

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Diabetes und Gestationsdiabetes,
Forscherguppe Diabetes der Technischen Universität München
(Leitung: Univ.-Prof. Dr. A.-G. Ziegler)

**Stratifizierung des Typ 1-Diabetesrisikos auf der Basis von
Inselzell-Autoantikörper-Charakteristika**

Jürgen Thomas Reiter

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

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. A.-G. Ziegler
	2. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 01.06.12 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 08.05.13 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
2	Zielsetzung.....	5
3	Grundlagen des Typ-1-Diabetes.....	6
4	Material und Methoden.....	14
4.1	Untersuchungsgruppen	14
4.2	Methoden	16
4.2.1	Radioimmunoassays	16
4.2.2	Statistik.....	20
5	Ergebnisse	22
5.1	Auftreten von Inselzell-Autoantikörpern,-Subklassen und Epitopspezifitäten in der Kohorte der erstgradig Verwandten	22
5.1.1	Auftreten der Inselzell-Autoantikörper	22
5.1.2	Auftreten der Inselzell-Autoantikörper-Subklassen	23
5.1.3	Auftreten der Inselzell-Autoantikörper-Epitopspezifitäten	28
5.1.4	Zusammenhang zwischen Inselzell-Autoantikörper-Titer und IgG-Subklassen und Epitopreaktivität von Inselzell-Autoantikörpern	31
5.2	Assoziation von Inselzell-Autoantikörper-Charakteristika mit Typ-1-Diabetes-Risiko: univariate Analyse	33
5.2.1	Alter, Verwandtschaftsgrad, Geschlecht und assoziiertes Diabetesrisiko	33
5.2.2	Autoantikörper-Spezifität, -Anzahl und -Kombinationen und assoziiertes Diabetesrisiko.....	33
5.2.3	Autoantikörper-Titer und assoziiertes Diabetesrisiko	35
5.2.4	Autoantikörper-Subklassen und assoziiertes Diabetesrisiko.....	36
5.2.5	Epitopspezifitäten und assoziiertes Diabetesrisiko	39
5.3	Assoziation von Inselzell-Autoantikörper-Charakteristika mit Typ-1-Diabetes-Risiko: multivariate Analyse.....	43
5.4	Modelle zur Stratifizierung des Typ-1-Diabetes-Risikos auf der Grundlage von Inselzell-Autoantikörper-Charakteristika.....	45
6	Diskussion.....	50
7	Zusammenfassung.....	57
8	Abkürzungsverzeichnis	59
9	Literaturverzeichnis	60
10	Vorveröffentlichungen	70
11	Danksagung	71
12	Lebenslauf	72

1 Einleitung

Der Typ 1-Diabetes (T1D) ist eine chronische multifaktoriell bedingte Autoimmunerkrankung, die zur selektiven Zerstörung der insulinproduzierenden Zellen im Pankreas führt und so eine lebenslange Insulintherapie für die betroffenen Patienten notwendig macht (40). Auch bei rascher Diagnose und Therapie können die Folgen der Erkrankung im Lauf der Zeit zu schwerwiegenden Komplikationen führen; als Beispiele seien hier die diabetische Neuropathie, diabetische Retinopathie oder kardiovaskuläre Erkrankungen genannt.

Die Inzidenz des T1D nimmt seit dem Zweiten Weltkrieg in den meisten industrialisierten Ländern zu (42), in Finnland beispielsweise sogar auf das Fünffache (61), so dass die frühzeitige Diagnostik und Therapie von Patienten bzw. Risikopersonen immer mehr an Bedeutung gewinnt. Auffallend war schon in der DiaMond-Studie aus dem Jahr 2000 eine große regionale Spannweite der Inzidenzrate von 0,1/100000 in China und Venezuela bis zu 36,5/100000 in Finnland und 36,8/100000 in Sardinien. In Deutschland lag diese bei ca. 11/100.000 pro Jahr (57). In einer neueren prospektiven Multicenter-Studie wurde im Zeitraum von 2005 bis 2020 sogar eine Verdopplung der Erkrankungen vor dem 5. Lebensjahr sowie ein Anstieg um 70% in der Altersgruppe der 5-15-Jährigen vorhergesagt (88).

Sicherlich spielen bei der multifaktoriellen Genese auf Grund der genetischen Prädispositionen einerseits ethnische Unterschiede eine Rolle, andererseits wurde in Migrationsstudien beschrieben, dass sich die Inzidenz des T1D bei Kindern von Einwanderern aus Staaten mit niedrigem T1D-Risiko dem des Gastlandes annähert (21). Somit bleiben zusätzliche exogene Umwelt-Faktoren als Trigger im Fokus der Forschung. Bislang wurden für keine der diskutierten derartigen Faktoren, weder Ernährung (z.B. Gluten, Kuhmilch oder Stillen) noch verschiedene Virusinfektionen (z.B. Enteroviren oder Röteln) oder Impfungen eindeutige Beweise für deren Beteiligung am autoimmunen Prozess erbracht (54, 83, 84)

Da zum Zeitpunkt der klinischen Krankheitsmanifestation schon bis zu 90% der insulinproduzierenden Zellen zerstört sein können (40), liegt der Augenmerk auf der frühestmöglichen Krankheitsdiagnose bereits in der präklinischen Phase, die der Manifestation jahrelang vorausgehen kann (10). In dieser Phase kann man bereits Autoimmunität durch die Messung von Autoantikörpern im Serum nachweisen, noch bevor Störungen in Glucosetoleranztests auftreten, und dadurch Risikopersonen identifizieren, die als Probanden in Interventionsstudien zur Diabetesprävention eingeschlossen werden können.

Die wichtigsten Autoantikörper gegen Inselzellantigene, die als Marker des Autoimmunprozesses dienen, sind die Autoantikörper gegen Insulin (IAA), die 65-kDa-Isoform des Enzyms Glutamatdecarboxylase (GADA) und das Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP)-homologe Antigen IA-2 (IA-2A) (17). Seit Abschluss der vorliegenden Untersuchung gewannen auch die Autoantikörper gegen den Zinktransporter ZnT8 an Bedeutung (113). Risikogruppen bei Verwandten von Typ 1-Diabetikern können durch das Auftreten dieser Autoantikörper identifiziert werden. Am höchsten ist dabei das Diabetesrisiko für diejenigen Verwandten, die mehr als einen Inselzell-Autoantikörper (16, 64, 73, 110, 116) oder hohe Inselzell-Autoantikörper-Titer (14, 22) haben. Dies impliziert, dass die Intensität der humoralen Antwort das Stadium der Inselzellzerstörung widerspiegelt. Dabei erreicht das Auftreten von Autoantikörpern bei Kindern mit positiver Familienanamnese für T1D einen ersten Gipfel um das 1.-2. Lebensjahr (53, 78) und einen zweiten Gipfel um das Pubertätsalter (94, 117). Es wurde andererseits gezeigt, dass Verwandte mit multiplen Inselzell-Autoantikörpern auch viele Jahre lang diabetesfrei bleiben können (43, 64), so dass für eine genauere Vorhersage des Diabetesrisikos eine genauere Charakterisierung der humoralen Immunantwort hilfreich sein könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die Autoantikörper GADA, IA-2A und IAA als auch deren Titer und zusätzlich Subklassen und Epitopspezifitäten in einer großen prospektiv verfolgten Kohorte erstgradig Verwandter von Typ 1-Diabetikern untersucht, um qualitative und quantitative Unterschiede in der Autoimmunantwort aufzeigen und Risikopersonen identifizieren zu können, die eine höhere Wahrscheinlichkeit einer Progression zur klinischen Manifestation des Typ-1-Diabetes haben.

Die Größe der untersuchten Studienkohorte, der lange Beobachtungszeitraum und die Komplexität der Analyse erlauben detaillierte Aussagen über die humorale Autoimmunität und das assoziierte Diabetesrisiko sowie die Einführung von verschiedenen Modellen zur Stratifizierung des Diabetesrisikos bei erstgradig Verwandten von Typ 1-Diabetikern, einerseits in Hinblick auf bestmögliche Risikodiskrimination, andererseits aber auch in Hinblick auf ökonomische Gesichtspunkte und laborchemische Validität sowie Möglichkeit der Verwendung von etablierten und standardisierten Messparametern.

2 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll die humorale Autoimmunantwort gegenüber den Inselzellantigenen GAD, IA-2 und Insulin bei erstgradig Verwandten von Patienten mit T1D charakterisiert werden. Die Arbeit soll zum besseren Verständnis der Pathogenese des T1D und zur besseren Prädiktion der Erkrankung beitragen sowie durch die Stratifizierung des Diabetesrisikos die Vorauswahl der Probanden für künftige Interventionsstudien erleichtern.

Spezifische Fragestellungen:

- 1) Wie stellen sich die Prävalenzen einzelner Charakteristika (Autoantikörper, Titer, Subklassen, Epitopspezifitäten) und die jeweiligen Kombinationen der Charakteristika dar? Lassen sich dabei Muster erkennen? Gibt es alters-, geschlechts- oder verwandtschaftsgradabhängige Unterschiede hinsichtlich der Autoantikörper-Profile? Besteht eine Beziehung zwischen dem Autoantikörper-Profil und den Titern der einzelnen Charakteristika?
- 2) Gibt es Abhängigkeiten im Auftreten der Charakteristika und dem assoziierten Diabetesrisiko? Welche Charakteristika sind unabhängige Prädiktoren? Führen die Bestimmung der Epitopspezifitäten von GADA und IA-2A sowie die Bestimmung von Antikörper-Subklassen zu einer Verbesserung der Prädiktion des T1D?
- 3) Lassen sich neue oder verbesserte Modelle für die Prädiktion und Stratifizierung des T1D-Risikos erstellen?

3 Grundlagen des Typ-1-Diabetes

Der Typ 1-Diabetes (T1D) ist eine chronische Autoimmunerkrankung, bei der es zu einer progredienten immunvermittelten Zerstörung der insulinproduzierenden Beta-Zellen der Langerhans'schen Inselzellen im Pankreas kommt, was als Folge zu einem Insulinmangel im Organismus führt, so dass eine exogene Insulinzufuhr nötig wird (40). Klinische Leitsymptome wie Polyurie, Polydipsie und Gewichtsabnahme führen in Verbindung mit laborchemischen Methoden wie pathologisch erhöhtem Blutglucosespiegel und Nachweis von Ketonkörpern im Urin bei den betroffenen Patienten meist schon im Kinder- und Jugendalter zur Diagnose, jedoch kann die Erkrankung auch erst in höherem Lebensalter manifest werden (63). Die bisherige Forschung hat gezeigt, dass bereits viele Jahre zuvor ein klinisch inapparenter Erkrankungsverlauf mit histologisch nachweisbarer Zerstörung von bis zu 90% der Beta-Zellen stattfindet (41), welcher durch das Auftreten von Inselzell-Autoantikörpern im peripheren Venen- und Kapillarblut nachweisbar ist (18, 116).

Die Genese des T1D ist multifaktoriell, was bedeutet, dass neben einer genetischen Prädisposition zusätzliche, bisher noch unbekannte, exogene Faktoren am Auftreten einer gestörten Immunregulation beteiligt sind.

Hinweise auf ein erhöhtes genetisches Erkrankungsrisiko konnten in Familien mit an T1D erkrankten Verwandten gezeigt werden. Erstgradig Verwandte haben dabei ein gegenüber der Normalbevölkerung 10fach erhöhtes Risiko, an T1D zu erkranken (36). Bei Geschwistern schwankt dabei das Erkrankungsrisiko in Abhängigkeit vom HLA-Typ zwischen 0,3% und 30% (7, 98). Der HLA-Locus auf Chromosom 6 trägt in etwa zur Hälfte der familiären T1D-Fälle bei (104). Für einige HLA-Genotypen besteht ein sehr hohes Risiko, T1D zu entwickeln (z.B. DRB1*0304/DQB1*0302) (66). Dagegen zeigen andere Allele nur eine geringe Assoziation mit T1D oder wirken gar protektiv (z.B. DQB1*0602) (85). Ein weiterer wichtiger genetischer Suszeptibilitätsfaktor ist das Insulin-Gen auf Chromosom 11 (13), zudem wurden mehr als 50 andere mit T1D assoziierte Genloci entdeckt (12), exemplarisch seien CTLA-4 (107) und PTPN-22 (28, 102) genannt.

Da jedoch eine genetische Prädisposition nicht in jedem Fall zur Entwicklung eines T1D führt, wie sich an der Diabetes-Konkordanz eineiiger Zwillinge von nur ca. 40% zeigt (65, 93), wird vermutet, dass der Ausbruch der Erkrankung zusätzlich auch von exogenen Faktoren beeinflusst wird. Bisher diskutierte Faktoren wie Stillen, Ernährung, virale Infektionen oder Impfungen konnten jedoch bisher nicht bestätigt werden (54, 83, 84). Aktuell hat insbesondere die TEDDY-Studie (The Environmental Determinants of Diabetes

in the Young; www.teddystudy.org) zum Ziel, Umweltfaktoren zu identifizieren, die Inselautoimmunität auslösen bzw. fördern können oder auch vor der Entwicklung eines T1D schützen können.

Als wertvolle Risikomarker und oft sehr früh messbare Indikatoren des zur Entwicklung eines T1D führenden Immunprozesses wurden im Lauf der letzten Jahre Autoantikörper gegen Insulin (IAA) (87), Glutamatdecarboxylase (GAD) (11), die Protein-Tyrosin-Phosphatase(PTP)-homologen Proteine IA-2 (ICA 512) (92) und IA-2 β (Phogrin) (71) identifiziert. Es wurde in zahlreichen Studien eine signifikante Assoziation zwischen Autoantikörper-Positivität und dem Risiko, einen T1D zu entwickeln, gezeigt (16, 112, 116). In neueren Studien gewannen auch die Autoantikörper gegen den Zink-Transporter 8 (ZnT8) an Bedeutung (113). Zahlreiche weitere möglich Zielantigene wurden in bisherigen Studien diskutiert, jedoch nicht als valide Prädiktoren identifiziert (2, 8, 31, 33).

Die bereits 1974 entdeckten cytoplasmatischen Inselzellantikörper ICA sind eine heterogene Gruppe von Antikörpern, die sich gegen verschiedene Bestandteile endokriner Zellen in den pankreatischen Inseln, u.a. auch gegen GAD und IA-2, richten (27). Die Prävalenz von ICA bei Krankheitsmanifestation und in der prädiabetischen Phase beträgt 70-90 % (45, 97), jedoch ist die Bestimmung von ICA aufwändig und stark von der subjektiven Bewertung durch den Untersucher abhängig und wurde deshalb in groß angelegten Screening-Programmen durch die kombinierte Testung von GADA, IA-2A und IAA abgelöst (20).

Im Gegensatz zu gegen Inselantigene gerichteten T-Zellen, die im peripheren Blut derzeit nur mit großer Schwierigkeit zu bestimmen sind (9), können gegen Inselzellantigene gerichtete Autoantikörper im peripheren Blut mit sensitiven und international standardisierten Methoden gemessen werden und eignen sich dadurch für die Diagnostik und Prädiktion des T1D (112).

Es zeigte sich, dass sich die Immunantwort im Verlauf von nur wenigen Inselzellantigenen auf verschiedene weitere ausdehnt, also ein sogenanntes Antigen spreading erfolgt (29).

Antikörper gegen Insulin (IAA)

Autoantikörper gegen körpereigenes Insulin sind die am längsten bekannten und wahrscheinlich am genauesten charakterisierten Inselzell-Autoantikörper. Sie wurden bereits 1983 im Serum von noch nicht mit Insulin behandelten, neu diagnostizierten Personen mit T1D entdeckt (32). IAA sind bei Kleinkindern häufig die ersten detektierbaren Antikörper und deshalb ein wichtiges Instrument zur Diabetes-Früherkennung (108). Die

Höhe der IAA-Titer hat eine inverse Korrelation mit dem Alter der Betroffenen, bei Patienten mit einem Manifestationsalter unter 5 Jahren beträgt die Prävalenz fast 100% (109); bei erstgradig Verwandten von Personen mit T1D liegt sie bei 3-7% (62).

Inzwischen können IAA in Mikroassays mit Serummengen von 20µl sensitiv und spezifisch nachgewiesen werden (79), nachdem früher bis zu 600µl nötig waren, was v.a. die Untersuchungen bei Kleinkindern erschwerte.

Die von den Autoantikörpern erkannten Epitope auf dem Insulin-Molekül sind bislang weniger gut erforscht, scheinen jedoch auf der A-Kette (AS 8-13) und B-Kette (AS 1-3) zu liegen und sich zu unterscheiden von den Insulinantikörpern, die erst auf Zufuhr von exogenem Insulin hin gebildet werden (46).

Antikörper gegen Glutaminsäuredecarboxylase (GADA) und Epitope (Abbildung 1)

GADA gehören zu den weiteren wichtigen Autoantikörpern beim T1D; GAD (Glutaminsäuredecarboxylase) ist ein an der Bildung von Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) beteiligtes Enzym (11). Es wurden zwei GAD-Isoformen identifiziert mit 70%-iger Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz: GAD 65 mit einem Molekulargewicht von 65 kD und einer Länge von 585 Aminosäuren und GAD 67 mit einem Molekulargewicht von 67 kD und einer Länge von 593 AS (58). Etwa 80% der Patienten mit T1D sind zum Zeitpunkt der klinischen Manifestation GADA-positiv. 6-13% der erstgradig Verwandten von Personen mit T1D weisen Antikörper gegen GAD auf (16, 23, 111). Abgesehen vom T1D kommen GAD-Antikörper jedoch auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wie dem Stiffman-Syndrom und dem polyendokrinen Syndrom vor (69, 103, 106).

Es wurden beim T1D verschiedene Epitope auf dem Molekül als primäre Ziele der Immunantwort in der prädiabetischen Phase identifiziert: die mittlere Sequenz (AS 235-442 und AS 96-249) und die c-terminale Domäne von GAD 65 (AS 436-585) (37). Erst zeitlich später gewinnt der n-terminale Bereich (AS 1-100) an Bedeutung (24). Die Reaktivität gegen GAD 67 beruht wohl zum großen Teil auf einer Kreuzreaktivität mit Epitopen, die sowohl GAD 65 als auch GAD 67 aufweisen (44). Jedoch kann Reaktivität gegen GAD 67 auch unabhängig von Reaktivität gegen GAD 65 existieren.

Bisher konnten Untersuchungen der Epitopreaktivität keine Differenzierungsmöglichkeiten zwischen den verschiedenen mit GADA assoziierten Erkrankungen liefern. Es wird jedoch angenommen, dass sich die T1D-assoziierte Autoreaktivität in erster Linie gegen Epitope auf dem GAD 65 Molekül richtet, während hingegen beim polyendokrinen Syndrom und beim

Stiffman-Syndrom häufig beide GAD-Isoformen als Antigene erkannt werden (30, 44). Insgesamt sind GAD-Antikörper im Vergleich zu anderen Diabetes-assoziierten Antikörpern somit zwar sehr sensitive, aber weniger spezifische Marker zur Prädiktion des T1D.

Antikörper gegen IA-2 (IA-2A) und IA-2 β (IA-2 β A) und Epitope (Abbildung 1)

Die Proteine IA-2 (ICA 512) und IA-2 β (Phogrin) gehören zur Familie der Protein-Tyrosinphosphatasen (PTP) und besitzen eine PTPase-ähnliche Domäne (68, 71). IA-2 (mit einem Molekulargewicht von 40 kD) und IA-2 β (mit einem Molekulargewicht von 37 kD) befinden sich als Transmembran-Proteine in sekretorischen Vesikeln neuroendokriner Zellen wie den β -Zellen der Langerhans'schen Inselzellen und bestehen aus jeweils der extrazellulären (Aminosäure 1-576), der transmembranären (AS 577-600) und der zytoplasmatischen Region (AS 601-979); dabei wird die zytoplasmatische Region weiter unterteilt in eine juxtamembranäre Region (AS 601-682) und eine PTP-Domäne (AS 683-979 für IA-2 und 683–1033 für IA-2 β). Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von IA-2 und IA-2 β liegt in den verschiedenen Regionen zwischen 10% und 80%, am geringsten ist sie im extrazellulären Bereich. Bis vor kurzem wurde Antikörper-Reaktivität nur gegen die zytoplasmatischen Anteile von IA-2 und IA-2 β nachgewiesen (59, 67, 86), in einer im Jahr 2010 erschienenen Studie jedoch auch gegen Epitope im extrazellulären Bereich (77). Als primäre Ziele der Autoreaktivität gegen PTP beim T1D dienen wahrscheinlich die Epitope auf dem IA-2 Molekül, im speziellen die Aminosäuresequenz 795-889. Für die Reaktivität gegen die juxtamembranäre (JM-) Domäne von IA-2 sind HLA-Typ-abhängig insbesondere die Sequenzen AS 611-620 (JM 1) und AS 621-630 (JM 2) entscheidend. Antikörper, die IA-2 β erkennen, sind meist gegen gemeinsame Domänen der PTP-Region von IA-2 und IA-2 β gerichtet (kreuzreaktive Antikörper). IA-2 β -selektive Antikörper sind selten und gegen die PTP-Region von IA-2 β gerichtet (25).

Im Gegensatz zu GADA sind IA-2A spezifischer für T1D, da sie kaum bei anderen Autoimmunerkrankungen auftreten (76). Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass sie im Vergleich zu GADA und IAA erst zu einem späteren Zeitpunkt in der prädiabetischen Phase auftreten. Jedoch sind sie mit einer schnelleren Krankheitsprogression assoziiert (34). Bei etwa 60 % der neu entdeckten Patienten können IA-2A nachgewiesen werden, IA-2 β A nur bei 40 % der Typ 1-Diabetiker. 2-4% der erstgradig Verwandten von Personen mit T1D weisen IA-2-Antikörper auf (62, 70, 101).

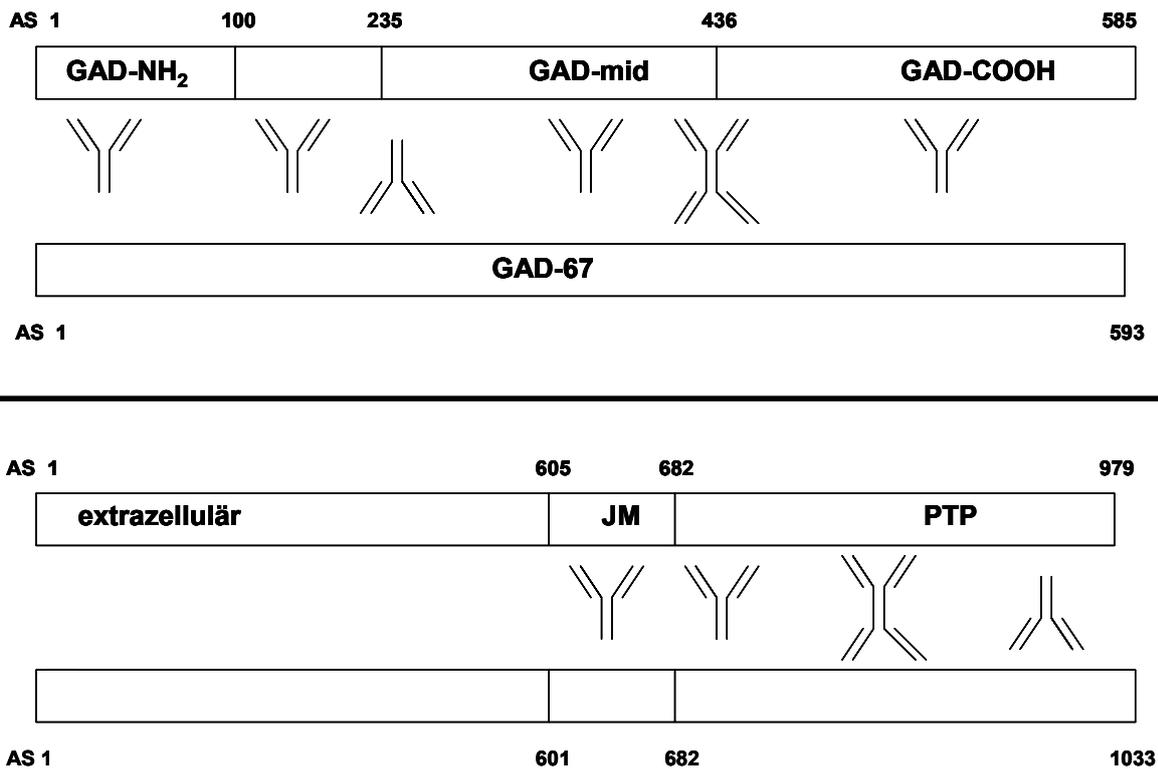


Abbildung 1 Epitopspezifitäten innerhalb der Moleküle GAD 65/67 und IA-2/IA-2β

Autoantikörper-Subklassen beim T1D

Es wird diskutiert, dass das Antikörper-Subklassenprofil mit dem Zytokinsekretionsmuster in Zusammenhang steht und hilfreich sein kann, um Aussagen über TH1- und TH2-Immunantworten treffen zu können (105). Die Bestimmung von Immunglobulin-Subklassen von Autoantikörpern ist laborchemisch praktikabler als eine Messung von Inselantigen-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut, da diese in nur sehr geringer Konzentration nachzuweisen sind und dazu keine vergleichbar standardisierten Assays beschrieben sind (9). An der T-Zell-vermittelten autoimmunen Zerstörung der Inselzellen sind sowohl CD4+-Helferzellen als auch CD8+-zytotoxische T-Zellen beteiligt (3). Dabei gibt es Hinweise aus dem Mausmodell, dass die TH1-dominierte inflammatorische T-Zell-Immunantwort mit Sekretion von IFN γ , TNF α und IL-2 und vermehrter IgG2a und IgG3-Antikörper-Synthese assoziiert ist, die TH2-Antwort hingegen mit IgG1-, IgG2b- und IgE-Antikörpern. Beim Menschen scheint hingegen die IgG1-Antwort mit der TH1-dominierten Immunantwort assoziiert zu sein, während IgG4- und IgE-Antikörper wohl eher mit dem TH2-Zytokinmuster (IL-4 und IL-10) verknüpft sind (55, 56, 72, 82).

Studienergebnisse bei T1D-Risikopersonen zeigen, dass die Immunantwort gegen IA-2 und GAD meist aus IgG1 besteht, was somit für eine zytotoxische, TH1-spezifische Immunantwort spricht (35, 48). Zudem existiert eine Studie von Seissler et al., die eine

protektive Rolle von IgG4-Subklassen zeigte (100). Bezüglich der IAA fanden sich bei Typ 1-Diabetikern ebenso vorwiegend IgG1-Subklassen (26, 90).

Insgesamt ist die Rolle der spezifischen Autoantikörper-Subklassen bezüglich der zellulären Immunantwort gegen Inselzellantigene bis dato nicht im Detail geklärt; ebenso weiß man relativ wenig über deren prädiktiven Wert.

Erfahrungen aus prospektiven Studien

Für das Gebiet der Inselzell-Autoantikörper ICA, GADA, IA-2A und IAA bedeutsam sind unter anderem folgende wichtige Studienkollektive aus den letzten Jahren, an denen Untersuchungen von Autoantikörpern als Screeningparameter für die Prädiktion eines T1D bei Verwandten von Typ 1-Diabetikern durchgeführt wurden; exemplarisch wird jeweils eine wichtige Studie in Klammern genannt. Seren aus den ersten beiden genannten Studienkollektiven wurden für die vorliegende Arbeit untersucht:

- Münchner Familienstudie (Institut für Diabetesforschung in München): seit 1989, erstgradig Antikörper-positive Verwandte von Patienten mit T1D (39)
- die Bart's Oxford Studie (England): seit 1978, Eltern und Geschwister von Personen mit T1D (43)
- die BABYDIAB-Studie (Institut für Diabetesforschung in München): seit 1989, prospektiv, Kinder von Patienten mit T1D (53)
- Gruppe um Eisenbarth (Denver, USA): erstgradig Antikörper-positive Verwandte von Patienten mit T1D (110)
- die DPT-1 (Diabetes Prevention Trial) Studie: erst- und zweitgradig Verwandte von Personen mit T1D (62)
- DiMe-Studie (Finnland): Geschwisterkinder von Personen mit T1D (60)
- Belgian Diabetes Registry: Geschwisterkinder von Personen mit T1D (38)

Aus diesen Studien konnten einige wichtige Erkenntnisse gewonnen werden: IAA zeigten sich häufig bei Kleinkindern als erste Autoantikörper (53, 60). Die Mehrzahl der Kinder, bei denen IAA innerhalb der ersten Lebensjahre im Serum nachweisbar sind, entwickelt in der Folge zusätzliche Autoantikörper (GADA, IA-2A, ICA) und danach gewöhnlich T1D. Das Risiko einer Diabetesentwicklung ist noch höher, wenn Kinder bereits vor dem ersten bzw.

zweiten Lebensjahr multiple Inselautoantikörper entwickeln (53). In der BABYDIAB-Studie wurde die Antikörperaffinität als neuer prädiktiver Marker für Diabetes-relevante IAA (5) und GADA (74) identifiziert; Kinder mit hochaffinen IAA entwickelten multiple Inselzell-Autoantikörper. In der DPT-1-Studie konnte die höchste Sensitivität bzgl. des Risikos, einen T1D zu entwickeln, durch die kombinierte Testung von GADA und ICA erreicht werden. Auch in der Bart's Oxford Studie führten zusätzliche Antikörper neben ICA zu einem signifikant höheren Erkrankungsrisiko als das Vorhandensein von ICA alleine.

Einschränkend ist grundsätzlich anzumerken, dass der familiäre T1D lediglich eine Minderheit der T1D-Erkrankungen darstellt (ca. 10%) und somit die Gültigkeit der Ergebnisse wahrscheinlich nicht uneingeschränkt auf die Allgemeinbevölkerung übertragbar ist, andererseits eine wichtige Rolle für das Verständnis der Pathogenese des immunologischen Prozesses spielt.

Untersuchungen der Epitopspezifitäten von Inselzell-Autoantikörpern zeigten bisher für GADA keine Assoziation mit dem T1D-Risiko. Häufig wurde eine Ausweitung der initialen gegen mittlere und c-terminale Epitope gerichteten Immunantwort hin zu n-terminalen Epitopen beobachtet (24).

Auch IA-2A-positive Kinder zeigen intramolekulares Spreading, ein IA-2A-Epitop-Spreading bei älteren erstgradig Verwandten (80) wurde nur sehr selten beobachtet. Zudem scheint zum einen die Reaktivität gegen die juxtamembranäre Region von IA-2 mit einem signifikant erhöhten Diabetesrisiko assoziiert zu sein (49, 80), zum anderen auch gegen IA-2-PTP (75). Weiter zeigte sich, dass Reaktivität gegen mehr als ein IA-2-Epitop mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko verbunden zu sein scheint (25). Es fanden sich in einer Studie von Miao et al. auch Hinweise darauf, dass der Nachweis eines IA-2-Epitops (AS 761-964) zwischen IA-2A-positiven nichtdiabetischen Personen und (prä-)diabetischen Verwandten unterscheiden kann (75). Jedoch sind Epitope auf dem IA-2-Molekül, die möglicherweise ein hohes Erkrankungsrisiko identifizieren können, noch nicht ausreichend evaluiert.

Die Messung der Autoantikörper-Subklassen in der BAYDIAB-Studie machte deutlich, dass GADA und IA-2A von einer IgG1-Antwort dominiert werden, IAA hingegen von einer Immunantwort auf die Subklassen IgG1 und IgG4 (26). In einer Studie von Seissler et al. korrelierte das Auftreten von gegen IA-2A gerichteten möglicherweise TH-2-assoziierten IgG4-Antikörpern mit einer Diabetes-Protektion (100), in der BABYDIAB-Studie jedoch wiederum nicht. Bei GADA wurde in einem anderen Studienkollektiv von erstgradig Verwandten eine mögliche Protektion bei Auftreten von IgG2 und IgG4 beobachtet (35).

Eine finnische Studie zeigte Hinweise für eine Assoziation von IAA-IgG1 und -IgG3 mit erhöhtem T1D-Risiko und mögliche Protektion bei Nichtauftreten von IgG3 (51).

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass eine genaue Einschätzung des T1D-Risikos und eine exakte Voraussage des Zeitpunktes der Krankheitsmanifestation schwierig bleiben, da es auch Probanden gibt, die trotz nachweisbarer Inselzell-Autoimmunität viele Jahre lang diabetesfrei bleiben. Zudem befinden sich die untersuchten Personen gewöhnlich zum Zeitpunkt des Einschlusses in Screeningprogramme in unterschiedlichen Stadien der Krankheitsprogression.

Daher stellt sich die Frage, ob eine detailliertere Charakterisierung der Autoantikörper einschließlich der Bestimmung von Titern, Subklassen und Epitopspezifitäten eine genauere Vorhersage des T1D ermöglichen könnte. Diese Fragestellung wird hier bearbeitet an Hand eines einzigartigen Studienkollektivs Autoantikörper-positiver Verwandter von Typ 1-Diabetikern aus der Kombination zweier prospektiver Studien mit langer Follow-up-Zeit.

4 Material und Methoden

4.1 Untersuchungsgruppen

Bei den zwei prospektiven Studien, aus deren Kollektiv die Probanden für die vorliegende Arbeit ausgewählt wurden, handelt es sich zum einen um die Münchner Familienstudie und zum anderen um die Bart's Oxford Studie, die beide die Entwicklung von Typ 1-Diabetes (T1D) bei erstgradig Verwandten von Personen mit T1D untersuchen.

Im Rahmen der Münchner Familienstudie, die seit 1989 am Institut für Diabetesforschung München durchgeführt wird, werden bei nicht-diabetischen Verwandten ersten Grades von Personen mit T1D Autoantikörper gegen die Inselzellantigene GAD und IA-2 sowie gegen Insulin untersucht (39). Ähnlich wird bei der Bart's Oxford Studie vorgegangen, bei der seit 1985 die Sere von Eltern und Geschwistern von Patienten mit T1D mit Diabetes-Manifestation vor dem 21. Lebensjahr auf Inselzell-Autoantikörper GADA, IA-2A und IAA untersucht werden (43). Ergebnisse Autoantikörper-positiver Probanden wurden in beiden Studien durch nochmalige Analyse der gleichen Probe überprüft und dann jährliche Folgeblutabnahmen angefordert. Autantikörper-negative Probanden wurden nach mehreren Jahren zu einer erneuten Blutabnahme aufgefordert.

Für die vorliegende Studie wurden nur nichtdiabetische Personen ausgewählt, deren erste positive Serumprobe für mindestens einen Autoantikörper (GADA, IA-2A, IAA) wiederholt positiv getestet worden waren und bei denen eine für alle Tests nach dem Studienprotokoll ausreichende Menge Serum vorhanden war.

Insgesamt wurden 180 Verwandte untersucht: 104 Mitglieder der Münchner Familienstudie und 76 Personen aus der Bart's Oxford Studie. Davon waren wie in Tabelle 1 dargestellt 65 Personen Kinder (38 Söhne, 27 Töchter) diabetischer Familienmitglieder, 68 waren Geschwister (32 Brüder, 36 Schwestern) und 47 Eltern (21 Väter, 26 Mütter).

Zusätzlich hatten 136 Verwandte Inselzell-Autoantikörper in ihrer Serumprobe, waren jedoch entweder negativ in ihren Follow-up-Proben (n=70; keiner entwickelte Diabetes) oder hatten keine Follow-up-Probe (n=66; 13 entwickelten Diabetes) und wurden daher wie oben beschrieben nicht in die Studie eingeschlossen.

Die Nachverfolgungszeit der Personen endete entweder mit deren Diabetes-Manifestation, Einschluss in eine Interventionsstudie oder am Studienendpunkt im März 2003. Zu diesem Zeitpunkt wurde nach einer gegebenenfalls inzwischen eingetretenen Diabetes-Entwicklung gefragt und eine erneute Blutprobe angefordert.

Die mediane Nachverfolgungszeit von der ersten Probe bis zum letzten Kontakt bzw. bis zur Diabetesmanifestation betrug 5,9 Jahre (25.-75. Perzentile: 3,8-10,7 Jahre) mit einer

Gesamtzahl von 1248 Probandenjahren. Das mediane Alter der Personen betrug zum Untersuchungszeitpunkt 14,5 Jahre (8,3 – 30,3 Jahre). Bis zum Studienendpunkt entwickelten 59 (32,8%) Verwandte einen T1D mit einer medianen Dauer von der ersten Probe bis zur Diagnose von 3,6 Jahren (1,3 – 6,1 Jahre). Die Diabetesdiagnose erfolgte gemäß den WHO/ADA-Kriterien (pathologischer oraler Glucose Toleranz Test) (1). Bei Krankheits-Manifestation betrug das mediane Alter 21,5 Jahre (14,1- 35,3 Jahre). Das mediane Alter bei erstem Screening unterschied sich nicht signifikant zwischen den Verwandten, die im Verlauf einen T1D entwickelten (12,5J., interquartile range 8,2-30,4J.), und denen, die während des Follow-ups diabetesfrei blieben (15,1J., interquartile range 8,3-31J.; p=0,42).

Beide Studien wurden von den jeweils zuständigen Ethikkommissionen zugelassen.

Tabelle 1 Charakterisierung des untersuchten Kollektivs

	Gesamt	München	Oxford
Anzahl Verwandter	180	104	76
Anzahl weiblicher / männlicher Verwandter	89 / 91	51 / 53	38 / 38
Kinder / Eltern / Geschw. Von T1D-Patient	65 / 47 / 68	65 / 6 / 33	0 / 41 / 35
Diabetes entwickelt	59	38	21
Follow-up-Zeit* nach dem ersten Screening	5,9 (3,8-10,7)	4,8 (3,0-6,9)	9,2 (5,3-13,0)
Medianes Alter* bei erstem Screening	14,5 (8,3-30,3)	10,8 (6,7-17,5)	28,8 (13,5-40,1)
Medianes Alter* bei T1D-Onset	21,5 (14,1-35,3)	15,3 (10,6-25,3)	33,6 (13,5-40,1)

* In Jahren (25.-75. Perzentile)

4.2 Methoden

Zunächst wurden die Proben der Personen im Radioimmunoassay auf Antikörper gegen GAD, IA-2 und Insulin getestet. Bei positivem Ak-Befund wurden daraufhin die Epitopspezifität der Autoantikörper (GADA, IA-2A) und die Subklassen (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE jeweils für GADA und IA-2A; IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 für IAA) bestimmt. Seren mit sehr hohen Antikörper-Titern wurden mit Puffer titriert, bis ihre Titer innerhalb der Standardkurve lagen, und das Ergebnis mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert. Die Grenzen für Positivität wurden anhand der 99. Perzentile eines Kontrollkollektivs festgelegt und betragen bei den Probanden der Münchener Familienstudie für GADA 8,5 units (25 WHO units/ml), für IA-2A 2,5 units (4 WHO units/ml) und für IAA 1,5 units, bei den Probanden der Bart's Oxford-Studie für GADA 6,5 units, für IA-2A 1,5 units und für IAA 0,8 units. Bei Verwendung dieser Grenzwerte für Positivität hatten die Assays im ersten DASP Proficiency Workshop (15) Sensitivitäten und Spezifitäten von 80% und 94% (GADA), 58% und 100% (IA-2A), und 30% und 98% (IAA) erreicht.

4.2.1 Radioimmunoassays

4.2.1.1 Bestimmung der Autoantikörper gegen GAD und IA-2

Antigenmarkierung durch Einbau von [³⁵S]-Methionin

Autoantikörper gegen GAD65 (GADA) und IA-2 (IA-2A) wurden mit Protein A/G Radioimmunoassays bestimmt. Als Antigene dienten [³⁵S]-Methionin-markiertes, in vitro translatiertes rekombinantes humanes GAD65 und IA-2. Zu diesem Zweck wurde cDNA für GAD im Vektor pEX9 (Dr. A. Lernmark, Karolinska Hospital, Stockholm, Schweden) und cDNA für IA-2 im Vektor pGEM-4Z (Dr. M.R. Christie, King's College, London, UK) kloniert. Die Antigene wurden jeweils mit Hilfe des „TNT SP6 Coupled Reticulocyte Lysate Kits“ (Promega) in vitro transkribiert und translatiert; dies erfolgte in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin (Amersham Pharmacia) zur radioaktiven Markierung. Es wurden 2 µl DNA in den Reaktionsmix eingesetzt und das Gemisch für 2 Stunden bei 30°C im Wärmeblock inkubiert. Danach wurde die Probe in 100 µl TBST-Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Tween 20, pH 7,4) aufgenommen und nicht eingebautes [³⁵S]-Methionin auf Gelchromatographiesäulen (Amersham) abgetrennt. 2 µl des Antigenproteins wurden in 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Microscint, Packard) pipettiert und die eingebaute Radioaktivität mit einem Betazähler gemessen. Das erhaltene markierte Antigen wurde abschließend portioniert und bei -20°C gelagert.

Assay zur Detektion der Autoantikörper gegen GADA und IA-2A

Je 2 µl Patientenserum wurden jeweils im Doppelansatz in Deep-well-Platten (Polystyrol, 96 wells, Beckman Coulter) pipettiert, Aliquots mit ca. 20 000 cpm des jeweiligen Antigens in 25 µl TBST-Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Tween 20, pH 7,4) zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden zur Isolierung der Immunpräzipitate 1,5 mg Protein-A-Sepharose in 50 µl TBST-Puffer zu den Proben pipettiert und anschließend der Ansatz für eine Stunde bei 4°C auf einem Orbital-Mixer gerüttelt. Danach wurden die Sepharose-Antigen-Antikörper-Komplexe in den Platten fünf Mal mit eiskaltem TBST-Puffer gewaschen. Dazu wurde 800 µl eiskalter TBST-Puffer mit einem Mehrkanalspender zugegeben, die Platten fünf Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit einem Mehrkanalaufsatz bis auf 100 µl abgesaugt. Nach dem Waschen wurden die Pellets im verbleibenden TBST resuspendiert und in Meßplatten (Optiplate-96, Packard) überführt. Jeder Probe wurden 150 µl Szintillationsflüssigkeit (Microscint 40; Packard) hinzugefügt, die Platten mit Folie versiegelt und mit Alufolie gegen Lichteinfall geschützt und daraufhin für 30 Minuten bei Raumtemperatur erneut auf einem Rüttler gerüttelt. Abschließend erfolgte dann die Messung der cpm in einem Szintillationscounter (Top Counter; Packard). In jedem Assay wurde zusätzlich die aufsteigende Verdünnungsreihe einer Positivkontrolle gemessen. Anhand einer Standardkurve wurden so den gemessenen Proben dann units zugeordnet.

4.2.1.2 Bestimmung der Autoantikörper gegen Insulin

Autoantikörper gegen Insulin (IAA) wurden unter Verwendung von 125-I-markiertem Insulin bestimmt. Alle Schritte des Assays wurden mit eiskaltem TBT-Puffer (50 mM Tris, 1% Tween 20, pH 8) durchgeführt. Dazu wurde 5 µl Serum in einem Gesamtvolumen von 55 µl mit 22000 cpm A14-125-I –markiertem humanem Insulin mit bzw. ohne nicht-markiertes Insulin (8 units/ml) in Rundbodenröhrchen angesetzt und für 72 h bei 4°C inkubiert. Um die Antigen-Antikörper-Komplexe zu präzipitieren wurde dann vorgequollene 10%iger Protein A- und 5%ige Protein G-Sepharose in 50 µl TBT zugegeben und das Gemisch für eine Stunden bei 4°C auf einem Rüttler inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit jeweils 1,5 ml Puffer wurde die Radioaktivität des Sepharose-Pellets in einem Gamma-Zähler neun Minuten lang gemessen. Die Differenzen zwischen uninhibiertem und mit nicht-markiertem Insulin (8 U/ml) inhibiertem Messwert wurden mit den aktuellen Messwerten einer geometrischen Standardkurve (1:2, 9 Verdünnungen einer Positivkontrolle) ins Verhältnis gesetzt. Der Wert der Proben, für die sich ein negatives delta cpm ergab, wurde als 0 units definiert.

4.2.1.3. Bestimmung der Epitopspezifitäten

Bestimmung der Epitopspezifität von GADA

Folgende GAD65/67-chimäre Konstrukte wurden für die Bestimmung von Autoantikörpern gegen Epitope von GAD verwendet (20): GAD₆₅₁₋₉₅/GAD67₁₀₂₋₅₉₃ (n-terminale GAD65-Epitope, GAD-NH2), GAD67₁₋₁₀₁/GAD65₉₆₋₄₄₄/GAD67₄₅₃₋₅₉₃ (mittlere GAD65-Epitope, GAD-MID), GAD67₁₋₄₅₂/GAD65₄₄₅₋₅₈₅ (c-terminale GAD65 Epitope; GAD-COOH) und GAD67 (AS 1-593). Der Radioimmunoassay wurde folgendermaßen durchgeführt: Für die Messung der GADA-Epitopspezifitäten wurde gereinigte Plasmid-DNA der GAD-Konstrukte durch Quantum Prep Spin Column Präparation (Bio-Rad, Hercules, CA) hergestellt, in vitro unter Verwendung des „TnT SP6 Coupled Retikuloocyte Lysate Kits“ in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin (Amersham International, UK) transkribiert und translatiert, und im Radioimmunoassay verwendet. Der Radioimmunoassay zur Detektion der Antikörper gegen Epitope von GAD wurde analog dem bereits beschriebenen Assay zur Analyse der Immunantwort gegen GAD und IA-2 durchgeführt. Antikörper-Reaktivität gegen folgende Epitopspezifitäten von GAD wurde gemäß Bonifacio et al. untersucht (24): den mittleren Teil (GAD65-MID; AS 240-440), den n-terminalen Teil (GAD65-NH2; AS 1-95), den c-terminalen Teil (GAD65-COOH; AS 440-585) sowie gegen GAD67. Die Ergebnisse wurden als units anhand einer Standardkurve ermittelt. Diese bestand aus einer Verdünnungsreihe aus der Probe eines Patienten mit sehr hohen Autoantikörper-Titern bei Stiffman-Syndrom (verdünnt mit Autoantikörper-negativem Serum), die in jedem Assay mitgemessen wurde. Der obere Wert von 50 Kontrollseren wurde als Grenze für Positivität für jedes Konstrukt verwendet (GAD-NH2: 10 units; GAD-MID: 15 units; GAD-COOH: 8 units; GAD-67: 12 units).

Bestimmung der Epitopspezifität von IA-2A

Für die Bestimmung der IA-2A-Epitopspezifitäten wurden folgende chimäre Konstrukte verwendet (25): Das IA-2₆₀₅₋₉₇₉-Konstrukt (IA-2ic) zur Bestimmung von IA-2-Autoantikörpern, das IA-2₆₀₅₋₆₈₂/IA-2 β ₇₄₁₋₁₀₃₃-Konstrukt (IA-2-JM) zur Identifikation von Antikörpern, die mit der juxtamembranären Region (JM) von IA-2 reagieren, das IA-2₆₈₇₋₉₇₉-Konstrukt (IA-2-PTP) zur Bestimmung von Antikörpern gegen die PTP-Region von IA-2 und das IA-2 β ₇₄₁₋₁₀₃₃ (IA-2 β -PTP)-Konstrukt zur Bestimmung von Antikörpern gegen die PTP-Region von IA-2 β . Diese Konstrukte wurden in den pSP64 polyA (IA-2ic) oder pGEM-T (IA-2-JM, IA-2-PTP, IA-2 β -PTP) Klonierungsvektoren (Promega) unter Kontrolle des SP6 Promoters hergestellt. IA-2₆₈₇₋₉₇₉, IA-2 β ₇₄₁₋₁₀₃₃ und IA-2₆₀₅₋₆₈₂ wurden außerdem in den pTRC-His bakteriellen Expressionsvektor (Invitrogen, San Diego, CAL) kloniert und für Konkurrenzexperimente verwendet.

Auch der Radioimmunoassay zur Bestimmung der Epitopspezifität von Antikörpern gegen IA-2 wurde analog zu dem bereits beschriebenen Assay zur Analyse der Immunantwort gegen GAD und IA-2 durchgeführt. Die obere Perzentile von 80 Kontrollseren wurde für jedes Konstrukt als Grenzwert für Positivität verwendet (11 units für JM und jeweils 3 units für IA-2-PTP und IA-2 β -PTP). Spezifisch gegen die PTP-Regionen von IA-2 und IA-2 β gerichtete Antikörper sowie kreuzreagierende Antikörper gegen die PTP-Domänen von IA-2 und IA-2 β wurden in Wettbewerbsversuchen mit unmarkierten Konstrukten im Radioimmunoassay identifiziert. Für die Konkurrenz wurden die Seren der Probanden vor Zugabe des radioaktiv-markierten Antigens und Durchführung des Assays eine Stunde lang bei 4°C mit 10 μ g rekombinantem Protein oder mit Kontrollpuffer präinkubiert. Anhand der kombinierten Ergebnisse aus direkten Bindungs- und Wettbewerbsversuchen wurden Reaktionen der Antikörper gegen folgende vier Epitopspezifitäten bestimmt: die juxtamembranäre Region von IA-2 (IA-2-JM); die PTP-Region von IA-2 (IA-2-PTP) ohne gleichzeitige Reaktion der Antikörper gegen die PTP-Domäne von IA-2 β ; die PTP-Region von IA-2 β (IA-2 β -PTP) ohne gleichzeitige Reaktion der Antikörper gegen die PTP-Domäne von IA-2 und kreuzreagierende Antikörper (X-react) gegen die gleichzeitig in der PTP-Region von IA-2 und IA-2 β vorkommenden Epitope.

Der Nachweis von JM-Spezifität in einem Serum wurde als positiv festgelegt, wenn die direkte Bindung einen Wert > 11 units ergab und diese Bindung durch Inhibition mit rekombinantem IA-2₆₀₅₋₆₈₂ einen Wert von < 11 units hatte. Positivität für die IA-2-PTP-Spezifität wurde definiert, wenn nur die Bindung an IA-2-PTP und nicht an IA-2 β -PTP gemessen wurde oder wenn die Bindung an IA-2-PTP auch bei Inhibition mit unmarkiertem IA-2 β -PTP einen Wert > 3 units behielt. IA-2 β -Spezifität wurde als positiv beurteilt, wenn nur Bindung an IA-2 β -PTP und nicht an IA-2-PTP gemessen wurde oder wenn die Bindung an IA-2 β -PTP auch bei Inhibition mit unmarkiertem IA-2-PTP einen Wert > 3 units behielt. IA-2-PTP/IA-2 β -PTP Kreuzreaktivität wurde dann als nachgewiesen festgelegt, wenn die Bindung an radioaktives IA-2-PTP zumindest teilweise (>10 % im Vergleich mit Kontrollpuffer) durch unmarkiertes rekombinantes IA-2 β -PTP inhibiert wurde und zugleich die Bindung an radioaktives IA-2 β -PTP zumindest teilweise (>10%) durch unmarkiertes rekombinantes IA-2-PTP inhibiert werden konnte.

4.2.1.4. Analyse der Subklassen der Antikörper

Die Subklassen von IAA, GADA und IA-2A wurden unter Verwendung von folgenden Subklassen-spezifischen biotinylierten, monoklonalen anti-humanen Antikörpern der Maus (PharMingen, San Diego, CA) bestimmt: Mouse-anti-human IgG1 (clone G17-1), -IgG2 (clone G18-21), -IgG3 (clone G18-3), -IgG4 (clone JDC-14), -IgA1/IgA2 (clone G20-359), -IgM (clone G20-127), -IgE (clone G7-26), sowie Mouse-anti-rat IgM (clone G53-238). Die

Antikörper wurden an Sepharose 4B Streptavidin Beads (Zymed, San Francisco, CA) gebunden (26).

Zur Messung der IgG Subklassen von IAA wurden 5 µl Serum mit 1159 nU ¹²⁵I-markiertem Insulin (Aventis, Frankfurt, Deutschland; spezifische Aktivität 360 µCi/µg) in 25 µl 50 mM Tris und 1% Tween 20 (TBT Puffer) bei 4°C für 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurden je 50µl einer Suspension aus an Sepharosebeads gekoppelten Antikörpern zugegeben, eine Stunde bei 4°C rüttelnd inkubiert, 5 mal mit eiskaltem TBT-Puffer gewaschen und dann für 10 Minuten im Gammazähler Cobra 2 (Canberra-Packard) gemessen. Unspezifische Bindung wurde für jedes Serum unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen rat-IgM bestimmt. Die Ergebnisse wurden als nU gebundenes Insulin/ml Serum wie folgt berechnet: [(IgG-subklassen-spezifische cpm – anti-rat IgM-spezifische cpm)/(totale cpm pro Röhrchen)] x 1159 x 200. Der Grenzwert für Positivität lag für alle Subklassen bei 150nU/ml.

Zur Bestimmung der Subklassen von GADA und IA-2A wurden zunächst 2 µl Serum mit 25000 cpm [³⁵S]-Methionin-markiertem in vitro transkribiertem und translatiertem Antigen in 25 µl TBST-Puffer (50 mM TRIS, 150 mM NaCl; 1% Tween 20; pH 7,4) über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden 50µl an Sepharosebeads gekoppelte Antikörper zugegeben, eine Stunde lang bei 4°C rüttelnd inkubiert, 5 mal mit eiskaltem TBST-Puffer gewaschen und anschließend im TopCount Mikroplatten-Zähler (Canberra-Packard) gemessen. Die Meßergebnisse wurden als delta cpm (IgG- oder isotypen-spezifische cpm minus anti-rat IgM cpm) ausgedrückt und in einen folgendermaßen berechneten standard deviation score (SDS) konvertiert: [(IgG-subklassen oder isotypen-spezifische delta cpm minus subklassen-spezifischer Mittelwert-cpm der Kontrollen) / subklassenspezifische Standardabweichung der Kontrollen]. Die Detektionsgrenze für alle Subklassen und Isotypen lag bei 3 SDS-Einheiten und wurde von keiner der Kontrollpersonen erreicht.

4.2.2. Statistik

Die Prävalenzen der Autoantikörper-Charakteristika und ihre Assoziationen mit Titern wurden mit dem χ^2 - Test oder Fisher's Exact Test verglichen. Die Einteilung in Titer-Kategorien erfolgte dabei für die Antikörper in Abhängigkeit vom Grenzwert der Positivität für jeden Assay (Kat.1: 3-facher cut-off, Kat. 2: 3- bis 10-facher cut-off, Kat. 3: 10- bis 100-facher cut-off und Kat.4: über 100-facher cut-off). Das kumulative Risiko für die Entwicklung von T1D wurde für alle Antikörper-Charakteristika mit Life-Table-Analysen bestimmt. Konfidenzintervalle (95% CI) für das kumulative Risiko wurden aus der Standardabweichung berechnet. Unterschiede im kumulativen Risiko, T1D zu entwickeln,

wurden mit dem Wilcoxon (Gehan) Test bestimmt. Wurden mehr als zwei Gruppen verglichen, wurde der p-Wert mit der Anzahl der durchgeführten Vergleiche multipliziert (Bonferroni-Korrektur).

Time-to-event-Methoden (Life-table-Analyse und proportionales Hazard-Modell nach Cox) wurden benutzt, um das T1D-Erkrankungsrisiko für Teilnehmer mit unterschiedlichen Kategorien der Kovariaten zu vergleichen. Mit Hilfe des proportionalen Hazard-Modells nach Cox wurden die in der univariaten Analyse als signifikant identifizierten Parameter in eine multivariate Analyse eingeschlossen, um den unabhängigen Beitrag der Parameter zum T1D-Risiko bestimmen zu können. Die relativen Risiken wurden durch Einschluss der untersuchten Kovariate in das Modell und die Interaktion zwischen Zeitverlauf und der untersuchten Kovariate getestet. Um das beste Modell zu erhalten, wurde der signifikanteste Parameter zuerst ins Modell eingegeben und nachfolgend die übrigen Marker. Alternativ konnten auch Parameter, die weniger signifikant waren, aber aus praktischen Gesichtspunkten von großer Bedeutung waren, im Modell an erste Stelle gesetzt werden, um sicherzustellen, dass sie nicht vom Modell ignoriert werden konnten. Das Modell endete, wenn alle verbleibenden Marker nach Eingabe ins Modell nicht mehr signifikant waren.

Bei Verwandten, die einen Typ-1-Diabetes entwickelten, wurde die Zeit zwischen erster Autoantikörper-positiver Probe und Diabetesdiagnose als time-to-event definiert. Die Follow-up-Zeit bei diabetesfreien Verwandten lief bis zum Zeitpunkt des letzten Kontakts oder Zeitpunkt des Einschlusses in eine Interventionsstudie. Mit dem Log-rank-Test wurde die Signifikanz in den verschiedenen Gruppen getestet.

Für alle Analysen wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ als signifikant betrachtet.

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

5 Ergebnisse

5.1 Auftreten von Inselzell-Autoantikörpern,-Subklassen und Epitopspezifitäten in der Kohorte der erstgradig Verwandten

5.1.1 Auftreten der Inselzell-Autoantikörper

In den durchgeführten Messungen waren GAD-Autoantikörper insgesamt bei 149 (82,8%) der 180 in die Studie eingeschlossenen erstgradig Verwandten von Typ 1-Diabetikern positiv, IA-2A bei 62 (34,4%) und IAA bei 72 (40,0%) Verwandten.

Allein auftretende Autoantikörper (ohne Nachweis der jeweils anderen beiden) wurden bei 100 Probanden (55,6%) detektiert, im einzelnen waren das allein auftretende GAD-Autoantikörper bei 72 Probanden (40,0%), alleinige IA-2A bei 9 (5,0%) und alleinige IAA bei 19 (10,6%) Probanden.

Eine Kombination aus zwei vorhandenen Inselzell-Autoantikörpern (ohne Nachweis des jeweils dritten) trat insgesamt bei 57 Probanden (31,7%) auf, nämlich die Kombination aus GADA und IA-2A bei 27 (15,0%), die Kombination aus GADA und IAA ebenfalls bei 27 (15,0%) und die Kombination aus IAA und IA-2A bei 3 (1,7%) Probanden.

Alle drei Inselzell-Autoantikörper gleichzeitig wurden bei 23 Probanden (12,8%) nachgewiesen (Tabelle 2).

Die Frequenz von IAA war signifikant niedriger bei GADA-Positiven (34%) als bei GADA-Negativen (71%; $p < 0,0001$). Für das gleichzeitige Auftreten von IA-2A mit einem der beiden anderen Antikörper fand sich keine signifikante Assoziation.

Tabelle 2 Kombinationen der Inselzell-Autoantikörper

(n=180)			Inselzell-Antikörper	Frequenz
GADA	Kombination IA-2A	IAA	Anzahl	
+	-	-	72	40,0%
-	+	-	9	5,0%
-	-	+	19	10,6%
+	+	-	27	15,0%
+	-	+	27	15,0%
-	+	+	3	1,7%
+	+	+	23	12,8%

Bezogen auf das Alter der Verwandten wird in Abbildung 2 gezeigt, dass IAA bei unter 4jährigen in 80% der Fälle und dann mit zunehmendem Lebensalter weniger häufig auftraten, GADA in etwa gleich häufig (80-90%) in allen Altersgruppen und IA-2A initial nur bei einem Probanden (10%) aus der jüngsten Altersgruppe auftrat, dann in mittlerem Lebensalter zunahm und schließlich bei Älteren wieder auf 20% abnahm.

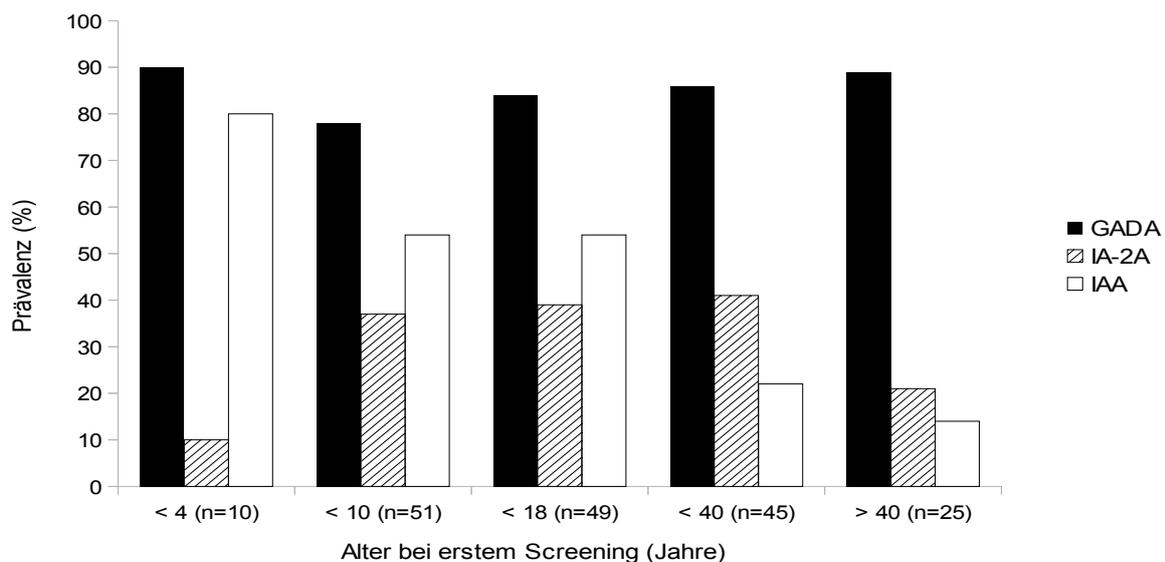


Abbildung 2 Prävalenz der Autoantikörper in Abhängigkeit vom Alter

5.1.2 Auftreten der Inselzell-Autoantikörper-Subklassen

Wie beschrieben wurden dann die Antikörper-Subklassen in den Seren der 149 GADA-, 62 IA-2A- und 72 IAA-positiven Verwandten bestimmt (Tabelle 3).

Prävalenzen der Inselzell-Autoantikörper-Subklassen

IgG1 war die am häufigsten positive Subklasse für jeden der drei gemessenen Autoantikörper mit einer Prävalenz von 63,9-96,6%. IAA-IgG1 (64%) trat dabei signifikant weniger häufig auf als GADA-IgG1 (97%) oder IA-2A-IgG1 (94%) (jeweils $p < 0,0005$). Dann folgten jeweils bei den verschiedenen Antikörpern die IgG2- und IgG4-Subklassen mit Prävalenzen von 23,6% bis 40,3% bzw. 26,4% bis 40,3%. IgG2 war häufiger bei IA-2A nachzuweisen (40%) im Vergleich zu GADA oder IAA (jeweils 24%; $p < 0,05$). Die Prävalenz von IgG3 war bei GADA und IA-2A selten (2,0 bzw. 4,8%), bei IAA jedoch ähnlich der von

IgG2 und IgG4 (31,9%; $p < 0,0001$ vs. GADA oder IA-2A). IgA- und IgM-Autoantikörper wurden für GADA und IA-2A in 16,1% und 16,8% bzw. 14,5% und 11,3% der Proben detektiert, wohingegen IgE-Autoantikörper selten (<2%) waren. Für IAA erfolgte nur die Messung der IgG-Subklassen.

Tabelle 3 Ig-Subklassenspezifitäten von GADA, IA-2A und IAA in den Seren der 180 Probanden (n.d.: nicht durchgeführt)

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE	IgM
GADA (n = 149)	144 (96.6%)	36 (24.2%)	3 (2.0%)	50 (33.6%)	24 (16.1%)	2 (1.3%)	25 (16.8%)
IA-2A (n = 62)	58 (93.5%)	25 (40.3%)	3 (4.8%)	25 (40.3%)	9 (14.5%)	1 (1.6%)	7 (11.3%)
IAA (n = 72)	46 (63.9%)	17 (23.6%)	23 (31.9%)	19 (26.4%)	n.d.	n.d.	n.d.

Titerhöhe der Inselzell-Autoantikörper-Subklassen

Die Titerhöhe der IgG-Subklassen ist in Abbildung 3 grafisch für sämtliche Personen aus dem untersuchten Kollektiv dargestellt, die gestrichelten Linien zeigen jeweils den Grenzwert für Positivität. Bei GADA und IA-2A waren die Titer am höchsten für IgG1 und am niedrigsten für IgG3, bei den IAA zeigten sich geringere Unterschiede zwischen den IgG-Subklassen.

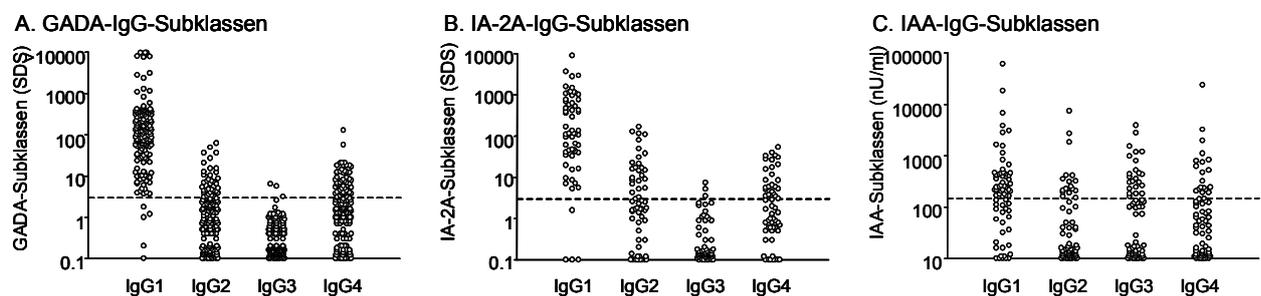


Abbildung 3 Autoantikörper-Subklassen bei 180 Autoantikörper-positiven erstgradig Verwandten von Patienten mit Typ-1-Diabetes.

Kombinationen im Auftreten der Inselzell-Autoantikörper-Subklassen

Eine allein auftretende IgG-Subklasse in der ersten Serumprobe (ohne gleichzeitigen Nachweis einer der jeweils drei anderen IgG-Subklassen) wurde zusammengefasst bei 80 der 149 GADA-positiven (53,7%; Tabelle 4), 29 der 62 IA-2A-positiven (46,8%; Tabelle 5) und 30 der 72 IAA-positiven (41,7%; Tabelle 6) Probanden festgestellt.

Diese war bei GADA in 79 von 80 Fällen (98,8%) die IgG1-Subklasse und einmal (1,3%) IgG2, bei IA-2A immer (100%) IgG1; bei Insulin-Autoantikörpern dagegen in 19 von 30 Fällen (63,3%) IgG1, zweimal IgG2 (6,7%), bei fünf Personen (16,7%) IgG3 und in 4 Fällen (13,3%) IgG4.

Bei GADA traten in 69 der 79 Fälle des alleinigen Auftretens von IgG1 (ohne weitere IgG-Subklassen) auch keine IgA-, IgE- und IgM-Subklassen auf, in 5 der 79 Fälle zusätzlich IgA, in 3 der 79 Fälle zusätzlich IgM, in einem der 79 Fälle zusätzlich IgE und in einem der 79 Fälle (6,3%) zusätzlich IgA und IgM. Bei dem einen Probanden mit alleinigem Auftreten von IgG2 traten keine IgA, IgE- und IgM-Subklassen auf.

Bei IA-2A traten in 27 der 29 Fälle des alleinigen Auftretens von IgG1 auch keine IgA-, IgE- und IgM-Subklassen auf, in 2 der 29 Fälle zusätzlich IgA.

Für IAA erfolgte keine Messung der IgA-, IgE- und IgM-Subklassen.

Mehr als eine IgG-Subklasse konnten bei 65 der 149 GADA-positiven (43,6%; Tabelle 4), 29 der 62 IA-2A-positiven (46,8%; Tabelle 5) und 28 der 72 IAA-positiven (37,5%; Tabelle 6) Personen in ihrer Serumprobe nachgewiesen werden.

IgG1 war somit die dominante Subklasse für jeden der drei Antikörper. Nur eine GADA-positive Person (IgG2) und eine IA-2A-positive Person (IgA) wiesen Subklassen auf, ohne IgG1 zu exprimieren. Dagegen traten bei der Immunantwort gegen Insulin Subklassen anderer Spezifitäten auch ohne IgG1 auf: 12 Verwandte wiesen subklassen-spezifische Antikörper ohne IgG1 auf (zwei Personen IgG2, fünf IgG3, vier IgG4, eine IgG2 und IgG3 gleichzeitig).

Bei 4 der 149 GADA-positiven Verwandten (2,7%), bei 3 der 62 IA-2A-positiven Verwandten (4,8%) und bei 14 der 72 IAA-positiven Verwandten (19,4%) konnten weder IgG- noch IgA-, IgE- oder IgM- Subklassen detektiert werden.

Bei den IA-2A-positiven Personen war das Auftreten von IgG2 signifikant assoziiert mit dem Auftreten von IgG4 (84% vs. 11% bei IgG4-negativen; $p < 0,0001$). Bei IAA-positiven war das Auftreten von IgG2 assoziiert mit IgG1 (83% vs. 55% bei IgG2-negativen; $p < 0,05$) und IgG4 (56% vs. 18% bei IgG2-negativen ; $p < 0,005$).

Ferner war bei Verwandten, die positiv für GADA getestet wurden, IgG2 mit einer höheren Prävalenz von IgG4 (56% vs. 27% bei IgG2-negativen; $p < 0.005$) und IgM (31% vs. 13% bei IgG2-negativen) assoziiert. Das Auftreten von IgG4 war assoziiert mit höherer Frequenz von IgM (42% vs. 4% bei IgG2-negativen; $p < 0.0001$) und IgA (36% vs. 6% bei IgG2-negativen; $p < 0.0001$).

Tabelle 4 Darstellung aller gemessenen Kombinationen der GADA-Subklassen

(n=149)				GADA-Antikörper			Anzahl	Frequenz
Subklassen-Kombination				IgA	IgE	IgM		
IgG1	IgG2	IgG3	IgG4					
+	-	-	-	-	-	+	3	2,0%
+	-	-	-	+	-	-	5	3,4%
+	-	-	-	-	+	-	1	0,7%
+	-	-	-	-	-	-	69	46,3%
+	-	-	-	+	-	+	1	0,7%
+	+	+	+	+	-	+	2	1,3%
+	+	+	+	+	-	-	1	0,7%
+	+	-	-	-	-	-	15	10,1%
+	+	-	+	+	-	-	1	0,7%
+	+	-	+	+	+	+	1	0,7%
+	+	-	+	+	-	+	3	2,0%
+	+	-	+	-	-	+	5	3,4%
+	+	-	+	-	-	-	7	4,7%
+	-	-	+	+	-	-	3	2,0%
+	-	-	+	-	-	-	17	11,4%
+	-	-	+	-	-	+	3	2,0%
+	-	-	+	+	-	+	7	4,7%
-	+	-	-	-	-	-	1	0,7%
-	-	-	-	-	-	-	4	2,7%

Tabelle 5 Darstellung aller gemessenen Kombinationen der IA-2A-Subklassen

(n=62)				IA-2-Antikörper			Anzahl	Frequenz
Subklassen-Kombination				IgA	IgE	IgM		
IgG1	IgG2	IgG3	IgG4					
+	-	-	-	-	-	-	27	43,5%
+	-	-	-	+	-	-	2	3,2%
+	+	+	+	+	-	+	1	1,6%
+	+	+	+	+	-	-	1	1,6%
+	+	+	-	-	-	-	1	1,6%
+	+	-	-	-	-	-	3	4,8%
+	+	-	+	+	-	-	1	1,6%
+	+	-	+	+	-	+	2	3,2%
+	+	-	+	-	-	-	12	19,4%
+	+	-	+	-	-	+	3	4,8%
+	+	-	+	-	+	-	1	1,6%
+	-	-	+	-	-	-	3	4,8%
+	-	-	+	+	-	+	1	1,6%
-	-	-	-	+	-	-	1	1,6%
-	-	-	-	-	-	-	3	4,8%

Tabelle 6 Darstellung aller gemessenen Kombinationen der IAA-Subklassen

(n=72)				Insulin-Antikörper	Anzahl	Frequenz
Subklassen-Kombination						
IgG1	IgG2	IgG3	IgG4			
+	-	-	-	19	26,4%	
+	+	+	+	5	6,9%	
+	+	+	-	1	1,4%	
+	+	-	-	4	5,6%	
+	-	+	+	4	5,6%	
+	+	-	+	4	5,6%	
+	-	-	+	2	2,8%	
+	-	+	-	7	9,7%	
-	+	+	-	1	1,4%	
-	+	-	-	2	2,8%	
-	-	+	-	5	6,9%	
-	-	-	+	4	5,6%	
-	-	-	-	14	19,4%	

5.1.3 Auftreten der Inselzell-Autoantikörper-Epitopspezifitäten

Die Epitopspezifitäten wurde bei 149 GADA- und 61 IA-2A-positiven Verwandten bestimmt (bei einer IA-2A-positiven Person war kein Serum mehr zur Messung der Epitopspezifitäten verfügbar).

Prävalenzen der Inselzell-Autoantikörper-Epitopspezifitäten (Tabelle 7)

GAD-spezifische Autoantikörper erkannten in der Mehrheit der Fälle die c-terminale (GAD-COOH) und die mittlere Region (GAD-MID) des Moleküls (85,2% bzw 79,9%), während die n-terminale Region (GAD-NH₂) und GAD 67 relativ selten erkannt wurden (29,5% bzw 26,8%).

Autoantikörper gegen IA-2 waren meist gegen die PTP-Region von IA-2 (70,5%) gerichtet, seltener gegen die JM-Region (50,8%) und gegen Epitope in der PTP-Region von IA-2 und IA-2β (kreuzreaktive Autoantikörper: 49,2%). Alleinige Reaktivität gegen die PTP-Region von IA-2β ohne gleichzeitige Reaktivität gegen die PTP-Region von IA-2 trat selten (11,5%) auf.

Tabelle 7 Epitopspezifitäten von GADA und IA-2A in den Seren der 180 Probanden

	MID	COOH	NH2	GAD-67	JM	X	PTP	β-PTP
GADA (n = 149)	127 (85.2%)	119 (79.9%)	44 (29.5%)	40 (26.8%)	-	-	-	-
IA-2A (n = 61)	-	-	-	-	31 (50.8%)	30 (49.2%)	43 (70.5%)	7 (11.5%)

Titerhöhe der Inselzell-Autoantikörper-Epitopspezifitäten

Die Titer der Inselzell-Autoantikörper-Epitopspezifitäten aller untersuchten Probanden sind in Abbildung 4 gezeigt, die gestrichelten Linien zeigen dabei den jeweiligen Grenzwert für Positivität. Dabei hatten auch hier - wie bei den Subklassen beschrieben - häufiger nachgewiesene Epitope höhere Titer, d.h. mittlere und c-terminale Regionen bei GAD und alle außer der IA-2 β -spezifischen bei IA-2.

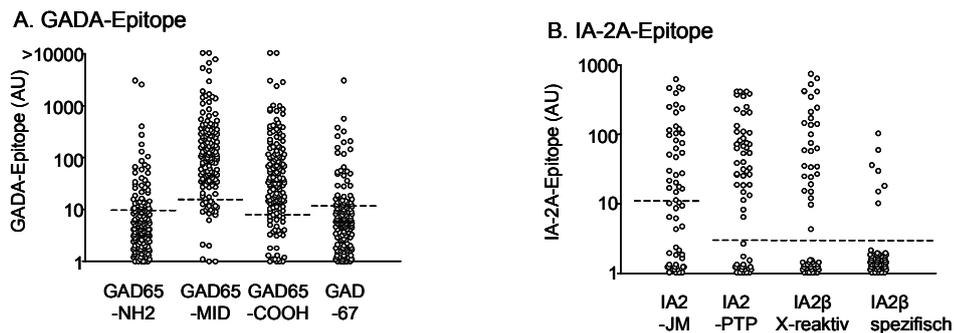


Abbildung 4 Autoantikörper-Epitopreaktivitäten bei 180 Autoantikörper-positiven erstgradig Verwandten von Patienten mit Typ-1-Diabetes. Epitopreaktivität wurde gemessen bei GADA- (n=149;A) und IA-2A- (n=61; B) positiven Probanden.

Kombinationen im Auftreten der Inselzell-Autoantikörper-Epitopspezifitäten

Von den 149 GADA-positiven Verwandten (Tabelle 8) hatten 24 (16,1%) lediglich Antikörper gegen ein einzelnes Epitop; im einzelnen hatten 13 Probanden Antikörper gegen GAD65-MID-Epitope (8,7%), 5 gegen GAD65-COOH-Epitope (3,3%) und 6 gegen GAD65-NH2-Epitope (4,0%).

Bei 10 Personen (6,7%) konnten keine Antikörper gegen einzelne Epitope nachgewiesen werden.

115 Personen (77,2%) hatten Antikörper gegen multiple Epitope des Antigens, darunter 113 (75,8%) Autoantikörper gegen GAD65-MID- und GAD65-COOH-terminale Epitope; dies war die am häufigsten auftretende Kombination von GAD-Epitopen.

Antikörper gegen GAD67-Epitope kamen nie alleine vor.

Tabelle 8 Kombinationen von GADA-Epitopen

(n=149)			GAD-Antikörper		Anzahl	Frequenz
MID	Epitop-Kombination		67			
	COOH	NH2				
+	+	+	+		24	16,1%
+	+	+	-		12	8,1%
+	+	-	+		15	10,1%
+	+	-	-		62	41,6%
+	-	+	-		1	0,7%
+	-	-	-		13	8,7%
-	+	+	+		1	0,7%
-	+	-	-		5	3,3%
-	-	+	-		6	4,0%
-	-	-	-		10	6,7%

Bei 19 der 61 IA-2A-positiven Verwandten (31,1%) traten ausschließlich Antikörper gegen ein einzelnes Epitop auf, dabei bei 9 Personen (14,8%) gegen JM alleine, bei 4 Personen (6,6%) kreuzreaktive Antikörper und bei 10 Personen (16,4%) gegen PTP alleine.

Bei 4 Probanden (6,6%) konnte keines der Epitope detektiert werden.

34 (56%) Verwandte hatten Antikörper gegen multiple Epitope und 30 (48%) hatten kreuzreaktive Antikörper, die an IA-2 und IA-2 β banden. Die Kombinationen sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9 Kombinationen von IA-2A-Epitopen (X: kreuzreaktive Antikörper gegen PTP und β -PTP)

(n=61)			IA-2-Antikörper		Anzahl	Frequenz
JM	Epitopkombination		β -PTP			
	X	PTP				
+	+	+	+		4	6,6%
+	+	+	-		9	14,8%
-	+	+	+		3	4,9%
+	+	-	-		1	1,6%
+	-	+	-		8	13,1%
-	+	+	-		9	14,8%
+	-	-	-		9	14,8%
-	+	-	-		4	6,6%
-	-	+	-		10	16,4%
-	-	-	-		4	6,6%

5.1.4 Zusammenhang zwischen Inselzell-Autoantikörper-Titer und IgG-Subklassen und Epitopreaktivität von Inselzell-Autoantikörpern

Die Titerhöhe wurde bereits in Abbildung 3 und Abbildung 4 dargestellt und für die Untersuchung des Zusammenhangs mit der IgG-Subklassen- und Epitopreaktivität in Quartilen eingeteilt. Es stellte sich heraus, dass für jeden Autoantikörper das Auftreten von zusätzlichen IgG-Subklassen neben IgG1 signifikant mit dem Autoantikörper-Titer assoziiert war (Abbildung 5; $p < 0,0001$ bzw. $p < 0,002$). Ebenso bestand eine signifikante Assoziation des Autoantikörper-Titers mit dem Auftreten von Autoantikörpern gegen multiple Epitope oder IA-2 β -Epitope (Abbildung 6; $p < 0,0001$).

Es wurden dabei für jeden Autoantikörper nur positive Proben zur Bestimmung der Quartilen herangezogen.

IgG-Subklassen vs. Titer

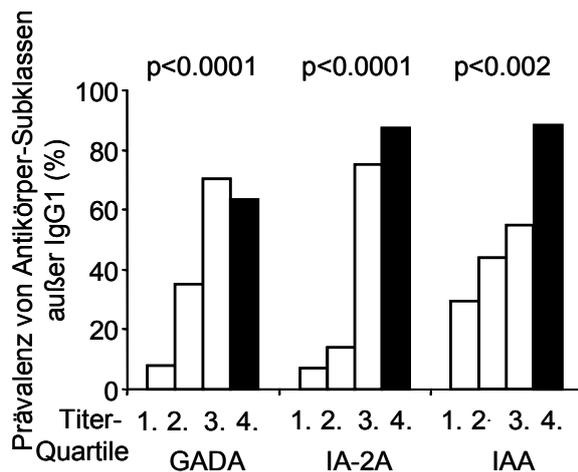


Abbildung 5 Beziehung zwischen Inselzell-Autoantikörper-Titer und IgG-Subklassen von Inselzell-Autoantikörpern. Für jeden Autoantikörper war die Prävalenz von zusätzlichen IgG-Subklassen neben IgG1 signifikant assoziiert mit dem Autoantikörper-Titer, welcher dargestellt ist von der niedrigsten (1.) zur höchsten (4.) Quartile.

Epitope vs. Titer

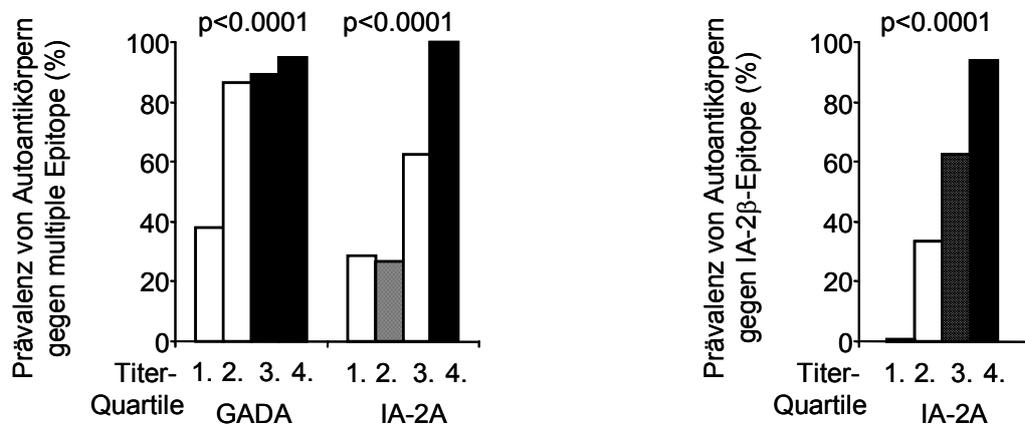


Abbildung 6 Beziehung zwischen Inselzell-Autoantikörper-Titer und Epitopreaktivität von Inselzell-Autoantikörpern. Für jeden Autoantikörper war die Prävalenz von Autoantikörpern gegen multiple Epitope oder IA-2β-Epitope signifikant assoziiert mit dem Autoantikörper-Titer, welcher dargestellt ist in von der niedrigsten (1.) zur höchsten (4.) Quartile.

5.2 Assoziation von Inselzell-Autoantikörper-Charakteristika mit Typ-1-Diabetes-Risiko: univariate Analyse

59 der 180 Verwandten (32,8%) entwickelten im Verlauf der Studie Typ-1-Diabetes. Das kumulative 5- und 10-Jahres-Erkrankungsrisiko innerhalb der Gesamtkohorte betrug 21% (CI: 14,8-27,2) bzw. 39% (CI:30,6-47,4).

5.2.1 Alter, Verwandtschaftsgrad, Geschlecht und assoziiertes Diabetesrisiko

Es zeigte sich, dass weder Verwandtschaftsgrad noch Geschlecht oder Alter bei Studieneintritt signifikant mit der Entwicklung von T1D assoziiert waren ($p=0,26$ bzw. $p=0,6$ bzw. $p=0,06$; Tabelle 10). Folgende Beobachtungen, die nicht signifikant waren, lassen sich beschreiben: Kinder und Geschwister von Personen mit T1D hatten mit 47% bzw. 37% ein etwas höheres 10-Jahres-Diabetesrisiko als Eltern (31%), und Frauen erkrankten etwas häufiger als Männer (10-Jahres-Risiko 43% vs. 34%). Auch erkrankten Verwandte, die bei Studieneintritt unter 15 Jahre alt waren, etwas häufiger als Personen, die über 15 Jahre alt waren (10-Jahres-Risiko 46% vs. 32%).

5.2.2 Autoantikörper-Spezifität, -Anzahl und -Kombinationen und assoziiertes Diabetesrisiko

In Bezug auf das Auftreten der drei Inselzell-Autoantikörper war nur das Auftreten von IA-2A signifikant mit einem erhöhten Typ-1-Diabetesrisiko assoziiert (Abbildung 7).

Bezüglich der Autoantikörper-Anzahl zeigte sich (Tabelle 10), dass Verwandte, die zwei oder drei positive Antikörper aufwiesen, ein höheres kumulatives Risiko hatten, im Verlauf von 10 Jahren an T1D zu erkranken (59% bzw 69%; CI: 46-76%) als Verwandte mit nur einem Antikörper (25%; CI: 14-34%; $p<0,001$). Das erhöhte Erkrankungsrisiko bestand bereits bei zwei positiven Antikörpern. Ein dritter positiver Antikörper-Befund erhöhte das Risiko nicht signifikant. In der univariaten Analyse war dabei insbesondere auffällig, dass die Kombination von IAA und IA-2A (ohne GADA) sogar ein 100%iges 10-Jahres-Erkrankungsrisiko zeigte ($p<0,001$); dies war höher als bei der Kombination aus allen drei Autoantikörpern (69%; CI 54-80%).

Bei Verwandten mit nur einem positiven Autoantikörper war das Risiko bei alleinigem Auftreten von IA-2A (47% nach 10 Jahren; CI 32-62%) signifikant höher als bei denjenigen mit GADA (22%; CI 11-33%) oder IAA (21%; CI 14-28%) ($p=0,05$).

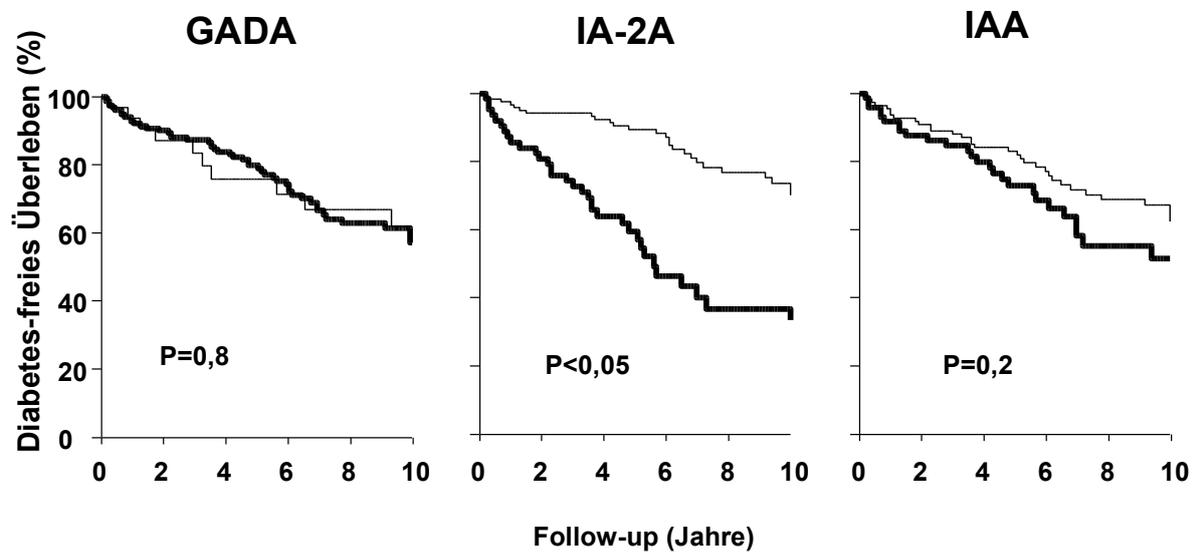


Abbildung 7 Autoantikörper-Spezifität und assoziiertes Diabetesrisiko. Das kumulative Diabetesrisiko bei Verwandten in Abhängigkeit von Autoantikörper-Positivität für GADA, IA-2A und IAA. Die jeweils dick gezeichnete Linie bezieht sich auf die Probanden, die für den Autoantikörper positiv sind.

Tabelle 10 Typ-1-Diabetesrisiko in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht, Verwandtschaftsgrad, Inselzell-Autoantikörper-Anzahl und -kombinationen bei Autoantikörper-positiven Verwandten - univariate Analyse

Variable		Typ-1-Diabetes (n)	10-Jahres-Diabetesrisiko (% ± SE)	Relatives Risiko (95% CI)	P
Alter					0.06
<15 Jahre	(n = 93)	32	46 ± 7	1.7 (1.0-2.8)	
>15 Jahre	(n = 87)	27	32 ± 6	1*	
Geschlecht					0.6
Männlich	(n = 91)	28	34 ± 6	0.9 (0.5-1.5)	
Weiblich	(n = 89)	31	43 ± 6	1*	
Verwandtschaft zum Probanden					0.26
Kinder	(n = 65)	22	47 ± 8	1.7 (0.9-3.4)	0.1
Geschwister	(n = 68)	22	37 ± 7	1.3 (0.7-2.6)	0.41
Eltern	(n = 47)	15	31 ± 7	1*	
Anzahl der Autoantikörper					0.0001
Einer	(n = 100)	22	25 ± 5	1*	
Zwei	(n = 57)	25	59 ± 9	3.1 (1.7-5.5)	<0.001
Drei	(n = 23)	12	69 ± 13	4.4 (2.1-9.0)	<0.001
Kombinationen von Autoantikörpern					0.0001
GADA allein	(n = 72)	15	22 ± 6	1*	
IAA allein	(n = 19)	3	21 ± 11	0.8 (0.2-2.7)	0.68
IA2A allein	(n = 9)	4	47 ± 17	3.0 (1.0-9.2)	0.05
GADA, IAA	(n = 27)	8	52 ± 17	2.1 (0.9-5.1)	0.09
GADA, IA2A	(n = 27)	14	61 ± 12	4.0 (1.9-8.4)	<0.001
IAA, IA2A	(n = 3)	3	100	13.3 (3.8-47.2)	<0.001
GADA, IAA, IA2	(n = 23)	12	69 ± 13	4.8 (2.2-10.4)	<0.001

* als Referenz im Cox's proportional hazard model benutzt; 100% bei der Kombination IAA/IA-2A bereits nach 6J. erreicht

5.2.3 Autoantikörper-Titer und assoziiertes Diabetesrisiko

IA-2A-positive Verwandte mit Titern oberhalb der 25. Perzentile (>27 Units) hatten ein signifikant erhöhtes Diabetesrisiko (79% nach 10 Jahren; CI: 64-94%) gegenüber denjenigen mit IA-2A-Titern in der niedrigsten Quartile (20%; CI 1-45%; p=0,002); ebenso hatten IAA-positive Verwandte mit IAA-Titern oberhalb der 75. Perzentile (>9 Units) ein signifikant erhöhtes Diabetesrisiko (77% nach 10 Jahren; CI: 53-99%) gegenüber denjenigen mit IAA-Titern in den niedrigsten drei Quartilen (37%; CI: 30-54%; p=0,002).

Zwischen GADA-Titern und Diabetesrisiko fand sich kein vergleichbarer Zusammenhang (Abbildung 8, Tabelle 14).

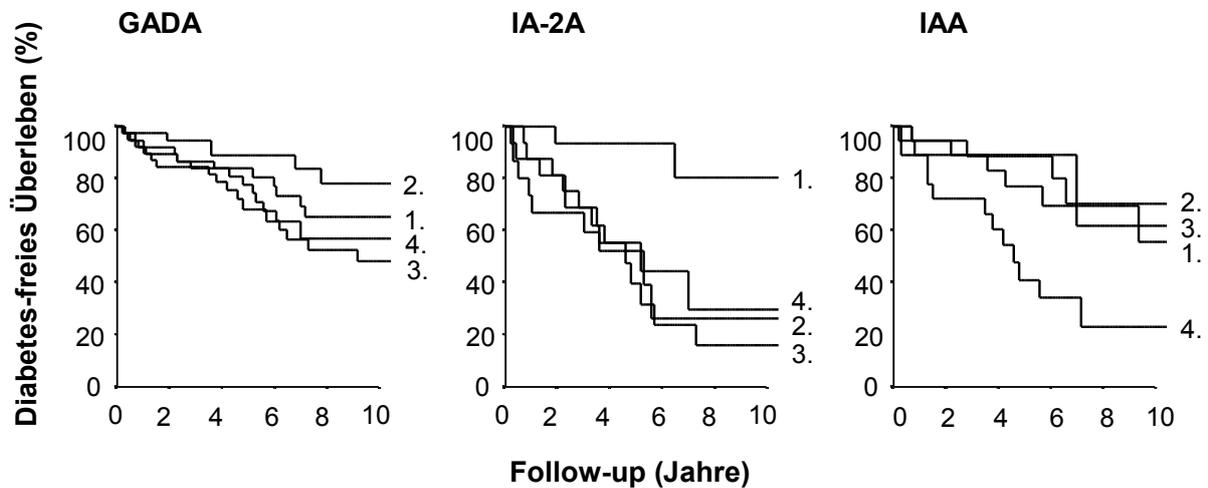


Abbildung 8 Autoantikörper-Titer und assoziiertes Diabetesrisiko. Das kumulative Diabetesrisiko bei Verwandten in Abhängigkeit von Autoantikörper-Titern für GADA, IA-2A und IAA. Die Titer für jeden Antikörper sind stratifiziert von der niedrigsten (1.) zur höchsten (4.) Quartile. Für jeden Autoantikörper wurden nur positive Proben zur Bestimmung der Quartilen herangezogen.

5.2.4 Autoantikörper-Subklassen und assoziiertes Diabetesrisiko

Bei GADA-positiven Verwandten waren in der Einzelanalyse das Auftreten von IgG2 und IgG3 signifikant mit einem erhöhten Typ-1-Diabetesrisiko verbunden, bei IA-2A-positiven Verwandten das Auftreten von IgG2 und IgG4 und bei IAA-positiven Verwandten das Auftreten von IgG2, IgG3 und IgG4. IgA, IgM und IgE waren weder für GADA noch für IA-2A mit einem erhöhten Diabetesrisiko assoziiert (Abbildung 9).

Im proportionalen Hazard-Modell nach Cox (Tabelle 11 und Tabelle 14) konnte in der Folge bei den GADA-positiven Verwandten jedoch kein Zusammenhang zwischen IgG-Subklassen und Typ-1-Diabetesrisiko gefunden werden. Im Gegensatz dazu war bei IA-2A-positiven Verwandten das Auftreten von IgG2, IgG3 oder IgG4 signifikant mit einem höherem Erkrankungsrisiko assoziiert (100% in 10 Jahren; CI 85-100%) als ohne diese IgG-Subklassen (37%; CI: 18-48%; $p=0,0007$) und bei IAA-positiven Verwandten ebenso das Auftreten von IgG2, IgG3 oder IgG4 (68% in 10 Jahren; CI 47-89%) gegenüber IgG2-, IgG3- und IgG4-negativen Verwandten (28%; CI 10-46%; $p=0,007$). Für keine Subklasse war das Auftreten mit einer signifikanten Protektion vor der Entwicklung eines T1D assoziiert.

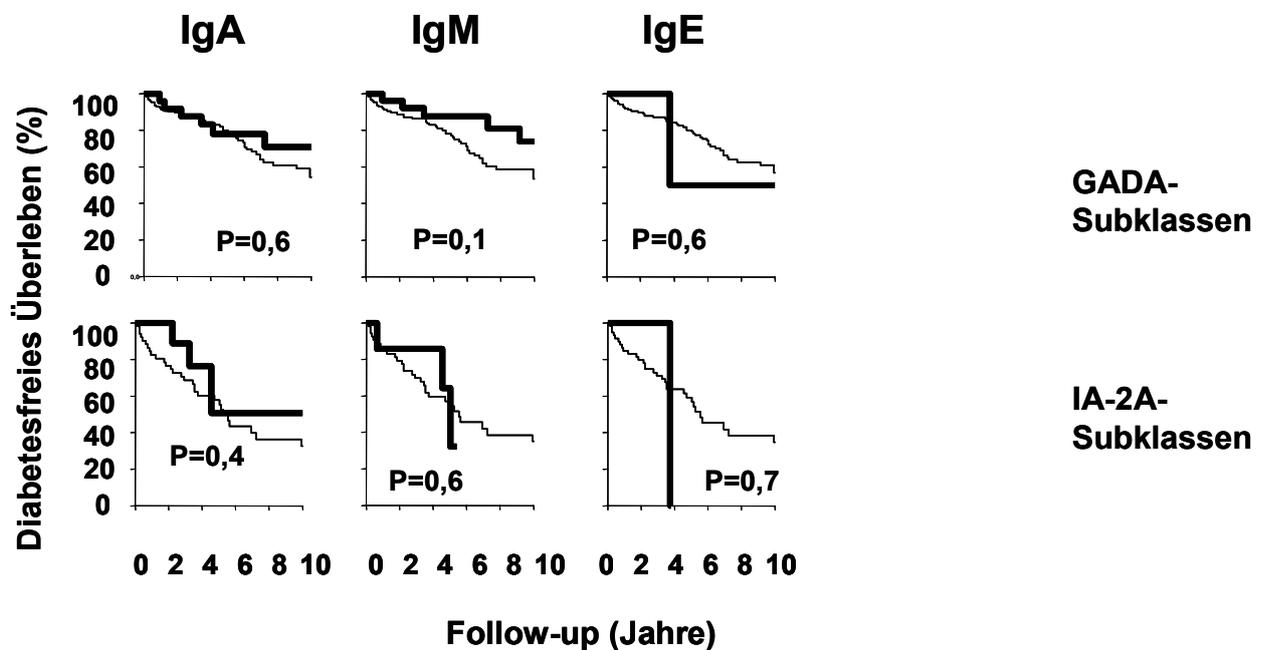
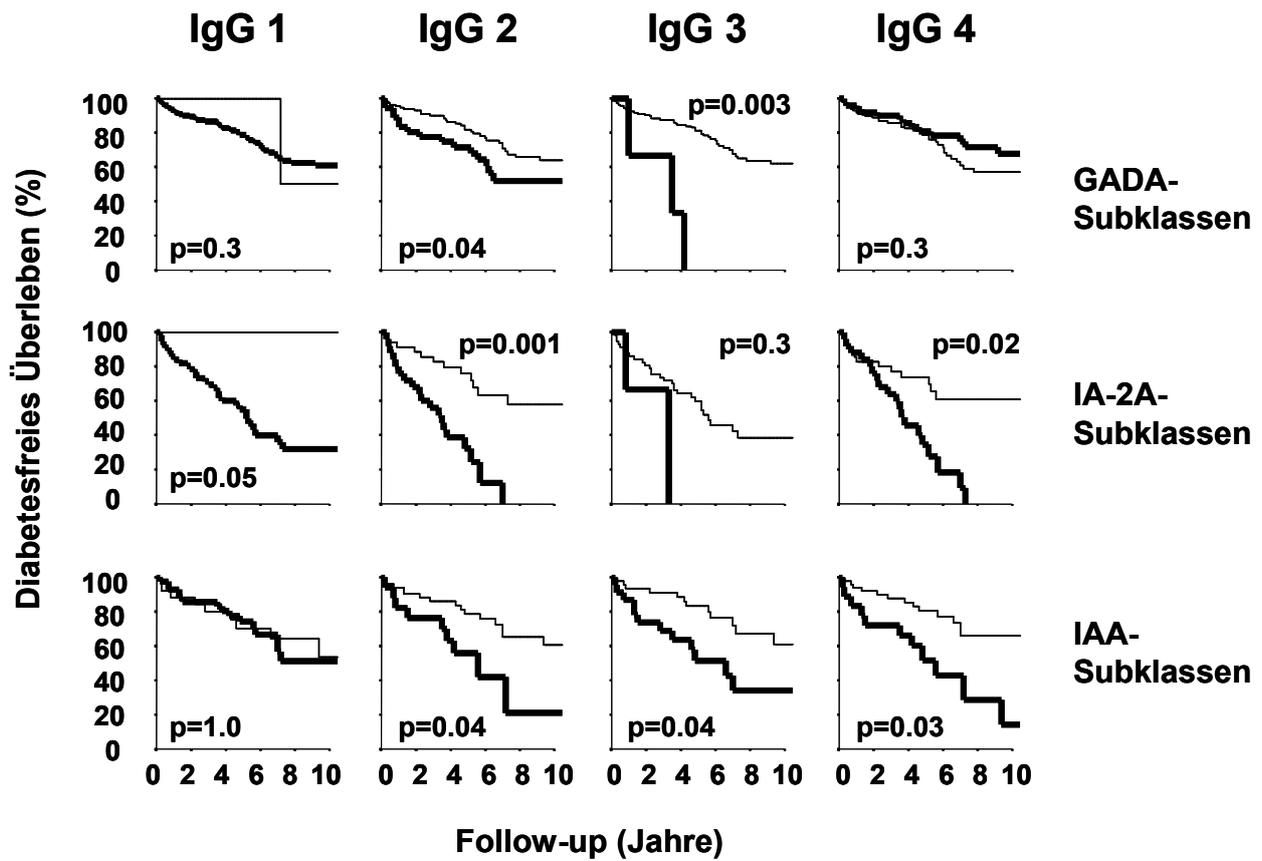


Abbildung 9 Ig-Subklassen und assoziiertes Diabetesrisiko. Die jeweils dick gezeichnete Linie bezieht sich auf die Probanden, die für die Subklasse positiv sind.

Tabelle 11 Kombinationen von IgG-Subklassen der Inselzell-Autoantikörper und assoziiertes T1D-Risiko

IgG-Subklassenkombination				GADA		IA-2A		IAA	
IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	n (T1D)	10-Jahres-Risiko ¹	n (T1D)	10-Jahres-Risiko	n (T1D)	10-Jahres-Risiko ¹
+	-	-	-	79 (23)	34%	29 (11)	54%	19 (4)	33%
+	+	+	+	3 (3)	44%	2 (1)	100% ²	5 (3)	67% ²
+	+	+	-	0		1 (1)		1 (0)	
+	+	-	-	15 (11)		3 (2)		4 (2)	
+	-	+	+	0		0		4 (3)	
+	+	-	+	19 (2)		19 (15)		4 (3)	
+	-	-	+	30 (9)		4 (3)		2 (0)	
+	-	+	-	0		0		7 (2)	
-	+	+	+	0		0		0	
-	-	+	+	0		0		0	
-	+	+	-	0		0		1 (0)	
-	+	-	+	0	0	0	67% ³		
-	+	-	-	1 (0)	0	2 (1)			
-	-	+	-	0	0	5 (3)			
-	-	-	+	0	0	4 (2)			
-	-	-	-	4 (1)		4 (0)		14 (3)	24%

n: Anzahl der für diese IgG-Subklassenkombination positiven Verwandten (in Klammern die Anzahl derer, die T1D entwickelten)

1 Diabetesrisiko in der Life-table-Analyse (Risiken nur für Kombinationen gezeigt, die bei mehr als fünf Probanden auftraten)

2 P < 0.005 vs. IgG1 allein

3 P = 0.01 vs. IgG1 allein (log rank test)

5.2.5 Epitopspezifitäten und assoziiertes Diabetesrisiko

Für GADA-positive Verwandte bestand in der Einzelanalyse kein signifikanter Zusammenhang zwischen den einzelnen Epitopspezifitäten und dem Diabetesrisiko. Bei IA-2A-positiven Verwandten hatten Personen mit IA-2 β -kreuzreaktiven Autoantikörpern ein signifikant erhöhtes Diabetesrisiko (Abbildung 10) mit einem 10-Jahres-Diabetesrisiko von 81% (CI 64-98%) gegenüber Personen ohne kreuzreaktive Antikörper (27%; 8-46%; $p < 0,05$).

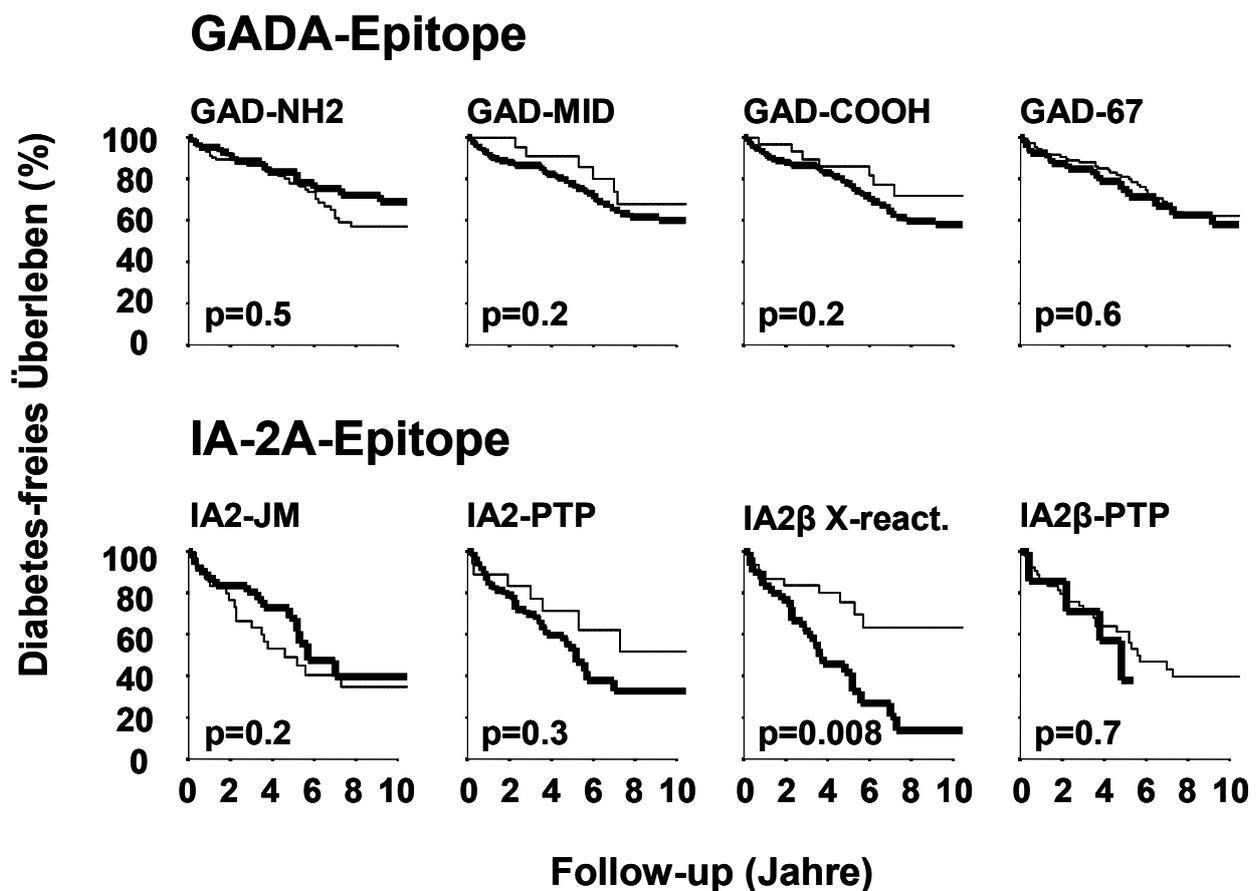


Abbildung 10 Epitopspezifitäten und assoziiertes Diabetesrisiko. Die jeweils dick gezeichnete Linie bezieht sich auf die Probanden, die für den Marker positiv sind.

Im Cox's proportional Hazard Modell (Tabelle 12 und Tabelle 14) war bei den IA-2A-positiven Verwandten das Typ-1-Diabetes-Risiko höher bei denjenigen mit Autoantikörpern, die zudem auch IA-2 β -Reaktivität aufwiesen (86% in 10 Jahren; CI 70-99%) als bei den IA-2 β -negativen Verwandten (38%; CI 18-58%; $p = 0,008$).

Ferner war das Risiko signifikant höher bei Verwandten mit Autoantikörpern, die Reaktivität gegen multiple IA-2A-Epitope aufwiesen (75% in 10 Jahren; CI 57-93%), als bei nur einer

Epitopreaktivität (50%; CI 26-74%; $p < 0,05$). Zwischen GADA-Epitopreaktivität und Diabetesrisiko konnte kein Zusammenhang gefunden werden (Tabelle 13 und Tabelle 14).

Tabelle 12 Kombinationen von IA-2-Epitopspezifitäten der Inselzell-Autoantikörper und assoziiertes T1D-Risiko

IA-2-Epitopkombinationen			n (T1D)	10-Jahres-Risiko ¹
IA-2 β -PTP und/oder X-react	IA-2-PTP	IA-2-JM		
+	+	+	13 (8)	81%
+	+	-	12 (10)	100% ²
+	-	+	1 (1)	
+	-	-	4 (3)	
-	+	+	8 (3)	34%
-	+	-	10 (4)	44%
-	-	+	9 (2)	41%
-	-	-	4 (1)	

n: Anzahl der für diese Epitopkombination positiven Verwandten (in Klammern die Anzahl derer, die T1D entwickelten)

¹ Diabetesrisiko in der Life-table-Analyse (Risiken nur für Kombinationen gezeigt, die bei mehr als fünf Probanden auftraten)

² $P = 0.009$ vs. PTP und/oder JM-positive/IA-2 β -negative Gruppen (log rank test)

Tabelle 13 Kombinationen von GAD-Epitopspezifitäten der Inselzell-Autoantikörper und assoziiertes T1D-Risiko

GAD-Epitopkombinationen					
GAD65- MID	GAD65- COOH	GAD65- NH2	GAD67	n (T1D entwickelt)	10-Jahres-Risiko ¹
+	+	+	+	24 (8)	39%
+	+	+	-	12 (6)	26%
+	+	-	+	15 (5)	56%
+	+	-	-	62 (21)	45%
+	-	+	-	1 (0)	
+	-	-	-	13 (3)	27%
-	+	+	+	1 (0)	
-	+	-	-	5 (2)	48%
-	-	+	-	6 (1)	20%
-	-	-	-	10 (3)	33%

n: Anzahl der für diese Epitopkombination positiven Verwandten (in Klammern die Anzahl derer, die T1D entwickelten)

¹ Diabetesrisiko in der Life-table-Analyse (Risiken nur für Kombinationen gezeigt, die bei mehr als fünf Probanden auftraten)

Tabelle 14 Typ-1-Diabetesrisiko in Abhängigkeit von Inselzell-Autoantikörper-Titer, IgG-Subklassen und Epitopreaktivität bei Autoantikörper-positiven Verwandten - univariate Analyse; * als Referenz im Cox's proportional hazards model benutzt; 100% bei der Kombination IA-2A-IgG2,IgG3 oder IgG4 bereits nach 6J. erreicht

Variable		Typ-1- Diabetes (n)	10-Jahres- Diabetesrisiko (% ± SE)	Relatives Risiko (95% CI)	P
Autoantikörper-Titer					
GADA					
					0.19
1. Quartile	(n = 37)	11	35 ± 9	1*	
2. Quartile	(n = 37)	8	22 ± 9	0.8 (0.3-1.9)	0.55
3. Quartile	(n = 37)	17	52 ± 9	1.7 (0.8-3.6)	0.18
4. Quartile	(n = 38)	13	43 ± 10	1.6 (0.7-3.6)	0.26
IAA					
					0.01
1. Quartile	(n = 18)	6	45 ± 16	1*	
2. Quartile	(n = 18)	4	30 ± 13	0.7 (0.2-2.4)	0.55
3. Quartile	(n = 18)	4	38 ± 17	0.8 (0.2-2.7)	0.68
4. Quartile	(n = 18)	12	77 ± 12	3.0 (1.1-8.1)	0.03
IA-2A					
					0.04
1. Quartile	(n = 15)	3	20 ± 14	1*	
2. Quartile	(n = 15)	9	74 ± 15	6.0 (1.6-22.4)	0.008
3. Quartile	(n = 16)	12	84 ± 10	5.9 (1.7-21.1)	0.006
4. Quartile	(n = 16)	9	71 ± 15	4.8 (1.3-17.9)	0.02
Autoantikörper IgG-Subklassen					
GADA					
					0.36
IgG2, 3 und 4 neg	(n = 83)	24	35 ± 7	1*	
IgG2, 3 oder 4 pos	(n = 66)	25	43 ± 7	1.3 (0.7-2.3)	
IAA					
					0.009
IgG2, 3 und 4 neg	(n = 33)	7	28 ± 9	1*	
IgG2, 3 oder 4 pos	(n = 39)	19	68 ± 10	3.2 (1.2-7.6)	
IA-2A					
					0.0001
IgG2, 3 und 4 neg	(n = 33)	11	37 ± 10	1*	
IgG2, 3 oder 4 pos	(n = 29)	22	100	4.9 (2.2-10.6)	
Autoantikörper-Epitope					
GADA					
					0.18
Alleine	(n = 34)	9	32 ± 9	1*	
Multipel	(n = 115)	40	41 ± 6	1.6 (0.8-3.4)	
IA-2A					
					0.048
Alleine	(n = 28)	11	50 ± 12	1*	
Multipel	(n = 34)	22	75 ± 9	2.1 (1.0-4.3)	
IA-2A					
					0.005
IA-2β negativ	(n = 32)	11	38 ± 10	1*	
IA-2β positiv	(n = 30)	22	86 ± 8	2.9 (1.4-6.0)	

5.3 Assoziation von Inselzell-Autoantikörper-Charakteristika mit Typ-1-Diabetes-Risiko: multivariate Analyse

Nun wurden im nächsten Schritt die Parameter, die sich in der univariaten Analyse (Tabelle 10 und Tabelle 14) als signifikant mit der Entwicklung von Typ-1-Diabetes assoziiert herausgestellt hatten, in einer multivariaten Analyse in das Cox's proportional Hazard Modell eingeschlossen; das waren :

- Auftreten multipler Autoantikörper (zwei oder mehr)
- hohe IA-2A-Titer (>25.Perzentile) und hohe IAA-Titer (>75.Perzentile)
- IA-2A-Subklassen (IgG2, IgG3 und/oder IgG4) und IAA-Subklassen (IgG2,IgG3 und/oder IgG4)
- Auftreten multipler IA-2A-Epitope
- Auftreten IA-2 β -reaktiver IA-2A.

Dabei zeigte sich, dass unabhängig von anderen Charakteristika IA-2A-Titer oberhalb der 25. Perzentile, IA-2A-IgG2, -IgG3 und/oder -IgG4 sowie IAA-IgG2, -IgG3 und/oder -IgG4 signifikant zum Cox's proportional Hazard Modell beitrugen. Die übrigen Marker, die in der univariaten Analyse signifikant mit erhöhtem T1DRisiko assoziiert waren (multiple Antikörper, IAA-Titer oberhalb der 75. Perzentile, multiple IA-2A-Epitope und IA-2 β -reaktive IA-2A), erreichten keine statistische Signifikanz mehr (Tabelle 15).

Da das Testen von IgG-Subklassen gegenwärtig teuer und nicht generell etabliert ist, wurde zusätzlich noch eine multivariate Analyse ohne die IgG-Subklassen-Covariaten durchgeführt. In diesem Modell erhöhten IA-2A-Titer oberhalb der 25.Perzentile (relatives T1D-Risiko: 5,1; CI 1,1-24,2) und IAA-Titer oberhalb der 75.Perzentile (relatives T1D-Risiko: 2,4; CI 1,1-5,4) signifikant das Diabetesrisiko. Jedoch verringerte die Herausnahme der IgG-Subklassen-Covariaten aus dem Modell andererseits signifikant die Eignung des Cox's proportional Hazard Modells (χ^2 ;18,8; p<0,0001).

Tabelle 15 Typ-1-Diabetesrisiko bei Autoantikörper-positiven Verwandten – multivariate Analyse

Inselzell-Autoantikörper-Charakteristika, signifikant in der univariaten Analyse	Typ-1- Diabetes (n)	Relatives Risiko (95%CI)	P
Zwei oder mehr Antikörper (n = 80)	37	1.6 (0.6-3.8)	0.32
Hohe IA-2A-Titer (n = 47)	30	5.4 (1-29)	0.05
Hohe IAA-Titer (n = 18)	12	1.0 (0.4-2.7)	0.97
IA-2A-Subklassen (n = 29)	22	3.3 (1.4-8.1)	0.008
IAA-Subklassen (n = 39)	20	4.6 (1.5-14)	0.007
Multiple IA-2A-Epitope (n = 34)	22	1.2 (0.5-3)	0.70
IA-2 β -reaktive IA-2A (n = 30)	22	1.1 (0.4-3.2)	0.83

5.4 Modelle zur Stratifizierung des Typ-1-Diabetes-Risikos auf der Grundlage von Inselzell-Autoantikörper-Charakteristika

Basierend auf den Ergebnissen der uni- und multivariaten Analyse wurden nun 4 Modelle erarbeitet und in Hinblick auf die Stratifizierung des Diabetesrisikos in der Kohorte verglichen (Abbildung 11):

Modell 1 (Tabelle 16) klassifizierte auf der Grundlage der Autoantikörper-Anzahl die Verwandten in Gruppen mit einem (A), zwei (B) oder allen drei (C) Autoantikörpern. Dabei zeigte sich mit zunehmender Autoantikörper-Anzahl eine Erhöhung des 5- und 10-Jahres-Diabetesrisikos. Das 10-Jahres-Erkrankungsrisiko konnte zwischen 25% und 69% stratifiziert werden.

Tabelle 16: Stratifizierung des Diabetesrisikos in Abhängigkeit von der Autoantikörper-Anzahl
 Kategorie A = ein Autoantikörper, Kategorie B = beliebige zwei Autoantikörper, Kategorie C = alle drei Autoantikörper (IAA, IA-2A, GADA);
 N (%) bezogen auf die 59 Verwandten, die insgesamt T1D entwickelten

Risiko-Stratifizierungs- Modell*	Typ-1-Diabetes N (%)	Diabetesrisiko	
		5 Jahre % (95% CI)	10 Jahre % (95% CI)
Modell 1			
Kategorie A (n = 100)	22 (37%)	12% (6-18)	25% (15-35)
Kategorie B (n = 57)	25 (42%)	30% (18-42)	59% (41-77)
Kategorie C (n = 23)	12 (20%)	48% (26-70)	69% (43-95)

In das Modell 2 (Tabelle 17) wurden alle Autoantikörper-Charakteristika, die signifikant zum proportional Hazard-Modell beitrugen, integriert. Dies waren:

- IA-2A-Titer oberhalb der 25. Perzentile der IA-2-positiven Verwandten
- IgG2, IgG3- oder IgG4-IA-2A-Subklassen-positiv Verwandte
- IgG2, IgG3 oder IgG4-IAA-Subklassen-positiv Verwandte

Die Probanden wurden in Gruppen mit keinem (A), einem (B), zwei (C) oder allen drei (D) der signifikanten Diabetesrisiko-Covariaten klassifiziert. Dabei zeigte sich mit zunehmender Zahl der Covariaten eine Erhöhung des 5- und 10-Jahres-Diabetesrisikos und dieses konnte zwischen 20% und 100% stratifiziert werden, wobei die 100%-Marke bereits nach 6 Jahren erreicht wurde. Dieses Modell erbrachte die beste Risikodiskrimination zwischen 7% und 89% Diabetesrisiko in 5 Jahren.

Tabelle 17 Stratifizierung des Diabetesrisikos in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Risikofaktoren:
 Kategorie A = keiner, Kategorie B = einer, Kategorie C = zwei, Kategorie D = alle drei der folgenden Risikofaktoren: hochtitrige IA-2A, Positivität für IgG2, IgG3- oder IgG4-IA-2A, und Positivität für IgG2-, IgG3- oder IgG4-IAA; 100% in Kategorie D bereits nach 6J. erreicht;
 N (%) bezogen auf die 59 Verwandten, die insgesamt T1D entwickelten

Risiko-Stratifizierungs-Modell*	Typ-1-Diabetes N (%)	Diabetesrisiko	
		5 Jahre % (95% CI)	10 Jahre % (95% CI)
Modell 2			
Kategorie A (n = 103)	19 (32%)	7% (2-12)	20% (11-29)
Kategorie B (n = 38)	12 (20%)	19% (6-32)	47% (25-69)
Kategorie C (n = 30)	19 (32%)	54% (34-74)	85% (66-100)
Kategorie D (n = 9)	9 (15%)	89% (68-100)	100%

Das Modell 3 (Tabelle 18) basierte im Gegensatz zum Modell 2 auf der multivariaten Analyse, die die IgG-Subklassen ausschloß. Es erfolgte somit eine Klassifikation von Probanden in solche mit keiner (A), einer (B) oder beiden (C) der verbleibenden signifikanten Diabetesrisiko-Covariaten:

- IA-2A-Titer oberhalb der 25. Perzentile der Positiven
- IAA-Titer oberhalb der 75. Perzentile der Positiven

Auch in diesem Modell zeigte sich mit zunehmender Zahl der Covariaten eine Erhöhung des 5- und 10-Jahres-Diabetesrisikos. Nach bereits 6 Jahren lag das kumulative Erkrankungsrisiko der Personen in Kategorie C bei 100%; andererseits lag es in Kategorie A auch nach 10 Jahren noch bei 23%.

Tabelle 18 Stratifizierung des Diabetesrisikos in Abhängigkeit von IA-2A- und IAA-Titer:
 Kategorie A = weder hochtitrige IA-2A noch hochtitrige IAA
 Kategorie B = hochtitrige IA-2A oder hochtitrige IAA
 Kategorie C = hochtitrige IA-2A und hochtitrige IAA
 100% in Kategorie C bereits nach 6J. erreicht; N (%) bezogen auf die 59 Verwandten, die insgesamt T1D entwickelten

Risiko-Stratifizierungs-Modell*	Typ-1-Diabetes N (%)	Diabetesrisiko	
		5 Jahre % (95% CI)	10 Jahre % (95% CI)
Modell 3			
Kategorie A (n =122)	24 (41%)	8% (3-13)	23% (14-32)
Kategorie B (n = 51)	28 (47%)	43% (28-58)	69% (52-86)
Kategorie C (n =7)	7 (12%)	86% (60-100)	100%

Das Modell 4 (Tabelle 19) beruhte hingegen auf IA-2- und IA-2 β -Autoantikörper-Messungen mit einer Klassifikation der Probanden in IA-2-negative (A), IA-2-positive und zugleich IA-2 β -negative (B) und IA-2 β -Autoantikörper-positive (C). Mit diesem Modell war ebenfalls die Möglichkeit einer Stratifizierung des 10-Jahres-Diabetesrisikos möglich zwischen 27% der Personen aus Kategorie A und 86% der in Kategorie C klassifizierten Personen.

Tabelle 19 Stratifizierung des Diabetesrisikos in Abhängigkeit von IA-2A-Epitopen:
 Kategorie A = IA-2A negativ
 Kategorie B = IA-2A positiv, aber IA-2 β -negativ
 Kategorie C = IA-2 β positiv;
 N (%) bezogen auf die 59 Verwandten, die insgesamt T1D entwickelten

Risiko-Stratifizierungs- Modell*	Typ-1-Diabetes N (%)	Diabetesrisiko	
		5 Jahre % (95% CI)	10 Jahre % (95% CI)
Modell 4			
Kategorie A (n = 118)	26 (44%)	11% (5-17)	27% (17-37)
Kategorie B (n = 32)	11 (19%)	24% (8-40)	41% (20-62)
Kategorie C (n = 30)	22 (37%)	63% (45-81)	86% (70-100)

Jedes dieser Modelle konnte somit das Diabetesrisiko in der Kohorte stratifizieren (alle $p < 0,0001$). Die Modelle 2, 3 und 4 stratifizierten das Diabetesrisiko signifikant sowohl bei den Verwandten, die nur einzelne Autoantikörper besaßen, als auch bei denen, die multiple besaßen (Abbildung 12). Die Modelle 2, 3 und 4 konnten Autoantikörper-positive Verwandte mit einem 5-Jahres-Diabetesrisiko identifizieren, das über 50% lag (Tabelle 17-Tabelle 19).

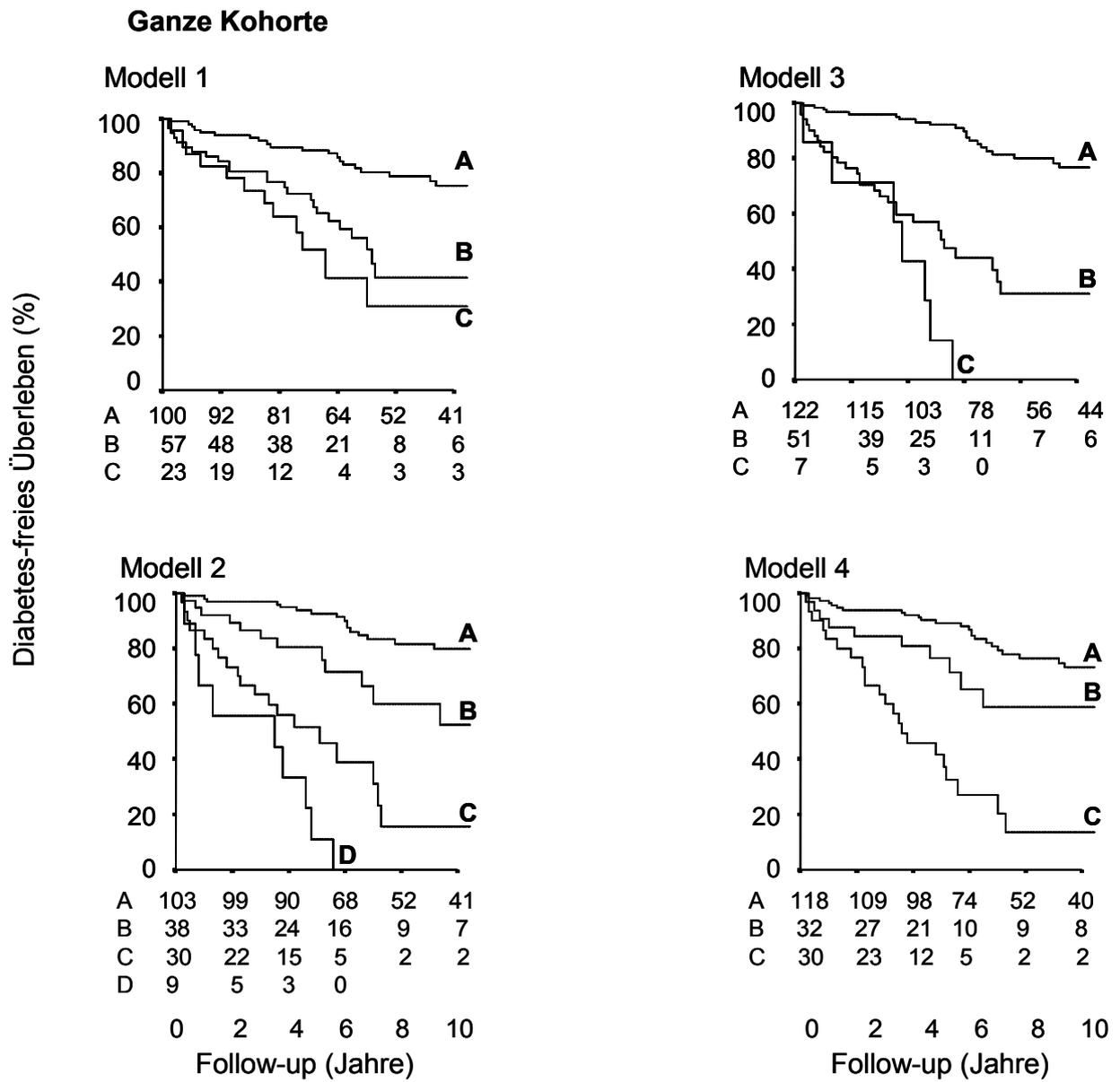


Abbildung 11 Das kumulative Diabetesrisiko bei Autoantikörper-positiven Verwandten, klassifiziert auf der Basis von Inselzell-Autoantikörper-Charakteristika. Die Stratifizierung wird gezeigt für die ganze Kohorte. Die jeweiligen Kategorien der Modelle sind beschrieben in Tabelle 16-Tabelle 19.

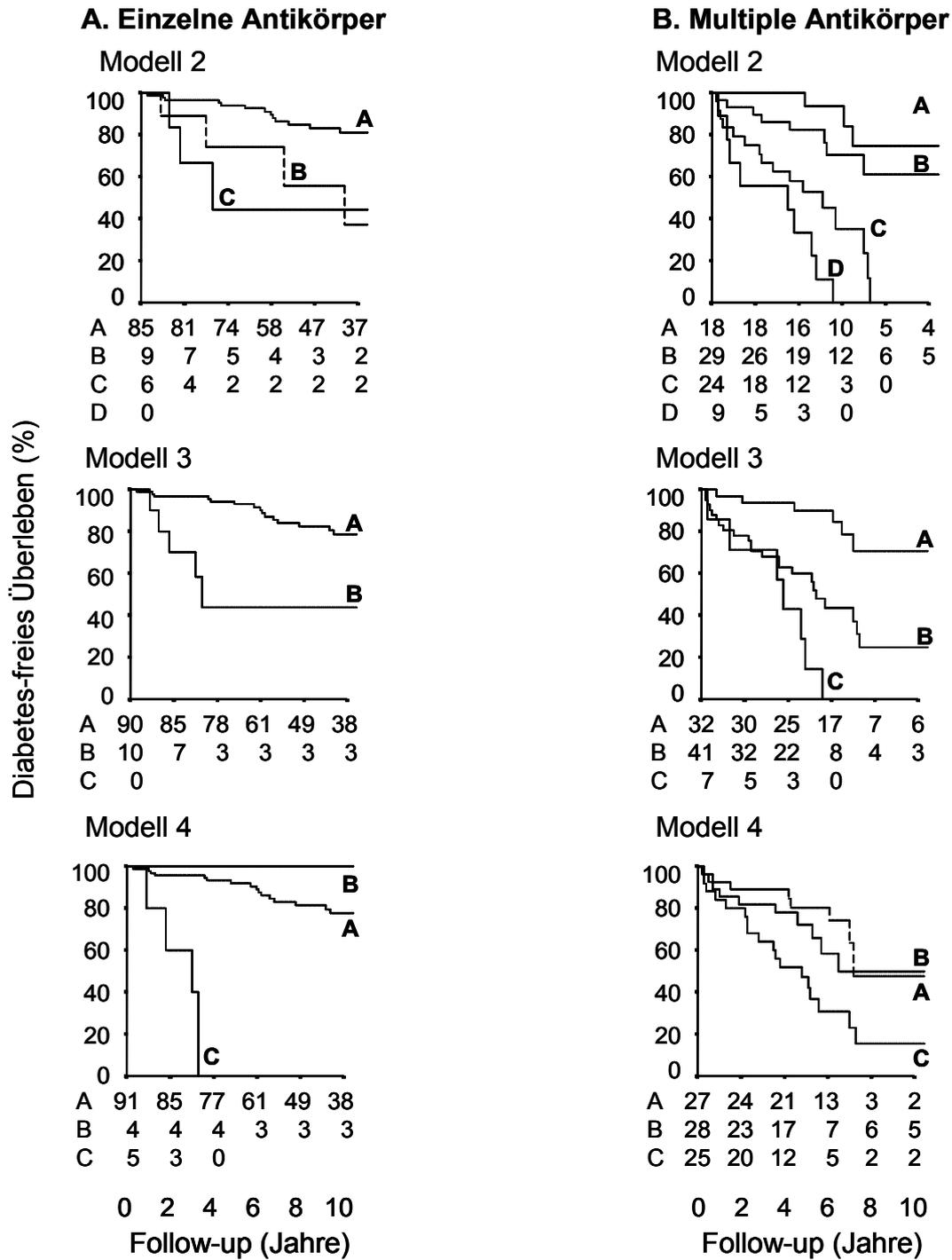


Abbildung 12 Das kumulative Diabetesrisiko bei Autoantikörper-positiven Verwandten, klassifiziert auf der Basis von Inselzell-Autoantikörper-Charakteristika. Die Stratifizierung wird gezeigt für Verwandte mit einzelnen Inselzell-Autoantikörpern (A) und für Verwandte mit zwei oder mehr Inselzell-Autoantikörpern (B). Die jeweiligen Kategorien der Modelle sind beschrieben in Tabelle 16-Tabelle 19.

6 Diskussion

Der Typ 1-Diabetes (T1D) ist eine Autoimmunerkrankung, die durch Zerstörung der β -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas gekennzeichnet ist (40). Zu den wichtigsten und weitverbreitetsten serologischen Markern, die das Ausmaß der β -Zellzerstörung beim Prä-Typ-1-Diabetes widerspiegeln können, lange bevor die Erkrankung klinisch manifest wird, zählen insbesondere die Autoantikörper GADA, IA-2A und IAA. Die Bestimmung dieser Autoantikörper kann daher hilfreich sein für die Prädiktion des Erkrankungsrisikos erstgradig Verwandter von Personen mit T1D, und damit beispielsweise die Rekrutierung von Risikopersonen für Präventionsprogramme und Interventionsstudien ermöglichen. Ein großer Vorteil ist die relativ einfache Bestimmung im peripheren Blut mit Hilfe international standardisierter Methoden (15, 112). Die Zusammenhänge zwischen Diabetesrisiko und Autoantikörper-Charakteristika wie Subklassen- und Epitopreaktivität variieren in verschiedenen Studien und wurden im Verlauf der prädiabetischen Phase bei erstgradig Verwandten bisher nur selten systematisch untersucht bzw. nur für einzelne Autoantikörper, sind aber sowohl für das Verständnis der Pathogenese des T1D als auch als zusätzliche diagnostische Marker von großem Interesse.

Die vorliegende Arbeit charakterisiert über die genannten Autoantikörper hinaus auch deren Titer, Epitop- und Subklassenspezifitäten in der jeweils ersten Autoantikörper-positiven Serumprobe bei erstgradig Verwandten von Typ 1-Diabetikern. Die besonderen Stärken dieser Studie sind dabei nicht nur die genannten umfangreichen Messungen von Autoantikörper-Charakteristika, sondern zudem die Größe der Kohorte der untersuchten Autoantikörper-positiven Verwandten von Typ 1-Diabetikern aus zwei prospektiven Studienkollektiven mit langer Follow-up-Zeit. Jeder einzelne Marker wurde dabei in Hinblick auf seine Fähigkeit, die Krankheitsprogression voraussagen zu können, evaluiert.

Dieses Vorgehen ermöglichte die Identifizierung von Hochrisikopersonen für die Entwicklung eines T1D in diesem Kollektiv, und es konnten in einer multivariaten Analyse verschiedene Modelle zur Risikostratifizierung erarbeitet werden.

Die Ergebnisse zeigten für Verwandtschaftsgrad, Geschlecht oder Alter (jünger bzw. älter als 15 Jahre) keine signifikante Assoziation mit dem Risiko für die Entwicklung eines T1D. Dabei fand sich zwar ein erhöhtes relatives Risiko für die Personen unter 15 Jahren, was allerdings knapp nicht signifikant war ($p=0,06$). Diese Beobachtung einer höheren Erkrankungsprävalenz in jüngerem Lebensalter bzw. Sinken des Erkrankungsalters wurde schon in anderen publizierten Verwandtenstudien gemacht (91, 115); die Inzidenz im jüngeren Kindesalter nimmt wohl sogar insgesamt zu und die Progression vom Beginn des

Immunprozesses bis zum Krankheitsausbruch beschleunigt sich (88). Die Ursachen dafür sind letztlich noch nicht geklärt, möglicherweise sind als Ursache der steigenden T1D-Inzidenz bei Kleinkindern unbekannte körpereigene Mechanismen abgeschwächt, die normalerweise bei der autoimmunen Zerstörung der Inselzellen regulierend eingreifen können (118).

Die Daten der vorliegenden Studie zeigen, dass die Seren der meisten getesteten Personen Antikörper-positiv waren für GAD (83%); IA-2A und IAA traten deutlich seltener auf (34% bzw. 40%). Häufig (bei 56% der Seren) waren nur Antikörper gegen ein Inselzellantigen nachweisbar, jedoch gab es andererseits auch Verwandte, die Autoantikörper gegen alle 3 untersuchten Inselzellantigene hatten (13%). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Forschergruppen war die IAA-Prävalenz im Kleinkindalter am höchsten und korrelierte invers mit dem Alter der untersuchten Personen (109).

IA-2A waren besonders starke Prädiktoren des T1D in der untersuchten Kohorte und waren wie in anderen Studien (34, 38) auch hochspezifische Risikoindikatoren sogar in Abwesenheit von Autoantikörpern gegen GAD oder Insulin mit einem 10-Jahres-Diabetesrisiko von 47% ($p=0,05$). Im Gegensatz dazu können GADA auch bei anderen Erkrankungen gefunden werden und sind in Abwesenheit von IA-2A mit einem relativ geringen Risiko assoziiert (18, 116).

Interessant war, dass in der vorliegenden Untersuchung die Anzahl und Kombinationen der Inselzell-Autoantikörper, die in der Studienkohorte gefunden wurden, ähnlich waren wie bei den Inselzell-Autoantikörper-positiven Verwandten, die in der Diabetes-Prevention-Trial-1(DPT-1) -Studie identifiziert wurden (62), was ein Hinweis darauf ist, dass die Ergebnisse keinem Selektionsbias unterlagen.

Wie schon in zahlreichen bisher publizierten Studien (16, 64, 73, 110, 116) konnte auch hier ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für T1D bei Auftreten von mehr als einem positiven Autoantikörper gezeigt werden: das 10-Jahres-Diabetesrisiko bei 2 positiven Antikörpern betrug 59%, bei drei positiven Antikörpern 69% (jeweils $p<0,001$). Abweichend zur Studie von Verge et al. (110) ergab sich in den vorliegenden Daten jedoch bei Positivität für alle drei Autoantikörper keine Assoziation mit einem signifikant erhöhten Krankheitsrisiko gegenüber Personen, die nur zwei der Autoantikörper aufwiesen. Es zeigte sich hier, dass Verwandte mit nachgewiesener Kombination aus IA-2A und IAA ein 100%-iges 10-Jahreserkrankungsrisiko hatten ($p<0,001$), was jedoch wegen der geringen Anzahl der Probanden ($n=3$) nicht überinterpretiert werden sollte. Bei Positivität für alle drei Autoantikörper blieben somit 31% der Verwandten wahrscheinlich für mindestens 10 Jahre diabetesfrei (Tabelle 10). Ältere Studien haben in ähnlicher Weise gezeigt, dass einige

Familienmitglieder mit allen vier Inselzell-Autoantikörpern (ICA, GADA, IA-2A und IAA) relativ geschützt vor Diabetesentwicklung sein können (43, 64).

Eine weitere wichtige Erkenntnis aus dieser Arbeit war, dass das Ausmaß der humoralen Immunantwort - wie über die Messung von IgG-Subklassen und Epitopreaktivität bestimmt - in direktem Bezug zur Höhe des Autoantikörper-Titers stand. In einer Studie von Harrison et al (47) wurde eine inverse Beziehung zwischen Autoantikörper-Titern und potentiell β -Zell-destruktiver T-Zell-Antwort vorgeschlagen. Es zeigte sich in den hier gewonnenen Daten, dass hohe IA-2A-Titer oberhalb der 25. Perzentile (10-Jahres-Diabetesrisiko 79%; $p=0,002$ gegenüber IA-2A-Titer unterhalb der 25. Perzentile) und hohe IAA-Titer oberhalb der 75. Perzentile (10-Jahres-Diabetesrisiko 77%; $p=0,002$ gegenüber IAA-Titer unterhalb der 75. Perzentile) mit dem Risiko, an T1D zu erkranken, korrelierten. Yu et al. hatten in ihrer Studie eine inverse Korrelation zwischen T1D-Risiko und GADA-Titer beschrieben (114). Für GADA-Titer fand sich in dieser Arbeit keine signifikante Assoziation. Obwohl sich bei den untersuchten Personen mit niedrigen GADA-Titern kein erhöhtes Erkrankungsrisiko fand, entwickelte keiner der sechs Probanden mit sehr hohen GADA-Titern (in Kategorie 4) T1D. Somit können diese Ergebnisse nicht die Hypothese belegen, dass eine starke humorale Immunantwort gegen Autoantigene Hinweis auf eine protektive TH2-Antwort ist.

Dennoch bleibt die Bestimmung der Autoantikörper-Titer ein bedeutender Baustein in der T1D-Risikoeinschätzung. Für den hier nicht untersuchten ICA-Titer war früher bereits gezeigt worden, dass er direkt mit erhöhtem Typ-1-Diabetes-Risiko korreliert (22).

Übereinstimmend zu vorangegangenen Studien (26, 81) bestanden die Subklassenspezifischen Immunantworten bei allen drei untersuchten Inselzell-Autoantikörpern GADA, IA-2A und IAA vorwiegend aus IgG1, die zweithäufigsten Subklassen bei GADA und IA-2A waren IgG2 und IgG4. Life-table-Analysen zeigten, dass zumindest bei GADA und IA-2A die IgG1-Messung keinen zusätzlichen Beitrag über die Bestimmung der Antikörper hinaus zu leisten vermag, sondern lediglich die Gesamtreaktivität widerspiegelt. IgG3-Subklassen wurden nur bei Insulinautoantikörpern in gleichem Ausmaß wie IgG2 und IgG4 beobachtet und waren mit erhöhtem Erkrankungsrisiko assoziiert ($p=0,04$); diese Beobachtung deutet in eine ähnliche Richtung wie die Beschreibung von Hoppu et al. (51), dass niedrige IAA-IgG3-Antworten eine relative T1D-Protektion repräsentieren. Bei GADA und IA-2A waren IgG3 und IgE die am seltensten nachzuweisenden Subklassen. Eine von Seissler et al. (100) beschriebene Protektion bei Auftreten von IA-2-IgG4 konnte hier nicht bestätigt werden, auch keine für IA-2-IgE wie in der finnischen DIPP-Studie beschrieben (50), wobei in letzterer Studie anders als in dieser Arbeit nur Probanden mit dem HLA-Risikotyp DQB1 ausgewählt wurden und das Durchschnittsalter jünger war, was möglicherweise den Unterschied

mitbedingen könnte. Es fanden sich insgesamt in den gezeigten Daten keine Hinweise auf assoziierte Diabetes-Protektivität für irgendeine der Autoantikörper-Subklassen. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit der Beobachtung der BABYDIAB-Studie (24).

Demgegenüber war bei IA-2A- und IAA-positiven Verwandten das Auftreten von IgG2-, IgG3- und/oder IgG4-Subklassen im Cox's proportional Hazard-Modell und in der multivariaten Analyse mit einem signifikant höheren Diabetesrisiko assoziiert als das Auftreten keiner dieser drei IgG-Subklassen ($p=0,0001$ für IA-2A; $p=0,009$ für IAA), was ähnlich auch in der finnischen prospektiven DiMe-Studie für IAA und IA-2A beschrieben wurde (49, 51). IA-2A-IgG2 war in der Cox-Regressionsanalyse der stärkste Prädiktor unter allen signifikanten Parametern für die Entwicklung eines T1D. Da T-Zell-Reaktivität in der vorliegenden Studie nicht gemessen wurden, können keine Aussagen über eine mögliche Korrelation individueller Subklassen mit einer TH1- oder TH2-Immunantwort gemacht werden. Petersen et al (89) beobachteten eine andere Reihenfolge der GADA-Subklassenhäufigkeit bei Patienten mit Stiff-man-Syndrom (IgG1 > IgG4 > IgG2 > IgG3 > IgE > IgM > IgA) als bei erstgradig Verwandten von Typ 1-Diabetikern mit niedrigem Erkrankungsrisiko (IgG1 > IgM > IgE > IgG4 > IgG3 > IgA > IgG2); dies ist möglicherweise durch die Tatsache zu erklären, dass das Auftreten der IgG2- und IgG4-Antworten mit höheren Antikörper-Titern einhergeht, wie hier gezeigt werden konnte.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der IA-2A- und IAA-Subklassen fand sich hier keine Assoziation einer breiten GADA-Subklassen-Antwort mit dem Erkrankungsrisiko. Dies ist konkordant mit der Arbeit von Hoppu et al. (52); eine Studie hatte diesbezüglich jedoch auch differierende Beobachtungen gemacht, dass nämlich eine breite, drei bis vier GADA-IgG-Subklassen umfassende Immunantwort mit erhöhtem Progressionsrisiko assoziiert war (96), so dass sicher weitere Untersuchungen nötig sind, um die Subklassenimmunantwort genauer einordnen zu können.

Autoantikörper gegen GAD richteten sich meist gegen die mittlere oder die c-terminale Region (bei 75,8% der GADA-positiven Verwandten gegen beide gleichzeitig), was die Ergebnisse früherer Studien bestätigt, dass die mittlere und c-terminale Region die primären Ziele der GAD-spezifischen Immunantwort bei T1D sind (24, 95); GAD67 und die n-terminale Region wurden seltener erkannt. Bezüglich der GAD-Epitope fanden sich wie in einer früheren finnischen Studie (52) keine Konstellationen, die signifikant mit erhöhtem Erkrankungsrisiko assoziiert waren.

Bezüglich der IA-2A-Epitope zeigte sich, dass die Prävalenz von Antikörpern gegen Epitope in der PTP-Region von IA-2 höher war als die Prävalenz von Antikörpern gegen die JM-Region oder diejenige von kreuzreaktiven Antikörpern gegen die PTP-Region von IA-2 und IA-2 β . Für die Verwandten mit nachgewiesener Reaktivität gegen multiple IA-2-Epitope

bestand in Übereinstimmung mit der Arbeit von Bonifacio et al. aus dem Jahr 1998 (25) ein signifikant erhöhtes 10-Jahres-Erkrankungsrisiko (hier 75%); ebenso für Verwandte mit kreuzreaktiven Antikörpern gegen die PTP-Region von IA-2 und IA-2 β (86%) (Tabelle 14). Letztere Beobachtung deckt sich auch mit der Studie von Christie et al (34). Zwar wurde eine Ausweitung der IA-2A-Reaktivität auf das IA-2 β -Molekül bereits von Naserke et al. diskutiert (80), jedoch angenommen, dass diese eher zu einem späteren Zeitpunkt des Autoimmunprozesses auftritt. In der vorliegenden Untersuchung fanden sich kreuzreaktive IA-2/IA-2 β -Antikörper bei Personen, die einen T1D entwickelten jedoch auch bereits bis zu 7 Jahre vor Krankheitsmanifestation. Da Antikörper-Reaktivität gegen IA-2 β fast ausschließlich bei IA-2A-positiven Verwandten vorkommt, könnte die IA-2A β -Bestimmung die Spezifität der Krankheitsprädiktion erhöhen; diese Annahme wird auch durch die Ergebnisse der Studie von MacLaren et al. gestützt (73). In der BABYDIAB-Studie (80) und einer finnischen Studie, in der jedoch Personen mit genetisch erhöhtem Risiko untersucht wurden (50), hatte sich abweichend dazu eine stärkere Assoziation zwischen dem Auftreten von IA-2-JM-Epitopen als von kreuzreaktiven Antikörpern mit erhöhtem T1D-Erkrankungsrisiko gezeigt.

Es zeigten sich somit zusammenfassend in der univariaten Analyse folgende Parameter als signifikant mit einem erhöhtem T1D-Risiko assoziiert: Auftreten multipler Autoantikörper (zwei oder mehr); IA-2A-Titer oberhalb der 25.Perzentile; IAA-Titer oberhalb der 75.Perzentile; IgG2-, IgG3- und/oder IgG4- Subklassen von IAA und IA-2A; Auftreten multipler IA-2A-Epitope und Auftreten IA-2 β -reaktiver IA-2A.

Nach Einschluss dieser genannten mit erhöhtem T1D-Risiko assoziierten Parameter in die multivariate Analyse wurde statistische Signifikanz für das T1D-Risiko bei den Autoantikörper-positiven Verwandten für folgende dieser Parameter erreicht: IA-2A-Titer oberhalb der 25.Perzentile sowie IAA-IgG2-, IgG3- und/oder IgG4- Subklassen und IA-2A-IgG2-, IgG3- und/oder IgG4-Subklassen.

In einer zusätzlich durchgeführten multivariaten Analyse, in die die teure und noch nicht weit verbreitete Subklassentestung nicht eingeschlossen wurde, wurde für das Auftreten von IA-2A-Titern oberhalb der 25.Perzentile und IAA-Titern oberhalb der 75.Perzentile statistische Signifikanz erreicht.

Es stellten sich also in dieser Kohorte zusammenfassend IA-2A- und IAA-IgG-Subklassen und IA-2A-Epitopreaktivität als Risikomodifikatoren heraus. Trotz der starken Assoziation anderer diabetes-assoziiertes Charakteristika mit hochtitrigen Autoantikörpern zeigte die multivariate Analyse, dass der IA-2A-IgG-Subklassen-Status die Risikoeinschätzung signifikant verbesserte; dabei war er dem IAA-Titer überlegen. Die Ursache dieses

Phänomens ist unklar. Möglicherweise spiegeln diese Charakteristika spezifische Mechanismen wider, die der Pathogenese des Typ-1-Diabetes zugrundeliegen, oder verbessern die Genauigkeit der Messung der Autoantikörper-Titer, welche artifiziell niedrig erscheinen könnten, wenn Autoantikörper an multiple Epitope binden. Somit wird in der vorliegenden Arbeit die Hypothese unterstützt, dass hohe Autoantikörper-Titer primäre Marker des Diabetesrisikos sind, und dass multiple IgG-Subklassen und IA-2 β -Positivität als bestätigende Marker hochtitriger Antworten dienen. Die gefundenen Ergebnisse bestätigen auch die Hypothese, dass hochtitrige und gegen multiple Ziele gerichtete Autoantikörper-Antworten eine späte oder aggressive Phase des präklinischen Typ-1-Diabetes kennzeichnen.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden durch das Kombinieren verschiedener Autoantikörper-Charakteristika vier exemplarische Modelle entwickelt, die alle signifikant das Erkrankungsrisiko bei erstgradig Verwandten von Typ 1-Diabetikern stratifizieren konnten, aber unterschiedlich Schwerpunkte setzten. Wert gelegt wurde einerseits auf bestmögliche Risikodiskrimination, andererseits aber auch auf ökonomische Gesichtspunkte und die Benutzung etablierter und standardisierter Parameter, die in sensitiven, spezifischen und konkordanten Assays bestimmt werden können.

Modell 1 beschränkte sich auf die etablierte Bestimmung der drei Autoantikörper GADA, IA-2A und IAA, die in vielen Labors etabliert, international standardisiert und relativ wenig kostenintensiv ist. Dabei zeigte sich, dass mit diesen Methoden immerhin Gruppen mit einem 10-Jahres-Diabetesrisiko zwischen 25% und 69% unterschieden werden konnten.

Dank der Größe der Studienpopulation konnte ferner ein sehr effektives Modell entwickelt werden (Modell 2), das durch die Messung von verschiedenen Autoantikörper-Charakteristika (IA-2A-Quantifizierung und Messung der IA-2A- und IAA-Subklassen) eine Subgruppe von Verwandten mit einem 89%-igen Diabetesrisiko innerhalb von 5 Jahren und einer Subgruppe von Verwandten, deren Risiko unter 10% lag, identifizieren konnte. Unter praktischen Gesichtspunkten ist die Anwendbarkeit eines solchen Modells auf klinische Studien natürlich abhängig von der Möglichkeit, diese Charakteristika reproduzierbar messen zu können. Vorhergehende Studien kamen zum Ergebnis, dass zumindest die Quantifizierung von IA-2A in den verschiedenen Laboren relativ konkordant ist (15), die Subklassenbestimmung jedoch teurer und schwieriger zu standardisieren ist und nicht routinemäßig durchgeführt werden kann.

Trotz großer Konfidenzintervalle konnten Modell 2 und das nachfolgend beschriebene Modell 3 sogar eine Gruppe von Hochrisikopersonen in dem untersuchten Kollektiv identifizieren, die zu 100% innerhalb von 6 Jahren Follow-up-Zeit einen Diabetes entwickelte (Modell 2 und 3). Praktikabler und ohne entscheidenden Informationsverlust ist sicherlich das Modell 3 mit

einer etwas geringeren 5-Jahres-Risikodiskrimination von 8 bis 86%, das aber allein durch die Messung von IA-2A- und IAA-Titern ohne die Subklassenbestimmung das Diabetesrisiko effizient stratifizieren konnte.

Ein weiteres etwas weniger effektives, aber dafür relativ einfaches Modell (Modell 4) basierte auf der alleinigen IA-2A- und IA-2 β A-Testung; allein der Nachweis von IA-2 β -Autoantikörpern konnte hierbei effektiv eine relativ große Gruppe von Probanden mit einem 10-Jahreserkrankungsrisiko zwischen 27% und 86% identifizieren. Diese Messung ist ebenso etabliert wie die Messung von IA-2A (4, 19, 99).

Die Modelle zur Risikostratifizierung waren dabei effizient sowohl bei den Verwandten, die positiv für nur einen einzigen Autoantikörper-Marker waren, als auch bei den Verwandten, die multiple Inselzell-Autoantikörper besaßen. Möglicherweise könnten in Zukunft diese Modelle durch Einschluss weiterer Parameter noch besser zur Stratifizierung des Diabetesrisikos beitragen. Eine Limitierung der vorliegenden Arbeit besteht darin, dass die ZnT8-Antikörper nicht untersucht wurden und somit eventuell andere spezifische Muster, die eine Relevanz haben könnten, nicht gefunden werden konnten. Auch wäre eine weitere Optimierung denkbar durch die Hinzunahme zusätzlicher metabolischer oder genetischer Daten, die hier nicht vorlagen und so nicht berücksichtigt werden konnten. Als weitere mögliche Einschränkung der Aussagekraft könnte die Komplexität der Analysen zu falsch-positiven oder falsch-negativen Zusammenhängen geführt haben.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit zusammenfassend gezeigt werden, dass die Bestimmung zusätzlicher Inselzell-Autoantikörper-Charakteristika, nämlich Autoantikörper-Titer, -Subklassen, Epitopreaktivität und/oder Positivität gegen IA-2 β über die reine Messung der Autoantikörper GADA, IA-2A und IAA hinaus die Stratifizierung des Diabetesrisikos bei erstgradig Verwandten von Typ 1-Diabetikern verbessern kann, und zwar bereits mit der Untersuchung einer einzigen Serumprobe. Wie auch in einer weiteren Studie am gleichen Patientenkollektiv gezeigt, kann sich im Verlauf das Profil der intraindividuellen Immunantwort verändern, so dass sicherlich jährliche Kontrolluntersuchungen sinnvoll sind, um das Risiko des einzelnen neu einschätzen zu können (6). Diese Beobachtungen müssen noch in anderen großen Kohorten validiert werden, haben jedoch bei Bestätigung das Potential, das Screening und die Rekrutierung von Probanden für klinische (Interventions-) Studien maßgeblich zu vereinfachen und zu verbessern. Um die vorgeschlagenen neuen Modelle weiter zu evaluieren, wäre es wünschenswert, wenn diese auch bei erstgradig Verwandten von Typ 1-Diabetikern aus anderen Studienkollektiven Anwendung fänden.

7 Zusammenfassung

Der Typ 1-Diabetes (T1D) ist eine Stoffwechselerkrankung multifaktorieller Genese, bei der es auf der Grundlage einer genetischen Prädisposition im Lauf der Zeit durch vermutlich zusätzliche exogene Triggerfaktoren zu einer Autoimmuninsulinitis kommt, die chronisch progredient verläuft und letztendlich zu einer Zerstörung der β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas und zu absolutem Insulinmangel führt. Da bereits in der prädiabetischen Phase, die der klinischen Krankheitsmanifestation Jahre voraus gehen kann, Inselzell-Autoimmunität durch die Bestimmung von Inselzell-Autoantikörpern serologisch nachgewiesen werden kann, ist die detaillierte Charakterisierung der individuellen Immunantwort und die Untersuchung deren Assoziation mit dem Erkrankungsrisiko von entscheidender Bedeutung, um Risikopersonen identifizieren und in zukünftige Interventionsstudien einschließen zu können.

In dieser Arbeit wurde eine komplexe Analyse der humoralen Autoimmunantwort bei erstgradig Verwandten von Typ 1-Diabetikern durchgeführt. In den Seren von 180 Inselzell-Autoantikörper-positiven Personen aus der Bart's-Oxford- und der Münchner Familienstudie, die zu den weltweit größten derartigen prospektiv untersuchten Kohorten zählen, wurden zum Zeitpunkt der ersten verfügbaren Antikörper-positiven Probe die Diabetes-relevanten Autoantikörper gegen Insulin (IAA), Glutamat-Decarboxylase (GADA) und IA-2 (IA-2A) sowie die jeweiligen Autoantikörper-Titer, -Subklassen (IgG1-4, IgM, IgA, IgE) und – Epitopspezifitäten bestimmt und in Hinblick auf ihren prädiktiven Wert für die Entwicklung eines T1D in uni- und multivariaten Analysen untersucht.

Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede im Profil der drei Inselzell-Autoantikörper-Spezifitäten bestehen, und dass auch deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Markern bezüglich des Auftretens bestimmter Charakteristika und dem damit assoziierten Diabetesrisiko existieren. Ferner konnten Autoantikörper-Profile identifiziert werden, die mit einer hohen Spezifität Rückschlüsse auf die Krankheitsprogression gestatten. Verwandtschaftsbeziehung zum erkrankten Familienmitglied, Geschlecht oder Alter zeigten keine signifikante Assoziation mit dem Erkrankungsrisiko.

Es zeigte sich ein signifikant erhöhtes Diabetesrisiko beim Auftreten multipler Inselzell-Autoantikörper: das 10-Jahres-Diabetesrisiko bei 2 positiven Antikörpern betrug 59%, bei drei positiven Antikörpern 69% (jeweils $p < 0,001$); letzteres brachte gegenüber dem Auftreten

von zwei Antikörpern keine zusätzliche signifikante Steigerung des Risikos mit sich. Der Nachweis von IA-2A war ebenfalls mit einem signifikanten Erkrankungsrisiko assoziiert (47% in 10 Jahren; $p=0,05$).

Als ein weiteres Hauptergebnis wurde deutlich, dass eine Assoziation zwischen Diabetesrisiko und einer intensiven humoralen Autoimmunantwort gegen die Antigene Insulin und IA-2 besteht, die sowohl hohe Antikörper-Titer von IAA (oberhalb der 75. Perzentile) und/oder IA-2A (oberhalb der 25. Perzentile) als auch das Auftreten von multiplen IgG-Subklassen und Antikörper-Reaktivität gegen multiple IA-2-Epitope beinhaltet. Insbesondere die Ausweitung der humoralen Immunantwort auf Epitopregionen, die ebenfalls auf dem IA-2-homologen Protein IA-2 β vorkommen (IA-2/IA-2 β -kreuzreagierende Autoantikörper) war mit einer signifikanten Erhöhung des Diabetesrisikos verbunden; $p=0,005$). Für GADA- Titer, -Epitopspezifität oder -Subklassen fand sich keine zusätzliche Assoziation mit dem Diabetesrisiko.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden hier vier neue Prädiktionsmodelle vorgeschlagen, die es ermöglichten, unter Autoantikörper-positiven Verwandten das 5-Jahres-Diabetesrisiko signifikant von <10% bis >85% zu stratifizieren. Dabei wurde einerseits auf bestmögliche Risikodiskrimination Wert gelegt, andererseits aber auch auf ökonomische Gesichtspunkte und die Benutzung etablierter und standardisierter Parameter. In zwei der Modelle wurden dabei Personen identifiziert, die alle nach 6 Jahren einen Diabetes entwickelten. Zwei alternative, aber einfacher durchführbaren Modelle, die nur auf der Autoantikörper-Anzahl alleine oder der Reaktivität gegen IA-2 β beruhten, erreichten auch eine Stratifizierung des 5-Jahresrisikos zwischen 12% und 48% bzw. 11% und 63%.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass die Bestimmung zusätzlicher Inselzell-Autoantikörper-Charakteristika, nämlich Autoantikörper-Titer, -Subklassen, Epitopreaktivität und/oder Positivität gegen IA-2 β die Stratifizierung des Diabetesrisikos bei erstgradig Verwandten von Typ 1-Diabetikern verbessern kann, und zwar bereits mit der Untersuchung einer einzigen Serumprobe. Damit wurden Ergebnisse erzielt, die für die Rekrutierung von Hochrisikopersonen für Immuninterventionsstudien genutzt werden können. In Zukunft werden diese sicherlich - auch in Kombination mit hier nicht berücksichtigten Parametern wie genetischen Untersuchungen oder metabolischen Daten sowie neu entdeckten Markern der Inselzellimmunität - weiter verbessert werden können und dadurch noch besser zum Verständnis von Pathogenese und Krankheitsprogression des T1D beitragen.

8 Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
CD	Cluster of differentiation
CI	Konfidenzintervall
cpm	Counts per Minute (Zerfallsrate)
GAD	Glutamatdecarboxylase
GADA	Glutamatdecarboxylase-Antikörper
HLA	Human leucocyte antigen
ICA	(zytoplasmatische) Inselzellantikörper
IAA	Insulin-Autoantikörper
IA-2	Protein-Tyrosinphosphatase IA-2
IA-2A	Antikörper gegen die Protein-Tyrosinphosphatase IA-2
IA-2 β	Protein-Tyrosin-Phosphatase IA-2 β
IA-2 β A	Antikörper gegen die Protein-Tyrosinphosphatase IA-2 β
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
J.	Jahre
JM	juxtamembranär
Kat.	Kategorie
kDa	kilo Dalton
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
SDS	standard deviation score
SE	standard error
T1D	Typ 1-Diabetes
TH1, TH2-Zellen	T-Helfer 1 - bzw. T-Helfer 2 – Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
U	units
vs.	versus
x bzw. x-react	kreuzreaktiv

9 Literaturverzeichnis

1. American Diabetes Association. 2004. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 27 Suppl 1: S5-S10.
2. Aanstoot HJ, Kang SM, Kim J, Lindsay LA, Roll U, Knip M, Atkinson M, Mose-Larsen P, Fey S, Ludvigsson J, Landin L, Bruining J, Maclaren N, Akerblom HK, Baekkeskov S. 1996. Identification and characterization of glima 38, a glycosylated islet cell membrane antigen, which together with GAD65 and IA2 marks the early phases of autoimmune response in type 1 diabetes. *J Clin Invest* 97 (12): 2772-83.
3. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383 (6603): 787-93.
4. Achenbach P, Bonifacio E, Williams AJ, Ziegler AG, Gale EA, Bingley PJ. 2008. Autoantibodies to IA-2beta improve diabetes risk assessment in high-risk relatives. *Diabetologia* 51 (3): 488-92.
5. Achenbach P, Koczwara K, Knopff A, Naserke H, Ziegler AG, Bonifacio E. 2004. Mature high-affinity immune responses to (pro)insulin anticipate the autoimmune cascade that leads to type 1 diabetes. *J Clin Invest* 114 (4): 589-97.
6. Achenbach P, Warncke K, Reiter J, Williams AJ, Ziegler AG, Bingley PJ, Bonifacio E. 2006. Type 1 diabetes risk assessment: improvement by follow-up measurements in young islet autoantibody-positive relatives. *Diabetologia* 49 (12): 2969-76.
7. Aly TA, Ide A, Jahromi MM, Barker JM, Fernando MS, Babu SR, Yu L, Miao D, Erlich HA, Fain PR, Barriga KJ, Norris JM, Rewers MJ, Eisenbarth GS. 2006. Extreme genetic risk for type 1A diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (38): 14074-9.
8. Arden SD, Roep BO, Neophytou PI, Usac EF, Duinkerken G, de Vries RR, Hutton JC. 1996. Imogen 38: a novel 38-kD islet mitochondrial autoantigen recognized by T cells from a newly diagnosed type 1 diabetic patient. *J Clin Invest* 97 (2): 551-61.
9. Atkinson M, Honeyman M, Peakman M, Roep B. 2000. T-cell markers in type 1 diabetes: progress, prospects and realistic expectations. *Diabetologia* 43 (6): 819-20.
10. Atkinson MA. 2005. ADA Outstanding Scientific Achievement Lecture 2004. Thirty years of investigating the autoimmune basis for type 1 diabetes: why can't we prevent or reverse this disease? *Diabetes* 54 (5): 1253-63.
11. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, De Camilli P. 1990. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347 (6289): 151-6.
12. 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. 2009. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet* 41 (6): 703-7.

13. Bell GI, Horita S, Karam JH. 1984. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 33 (2): 176-83.
14. Bingley PJ. 1996. Interactions of age, islet cell antibodies, insulin autoantibodies, and first-phase insulin response in predicting risk of progression to IDDM in ICA+ relatives: the ICARUS data set. Islet Cell Antibody Register Users Study. *Diabetes* 45 (12): 1720-8.
15. Bingley PJ, Bonifacio E, Mueller PW. 2003. Diabetes Antibody Standardization Program: first assay proficiency evaluation. *Diabetes* 52 (5): 1128-36.
16. Bingley PJ, Bonifacio E, Williams AJ, Genovese S, Bottazzo GF, Gale EA. 1997. Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes* 46 (11): 1701-10.
17. Bingley PJ, Bonifacio E, Ziegler AG, Schatz DA, Atkinson MA, Eisenbarth GS. 2001. Proposed guidelines on screening for risk of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24 (2): 398.
18. Bingley PJ, Christie MR, Bonifacio E, Bonfanti R, Shattock M, Fonte MT, Bottazzo GF, Gale EA. 1994. Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. *Diabetes* 43 (11): 1304-10.
19. Bingley PJ, Gale EA. 2006. Progression to type 1 diabetes in islet cell antibody-positive relatives in the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial: the role of additional immune, genetic and metabolic markers of risk. *Diabetologia* 49 (5): 881-90.
20. Bingley PJ, Williams AJ, Gale EA. 1999. Optimized autoantibody-based risk assessment in family members. Implications for future intervention trials. *Diabetes Care* 22 (11): 1796-801.
21. Bodansky HJ, Staines A, Stephenson C, Haigh D, Cartwright R. 1992. Evidence for an environmental effect in the aetiology of insulin dependent diabetes in a transmigratory population. *Bmj* 304 (6833): 1020-2.
22. Bonifacio E, Bingley PJ, Shattock M, Dean BM, Dunger D, Gale EA, Bottazzo GF. 1990. Quantification of islet-cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 335 (8682): 147-9.
23. Bonifacio E, Genovese S, Braghi S, Bazzigaluppi E, Lampasona V, Bingley PJ, Rogge L, Pastore MR, Bognetti E, Bottazzo GF, et al. 1995. Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity. *Diabetologia* 38 (7): 816-22.
24. Bonifacio E, Lampasona V, Bernasconi L, Ziegler AG. 2000. Maturation of the humoral autoimmune response to epitopes of GAD in preclinical childhood type 1 diabetes. *Diabetes* 49 (2): 202-8.
25. Bonifacio E, Lampasona V, Bingley PJ. 1998. IA-2 (islet cell antigen 512) is the primary target of humoral autoimmunity against type 1 diabetes-associated tyrosine phosphatase autoantigens. *J Immunol* 161 (5): 2648-54.
26. Bonifacio E, Scirpoli M, Kredel K, Fuchtenbusch M, Ziegler AG. 1999. Early autoantibody responses in prediabetes are IgG1 dominated and suggest antigen-specific regulation. *J Immunol* 163 (1): 525-32.

27. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. 1974. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 2 (7892): 1279-83.
28. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, MacMurray J, Meloni GF, Lucarelli P, Pellecchia M, Eisenbarth GS, Comings D, Mustelin T. 2004. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 36 (4): 337-8.
29. Brooks-Worrell B, Gersuk VH, Greenbaum C, Palmer JP. 2001. Intermolecular antigen spreading occurs during the preclinical period of human type 1 diabetes. *J Immunol* 166 (8): 5265-70.
30. Butler MH, Solimena M, Dirx R, Jr., Hayday A, De Camilli P. 1993. Identification of a dominant epitope of glutamic acid decarboxylase (GAD-65) recognized by autoantibodies in stiff-man syndrome. *J Exp Med* 178 (6): 2097-106.
31. Castano L, Russo E, Zhou L, Lipes MA, Eisenbarth GS. 1991. Identification and cloning of a granule autoantigen (carboxypeptidase-H) associated with type I diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 73 (6): 1197-201.
32. Castano L, Ziegler AG, Ziegler R, Shoelson S, Eisenbarth GS. 1993. Characterization of insulin autoantibodies in relatives of patients with type I diabetes. *Diabetes* 42 (8): 1202-9.
33. Chang YH, Hwang J, Shang HF, Tsai ST. 1996. Characterization of human DNA topoisomerase II as an autoantigen recognized by patients with IDDM. *Diabetes* 45 (4): 408-14.
34. Christie MR, Genovese S, Cassidy D, Bosi E, Brown TJ, Lai M, Bonifacio E, Bottazzo GF. 1994. Antibodies to islet 37k antigen, but not to glutamate decarboxylase, discriminate rapid progression to IDDM in endocrine autoimmunity. *Diabetes* 43 (10): 1254-9.
35. Couper JJ, Harrison LC, Aldis JJ, Colman PG, Honeyman MC, Ferrante A. 1998. IgG subclass antibodies to glutamic acid decarboxylase and risk for progression to clinical insulin-dependent diabetes. *Hum Immunol* 59 (8): 493-9.
36. Dabelea D, Bell RA, D'Agostino RB, Jr., Imperatore G, Johansen JM, Linder B, Liu LL, Loots B, Marcovina S, Mayer-Davis EJ, Pettitt DJ, Waitzfelder B. 2007. Incidence of diabetes in youth in the United States. *Jama* 297 (24): 2716-24.
37. Daw K, Powers AC. 1995. Two distinct glutamic acid decarboxylase auto-antibody specificities in IDDM target different epitopes. *Diabetes* 44 (2): 216-20.
38. Decochez K, De Leeuw IH, Keymeulen B, Mathieu C, Rottiers R, Weets I, Vandemeulebroucke E, Truyen I, Kaufman L, Schuit FC, Pipeleers DG, Gorus FK. 2002. IA-2 autoantibodies predict impending type I diabetes in siblings of patients. *Diabetologia* 45 (12): 1658-66.
39. Dittler J, Seidel D, Schenker M, Ziegler AG. 1998. GADIA2-combi determination as first-line screening for improved prediction of type 1 diabetes in relatives. *Diabetes* 47 (4): 592-7.
40. Eisenbarth GS. 1986. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 314 (21): 1360-8.

41. Foulis AK, Liddle CN, Farquharson MA, Richmond JA, Weir RS. 1986. The histopathology of the pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia* 29 (5): 267-74.
42. Gale EA. 2002. The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. *Diabetes* 51 (12): 3353-61.
43. Gardner SG, Gale EA, Williams AJ, Gillespie KM, Lawrence KE, Bottazzo GF, Bingley PJ. 1999. Progression to diabetes in relatives with islet autoantibodies. Is it inevitable? *Diabetes Care* 22 (12): 2049-54.
44. Hagopian WA, Michelsen B, Karlsen AE, Larsen F, Moody A, Grubin CE, Rowe R, Petersen J, McEvoy R, Lernmark A. 1993. Autoantibodies in IDDM primarily recognize the 65,000-M(r) rather than the 67,000-M(r) isoform of glutamic acid decarboxylase. *Diabetes* 42 (4): 631-6.
45. Hagopian WA, Sanjeevi CB, Kockum I, Landin-Olsson M, Karlsen AE, Sundkvist G, Dahlquist G, Palmer J, Lernmark A. 1995. Glutamate decarboxylase-, insulin-, and islet cell-antibodies and HLA typing to detect diabetes in a general population-based study of Swedish children. *J Clin Invest* 95 (4): 1505-11.
46. Hall TR, Thomas JW, Padoa CJ, Torn C, Landin-Olsson M, Ortqvist E, Hampe CS. 2006. Longitudinal epitope analysis of insulin-binding antibodies in type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 146 (1): 9-14.
47. Harrison LC, Honeyman MC, DeAizpurua HJ, Schmidli RS, Colman PG, Tait BD, Cram DS. 1993. Inverse relation between humoral and cellular immunity to glutamic acid decarboxylase in subjects at risk of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 341 (8857): 1365-9.
48. Hawa MI, Fava D, Medici F, Deng YJ, Notkins AL, De Mattia G, Leslie RD. 2000. Antibodies to IA-2 and GAD65 in type 1 and type 2 diabetes: isotype restriction and polyclonality. *Diabetes Care* 23 (2): 228-33.
49. Hoppu S, Harkonen T, Ronkainen MS, Akerblom HK, Knip M. 2004. IA-2 antibody epitopes and isotypes during the prediabetic process in siblings of children with type 1 diabetes. *J Autoimmun* 23 (4): 361-70.
50. Hoppu S, Harkonen T, Ronkainen MS, Simell S, Hekkala A, Toivonen A, Ilonen J, Simell O, Knip M. 2006. IA-2 antibody isotypes and epitope specificity during the prediabetic process in children with HLA-conferred susceptibility to type I diabetes. *Clin Exp Immunol* 144 (1): 59-66.
51. Hoppu S, Ronkainen MS, Kimpimaki T, Simell S, Korhonen S, Ilonen J, Simell O, Knip M. 2004. Insulin autoantibody isotypes during the prediabetic process in young children with increased genetic risk of type 1 diabetes. *Pediatr Res* 55 (2): 236-42.
52. Hoppu S, Ronkainen MS, Kulmala P, Akerblom HK, Knip M. 2004. GAD65 antibody isotypes and epitope recognition during the prediabetic process in siblings of children with type I diabetes. *Clin Exp Immunol* 136 (1): 120-8.
53. Hummel M, Bonifacio E, Schmid S, Walter M, Knopff A, Ziegler AG. 2004. Brief communication: early appearance of islet autoantibodies predicts childhood type 1 diabetes in offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med* 140 (11): 882-6.

54. Hummel M, Fuchtenbusch M, Schenker M, Ziegler AG. 2000. No major association of breast-feeding, vaccinations, and childhood viral diseases with early islet autoimmunity in the German BABYDIAB Study. *Diabetes Care* 23 (7): 969-74.
55. Kallmann BA, Huther M, Tubes M, Feldkamp J, Bertrams J, Gries FA, Lampeter EF, Kolb H. 1997. Systemic bias of cytokine production toward cell-mediated immune regulation in IDDM and toward humoral immunity in Graves' disease. *Diabetes* 46 (2): 237-43.
56. Kallmann BA, Lampeter EF, Hanifi-Moghaddam P, Hawa M, Leslie RD, Kolb H. 1999. Cytokine secretion patterns in twins discordant for Type I diabetes. *Diabetologia* 42 (9): 1080-5.
57. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J. 2000. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes Care* 23 (10): 1516-26.
58. Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, Atkinson MA, Maclaren NK, Tobin AJ. 1992. Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 89 (1): 283-92.
59. Kawasaki E, Yu L, Rewers MJ, Hutton JC, Eisenbarth GS. 1998. Definition of multiple ICA512/phogrin autoantibody epitopes and detection of intramolecular epitope spreading in relatives of patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 47 (5): 733-42.
60. Kimpimaki T, Kupila A, Hamalainen AM, Kukko M, Kulmala P, Savola K, Simell T, Keskinen P, Ilonen J, Simell O, Knip M. 2001. The first signs of beta-cell autoimmunity appear in infancy in genetically susceptible children from the general population: the Finnish Type 1 Diabetes Prediction and Prevention Study. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (10): 4782-8.
61. Knip M, Siljander H. 2008. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmun Rev* 7 (7): 550-7.
62. Krischer JP, Cuthbertson DD, Yu L, Orban T, Maclaren N, Jackson R, Winter WE, Schatz DA, Palmer JP, Eisenbarth GS. 2003. Screening strategies for the identification of multiple antibody-positive relatives of individuals with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 88 (1): 103-8.
63. Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, Kahn CR. 1987. Epidemiologic approach to the etiology of type I diabetes mellitus and its complications. *N Engl J Med* 317 (22): 1390-8.
64. Kulmala P, Savola K, Petersen JS, Vahasalo P, Karjalainen J, Lopponen T, Dyrberg T, Akerblom HK, Knip M. 1998. Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings of children with diabetes. A population-based study. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *J Clin Invest* 101 (2): 327-36.
65. Kumar D, Gemayel NS, Deapen D, Kapadia D, Yamashita PH, Lee M, Dwyer JH, Roy-Burman P, Bray GA, Mack TM. 1993. North-American twins with IDDM. Genetic, etiological, and clinical significance of disease concordance according to age, zygosity, and the interval after diagnosis in first twin. *Diabetes* 42 (9): 1351-63.
66. Lambert AP, Gillespie KM, Thomson G, Cordell HJ, Todd JA, Gale EA, Bingley PJ. 2004. Absolute risk of childhood-onset type 1 diabetes defined by human leukocyte antigen class II genotype: a population-based study in the United Kingdom. *J Clin Endocrinol Metab* 89 (8): 4037-43.

67. Lampasona V, Bearzatto M, Genovese S, Bosi E, Ferrari M, Bonifacio E. 1996. Autoantibodies in insulin-dependent diabetes recognize distinct cytoplasmic domains of the protein tyrosine phosphatase-like IA-2 autoantigen. *J Immunol* 157 (6): 2707-11.
68. Li Q, Borovitskaya AE, DeSilva MG, Wasserfall C, Maclaren NK, Notkins AL, Lan MS. 1997. Autoantigens in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular cloning and characterization of human IA-2 beta. *Proc Assoc Am Physicians* 109 (4): 429-39.
69. Lohmann T, Hawa M, Leslie RD, Lane R, Picard J, Londei M. 2000. Immune reactivity to glutamic acid decarboxylase 65 in stiffman syndrome and type 1 diabetes mellitus. *Lancet* 356 (9223): 31-5.
70. Lohmann T, Sessler J, Verlohren HJ, Schroder S, Rotger J, Dahn K, Morgenthaler N, Scherbaum WA. 1997. Distinct genetic and immunological features in patients with onset of IDDM before and after age 40. *Diabetes Care* 20 (4): 524-9.
71. Lu J, Li Q, Xie H, Chen ZJ, Borovitskaya AE, Maclaren NK, Notkins AL, Lan MS. 1996. Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase, IA-2beta, as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37-kDa tryptic fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (6): 2307-11.
72. Lundgren M, Persson U, Larsson P, Magnusson C, Smith CI, Hammarstrom L, Severinson E. 1989. Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells. *Eur J Immunol* 19 (7): 1311-5.
73. Maclaren N, Lan M, Coutant R, Schatz D, Silverstein J, Muir A, Clare-Salzer M, She JX, Malone J, Crockett S, Schwartz S, Quattrin T, DeSilva M, Vander Vegt P, Notkins A, Krischer J. 1999. Only multiple autoantibodies to islet cells (ICA), insulin, GAD65, IA-2 and IA-2beta predict immune-mediated (Type 1) diabetes in relatives. *J Autoimmun* 12 (4): 279-87.
74. Mayr A, Schlosser M, Grober N, Kenk H, Ziegler AG, Bonifacio E, Achenbach P. 2007. GAD autoantibody affinity and epitope specificity identify distinct immunization profiles in children at risk for type 1 diabetes. *Diabetes* 56 (6): 1527-33.
75. Miao D, Yu L, Tiberti C, Cuthbertson DD, Rewers M, di Mario U, Eisenbarth GS, Dotta F. 2002. ICA512(IA-2) epitope specific assays distinguish transient from diabetes associated autoantibodies. *J Autoimmun* 18 (2): 191-6.
76. Morgenthaler NG, Seissler J, Achenbach P, Glawe D, Payton M, Meinck HM, Christie MR, Scherbaum WA. 1997. Antibodies to the tyrosine phosphatase-like protein IA-2 are highly associated with IDDM, but not with autoimmune endocrine diseases or stiff man syndrome. *Autoimmunity* 25 (4): 203-11.
77. Morran MP, Casu A, Arena VC, Pietropaolo S, Zhang YJ, Satin LS, Nelson P, Omenn GS, Trucco M, Becker DJ, Pietropaolo M. 2010. Humoral autoimmunity against the extracellular domain of the neuroendocrine autoantigen IA-2 heightens the risk of type 1 diabetes. *Endocrinology* 151 (6): 2528-37.
78. Naserke HE, Bonifacio E, Ziegler AG. 1999. Immunoglobulin G insulin autoantibodies in BABYDIAB offspring appear postnatally: sensitive early detection using a protein A/G-based radiobinding assay. *J Clin Endocrinol Metab* 84 (4): 1239-43.
79. Naserke HE, Dozio N, Ziegler AG, Bonifacio E. 1998. Comparison of a novel micro-assay for insulin autoantibodies with the conventional radiobinding assay. *Diabetologia* 41 (6): 681-3.

80. Naserke HE, Ziegler AG, Lampasona V, Bonifacio E. 1998. Early development and spreading of autoantibodies to epitopes of IA-2 and their association with progression to type 1 diabetes. *J Immunol* 161 (12): 6963-9.
81. Ng WY, Lui KF, Cheah JS, Thai AC. 2002. IgG1 subclass dominates autoimmune response to tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 in Chinese type 1 diabetes patients. *Horm Metab Res* 34 (10): 596-600.
82. Ng WY, Thai AC, Lui KF, Yeo PP, Cheah JS. 1999. Systemic levels of cytokines and GAD-specific autoantibodies isotypes in Chinese IDDM patients. *Diabetes Res Clin Pract* 43 (2): 127-35.
83. Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, Hoffman M, Eisenbarth GS, Erlich HA, Rewers M. 2003. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *Jama* 290 (13): 1713-20.
84. Norris JM, Beaty B, Klingensmith G, Yu L, Hoffman M, Chase HP, Erlich HA, Hamman RF, Eisenbarth GS, Rewers M. 1996. Lack of association between early exposure to cow's milk protein and beta-cell autoimmunity. *Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY)*. *Jama* 276 (8): 609-14.
85. Notkins AL. 2002. Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes. *J Biol Chem* 277 (46): 43545-8.
86. Notkins AL, Zhang B, Matsumoto Y, Lan MS. 1997. Comparison of IA-2 with IA-2beta and with six other members of the protein tyrosine phosphatase family: recognition of antigenic determinants by IDDM sera. *J Autoimmun* 10 (3): 245-50.
87. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL. 1983. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science* 222 (4630): 1337-9.
88. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltesz G. 2009. 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 (9680): 2027-33.
89. Petersen JS, Kulmala P, Clausen JT, Knip M, Dyrberg T. 1999. Progression to type 1 diabetes is associated with a change in the immunoglobulin isotype profile of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase (GAD65). *Childhood Diabetes in Finland Study Group*. *Clin Immunol* 90 (2): 276-81.
90. Potter KN, Wilkin TJ. 2000. The molecular specificity of insulin autoantibodies. *Diabetes Metab Res Rev* 16 (5): 338-53.
91. Pundziute-Lycka A, Dahlquist G, Nystrom L, Arnqvist H, Bjork E, Blohme G, Bolinder J, Eriksson JW, Sundkvist G, Ostman J. 2002. The incidence of Type I diabetes has not increased but shifted to a younger age at diagnosis in the 0-34 years group in Sweden 1983-1998. *Diabetologia* 45 (6): 783-91.
92. Rabin DU, Pleasic M, Shapiro JA, Yoo-Warren H, Oles J, Hicks JM, Goldstein DE, Rae PM. 1994. Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. *J Immunol*. 152 (6): 3183-8.
93. Redondo MJ, Jeffrey J, Fain PR, Eisenbarth GS, Orban T. 2008. Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. *N Engl J Med* 359 (26): 2849-50.

94. Rewers M, Stone RA, LaPorte RE, Drash AL, Becker DJ, Walczak M, Kuller LH. 1989. Poisson regression modeling of temporal variation in incidence of childhood insulin-dependent diabetes mellitus in Allegheny County, Pennsylvania, and Wielkopolska, Poland, 1970-1985. *Am J Epidemiol* 129 (3): 569-81.
95. Richter W, Shi Y, Baekkeskov S. 1993. Autoreactive epitopes defined by diabetes-associated human monoclonal antibodies are localized in the middle and C-terminal domains of the smaller form of glutamate decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (7): 2832-6.
96. Ronkainen MS, Hoppu S, Korhonen S, Simell S, Veijola R, Ilonen J, Simell O, Knip M. 2006. Early epitope- and isotype-specific humoral immune responses to GAD65 in young children with genetic susceptibility to type 1 diabetes. *Eur J Endocrinol* 155 (4): 633-42.
97. Schatz D, Krischer J, Horne G, Riley W, Spillar R, Silverstein J, Winter W, Muir A, Derovanessian D, Shah S, et al. 1994. Islet cell antibodies predict insulin-dependent diabetes in United States school age children as powerfully as in unaffected relatives. *J Clin Invest* 93 (6): 2403-7.
98. Schenker M, Hummel M, Ferber K, Walter M, Keller E, Albert ED, Janka HU, Kastendiek C, Sorger M, Louwen F, Ziegler AG. 1999. Early expression and high prevalence of islet autoantibodies for DR3/4 heterozygous and DR4/4 homozygous offspring of parents with Type I diabetes: the German BABYDIAB study. *Diabetologia* 42 (6): 671-7.
99. Schlosser M, Mueller PW, Achenbach P, Lampasona V, Bingley PJ. 2011. Diabetes Antibody Standardization Program: First evaluation of assays for autoantibodies to IA-2beta. *Diabetes Care* 34 (11): 2410-2.
100. Seissler J, Eikamp K, Schott M, Scherbaum WA. 2002. IA-2 autoantibodies restricted to the IgG4 subclass are associated with protection from type 1 diabetes. *Horm Metab Res* 34 (4): 186-91.
101. Seissler J, Morgenthaler NG, Achenbach P, Lampeter EF, Glawe D, Payton M, Christie M, Scherbaum WA. 1996. Combined screening for autoantibodies to IA-2 and antibodies to glutamic acid decarboxylase in first degree relatives of patients with IDDM. The DENIS Study Group. *Deutsche Nikotinamid Interventions-Studie. Diabetologia* 39 (11): 1351-6.
102. Smyth D, Cooper JD, Collins JE, Heward JM, Franklyn JA, Howson JM, Vella A, Nutland S, Rance HE, Maier L, Barratt BJ, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage DA, Dunger DB, Widmer B, Strachan DP, Ring SM, Walker N, Clayton DG, Twells RC, Gough SC, Todd JA. 2004. Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes* 53 (11): 3020-3.
103. Solimena M, Folli F, Aparisi R, Pozza G, De Camilli P. 1990. Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrome. *N Engl J Med* 322 (22): 1555-60.
104. Todd JA. 1995. Genetic analysis of type 1 diabetes using whole genome approaches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (19): 8560-5.
105. Toellner KM, Luther SA, Sze DM, Choy RK, Taylor DR, MacLennan IC, Acha-Orbea H. 1998. T helper 1 (Th1) and Th2 characteristics start to develop during T cell

- priming and are associated with an immediate ability to induce immunoglobulin class switching. *J Exp Med* 187 (8): 1193-204.
106. Tuomi T, Bjorses P, Falorni A, Partanen J, Perheentupa J, Lernmark A, Miettinen A. 1996. Antibodies to glutamic acid decarboxylase and insulin-dependent diabetes in patients with autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Clin Endocrinol Metab* 81 (4): 1488-94.
 107. Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KM, Smith AN, Di Genova G, Herr MH, Dahlman I, Payne F, Smyth D, Lowe C, Twells RC, Howlett S, Healy B, Nutland S, Rance HE, Everett V, Smink LJ, Lam AC, Cordell HJ, Walker NM, Bordin C, Hulme J, Motzo C, Cucca F, Hess JF, Metzker ML, Rogers J, Gregory S, Allahabadia A, Nithiyananthan R, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Bingley P, Gillespie KM, Undlien DE, Ronningen KS, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage DA, Maxwell AP, Carson DJ, Patterson CC, Franklyn JA, Clayton DG, Peterson LB, Wicker LS, Todd JA, Gough SC. 2003. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423 (6939): 506-11.
 108. Vandewalle CL, Decraene T, Schuit FC, De Leeuw IH, Pipeleers DG, Gorus FK. 1993. Insulin autoantibodies and high titre islet cell antibodies are preferentially associated with the HLA DQA1*0301-DQB1*0302 haplotype at clinical type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus before age 10 years, but not at onset between age 10 and 40 years. The Belgian Diabetes Registry. *Diabetologia* 36 (11): 1155-62.
 109. Vardi P, Ziegler AG, Mathews JH, Dib S, Keller RJ, Ricker AT, Wolfsdorf JI, Herskowitz RD, Rabizadeh A, Eisenbarth GS, et al. 1988. Concentration of insulin autoantibodies at onset of type I diabetes. Inverse log-linear correlation with age. *Diabetes Care* 11 (9): 736-9.
 110. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS. 1996. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 45 (7): 926-33.
 111. Verge CF, Howard NJ, Rowley MJ, Mackay IR, Zimmet PZ, Egan M, Hulinska H, Hulinsky I, Silvestrini RA, Kamath S, et al. 1994. Anti-glutamate decarboxylase and other antibodies at the onset of childhood IDDM: a population-based study. *Diabetologia* 37 (11): 1113-20.
 112. Verge CF, Stenger D, Bonifacio E, Colman PG, Pilcher C, Bingley PJ, Eisenbarth GS. 1998. Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes: Combinatorial Islet Autoantibody Workshop. *Diabetes* 47 (12): 1857-66.
 113. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, Rewers M, Eisenbarth GS, Jensen J, Davidson HW, Hutton JC. 2007. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (43): 17040-5.
 114. Yu L, Gianani R, Eisenbarth GS. 1994. Quantitation of glutamic acid decarboxylase autoantibody levels in prospectively evaluated relatives of patients with type I diabetes. *Diabetes* 43 (10): 1229-33.

115. Yu L, Rewers M, Gianani R, Kawasaki E, Zhang Y, Verge C, Chase P, Klingensmith G, Erlich H, Norris J, Eisenbarth GS. 1996. Antiislet autoantibodies usually develop sequentially rather than simultaneously. *J Clin Endocrinol Metab* 81 (12): 4264-7.
116. Ziegler AG, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E. 1999. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes* 48 (3): 460-8.
117. Ziegler AG, Meier-Stiegen F, Winkler C, Bonifacio E. 2012. Prospective evaluation of risk factors for the development of islet autoimmunity and type 1 diabetes during puberty - TEENDIAB: study design. *Pediatr Diabetes*.
118. Ziegler AG, Pflueger M, Winkler C, Achenbach P, Akolkar B, Krischer JP, Bonifacio E. 2011. Accelerated progression from islet autoimmunity to diabetes is causing the escalating incidence of type 1 diabetes in young children. *J Autoimmun* 37 (1): 3-7.

10 Vorveröffentlichungen

Achenbach P, Warncke K, Reiter J, Naserke HE, Williams AJK, Bingley PJ, Bonifacio E, Ziegler AG. 2004. Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics. *Diabetes* 53(2): 384-392.

Achenbach P, Warncke K, Reiter J, Williams AJ, Ziegler AG, Bingley PJ, Bonifacio E. 2006. Type 1 diabetes risk assessment: improvement by follow-up measurements in young islet autoantibody-positive relatives. *Diabetologia* 49(12):2969-76.

11 Danksagung

Zuletzt möchte ich allen meinen Dank aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. A.-G. Ziegler danke ich ganz besonders für die Überlassung des Themas und für die kompetente fachliche und persönliche Unterstützung.

Ebenfalls möchte ich sehr herzlich dem Betreuer der vorliegenden Arbeit, Herrn Dr. Peter Achenbach, für die kompetente Beratung in wissenschaftlichen Fragen und Hilfestellung bei der Auswertung der Daten sowie Korrekturvorschläge danken; ebenso Frau Dr. Heike Naserke für die Betreuung und ihre Unterstützung bei wissenschaftlichen und labortechnischen Fragestellungen im experimentellen Teil. Ein herzliches Dankeschön auch an Herrn Prof. Ezio Bonifacio für seine wertvollen fachlichen Anmerkungen im experimentellen Teil der Arbeit und bei der Auswertung der Daten.

Ebenfalls möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Diabetesforschung meinen Dank aussprechen, die mir zu jeder Zeit vor allem während des praktischen Teils der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen und für eine überaus angenehme Arbeitsatmosphäre sorgten, insbesondere Frau Annette Knopff, Herrn Dr. Markus Walter und Frau Dr. Kerstin Koczvara. Darüberhinaus auch Frau Dr. Katharina Warncke, die im Rahmen Ihrer Dissertation die Messungen im Labor mit mir zusammen durchführte und mit der jederzeit eine sehr angenehme und verlässliche Zusammenarbeit möglich war.

Frau Prof. Polly J. Bingley gilt mein Dank für die Überlassung der Seren der Ak-positiven Verwandten aus der Bart's Oxford Studie, die einen großen Teil des untersuchten Kollektivs darstellten.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern, meiner Lebensgefährtin und allen anderen bedanken, die mit viel Geduld und Unterstützung in allen Höhen und Tiefen zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Jürgen Reiter
geb. am 15.03.1977 in Augsburg

Schullaufbahn

1983-1987 Grundschule Kissing
1987-1996 Wernher-von-Braun-Gymnasium Friedberg/Bayern

Zivildienst

1996-1997 Kreiskrankenhaus Mering

Studium

1997-2004 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität,
München

Praktisches Jahr

1. Tertial Neurologie am Städtischen Krankenhaus München-Harlaching
2. Tertial Innere Medizin am Städtischen Krankenhaus München-Neuperlach
3. Tertial Chirurgie am Klinikum Innenstadt der LMU München

Ärztliche Weiterbildung

2006-2011 Neurologische Klinik am Krankenhaus Rummelsberg
seit 10/2011 Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie am Klinikum Nürnberg