

Fakultät für Medizin der Technischen Universität München

**Bedeutung der Autoantikörper gegen Zink-Transporter 8 in der Pathogenese
des Typ 1 Diabetes im Kindesalter**

Ulrike Landherr

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Peter Achenbach
2. Prof. Dr. Anette-G. Ziegler

Die Dissertation wurde am 27.08.2015 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.10.2017 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Abkürzungsverzeichnis | 3 |
| 2. Einleitung | 4 |
| 3. Allgemeine Grundlagen des Typ 1 Diabetes | 6 |
| 4. Zielsetzung der Arbeit | 14 |
| 5. Material und Methoden | 15 |
| 5.1. Untersuchungsgruppen | 15 |
| 5.2. Bestimmung der Autoantikörper gegen Insulin, GAD und IA-2 | 16 |
| 5.3. Bestimmung der Autoantikörper gegen ZnT8 | 16 |
| 5.4. Genotypisierung von SLC30A8 | 18 |
| 5.5. Statistik | 18 |
| 6. Ergebnisse | 20 |
| 6.1. Prävalenz und Zeitpunkt der Entstehung von ZnT8A, Auftreten anderer Insel-Autoantikörper | 20 |
| 6.2. Reaktivität der Autoantikörper gegen die Varianten von ZnT8 | 21 |
| 6.3. Die Epitop-Spezifität von ZnT8A steht in Zusammenhang mit dem SLC30A8-Genotyp | 22 |
| 6.4. Stratifizierung des Diabetes-Risikos bei ZnT8A-COOH-positiven Kindern | 24 |
| 6.5. Stratifizierung des Diabetes-Risikos durch den SLC30A8-Genotyp | 26 |
| 7. Diskussion | 28 |
| 8. Zusammenfassung | 35 |
| 9. Literaturverzeichnis | 38 |
| Vorveröffentlichungen | 47 |
| Danksagung | 48 |
| Lebenslauf | 49 |

1. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| Arg | Arginin |
| AUC | Fläche unter der Kurve (area under the curve) |
| CI | Konfidenzintervall |
| cpm | counts per minute (Zerfallsrate) |
| DASP | Diabetes Antibody Standardization Program |
| GAD | Glutamatdecarboxylase |
| GADA | Glutamatdecarboxylase-Autoantikörper |
| Gln | Glutamin |
| IA-2 | Protein-Tyrosin-Phosphatase IA-2 |
| IA-2 β | Protein-Tyrosin-Phosphatase IA-2 β |
| IA-2A | Protein-Tyrosin-Phosphatase IA-2-Autoantikörper |
| IA-2 β A | Protein-Tyrosin-Phosphatase IA-2 β -Autoantikörper |
| IAA | Insulin-Autoantikörper |
| ICA | (zytoplasmatische) Inselzell-Autoantikörper |
| IQR | Interquartile Range |
| IVGTT | intravenöser Glucosetoleranztest |
| LADA | latent autoimmune diabetes in adults |
| OGTT | oraler Glucosetoleranztest |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (rounds per minute) |
| SNP | Einzel-Nukleotid-Polymorphismus |
| Trp | Tryptophan |
| U | Units |
| ZnT8 | Zink-Transporter 8 |
| ZnT8A | Zink-Transporter 8-Autoantikörper |

2. Einleitung

In der prädiabetischen Phase des Typ 1 Diabetes werden Autoantikörper gegen verschiedene Antigene der Beta-Zelle gebildet (Achenbach 2005). Durch Bestimmen dieser Autoantikörper und ihrer Charakteristika können bereits Jahre vor der Manifestation der Erkrankung Hochrisiko-Kinder identifiziert werden. Seit längerem bekannt sind Insulin-Autoantikörper (IAA), Autoantikörper gegen die Glutamat-Decarboxylase (GADA) und gegen die Tyrosin-Phosphatase-homologen Proteine IA-2 (IA-2A) und IA-2 β (IA-2 β A; Achenbach 2007). Das Risiko, an Typ 1 Diabetes zu erkranken, korreliert dabei mit der Anzahl der gebildeten Autoantikörper. Kinder, die für mindestens zwei dieser Autoantikörper positiv gemessen wurden und ein genetisches Risiko für Typ 1 Diabetes haben, entwickeln mit einer Wahrscheinlichkeit von über 60% innerhalb eines Zeitraumes von zehn Jahren Diabetes (Ziegler 2013).

Bei Patienten mit neumanifestiertem Typ 1 Diabetes wurde ein zusätzliches Autoantigen identifiziert, gegen welches ca. 70% der Probanden Autoantikörper bilden (Wenzlau 2007): Der Kationen-Efflux-Transporter Zink-Transporter 8 (ZnT8; Chimienti 2004). Bei einigen Patienten, die nur für einen der bekannten Autoantikörper positiv gemessen wurden, können nun zusätzlich Autoantikörper gegen ZnT8 detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass durch Messung dieses Autoantikörpers das Risiko, Typ 1 Diabetes zu entwickeln, besser stratifiziert werden kann. Ferner stellte sich heraus, dass das Epitop, an das die Autoantikörper gegen ZnT8 hauptsächlich binden, in drei unterschiedlichen Varianten vorliegt. Beeinflusst wird die Variante von einer einzigen Aminosäure an Position 325, die für Arginin (Arg), Tryptophan (Trp) oder Glutamin (Gln) codiert. Zugrunde liegen hierfür verschiedene polymorphe Varianten des für ZnT8 kodierenden Gens SLC30A8 (Wenzlau 2008, Kawasaki 2008). Forschungsergebnisse in Bezug auf Typ 2 Diabetes zeigten, dass das SLC30A8-Gen auch das Risiko beeinflusst, an Typ 2 Diabetes zu erkranken (Scott 2007, Sladek 2007). Weitere Daten beim Typ 1 Diabetes wiederum wiesen darauf hin, dass es den Zeitpunkt der Manifestation beeinflusst (Gohlke 2008).

Einerseits wurden in der vorliegenden Arbeit die Autoantikörper gegen ZnT8 (ZnT8A) in einer Kohorte erstgradig verwandter Kinder von Typ 1 Diabetikern gemessen, um

die Bedeutung von ZnT8A als zusätzlichem Marker in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes zu untersuchen. Andererseits wurde in den Proben SLC30A8 genotypisiert, um die Rolle des Polymorphismus in SLC30A8 für die Vorhersage des Risikos, an Typ 1 Diabetes zu erkranken, zu evaluieren. Die Kohorte wurde prospektiv von Geburt an bis zur Adoleszenz verfolgt. Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die bei Patienten mit Typ 1 Diabetes bereits nachgewiesenen Zusammenhänge zwischen ZnT8A und dem SLC30A8-Genotyp auch bei Autoantikörper-positiven Kindern bestätigt werden konnten. Auch konnte ZnT8A als zusätzlicher Marker dazu genutzt werden, das Diabetes-Risiko bei Autoantikörper-positiven Kindern zu stratifizieren. Eine Beziehung zwischen dem SLC30A8-Genotyp und der Progression zu Typ 1 Diabetes bei ZnT8A-positiven Kindern konnte identifiziert werden.

3. Allgemeine Grundlagen des Typ 1 Diabetes

Typ 1 Diabetes ist eine chronische organspezifische autoimmune Erkrankung, die durch eine selektive Zerstörung der Insulin produzierenden Beta-Zellen der Langerhans-Inseln im Pankreas hervorgerufen wird. Charakteristisch für die Entstehung des Typ 1 Diabetes ist das Auftreten humoraler und zellulärer Insel-Autoimmunität assoziiert mit einer gestörten Immunregulation bei genetisch prädisponierten Patienten. Konsequenz dieser Zerstörung ist ein absoluter Insulinmangel, den die Patienten zeitlebens durch Substitution des Hormons ausgleichen müssen. Obwohl die Therapie immer weiter optimiert wurde, haben dennoch viele Patienten an den Folgeerscheinungen zu leiden (Milton 2006). Bislang ist die Erkrankung weder präventiv vermeidbar noch heilbar.

Die Inzidenz variiert stark in unterschiedlichen Populationen. Am niedrigsten ist sie mit 0,1/100 000 pro Jahr in China bis hin zu 36,5/100 000 pro Jahr in Finnland (Karvonen 2000). In Europa wurde gezeigt, dass einerseits das Manifestationsalter kontinuierlich sinkt und andererseits die Inzidenz bei den jüngeren Kindern am stärksten ansteigt. So wird sich die Anzahl der Manifestationen von Typ 1 Diabetes bei Kleinkindern von 2005 bis 2020 verdoppeln (Patterson 2009). In Deutschland - die Zahlen stammen aus Baden-Württemberg - lag die Inzidenz von 1987 bis 2003 bei 14,1/100 000 pro Jahr und stieg damit um 3,8% an (Ehehalt 2008). Auch diese Daten beweisen ein sinkendes Manifestationsalter und eine schnellere Zunahme der Inzidenz in der Gruppe der 0-4 Jährigen. Die Prävalenz liegt derzeit bei 0,3%, wobei fast die Hälfte aller Patienten die Erkrankung bereits vor dem 20. Lebensjahr entwickelt (Achenbach 2010).

Zur genaueren Erforschung der Pathogenese wurden in den letzten Jahren große multizentrische Verlaufsstudien initiiert, z.B. BABYDIAB in Deutschland (Ziegler 1999) oder DAISY in den USA (Rewers 1996). In diesen Studien wurden Personen mit genetischem und/oder familiärem Risiko für Typ 1 Diabetes eingeschlossen und bis zu 20 Jahre nachverfolgt. Auch wurden per Randomisierung der Einfluss von Umweltfaktoren untersucht, z.B. die Zufuhr glutenhaltiger Nahrung in BABYDIABET (Hummel 2011) oder der Effekt intranasal applizierten Insulins in DIPP (Näntö-Salonen 2008). Weitere Studien, z.B. die TEDDY Studie in einigen europäischen Ländern und den USA (TEDDY Study Group 2007), beobachten sowohl Angehörige

von Typ 1 Diabetikern, aber auch Menschen aus der gesunden Allgemeinbevölkerung prospektiv und wollen neben genetischen und immunologischen Untersuchungen durch genaue Dokumentation von Ernährung und Krankheiten zusätzliche Faktoren in der Pathogenese erforschen.

Dabei stützt sich die Arbeit zahlreicher Forschergruppen vor allem auf die Untersuchung der immunologischen Prozesse in der prädiabetischen Phase, speziell auf die Charakterisierung der auftretenden Autoantikörper gegen Antigene der Beta-Zelle.

Die genaue Entstehungsursache der Autoimmunkrankheit ist nicht bis zuletzt geklärt, man weiß aber, dass eine genetische Prädisposition den Ablauf einer gestörten Immunreaktion begünstigt, welche wiederum durch Umweltfaktoren getriggert wird und schließlich zur selektiven Zerstörung der Beta-Zellen führt.

Über 40 Genloci stehen mit Typ 1 Diabetes in Zusammenhang (Barrett 2009), wobei den größten Einfluss auf die Entstehung der HLA-Genotyp (IDDM1) innehat. In bis zu 50% der Fälle kann die familiäre Häufung des Auftretens von Typ 1 Diabetes durch das Vorhandensein bestimmter HLA-Allele erklärt werden, wobei manche HLA-Allele (z.B. HLA DRB1*0301) mit einem erhöhten Risiko, andere (z.B. HLA DQB1*0602) eher mit Protektion vor der Erkrankung einhergehen. Mit dem höchsten Diabetesrisiko sind die Genotypen HLA DR3-DQ2/DR4-DQ8 und HLA DR4-DQ8/DR4-DQ8 vergesellschaftet. Weitere diabetesassoziierte Genotypen sind neben INS VNTR (IDDM2), welcher in der Promotorregion des Insulingens liegt, auch andere Gene wie z.B. PTPN22 oder CTLA-4 und MIC-A (Walter 2003).

Untersuchungen an eineiigen Zwillingen zeigen, dass die Diabetes-Konkordanz bei genetischer Übereinstimmung je nach follow-up verschieden hoch ist. Bei einem Verlauf von 3,6 Jahren nach Manifestation bei einem Zwilling liegt sie bei 25%, bei 40 Jahren bei 50% (Redondo 2001) und steigt weiter an, wenn zusätzlich noch Autoantikörper-Positivität berücksichtigt wird (Redondo 2008). Es liegt nahe, dass Umweltfaktoren wie z.B. Viruserkrankungen, besonders Infektionen mit Enteroviren (Stene 2010), Medikamente oder Nahrungsmittel eine Rolle als Trigger spielen. Kinder der BABYDIAET-Studie, die den Genotyp HLA DR3-DQ2/DR4-DQ8 hatten und vor dem 4. Lebensmonat glutenhaltige Nahrung bekamen, entwickelten zu 100% Inselautoantikörper (Ziegler 2003). Ferner konnte durch Untersuchungen an Erwachsenen und Kindern mit Typ 1 Diabetes auf Sardinien ein Zusammenhang

zwischen dem Auftreten von Autoantikörpern gegen das Epitop MAP3865c des *Mycobacterium avium paratuberculosis* und Autoantikörpern gegen ZnT8 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich um kreuzreaktive Autoantikörper aufgrund eines molekularen Mimikry-Mechanismus handelt (Masala 2011 und 2013).

Abhängig vom genetischen Hintergrund und wirkenden Umweltfaktoren beginnt die prädiabetische Phase mit der Autoimmunreaktion einige Zeit vor der klinischen Manifestation des Diabetes. Durch eine chronische Infiltration der Beta-Zellen mit mononuklearen Zellen wird eine Entzündungsreaktion, genannt Insulinitis, hervorgerufen, welche die Beta-Zellen selektiv zerstört (Bach 1994). Auf der Seite der zellulären Immunreaktion geschieht dies durch von CD4+ T-Lymphozyten sezernierten Botenstoffen und durch CD8+ T-Lymphozyten (Ounissi-Benkalha 2008). Auch für CD8+ T-Zellen ist ZnT8 ein Haupt-Autoantigen (Dang 2011), welches bei pädiatrischen und erwachsenen Patienten mit Typ 1 Diabetes erkannt wird (Énée 2012). Dabei richtet sich die Immunantwort hauptsächlich gegen das ZnT8 (186-194) Epitop (Scotto 2012). Neben der zellulären Immunreaktion findet auch eine über Autoantikörper vermittelte humorale Immunantwort gegen multiple Inselzell-Autoantigene statt, wobei beide Immunreaktionen unabhängig voneinander aktiviert werden (Hummel 1996). Das Auftreten dieser Autoantikörper ist der früheste diagnostische Marker für Insel-Autoimmunität, der durch relativ einfache und sehr zuverlässige Testverfahren gut untersucht werden kann. Metabolische Marker, wie z.B. eine reduzierte Insulinantwort im intravenösen Glucosetoleranztest (IVGTT) oder eine gestörte Glukosetoleranz im oralen Glucosetoleranztest (OGTT) lassen sich erst in einem weiter fortgeschrittenen Stadium der Pathogenese bzw. nach Manifestation durch klinische Tests nachweisen. Dann hat die Beta-Zell-Masse bis auf 10-20% des Ausgangsvolumens abgenommen (Achenbach 2010). Die Zerstörung der Beta-Zellen schreitet weiter fort und der Patient ist sein Leben lang auf die Zufuhr von exogenem Insulin angewiesen, da eine Regeneration der Beta-Zellen zwar bei Mäusen nachgewiesen wurde (Nir 2007), nicht aber beim Menschen (Eisenbarth 2008). Wie lange es vom ersten Auftreten der Insel-Autoantikörper bis zur Manifestation der Erkrankung dauert, ist individuell sehr unterschiedlich. Bei Kindern mit einem diabetischen Elternteil konnte eine Gruppe mit rapid-progressivem Verlauf identifiziert werden, die innerhalb von 3 Jahren nach Auftreten des ersten Insel-

Autoantikörper (=Serokonversion) einen klinisch manifesten Typ 1 Diabetes entwickelten. Im Gegensatz dazu gab es eine Gruppe, die nach Serokonversion 10 Jahre oder mehr keinen Diabetes entwickelten. Die Gruppe der rapid-progressiven unterschied sich nur hinsichtlich eines früheren Auftretens von IA-2A und einer insgesamt höheren Belastung der für Diabetes prädisponierenden Allele der Nicht-HLA-Risiko-Gene (Achenbach 2013). Verschiedene Charakteristika der Insel-Autoantikörper, z.B. Titer, Epitop-Spezifität und IgG-Subklasse, sind für unterschiedliche Verlaufsformen typisch (Achenbach 2004).

Die besten prädiktiven Marker, um die Pathogenese des Diabetes einzuschätzen, stellen IAA, GADA und IA-2A/IA-2 β A sowie ZnT8A dar (Achenbach 2010). Bis zu 98% der Patienten mit Typ 1 Diabetes und 5-15% der Verwandten von Patienten weisen einen oder mehrere der Inselzell-Autoantikörper auf (Schlosser 2002, Achenbach 2010). Autoantikörper können in jedem Alter gebildet werden. Bei Kindern der BABYDIAB-Kohorte war die Inzidenz im Alter zwischen 9 Monaten und 2 Jahren am Höchsten (Ziegler 2012) und auch Ergebnisse der multizentrischen Teddy-Studie zeigen eine frühe Serokonversion (Krischer 2015). In einer Belgischen Kohorte konnte gezeigt werden, dass bei einer wichtigen Minderheit auch das Auftreten von Autoantikörpern nach dem 10. Lebensjahr relevant sein kann (Vermeulen 2012). Personen aus nicht-diabetischen Familien dagegen weisen eine um den Faktor 10 verringerte Autoantikörper-Häufigkeit auf. Das Auftreten eines Inselzell-Autoantikörpers allein ist noch nicht gleichzusetzen mit einem erhöhten Diabetes-Risiko. Erst unter Berücksichtigung des Alters beim Auftreten des Autoantikörpers, Art und Anzahl der Autoantikörper und verschiedener Antikörper-Charakteristika können Aussagen über das Erkrankungs-Risiko getroffen werden. Es können auch einzelne Autoantikörper auftreten, die im weiteren Verlauf wieder verschwinden (transiente Autoantikörper) oder zum Teil jahrelang im Serum persistieren ohne zu einer Progression zu führen (meist niedrig-affine Autoantikörper; Achenbach 2010, Kimpimäki 2002, Ziegler 1999, Hummel 2004). Mit wiederholter Bestimmung der Autoantikörper und ihrer Charakteristika Anzahl, Titer, IgG-Subklasse und Epitop-Spezifität sowie Affinität kann bei Personen mit einem genetischen Risiko das 5-Jahres-Diabetes-Risiko von weniger als 10% bis über 90% stratifiziert werden (Achenbach 2004). Das Risiko ist am höchsten bei Kindern, die multiple Autoantikörper gebildet haben, und sinkt, je weniger Autoantikörper

vorliegen. Unter denen, die multiple Autoantikörper haben, erkranken diejenigen schneller an Diabetes, die in jüngerem Alter Autoantikörper bilden (Hummel 2004 und Ziegler 2012). Verwandte von Patienten mit Typ 1 Diabetes, die 3 Autoantikörper aufweisen, haben ein 15-Jahres-Diabetes-Risiko von beinahe 80%, während solche mit nur einem Autoantikörper mit einer Wahrscheinlichkeit von knapp 13% erkranken (Ziegler 2013). Auch wenn Personen multiple Autoantikörper, aber keine familiäre Belastung haben, ist das Diabetes-Risiko erhöht (Schlosser 2002).

Autoantikörper gegen Zink-Transporter 8 (ZnT8A)

Im Jahr 2007 wurde ein neues Beta-Zell-spezifisches Hauptziel-Antigen entdeckt: Zink-Transporter 8 (ZnT8). Dieser Ionen-Transporter wird spezifisch in den Beta-Zellen des Pankreas exprimiert, wo er in die Membran der sekretorischen Vesikel integriert ist und dort an der regulierten Sekretion von Insulin teilnimmt (Eisenbarth 2008, Chimienti 2004). ZnT8 (369 Aminosäuren) besteht aus sechs Transmembrandomänen und zwei zytosolischen Endbereichen, einem N-terminalen (Aminosäure 1-74) und einem C-terminalen (Aminosäure 268-369). Durch ZnT8 gelangen zweifach positiv geladene Zinkionen aus dem Zytosol in die sekretorischen Vesikel der Beta-Zellen, welche zu den Zellen mit dem größten Zinkgehalt im gesamten Körper zählen (Chimienti 2006).

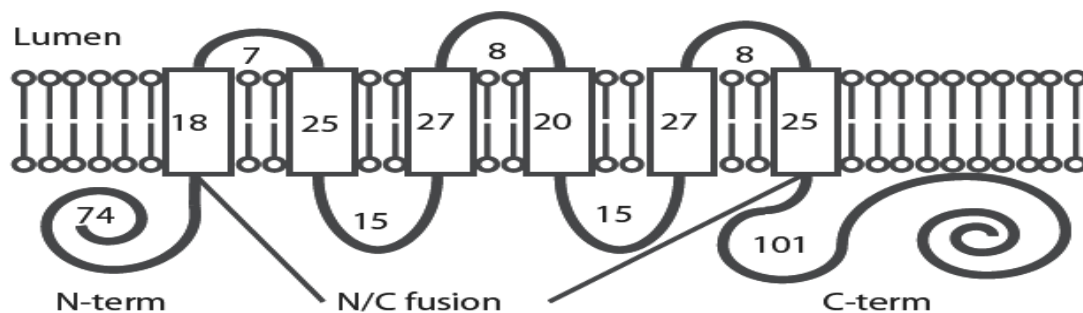


Abbildung 1: Zink-Transporter 8 (Wenzlau 2007)

Zink ist für den Zellstoffwechsel sehr wichtig: Es wird benötigt zur DNA-Replikation, für die Aktivität metabolischer Enzyme und zum Schutz der Zelle vor Schäden durch Apoptose oder oxidativen Stress. Darüber hinaus ist Zink ein wichtiger Mediator des Insulinstoffwechsels. Zwei Zn^{2+} -Ionen bilden in den sekretorischen Vesikeln der Beta-

Zelle mit sechs Insulinmolekülen stabile Hexamere, welche in dieser Form gespeichert und via Exozytose auf externe Stimulation hin sezerniert werden (Chimienti 2006). Wird Zink auf diesem Weg frei, hat es eine Funktion in der parakrinen und autokrinen Kommunikation der Zellen, indem es die Aktivität benachbarter Alphazellen moduliert, so dass die Glucagon-Sekretion gestoppt wird (Gyulkhandanyan 2008, Chimienti 2004). Man geht davon aus, dass es zwischen Zink und Typ 1 und auch Typ 2 Diabetes komplexe Beziehungen gibt, weil auch Folgeerkrankungen des Diabetes durch oxidativen Stress mitverursacht werden, wobei Zinkmangel ursächlich beteiligt sein könnte (Chausmer 1998). Unter Supplementation von Zink bei Typ 2 Diabetikern wurde weniger oxidativer Stress nachgewiesen (Roussel 2003). Diese und weitere Beobachtungen lassen annehmen, dass Zink eine Rolle bei der Homöostase des Glucosespiegels spielt (Smidt 2009).

Einen Zusammenhang zwischen diesem Ionen-Transporter und Typ 1 Diabetes untersuchte eine Forschergruppe in Denver, indem sie nach spezifisch in Beta-Zellen exprimierten Genen suchte. Mittels Microarray-Technologie wurde die mRNA-Transskription in 79 menschlichen Geweben untersucht. Ergebnis dieses Screenings waren 300 Gene, die in den Langerhans-Inseln eine vergleichsweise stärkere Expression aufwiesen. Nach Ausschluss von 200 Genen, die stärker in Alpha-Zellen bzw. in Insulinom-Zellen exprimiert wurden, blieben 100 Kandidaten-Gene übrig, deren Transskriptions-Frequenz im Pankreas mit der in 49 anderen menschlichen Geweben verglichen wurde. Anhand eines aus Pankreas-Spezifität und mRNA-Transkription gebildeten Index wurden die Kandidaten geordnet. Unter den ersten 68 Kandidaten dieser Liste fanden sich bereits als Autoantigen beim Typ 1 Diabetes bekannte Proteine wie Insulin, GAD65, IA-2, IA-2 β , IAPP, IGRP und weitere Moleküle, die Ziel der Autoimmunität sind. Bezüglich Pankreas- und Insel-Spezifität sowie der Höhe der Expression in Inselzellen rangierte ZnT8 weit vorne. Häufiger im menschlichen Pankreas exprimiert werden nur Insulin, GAD2 und IGRP, was darauf hindeutete, dass ZnT8 ebenfalls ein Autoantigen für Typ 1 Diabetes ist. Dies konnte bestätigt werden, indem bei 63% einer Kohorte von neu diagnostizierten Typ 1 Diabetikern Autoantikörper gegen ZnT8 nachgewiesen wurden. Als Methode diente ein Radiobindungsassay, bei dem als Antigen ein in vitro-translatiertes Konstrukt aus COOH und NH₂ verwendet wurde. Die Sensitivität war vergleichbar mit der der Testverfahren für GADA, IA-2A und IAA. Die Zahl der Personen, die Autoantikörper-

negativ waren, sank durch ZnT8A von 13 auf 4, während nun 183 statt 160 Personen mehr als zwei Autoantikörper bildeten (Wenzlau 2007).

Im Diabetes Antibody Standardization Program (DASP)-Workshop konnte im Jahr 2009 belegt werden, dass ZnT8A deutlich zwischen gesunden und kranken Individuen unterscheiden konnten und dass Sensitivität und Spezifität des Radiobindungsassay vergleichbar zu den bereits etablierten Autoantikörpern ist. Die Sensitivität eines Radiobindungsassays, der gleichzeitig Autoantikörper gegen die beiden häufigsten Varianten von ZnT8A-COOH misst, ist höher als die anderer Testmethoden (Lampasona 2011). Moleküle, die von Autoantikörpern beim Typ 1 Diabetes erkannt werden, sind typischerweise auch Ziele für autoreaktive T-Zellen (Monti 2009). Deshalb wurden im peripheren Blut von Typ 1 Diabetikern und entsprechenden Kontrollpersonen IFN- γ -produzierende T-Zellen untersucht, die für ZnT8 spezifisch sind. Es konnte nachgewiesen werden, dass ZnT8 bei Menschen mit Typ 1 Diabetes ebenfalls ein Ziel für krankheitsspezifische, autoreaktive T-Zellen ist (Dang 2011). Bei Patienten mit Typ 1 Diabetes wurde erforscht, dass der Titer von ZnT8A bereits im ersten Jahr nach Manifestation signifikant sinkt und auch in den folgenden 4 Jahren weiter fällt, wohingegen IA-2A und v.a. GADA weniger stark sinken bzw. konstant bleiben (Vaziri-Sani 2010). Die Bestimmung von ZnT8A in Intervallen von 3 Monaten nach Manifestation wird für die Einschätzung des Absinkens der ZnT8-spezifischen Autoimmunität als sinnvoll erachtet (Wenzlau 2010).

SLC30A8, das für ZnT8 kodierende Gen

SLC30A8, welches für den Zink Transporter 8 kodiert, ist auf Chromosom 8q24.11 lokalisiert. Es ist eines von neun menschlichen Genen, die für transmembrane Proteine kodieren, die Zn^{2+} aus der Zelle in intrazelluläre Kompartimente transportieren (Wenzlau 2008). Bereits in Untersuchungen des genetischen Hintergrundes des Typ 2 Diabetes wurde ein Polymorphismus im Gen von ZnT8 entdeckt, der mit dem Auftreten von Typ 2 Diabetes assoziiert war (Sladek 2007, Scott 2007). Dieser Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (SNP) rs13266634 kodiert für die Aminosäure 325 auf dem COOH-Ende von ZnT8 und zwar entweder für die Aminosäuren Arg (C), Trp (T) oder Gln (Q). Bislang konnte bei nicht-diabetischen Verwandten von Typ 2 Diabetikern ein Bezug zwischen dem Haupt-Allel (C-Allel) des

SNPs zu reduzierter Sekretion von Insulin im IVGTT nachgewiesen werden (Staiger 2007), sowie eine Beeinträchtigung der Konversion von Proinsulin zu Insulin (Kirchhoff 2008).

Auch beim Typ 1 Diabetes ist der SNP rs13266634 ein Schlüsselfaktor für die autoimmune Reaktivität gegen ZnT8, da 2 Epitope durch den Polymorphismus an Stelle 325 definiert werden. Damit bietet der SNP die bisher einzige polymorphe Variante eines Antigens, die als Determinante humoraler Autoreaktivität bekannt ist (Wenzlau 2008). Die höchste Sensitivität zeigen ZnT8A der untersuchten Typ 1 Diabetiker für die Arg-Variante, gefolgt von der Trp-Variante und der Gln-Variante. Die Autoantikörper binden auch an mehrere Epitope mit bestimmten Mustern, z.B. häufig an alle 3 Epitope, häufig an Arg allein oder an Trp allein, jedoch selten an Gln in Verbindung mit Arg oder Trp oder an Gln allein. Werden die Spezifitäten für die Epitope mit den zugrundeliegenden Genotypen in Verbindung gebracht, lassen sich je nach Ausprägung verschiedene Beziehungen erkennen. Dabei ist vor allem entscheidend, welche Allele in homozygoter oder heterozygoter Weise vorliegen: Autoantikörper gegen die Arg-Form von ZnT8 sind am höchsten bei Personen mit homozygotem CC-Genotyp, am niedrigsten bei Personen mit TT-Genotyp und liegen bei heterozygoten Personen dazwischen. Entsprechendes gilt für Autoantikörper gegen die Trp-Form; für Autoantikörper gegen die Gln-Form zeigten sich keine signifikanten Variationen des rs13266634 Genotyps (Wenzlau 2008).

4. Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen in einer großen, prospektiv untersuchten Kohorte Autoantikörper gegen ZnT8 bestimmt werden. Dabei sollen verschiedene Charakteristika wie Alter des ersten Auftretens von ZnT8A, Zusammenhang mit dem Auftreten der bereits bekannten Autoantikörper IAA, GADA und IA-2A und Bindung an die Varianten von ZnT8 berücksichtigt werden. Weiterhin soll herausgefunden werden, ob durch Bestimmen der Autoantikörper-Profile das Risiko, Typ 1 Diabetes zu entwickeln, besser stratifiziert werden kann. Dies soll insbesondere auch durch Bestimmung des SLC30A8-Genotyps und Analyse der Zusammenhänge zwischen Genotyp und Autoantikörper-Profil ermittelt werden. Zuletzt soll die Frage beantwortet werden, ob hierdurch Kinder mit hohem Risiko identifiziert werden können, die zur weiteren Entschlüsselung der Pathogenese untersucht oder in Interventionsstudien eingeschlossen werden können.

Spezifische Fragestellungen:

- 1) Wie hoch ist die Prävalenz des Autoantikörpers gegen ZnT8 in einer Kohorte prädiabetischer Kinder mit erstgradig Verwandten mit Typ 1 Diabetes? Wann treten ZnT8A auf, wie ist der Zusammenhang mit dem Auftreten anderer Insel-Autoantikörper und der Diabetes-Manifestation?
- 2) Welcher Zusammenhang stellt sich zwischen dem SLC30A8-Genotyp und dem Auftreten der Autoantikörper gegen die polymorphen Varianten von ZnT8 dar?
- 3) Welche Rückschlüsse und Vorhersagen lassen sich dadurch über das Risiko treffen, an Typ 1 Diabetes zu erkranken? Lässt sich das Diabetes-Risiko so stratifizieren?

5. Material und Methoden

5.1. Untersuchungsgruppen

Die getesteten Proben stammen von 1633 Kindern, die einen Verwandten ersten Grades mit Typ 1 Diabetes haben. Sie sind Teilnehmer der prospektiven Studie der Forschergruppe Diabetes der Technischen Universität München BABYDIAB. Für BABYDIAB wurden von 1989 bis 2000 insgesamt 1650 Kinder ab Geburt eingeschlossen, die mindestens einen Verwandten mit Typ 1 Diabetes haben. Die Familien wurden gebeten, Blutproben des Kindes bei Geburt, nach 9 Monaten, 2, 5, 8, 11, 14 und 17 Jahren zu schicken, um verfolgen zu können, ob und wann diese Kinder Insel-Autoantikörper und schließlich Diabetes entwickeln (Ziegler 1999). Alle Proben wurden auf Autoantikörper gegen Insulin, GAD, IA-2 und ICA untersucht; aus der Probe im Alter von 2 Jahren wurde zusätzlich der HLA-Genotyp bestimmt (Schenker 1999). Falls bei einem Kind ein oder mehrere Autoantikörper positiv gemessen wurden, wurde eine Probe innerhalb von 6 Monaten angefordert, um den Antikörperstatus zu bestätigen. Danach wurden jährlich Proben getestet. Bei Kindern, die Diabetes entwickelten, wurden keine weiteren Proben gesammelt. Autoantikörper-positive Kinder machten alle 6-12 Monate einen OGTT, um eine pathologische Glucoseverwertung möglichst früh zu erkennen (Bonifacio 2004). Die mediane Verlaufszeit lag bei 10,8 Jahren (IQR 8,2-12,8).

Für die vorliegende Arbeit wurden alle verfügbaren Proben von 1633 Personen zusätzlich zu den vorliegenden Markern auf Autoantikörper gegen ZnT8 untersucht, wobei die Nachverfolgungszeit entweder mit Manifestation des Diabetes oder mit einem letzten Kontakt im April 2008 (Studienendpunkt) endete. Die kumulative Drop-out-rate war bei BABYDIAB 2%, 8%, 17% und 23% im Alter von 2, 5, 8 und 11 Jahren. Im April 2008 hatten 128 Kinder Autoantikörper gegen Insulin, GAD und IA-2 entwickelt, die in mindestens 2 aufeinanderfolgenden Proben positiv gemessen werden konnten. Darunter waren 69 Kinder, die 2 oder mehr Autoantikörper aus IAA, GADA und IA-2A aufwiesen (multiple Autoantikörper) und 42 Kinder, die Typ 1 Diabetes entwickelt hatten. Alle Familien gaben schriftlich ihre Zustimmung zur Teilnahme an den Studien. Die BABYDIAB-Studie war von der zuständigen Ethikkommission genehmigt.

5.2. Bestimmung der Autoantikörper gegen Insulin, GAD und IA-2

Die Autoantikörper gegen Insulin, GAD und IA-2 wurden in Protein A/G-Radiobindungsassays bestimmt. IAA wurden unter Verwendung von ¹²⁵I-markiertem Insulin gemessen (Naserke 1998), GADA und IA-2A mittels [³⁵S]-Methionin-markiertem *in vitro*-translatiertem/ -transkribiertem rekombinantem humanen GAD65 bzw. IA-2 (Ziegler 1999). Die Grenzen für Positivität wurden anhand der 99. Perzentile eines Kontrollkollektivs festgelegt und betragen für IAA 1,5 U (Bonifacio 2004), für GADA 25 WHO U/ml und für IA-2A 4 WHO U/ml. Mit diesen Grenzwerten hatten die Testverfahren im DASP-Workshop Sensitivitäten und Spezifitäten von 70% und 99% für IAA, von 86% und 93% für GADA und von 72% und 100% für IA-2A (Törn 2008) und 84% und 100% für multiple Autoantikörper.

5.3. Bestimmung der Autoantikörper gegen ZnT8

Um Testverfahren für die Bestimmung von ZnT8A zu etablieren wurden die cDNAs, die mit den Amino-terminalen Domänen (Aminosäure 1-74) und den Carboxyl-terminalen Domänen (Aminosäure 268-369) der R325-, W325- oder Q325-Varianten von ZnT8 korrespondieren, mittels RT-PCR von der ganzen RNA menschlicher pankreatischer Inseln amplifiziert. Gen-spezifische Primer schlossen eine EcoRI Restriktions-Stelle und, im Falle des Vorwärts-Primers, auch ein künstliches Start-Kodon innerhalb des Kontextes einer kanonischen Kozak-Sequenz ein. Die amplifizierten cDNAs wurden in die EcoRI-Stelle des pTnT Plasmid Vektors (Promega, Hercules, CA, USA) kloniert. Die Klone, die zur Expression des Proteins gebraucht wurden, wurden auf ihre korrekte Sequenz und Orientierung hin überprüft. Für die *in vitro*-Transskription und -Translation wurde die Plasmid-DNA mit Qiagen midi-Säulen (Qiagen, Hilden, Deutschland) vorbereitet. Die cDNAs wurden freundlicherweise von V. Lampasona (San Raffaele Scientific Institute, Mailand, Italien) zur Verfügung gestellt.

ZnT8A wurden ebenfalls im Protein A-Radiobindungsassay bestimmt. Autoantikörper gegen den COOH-terminalen Teil von ZnT8 (ZnT8A-COOH) wurden mit COOH-terminalen (Aminosäure 268-369) Konstrukten der ZnT8-R325- (ZnT8RA), beziehungsweise -W325- (ZnT8WA) oder -Q325 (ZnT8QA) -Varianten gemessen.

Autoantikörper gegen den NH₂-terminalen Teil von ZnT8 wurden mit einem NH₂-terminalen (Aminosäure 1-74) Konstrukt gemessen.

Von jeder Serumprobe wurden 2 µl im Doppelansatz in 96er deep-well Platten (Polystyrol, 96 wells, Beckman Coulter) pipettiert. Darauf wurden 25 µl eines Gemisches mit 25000 cpm des [³⁵S]-markierten, in vitro-transkribierten/ -translatierten (TNT® SP6 Quick Coupled Transcription/ Translation System, Promega, Mannheim, Germany) rekombinanten humanen ZnT8-Konstruktes und TBST-Puffer (20 mM Tris gepufferte Saline, pH 7,4, 0,15% Tween-20) mit 0,1% BSA gegeben. Dieser Ansatz mit einer Menge von 27µl wurde kurz bei 500 rpm zentrifugiert, dann 30 Sekunden bei 1000 rpm auf einem orbital shaker gerüttelt, mit Parafilm (Sigma) abgedeckt und über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1,5 mg Protein A-Sepharose (Amersham, UK), vorgequollen in 50 µl TBST, in jedes well pipettiert, die Platten wiederum kurz zentrifugiert und bei 1000 rpm 60 Minuten gerüttelt, damit sich Immunkomplexe bilden können. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Platten 5 mal gewaschen: 800µl eiskalter harmonisierter TBST-Puffer wurde jedem well mit einem Dispensor zugegeben und die Platte 5 Minuten bei 500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, so dass 100µl in jedem well zurück blieben. Daraufhin wurde die Platte kurz geschüttelt und wieder mit Puffer versetzt. Nach dem Waschen wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe mit einer Multipipette in eine Messplatte (Optiplate, Packard Instruments, Meriden, CT) überführt, auf der jedem well 150µl Szintillationsflüssigkeit (Microscint 40 scintillant, Packard) zugegeben wurden. Die Platten wurden mit Klebefilm (Topseal) verschlossen und mit Alufolie gegen Lichteinfall geschützt, bevor in einem Beta-counter (Topcount Microplate Scintillation Counter, Packard, Deutschland) die Radioaktivität gemessen wurde.

Die Ergebnisse wurden in Units angegeben, die aus Standardkurven abgeleitet wurden. Diese entstanden, indem bei allen ZnT8-COOH Tests gemischte Seren von 20 Patienten mit neu manifestiertem Diabetes mit gemischten Seren gesunder Spender verdünnt und mitgetestet wurden. Bei den ZnT8-NH₂ Tests wurden Verdünnungen eines Serums eines Patienten mit sehr starker Bindung des NH₂-terminalen Konstruktes mitgemessen. Die Grenzen für Positivität wurden im Q-Q-Plot anhand der 99. Perzentile eines Kontrollkollektivs festgelegt und betragen für ZnT8RA 16 U/ml, für ZnT8WA 30 U/ml, für ZnT8QA 60 U/ml und für ZnT8A NH₂ 15

U/ml. Die Grenzwerte für ZnT8A wurden durch eine Analyse von Q-Q-Plots in einem getrennten Testansatz mit Seren von 100 Spendern und 415 Patienten mit Typ 1 Diabetes validiert. Die inter-assay Variationskoeffizienten für Proben mit mittlerem positivem Antikörpertiter waren 17% (ZnT8RA), 16% (ZnT8WA), 19% (ZnT8QA) und 14% (ZnT8A-NH₂).

Für diese Arbeit wurde ZnT8A-COOH bei allen Kindern zuerst in der letzten verfügbaren Probe bestimmt (n=1633). Bei Kindern, die Typ 1 Diabetes entwickelten, wurde die letzte Probe vor der Diagnose und, soweit verfügbar, eine Probe zum Zeitpunkt der Diagnose gewählt. ZnT8A-NH₂ wurde in der letzten verfügbaren Probe von 574 Kindern gemessen. Darunter befanden sich alle Kinder, die für ZnT8A-COOH und/oder einen anderen Insel-Autoantikörper (IAA, GADA, IA-2A) positiv gemessen wurden. Bei den Kindern, bei denen irgendeine der ZnT8A-Varianten gemessen wurden, wurden alle verfügbaren Proben des Verlaufs getestet.

5.4. Genotypisierung von SLC30A8

Aus heparinisiertem Blut von 1170 Kindern wurde im standardisierten Verfahren genomische DNA extrahiert und der Genotypisierung des SNP rs13266634, der für die polymorphen Varianten an Position 325 von ZnT8 Arg oder Trp (R325W) kodiert, im Taqman Assay (assay ID C_357888_10, Applied Biosystems, Monza, Italien) unterzogen, entsprechend der Anweisung des Herstellers mit einem ABI 7000 (ABI Whittam, MA). Selektierte Genotypen wurden durch automatisiertes Sequenzieren auf einem ABI 3130 Sequenzierer (ABI Whittam) verifiziert.

5.5. Statistik

Mit dem Mann-Whitney *U* oder dem Kruskal-Wallis *H* Test wurden die kontinuierlichen Variablen zwischen den Gruppen verglichen. Mit dem Fischer's exact Test oder dem Chi-squared Test for trend wurden die Prävalenzen zwischen den Gruppen verglichen. Mit Hilfe von Life-table-Analysen wurde die kumulative Häufigkeit von ZnT8A-COOH bei Kindern bestimmt und das Diabetes-Ergebnis bei Autoantikörper-positiven Kindern mit verschiedenen kovariaten Kategorien verglichen. Ein Kind wurde als ZnT8A-COOH-positiv betrachtet, wenn es mindestens

2 aufeinanderfolgende positive Proben für Autoantikörper gegen eine oder mehr der ZnT8-COOH-Varianten aufwies. Als Ereigniszeitpunkt wurde die erste ZnT8A-COOH-positive Probe angenommen. Die Analysen berücksichtigten eine Zensierung bei Verlusten im follow-up und bei Kindern mit negativem ZnT8A-COOH-Status im Verlauf das Alter bei der letzten Autoantikörper-negativen Probe. Für Berechnung des Diabetes-Risikos bei Inselautoantikörper-positiven Kindern wurde die Zeit zwischen der ersten Autoantikörper-positiven Probe und der Diagnose Typ 1 Diabetes bzw. dem letzten Kontakt als Ereigniszeitpunkt für den Diabetes-Status definiert. Bei Kindern, bei denen die Life-table-Analyse nur die Untergruppe Kinder mit ZnT8-COOH berücksichtigte, wurde als Ereigniszeitpunkt die Zeit zwischen der ersten ZnT8A-COOH-positiven Probe und der Diagnose Diabetes bzw. dem letzten Kontakt definiert. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde mit dem log rank test bestimmt. Die „area under the curve“ (AUC) der ZnTRA- und ZnT8WA-Bindung im Verlauf wurde für Kinder mit Reaktivität gegen beide Varianten mit der Thai's Formel kalkuliert. Die AUC-Kalkulation berücksichtigte die direkte (cmp) Bindung der R325 und W325 Varianten, die entsprechend in allen Proben eines Kindes gemessen wurde. Für alle Analysen wurden ein p -Wert=0,05 als signifikant angenommen. Die statistischen Analysen wurden mit dem Statistical Package for Social Science (SPSS 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

6. Ergebnisse

6.1. Prävalenz und Zeitpunkt der Entstehung von ZnT8A, Auftreten anderer Insel-Autoantikörper

Um die Häufigkeit und das Alter der Entstehung von Autoantikörpern gegen ZnT8 bei Kindern mit einem erstgradig Verwandten mit Typ 1 Diabetes zu bestimmen, untersuchten wir 1633 Kinder der BABYDIAB-Studie, die prospektiv von Geburt an beobachtet wurden. Als Autoantikörper-positiv galten Personen, die in mindestens 2 Proben Werte über dem Grenzwert für den jeweiligen Autoantikörper erreicht hatten. War nur eine Serumprobe positiv für Autoantikörper, galt die Person bis zur Bestätigung des Ergebnisses durch eine zweite Probe als Autoantikörper-negativ. Anders bei Probanden mit Typ 1 Diabetes: Hier reichte bereits eine positive Probe aus, um als Autoantikörper-positiv zu gelten (Bonifacio 2004). Getestet wurden alle verfügbaren Proben eines Kindes. 58 Kinder aus BABYDIAB bildeten persistierende Autoantikörper (ZnT8A-COOH) gegen mindestens eines der COOH-terminalen ZnT8-Konstrukte mit entweder Arg, Trp oder Gln an Stelle 325. ZnT8A-COOH traten im medianen Alter von 3,2 Jahren (IQR 2,1-5,4) auf. Ihre kumulative Häufigkeit lag bei 2,8% (95% CI, 2,0-3,6) im Alter von 5 Jahren, 3,7% (2,7-4,7) im Alter von 8 Jahren und 4,6% (3,3-5,9) im Alter von 11 Jahren (Abbildung 2a).

Unter den 58 ZnT8A-COOH-positiven Kindern waren 50 von 69 (72,5%) Kinder, die multiple Insel-Autoantikörper (mindestens zwei von IAA, GADA und IA-2A) entwickelt hatten, 5 von 59 (8,5%) mit einem einzelnen anderen Autoantikörper (3 Kinder waren nur für IAA positiv, 2 nur für GADA) und 3 von 1505 (0,2%) Insel-Autoantikörper-negativen Kindern. Die ZnT8A-COOH gingen bei einem Kind der Entwicklung anderer Autoantikörper voran, bei 24 Kindern erschienen sie zur selben Zeit und bei 30 Kindern nach einem anderen Autoantikörper.

Autoantikörper gegen das NH₂-terminale Konstrukt von ZnT8 (ZnT8A-NH₂) wurden bei 20 von 574 (3,5%) Kindern der BABYDIAB-Studie nachgewiesen, wovon 8 (13,8%) Kinder auch ZnT8A-COOH-positiv waren, 2 (2,8%) von 72 ZnT8A-COOH-negativ aber positiv für andere Insel-Autoantikörper waren und 10 (2,3%) von 444 negativ für alle anderen Autoantikörper waren ($p < 0,0001$). ZnT8A-NH₂ erschienen erstmalig im medianen Alter von 6,3 Jahren (IQR 3,6-11,4), also später als ZnT8A-

COOH ($p=0,01$).

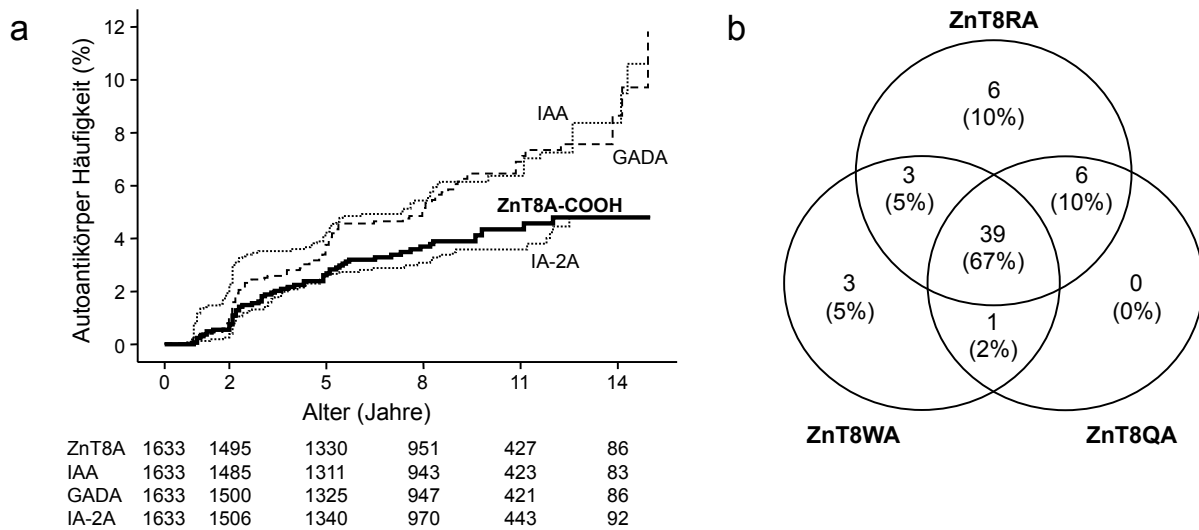


Abbildung 2

Auftreten der Autoantikörper gegen die COOH-terminale Domäne von ZnT8 (ZnT8A-COOH) bei Kindern mit einem Verwandten ersten Grades mit Typ 1 Diabetes.

a: Life-table-Analyse: Kumulatives Risiko für die Entwicklung von ZnT8A-COOH, IAA, GADA und IA-2A bei 1633 Kindern der BABYDIAB-Studie. Die Zahlen unter der Abszisse stehen für die Anzahl der verbliebenen ZnT8A-COOH-negativen Kinder des jeweiligen Alters.

b: Das Mengendiagramm zeigt die Anzahl der ZnT8A-COOH-positiven Kinder, die Autoantikörper gegen die ZnT8-Varianten R325 (ZnT8RA), W325 (ZnT8WA) und/oder Q325 (ZnT8QA) entwickelten.

6.2. Reaktivität der Autoantikörper gegen die Varianten von ZnT8

Unter den 58 ZnT8A-COOH-positiven Kindern hatten 54 (93,1%) Autoantikörper gegen die R325-Variante (ZnT8RA), 46 (79,3%) gegen die W325-Variante (ZnT8WA) und 46 (79,3%) gegen die Q325-Variante (ZnT8QA; Abbildung 2b). Das Screening für ZnT8RA und ZnT8WA konnte alle 58 ZnT8A-COOH-positiven Kinder identifizieren. Die Mehrheit dieser Kinder (67%) bildete Autoantikörper gegen alle drei Varianten. Neun Kinder (15,5%) hatten Autoantikörper gegen nur eine einzige Variante. Insgesamt betrachtet konnten 6 verschiedene Muster der Reaktivität beobachtet werden (Abbildung 2b).

Die Reaktivität der Autoantikörper im Verlauf ist bei den Kindern heterogen (Abbildung 3). Die Hälfte der Kinder hatte Autoantikörper gegen alle Varianten mit

ähnlicher Dynamik im Verlauf der Zeit (Abbildung 3a). Andere Muster zeigten signifikant stärkere (Abbildung 3b) und/oder frühere (Abbildung 3c) Bindungen der Autoantikörper gegen eine der Varianten. Es gab auch Kinder, die im Verlauf nur gegen eine einzige Variante Autoantikörper bildeten (Abbildung 3d).

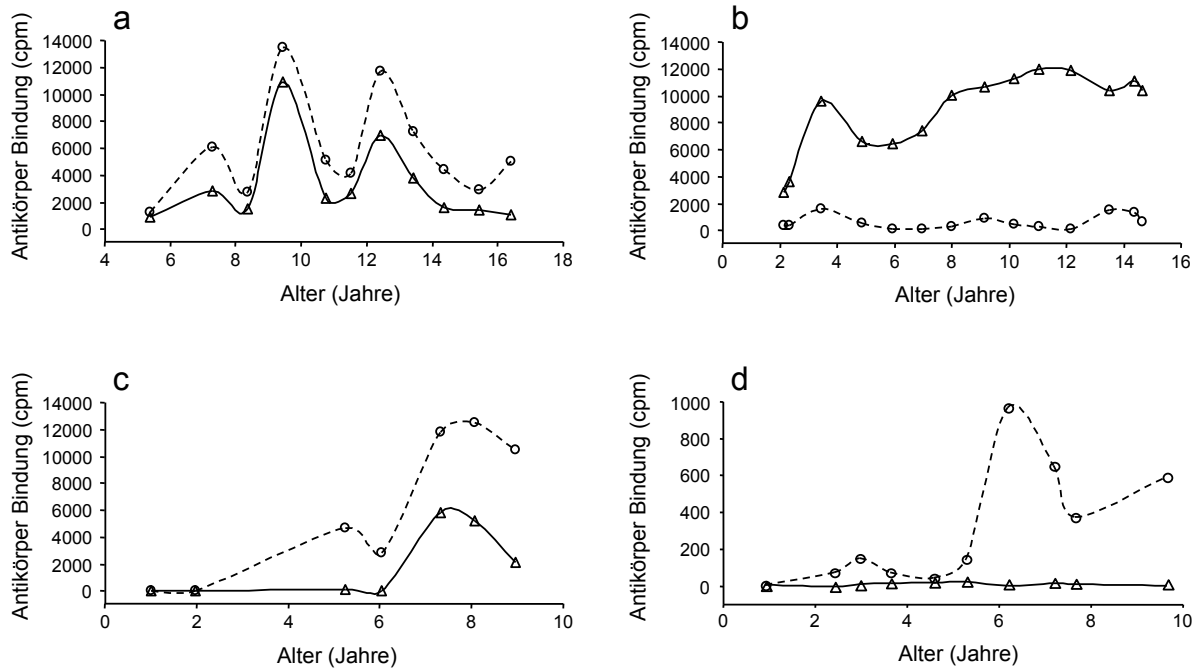


Abbildung 3

ZnT8A-COOH im Verlauf. Beispielhafte Kurven werden gezeigt für Kinder, die Autoantikörper sowohl gegen die ZnT8-R325-Variante als auch gegen die ZnT8-W325-Variante gebildet haben (a-c), und für Kinder, die im Verlauf Autoantikörper gegen die ZnT8-R325-Variante aber nicht gegen die W325-Variante haben (d). Kreise verbunden mit gestrichelter Linie zeigen ZnT8RA, Dreiecke mit durchgezogener Linie zeigen ZnT8WA.

6.3. Die Epitop-Spezifität von ZnT8A steht in Zusammenhang mit dem SLC30A8-Genotyp

Für die Analyse des Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (SNP) rs13266634 (R325W) war DNA von 128 Autoantikörper-positiven Kinder verfügbar, darunter 52 ZnT8A-COOH-positive und 1042 Insel-Autoantikörper-negative Kinder (Tabelle 1).

ZnT8A-COOH-positive Kinder

| SLC30A8 SNP rs13266634 Genotyp | n | ZnT8RA-pos ZnT8WA-neg | ZnT8RA-pos ZnT8WA-pos | ZnT8RA-neg ZnT8WA-pos |
|--------------------------------------|----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 11 | 37 | 4 |
| CC | 31 | 9 (7) | 22 (16) | 0 |
| CT | 17 | 2 | 13 (1) | 2 (2) |
| TT | 4 | 0 | 2 (2) | 2 (2) |

ZnT8A-COOH-negative Kinder

| SLC30A8 SNP rs13266634 Genotyp | n | positiv für andere Inselzell- Autoantikörper | negativ für andere Inselzell- Autoantikörper |
|--------------------------------------|-----|---|---|
| | | 76 | 1042 |
| CC | 533 | 33 (1) | 500 |
| CT | 485 | 35 (5) | 450 |
| TT | 100 | 8 | 92 |

Tabelle 1

Verteilung der SLC30A8 SNP rs13266634-Genotypen bei 52 ZnT8A-COOH-positiven und 1118 ZnT8A-COOH-negativen Kindern. ZnT8A-COOH-positive Kinder wurden nach Autoantikörper-Bindung gegen die ZnT8-R325- (ZnT8RA) und -W325 (ZnT8WA) -Varianten gruppiert. ZnT8A-COOH-negative Kinder wurden nach dem Auftreten von anderen Inselzell-Autoantikörpern (IAA, GADA, IA-2A und/oder ZnT8A-NH₂) gruppiert. Die Anzahl der Kinder, die Typ 1 Diabetes entwickelten steht in Klammern.

Der SLC30A8 SNP rs13266634-Genotyp war sehr stark assoziiert mit dem Bindungsmuster der ZnT8-R325W-Variante, die von den Autoantikörpern gebunden wurde. Alle Kinder, die in ihrem Verlauf ZnT8RA -positiv und ZnT8WA-negativ waren, hatten mindestens ein Allel der für die Arginin-kodierenden R325-Kodon-Variante CCG (C-Allel), darunter 9 Kinder (82%), die homozygot (CC-Genotyp) waren.

Im Gegensatz dazu hatten alle 4 Kinder, die in ihrem Verlauf ZnT8RA-negativ, aber ZnT8WA-positiv waren, mindestens ein Allel der für die Tryptophan-kodierenden W325-Kodon-Variante TCG (T-Allel), darunter 2 Kinder mit homozygotem (TT-

Genotyp) Genotyp ($p=0,001$; Tabelle 1).

Die Verteilung des SLC30A8-Genotyps bei den Kindern, deren ZnT8A-COOH sowohl an die R325- als auch an die W325-Variante banden, war vergleichbar zur Verteilung bei Insel-Autoantikörper-negativen Kindern ($p=0,2$; Tabelle 1). Interessanterweise zeigte der SLC30A8-Genotyp Assoziationen zur relativen Autoantikörper-Bindung gegen die ZnT8-R325W-Varianten bei diesen Kindern (Abbildung 4).

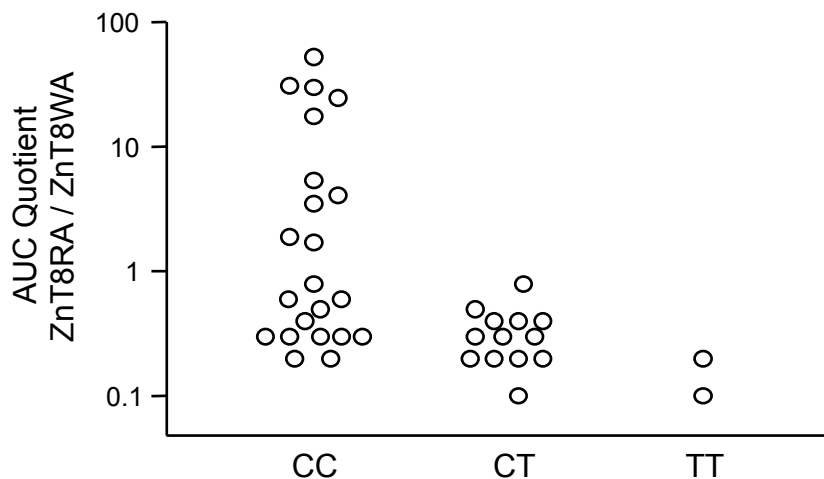


Abbildung 4

Der relative Titer der Autoantikörper-Reaktionen gegen die ZnT8-R325- und -W325-Varianten über die Zeit wurde bestimmt durch den SLC30A8 SNP rs16889462-Genotyp bei 37 Kindern, die gegen beide R325W-Varianten Autoantikörper entwickelten ($p=0,004$). Der individuelle Anteil der AUC für ZnT8RA geteilt durch die AUC für ZnT8WA wurde dargestellt in Beziehung zum SLC30A8 SNP rs16889462-Genotyp (CC, CT oder TT).

Der AUC ZnT8RA/AUC ZnT8WA-Quotient war bei den 22 Kindern, die den CC-Genotyp aufwiesen, signifikant höher (medianer Quotient 0,7; IQR 0,3-11,5) als bei den 13 Kindern mit dem CT-Genotyp (0,3; 0,2-0,4) und den 2 Kindern mit dem TT-Genotyp ($p=0,004$).

6.4. Stratifizierung des Diabetes-Risikos bei ZnT8A-COOH-positiven Kindern

34 (59%) der 58 Kinder, die für ZnT8A-COOH positiv gemessen wurden, 8 (11%) der 73 Kinder, die für ZnT8A-COOH negativ gemessen wurden aber andere Insel-Autoantikörper aufwiesen und keines der 1502 Insel-Autoantikörper-negativen Kinder entwickelte Diabetes ($p<0,0001$). Das kumulative 5-Jahres-Diabetes-Risiko vom

Auftreten von ZnT8A-COOH lag bei den 58 Kindern bei 48% (95% CI, 34-62). Durch die zusätzliche Bestimmung von ZnT8A-COOH konnte das Risiko bei Kindern, die vorher auf der Basis von IAA, GADA und IA-2A als einfach oder mehrfach positiv klassifiziert wurden, genauer bestimmt werden ($p < 0,0001$, Abbildung 5).

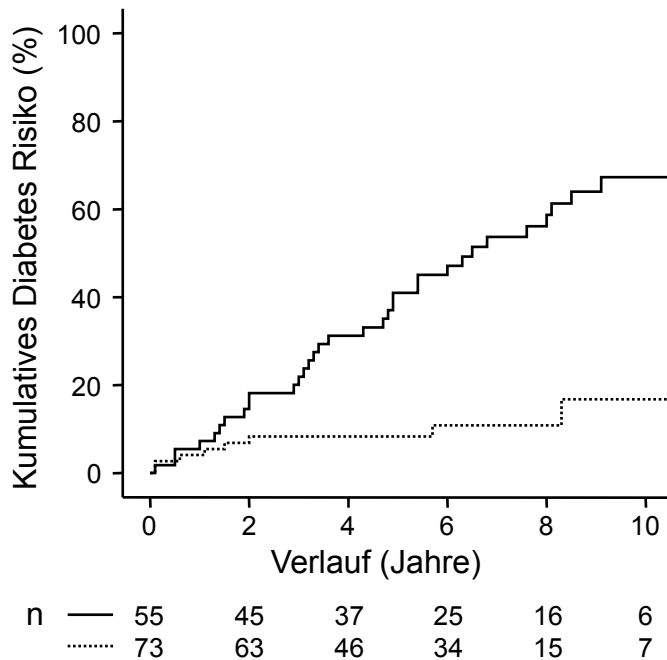


Abbildung 5

Der ZnT8A-COOH-Status stratifiziert das Diabetes-Risiko bei Insel-Autoantikörper-positiven Kindern ($p < 0,0001$). Die kumulative Progression zu Diabetes wurde für 55 ZnT8A-COOH-positive Kinder (durchgehende Linie) und für 73 ZnT8A-COOH-negative aber IAA-, GADA- und/oder IA-2A-positive Kinder (gepunktete Linie) gezeigt. Die Kinder wurden ab der ersten Autoantikörper-positiven Probe verfolgt. Die Zahlen unter der Abszisse bedeuten die Anzahl der verbleibenden Nicht-diabetischen Kinder im Verlauf.

59 Kindern wiesen nur einen Autoantikörper (IAA, GADA und IA-2A) auf. Davon konnte bei 5 Kindern ZnT8A-COOH nachgewiesen werden. Von diesen 5 jetzt als multipel Autoantikörper-positiv klassifizierten Kindern entwickelten 3 (60%) im Verlauf Typ 1 Diabetes. Im Vergleich dazu entwickelten 2 der verbliebenen 54 (4%) ZnT8A-COOH negativen Kinder Typ 1 Diabetes ($p = 0,003$). Von den 69 Kindern, die vorher bereits als multipel, d.h. für mindestens 2 Insel-Autoantikörper positiv gemessen wurden, entwickelten 31 der 50 (62%) ZnT8A-COOH-positiven Kinder und 6 der 19 (32%) ZnT8A-COOH-negativen Kinder im Verlauf Typ 1 Diabetes ($p = 0,03$).

6.5. Stratifizierung des Diabetes-Risikos durch den SLC30A8-Genotyp

Ein weiteres Ergebnis war, dass homozygote Polymorphismen, die für die ZnT8-R325 (CC-Genotyp) oder -W325 (TT-Genotyp) -Varianten kodieren, mit einer Progression zu Diabetes bei Kindern, die ZnT8A-COOH entwickelten, assoziiert waren. 77% der ZnT8A-COOH-positiven Kinder mit dem CC- oder TT-Genotyp entwickelten Diabetes, im Vergleich zu 18% der ZnT8A-COOH-positiven Kinder mit dem CT-Genotyp ($p < 0,0001$; Tabelle 1). Das 5-Jahres-Diabetes-Risiko bei ZnT8A-COOH-positiven Kindern mit dem homozygoten CC- oder TT-Genotyp lag bei 59% (95% CI, 42-76) und bei 22% bei ZnT8A-COOH-positiven Kindern, die den heterozygoten CT-Genotyp trugen (0-44; $p = 0,01$; Abbildung 6).

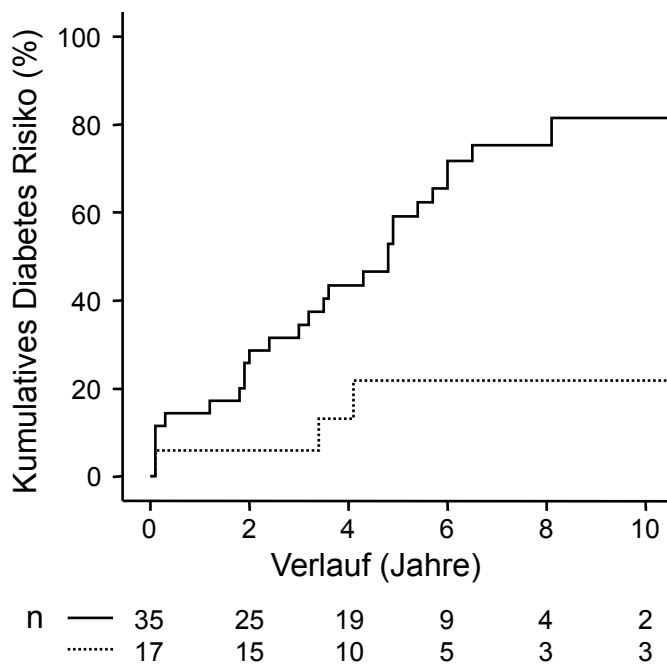


Abbildung 6

Der SLC30A8-Genotyp stratifiziert das Risiko für Typ 1 Diabetes bei ZnT8A-COOH-positiven Kindern. Die kumulative Progression zu Diabetes wurde für die 60 ZnT8A-COOH-positiven Kinder gezeigt, bei denen der SLC30A8-Genotyp bestimmt wurde. Die Kinder wurden nach SLC30A8 SNP rs13266634-Genotypen gruppiert: Homozygote CC- oder TT-Genotypen (durchgezogene Linie) oder heterozygoter Genotyp CT (gepunktete Linie). Der Verlauf wurde von der ersten ZnT8A-COOH-positiven Probe aus kalkuliert. Die Zahlen unter der Abszisse stehen für die Anzahl der verbleibenden Nicht-diabetischen Kinder im Verlauf.

Bei den Kindern, die Autoantikörper gegen alle 3 Varianten aufwiesen, entwickelten die Kinder mit heterozygotem CT-Genotyp signifikant weniger Diabetes ($p=0,0004$; Tabelle 2).

| SLC30A8 SNP rs13266634 Genotyp | ZnT8RA+ ZnT8QA- ZnT8WA- | ZnT8RA+ ZnT8QA+ ZnT8WA- | ZnT8RA+ ZnT8QA+ ZnT8WA+ | ZnT8RA+ ZnT8QA- ZnT8WA+ | ZnT8RA- ZnT8QA+ ZnT8WA+ | ZnT8RA- ZnT8QA- ZnT8WA+ |
|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| CC | 4 (3) | 5 (4) | 19 (13) | 3 (3) | 0 | 0 |
| CT | 1 | 1 | 13 (1) | 0 | 1 (1) | 1 (1) |
| TT | 0 | 0 | 2 (2) | 0 | 0 | 2 (2) |

Tabelle 2

Verteilung des SLC30A8 SNP rs13266634-Genotyps bei 52 ZnT8A-COOH-positiven Kindern, die gemäß ihrer Autoantikörper gegen die ZnT8-R325- (Zn8RA), -W325- (ZnT8WA) und -Q325 (ZnT8QA) -Varianten gruppiert wurden. Die Anzahl der Kinder, die Typ 1 Diabetes entwickelten, steht in Klammern.

Eine weitere Stratifizierung der ZnT8A-COOH-positiven Kinder auf der Basis der Reaktivität gegen die R325W-Varianten resultierte in kleinen Anzahlen und war deswegen nicht informativ genug, um zu bestimmen, ob der genetische Effekt auf das Diabetes-Risiko auf einzelne Epitope begrenzt war. Das Diabetes-Risiko wurde bei Inselzell-Autoantikörper-positiven Kindern, die ZnT8A-COOH-negativ waren, durch den SLC30A8-Genotyp nicht signifikant stratifiziert (Tabelle 1).

7. Diskussion

In der Pathogenese des Typ 1 Diabetes spielen Autoantikörper gegen Inselzell-Antigene der Beta-Zellen des Pankreas wie IAA, GADA und IA-2A eine entscheidende Rolle. Viele, aber nicht alle Kinder, die diese Autoantikörper aufweisen, entwickeln einen Typ 1 Diabetes in der Kindheit (Hummel 2004).

Mit der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in der präklinischen Phase des Diabetes bei Kindern mit einem Verwandten ersten Grades mit Typ 1 Diabetes Autoantikörper gegen ZnT8 vorkommen. Dieser Zink-Transporter wurde neben den bereits als Antigen bekannten Molekülen als zusätzliches Haupt-Zielantigen entdeckt (Wenzlau 2007). Durch Bestimmung der Autoantikörper gegen ZnT8-COOH konnte die Immunantwort genauer erfasst und das Diabetes-Risiko bei Autoantikörper-positiven Kindern genauer stratifiziert werden. Es wird dargelegt, dass der Genotyp des für ZnT8 codierenden Gens SLC30A8 dafür verantwortlich ist, gegen welche polymorphen Varianten von ZnT8-COOH Autoantikörper gebildet werden. Auch beeinflusst er bei ZnT8A-COOH-positiven Kindern die Rate der Progression zu Diabetes.

In der vorliegenden Arbeit wird erstmalig über die Immunreaktion gegen ZnT8 und den Zusammenhang mit dem zugrundeliegenden Genotyp in einer große Kohorte von Kindern berichtet, die einen Verwandten ersten Grades mit Typ 1 Diabetes haben. Zum großen Teil handelt es sich dabei um gesunde bzw. in der prädiabetischen Phase befindliche Kinder. Aufgrund der prospektiven Beobachtung von Geburt an bestand bei allen Kindern, auch bei bereits an Diabetes erkrankten, die Möglichkeit, Blutproben aus der prädiabetischen Phase zu untersuchen. In festgelegten Zeitabständen wurden Blutproben mit sensitiven Radiobindungsassays getestet. Durch dieses Vorgehen ließen sich auch die Zeitpunkte des Auftretens der Inselzell-Autoantikörper, der Autoantikörper gegen die ZnT8-Varianten sowie der Diabetes-Manifestation genau bestimmen. Ein weiterer Vorteil des langen Verlaufs ist, dass einmal positiv gemessene Proben durch eine zweite Probe bestätigt werden konnten und Personen mit transient auftretenden Autoantikörpern identifiziert werden konnten.

Als Einschränkung dieser Studie ist zu betrachten, dass sie nicht populationsbasiert ist. Die Daten wurden in einer Kohorte mit Menschen, die ein erhöhtes Risiko haben,

erhoben. Im Gegensatz zu den Kohorten der DIPP-Studie (Kimpimäki 2002) und der DAISY-Studie (Barker 2004) wurde in der BABYDIAB-Kohorte aber auf eine weitere Selektierung, z.B. anhand des HLA-Genotyps, verzichtet.

Eine weitere mögliche Limitierung des Studiendesigns liegt darin, dass bei Kindern, die für die bisher bekannten Inselzell-Autoantikörper negativ waren, nur die letzte verfügbare Probe für Autoantikörper gegen ZnT8 getestet wurde. Durch diese Vorgehensweise könnten möglicherweise Probanden mit transienten Autoantikörpern gegen ZnT8 übersehen worden sein.

Eine Stärke dieser Arbeit ist, dass die Autoantikörper im gut untersuchten und bewährten Radiobindungsassay gemessen wurden. Neuere Experimente bzgl. anderer Testmethoden zeigen sich teilweise weniger effektiv wie der in dieser Arbeit durchgeführte Test, z.B. ein Testverfahren mit Biolumineszenz (LIPS; Ustinova 2014). Oder sie weisen eine ähnliche Effektivität auf, bedürfen aber noch weiterer Evaluationen, z.B. ein Enzym-gekoppelter Ansatz (Kawasaki 2014). Testansätze, in denen mehrere Autoantikörper gleichzeitig evaluiert werden können, wie ein dreifacher Radiobindungsassay, der alle drei Varianten von ZnT8 als separate Konstrukte in einem einzigen Testansatz (Vaziri-Sani 2011) misst, oder ein Multi-Autoantigen Radiobindungsassay (MAA; Tiberti 2011), scheinen bislang eher für ein Screening der Allgemeinbevölkerung geeignet zu sein. Die höchste Sensitivität wies im DASP Workshop von 2009 der Radiobindungsassay mit einem Konstrukt aus R und W auf (Lampasona 2011).

Zur Genotypisierung von SLC30A8 waren von 72% der Kinder aus der getesteten Kohorte Proben verfügbar. Allerdings konnten von 91% der Probanden, die positiv für Autoantikörper gemessen wurden, die Daten bzgl. des Genotyps erhoben werden, sodass die Rückschlüsse auf die Beziehung des Genotyps zum Muster der Immunantwort gegen ZnT8 kaum durch fehlende Daten beeinflusst wurden.

Die Ergebnisse bzgl. des Auftretens der Autoantikörper gegen ZnT8 entsprechen denen anderer Arbeitsgruppen, die dieselben Autoantikörper bei Patienten mit Typ 1 Diabetes gemessen haben. Genauso wie von einer Forschergruppe aus den USA (Wenzlau 2007) kann auch hier gezeigt werden, dass Autoantikörper gegen ZnT8 vor allem gegen die COOH-terminale Domäne gerichtet sind. In geringerem Ausmaß kommen sie auch gegen die NH₂-terminale Domäne des Zink-Transporters vor. Auch bei einer Subgruppe von Patienten mit Diabetes konnte gezeigt werden, dass

ZnT8A-COOH bei ca. 19% vorliegen. Bei dieser Subgruppe (sog. LADA) manifestiert sich im Erwachsenenalter klinisch zuerst ein Typ 2 Diabetes. Im weiteren Verlauf sind diese Patienten auf eine Insulin-Therapie angewiesen und GADA können nachgewiesen werden (Lampasona 2010 und Kawasaki 2010).

Durch die Untersuchungen dieser Kohorte mit prospektivem Verlauf können die bereits vorliegenden Ergebnisse um Daten erweitert werden, wann Autoantikörper gegen ZnT8 erstmalig auftreten, in welchem zeitlichen Verhältnis dies zum Auftreten der anderen Inselzell-Autoantikörper steht und wie die zeitliche Beziehung zur Manifestation des Diabetes ist. ZnT8 ist tatsächlich ein frühes Ziel der Autoantikörper bei Kindern mit einem Verwandten ersten Grades mit Typ 1 Diabetes. Circa 4% von 1633 Kindern der BABYDIAB-Studie entwickelten ZnT8A-COOH, etwa die Hälfte davon im Alter von 3 Jahren, wobei das früheste Auftreten im Alter von nur 9 Monaten gemessen wurde. Die kumulative Häufigkeit von ZnT8A-COOH im Kindesalter war in etwa vergleichbar mit der von IA-2A, womit sie niedriger als die von GADA und IAA war. Im Hinblick auf das zeitliche Verhältnis zum Auftreten der anderen Inselzell-Autoantikörper wird in dieser Arbeit gezeigt, dass ZnT8A-COOH nur selten den anderen Inselzell-Autoantikörpern vorrausgeht, bei 44% der ZnT8A-COOH positiven Kinder aber gleichzeitig als erstes mit IAA, GADA und/ oder IA-2A auftritt.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen amerikanischer (Wenzlau 2008) und japanischer (Kawasaki 2008) Patienten mit Typ 1 Diabetes treten auch in dieser Studie bei den ZnT8A-COOH-positiven Kindern als häufigste Autoantikörper die gegen die R325-Variante auf (93%), gefolgt von Autoantikörpern gegen die W325-Variante. Insgesamt zwei Drittel der ZnT8A-COOH-positiven Kinder bildeten Autoantikörper gegen beide polymorphen Varianten, weswegen ein Screening für Autoantikörper gegen die beiden Haupt-Varianten von ZnT8 als geeignete Strategie angesehen wird, ZnT8A-COOH-positive Probanden zu identifizieren. Eine Gruppe aus Schweden bestätigte, dass Autoantikörper gegen alle 3 Varianten die diagnostische Sensitivität beim Typ 1 Diabetes bei Kindern und Heranwachsenden verbessern (Andersson 2011). Neuere Daten ergaben Hinweise darauf, dass neben den in dieser Arbeit getesteten COOH-terminalen Epitopen R325 bzw. W325 ein weiteres C-terminales nicht-polymorphes Epitop existiert, welches die Immunreaktion ebenfalls beeinflussen könnte (Wenzlau 2011).

Autoantikörper gegen die COOH-terminale Domäne von ZnT8 waren stark mit der Manifestation von Typ 1 Diabetes vergesellschaftet. Bei fast der Hälfte aller Kinder dieser Kohorte, die ZnT8A-COOH entwickelten, manifestierte sich Typ 1 Diabetes innerhalb von 5 Jahren nach dem Auftreten dieser Autoantikörper. Bei Probanden der TrialNet Natural History Study (NHS), ebenfalls eine prospektive Studie, die Verwandte ersten oder auch zweiten und dritten Grades von Patienten mit Typ 1 Diabetes untersucht, wurden die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt: Die Autoantikörper gegen ZnT8 identifizierten innerhalb der für einen Inselzell-Autoantikörper positiv gemessenen Probanden eine Gruppe, welche ein höheres Risiko für Diabetes hat (Yu 2012).

Weiterhin können Autoantikörper gegen ZnT8-COOH das Risiko bei Kindern, die bereits vorher als multipel Autoantikörper-positiv auf der Basis von IAA, GADA oder/und IA-2A galten, genauer bestimmen. Besonders konnte das Risiko bei Verwandten von Typ 1 Diabetikern durch kombinierte Testung der Autoantikörper gegen IA-2 β und ZnT8A-COOH stratifiziert werden. Diese beiden Autoantikörper gelten als starke Prädiktoren der Manifestation (DeGrijse 2010) und können sogar als alleiniges Screening die Mehrheit der Verwandten ersten Grades von Typ 1 Diabetikern identifizieren, die schnell zu Diabetes voranschreiten (Gorus 2013). Auch bei LADA-Patienten können unter den GADA-positiven durch zusätzliche Bestimmung von IAA, IA-2A und ZnT8A-COOH die identifiziert werden, die schneller zu einem insulinpflichtigen Diabetes voranschreiten (Kawasaki 2010).

Für Autoantikörper gegen ZnT8-NH₂ trifft diese Aussage nicht zu: Sie waren oft transient und die Hälfte der ZnT8A-NH₂ positiven Kinder entwickelten keine anderen Insel-Autoantikörper. Außerdem entwickelte keines der ZnT8A-NH₂-positiven Kinder Diabetes; Autoantikörper gegen die NH₂-terminale Domäne von ZnT8 tragen also nicht zu einer genaueren Bestimmung des Diabetes-Risikos bei.

Das hohe Diabetes-Risiko, welches mit ZnT8A-COOH in Zusammenhang steht, ist vergleichbar zu dem, welches bei Kindern, die Autoantikörper gegen IA-2 und besonders gegen IA-2 β entwickelten, gesehen wurde (Achenbach 2008 und Notkins 1998). Alle diese Strukturen, gegen die sich die Immunreaktion richtet, sind COOH-terminale zytosolische Teilbereiche von Transmembranproteinen, die in sekretorischen Vesikeln lokalisiert sind. Dieser Zusammenhang scheint auf die große Relevanz der Autoimmunität gegen solche Proteine im Vergleich zu

Autoimmunreaktionen gegen andere Proteine der Beta-Zelle in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes hinzuweisen.

Aus den USA und Japan liegen bereits Ergebnisse vor, die zeigen, dass im SLC30A8-Gen an Position aa325 der COOH-terminalen Domäne ein Polymorphismus existiert, der die Autoantikörper-Reaktionen bei Patienten mit Typ 1 Diabetes beeinflusst (Wenzlau 2008, Kawasaki 2008). Bei über 60% der neu manifestierten Diabetiker wiesen ZnT8A eine Bindung an diese Stelle auf (Wenzlau 2007). In dieser Kohorte prädiabetischer Kinder wurden Daten erhoben, die entsprechend den Vorergebnissen zeigen, dass sich die Autoantikörper-Reaktion je nach zugrundeliegendem Genotyp unterscheidet. So hat die Allel-Häufigkeit des C- oder T-Allels Einfluss auf die Ausbildung der Autoantikörper gegen die ZnT8-R325- oder -W325-Variante. Obwohl es keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die SLC30A8-Allel-Häufigkeit zwischen Autoantikörper-positiven und -negativen Kindern dieser Kohorte gab, wurde ein starker genetischer Einfluss auf die Ziel-Spezifisierung von ZnT8A-COOH beobachtet: Die Häufigkeit und die Titer von Autoantikörpern gegen ZnT8-COOH, die an die R325-Variante, nicht aber an die W325-Variante banden, war sehr viel höher bei ZnT8A-COOH-positiven Kindern mit einem homozygoten SLC30A8-Genotyp, der für R325 kodiert, als bei Kindern mit mindestens einem SLC30A8-Allel, das für W325 kodierte. Entsprechendes gilt auch für Autoantikörper, die nur an die W325-Variante banden. Diese wurden bei Kindern mit homozygoten C-Allelen, die für R325 kodieren, nicht gefunden. Hiermit kann durch die vorliegenden Untersuchungen in einer Kohorte prädiabetischer Kinder bekräftigt werden, dass der Polymorphismus an Stelle aa325 die Schlüssel-Determinante der humoralen Autoreaktivität gegen ZnT8 ist und dass der SLC30A8-Genotyp ein mitbestimmender Faktor der Autoantikörper-Spezifität in der präklinischen Phase des Typ 1 Diabetes ist. Diese Ergebnisse bzgl. Beziehung des rs13266634-Genotyps und den Autoantikörpern gegen ZnT8R bzw. ZnT8W konnten in einer Kohorte aus Patienten und gesunden Geschwistern aus Dänemark bestätigt werden. Darüber hinaus konnte eine Korrelation zwischen ZnT8RA und dem Genotyp HLA DQB1*0302 gefunden werden (Brorsson 2011 und Nielsen 2011). Bei der Untersuchung schwedischer vs. nicht-schwedischer Patienten mit kürzlich manifestiertem Typ 1 Diabetes wurde festgestellt, dass der CC-Genotyp im Vergleich zum CT- und TT-Genotyp häufiger bei Nicht-Schweden vorkam, die bei der Diagnose

jünger waren. In beiden Kohorten gab es - vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Studie - Assoziationen zwischen dem CC-Genotyp und ZnT8RA, sowie zwischen dem CT- und TT-Genotyp und ZnT8WA (Delli 2012).

Zum ersten Mal ergaben Forschungen in Bezug auf den SLC30A8-R325W-Genotyp, dass es bei ZnT8A-COOH-positiven Kindern, die homozygote Träger des C- oder des T-Allels sind, eine starke Beziehung zur Entwicklung von Diabetes gibt. Kinder mit diesen homozygoten CC- oder TT-Genotypen hatten ein deutlich höheres Risiko, an Typ 1 Diabetes zu erkranken. Ein wesentlicher Punkt hierbei ist, dass diese Beziehung unabhängig von der Beziehung der homozygoten Genotypen mit der Epitop-Spezifität erkannt wurde. Insgesamt hatten 75% der Kinder, die in dieser Kohorte Diabetes entwickelten, Autoantikörper gegen ZnT8-COOH gebildet und waren entweder für den CC- oder den TT-Genotyp homozygot. Mögliche Mechanismen, die dieser Beziehung zugrunde liegen könnten, sind rein spekulativ. Auffallend ist, dass die Beziehung nur bei ZnT8A-COOH-positiven Kindern und nicht bei Insel-Autoantikörper-positiven Kindern, die ZnT8A-COOH-negativ waren, gesehen wurde. Dies lässt vermuten, dass die Beziehung mit dem Ausmaß der Autoimmunität und der Expression verwandter Autoantigene zusammen hängen könnte. Lässt man den hinter dieser Beobachtung zugrundeliegenden Mechanismus außer Acht, implizieren die vorliegenden Daten, dass die Genotypisierung des SNP rs13266634 ein effektiver zweiter Schritt im Screening ZnT8A-COOH-positiver Probanden im Hinblick auf die genauere Bestimmung des Diabetes-Risikos ist.

Erwähnenswert ist, dass in einer anderen Kohorte eine erhöhte Prävalenz des SNP rs13266634 C-Allels bei Kindern, die vor dem Altern von 5 Jahren Diabetes entwickelten, gefunden wurde (Gohlke 2008). Die Ergebnisse dieser Fall-Kontroll-Studie als auch dieser Arbeit indizieren, dass der SLC30A8-Genotyp das Alter der Diabetesmanifestation beeinflusst. Sie stimmen aber nicht ganz exakt überein, vor allem weil in der Fall-Kontroll-Studie nur wenige Patienten homozygot bezüglich des seltener vorkommenden T-Allels waren. Dagegen ist in der vorliegenden Arbeit das Diabetes Risiko bei ZnT8A-COOH-positiven Probanden, die entweder den CC- oder den TT-Genotyp hatten, hoch. Die Unterschiede sind aber nicht unvereinbar, v.a. weil sich in den Daten dieser Arbeit zeigt, dass der ZnT8-Autoantikörper-Status wahrscheinlich relevant im Hinblick auf die genetischen Beziehungen ist, was in der Fall-Kontroll-Studie nicht gemessen wurde. Deswegen muss in Bezug auf SLC30A8

der Autoantikörper-Status anhand der Daten genetischer Studien überprüft werden. Eine weitere Methode, um das Risiko genauer zu bestimmen, könnte die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen den bereits bekannten Hoch-Risiko Genotypen und ZnT8 sein. In der schwedischen Better Diabetes Diagnosis Studie waren Autoantikörper gegen alle 3 Varianten von ZnT8 assoziiert mit den Genotypen HLA DQ6,4 und DQ8, wobei ZnT8WA und ZnT8QA negativ assoziiert waren mit HLA DQ2 (Andersson 2013). Aus Belgien liegen Ergebnisse vor, die zeigen, dass unter ZnT8A- und IA-2A-positiven Patienten mit dem HLA DQ2- und/oder HLA DQ8-Genotyp diejenigen durch das zusätzlich zu HLA A*24 (Mbunwe 2013 Diabetes) vorliegende HLA-Klasse-I-Allel HLA B*18 identifiziert werden, die rasch zu Diabetes voranschreiten (Mbunwe 2013 Diabetologia). Andere Ergebnisse zeigen, dass zwischen den klassischen HLA-Regionen sowie den typischen mit Typ 1 Diabetes verknüpften Regionen und ZnT8A keine Assoziationen bestehen. Beziehungen konnten nach Auswertung einer genomweiten Analyse nur für FCRL3 und die HLA-Klasse-I-Region nachgewiesen werden, wobei diese das Risiko für Typ 1 Diabetes nicht erhöhten (Howson 2012).

8. Zusammenfassung

Die präklinische Phase des Typ 1 Diabetes, die der Manifestation der Erkrankung vorausgeht, wird durch autoimmune Prozesse gelenkt. Besonders wichtig für die Erforschung der Entstehung der Erkrankung sind die Autoantikörper, die spezifisch gegen die Antigene der Beta-Zellen gebildet werden und diese mit zerstören. Zusätzlich zu den bereits bekannten und gut untersuchten Autoantikörpern IAA, GADA und IA-2A wurde ein weiteres Haupt-Zielantigen entdeckt, der Zink-Transporter 8. Bei Patienten mit Typ 1 Diabetes konnte bereits nachgewiesen werden, dass Autoantikörper gegen ZnT8 häufig gebildet werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass vor allem unter Berücksichtigung des Genotyps des SLC30A8-Gens das Risiko an Typ 1 Diabetes zu erkranken stratifiziert werden kann.

Ziel dieser Arbeit war, in einer großen prospektiv von Geburt an verfolgten Kohorte von Kindern, die einen Verwandten ersten Grades mit Typ 1 Diabetes haben, das Auftreten von Autoantikörpern gegen Zink-Transporter 8 zu bestimmen. Weiterhin sollte das Alter des ersten Auftretens von ZnT8 und der Zusammenhang mit dem Erscheinen der bereits bekannten Inselzell-Autoantikörper sowie die Bindung an die polymorphen Varianten von ZnT8 untersucht werden. Mithilfe dieser Parameter und der zusätzlichen Bestimmung des SLC30A8-Genotyps wurde überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen Genotyp und Autoantikörper-Profil besteht und ob dadurch das Risiko, an Diabetes zu erkranken, genauer stratifiziert werden kann.

Alle Proben der vorliegenden Arbeit stammten von 1633 Teilnehmern der prospektiven BABYDIAB-Studie, bei welcher Kinder mit einem Verwandten ersten Grades mit Typ 1 Diabetes teilnahmen. Bei einer medianen Verlaufszeit von 10,8 Jahren wurden in festgelegten Abständen Blutproben neben den bereits bekannten Antikörpern IAA, GADA und IA-2A auch auf ZnT8A untersucht und positive Ergebnisse durch eine zweite Probe bestätigt. Getestet wurde mittels eines etablierten und von Sensitivität und Spezifität aussagekräftigen Radiobindungsassays. Die Genotypisierung von SLC30A8 geschah ebenfalls mittels standardisierter Verfahren.

Bei 58 Kindern der BABYDIAB-Studie wurden persistierende Autoantikörper gegen mindestens eine der polymorphen COOH-terminalen Varianten von ZnT8 nachgewiesen. Sie traten im medianen Alter von 3 Jahren auf. 50 der ZnT8A-COOH-

positiven Kinder hatten multiple Insel-Autoantikörper gebildet und 5 einen einzelnen anderen Autoantikörper. 3 ZnT8A-COOH-positive Kinder wiesen keinen anderen Autoantikörper auf. ZnT8A traten bei 24 Kindern zur selben Zeit wie andere Autoantikörper auf, bei 30 Kindern nach einem anderen Autoantikörper. Bei einem Kind war ZnT8A der erste aufgetretene Autoantikörper. 93,1% der ZnT8A-COOH-positiven Kinder entwickelten ZnT8RA, 79,3% ZnT8WA und 79,3% ZnT8QA, wobei durch ein Screening für ZnT8RA und ZnT8WA alle 58 ZnT8A-COOH-positiven Kinder identifiziert wurden. Die Mehrheit (67%) bildete Autoantikörper gegen alle drei Varianten, 15,5% hatten Autoantikörper gegen nur eine Variante. Insgesamt konnten 6 verschiedene Muster der Reaktivität beobachtet werden.

Die Analyse des SLC30A8 SNP rs13266634-Genotyps zeigte starke Assoziationen mit dem Bindungsmuster der ZnT8-R325W-Variante, die von den Autoantikörpern gebunden wurde. Alle Kinder, die ZnT8RA-positiv und ZnT8WA-negativ waren, hatten mindestens ein C-Allel. Umgekehrt hatten alle Kinder, die ZnT8WA-positiv und ZnT8RA-negativ waren, mindestens ein T-Allel.

59% der ZnT8A-COOH-positiven Kinder, 11% der ZnT8A-COOH-negativen aber für andere Inselzell-Autoantikörper positiv gemessenen Kinder und keines der Insel-Autoantikörper-negativen Kinder entwickelte im Verlauf Diabetes. Das kumulative 5-Jahres-Diabetes-Risiko vom Auftreten von ZnT8A-COOH lag bei 48%. Das zusätzliche Vorhandensein von ZnT8A-COOH stratifizierte bei den Insel-Autoantikörper-positiven Kindern das Risiko, an Diabetes zu erkranken. Auch homozygote Polymorphismen waren bei den ZnT8A-COOH-positiven Kindern mit einer Progression zu Diabetes assoziiert: 77% der ZnT8A-COOH-positiven Kinder mit dem CC- oder dem TT-Genotyp entwickelten Diabetes, im Vergleich zu 18% der ZnT8A-COOH-positiven Kinder mit dem CT-Genotyp. Das 5-Jahres-Diabetes-Risiko bei ZnT8A-COOH-positiven homozygoten Kindern lag bei 59%.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bestimmung der Autoantikörper gegen ZnT8-COOH-R325W zusätzlich zu den bereits bekannten Autoantikörpern bei Personen mit Verwandten mit Typ 1 Diabetes das Risiko, an Diabetes zu erkranken, genauer stratifizieren kann. Wird zudem noch der SLC30A8 SNP rs13266634-Genotyp bestimmt, lassen sich unter den ZnT8A-COOH-positiven Kindern diejenigen mit dem höchsten Diabetes-Risiko identifizieren. Diese Hochrisiko-Kinder können in weiterführende Studien eingeschlossen werden, beispielsweise Präventions- oder

Interventionsstudien, damit Typ 1 Diabetes und die damit verbundenen gesundheitlichen und sozioökonomischen Folgen reduziert werden können.

9. Literaturverzeichnis

1. Achenbach P, Bonifacio E, Koczwara K, Ziegler AG. Natural history of type 1 diabetes. *Diabetes* 54 Suppl 2 (2005): 25-31.
2. Achenbach P, Bonifacio E, Williams AJ, Ziegler AG, Gale EA, Bingley PJ; ENDIT Group. Autoantibodies to IA-2beta improve diabetes risk assessment in high-risk relatives. *Diabetologia* 51 (2008): 488-492.
3. Achenbach P, Hummel M, Thümer L, Boerschmann H, Höfelmann D, Ziegler AG. Characteristics of rapid vs slow progression to type 1 diabetes in multiple islet autoantibody-positive children. *Diabetologia* 56 (2013):1615-1622.
4. Achenbach P, Krause S, Ziegler AG. Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1. *Diabetologie* 5 (2010): R29-R46.
5. Achenbach P, Pan L, Zieger AG. Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1. *Diabetologie* 2 (2007): R25-R39.
6. Achenbach P, Warncke K, Reiter J, Naserke HE, Williams AJK, Bingley PJ, Bonifacio E, Ziegler AG. Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics. *Diabetes* 53 (2004): 384-392.
7. Andersson C, Larsson K, Vaziri-Sani F, Lynch K, Carlsson A, Cedervall E, Jönsson B, Neiderud J, Mansson M, Nilsson A, Lernmark A, Elding Larsson H, Ivarsson SA. The three ZNT8 autoantibody variants together improve the diagnostic sensitivity of childhood and adolescent type 1 diabetes. *Autoimmunity* 44 (2011): 394-405.
8. Andersson C, Vaziri-Sani F, Delli A, Lindblad B, Carlsson A, Forsander G, Ludvigsson J, Marcus C, Samuelsson U, Ivarsson S, Lernmark A, Larsson HE; BDD Study Group. Triple specificity of ZnT8 autoantibodies in relation to HLA and other islet autoantibodies in childhood and adolescent type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 14 (2013): 97-105.
9. Bach JF. Insulin-Dependent Diabetes Mellitus as an Autoimmune Disease. *Endocr Rev* 15 (1994): 516-542.
10. Barker JM, Barriga KJ, Yu L, Miao D, Erlich HA, Norris JM, Eisenbarth GS, Rewers M. Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *J Clin Endocrinol Metab* 89 (2004): 3896-3902.
11. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C, Plagnol V, Pociot F, Schuilenburg H, Smyth DJ, Stevens H, Todd JA, Walker NM, Rich SS; Type 1 Diabetes Genetics Consortium. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet* 41 (2009): 703-707.

12. Bonifacio E, Hummel M, Walter M, Schmid S, Ziegler AG. IDDM1 and multiple family history of type 1 diabetes combine to identify neonates at high risk for type 1 diabetes. *Diabetes Care* 27 (2004): 2695-2700.
13. Brorsson C, Vaziri-Sani F, Bergholdt R, Eising S, Nilsson A, Svensson J, Lernmark A, Pociot F; Danish Study Group of Childhood Diabetes. Correlations between islet autoantibody specificity and the SLC30A8 genotype with HLA-DQB1 and metabolic control in new onset type 1 diabetes. *Autoimmunity* 44 (2011): 107-114.
14. Chausmer AB. Zinc, insulin and diabetes. *J Am Coll Nutr* 17 (1998): 109-115.
15. Chimienti F, Devergnas S, Favier A, Seve M. Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* 53 (2004): 2330-2337.
16. Chimienti F, Devergnas S, Pattou F, Schuit F, Garcia-Cuenca R, Vandewalle B, Kerr-Conte J, Van Lommel L, Grunwald D, Favier A, Seve M. In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. *J Cell Sci* 119 (2006): 4199-4206.
17. Dang M, Rockell J, Wagner R, Wenzlau JM, Yu L, Hutton JC, Gottlieb PA, Davidson HW. Human type 1 diabetes is associated with T cell autoimmunity to zinc transporter 8. *J Immunol* 186 (2011): 6056-6063.
18. De Grijse J, Asanghanwa M, Nouthe B, Albrecher N, Goubert P, Vermeulen I, Van Der Meeren S, Decochez K, Weets I, Keymeulen B, Lampasona V, Wenzlau J, Hutton JC, Pipeleers D, Gorus FK; Belgian Diabetes Registry. Predictive power of screening for antibodies against insulinoma-associated protein 2 beta (IA-2beta) and zinc transporter-8 to select first-degree relatives of type 1 diabetic patients with risk of rapid progression to clinical onset of the disease: implications for prevention trials. *Diabetologia* 53 (2010): 517-524.
19. Delli AJ, Vaziri-Sani F, Lindblad B, Elding-Larsson H, Carlsson A, Forsander G, Ivarsson SA, Ludvigsson J, Kockum I, Marcus C, Samuelsson U, Örtqvist E, Groop L, Bondinas GP, Papadopoulos GK, Lernmark Å; Better Diabetes Diagnosis Study Group. Zinc transporter 8 autoantibodies and their association with SLC30A8 and HLA-DQ genes differ between immigrant and Swedish patients with newly diagnosed type 1 diabetes in the Better Diabetes Diagnosis study. *Diabetes* 61 (2012): 2556-2564.
20. Eehalt S, Blumenstock G, Willasch AM, Hub R, Ranke MB, Neu R for the DIARY-study Group Baden-Württemberg. Continuous rise in incidence of childhood type 1 diabetes in Germany. *Diabet Med* 25 (2008): 755-757.
21. Énée É, Kratzer R, Arnoux JB, Barilleau E, Hamel Y, Marchi C, Beltrand J, Michaud B, Chatenoud L, Robert JJ, van Endert P. ZnT8 is a major CD8+ T cell-recognized autoantigen in pediatric type 1 diabetes. *Diabetes* 61 (2012): 1779-1784.

22. Eisenbarth GS, Jeffrey J. The Natural History of Type 1A Diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab* 52 (2008): 146-155.
23. Gohlke H, Ferrari U, Koczwara K, Bonifacio E, Illig T, Ziegler AG. SLC30A8 (ZnT8) polymorphism is associated with young age at type 1 diabetes onset. *Rev Diabet Stud* 5 (2008): 25-27.
24. Gorus FK, Balti EV, Vermeulen I, Demeester S, Van Dalem A, Costa O, Dorchy H, Tenoutasse S, Mouraux T, De Block C, Gillard P, Decochez K, Wenzlau JM, Hutton JC, Pipeleers DG, Weets I; Belgian Diabetes Registry. Screening for insulinoma antigen 2 and zinc transporter 8 autoantibodies: a cost-effective and age-independent strategy to identify rapid progressors to clinical onset among relatives of type 1 diabetic patients. *Clin Exp Immunol* 171 (2013): 82-90.
25. Gyulkhandanyan AV, Lu H, Lee SC, Bhattacharjee A, Wijesekara N, Fox JE, MacDonald PE, Chimienti F, Dai FF, Wheeler MB. Investigation of transport mechanisms and regulation of intracellular Zn²⁺ in pancreatic alpha-cells. *J Biol Chem* 283 (2008): 10184-10197.
26. Howson JM, Krause S, Stevens H, Smyth DJ, Wenzlau JM, Bonifacio E, Hutton J, Ziegler AG, Todd JA, Achenbach P. Genetic association of zinc transporter 8 (ZnT8) autoantibodies in type 1 diabetes cases. *Diabetologia* 55 (2012): 1978-1984.
27. Hummel M, Bonifacio E, Schmid S, Walter M, Knopff A, Ziegler AG. Brief communication: early appearance of islet autoantibodies predicts childhood type 1 diabetes in offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med* 140 (2004): 882-886.
28. Hummel M, Durinovic-Bello I, Ziegler AG. Relation between cellular and humoral immunity to islet cell antigens in type 1 diabetes. *J Autoimmun* 9 (1996): 427-430.
29. Hummel S, Pflüger M, Hummel M, Bonifacio E, Ziegler AG. Primary dietary intervention study to reduce the risk of islet autoimmunity in children at increased risk for type 1 diabetes: the BABYDIET study. *Diabetes Care* 34 (2011): 1301-1305.
30. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes Care* 23 (2000): 1516-1526.
31. Kawasaki E, Nakamura K, Kuriya G, Satoh T, Kuwahara H, Kobayashi M, Abiru N, Yamasaki H, Eguchi K. Autoantibodies to insulin, insulinoma-associated antigen-2, and zinc transporter 8 improve the prediction of early insulin requirement in adult-onset autoimmune diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 95 (2010): 707-713.

32. Kawasaki E, Tanaka M, Miwa M, Abiru N, Kawakami A. Novel enzyme-linked immunosorbent assay for bivalent ZnT8 autoantibodies. *Aca Diabetol* 51 (2014): 429-434.
33. Kawasaki E, Uga M, Nakamura K, Kuriya G, Satoh T, Fujishima K, Ozaki M, Abiru N, Yamasaki H, Wenzlau JM, Davidson HW, Hutton JC, Eguchi K. Association between anti-ZnT8 autoantibody specificities and SLC30A8 Arg325Trp variant in Japanese patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 51 (2008): 2299-2302.
34. Kimpimäki T, Kulmala P, Savola K, Kupila A, Korhonen S, Simell T, Ilonen J, Simell O, Knip M. 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 (2002): 4572-4579.
35. Kirchhoff K, Machicao F, Hauot A, Schäfer SA, Tschritter O, Staiger H, Stefan N, Häring HU, Fritsche A. Polymorphisms in the TCF7L2, CDKAL1 and SLC30A8 genes are associated with impaired proinsulin conversion. *Diabetologia* 51 (2008): 597-601.
36. Krischer JP, Lynch KF, Schatz DA, Ilonen J, Lernmark A, Hagopian WA, Rewers MJ, She JX, Simell OG, Toppari J, Ziegler AG, Akolkar B, Bonifacio E; TEDDY Study Group. The 6 year incidence of diabetes-associated autoantibodies in genetically at-risk children: the TEDDY study. *Diabetologia* 58 (2015): 980-987.
37. Lampasona V, Petrone A, Tiberti C, Capizzi M, Spoletini M, di Pietro S, Songini M, Bonicchio S, Giorgino F, Bonifacio E, Bosi E, Buzzetti R; Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) Study Group. Zinc transporter 8 antibodies complement GAD and IA-2 antibodies in the identification and characterization of adult-onset autoimmune diabetes: Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) 4. *Diabetes Care* 33 (2010): 104-108.
38. Lampasona V, Schlosser M, Mueller PW, Williams AJ, Wenzlau JM, Hutton JC, Achenbach P. Diabetes antibody standardization program: first proficiency evaluation of assays for autoantibodies to zinc transporter 8. *Clin Chem*. 57 (2011): 1693-1702.
39. Masala S, Paccagnini D, Cossu D, Brezar V, Pacifico A, Ahmed N, Mallone R, Sechi LA. Antibodies recognizing Mycobacterium avium paratuberculosis epitopes cross-react with the beta-cell antigen ZnT8 in Sardinian type 1 diabetic patients. *PLoS One* 6 (2011): e26931.
40. Masala S, Zedda MA, Cossu D, Ripoli C, Palermo M, Sechi LA. Zinc transporter 8 and MAP3865c homologous epitopes are recognized at T1D onset in Sardinian children. *PLoS One* 8 (2013): e63371.

41. Mbunwe E, Van der Auwera BJ, Vermeulen I, Demeester S, Van Dalem A, Balti EV, Van Aken S, Derdelinckx L, Dorchy H, De Schepper J, van Schravendijk C, Wenzlau JM, Hutton JC, Pipeleers D, Weets I, Gorus FK; Belgian Diabetes Registry. HLA-A*24 is an independent predictor of 5-year progression to diabetes in autoantibody-positive first-degree relatives of type 1 diabetic patients. *Diabetes* 62 (2013): 1345-1350.
42. Mbunwe E, Van der Auwera BJ, Weets I, Van Crombrugge P, Crenier L, Coeckelberghs M, Seret N, Decochez K, Vandemeulebroucke E, Gillard P, Keymeulen B, van Schravendijk C, Wenzlau JM, Hutton JC, Pipeleers DG, Gorus FK; Belgian Diabetes Registry. In antibody-positive first-degree relatives of patients with type 1 diabetes, HLA-A*24 and HLA-B*18, but not HLA-B*39, are predictors of impending diabetes with distinct HLA-DQ interactions. *Diabetologia* 56 (2013): 1964-1970.
43. Milton B, Holland P, Whitehead M. The social and economic consequences of childhood-onset type 1 diabetes mellitus across the lifecourse: a systematic review. *Diabet Med* 23 (2006): 821-829.
44. Monti P, Heninger AK, Bonifacio E. Differentiation, expansion, and homeostasis of autoreactive T cells in type 1 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 9 (2009): 113-118.
45. Näntö-Salonen K, Kupila A, Simell S, Siljander H, Salonsaari T, Hekkala A, Korhonen S, Erkkola R, Sipilä JI, Haavisto L, Siltala M, Tuominen J, Hakalax J, Hyöty H, Ilonen J, Veijola R, Simell T, Knip M, Simell O. Nasal insulin to prevent type 1 diabetes in children with HLA genotypes and autoantibodies conferring increased risk of disease: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 372 (2008): 1746-1755.
46. Naserke HE, Ziegler AG, Lampasona V, Bonifacio E. Early development and spreading of autoantibodies to epitopes of IA-2 and their association with progression to type 1 diabetes. *J Immunol* 161 (1998): 6963-6969.
47. Nielsen LB, Vaziri-Sani F, Pörksen S, Andersen ML, Svensson J, Bergholdt R, Pociot F, Hougaard P, de Beaufort C, Castano L, Mortensen HB, Lernmark A, Hansen L; Hvidoere Study Group on Childhood Diabetes. Relationship between ZnT8Ab, the SLC30A8 gene and disease progression in children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Autoimmunity* 44 (2011): 616-623.
48. Nir T, Melton DA, Dor Y. Recovery from diabetes in mice by β cell regeneration. *J Clin Invest* 117 (2007): 2553-2561.
49. Notkins AL, Lan MS, Leslie RD. IA-2 and IA-2beta: the immune response in IDDM. *Diabetes Metab Rev* 14 (1998): 85-93.
50. Ounissi-Benkalha H, Polychronakos C. The molecular genetics of type 1 diabetes: new genes and emerging mechanisms. *Trends Mol Med* 14 (2008): 268-275.

51. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G; EURODIAB Study Group. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet* 373 (2009): 2027-2033.
52. Redondo MJ, Jeffrey J, Fain PR, Eisenbarth GS, Orban T. Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. *N Engl J Med* 26 (2008): 2849-2850.
53. Redondo MJ, Yu L, Hawa M, Mackenzie T, Pyke DA, Eisenbarth GS, Leslie RD. Heterogeneity of type I diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States. *Diabetologia* 44 (2001): 354-362.
54. Rewers M, Bugawan TL, Norris JM, Blair A, Beaty B, Hoffman M, McDuffie RS Jr, Hamman RF, Klingensmith G, Eisenbarth GS, Erlich HA. Newborn screening for HLA markers associated with IDDM: diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). *Diabetologia* 39 (1996): 807-812.
55. Roussel AM, Kerkeni A, Zouari N, Mahjoub S, Matheau JM, Anderson RA. Antioxidant effects of zinc supplementation in Tunisians with type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr* 22 (2003): 316-321.
56. Schenker M, Hummel M, Ferber K, Walter M, Keller E, Albert ED, Janka HU, Kastendiek C, Sorger M, Louwen F, Ziegler AG. Early expression and high prevalence of islet autoantibodies for DR3/4 heterozygous and DR4/4 homozygous offspring of parents with type 1 diabetes: The German BABYDIAB study. *Diabetologia* 42 (1999): 671-677.
57. Schlosser M, Strebelow M, Wassmuth R, Arnold ML, Breunig I, Rjasanowski I, Ziegler B, Ziegler M. The Karlsburg type 1 diabetes risk study of a normal schoolchild population: association of beta-cell autoantibodies and human leukocyte antigen-DQB1 alleles in antibody-positive individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (2002): 2254-2261.
58. Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, Jackson AU, Prokunina-Olsson L, Ding CJ, Swift AJ, Narisu N, Hu T, Pruim R, Xiao R, Li XY, Conneely KN, Riebow NL, Sprau AG, Tong M, White PP, Hetrick KN, Barnhart MW, Bark CW, Goldstein JL, Watkins L, Xiang F, Saramies J, Buchanan TA, Watanabe RM, Valle TT, Kinnunen L, Abecasis GR, Pugh EW, Doheny KF, Bergman RN, Tuomilehto J, Collins FS, Boehnke M. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 316 (2007): 1341-1345.
59. Scotto M, Afonso G, Larger E, Raverdy C, Lemonnier FA, Carel JC, Dubois-Laforgue D, Baz B, Levy D, Gautier JF, Launay O, Bruno G, Boitard C, Sechi LA, Hutton JC, Davidson HW, Mallone R. Zinc transporter (ZnT)8(186-194) is an immunodominant CD8+ T cell epitope in HLA-A2+ type 1 diabetic patients. *Diabetologia* 55 (2012): 2026-2031.

60. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445 (2007): 881-885.
61. Smidt K, Jessen N, Petersen AB, Larsen A, Magnusson N, Jeppesen JB, Stoltenberg M, Culvenor JG, Tsatsanis A, Brock B, Schmitz O, Wogensen L, Bush AI, Rungby J. SLC30A3 responds to glucose- and zinc variations in beta-cells and is critical for insulin production and in vivo glucose-metabolism during beta-cell stress. *PLoS One* 25(2009): e5684.
62. Staiger H, Machicao F, Stefan N, Tschritter O, Thamer C, Kantartzis K, Schäfer SA, Kirchhoff K, Fritsche A, Häring HU. Polymorphisms within novel risk loci for type 2 diabetes determine beta-cell function. *PLoS One* 2 (2007): e832.
63. Stene LC, Oikarinen S, Hyöty H, Barriga KJ, Norris JM, Klingensmith G, Hutton JC, Erlich HA, Eisenbarth GS, Rewers M. Enterovirus infection and progression from islet autoimmunity to type 1 diabetes: the Diabetes and Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Diabetes* 59 (2010): 3174-3180.
64. TEDDY Study Group. The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) study: study design. *Pediatr Diabetes* 8 (2007): 286-298.
65. Tiberti C, Yu L, Lucantoni F, Panimolle F, Spagnuolo I, Lenzi A, Eisenbarth GS, Dotta F. Detection of four diabetes specific autoantibodies in a single radioimmunoassay: an innovative high-throughput approach for autoimmune diabetes screening. *Clin Exp Immunol* 166 (2011): 317-324.
66. Törn C, Müller PW, Schlosser M, Bonifacio E, Bingley PJ. Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. *Diabetologia* 51 (2008): 846-852.
67. Ustinova J, Zusinaite E, Utt M, Metsküla K, Reimand K, Huchaiyah V, Merits A, Uibo R. Development of a luciferase-based system for the detection of ZnT8 autoantibodies. *J Immunol Methods* 405 (2014): 67-73.
68. Vaziri-Sani F, Delli AJ, Elding-Larsson H, Lindblad B, Carlsson A, Forsander G, Ivarsson SA, Ludvigsson J, Marcus C, Lernmark A. A novel triple mix radiobinding assay for the three ZnT8 (ZnT8-RWQ) autoantibody variants in children with newly diagnosed diabetes. *J Immunol Methods* 371 (2011): 25-37.
69. Vaziri-Sani F, Oak S, Radtke J, Lernmark A, Lynch K, Agardh CD, Cilio CM, Lethagen AL, Ortqvist E, Landin-Olsson M, Törn C, Hampe CS. ZnT8 autoantibody titers in type 1 diabetes patients decline rapidly after clinical onset. *Autoimmunity* 43 (2010): 598-606.

70. Vermeulen I, Weets I, Costa O, Asanghanwa M, Verhaeghen K, Decochez K, Ruige J, Casteels K, Wenzlau J, Hutton JC, Pipeleers DG, Gorus FK; Belgian Diabetes Registry. An important minority of prediabetic first-degree relatives of type 1 diabetic patients derives from seroconversion to persistent autoantibody positivity after 10 years of age. *Diabetologia* 55 (2012): 413-420.
71. Walter M, Albert E, Conrad M, Keller E, Hummel M, Ferber K, Barratt BJ, Todd JA, Ziegler AG, Bonifacio E. IDDM2/insulin VNTR modifies risk conferred by IDDM1/HLA for development of type 1 diabetes and associated autoimmunity. *Diabetologia* 46 (2003): 712-720.
72. Wenzlau JM, Frisch LM, Hutton JC, Davidson HW. Mapping of conformational autoantibody epitopes in ZNT8. *Diabetes Metab Res Rev* 27 (2011): 883-886.
73. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, Rewers M, Eisenbarth GS, Jensen J, Davidson HW, Hutton JC. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007): 17040-17045.
74. Wenzlau JM, Liu Y, Yu L, Moua O, Fowler KT, Rangasamy S, Walters J, Eisenbarth GS, Davidson HW, Hutton JC. A common nonsynonymous single nucleotide polymorphism in the SLC30A8 gene determines ZnT8 autoantibody specificity in type 1 diabetes. *Diabetes* 57 (2008): 2693-2697.
75. Wenzlau JM, Walter M, Gardner TJ, Frisch LM, Yu L, Eisenbarth GS, Ziegler AG, Davidson HW, Hutton JC. Kinetics of the post-onset decline in zinc transporter 8 autoantibodies in type 1 diabetic human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 95 (2010): 4712-4719.
76. Yu L, Boulware DC, Beam CA, Hutton JC, Wenzlau JM, Greenbaum CJ, Bingley PJ, Krischer JP, Sosenko JM, Skyler JS, Eisenbarth GS, Mahon JL; Type 1 Diabetes TrialNet Study Group. Zinc transporter-8 autoantibodies improve prediction of type 1 diabetes in relatives positive for the standard biochemical autoantibodies. *Diabetes Care* 35 (2012): 1213-1218.
77. Ziegler AG, Bonifacio E; BABYDIAB-BABYDIET Study Group. Age-related islet autoantibody incidence in offspring of patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 55 (2012): 1937-1943.
78. Ziegler AG, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes* 48 (1999): 460-468.
79. Ziegler AG, Rewers M, Simell O, Simell T, Lempainen J, Steck A, Winkler C, Ilonen J, Veijola R, Knip M, Bonifacio E, Eisenbarth GS. Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. *JAMA* 309 (2013): 2473-2479.

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

Vorveröffentlichungen

Originalarbeiten:

Achenbach P, Lampasona V, Landherr U, Koczwara K, Krause S, Grallert H, Winkler C, Pflüger M, Illig T, Bonifacio E, Ziegler AG. Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLC30A8 genotype stratify type 1 diabetes risk. *Diabetologia* 52 (2009): 1881-1888.

Krause S, Landherr U, Agardh CD, Hausmann S, Link K, Hansen J, Lynch KF, Powell M, Furmaniak J, Rees-Smith B, Bonifacio E, Ziegler AG, Lernmark A, Achenbach P. GAD autoantibody affinity in adult patients with latent autoimmune diabetes, the study participants of a GAD65 vaccination trial. *Diabetes Care* 37 (2014): 1675-1680.

Abstracts:

Achenbach P, Landherr U, Koczwara K, Lampasona V, Krause S, Ziegler AG, Bonifacio E. Autoantibody responses to zinc transporter 8 in children at risk for type 1 diabetes. *Diabetologia* 51 Suppl. 1 (2008): 330.

Landherr U, Lampasona V, Koczwara K, Krause S, Illig T, Bonifacio E, Ziegler AG, Achenbach P. The SLC30A8 gene polymorphism R325W can stratify type 1 diabetes risk among ZnT8 autoantibody positive children. *Diabetologie und Stoffwechsel* 4 Suppl. 1 (2009): 25.

Achenbach P, Lampasona V, Landherr U, Koczwara K, Krause S, Grallert H, Winkler C, Pflüger M, Illig T, Bonifacio E, Ziegler AG. Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLC30A8 genotype stratify type 1 diabetes risk. *Program & Abstracts* (2009): 62.

Krause S, Landherr U, Agardh CD, Hausmann S, Powell M, Furmaniak J, Ziegler AG, Lernmark A, Achenbach P. GAD autoantibody affinity in LADA patients. *Diabetologie und Stoffwechsel* 6 Suppl. 1 (2011): 85.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen meinen Dank aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Univ.-Prof. Dr. A. G. Ziegler danke ich dafür, dass sie mir das Thema zur Verfügung gestellt hat sowie für die hervorragende fachliche und persönliche Unterstützung.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. P. Achenbach, der diese Arbeit betreut hat. Dank seiner fachlichen Kompetenz war es mir möglich, mich mit wissenschaftlichen Arbeitsweisen auseinanderzusetzen. Bei Fragen stand er immer mit Rat und Tat zur Seite und ließ mich an seinen umfangreichen Kenntnissen auf diesem Gebiet teilhaben. Auch für seine persönliche Unterstützung, v.a. bei der Auswertung der Daten und durch Korrekturvorschläge möchte ich mich herzlich bedanken.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Diabetesforschung, die mich v.a. während des experimentellen Teils angeleitet und begleitet haben. Besonders möchte ich Frau S. Krause, Frau U. Mollenhauer und Frau A. Knopff danken, die mich in die Durchführung der Test eingearbeitet haben und bei allen Fragen Hilfsbereitschaft zeigten. Danke auch für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Herrn Dr. V. Lampasona gilt mein Dank für die Überlassung der cDNAs, die für die Messung der Autoantikörper unabdingbar waren.

Als letztes möchte ich meiner Familie und meinem Lebensgefährten sowie allen Freunden danken, die mich durch ihre Geduld und ihr Interesse und nicht zuletzt auch durch ihre Motivation unterstützt haben.

Lebenslauf

| | |
|----------------------|--|
| Name | Ulrike Landherr |
| Geburtstag | 28.03.1984 |
| Geburtsort | Augsburg |
| Staatsangehörigkeit | Deutsch |
| Anschrift | Kornfeldweg 16 87776 Sontheim |
| Schulbildung | 1990-1994 Hans-Adlhoch-Volksschule in Augsburg 1994-2003 Gymnasium Maria Stern in Augsburg |
| weitere Ausbildung | 2003-2009 Studium der Medizin an der Ludwigs- Maximilians-Universität München Praktisches Jahr: 1. Tertial 2008: Pädiatrie am Dr. von Haunerschen Kinderspital der LMU München 2. Tertial 2008/2009: Chirurgie am Klinikum Memmingen 3. Tertial 2009: Innere Medizin an der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Suchtmedizin des Klinikums München-Schwabing Abschluss des Studiums mit dem zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 20.10.2009 (Note „gut“) seit 2008 Doktorandin am Institut für Diabetesforschung |
| Berufliche Tätigkeit | seit 2010: Assistenzärztin in der Facharztausbildung zur Kinder- und Jugendpsychiaterin und -psychotherapeutin an der Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie und - psychotherapie Josefinum in Kempten (Allgäu) |