161: 2648-54.
- (22) Bonifacio E, Scirpoli M, Kredel K, Fuchtenbusch M, Ziegler AG. 1999. Early autoantibody responses in prediabetes are IgG1 dominated and suggest antigen-specific regulation. *J Immunol* 163: 525-32.
- (23) Bosi E, Braghi S, Maffi P, Scirpoli M, Bertuzzi F, Pozza G, Secchi A, Bonifacio E. 2001. Autoantibody response to islet transplantation in type 1 diabetes. *Diabetes* 50: 2464-71.
- (24) Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, MacKay EH, Swift PG, Gamble DR. 1985. In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N Engl J Med* 313: 353-60.
- (25) Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. 1974. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* (2): 1279-83.
- (26) Brooks-Worrell B, Gersuk VH, Greenbaum C, Palmer JP. 2001. Intermolecular antigen spreading occurs during the preclinical period of human type 1 diabetes. *J Immunol* 166: 5265-70.

- (27) Buschard K, Josefsen K, Horn T, Larsen S, Fredman P. 1993. Sulphatide antigen in islets of Langerhans and in diabetic glomeruli and sulphatide antibodies in insulin-dependent diabetes mellitus. *APMIS* 101: 963-70.
- (28) Butler MH, Solimena M, Dirx R Jr, Hayday A, De Camillo P. 1993. Identification of a dominant epitope of glutamic acid decarboxylase (GAD-65) recognized by autoantibodies in stiff-man syndrome. *J Exp Med* 178: 2097-106.
- (29) Castano L, Russo E, Zhou L, Lipes MA, Eisenbarth GS. 1991. Identification and cloning of a granule autoantigen (carboxypeptidase-H) associated with type I diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 73: 1197-201.
- (30) Castano L, Ziegler AG, Ziegler R, Shoelson S, Eisenbarth GS. 1993. Characterization of insulin autoantibodies in relatives with type 1 diabetes. *Diabetes* 42: 1202-9.
- (31) Chang YH, Hwang J, Shang HF, Tsai ST. 1996. Characterization of human DNA topoisomerase II as an autoantigen recognized by patients with IDDM. *Diabetes* 45: 408-14.
- (32) Christie M, Genovese S, Cassidy D, Bosi E, Brown TJ, Lai M, Bonifacio E, Bottazzo GF. 1994. Antibodies to islet 37K antigen, but not to glutamate decarboxylase, discriminate rapid progression to IDDM in endocrine autoimmunity. *Diabetes* 43: 1254-9.
- (33) Clarke WL, Shaver KA, Bright GM, Rogol AD, Nance WE. 1984. Autoimmunity in congenital rubella syndrome. *J Pediatr* 104: 370-3.
- (34) Couper JJ, Harrison LC, Aldis JJ, Colman PG, Honeyman MC, Ferrante A. 1998. IgG subclass antibodies to glutamic acid decarboxylase and risk for progression to clinical insulin-dependent diabetes. *Hum Immunol* 59: 493-9.
- (35) Daw K, Powers A. 1995. Two distinct glutamic acid decarboxylase autoantibody specificities in IDDM target different epitopes. *Diabetes* 44: 216-20.
- (36) Decochez K, De Leeuw IH, Keymeulen B, Mathieu C, Rottiers R, Weets I, Vandemeulebroucke E, Truyen I, Kaufman L, Schuit FC, Pipeleers DG, Gorus FK, Belgian Diabetes Registry. 2002. IA-2 autoantibodies predict impending Type I diabetes in siblings of patients. *Diabetologia* 45: 1658-66.
- (37) Dittler J, Seidel D, Schenker M, and Ziegler AG. 1998. GAD/ IA2-combi determination as first-line screening for improved prediction of type 1 diabetes in relatives. *Diabetes* 47: 592-7.
- (38) Dotta F, Gianani R, Previti M, Lenti L, Dionisi S, D'Erme M, Eisenbarth GS, Di Mario U. 1996. Autoimmunity to the GM2-1 islet ganglioside before and at the onset of type I diabetes. *Diabetes* 45: 1193-6.
- (39) Eisenbarth GS, Colman P, Ziegler AG. 1992. Pathogenesis of IDDM. In: Weir CG, Kahn CR (eds.): 13<sup>th</sup> edition Joslin textbook: 15-8
- (40) Eisenbarth GS. 1986. Type 1 Diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 314: 1360-8.

- (41) Erlander MG, Tobin AJ. 1991. The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. *Neurochem Res* 16: 215-26.
- (42) Foulis AK, Liddle CN, Farquharson MA, Richmond JA, Weir RS. 1986. The histopathology of the pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in united kingdom. *Diabetologia* 29: 267-74.
- (43) Fuchtenbusch M, Ziegler AG. 1995. Umweltfaktoren in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes. *Diab Stoffw* 4: 1-9.
- (44) Gardner SG, Gale EAM, Williams AJK, Gillespie KM, Lawrence KE, Bottazzo GF, Bingley PJ. 1999. Progression to diabetes in relatives with islet autoantibodies. Is it inevitable? *Diabetes Care* 22: 2049-54.
- (45) Genovese S, Bonifacio E, McNally JM, Dean BM, Wagner R, Bosi E, Gale EA, Bottazzo GF. 1992. Distinct cytoplasmic islet cell antibodies with different risks for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 35: 385-8.
- (46) Gillard BK, Thomas JW, Nell LJ, Marcus DM. 1989. Antibodies against ganglioside GT3 in the sera of patients with type I diabetes mellitus. *J Immunol* 142: 3826-32.
- (47) Gleichmann H, Bottazzo GF. 1987. Progress toward standardization of cytoplasmic islet cell-antibody assay. *Diabetes* 36: 578-84.
- (48) Gorsuch AN, Spencer KM, Lister J, Mc Nally JM, Dean BM, Bottazzo GF, Cudworth AG. 1981. Evidence for a long prediabetic period in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Lancet* (2): 1363-5.
- (49) Gorus FK, Goubert P, Semakula C, Vandewalle CL, De Schepper J, Scheen A, Christie MR, Pipeleers DG. 1997. IA-2-autoantibodies complement GAD65-autoantibodies in new-onset IDDM patients and help predict impending diabetes in their siblings. The Belgian Diabetes Registry. *Diabetologia* 40: 95-9.
- (50) Gurr W, Yavari R, Wen L, Shaw M, Mora C, Christa L, Sherwin RS. 2002. A Reg family protein is overexpressed in islets from a patient with new-onset type 1 diabetes and acts as T-cell autoantigen in NOD mice. *Diabetes* 51: 339-46.
- (51) Hagopian WA, Michelsen B, Karlens AE, Larsen F, Moody A, Grubin CE, Rowe R, Petersen J, McEvoy R, Lernmark A. 1993. Autoantibodies in IDDM primarily recognize the 65,000-M rather than the 67,000-M isoform of glutamic acid decarboxylase. *Diabetes* 42: 631-6.
- (52) Hagopian WA, Sanjeevi CB, Kockum I, Landin-Olsson M, Karlens AE, Sundkvist G, Dahlquist G, Palmer J, Lernmark A. 1995. Glutamate decarboxylase-, insulin-, and islet cell-antibodies and HLA typing to detect diabetes in a general population-based study of Swedish children. *J Clin Invest* 95: 1505-11.
- (53) Hanninen A, Jalkanen S, Salmi M, Toikkanen S, Nikolakaros G, Simell O. 1992. Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 90: 1901-10.

- (54) Harrison LC, Honeyman MC, DeAizpura HJ, Schmidli RS, Colman PG, Tait BD, and Cram DS. 1993. Inverse relation between humoral and cellular immunity to glutamic acid decarboxylase in subjects at risk of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 341: 1365-9.
- (55) Hawa MI, Fava D, Medici F, Deng YJ, Notkins AL, De Mattia G, Leslie RD. 2000. Antibodies to IA-2 and GAD65 in type 1 and type 2 diabetes: isotype restriction and polyclonality. *Diabetes Care* 23: 228-33.
- (56) Honeyman MC, Cram DS, Harrison LC. 1993. Transcription factor jun-B is target of autoreactive T-cells in IDDM. *Diabetes* 42: 626-30.
- (57) Hoppu S, Ronkainen MS, Kimpimaki T, Simell S, Korhonen S, Ilonen J, Simell O, Knip M. 2004. Insulin autoantibody isotypes during the prediabetic process of young children with increased genetic risk of type 1 diabetes. *Pediatr Res* 55: 236-42.
- (58) Hummel M, Bonifacio E, Schmid S, Walter M, Knopff A, Ziegler AG. 2004. Brief communication: Early appearance of islet autoantibodies predicts childhood type 1 diabetes in offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med* 140: 882-6.
- (59) Hummel M, Fuchtenbusch M, Schenker M, Ziegler AG. 2000. No major association of breast feeding, vaccinations and common childhood viral disease with early islet autoimmunity in the German BABY-DIAB study. *Diabetes Care* 23: 969-74.
- (60) Inman LR, McAllister CT, Chen L, Hughes S, Newgard CB, Kettman JR, Unger RH, Johnson JH. 1993. Autoantibodies to the GLUT-2 glucose transporter of beta cells in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 1281-4.
- (61) Itoh N, Hanafusa T, Miyazaki A, Miyagawa J, Yamagata K, Yamamoto K, Waguri M, Imagawa A, Tamura S, Inada M, et al. 1993. Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Clin Invest* 92: 2313-22.
- (62) Karjalainen JK. 1990. Islet cell antibodies as predictive markers for IDDM in children with high background incidence of disease. *Diabetes* 39: 1144-50.
- (63) Kasimiotis H, Myers MA, Argentaro A, Mertin S, Fida S, Ferraro T, Olsson J, Rowley MJ, Harley VR. 2000. Sex-determining region Y-related protein SOX13 is a diabetes autoantigen expressed in pancreatic islets. *Diabetes* 49: 555-61.
- (64) Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzer M, Atkinson MA, MacLaren NK, Tobin AJ. 1992. Autoimmunity of two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 89: 283-92.
- (65) Kawasaki E, Sera Y, Abiru N, Yamauchi M, Ozaki M, Yamakawa K, Abe T, Uotani S, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Eguchi K. 2002. Distinct IA-2 autoantibody epitope recognition between childhood-onset and adult-onset type 1 diabetes. *Ann NY Acad Sci* 958: 235-40.

- (66) Kimpimaki T, Kulmala P, Savola K, Kupila A, Korhonen S, Simell T, Ilonen J, Simell O, Knip M. 2002. Natural history of beta-cell autoimmunity in young children with increased genetic susceptibility to type 1 diabetes recruited from the general population. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4572-9.
- (67) Kimpimaki T, Kupila A, Hamalainen AM, Kukko M, Kulmala P, Savola K, Simell T, Keskinen P, Ilonen J, Simell O, Knip M. 2001. The first signs of beta-cell autoimmunity appear in infancy in genetically susceptible children from the general population. Finnish Type 1 Diabetes Prediction and Prevention study. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4782-8.
- (68) King CL, Nutman TB. 1993. IgE and IgG subclass regulation by IL-4 and IFN-gamma in human helminth infections. Assessment by B cell precursor frequencies. *J Immunol* 151: 458-65.
- (69) Krischer JP, Cuthbertson D, Yu L, Orban T, MacLaren M, Jackson R, Winter WE, Schatz DA, Palmer JP, Eisenbarth GS. 2003. Screening strategies for the identification of multiple antibody-positive relatives of individuals with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 103-8.
- (70) Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, Kahn CR. 1987. Epidemiologic approach to the etiology of type 1 diabetes mellitus and its complications. *N Engl J Med* 317: 1390-8.
- (71) Kuglin B, Halder B, Bertrams J, Gruneklee D, Gries FA, Kolb H. 1990. Proinsulin autoantibodies: association with type I diabetes but not with islet cell antibodies, insulin autoantibodies or HLA-DR type. *J Autoimmun* 3: 573-7.
- (72) Kukreja A, MacLaren NK. 1999. Autoimmunity and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 4371-8.
- (73) Kulmala P, Savola K, Petersen JS, Vahasalo P, Karjalainen J, Lopponen T, Dyrberg T, Akerblom HK, Knip M. 1998. Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings of children with diabetes. A population-based study. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *J Clin Invest* 101: 327-36.
- (74) LaGasse JM, Brantley MS, Leech NJ, Rowe RE, Monks S, Palmer JP, Nepom GT, Mc Culloch DK, Hagopian WA. 2002. Successful prospective prediction of type 1 diabetes in schoolchildren through multiple defined autoantibodies: an 8-year follow-up of the Washington State Diabetes Prediction Study. *Diabetes Care* 25: 505-11.
- (75) Lampasona V, Bearzatto M, Genovese S, Bosi E, Ferrari M, Bonifacio E. 1996. Autoantibodies in insulin-dependent diabetes recognize distinct cytoplasmatic domains of the tyrosine phosphatase-like IA-2 autoantigen. *J Immunol* 157: 2707-11.
- (76) Lan MS, Lu J, Goto Y, and Notkins AL. 1994. Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma. *DNA Cell Biol* 13: 505-14.
- (77) Li Q, Borovitskaya AE, DeSilva MG, Wasserfall C, MacLaren NK, Notkins AL, Lan MS. Autoantigens in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular cloning and characterization of human IA-2 beta. *Proc Assoc Am Physicians* 109: 429-39.
- (78) Lieberman SM, Evans AM, Han B, Takaki T, Vinnitskaya Y, Caldwell JA, Serreze DV, Shabanowitz J, Hunt DF, Nathenson SG, Santamaria P, DiLorenzo TP. 2003. Identification of the beta cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8+ T cells in autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100: 8384-8.

- (79) Lohmann T, Hawa M, Leslie RD, Lane R, Picard J, Londei M. 2000. Immune reactivity to glutamic acid decarboxylase 65 in stiffman syndrome and type 1 diabetes mellitus. *Lancet* 356: 31-5.
- (80) Lohmann T, Kellner K, Verlohren HJ, Krug J, Steindorf J, Scherbaum WA, Seissler J. 2001. Titre and combination of ICA and autoantibodies to glutamic acid decarboxylase discriminate two clinically distinct types of latent autoimmune diabetes in adults (LADA). *Diabetologia* 44: 1005-10.
- (81) Lohmann T, Seissler J, Verlohren HJ, Schroder S, Rotger J, Dahn K, Morgenthaler N, Scherbaum WA. 1997. Distinct genetic and immunological features in patients with insulin-dependent diabetes below and above 40 at onset. *Diabetes Care* 20: 524-9.
- (82) Lu J, Li Q, Xie H, Chen ZJ, Borovitskaya AE, MacLaren NK, Notkins AL, Lan MS. 1996. Identification of a second transmembrane tyrosine phosphatase IA-2beta, as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37-kDa tryptic fragment. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2307-11.
- (83) 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 stiffman syndrome. *Autoimmunity* 25: 203-211.
- (84) Naserke HE, Bonifacio E, Ziegler AG. 1999. Immunoglobulin G insulin autoantibodies in BABYDIAB offspring appear postnatally: sensitive early detection using a protein A/G-based radiobinding assay. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1239-43.
- (85) Naserke HE, Dozio N, Ziegler AG, Bonifacio E. 1998. Comparison of a novel micro-assay for insulin-autoantibodies with the conventional radiobinding assay. *Diabetologia* 41: 681-3.
- (86) Naserke HE, Ziegler AG, Lampasona V, Bonifacio E. 1998. Early development and spreading of autoantibodies to epitopes of IA-2 and their association with progression to type 1 diabetes. *J Immunol* 163: 6963-9.
- (87) Ng WY, Lui KF, Cheah JS, Thai AC. 2002. IgG1 subclass dominates autoimmune responses to tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 in Chinese type 1 diabetes patients. *Horm Metab Res* 34: 596-600.
- (88) Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, Hoffman M, Eisenbarth GS, Erlich HA, Rewers M. 2003. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA* 290: 1713-20.
- (89) Norris JM, Beaty B, Klingensmith G, Yu Liping, Hoffmann M, Chase HP, Erlich HA, Hamman RF, Eisenbarth GS, Rewers M. Lack of association between early exposure to cow's milk protein and beta-cell autoimmunity. *Diabetes autoimmunity study in the young. JAMA* 276: 609-614.
- (90) Notkins AL. 2002. Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes. *J Biol Chem* 277: 43545-8.
- (91) Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL. 1983. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science* 222: 1337-9.
- (92) Panagiotopoulos C, Qin H, Tan R, Verchere CB. 2003. Identification of a beta-Cell-Specific HLA Class I Restricted Epitope in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 52: 2647-51.

*Literaturverzeichnis*

- (93) Petersen JS, Kulmala P, Clausen JT, Knip M, Dyrberg T. 1999. Progression to type 1 diabetes is associated with a change in the immunoglobulin isotype profile of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase (GAD65). Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Clin Immunol* 90: 276-81.
- (94) Pietropaolo M, Castano L, Babu S, Buelow R, Kuo YL, Martin S, Martin A, Powers AC, Prochazka M, Naggert J, et al. 1993. Islet cell autoantigen 69 kD (ICA69). Molecular cloning and characterization of a novel diabetes-associated autoantigen. *J Clin Invest* 92: 359-71.
- (95) Primo ME, Anton EA, Villanueva AL, Poskus E, Ermacora MR. 2003. Engineered variants of human glutamic acid decarboxylase (GAD) and autoantibody epitope recognition. *Clin Immunol.* 108: 38-45
- (96) Qin HY, Mahon JL, Atkinson MA, Chaturvedi P, Lee-Chan E, Singh B. 2003. Type 1 diabetes alters anti-hsp90 autoantibody isotype. *J Autoimmun* 20: 237-45.
- (97) Rabin DU, Pleasic SM, Shapiro JA, Yoo-Warren H, Oles J, Hicks JM, Goldstein DE, and Rae PM. 1994. Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet-autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. *J Immunol* 152: 3183-7.
- (98) Rewers M, Stone RA, LaPorte RE, Drash AL, Becker DJ, Walczak M, Kuller LH. 1989. Poisson regression modeling of temporal variation in incidence of childhood insulin-dependent diabetes mellitus in Allegheny County, Pennsylvania, and Wielkopolska, Poland, 1970-1985. *Am J Epidemiol.* 129: 569-81.
- (99) Robles DT, Eisenbarth GS. 2001. Type 1A diabetes induced by infection and immunization. *J Autoimmun* 16: 355-62.
- (100) Roep BO. 1996. T-cell responses to autoantigens in IDDM. The search for the Holy Grail. *Diabetes* 45: 1147-56.
- (101) Rowley MJ, Mackay IR, Chen QY, Knowles WJ, Zimmet PZ. 1992. Antibodies to glutamic acid decarboxylase discriminate major types of diabetes mellitus. *Diabetes* 41: 548-51.
- (102) Savola K, Laara E, Vahasalo P, Kulmala P, Akerblom HK, Knip M, and the Childhood Diabetes in Finland Study Group. 2001. Dynamic Pattern of Disease-associated autoantibodies in siblings of children with type 1 diabetes. *Diabetes* 50: 2625-32.
- (103) Schatz D, Krischer J, Horne G, Riley W, Spillar R, Silverstein J, Winter W, Muir A, Derovanesian D, Shah S, et al. 1994. Islet cell antibodies predict insulin-dependent diabetes in United States school age children as powerfully as in unaffected relatives. *J Clin Invest* 93: 2403-7.
- (104) Seissler J, Bieg S, Yassin N, Mauch L, Northemann W, Boehm BO, Scherbaum WA. 1994. Association between antibodies to the MR 67,000 isoform of glutamate decarboxylase (GAD) and type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus with coexisting autoimmune polyendocrine syndrome type II. *Autoimmunity* 19: 231-8.
- (105) Seissler J, Eikamp K, Schott M, Scherbaum WA. 2002. IA-2 Autoantibodies restricted to the IgG4 Subclass are associated with protection from Type 1 Diabetes. *Horm Metab Res* 34: 186-91.

- (106) Seissler J, Morgenthaler NG, Achenbach P, Lampeter EF, Glawe D, Payton M, Christie M, Scherbaum WA. 1996. Combined screening for autoantibodies to IA-2 and antibodies to glutamic acid decarboxylase in first degree relatives of patients with IDDM. The DENIS Study Group. Deutsche Nikotinamid Interventions-Studie. *Diabetologia* 39: 1351-6.
- (107) Soderbergh A, Myhre AG, Ekwall O, Gebre-Medin G, Hedstrand H, Landgren E, Miettinen A, Eskelin P, Halonen M, Tuomi T, Gustafsson J, Husebye ES, Perheentupa J, Gylling M, Manns MP, Rorsman F, Kampe O, Nilsson T. 2004. Prevalence and clinical associations of 10 defined autoantibodies in autoimmune polyendocrine syndrome type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 544-7.
- (108) Sohnlein P, Muller M, Syren K, Hartmann U, Bohm BO, Meinck HM, Knip M, Akerblom M, Richter W. 2000. Epitope spreading and a varying but non-disease specific antibody response in type I diabetes. The childhood diabetes in Finland study group. *Diabetologia*. 43: 210-7.
- (109) Solimena M, Folli F, Aparisi R, Pozza G, DeCamilli P. 1990. Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta cells in stiff man syndrome. *N Engl J Med* 322: 1555-60.
- (110) Srikanta S, Ganda OP, Rabizadeh A, Soeldner JS, Eisenbarth GS. 1985. First-degree relatives of patients with type I diabetes mellitus. Islet-cell antibodies and abnormal insulin secretion. *N Engl J Med* 313: 461-4.
- (111) Strebelow M, Schlosser M, Ziegler B, Rjasanowski I, Ziegler M. 1999. Karlsburg Type I diabetes risk study of a general population: frequencies and interactions of the four major Type I diabetes-associated autoantibodies studied in 9419 schoolchildren. *Diabetologia* 42: 661-70.
- (112) Tuomi T, Bjorses P, Falorni A, Partanen J, Perheentupa J, Lernmark A, Miettinen A. 1996. Antibodies to glutamic acid decarboxylase and insulin-dependent diabetes in patients with autoimmune polyendocrine syndrome type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1488-94.
- (113) Tuomi T, Groop LC, Zimmet PZ, Rowley MJ, Knowles W, Mackay IR. 1993. Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulin-dependent onset of disease. *Diabetes* 42: 359-62.
- (114) Vahasalo P, Knip M, Karjalainen J, Tuomilehto-Wolf E, Lounamaa R, Akerblom HK. 1996. Islet-cell-specific autoantibodies in children with insulin-dependent diabetes mellitus and their siblings at clinical manifestation of disease. The childhood diabetes in Finland Study Group. *Eur J Endocrinol* 135: 689-95.
- (115) Vardi P, Dib SA, Tuttleman M, Connely JE, Grinbergs M, Radizabeh A, Riley WJ, MacLaren NK, Eisenbarth GS, Soeldner JS. Competitive insulin autoantibody assay. 1987. Prospective evaluation of subjects at high risk for development of type 1 diabetes mellitus. *Diabetes* 36: 1286-91.
- (116) Vardi P, Ziegler AG, Mathews JH, Dib S, Keller RJ, Ricker AT, Wolfsdorf JI, Herkowitz RD, Rabizadeh A, Eisenbarth GS, Soeldner JS. 1988. Concentration of insulin autoantibodies at onset of type 1 diabetes: inverse log-linear correlation with age. *Diabetes Care* 11: 736-9.
- (117) Verge C, Gianani R, Kawasaki E, Liping Y, Pietropaolo M, Jackson R, Chase P, Eisenbarth G. 1996. Prediction of type 1 diabetes in first degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA 512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 45: 926-33

*Literaturverzeichnis*

- (118) Verge CF, Howard NJ, Rowley MJ, Mackay IR, Zimmet PZ, Egan M, Hulinska H, Hulinsky I, Silvestrini RA, Kamath S, et al. 1994. Anti-glutamate decarboxylase and other antibodies at the onset of childhood IDDM: a population-based study. *Diabetologia* 37: 1113-20.
- (119) Wasmeier C, Hutton JC. 1996. Molecular cloning of phogrin, a protein tyrosine phosphatase homologue localized to insulin secretory granule membranes. *J Biol Chem* 271: 18161-70.
- (120) Williams AJ, Bingley PJ, Bonifacio E, Palmer JP, Gale EA. 1997. A novel micro-assay for insulin autoantibodies. *J Autoimmun* 10: 473-8.
- (121) Winer S, Tsui H, Lau A, Song A, Li X, Cheung RK, Sampson A, Afifyan F, Elford A, Jackowski G, Becker DJ, Santamaria P, Ohashi P, Dosch HM. 2003. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. *Nat Med* 9: 198-205.
- (122) Yu L, Rewers M, Gianani R, Kawasaki E, Zhang Y, Verge C, Chase P, Klingensmith G, Erlich H, Norris J, Eisenbarth G. 1996. Antiislet autoantibodies usually develop sequentially rather than simultaneously. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 4264-7.
- (123) Yu L, Robles DT, Abiru N, Kaur P, Rewers M, Kelemen K, Eisenbarth GS. 2000. Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: Evidence for early determination of subsequent diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1701-6.
- (124) Ziegler, AG, Hummel M, Schenker M, and Bonifacio E. 1999. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes* 48: 460-8.
- (125) Ziegler AG, Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E. 2003. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA* 290: 1721-8

## 9. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
CI	Konfidenzintervall
cpm	Counts per Minute = Impulse pro Minute (Zerfallsrate)
DM	Diabetes mellitus
DPT-1	Diabetes-Prevention-Trial-Type 1
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent assay
GAD	Glutamatdecarboxylase
GADA	Glutamatdecarboxylase-Antikörper
HLA	Human leukocyte antigen
<sup>125</sup> I-markiert	125-Jod-markiert
IAA	Insulin-Autoantikörper
IA-2(β)	Protein-Tyrosin-Phosphatase IA-2(β)
IA-2A	Protein-Tyrosin-Phosphatase IA-2-Antikörper
ICA	Inselzell-Antikörper
ID	Identifikationsnummer
IFNγ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
J.	Jahre
Kat.	Kategorie
kDa	kilo Dalton
n.s.	nicht signifikant

*Abkürzungsverzeichnis*

NOD-Maus	Non obese diabetic-Maus
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
Q.	Quartile
RIA	Radioimmunoassay
[ <sup>35</sup> S]-markiert	35-Schwefel-markiert
SDS	standard deviation score
T1D	Typ 1 Diabetes
TH1-, TH-2-Zellen	T-Helfer-1- bzw. T-Helfer-2-Zellen
TNFb	Tumornekrosefaktor beta
U	unit
vs.	versus
x-react	kreuzreaktiv

## Vorveröffentlichungen

### Originalarbeiten

Achenbach P, **Warncke K**, Reiter J, Naserke HE, Williams AJK, Bingley PJ, Bonifacio E, Ziegler AG. 2004. Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics. *Diabetes* 53: 384-392.

### Abstracts

**Warncke K**, Reiter J, Williams A, Bingley PJ, Bonifacio E, Ziegler AG, Achenbach P. 2003. Autoantikörper-Dynamik in der präklinischen Phase des Typ 1 Diabetes. *Diabetes und Stoffwechsel* 12 [Suppl 1]: 24.

Achenbach P, **Warncke K**, Reiter J, Williams A, Bingley PJ, Bonifacio E, Ziegler AG. 2002. Characteristics of islet autoantibodies and risk of type 1 diabetes in first degree relatives. *Diabetes Metab Res Rev* 18 [Suppl 4]: 17.

Reiter J, **Warncke K**, Williams A, Bingley PJ, Bonifacio E, Ziegler AG, Achenbach P. 2003. Charakterisierung von Inselzell-Autoantikörpern und Diabetesrisiko bei erstgradig Verwandten von Patienten mit Typ 1 Diabetes. *Diabetes und Stoffwechsel* 12 [Suppl 1]: 123

## **Danksagung**

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle sehr herzlich danken.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Frau Professor Anette-G. Ziegler für die Überlassung des Themas und für die fachliche und persönliche Unterstützung, mit der sie die Arbeit von Anfang an begleitet hat. Frau Professor Ziegler hat durch ihr Engagement, ihre konstruktive Unterstützung, ihre fachliche Kompetenz bei allen wissenschaftlichen Fragestellungen, sowie durch persönliche Gespräche wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein sehr herzliches Dankeschön an Herrn Professor Ezio Bonifacio für seine hervorragende fachliche Unterstützung im experimentellen Teil und bei der Auswertung der Daten.

Sehr herzlich danken möchte ich Herrn Dr. Peter Achenbach für die Betreuung der Arbeit. Durch seine kompetente Beratung in wissenschaftlichen Fragen, seinen Elan und seine Motivation hat er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Frau Dr. Heike Naserke möchte ich sehr herzlich für die Betreuung des experimentellen Teils und ihre Unterstützung bei wissenschaftlichen und labortechnischen Fragestellungen danken.

Frau Polly J. Bingley (MD) für die Überlassung der Seren der Ak-positiven Verwandten aus der Bart´s Oxford Studie, die einen großen Teil des untersuchten Kollektivs darstellten.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern im Labor, die für ein freundschaftliches Arbeitsverhältnis sorgten und den Laboralltag bereicherten, insbesondere Frau Annette Knopff, Herrn Dr. Markus Walter und Frau Kerstin Koczvara, die bei allen technischen Fragen im Labor mit Rat und Tat zur Seite standen.

Herrn Jürgen Reiter, der mit mir zusammen die Messungen im Labor im Rahmen seiner Dissertation durchführte und mit dem eine sehr angenehme und freundschaftliche Zusammenarbeit möglich war.

Nicht zuletzt möchte ich einen ganz besonders herzlichen Dank an meine Eltern richten, die mir meinen beruflichen Werdegang ermöglicht haben und mich zu jeder Zeit mit Enthusiasmus unterstützt haben.

## Lebenslauf

### Angaben zur Person

Katharina Ulrike Warncke

geboren am 02.09.1977 in München

Adresse: 80803 München, Karl-Theodor-Str. 31

Familienstand: ledig

Eltern: Frau Dr. Ute Warncke, Ärztin, und Herr Dr. Egbert Warncke, Diplom-Ingenieur

### Schulbildung

1984-1988     Grundschule Stätzing

1988-1997     Wernher-von-Braun Gymnasium Friedberg

### Studium und berufliche Tätigkeit

1997-2004             Studium der Humanmedizin an der Ludwigs-  
Maximiliansuniversität München

April 2003-März 2004     Studentin im Praktischen Jahr  
  
Chirurgie und Neurochirurgie am Klinikum Großhadern,  
München

Innere Medizin an der Poliklinik, München

Pädiatrie am Dr. von Hauner´schen Kinderspital, München

seit Juni 2004             Ärztin im Praktikum, seit Oktober 2004 Assistenzärztin an der  
Kinderklinik der Technischen Universität München am  
Krankenhaus München-Schwabing

seit September 2001       Mitarbeit an verschiedenen wissenschaftlichen Projekten am  
Institut für Diabetesforschung, München

## *Lebenslauf*