



Technische Universität München
Klinikum rechts der Isar
Lehrstuhl für Diabetes und Gestationsdiabetes
Forscherguppe Diabetes und Institut für Diabetesforschung
Helmholtz Zentrum München

**Analyse der Reifung von Typ 1 Diabetes assoziierten Autoantikörpern bei
Kindern mit Hilfe der Messung von IgM-Autoantikörperisotypen**

Kathrin Theresa Ohliger

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. E.J. Rummeny
2. Univ.-Prof. Dr. A.-G. Ziegler
3. Priv.-Doz. Dr. P. Achenbach

Die Dissertation wurde am 18.09.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.05.2014 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 5 -
2. Grundlagen	- 8 -
2.1. Epidemiologie	- 8 -
2.2. Genetik	- 10 -
2.3. Umweltfaktoren	- 12 -
2.4. Krankheitsmanifestation und Krankheitsverlauf	- 14 -
2.5. Immunologie	- 16 -
2.5.1. T-Lymphozyten und Typ 1 Diabetes	- 16 -
2.5.2. B-Lymphozyten und Typ 1 Diabetes	- 17 -
2.5.3. Antikörper und Autoantikörper beim Typ 1 Diabetes	- 18 -
3. Kollektiv und Methoden	- 22 -
3.1. Untersuchtes Kollektiv – Die BABYDIÄT-Studie	- 22 -
3.2. Analytische Methoden	- 29 -
3.2.1. Detektion von IgG-Insulin-Autoantikörpern im Radioliganden-Bindungsassay	- 30 -
3.2.2. Methoden zur gleichzeitigen Detektion von IgG- und IgM-Insulin-Autoantikörpern im Radioliganden-Bindungsassay	- 32 -
3.2.3. Detektion von IgG-Autoantikörpern gegen GAD und IA-2 im Radioliganden-Bindungsassay	- 34 -
3.2.3.1. Antigenherstellung	- 34 -
3.2.3.2. Versuchsansatz	- 34 -
3.2.4. Methoden zur gleichzeitigen Detektion von IgG- und IgM-Autoantikörpern gegen GAD und IA-2 im Radioliganden-Bindungsassay	- 35 -
3.2.5. Detektion der GADA-Epitop-Spezifitäten COOH, NH ₂ , GAD67 und NASTU	- 37 -
3.2.6. Detektion der IA-2A-Epitop-Spezifitäten PTP, β-PTP und JM	- 37 -
3.2.7. HLA-Genotypisierung	- 40 -
3.2.8. Statistik	- 40 -
	- 2 -

4. Ergebnisse	41 -
4.1. Etablierung der Methoden zur gleichzeitigen Detektion von IgM- und IgG- IAA, -GADA und -IA-2A	41 -
4.1.1. Interassay-Varianzen anhand von Positiv- und Negativkontrollen ..	41 -
4.1.2. Messung von Nabelschnurseren zur Analyse von IgG-Fehlmessungen bei der Detektion von IgM-Antikörpern	45 -
4.2. Messergebnisse	47 -
4.2.1. Messung der IgG- und IgM-IAA	47 -
4.2.1.1. Darstellung aller getesteten Serumproben	47 -
4.2.1.2. Darstellung aller getesteten Serumproben eines Individuums	49 -
4.2.2. Messung der IgG- und IgM-GADA	51 -
4.2.2.1. Darstellung aller getesteten Serumproben	51 -
4.2.2.2. Darstellung aller getesteten Serumproben eines Individuums	53 -
4.2.2.3. IgM-GADA positive Kinder im Verlauf und korrespondierende GADA- Epitopmesswerte	55 -
4.2.3. Messungen der IgG- und IgM-IA-2A	73 -
4.2.3.1. Darstellung aller getesteten Serumproben	73 -
4.2.3.2. Darstellung aller getesteten Serumproben eines Individuums	74 -
4.2.3.3. IgM-IA-2A positive Kinder im Verlauf und korrespondierende IA-2A- Epitopmesswerte	76 -
5. Diskussion	80 -
5.1. Vorkommen und mögliche Bedeutung von IgM-Autoantikörpern beim Typ 1 Diabetes	81 -
5.2. Evaluation des neu etablierten Messverfahrens	87 -
5.3. Schlussfolgerung	90 -
6. Zusammenfassung und Zukunftsaussicht	92 -
7. Literaturverzeichnis	95 -
8. Anhang	120 -

1. Einleitung

8.1. Tabellenverzeichnis	- 120 -
8.2. Abbildungsverzeichnis	- 121 -
8.3. Abkürzungsverzeichnis	- 123 -
8.4. Danksagung.....	- 125 -

1. Einleitung

Typ 1 Diabetes ist eine chronische, progrediente, multifaktorielle Autoimmunerkrankung, bei der es zu einer langsamen kontinuierlichen Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas durch körpereigene Immunzellen kommt. Dies führt über einen gewissen Zeitraum hinweg zu einem absoluten Insulinmangel im Organismus eines Erkrankten und zur Manifestation des klinischen Bildes eines Typ 1 Diabetes.

Eine wichtige Grundlage dieser Erkrankung ist die genetische Prädisposition. Hier wurden bislang über 20 Gene beschrieben, denen eine Assoziation zur Entstehung des Typ 1 Diabetes zugeschrieben wird. Die Vererbung ist somit polygenetisch (Davies 1994 / Nistico 1996 / Pugliese 1997 / Wang 2005 / Todd 2007).

Schnell aber wurde deutlich, dass die genetische Prädisposition alleine nicht ausreicht, die Erkrankung hervorzurufen. Dies konnte in den letzten Jahren beispielsweise in zahlreichen Zwillingsstudien nachgewiesen werden (Barnett 1981 / Olmos 1988 / Hyttinen 2003 / Redondo 2008). Vielmehr handelt es sich bei der Entstehung der Erkrankung um ein multifaktorielles Zusammenspiel aus endogenen, genetischen und exogenen Umwelteinflüssen. Immer mehr in den Fokus der Wissenschaft geraten hierbei auch Einflüsse noch während der Schwangerschaft sowie postnatale und frühkindliche Faktoren (Schmid 2004a / Bonifacio 2008).

In vielen Untersuchungen wurde die Rolle verschiedener Umweltfaktoren in Bezug auf die Entstehung des Typ 1 Diabetes diskutiert. Hier wurden unter anderem verschiedene Ernährungsfaktoren, Virusinfektionen, Impfungen und soziokulturelle Aspekte als mögliche Auslöser aufgeführt (Hummel 2000 / Norris 2003 / Honeyman 2005 / Lammi 2005 / Virtanen 2006 / Hummel 2007c / Rosenbauer 2007b). Im Zuge der Entstehung des Typ 1 Diabetes ist lange bekannt, dass im Laufe der Zerstörung der β -Zellen verschiedenartige Autoantikörper gegen antigene Strukturen der β -Zellen des Pankreas im Serum der betroffenen Personen nachweisbar sind.

Antikörper sind Immunglobuline (Ig), die je nach Größe und Molekülstruktur in fünf Klassen eingeteilt sind: IgG, IgM, IgA, IgD und IgE. Den größten Anteil der Immunglobuline im Blut nimmt IgG ein. Nach einem Antigenkontakt lässt sich IgM in

der Regel zuerst im Blut nachweisen (Edelmann 1973 / Porter 1973 / Milstein 1986 / Stryer 2007). So wird davon ausgegangen, dass IgM den ersten Kontakt mit dem jeweiligen Antigen und somit den Beginn einer neuen Immunreaktion markiert. Spezifische Autoantikörper, die im Vorfeld einer Diabetes-Manifestation nachgewiesen werden können, sind unter anderen Antikörper gegen das Hormon (Pro)Insulin, gegen das Enzym Glutamat-Decarboxylase (GAD65), gegen Tyrosinphosphatase-homologes Protein (IA-2) und gegen den Zink-Transporter 8 (ZnT8), wobei Autoantikörper gegen Insulin im Kindesalter meist die ersten sind, welche detektiert werden (Ziegler 1999 / Atkinson und Eisenbarth 2001 / Bingley 2001 / Wenzlau 2007). Autoantikörpern wird in den verschiedenen Konstellationen und abhängig von der Höhe ihrer Titerwerte eine enorme prädiktive Bedeutung in Bezug auf eine mögliche Manifestation des Typ 1 Diabetes zugeschrieben (Roll und Ziegler 1997 / Achenbach 2004a / Bonifacio 2004). Gleichzeitig sind sie auch beweisend für ein immunologisches Geschehen rund um die Zellzerstörung in der Bauchspeicheldrüse. Es handelt sich hierbei um eine so genannte Insulitis, bei der es zum Einströmen von verschiedenen Zellen des Immunsystems in das Pankreas kommt (Hanninen 1992 / Liblau 1995).

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen behandelt werden:

- Können bei Kindern, die mit Typ 1 Diabetes assoziierte Autoantikörper gegen Insulin, GAD und IA-2 aufweisen, auch IgM gegen diese Strukturen detektiert werden?
- In welchem klinischen Stadium der Entwicklung eines Typ 1 Diabetes treten IgM-Autoantikörper auf?
- Gibt es eine initiale Reifung von mit Typ 1 Diabetes assoziierten Autoantikörpern über eine Vorstufe IgM zu den reifen IgG?

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Verfahren etabliert, um IgM-Autoantikörper zu detektieren und hiermit festzustellen und auszuwerten, wann diese Antikörper im Verlauf auftreten und ob diese den Beginn einer neuen Entwicklung beziehungsweise den Ausgangspunkt des mit Typ 1 Diabetes assoziierten Autoimmunprozesses markieren. In der vorliegenden Arbeit wurden Blutproben verwendet, die im Rahmen der BABYDIÄT-Studie von Frau Prof. Dr. Ziegler gesammelt und routinemäßig von Geburt an auf das Vorhandensein von Diabetes-assoziierten IgG-Autoantikörpern getestet wurden. In den Jahren 2000 bis 2006 wurden hierfür Kinder, die sowohl einen an Typ 1 Diabetes erkrankten Verwandten ersten Grades hatten und zusätzlich eine HLA-Risikokonstellation aufwiesen, im Abstand von drei Monaten untersucht und überwacht. Für diese Arbeit wurden Blutproben von insgesamt 40 Kindern ausgewählt, die bereits mindestens einen positiven IgG-Autoantikörper aufwiesen. Mit Hilfe eines quantitativen Radioliganden-Bindungsassays (RBA) wurden im Rahmen dieser Arbeit die vorhandenen Seren der ausgewählten Kinder auf IgM- und IgG-Autoantikörper gegen Insulin, GAD und IA-2 getestet, um festzustellen, wann im Zeitverlauf der gesammelten Blutproben IgM-Autoantikörper auftreten. Ein entsprechender IgM-spezifischer Assay wurde für diese Messungen etabliert. Zusätzlich wurden die Blutproben auf die Eptiopspezifitäten von GAD COOH, NH₂, GAD67, NASTU und von IA-2A PTP, β -PTP und JM untersucht, um festzustellen, ob das Auftreten von IgM-GADA beziehungsweise von IgM-IA-2A in Zusammenhang mit dem Auftreten neuer Epitope steht.

Insgesamt soll die Arbeit zu einem besseren Verständnis der Pathogenese des Typ 1 Diabetes beitragen und die immunologischen Mechanismen, die im Vorfeld der Manifestation im Organismus stattfinden, detaillierter beschreiben, um eventuell in Zukunft schon vor dem Einsetzen eines immunologisch-destruktiven Prozesses und somit vor einer möglichen Erkrankung therapeutisch intervenieren zu können.

2. Grundlagen

2.1. Epidemiologie

Weltweit sind über 371 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt (IDF 2012). Der Typ 1 Diabetes macht ca. 5 bis 10 % aller Diabetesfälle aus (Atkinson 2004 / American Diabetes Association 2008). Die Inzidenz in Deutschland liegt momentan bei etwa 14 / 100 000 pro Jahr. Die Daten sprechen für einen jährlichen Anstieg der Inzidenz um etwa 3 bis 5 % (Tuomilehto 1999 / Grenn und Patterson 2001; 2006b / Eehalt 2006). Die höchsten Inzidenzen finden sich auf Sardinien (38,8/100000 pro Jahr) und in Finnland (>40,9/100000 pro Jahr) (Casu 2004). Abzugrenzen ist der Typ 1 Diabetes vom weitaus häufigeren Typ 2 Diabetes, der in ca. 90% der Fälle vorliegt und eigentlich bekannt ist als so genannter „Altersdiabetes“, aber mittlerweile auch bei Kindern und Jugendlichen zunimmt (Fagot-Campagna 2000 / Lammi 2007 / SEARCH 2004). Der Typ 1 Diabetes wird weiter unterteilt in den dominierenden Typ 1A, der auf Autoimmunprozesse zurückzuführen ist, den selteneren Typ 1B (idiopathisch) und den latenten Autoimundiabetes des Erwachsenen (LADA) (Atkinson 2004 / ADA 2008). Die Einschätzung, ob ein Typ 1 oder ein Typ 2 vorliegt, erfolgt nach klinischen Symptomen, der Labordiagnostik und der jeweiligen Familienanamnese. Das Vorhandensein von Autoantikörpern ist der Nachweis für einen Typ 1 Diabetes (Köbberling und Tillil 1991 / Berger 1992 / Eggstein und Luft 1994 / Martin 1996). Diabetes ist die häufigste Stoffwechselerkrankung im Kindesalter (Gardner 1997 / Karvonen 2000) und die Inzidenz der Erkrankung bei Kindern unter 15 Jahren steigt kontinuierlich an (Patterson 2009). Die Inzidenzrate ist am höchsten bei den 10- bis 14-Jährigen (Dabelea 2007), wobei weltweit ein Anstieg der Neuerkrankungsraten vor allem bei jungen Kindern unter 4 Jahren beobachtet wird (Patterson 2009). Patterson et al. haben von 1989 bis 2003 in 17 europäischen Ländern fast 30 000 neue Typ 1 Diabetes-Fälle registriert und überwacht und daraus einen Trend für die Jahre 2005 bis 2020 erstellt, um eine Vorhersage über die zukünftige Inzidenz in Europa treffen zu können. Die jährliche Inzidenz steigt je nach geographischer Lage und ethnischen Faktoren zwischen 0,6% und 9,3%, wobei der Anstieg in der

2. Grundlagen

Gruppe der unter 4-Jährigen durchschnittlich am stärksten ausgeprägt ist (Patterson 2009). Auch Gyurus et al. bestätigten dies mit ihrer Studie. Sie registrierten im Zeitraum von 1989 bis 2009 alle neu aufgetretenen Typ 1 Diabetes-Fälle bei Kindern unter 14 Jahren in Ungarn (Gyurus 2011). Patterson et al. prognostizierten zudem, dass es, falls sich der Trend weiter fortsetzt, im Zeitraum zwischen 2005 und 2020 zu einer Verdopplung der Inzidenz an Typ 1 Diabetes erkrankter Kinder unter 15 Jahren kommen wird (Patterson 2009).

2.2. Genetik

Schon seit einiger Zeit ist bekannt, dass sowohl eine genetische Prädisposition, als auch von außen einwirkende Umweltfaktoren die Entstehung eines Typ 1 Diabetes begünstigen, beziehungsweise möglicherweise auslösen (Davies 1994 / Leslie 1994). Die Pathogenese des Typ 1 Diabetes unterliegt somit einem komplexen Zusammenspiel aus Vererbung, Umweltfaktoren und Lebensumständen. Dies zeigt sich besonders an der familiären Häufung des Auftretens der Erkrankung. Im Rahmen der BABYDIAB-Studie konnte gezeigt werden, dass sich das Risiko, an Typ 1 Diabetes zu erkranken, signifikant erhöht, wenn die Eltern und / oder Geschwister bereits erkrankt sind (Bonifacio 2004). Ferner zeigte sich in anderen Untersuchungen, dass Kinder von Vätern, die an Typ 1 Diabetes erkrankt sind, ein höheres Risiko aufweisen, als Kinder diabetischer Mütter (Warram 1984 / Ziegler 1999). Bei der Vererbung des Typ 1 Diabetes handelt es sich um eine polygene, genetische Prädisposition, wobei die größte Bedeutung nach bisherigem Stand der Wissenschaft dem MHC (major histocompatibility complex) zukommt. Der MHC trägt die genetische Information für HLA-Klasse-1-Moleküle (HLA-A, -B, -C), sowie auch für HLA-Klasse-2-Moleküle (HLA-DR, -DQ, -DP), die nur auf den immunkompetenten Zellen des Körpers (Makrophagen, B-Lymphozyten, aktivierte T-Lymphozyten, Langerhanszellen der Epidermis und Endothelzellen) exprimiert werden.

Am bedeutendsten für die Diabetesentstehung sind die humanen Leukozytenantigene der Klasse-2-Moleküle HLA-DQ und HLA-DR auf dem Chromosom 6p21.3 (IDDM1). Es sind jedoch mittlerweile über 20 weitere Genloki bekannt, denen eine Assoziation mit der Entstehung von Typ 1 Diabetes zugeschrieben wird. Hierzu zählen unter anderen der IDDM2 Locus auf Chromosom 11p15 (INS Insulinpolymorphismus), der IDDM12 Locus auf Chromosom 2q33 (CTLA-4 Genzytotoxisches T-Lymphozytenantigen), PTPN2 auf Chromosom 18p11, CD226 auf Chromosom 18q22, CD25 auf Chromosom 10p15, IFIH1 (MDA5) auf Chromosom 2q24, PTPN22 auf Chromosom 1p13 und ferner weitere Gene auf den Chromosomen 7q31, 5p13, 12q24, 16p13 und 20q13 (Davies 1994 / Nistico 1996 / Pugliese 1997 / Wang 2005 / Todd 2007). Etwa bei 50% der Erkrankten, die einen Typ 1

2. Grundlagen

Diabetes in der Kindheit entwickeln, und bei 20 bis 30 % aller Erkrankten wurde der Genotyp HLA DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*02/DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302 (DR3/4) nachgewiesen (Rewers 1996 / Walter 2003). Auch die folgenden HLA-Haplotypen sind mit einem erhöhten Risiko assoziiert: DQB1*0201, DRB1*0401, DQA1*0501, DQB1*0302, DQA1*0301 und DRB1*0301 (Cerna 2008).

Erstaunlich hierbei ist auch, dass es für Kinder mit einem an Typ 1 Diabetes erkrankten Verwandten ersten Grades einen erheblichen Unterschied in der Prognose gibt, je nachdem, ob sie den HLA-Risikogenotyp aufweisen oder nicht. Das Risiko, innerhalb der ersten fünf Lebensjahre zu erkranken, liegt bei Kindern mit Risikogenotyp bei etwa 20%, während es sich bei den anderen Kindern nur auf etwa 3% beläuft (Ziegler 1999 / Walter 2003).

Im Gegensatz dazu konnte aber auch festgestellt werden, dass beispielsweise der Genotyp DRB1*1601-DQA1*01/DQB1*0602 einen protektiven Effekt im Hinblick auf die Entstehung eines Typ 1 Diabetes hat und somit einer möglichen Erkrankung entgegenwirkt (Kockum 1993 / Eisenbarth 2007).

2.3. Umweltfaktoren

Schon seit einiger Zeit steht fest, dass es sich bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes um ein multifaktorielles Geschehen handelt und die genetische Prädisposition allein nicht ausreicht, die Erkrankung hervorzurufen. Wie sich in den letzten Jahrzehnten in vielen Studien mit eineiigen Zwillingen herausstellte, führt eine genetische Veranlagung zwar wahrscheinlich, aber nicht zwangsläufig zum Ausbruch der Krankheit. Die Konkordanz liegt hier bei etwa 45 bis 60 % (Barnett 1981 / Castano und Eisenbarth 1990 / Hyttinen 2003 / Redondo 2008). Ferner wurden auch geographische und jahreszeitliche Unterschiede der Diabetesinzidenz als Beweis dafür angesehen, dass eine Vielzahl von Umweltfaktoren in der Pathogenese der Erkrankung eine Rolle zu spielen scheinen (Karvonen 2000 / Neu 2001b / Lammi 2008 / Ostman 2008). In den letzten Jahren wurde in verschiedenen Studien begonnen, sowohl die Einflüsse während der Schwangerschaft, als auch periportale, postnatale und frühkindliche Faktoren zu untersuchen, da sich gezeigt hatte, dass es bei Kindern, die einen Typ 1 Diabetes entwickeln, schon in den ersten Lebensjahren zur Bildung von Inselautoimmunität kommt (Ziegler 1999 / Barker 2004 / Hummel 2004).

Schon seit längerem wird auch diskutiert, inwiefern verschiedene Nahrungsbestandteile eine Rolle in der Entstehung des Typ 1 Diabetes spielen. Hierzu zählen vor allem die frühkindliche Exposition von Kuhmilch, Gluten und Getreide und die Dauer der Stillzeit. Ergebnisse hierzu sind allerdings kontrovers und führten noch nicht zu eindeutigen Ergebnissen (Virtanen 1991 / Norris 1996 / Hummel 2000 / Norris 2003 / Ziegler 2003 / Sipetic 2005 / Virtanen 2006 / Hummel 2007c). Wichtig in diesem Zusammenhang sind auch die am Institut für Diabetesforschung 1989 begonnene BABYDIAB-Studie, die sich mit dem Auftreten von Inselautoimmunität im Zusammenhang mit der Einführung von gluten- bzw. getreidehaltigen Nahrungsmitteln bei Kindern beschäftigt und die im Rahmen dieser Arbeit genutzt, darauf aufbauende Interventionsstudie BABYDIÄT. Im Rahmen dieser Studie wird versucht herauszufinden, ob durch eine verzögerte Einführung von Gluten zur Nahrung von Säuglingen, die ein erhöhtes genetisches Risiko aufweisen, an Typ 1

2. Grundlagen

Diabetes zu erkranken, das Risiko, eine Inselautoimmunität zu entwickeln verringert werden kann.

Im Gegensatz dazu werden auch einige Nahrungsfaktoren untersucht, die einen protektiven Effekt auf die Entstehung eines Typ 1 Diabetes haben sollen. Hierunter zählt man beispielsweise die aktive Form des Vitamin D und Omega-3-Fettsäuren aus Fischöl. Hypponen et al. stellten 2001 fest, dass es bei einer täglichen Zugabe von Vitamin D zur Nahrung von Kleinkindern zu einer signifikanten Verringerung des Diabetesrisikos kommt (Hypponen 2001). Weiterhin stehen frühkindliche Impfungen und Virusinfektionen im Verdacht, einen Zusammenhang mit der Erkrankung Typ 1 Diabetes aufzuweisen. Gegenstand der Forschung waren unter anderen folgende Viren: Epstein-Barr-Viren, Varizella-Zoster-Viren, Mumpsviren, Retroviren, Rotaviren, Rötelnviren, Coxsackie A und B und auch Cytomegaloviren (Hyoty und Taylor 2002 / Honeyman 2005 / Lammi 2005). Auch hier liegen jedoch bislang keine richtungsweisenden Ergebnisse vor. Ebenso konnte für Impfungen in zahlreichen Studien kein Nachweis eines kausalen Zusammenhangs mit dem Auftreten von Inselautoantikörpern beziehungsweise der Manifestation eines Typ 1 Diabetes erbracht werden (Blom 1991 / Jefferson und Demicheli 1998 / Karvonen 1999 / Hummel 2000 / DeStefano 2001 / Hviid 2004 / Rosenbauer 2007b).

Es wird sehr interessant sein zu sehen, ob die 2004 weltweit angelaufene Studie TEDDY (The Environmental Determinants of Diabetes in the Young) signifikante Hinweise auf pathogene bzw. protektive Umweltfaktoren liefern kann. TEDDY ist die größte Typ 1 Diabetes-Studie weltweit mit fünf Zentren in den USA und zahlreichen in Europa, die zum Ziel hat, Kinder mit einem erhöhten genetischen Risiko von Geburt an prospektiv und engmaschig über 23 Jahre hinweg zu untersuchen. Mit diesen Daten soll noch genauer evaluiert werden, inwieweit welcher Umweltfaktor den Entstehungsprozess der Erkrankung begünstigt, beschleunigt oder womöglich auch verhindert (Teddy Study Group 2008).

2.4. Krankheitsmanifestation und Krankheitsverlauf

Typ 1 Diabetes ist eine chronische Erkrankung mit bis heute nicht genau geklärter Pathogenese. Der Autoimmunprozess, welcher zur Manifestation der Erkrankung führt, ist gekennzeichnet durch eine selektive Zerstörung der β -Zellen der Langerhans-Inseln der menschlichen Bauchspeicheldrüse. Im gesunden Organismus produzieren diese Zellen das Hormon Insulin und geben dies ins Blut ab, abhängig von der jeweiligen Stoffwechselsituation und der Nahrungsaufnahme. Insulin führt ins Blut freigegeben dazu, die über die Nahrung aufgenommene Glucose in die Zellen des Körpers zu schleusen, um dort energetisch genutzt zu werden. Dies bewirkt Insulin über die Aktivierung des GLUT-4 Glucose-Transporters, der besonders auf Zellen lokalisiert ist, die einen hohen Energieverbrauch vorweisen, wie beispielsweise Muskel- oder Fettzellen.

Fehlt dieses Hormon, verbleibt die Glucose im Blut des Organismus und kann vom Körper nicht mehr als Energiequelle genutzt werden. Folglich werden im Körper verschiedene Mechanismen angestoßen, Energie auf anderem Wege bereitzustellen. Da die Erkrankung den gesamten Stoffwechsel in Mitleidenschaft zieht, gibt es zahlreiche mögliche Akutkomplikationen, die durch sie bedingt auftreten können. Der akute absolute Insulinmangel führt zunächst zu einer Hyperglykämie und zu einer Unterversorgung der Zellen mit Energie. Durch eine dadurch angestoßene gesteigerte Glykogenolyse und Glukoneogenese aus ketoplastischen Aminosäuren fällt vermehrt Acetyl-CoA an, welches nicht abgebaut werden kann und so zur Ketose führt (Berger 1992 / Kraft und Reusch 1990 / WHO 1999). Akut kann es zu einer Ketoazidose mit charakteristischer Kussmaulatmung kommen. Ferner kann es beim mit Insulin behandelten Diabetiker zu einer Unterzuckerung, einer sogenannten Hypoglykämie kommen. Hierbei wird das Gehirn mit zu wenig Energie versorgt, was bei häufigerem Auftreten Langzeitschäden im zentralen Nervensystem zur Folge haben kann. Nicht nur die akut auftretenden Komplikationen des Typ 1 Diabetes machen diese Erkrankung zu einer den Betroffenen einschränkenden Behinderung, sondern vor allem die multiplen Langzeitschäden führen zu einer Reduzierung der Lebensqualität und der Lebenserwartung der erkrankten Personen. Dabei steht das Auftreten von Spätfolgen in direktem Zusammenhang

mit der Langzeit-Einstellung des Blutzuckerspiegels (Le Devehat 1997). Aufgrund des nur unzureichend eingestellten Stoffwechsellage eines Diabetikers kommt es im Laufe der Jahre sowohl zu mikroangiopathischen, als auch zu makroangiopathischen und zudem neuropathischen Veränderungen. Defekte der kleineren und mittleren Gefäße der Glomeruli der Niere (diabetische Nephropathie) und der Retina des Auges (diabetische Retinopathie) können auftreten. Die häufiger auftretende Arteriosklerose führt bei Diabetikern vermehrt zu Myokardinfarkten und Apoplex-Ereignissen. Die unter dem Begriff diabetische Polyneuropathie zusammengefassten neurologischen Spätfolgen umfassen eine Vielzahl neurologischer Ausfallerscheinungen und degenerativer Veränderungen im Nervensystem. Charakteristisch für die Spätschäden des Diabetes ist der so genannte „Diabetische Fuss“. Dieser beschreibt eine Kombination aus peripherer Neuropathie und peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) und wird zudem getriggert durch eine schlechtere Wundheilung und eine höhere Infektanfälligkeit bei diabetischer Stoffwechsellage. Es ist heutzutage jedoch möglich, durch die ständige Verbesserung der Möglichkeiten der intensivierten Insulintherapie, die Stoffwechsellage eines Diabetikers relativ stabil im Normbereich zu halten. Dadurch können die Spätfolgen hinausgezögert beziehungsweise sogar verhindert werden und Akutkomplikationen, wie die Hypoglykämie, treten durch die flexible Mahlzeitengestaltung und die daran angepasste Zufuhr von Insulin seltener auf als noch vor ein paar Jahren.

2.5. Immunologie

Der Typ 1 Diabetes ist gekennzeichnet durch eine durch Autoimmunität verursachte Destruktion der insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas. Diese Destruktion kann sich über einen langen Zeitraum hinziehen und verläuft klinisch asymptomatisch. Es wird davon ausgegangen, dass es auf dem Boden einer genetischen Prädisposition, getriggert durch verschiedene Umweltfaktoren, zu einer Fehlsteuerung der Immunregulation kommt, die schließlich die autoimmune Reaktion hervorruft (Füchtenbusch 1995).

Nach wie vor ist die Pathogenese des Typ 1 Diabetes jedoch nicht vollständig geklärt. Umso wichtiger ist es, den Ablauf der Autoimmunreaktion im Körper noch genauer zu erforschen, um in Zukunft eventuell eine Intervention noch vor der Manifestation der Erkrankung zu ermöglichen. Man geht davon aus, dass es sich um einen Entzündungsprozess handelt, in den verschiedene Zellen des Immunsystems involviert sind, hierunter beispielsweise $CD4^{+}$ - und $CD8^{+}$ -T-Zellen und Makrophagen (Tisch 1996 / Knip 2005 / Gillespie 2006).

Es ist bekannt, dass vor der Manifestation der Erkrankung eine präklinische Phase auftritt, in der es zu einem langsamen immunologisch bedingten Zerstörungsprozess der β -Zellen kommt. Erst wenn über 80% der funktionellen β -Zellen zerstört sind, kommt es zu einem absoluten Insulinmangel im Körper eines Betroffenen und zu den charakteristischen Symptomen bei Erstmanifestation des Typ 1 Diabetes (Robles 2001 / Achenbach 2007).

2.5.1. T-Lymphozyten und Typ 1 Diabetes

Bei Erstmanifestation zeigen sich im Pankreas der betroffenen Personen eine Infiltration mit Makrophagen, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten und ein chronisches Entzündungsgeschehen, was als Insulitis bezeichnet wird (Gepts 1981 / Hanninen 1992 / Liblau 1995). Es wird angenommen, dass T-Zellen der Dreh- und Angelpunkt des immunologischen Geschehens sind. Vor allem den $CD4^{+}$ -Zellen, die auch als Effektorzellen bezeichnet werden, kommt eine maßgebliche Rolle bei der Destruktion der pankreatischen Inseln zu (Haskins 1990 / O'Reilly 1991 /

Thivolet 1991). Seit längerer Zeit bekannt sind die zwei folgenden Unterformen der CD4+-Zellen: Th1- und die Th2-Zellen. Während erstgenannte unter anderem das proinflammatorische Interferon-Gamma (IFN- γ) und Interleukin 2 (IL-2) ausschütten, sezernieren die Th2-Zellen Interleukin 4 (IL-4) und 10 (IL-10) (Mosmann 1986 / Abbas 1996). Die beiden Zelltypen fungieren in der Immunabwehr als Gegenspieler, wobei den Th1 Zellen eine eher destruktive und den Th2-Zellen eine protektive Komponente bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes zugerechnet wird (Scott 1993 / Paul und Seder 1994 / Tisch 1996 / Rabinovitch und Suarez-Pinzon 2007). Es wird davon ausgegangen, dass vor allem ein Ungleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zellen mit einem Überwiegen der Th1-Zellen den Autoimmunprozess um die Zerstörung der β -Zellen triggert (Wicker 1986 / Eisenbarth 1996 / Haskins 1996 / Schuppan 2000).

2.5.2. B-Lymphozyten und Typ 1 Diabetes

B-Lymphozyten wirken im Gegensatz zu T-Lymphozyten nicht selbst zytotoxisch, sondern ihnen wird im Rahmen des Immunprozesses eine regulatorische und immunmodulierende Rolle zugeschrieben. Hierbei wirken sie zusammen mit anderen Zellen als Antigenpräsentierende Zellen und steuern somit die Aktivierung der T-Lymphozyten (Simitsek 1995). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass spontan-autoimmundiabetische non-obese diabetic (NOD)-Mäuse, denen das B-Zellrepertoire entzogen wird, weniger Insulitis und eine deutlich niedrigere Diabetes-Inzidenz aufweisen, woraus man schließen könnte, dass B-Zellen und die von diesen produzierten Antikörper eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Autoimmundiabetes spielen (Forsgren 1991 / Serreze 1996 / Noorchashm 1997 / Silveira 2002). Auch die Aktivierung zur Differenzierung der CD4+-Zellen in die Subklassen Th1 und Th2 erfolgt unter anderem durch Zytokine, die von B-Zellen sezerniert werden. Hier wäre zum Beispiel Interleukin 12 (IL-12) anzuführen, welches die Aktivierung zu Th1-Zellen vorantreibt (Scott 1993).

2.5.3. Antikörper und Autoantikörper beim Typ 1 Diabetes

Immunglobuline sitzen als lösliche Rezeptoren auf der Zelloberfläche von B-Lymphozyten. Es gibt die Immunglobuline IgG, IgM, IgD, IgA und IgE, die sich durch ihre Anzahl konstanter Domänen, durch die Position und Anzahl der Disulfidbrücken, Anzahl und Lage der Kohlenhydrat-Seitenketten und dem Vorhandensein einer Gelenkregion unterscheiden. IgG ist der häufigste und wichtigste Antikörper im Blut. IgA findet sich vor allem in Sekreten wie Speichel, Tränen und Bronchialflüssigkeit. IgE ist verantwortlich für allergische Reaktionen und die Abwehr vor Parasiten. Die Funktion von IgD ist bislang nur unzureichend geklärt.

IgM tritt als Pentamer, also zusammengesetzt aus fünf Monomeren auf und ist daher die größte der unterschiedlichen Immunglobulinformen. Die IgM-Form ist die Isoform, in der ein Antikörper meistens als erstes sezerniert wird. Er hat auf Grund seiner pentameren Struktur sehr viele Bindungsstellen für Antigene und auch für C1q und aktiviert so stark das Komplementsystem (Edelmann 1973 / Porter 1973 / Milstein 1986 / Janeway 2009).

Schon sehr früh wurde herausgefunden, dass peripheres Blut von an Typ 1 Diabetes erkrankten Patienten IgG-Antikörper gegen körpereigene Strukturen des Pankreas enthält (Botazzo 1974). Im Rahmen der Autoimmunreaktion werden gegen spezifische Zellstrukturen und Substanzen der β -Zelle der Langerhans-Inseln Autoantikörper gebildet, die somit das Ausmaß der Zellschädigung anzeigen (Achenbach 2004). Die verschiedenen Autoantikörper sind oft schon Jahre vor der eigentlichen Diabetes-Manifestation im Blut nachweisbar und können somit als natürliche Marker für eine eventuell später auftretende Erkrankung angesehen werden (Leslie 1999 / Bonifacio 2004). Deshalb hat sich die kombinierte Autoantikörperbestimmung in den letzten Jahren als Methode der Wahl erwiesen, eine individuelle Risikoabschätzung für Typ 1 Diabetes bei Verwandten von erkrankten Personen zu treffen.

Die bedeutendsten Autoantikörper sind die gegen das endogene Hormon Insulin (IAA), gegen das Enzym Glutamat-Decarboxylase (GADA) und gegen das Thyrosinphosphatase-homologe Protein IA-2 (IA-2A) gerichtet (Baekkeskov 1989 / Lan 1996 / Achenbach 2004). Ursprünglich sprach man auch von Inselzell-Antigenen

2. Grundlagen

(ICA) im Allgemeinen. Diese Bezeichnung umfasst mehrere verschiedene Antigene. Erst vor wenigen Jahren wurden Autoantikörper gegen den Zinktransporter ZnT8 zusätzlich als Typ 1 Diabetes assoziiert nachgewiesen (Wenzlau 2007). Letztgenannter wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt. Meist sind IAA im Kindesalter die ersten Autoantikörper, die sich im Serum detektieren lassen (Karjalainen 1989 / Ziegler 1993 / Ziegler 1999 / Yu 2000). Sie wurden erstmals von Palmer et al. 1983 beschrieben und sind bis heute unerlässlich in der Prädiktion des Typ 1 Diabetes (Palmer 1983). Bei IAA handelt es sich um Autoantikörper gegen das einzige β -Zell-spezifische Antigen des Typ 1 Diabetes. Sie richten sich gegen das körpereigene Insulin, noch bevor es zu einer exogenen Insulintherapie kommt, und sind je nach Alter der Person bei Erstmanifestation bei 16 bis 69% der Patienten nachweisbar (Wilkin 1990).

GADA richten sich gegen ein Inselzell-Protein mit einem Molekulargewicht von meist 65kD, es gibt jedoch auch eine Variante des Proteins mit 67kD. Dieses Protein wurde von Baekkeskov et al. 1982 als GABA-synthetisierendes Enzym Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) identifiziert (Baekkeskov 1982). Das Enzym GAD setzt Glutamat zu GABA um, einem Neurotransmitter sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem (Baekkeskov 1990). GADA persistieren am längsten und sind auch noch oft im Erwachsenenalter nachweisbar (Atkinson 1993 / Decochez 2000). GADA sind allerdings nicht sehr spezifisch für den Typ 1 Diabetes, da sie auch bei etwa 70% der Patienten, die an der seltenen neurologischen Erkrankung Stiff-man-Syndrom leiden und bei am Polyendokrinen Syndrom Erkrankten auftreten (Lohmann 2000). GADA kommen außerdem in Epithelzellen des Eileiters und in Spermiovorstufen vor (Ellis und Atkinson 1996).

Um die Spezifität von GADA für die prädiabetische Diagnostik zu erhöhen, wurden in den letzten Jahren einzelne Epitope in der Aminosäuresequenz des Moleküls genauer untersucht. Es wurde versucht festzustellen, welche Regionen wie das Risiko für Typ 1 Diabetes beeinflussen können. Im Fokus der Wissenschaft lagen hierbei die beiden terminalen Bereiche des Moleküls COOH-GAD und NH₂-GAD, sowie die Isoform GAD67 und das Epitop NASTU (Daw 1995 / Bonifacio 2000).

Sehr spezifisch für den Typ 1 Diabetes hingegen sind IA-2A (Bonifacio 1998a). Es handelt sich um Antikörper gegen das Thyrosinphosphatase-homologe Protein IA-

2 (IA-2A). Auch diese Autoantikörper werden bei etwa 60% der Patienten mit neu aufgetretenem Diabetes gefunden (Bonifacio 1998). Auch bei IA-2A wurden Epitop-Spezifitäten gefunden, indem verschiedene Molekülbereiche bezüglich einer Typ 1 Diabetes-Assoziation untersucht worden sind. Antikörper-Reaktivität zeigte sich gegen die folgenden Molekülabschnitte: gegen die beiden homologen PTP-Abschnitte der Proteine IA-2 und IA-2 β und gegen die juxtamembranäre Region des IA-2 Proteins (Lan 1994 / Lampasona 1996). Bei Personen, die zusätzlich zu anderen Autoantikörpern IA-2A aufweisen, deutet dies auf einen progressiven Verlauf der Autoimmunität hin, was zu einer schnellen Destruktion führt und somit auf ein rapides Auftreten der Erkrankung schließen lässt (Christie 1994 / Ziegler 2010).

Das Risiko, an Typ 1 Diabetes zu erkranken, kann variieren, je nachdem, welcher Autoantikörper detektiert wird bzw. wie viele der Autoantikörper vorhanden sind (Achenbach 2004 / Achenbach 2006 / Achenbach 2009). Entscheidend ist, dass das Risiko umso höher ist, je mehr verschiedene Autoantikörper eine Person aufweist und je höher die gemessenen Titer sind. Während ein Insel-Autoantikörper das Risiko nur minimal erhöht und die meisten Personen mit nur einem Autoantikörper nie an Typ 1 Diabetes erkranken, steigt es bei zwei vorhandenen Antikörpern kumulativ auf 20%, während die Wahrscheinlichkeit zu erkranken bei drei oder vier Autoantikörpern auf 70% erhöht ist (Ziegler 1990 / Roll und Ziegler 1997). Neuere Ergebnisse zeigen auch, dass die Risikoeinschätzungen zum Beispiel durch die Bestimmung von Antikörpersubklassen (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), Epitopen und die Herausarbeitung unterschiedlicher Affinitäten in Zukunft noch detaillierter möglich sein wird (Achenbach 2004 / Schlosser 2005).

Bezüglich des Auftretens von mit dem Typ 1 Diabetes-assoziierten IgM-Autoantikörpern gibt es bisher nur wenige Veröffentlichungen. Diese liefern zudem keine richtungsweisenden Ergebnisse bezüglich des prädiabetischen Vorkommens von IgM-Autoantikörpern. IgM-IAA wurden bisher nur in einer Veröffentlichung beschrieben (Achenbach 2004), während IgM-GADA und IgM-IA-2A in einigen Untersuchungen in geringer Anzahl detektiert werden konnten (Petersen 1999 / Hawa 2000 / Achenbach 2004). In keiner der Untersuchungen konnte allerdings eine Theorie aufgestellt werden, zu welchem Zeitpunkt IgM-Autoantikörper auftre-

2. Grundlagen

ten und welche Rolle sie im Geschehen um den Immunprozess bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen nun neue sensitive Messverfahren etabliert werden, um zu analysieren, ob es im Verlauf und im Vorfeld der prädiabetischen IgG-Autoantikörperpositivität auch zum Auftreten von IgM-Autoantikörpern kommt und welche Rückschlüsse daraus für den Entstehungsprozess des Typ 1 Diabetes gezogen werden können.

3. Kollektiv und Methoden

3.1. Untersuchtes Kollektiv – Die BABYDIÄT-Studie

Die für die Tests verwendeten Proben stammen aus dem Kollektiv der BABYDIÄT-Studie. Die BABYDIÄT-Studie war nicht erfolgreich, was bedeutet sie beeinflusste das Risiko für Inselautoimmunität und Typ 1 Diabetes weder in eine positive noch negative Richtung (Hummel 2011). Die Ernährungsintervention untersuchte den Nutzen einer frühkindlichen Ernährungsprävention für die Verhinderung von Inselautoimmunität und Typ 1 Diabetes bei Kindern mit erhöhtem Diabetesrisiko innerhalb der ersten 3 Lebensjahre und den natürlichen Verlauf der Diabeteserkrankung in den folgenden Jahren. Ziel der Intervention war es zu untersuchen, ob eine verzögerte Zugabe von Gluten zur Nahrung bei Neugeborenen bis zu einem Alter von 12 Monaten bei Kindern mit einem hohen genetischen Risiko für Typ 1 Diabetes das Risiko, eine Inselautoimmunität zu entwickeln, verringern kann. In den Jahren 2000 bis 2006 wurden 1168 Kinder oder Geschwister einer an Typ 1 Diabetes erkrankten Person auf das Erfüllen der Einschlusskriterien hin untersucht. Von 169 Kindern, die diese Kriterien erfüllten, willigten die Eltern von 150 in die Teilnahme an der Studie ein. Diese 150 Kinder wurden randomisiert auf eine Kontrollgruppe (n=77) und eine Interventionsgruppe (n=73) aufgeteilt.

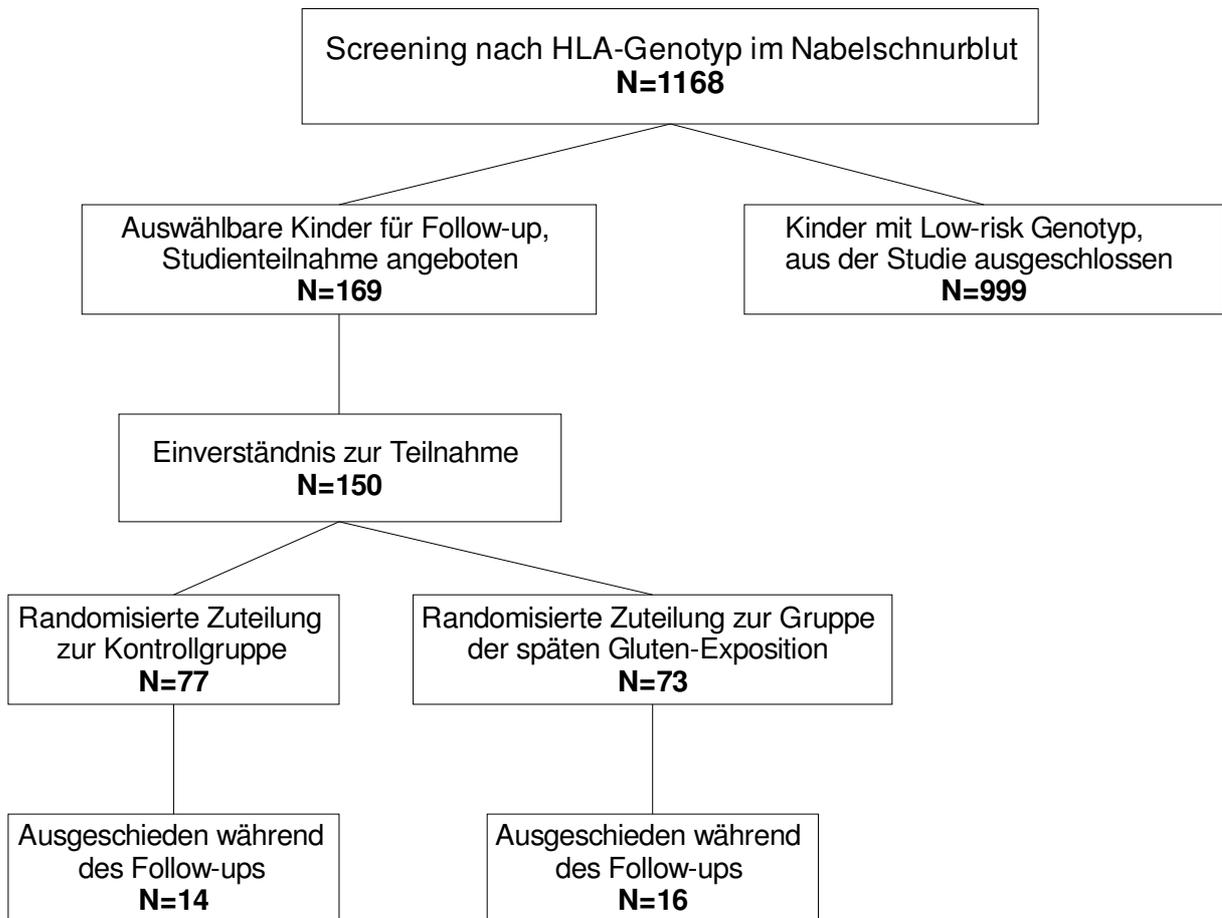


Abbildung 1: Entstehung des BABYDIÄT-Studienkollektivs (nach Hummel 2011)

Es konnten 150 Kinder in die Studie aufgenommen werden, die sowohl einen an Typ 1 Diabetes erkrankten erstgradig Verwandten und zusätzlich den HLA Risikogenotyp aufwiesen und somit die Einschlusskriterien erfüllten. Eine weitere Aufnahmemöglichkeit bestand für Kinder ohne den Risikogenotyp, aber mit zwei erkrankten erstgradig verwandten Personen. Das maximale Alter der Kinder bei Aufnahme in die Studie lag bei 2 Monaten.

Die genetischen Risikotypen waren wie folgt festgelegt:

- » DR 3/4,DQB1*57non-Asp oder
- » DR 4/4,DQB1*57non-Asp oder
- » DR 3/3,DQA1*0501,DQB2*02

(Hummel 2011).

Kinder, die diese Genotypen aufwiesen, wurden selektiert, da von Schenker et al. 1999 festgestellt worden war, dass hier ein 20%-iges Risiko vorliegt, innerhalb der ersten beiden Lebensjahre an Typ 1 Diabetes zu erkranken (Schenker 1999). Neben genetischen Untersuchungen wurde versucht, den Einfluss frühkindlicher Umweltfaktoren sowie erfolgter Impfungen und abgelaufener Infektionen auf die Entstehung eines Typ 1 Diabetes mit gezielten Fragebögen und detaillierten Protokollen zu analysieren, um zusätzlich protektive Faktoren und Risikofaktoren identifizieren zu können.

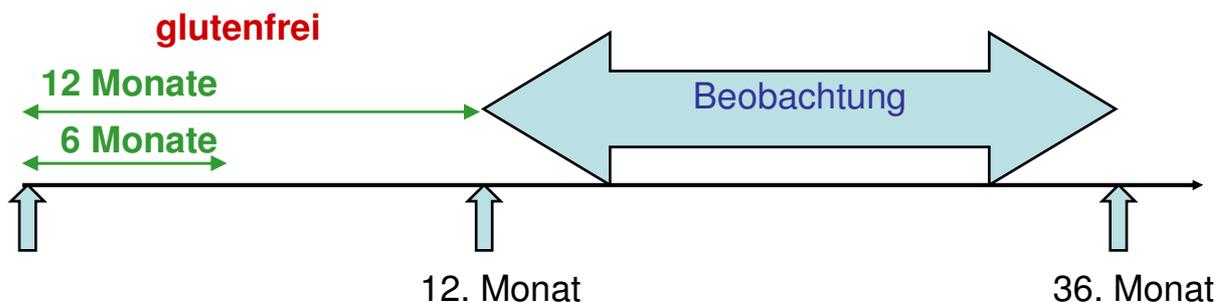


Abbildung 2: Konzeption der BABYDIÄT-Interventionsstudie

In einem randomisierten Ansatz wurden die Kinder in zwei Gruppen eingeteilt. In der ersten, der Kontrollgruppe, wurde glutenhaltige Nahrung im Alter von 6 Monaten eingeführt, was auch den aktuellen nationalen Empfehlungen des Forschungsinstituts für Kinderernährung in Dortmund entspricht. In der Interventionsgruppe hingegen durfte die Nahrung der Kleinkinder erst ab einem Alter von 12 Monaten Gluten enthalten. Die Kinder wurden im Abstand von 3 Monaten bis zu einem Alter von 3 Jahren regelmäßig untersucht. Im Anschluss wurden jährliche Kontrollen durchgeführt. Sie wurden neben den regelmäßig durchgeführten Follow-up Untersuchungen, die eine Stuhl- und Urinprobe, eine Blutentnahme und das Ausfüllen von Fragebögen und Protokollen zur familiären Situation, zu demographischen Umständen und zur körperlichen Entwicklung des Kindes enthielten, auf das Vorhandensein von Insel-Autoantikörpern gegen Insulin, GAD, IA-2 und das Auftreten eines eventuellen Typ 1 Diabetes untersucht.

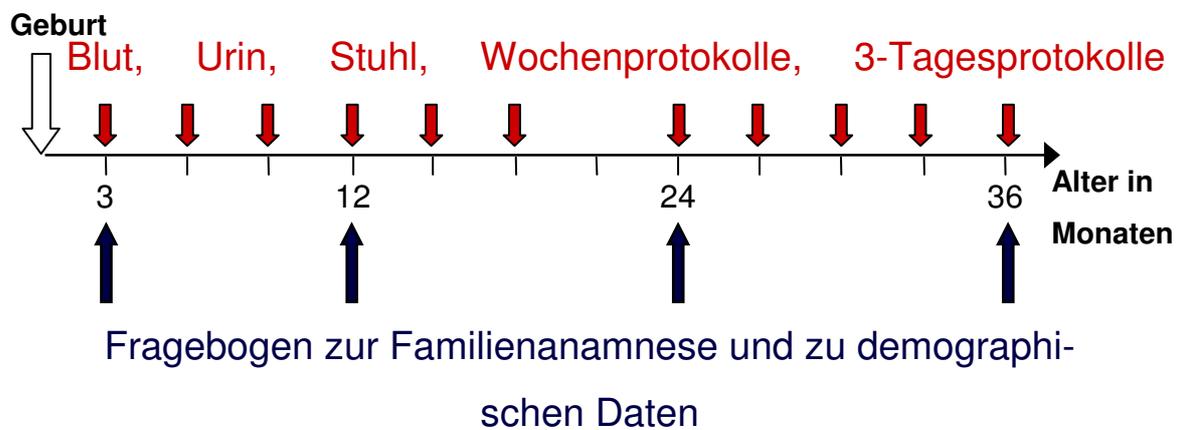


Abbildung 3: Follow-up des BABYDIÄT-Studienkollektivs

Die Entwicklung von Inselautoantikörpern wurde im Rahmen der BABYDIÄT-Studie definiert als das in mindestens zwei aufeinander folgenden Proben gemessene positive Ergebnis eines Autoantikörpers. 11 Kinder der Kontrollgruppe und 13 Kinder der Interventionsgruppe entwickelten Inselautoantikörper, während 7 Kinder an Typ 1 Diabetes erkrankten, 4 hiervon waren aus der Interventionsgruppe. Es konnten hier also keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. (Autoantikörper-Risiko im Alter von 3 Jahren: 12 vs. 13 %; $P = 0.6$). Folglich scheint eine verzögerte Zugabe von Gluten zur Nahrung von Kleinkindern die Entwicklung von Insel-Autoantikörpern nicht zu verhindern. Innerhalb der ersten drei Jahre entwickelten 16 der Kinder Inselautoantikörper, bei 11 von diesen wurden mehr als nur ein Autoantikörper gefunden. Weitere 8 Kinder entwickelten Autoantikörper erst nach dem 3. Lebensjahr. Anamnestisch konnte festgestellt werden, dass sich etwa 30% der Familien nicht an die vorgegebenen Zeiten der Einführung von Gluten hielten (Hummel 2011). Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Kinder aus dem Studienkollektiv ausgewählt, die mindestens einmalig im Rahmen des Follow-up einen positiven IgG-Autoantikörper-Titer aufwiesen. Insgesamt waren 40 Kinder in mindestens einem der Routine-Assays positiv.

3. Kollektiv und Methoden

Die im Routine-Assay als positiv getesteten Proben aus den ersten 6 Lebensmonaten der Neugeborenen von an Typ 1 Diabetes erkrankten Müttern wurden für die Tests nicht berücksichtigt, da in dieser Zeit durch den so genannten „Nestschutz“ noch zirkulierende IgG-Antikörper der Mutter im Blut des Säuglings nachgewiesen werden und diese somit nicht als Autoimmunität des Kindes gewertet werden können. 23 der Kinder waren weiblich (57,5%) und 17 der untersuchten Kinder waren männlich (42,5%). Von den 40 Personen, die in die Untersuchung eingeschlossen wurden, waren insgesamt 26 Patienten im Routine-IgG-IAA-Assay positiv getestet worden (65%). Insgesamt 25 der Personen hatten mindestens einen positiven IgG-GADA-Autoantikörperwert (62,5%), während nur 7 der 40 Personen mindestens einmal positiv auf IA-2A-IgG getestet worden sind (17,5%).

Autoantikörper	Anzahl Kinder	Weiblich	Männlich	Medianes Alter bei Serokonversion
IAA positiv	26	15	11	1,91 Jahre
GADA positiv	25	15	9	2,63 Jahre
IA-2A positiv	7	5	2	2,02 Jahre
<i>davon</i>				
GADA + IAA positiv	10	5	5	
IA-2A + IAA positiv	0	0	0	
IAA + GADA + IA-2A positiv	6	5	1	

Tabelle 1: IgG-Autoantikörper-Positivität des Kollektivs der BABYDIÄT-Studie in Abhängigkeit vom Geschlecht und zusätzlich medianes Alter bei Serokonversion

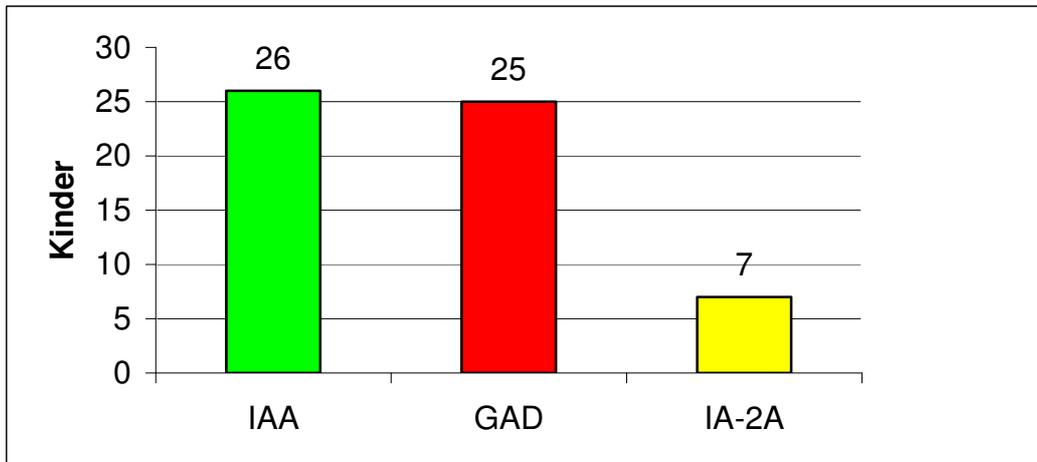


Abbildung 4: IgG-Autoantikörper Positivität des Studienkollektivs

Von den 40 Kindern hatten 16 eine an Typ 1 Diabetes erkrankte Mutter (40%), während bei 11 Kindern der Vater an einem Typ 1 Diabetes litt (27,5%). Bei 4 Kindern waren sowohl die Mutter als auch der Vater Typ-1-Diabetiker (10%) und bei jeweils 4 Studienteilnehmern waren entweder der Bruder (10%) oder die Schwester (10%) an Typ 1 Diabetes erkrankt. Bei einem Kind lag der Typ 1 Diabetes sowohl bei der Mutter als auch beim Bruder vor (2,5%).

Verwandtschaftsverhältnisse

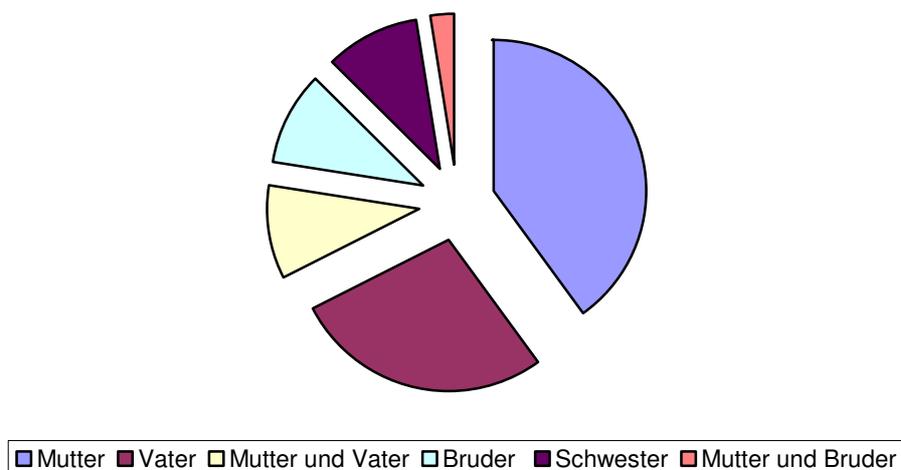


Abbildung 5: An Typ 1 Diabetes erkrankte Verwandte ersten Grades des BABYDIÄT-Kollektivs

3. Kollektiv und Methoden

Bei 3 der 40 getesteten Kinder (7,5%) kam es im Zeitverlauf der Probensammlung zur Diabetes-Manifestation: im Alter von 9 Monaten, im Alter von 10,5 Monaten und beim dritten Kind im Alter von 4 Jahren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 454 Serumproben von 40 Kindern analysiert. Im medianen Durchschnitt waren pro Person 12 Blutproben verfügbar (2 bis 18 Blutproben). Die älteste im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Probe stammt vom 10. Januar 2002. Bei 20 Kindern begannen die Untersuchungen mit einer Nabelschnurprobe bei Geburt. Das mediane Alter bei späterem Einschluss in die Studie lag dagegen bei 0,15 Jahren (entspricht 1 Monat und 24 Tage). Die zuletzt durchgeführte Untersuchung, welche im Rahmen dieser Arbeit analysiert und getestet wurde, stammt vom 11. Februar 2009. Das Follow-up konnte bis zu diesem Zeitpunkt bei den teilnehmenden Kindern im medianen Durchschnitt 4,08 Jahre lang durchgeführt werden (0,75 bis 7,17 Jahre).

Die BABYDIÄT-Studie wurde durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität genehmigt (Nr. 329 / 00).

3.2. Analytische Methoden

Für die Analyse der IgM-Inselautoantikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit die bei der Forschergruppe Diabetes damals routinemäßig durchgeführten Radioliganden-Bindungsassays für IAA, GADA und IA-2A verwendet und modifiziert. Es wurde mit Hilfe einer speziellen Anti-human IgM-Agarose ein Testverfahren etabliert, um in einer Serumprobe zeitgleich IgG- und IgM-Autoantikörper getrennt voneinander zu messen.

Zusätzlich wurden alle vorhandenen Serumproben der Kinder, welche in mindestens einer Serumprobe IgM-GADA oder IgM-IA-2A positiv waren, auf die vier GADA-Epitope COOH, NH₂, GAD67 und NASTU beziehungsweise die drei IA-2A Epitope PTP, β -PTP und JM getestet, um zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von IgM-Autoantikörpern und Veränderungen der Epitop-Spezifität gibt. Die Sensitivität und Spezifität der Routine-Assays konnten beim dritten „Diabetes Autoantibodies Standardization Program Proficiency Workshop“ eindeutig dargelegt werden. Hier zeigten sich Sensitivitäten und Spezifitäten von 70% und 99% für das IAA-Messverfahren, 86% und 93% für das GADA-Messverfahren und 72% und 100% für das IA-2A-Messverfahren. Weiterhin lag der Inter-Assay-Variationskoeffizient bei den Proben mit niedrigen Antikörper-Titern bei 11% für IAA, 18% für GADA und bei 16% für IA-2A (Torn 2008).

3.2.1. Detektion von IgG-Insulin-Autoantikörpern im Radioliganden-Bindungsassay

Die Bestimmung der IAA basierte auf einem Radioliganden-Bindungsassay an ¹²⁵I-A14-markiertes und unmarkiertes Insulin (Williams 1997, Naserke 1998). Es handelt sich um einen Protein-A/G-Sepharose-Test, bei dem nur sehr geringe Serummengen benötigt werden. Dieser wurde im Labor der Forschergruppe Diabetes in München routinemäßig für IgG-IAA verwendet. Der gesamte Versuchsansatz wurde auf Eis und mit eiskaltem TBT-Puffer (50 mM Tris, 1% Tween20, pH 8) durchgeführt. Für jede Probe wurden jeweils 5 µl unverdünntes humanes Serum in 4 Rundbodenröhrchen pipettiert. Einem Duplikat wurde je 25 µl humanes unmarkiertes Insulin (8 U/ml) zur Inhibition zugegeben. Durch die Inhibition wurden alle insulinspezifischen Bindungsstellen blockiert und die in diesem Duplikat gemessene Radioaktivität in Zerfällen pro Minute (cpm) entspricht der unspezifischen Bindung. Um in den beiden anderen Röhrchen einen Volumenausgleich zu erzielen, wurden jeweils 25 µl TBT zugefügt. Anschließend wurde jedem Röhrchen 1,5 µl ¹²⁵I-markiertes Insulin (18000 - 25000 cpm) verdünnt in 25 µl TBT zugegeben und der gesamte Ansatz wurde für 72 Stunden bei 4 °C inkubiert.

Am Vorabend der Weiterbearbeitung wurden für jedes Röhrchen 1,5 mg Protein-A-Sepharose in eiskaltem TBT bei 4 °C vorgequollen.

Am Tag darauf wurden dieser Mischung für jedes Röhrchen 2 µl y-bind-Sepharose zugegeben und anschließend wurde alles dreimal mit TBT zentrifugiert und ausgewaschen. Dieses Sepharosegemisch, insgesamt eine Menge von 50 µl pro Röhrchen, wurde den Röhrchen zugefügt und im Anschluss folgte eine einstündige Inkubation bei 4 °C auf einem leicht rotierenden Mixer. Hierbei präzipitierten die Antigen-Antikörper-Komplexe. Im Anschluss folgten sechs Waschgänge mit je 1,8 ml TBT pro Röhrchen und fünf Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 1400 rpm (= 500g), um das ungebundene, radioaktive ¹²⁵I-Insulin zu entfernen. Die Überstände wurden zwischen den Waschschritten mit einer Vakuumpumpe abgesaugt.

Im Anschluss wurde die Radioaktivität der Sepharose-Pellets für 9 Minuten in

einem Gammazähler bestimmt. Für alle Proben wurden von den jeweiligen Duplikaten die arithmetischen Mittel aus den gemessenen cpm berechnet. Um die Messwerte um die unspezifische Bindung zu bereinigen, wurden auch von den Duplikaten mit Zugabe von kaltem Insulin die Mittelwerte berechnet. Diese Mittelwerte wurden dann von den Mittelwerten der Proben ohne Zugabe von kaltem Insulin abgezogen, die anschließend mit der Einheit „ Δ cpm“ bezeichnet wurden.

Alle Ergebnisse wurden auf eine Standardkurve bezogen, welche in jedem Ansatz mit gemessen wurde. Angegeben wurden diese als willkürlich definierte IAA-Units. Die Basis für die Berechnung der IAA-Units der Standardkurve und der Proben bilden die um die unspezifische Bindung bereinigten Δ cpm. Die obere Grenze für Normalwerte, definiert als 99. Perzentile der gemessenen Antikörperwerte in einer Kontrollgruppe mit nicht an Typ 1 Diabetes erkrankten Kindern, betrug 1,5 Units für IAA. 1,5 Units bilden folglich den Grenzwert für positive IAA-Titer.

3.2.2. Methoden zur gleichzeitigen Detektion von IgG- und IgM-Insulin-Autoantikörpern im Radioliganden-Bindungsassay

Die unter 3.2.1. beschriebene Methode zur IgG-IAA-Routinemessung wurde entsprechend der beschriebenen Methode für IgA-IAA (Koczwara 2007) für die Messung von IgM-IAA weiterentwickelt und modifiziert verwendet. Der Versuchsansatz erfolgte mit Duplikaten von je 5 µl Serum, die alle mit 25 µl ¹²⁵I-A14 markiertem humanem Insulin versetzt und 72 h bei 4°C in Rundbodenröhrchen inkubiert wurden. Für die folgenden Schritte wurde unter der Verwendung von y-bind-Sepharose, die IgG bindet, und einer speziellen IgM-Agarose ein Messverfahren entwickelt, um gezielt IgM-Autoantikörper zu detektieren. In zwei aufeinander folgenden Schritten wurden durch die Verwendung von y-bind-Sepharose die IgG-spezifischen IAA aus der Serumprobe extrahiert, um im Anschluss unter Verwendung der IgM-Agarose die verbliebenen IgM-spezifischen IAA zu detektieren.

Zur Optimierung des Messverfahrens wurden im Rahmen dieser Arbeit in mehreren Versuchsansätzen unterschiedliche Mengen der y-bind-Sepharose und der IgM-Agarose getestet. Die eindeutigsten Ergebnisse ergab der folgende Versuchsverlauf:

Nach der Zugabe von 7 µl y-bind-Sepharose gelöst in 75 µl TBT-Puffer pro Röhrchen, wurden diese unter Schütteln bei 4°C für eine Stunde inkubiert, wodurch die IgG-Antigen-Antikörperkomplexe präzipitierten. Nach anschließender Zentrifugation, woraufhin die IgG-Antigen-Antikörperkomplexe am Boden der Röhrchen anlagen, wurden mit Hilfe von Mikropipettenspitzen sehr behutsam 60 µl des die IgM-IAA enthaltenden Überstandes am Oberrand des Röhrcheninhaltes abpipettiert und in ein neues Röhrchen transferiert. Nach Zusatz von 20 µl anti-human IgM-Agarose, gelöst in 50 µl TBT-Puffer, zu diesen Überständen wurde nochmals unter Schütteln bei 4°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgten die unter 3.2.1. beschriebenen Waschschrte für alle Röhrchen (y-bind-Sepharose und IgM-Agarose) und die Messung im Gammazähler. Bei diesem Versuchsverfahren wurden die Ergebnisse zur Ergebnisauswertung nicht ins Verhältnis zu einer Standardkurve gesetzt. Anstatt dessen wurden bei jedem Versuchsansatz jeweils eine Positiv- und Negativkontrolle für IgG- und IgM-Autoantikörper mitgetestet. Durch

3. Kollektiv und Methoden

Subtraktion der gemittelten cpm der Negativkontrollen von den Mittelwerten der Probenergebnisse ergaben sich die im Weiteren dargestellten Δ cpm. Als Negativkontrolle wurde eine Serumprobe einer nicht an Typ 1 Diabetes erkrankten, gesunden Person verwendet.

Geräte / Materialien	Hersteller
Vakuumpumpe UNO 004B	Pfeiffer Balzers, Aßlar
Gamma Counter Cobra II	Packard, Meriden, CT, USA
CL-GPR Zentrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld
IKA-VIBRAX-VXR Orbitalschüttler	Bachofer
Rundbodenröhrchen Kreuzprobenröhrchen 75/12mm aus Polystyrol	Peske, Andling
Ultramikro-Pipettenspitzen, flach, 200 μ l	Sigma Aldrich, Deisenhofen

Tabelle 2: Geräte für die IAA-Messungen

Chemikalien	Hersteller
Tris® Base	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Tween	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Insuman® Rapid	Aventis, Frankfurt a. M.
¹²⁵ I-A14 Insulin	Aventis, Frankfurt a. M.
Protein-A-Sepharose	Amersham, Buckinghamshire, GB
y-bind-Sepharose	Amersham, Buckinghamshire, GB
Anti-human IgM-Agarose	Sigma Aldrich, USA

Tabelle 3: Chemikalien für die IAA-Messungen

3.2.3. Detektion von IgG-Autoantikörpern gegen GAD und IA-2 im Radioliganden-Bindungsassay

3.2.3.1. Antigenherstellung

Bei der Forschergruppe Diabetes in München wurde cDNA von humanem GAD65- und humanem IA-2i.c.-Antigen hergestellt. Mit Hilfe des „TNT[®] SP6 Coupled Reticulocyte Lysate Kits“ wurde diese cDNA in vitro transkribiert und translatiert. Die radioaktive Markierung wurde mittels ³⁵S-Methionin vorgenommen. Es wurden 1 µg cDNA zur vorbereiteten Reaktionsmischung gegeben. Anschließend wurden 1 µl RNAsin und 10 µl nuklease-freies Wasser zugefügt und der gesamte Ansatz zwei Stunden im Wärmeblock bei 30°C inkubiert. Danach wurde das Gemisch in 100 µl TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Tween20, pH 7,4) gelöst. Es folgte eine Abtrennung des nicht eingebauten ³⁵S-Methionins über Massengewichtssäulen. Die Antigenmarkierung wurde mit der Messung der eingebauten Radioaktivität mit einem Betazähler abgeschlossen. Hierzu wurden 2 µl des radioaktiv markierten, aufgereinigten Antigenproteins in 2 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und anschließend der Messung zugeführt. Die Lagerung des Antigens erfolgte bei -20°C.

3.2.3.2. Versuchsansatz

Bei der Bestimmung von GADA und IA-2A handelt es sich um analoge Radioliganden-Bindungsassayverfahren (Grubin 1994 / Gianani 1995). Diese Messungen fanden komplett auf Eis und unter Verwendung von eiskaltem TBST-Puffer statt. Es wurden ebenfalls von jedem Testserum Duplikate angelegt. Zu je 2 µl Serum in 96-Deepwell-Platten wurden 25 µl TBST gegeben. Zu dieser Mischung wurden 25000 cpm des jeweiligen ³⁵S-markierten Antigens pipettiert und vermengt. Der gesamte Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Noch am Vorabend der Weiterbearbeitung wurden für jede Messprobe 1 mg Protein-A-Sepharose in eiskaltem TBST vorgequollen. Am Tag darauf wurden zu dieser Mischung für jedes Röhr-

chen 3 µl γ-bind-Sepharose gegeben und anschließend in 50 µl TBST pro Well zentrifugiert und ausgewaschen. Im Anschluss wurde das Sepharose-Gemisch in die Wells der Platten pipettiert und alles zusammen für eine Stunde bei 4°C auf einem Orbitalschüttler leicht geschüttelt, um eine Antigen-Antikörper-Präzipitation zu erreichen. Im Anschluss folgten fünf Waschgänge mit je 800 µl eiskaltem TBST und jeweils fünf Minuten Zentrifugation bei 4°C und 1400 rpm (= 500 g), um die gebundenen Immunpräzipitate vom Überstand zu trennen. Der Puffer wurde mit einem Mehrkanalspender zugegeben, die Überstände wurden zwischen den Waschschritten mit einer Vakuumpumpe und einem Mehrkanalaufsatz abgesaugt. Auf den letzten Waschgang folgte eine Resuspension der Pellets in 100 µl TBST und die Überführung in eine 96-Well-Messplatte. Jeder Probe wurden 150 µl Szintillationsflüssigkeit beigefügt. Die Platten wurden mit einer Folie verschlossen und in Alufolie verpackt eine halbe Stunde bei Raumtemperatur auf dem Orbitalschüttler geschüttelt. Anschließend wurden die cpm der in den Pellets gebundenen Radioaktivität im Radioaktivitätsmessgerät für Platten bestimmt.

Auch in diesem Versuchsansatz wurden die Ergebnisse der Messungen auf eine Standardkurve aus neun Verdünnungen von GADA- bzw. IA-2A-positiven Humanseren bezogen, welche in jedem Ansatz mit gemessen wurden. Die obere Grenze für Normalwerte, definiert als 99. Perzentile der gemessenen Antikörperwerte in einer Kontrollgruppe aus nicht an Typ 1 Diabetes erkrankten Kindern, betrug 8,5 Units für GADA und 2,5 Units für IA-2A.

Seit 2009 wird bei der Forschergruppe Diabetes, ebenso wie in ausgewählten Forschungseinrichtungen weltweit, ein vom beschriebenen Verfahren geringfügig abweichendes, harmonisiertes Messverfahren zur Detektion von GADA und IA-2A verwendet. Dies ermöglicht international vergleichbare, standardisierte Messergebnisse (Bonifacio 2010).

3.2.4. Methoden zur gleichzeitigen Detektion von IgG- und IgM-Autoantikörpern gegen GAD und IA-2 im Radioliganden-Bindungsassay

Die unter 3.2.3.2. beschriebene Methode zur IgG-Messung wurde für die Messung der IgM-GADA bzw. IgM-IA-2A analog zum Messverfahren der IgM-IAA (siehe 3.2.2.) weiterentwickelt und modifiziert. Der Versuchsansatz erfolgte mit Duplika-

ten von je 2 μl Serum, die alle mit ^{35}S -markiertem Antigen versetzt und 24h bei 4°C inkubiert wurden. Auch für GADA und IA-2A wurde unter der Verwendung von γ -bind-Sepharose, die IgG bindet, und einer speziellen IgM-Agarose ein Messverfahren entwickelt, um gezielt IgM-Autoantikörper zu detektieren. In zwei aufeinander folgenden Schritten wurden durch die Verwendung von γ -bind-Sepharose die IgG-spezifischen Autoantikörper aus der Serumprobe extrahiert, um im Anschluss unter Verwendung der IgM-Agarose die verbliebenen IgM-spezifischen Autoantikörper zu detektieren.

Zur Optimierung des Messverfahrens wurden im Rahmen dieser Arbeit in mehreren Versuchsansätzen unterschiedliche Mengen der γ -bind-Sepharose und der IgM-Agarose getestet. Die eindeutigsten Ergebnisse ergab der folgende Versuchsverlauf:

Nach der Zugabe von 4 μl γ -bind-Sepharose gelöst in 75 μl TBST-Puffer pro Well einer Platte wurden diese unter Schütteln bei 4°C für eine Stunde inkubiert, wodurch die IgG Antigen-Antikörperkomplexe präzipitierten. Nach einer anschließenden Zentrifugation, wobei sich IgG-Antigen-Antikörperkomplexe am Boden der Wells anlagerten, wurden mit Hilfe von Mikropipettenspitzen 60 μl des die IgM-Autoantikörper enthaltenden Überstandes am Oberrand abpipettiert und in neue 96-Deepwell-Platten transferiert. Nach Zusatz von 8 μl anti-human IgM-Agarose gelöst in 50 μl TBST-Puffer zu diesen Überständen wurde nochmals unter Schütteln bei 4°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgten die unter 3.2.3.2. beschriebenen Waschschrötte für alle Wells der Platten (γ -bind-Sepharose und IgM-Agarose) und die Messung im Szintillationscounter. Auch für dieses Messverfahren wurden die Ergebnisse zur Auswertung nicht ins Verhältnis zu einer Standardkurve gesetzt. Anstatt dessen wurden bei jedem Versuchsansatz jeweils eine Positiv- und Negativkontrolle für IgG- und IgM-Autoantikörper mitgetestet. Durch Subtraktion der gemittelten cpm der Negativkontrollen von den Mittelwerten der Probenergebnisse ergaben sich die im Weiteren dargestellten Δcpm . Als Negativkontrolle wurde eine Serumprobe einer nicht an Typ 1 Diabetes erkrankten, gesunden Person verwendet.

3.2.5. Detektion der GADA-Epitop-Spezifitäten COOH, NH₂, GAD67 und NASTU

Alle Seren von 9 Probanden, welche in mindestens einer Serumprobe IgM-GADA positiv waren, wurden auf die vier GAD-Epitope COOH, NH₂, GAD67 und NASTU (MID) getestet. Es lagen folgende Konstrukte vor, die für die Bestimmung der Autoantikörper gegen verschiedene Epitope von GAD verwendet wurden:

GAD67₁₋₄₅₂ /GAD65₄₄₅₋₅₈₅-chimäre Konstrukte (COOH-terminale GAD65 Epitope; GAD-COOH), GAD 67₁₋₁₀₁/GAD65₉₆₋₄₄₄/GAD 67₄₅₃₋₅₉₃-chimäre Konstrukte (mittlere GAD65-Epitope, GAD-MID) und GAD65₁₋₉₅/GAD67₁₀₂₋₅₉₃-chimäre Konstrukte (NH₂-terminale GAD65-Epitope, GAD-NH₂).

Zur Bestimmung der Epitop-Spezifitäten der Antikörper gegen GAD wurde gereinigte Plasmid-DNA dieser GAD-Konstrukte durch Quantum Prep Spin Column Präparation (Bio-Rad, Hercules, CA) hergestellt. Mit Hilfe des „TNT[®] SP6 Coupled Reticulocyte Lysate Kits“ wurde diese cDNA in vitro transkribiert und translatiert. Die radioaktive Markierung wurde mittels ³⁵S-Methionin vorgenommen. Anschließend wurde der Radioliganden-Bindungsassay zur Bestimmung der Antikörper gegen die Epitope von GAD analog des unter 3.2.3.2. beschriebenen Verfahrens zur Detektion von IgG-Autoantikörpern GADA und IA-2A durchgeführt. Auch in diesem Versuchsansatz wurden alle Ergebnisse der Messungen auf eine Standardkurve bezogen und als Units angegeben. Die Grenzen für Positivität der Epitop-Spezifitäten waren wie folgt festgelegt:

COOH 8 Units, NH₂ 10 Units, GAD67 12 Units und NASTU 15 Units.

3.2.6. Detektion der IA-2A-Epitop-Spezifitäten PTP, β-PTP und JM

Alle Seren von 2 Probanden, welche in mindestens einer Serumprobe IgM-IA-2A positiv waren, wurden auf die drei IA-2-Epitope PTP, β-PTP und JM getestet. Es lagen folgende Konstrukte vor, die für die Bestimmung der Autoantikörper gegen verschiedene Epitope von IA-2 verwendet wurden:

Das IA-2₆₈₇₋₉₇₉-Konstrukt (IA2-PTP) zur Bestimmung von Antikörpern gegen die PTP-Region von IA-2, das IA-2 β ₇₄₁₋₁₀₃₃ (IA-2 β -PTP)-Konstrukt zur Bestimmung von Antikörpern gegen die PTP-Region von IA-2 β und das IA-2₆₀₅₋₆₈₂/IA-2 β ₇₄₁₋₁₀₃₃-Konstrukt (IA2-JM) zur Identifikation von Antikörpern, die mit der juxtamembränen Region (JM) von IA-2 reagieren.

Zur Bestimmung der Epitop-Spezifitäten der Antikörper gegen IA-2 wurde gereinigte Plasmid-DNA dieser IA-2A-Konstrukte durch Quantum Prep Spin Column Präparation (Bio-Rad, Hercules, CA) hergestellt. Mit Hilfe des „TNT[®] SP6 Coupled Reticulocyte Lysate Kits“ wurde diese cDNA in vitro transkribiert und translatiert. Die radioaktive Markierung wurde mittels ³⁵S-Methionin vorgenommen. Anschließend wurde der Radioliganden-Bindungsassay zur Bestimmung der Antikörper gegen die Epitope von IA-2 analog des unter 3.2.3.2. beschriebenen Verfahrens zur Detektion von IgG-Autoantikörpern GADA und IA-2A durchgeführt. Auch in diesem Versuchsansatz wurden alle Ergebnisse der Messungen auf eine Standardkurve bezogen und als Units angegeben. Die Grenzen für Positivität der Epitop-Spezifitäten waren wie folgt festgelegt:

IA-2 PTP 3 Units, IA-2 β PTP 3 Units und IA-2 JM 11 Units.

3. Kollektiv und Methoden

Geräte / Materialien	Hersteller
96-Deepwell-Platten, 1 ml/Well aus Polystrol,	Beckman Coulter, Krefeld
CL-GPR Zentrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld
IKA-VIBRAX-VXR Orbitalschüttler	Bachofer
96-Well-Messplatte Optiplate	Perkin Elmer, Waltham, USA
Ultramikro-Pipettenspitzen, flach, 200µl	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Top Count Microplate Scintillation Counter (Platten-Radioaktivitätsmessgerät)	Packard
Vakuumpumpe UNO 004B	Pfeiffer Balzers, ABlar
Mehrkanalaufsatz (Multiwell Plate Washer / Dispenser Manifol)	Sigma-Aldrich
Folie TopSeal-A	Packard
Massengewichtssäulen (NAP 5 Columns, Sephadex G-25 DNA Grade)	Amersham
Wärmeblock (Thermostat 5320)	Eppendorf
TNT® SP6 Coupled Reticulocyte Lysate Kits	Promega
Betazähler LKB 1219 Rackbeta Liquid Scintillation Counter	LKB Rackbeta
Quantum Prep Spin Column Präparation	Bio-Rad, Hercules, CA

Tabelle 4: Geräte für die GADA/IA-2A-Messungen

Chemikalien	Hersteller
Tris® Base	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Tween	Sigma Aldrich, Deisenhofen
³⁵ S-Methionin (Redivue L-(³⁵ S)-Methionin, 18,5 MBq, 500 Ci)	Amersham Pharmacia
Szintillationsflüssigkeit Microscint 40	Packard
Protein-A-Sepharose	Amersham, Buckinghamshire, GB
y-bind-Sepharose	Amersham, Buckinghamshire, GB
Anti-human IgM-Agarose	Sigma Aldrich, USA

Tabelle 5: Chemikalien für die GADA/IA-2A-Messungen

3.2.7. HLA-Genotypisierung

Bei 1162 Kindern wurden im Rahmen der BABYDIÄT-Studie die Allele HLA-DRB1, HLA-DQA1 und HLA-DqB1 bestimmt. Dies geschah im Labor für Gewebetypisierung der Ludwig-Maximilians-Universität München aus Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifizierter DNA mit Hilfe nicht-radioaktiver sequenzspezifischer Oligonukleotid-Sonden (Walter 2003).

3.2.8. Statistik

Zur Berechnung des Variationskoeffizienten für die Darstellung der Interassay Varianz (4.1.1.) wurde im Rahmen dieser Arbeit die Standardabweichung durch das arithmetische Mittel der Messergebnisse der für die jeweiligen Antikörper verwendeten Positiv- und Negativkontrollen geteilt.

Alle statistischen Auswertungen wurden mit Excel, GraphPad Prism und dem Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Chicago, IL) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung der Methoden zur gleichzeitigen Detektion von IgM- und IgG-IAA, -GADA und -IA-2A

4.1.1. Interassay-Varianzen anhand von Positiv- und Negativkontrollen

Um die Tests miteinander vergleichbar zu machen und um Ergebnisschwankungen zwischen individuellen Testansätzen zu berechnen, wurden bei jedem IgM-Messansatz für die jeweiligen Autoantikörper immer dieselbe Positiv- und Negativkontrolle mit gemessen.

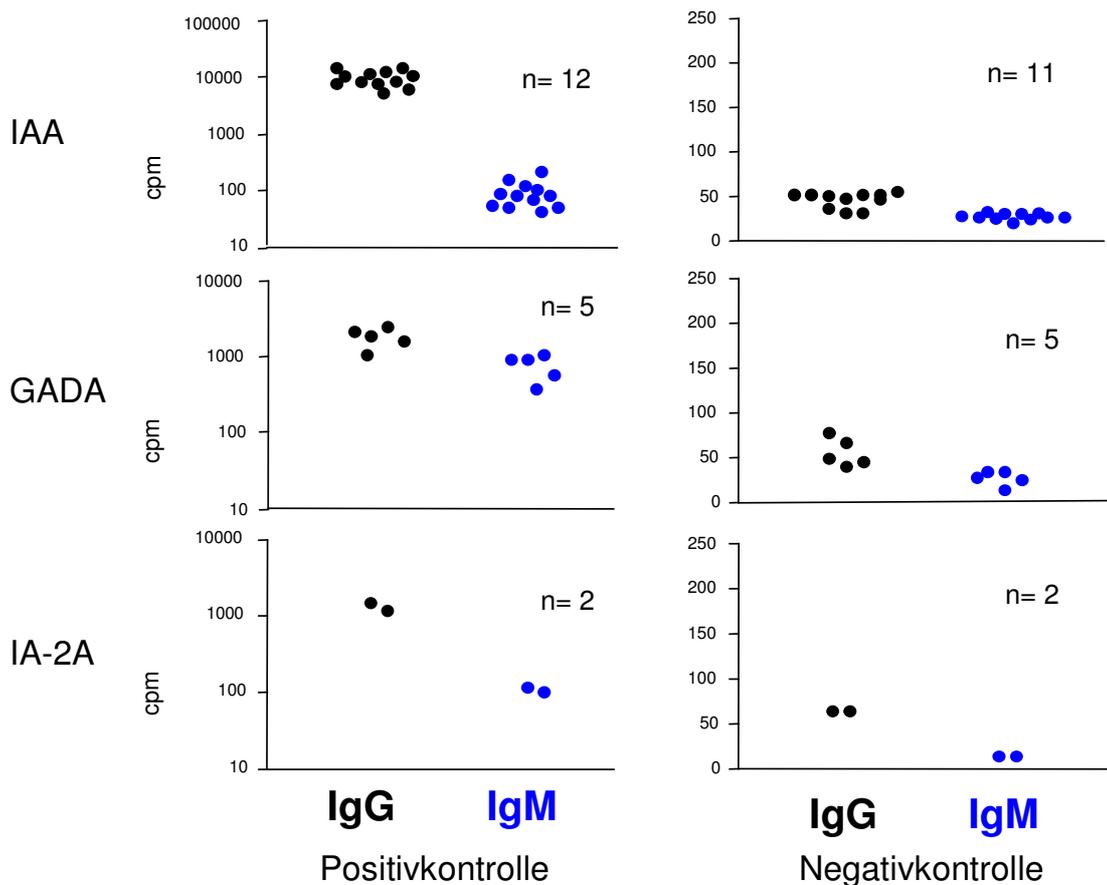


Abbildung 6: Darstellung der Interassay-Varianzen mittels Positiv- und Negativkontrollen

4. Ergebnisse

Abgebildet sind die resultierenden cpm der verwendeten Positiv- und Negativkontrollen für IgG und IgM in den aufeinander folgenden Testansätzen ohne Bereinigung um die unspezifischen Bindungen.

Die Positivkontrollen erzielten deutlich höhere Messergebnisse, als die Negativkontrollen (Abbildung 6). Ebenfalls zeigt sich, dass in allen verwendeten Kontrollseren IgG- in höherer Anzahl detektiert wurden als IgM-Antikörper. Für die IAA-Positivkontrolle sind sehr hohe IgG-IAA-Werte mit einem Median von 8909,0 cpm gemessen worden, während die IgM-IAA-Werte einen 100fach niedrigeren medianen Wert von 86,9 cpm aufweisen (Tabelle 6). Für die GADA-Positivkontrolle war ein medianer IgM-Messwert von 815,2 cpm und für die IA-2A-Positivkontrolle von 110,4 cpm messbar. Folglich waren für die GADA- und IA-2A-Positivkontrollen deutlich höhere IgM-Werte nachweisbar, als für die IAA-Positivkontrolle.

Alle IgM-Negativkontrollen liegen in einem sehr niedrigen Bereich, welcher die unspezifischen Bindungen widerspiegelt (Tabelle 6).

Diese Messdaten zeigen, dass die Methode über eine sehr hohe Spezifität für IgG verfügt, und dass beim Transfer des Überstands offensichtlich keine IgG-Autoantikörper unerwünschterweise mittransferiert wurden.

4. Ergebnisse

Antikörper	IgG Positiv (Minimum – Maximum)	IgG Negativ (Minimum – Maximum)	IgM Positiv (Minimum – Maximum)	IgM Negativ (Minimum – Maximum)
IAA	8909,0 cpm (3509,9 - 12517,4)	51,1 cpm (32,0 - 55,6)	86,9 cpm (40,8 – 427,0)	27,5 cpm (20,9 - 33,9)
GADA	1407,0 cpm (663,9 – 2684,3)	49,4 cpm (41,5 - 78,8)	815,2 cpm (327,2 – 1694,5)	27,9 cpm (14,3 - 34,6)
IA-2A	1378,4 cpm (1549,3 - 1207,4)	72,7 cpm (64,6 – 80,8)	110,4 cpm (102,3 - 118,4)	14,8 cpm (14,6 - 14,9)

Tabelle 6: Mediane Messergebnisse der Positiv- und Negativkontrollen in den neu etablierten Messmethoden zur simultanen Messung von IgM- und IgG-IAA, -GADA und -IA-2A

Aufgelistet sind die medianen, die minimalen und die maximalen Messergebnisse der Positiv- und Negativkontrollen für die jeweiligen Autoantikörper.

Sowohl die augenscheinlichen Interassay-Varianzen (Abbildung 6) also auch die Variationskoeffizienten (Tabelle 7) des neu etablierten Messverfahrens sind sowohl für IAA, GADA, als auch IA-2A sehr gering. Für IA-2A waren nur 2 Testläufe nötig. Auch hier zeigt sich, dass die Ergebnisse sehr vergleichbar waren.

In den verschiedenen Versuchsansätzen wurden alle Negativseren in einem ähnlich niedrigen und sehr vergleichbaren Bereich getestet (Abbildung 6). Diese wurden im Rahmen der Versuchsauswertung als unspezifische Antikörperbindung von den Probenmesswerten subtrahiert, um nur die spezifischen Bindungen als Δ cpm darzustellen. Bei den Positivkontrollen ist die Varianz der gemessenen cpm größer und diese korreliert mit der Höhe an Radioaktivität in den jeweiligen Ansätzen. Folglich ist insgesamt die Messgenauigkeit der neu etablierten Verfahren sehr gut und die verschiedenen Ansätze sind vergleichbar.

4. Ergebnisse

Positivkontrollen	IAA	GADA	IA-2A
IgG	0,28	0,49	0,12
IgM	0,86	0,56	0,07
Negativkontrollen			
IgG	0,17	0,25	0,11
IgM	0,13	0,27	0,01

Tabelle 7: Variationskoeffizienten der mit getesteten Positiv- und Negativkontrollen für IgG-IAA, IgM-IAA, IgG-GADA, IgM-GADA, IgG-IA-2A und IgM-IA-2A

4. Ergebnisse

gene IgM-Produktion erst in den ersten Lebensmonaten anläuft, wurden im Rahmen dieser Arbeit nur Blutseren von Kindern ab einem Alter von 6 Monaten mit einbezogen (Janeway 2009).

Bei den 15 gemessenen Nabelschnurseren für IgG-IAA ergab sich ein Median von 5651,9 Δ cpm (38,3 – 12051,6 Δ cpm), die 14 getesteten Seren für IgG-GADA ergaben einen Median von 1123,1 Δ cpm (238,5 – 4258,4 Δ cpm) und 9 auf IgG-IA-2A untersuchte Proben zeigten einen Median von 1018,0 Δ cpm (136,0 – 1616,2 Δ cpm).

Teilweise sind sehr hohe IgG-Werte in Nabelschnurblutproben nachweisbar, während die IgM-Werte in einem sehr niedrigen Messbereich liegen. Folglich kommt es zu keiner relevanten Übertragung von IgG-Autoantikorpfern im Transferschritt und es sind keine IgG-Fehlmessungen bei der Detektion von IgM-Antikorpfern aufzeigbar. Nichtsdestotrotz werden relevante Mengen an unspezifischer Antikorpferbindung mit medianen Messwerten von 23,8 Δ cpm für IAA (3,7 – 48,9 Δ cpm), 0 Δ cpm für GADA (0 – 66,8 Δ cpm) und 9,1 Δ cpm für IA-2A (0 – 22,0 Δ cpm) nachgewiesen (Daten nicht gezeigt)

4.2. Messergebnisse

4.2.1. Messung der IgG- und IgM-IAA

4.2.1.1. Darstellung aller getesteten Serumproben

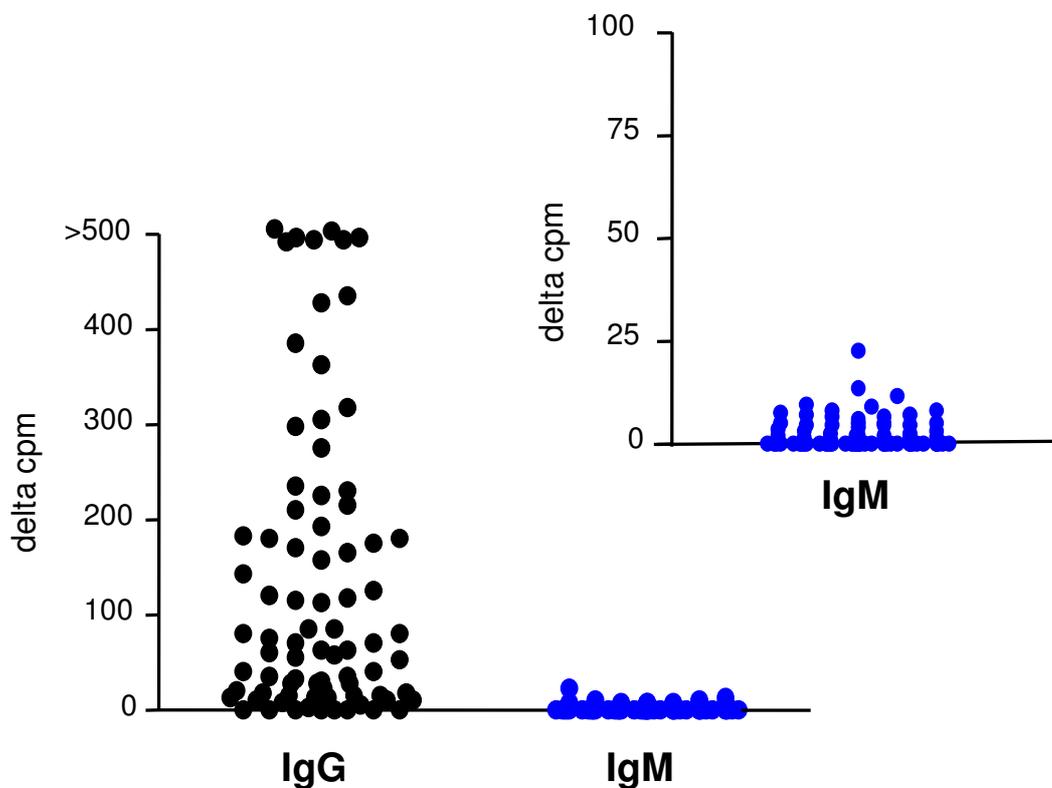


Abbildung 8: Darstellung der getesteten IgG- und IgM-IAA

Schwarz dargestellt sind IgG-IAA und blaue Punkte demonstrieren die Messergebnisse der IgM-IAA als Δ cpm. Es sind 80 Proben von 26 getesteten Kindern dargestellt. Die y-Achse zeigt linear die cpm bis zu einer Grenze von 500 Δ cpm. Im rechten oberen Koordinatensystem sind die IgM-Messwerte detaillierter bis zu einem Wert von 100 Δ cpm dargestellt.

4. Ergebnisse

Insgesamt wurden 80 Seren von 26 Kindern auf IgG-IAA und IgM-IAA getestet. In keinem der getesteten Seren konnten IgM-IAA detektiert werden. Es besteht hier keine Korrelation zwischen dem Auftreten von IgG-IAA und dem Auftreten von IgM-IAA. Lediglich bei einem Mädchen aus dem Studienkollektiv traten im Alter von 4,02 Jahren positive Ergebnisse für IgM-IAA auf. Die Probe war vom 27. November 2007 und in dieser wurden IgG-IAA, -GADA und -IA-2A detektiert. Es konnten IgM-Autoantikörper wie folgt nachgewiesen werden:

	IgG	IgM
IAA	8982,8 Δ cpm	181,0 Δ cpm
GADA	270,9 Δ cpm	0,0 Δ cpm
IA-2A	936,9 Δ cpm	18,6 Δ cpm

Tabelle 8: Messergebnisse einer IgM-IAA positiven Serumprobe

Es lag hier allerdings eine Typ 1 Diabetes Erstmanifestation am 01. Juli 2007 zugrunde. Somit können diese IgM-IAA nicht als Autoantikörper gegen endogenes Insulin betrachtet werden, sondern repräsentieren womöglich eine neue Immunreaktion gegen das gespritzte exogene Insulin.

Insgesamt zeigte sich bei den Messungen der IgM-IAA, dass sich in keinem der getesteten Seren IgM-Autoantikörper beziehungsweise eine ausreichende Menge an IgM-Autoantikörpern befanden, um sie mit den in der vorliegenden Arbeit angewandten Messmethoden detektieren zu können. IgM-IAA konnten ausschließlich in Positivkontrollen von bereits an Typ 1 Diabetes erkrankten Personen nachgewiesen werden, hier allerdings im deutlich positiven Bereich, wie am obigen Beispiel verdeutlicht wird.

4.2.1.2. Darstellung aller getesteten Serumproben eines Individuums

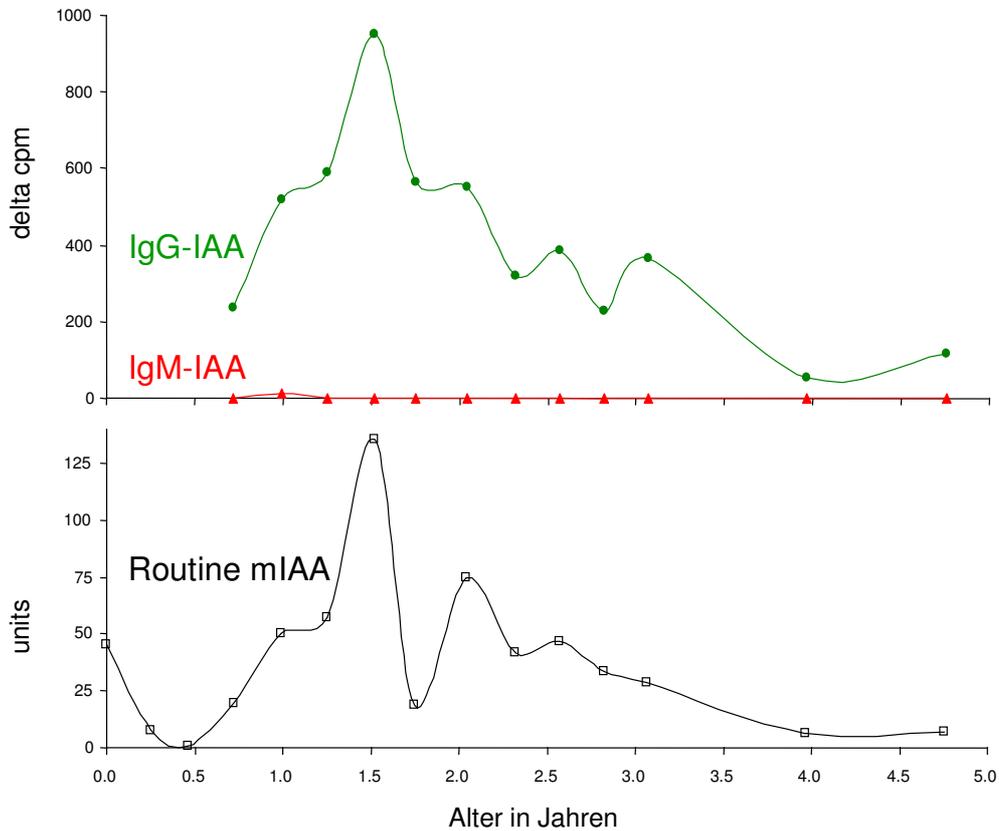


Abbildung 9: IAA-Isotypen im Verlauf bei einem prädiabetischen Individuum

Die x-Achse stellt das Alter in Jahren bis zu einem Alter von 5 Jahren dar. Die untere Grafik zeigt die auf eine Standardkurve bezogenen units des Routine-Assays (schwarze Linie), während die obere Grafik die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Δcpm für IgG (grüne Linie) und IgM (rote Linie) darstellt.

Abbildung 9 ist eine Darstellung der Messwerte eines Individuums des Studienkollektivs über die Zeit der Studienteilnahme hinweg. Die Einheiten variieren je nach Versuchsansatz: Im Routine-Assay wurden die Ergebnisse mit einer Standardkurve verrechnet als units angegeben, während im Rahmen dieser Arbeit in der Kurve die absoluten Δcpm angezeigt sind.

4. Ergebnisse

Bei diesem Studienteilnehmer ist es noch nicht zu einer Erkrankung an Typ 1 Diabetes gekommen. Es zeigt sich hier, dass die Kurven des Routine-Assays und des neu etablierten modifizierten Versuchsansatzes sehr ähnlich sind. Dies lässt darauf schließen, dass die Abtrennung und der Transfer des Überstandes das Ergebnis für IgG-Autoantikörper nicht verfälscht. Hier wird sehr deutlich, dass IgM-IAA trotz hoher Messwerte an IgG-IAA gar nicht oder nur in sehr geringen Mengen detektiert werden können.

4.2.2. Messung der IgG- und IgM-GADA

4.2.2.1 Darstellung aller getesteten Serumproben

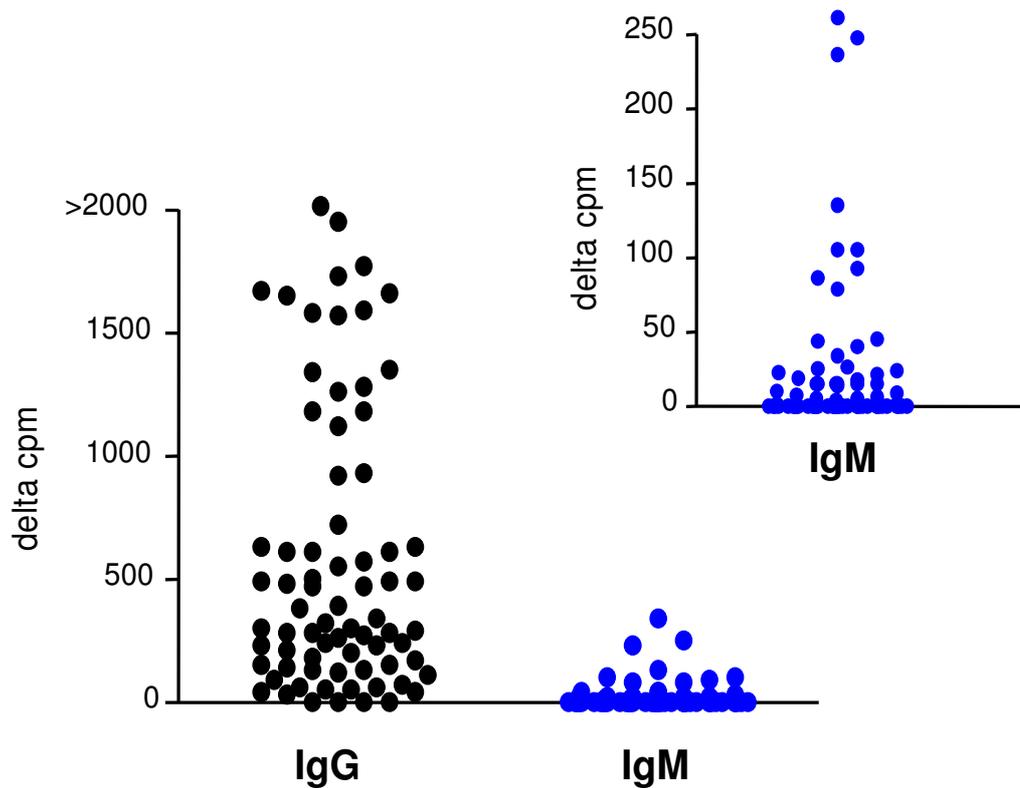


Abbildung 10: Darstellung der getesteten IgG- und IgM-GADA

Schwarz dargestellt sind IgG-GADA, blaue Punkte demonstrieren die Messergebnisse der IgM-GADA. IgG-GADA sind dargestellt bis zu einem Bereich von 2000 Δ cpm. IgM-GADA sind in der rechten oberen Grafik detaillierter in einem Bereich bis 250 Δ cpm dargestellt. Ein Wert liegt oberhalb von 250 Δ cpm (339,1 Δ cpm).

Es handelt sich um insgesamt 74 gemessene Proben. Die Werte für die IgM-GADA variieren zwischen 0 Δ cpm und 339,1 Δ cpm (Median 14,9 Δ cpm).

4. Ergebnisse

Bei 9 der 24 getesteten Kinder war mindestens eine Probe positiv für IgM-GADA (37,5%). Bei keinem der Kinder wurden IgM-Autoantikörper vor dem Auftreten von IgG gefunden (0%).

4.2.2.2. Darstellung aller getesteten Serumproben eines Individuums

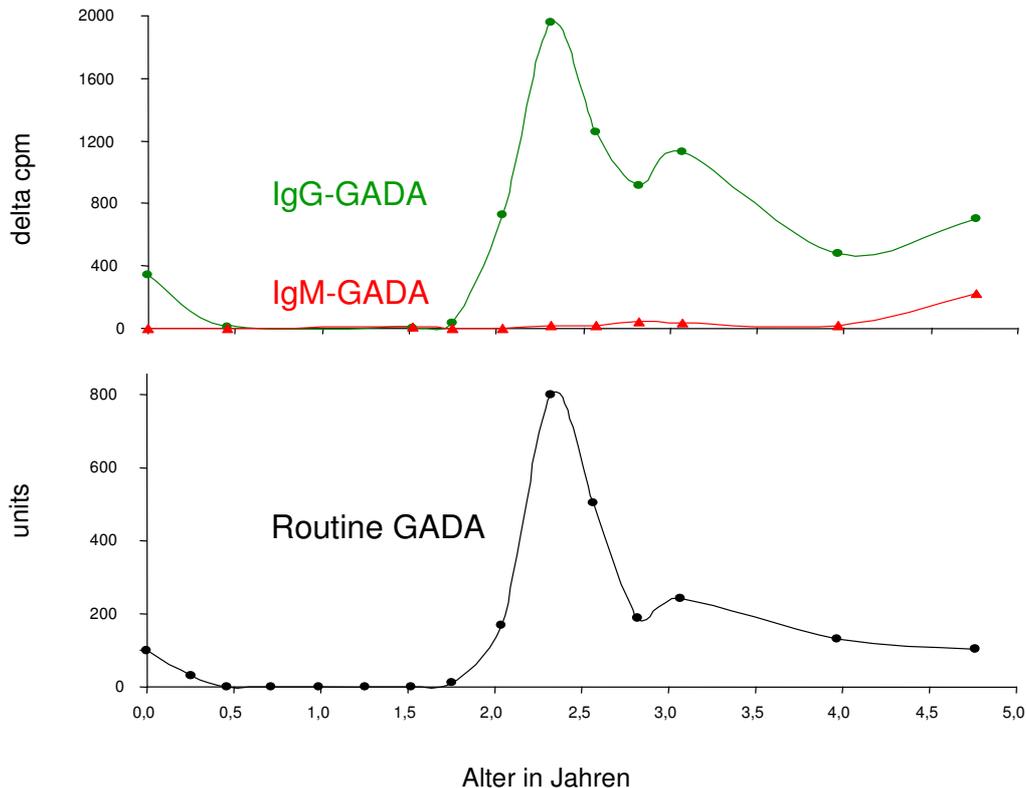


Abbildung 11: GADA-Isotypen im Verlauf bei einem prädiabetischen Individuum

Die x-Achse stellt das Alter in Jahren bis zu einem Alter von 5 Jahren dar. Die untere Grafik zeigt die auf eine Standardkurve bezogenen units des Routine-Assays (schwarze Linie), während die obere Grafik die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Δcpm für IgG (grüne Linie) und IgM (rote Linie) darstellt.

Abbildung 11 ist eine Darstellung der Messwerte eines Individuums des Studienkollektivs über die Zeit der Studienteilnahme hinweg. Es zeigt sich hier, dass die Kurven des Routine-Assays und die Messwerte für IgG-GADA des neu etablierten Messverfahrens sehr parallel verlaufen. Dies lässt schlussfolgern, dass die Abtrennung und der Transfer des Überstandes auch hier das Ergebnis für IgG-Autoantikörper nicht verfälscht.

4. Ergebnisse

Es zeigt sich eine leichte Erhöhung der IgM-GADA im Alter von knapp drei Jahren auf Werte von 15,0 Δ cpm und 34,3 Δ cpm. Anschließend kommt es wieder zu einer IgM-GADA Negativität. Gegen Ende der Darstellung im Alter von knapp fünf Jahren kommt es zu einer deutlichen Positivität der IgM-GADA mit 247,8 Δ cpm. Wie hier deutlich zu sehen ist, ist der IgM-Anstieg erst nachweisbar, wenn bereits IgG vorhanden sind, also erst im Verlauf der Autoantikörper-Positivität. Dies spricht für Reimmunisierungsprozesse im Verlauf des präklinischen Diabetes. Ebenfalls wird sehr deutlich, dass das Auftreten von IgM-GADA nicht zwangsläufig mit hohen Messwerten an IgG-GADA korreliert (Abbildung 11).

4.2.2.3. IgM-GADA positive Kinder im Verlauf und korrespondierende GADA-Epitopmesswerte

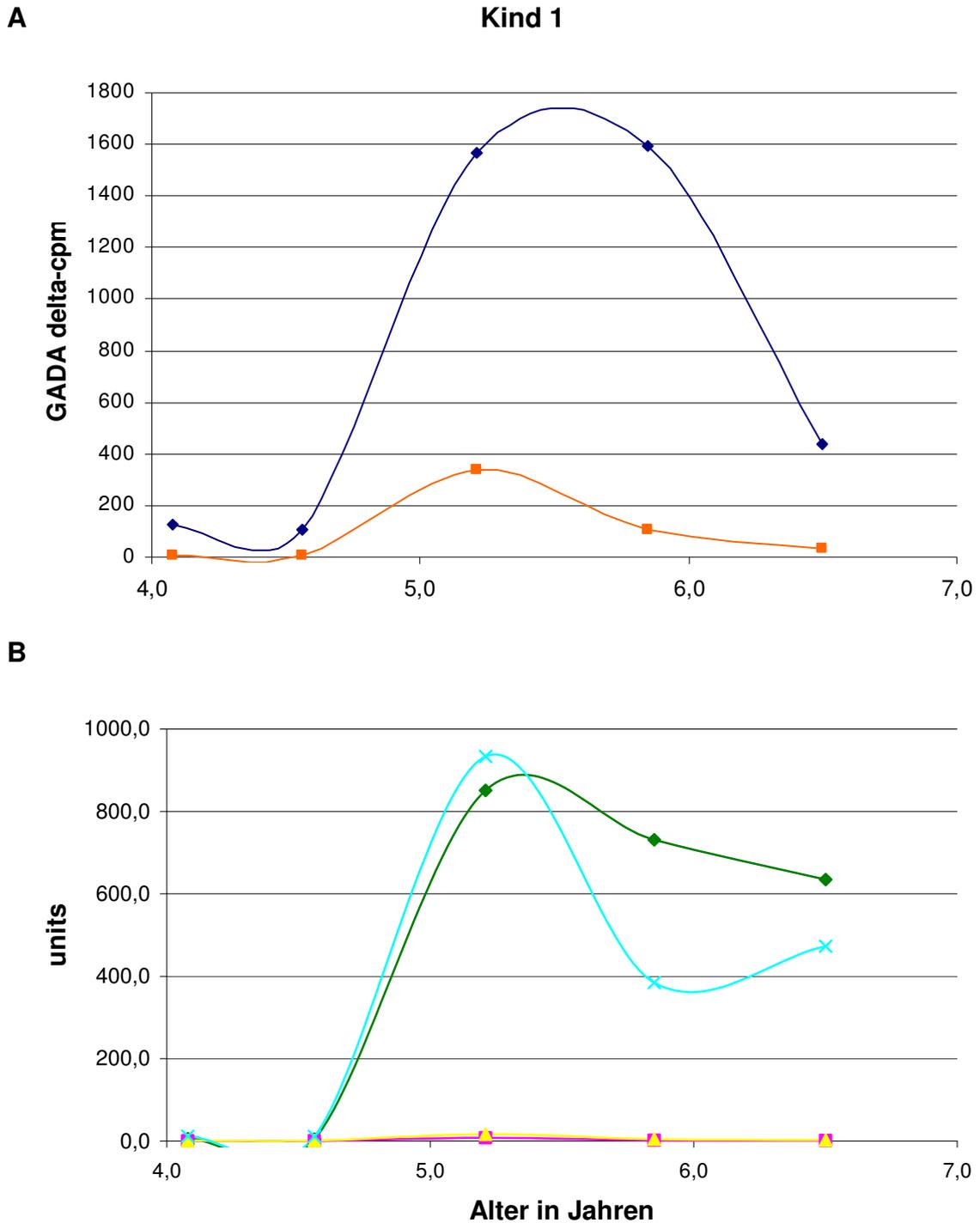


Abbildung 12: IgG-GADA, IgM-GADA und die GADA Epitope COOH, NH₂, GAD67 und NASTU bei Kind 1

4. Ergebnisse

Die x-Achse stellt das Alter des Kindes in Jahren dar. (A) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der GADA- Δ cpm. Die blaue Linie stellt die gemessenen Δ cpm für IgG-GADA dar, während die orange Linie die Δ cpm für IgM zeigt. (B) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der GADA-Epitope in Units abgeleitet aus einer Standardkurve. Die 4 Graphen stehen für die aus derselben Probe gemessenen GADA-Epitope COOH (grün), NH₂ (pink), GAD67 (gelb) und NASTU (türkis).

In Abbildung 12 zeigt sich, dass IgG, IgM und die Epitop-Spezifitäten GAD-COOH (grün) und GAD-NASTU (türkis) gleichzeitig im Verlauf ansteigen und auch der höchste Titerwert zeitgleich erreicht wird. Es kann keine IgM-Positivität vor einer IgG-Positivität festgestellt werden. Die Epitope COOH und NASTU lassen sich hier im deutlich positiven Bereich bis über 800 Units zusammen mit einem Anstieg der IgM-GADA auf 339,1 Δ cpm detektieren. GAD-NH₂ und GAD67 bleiben in allen getesteten Seren des Kindes 1 negativ.

4. Ergebnisse

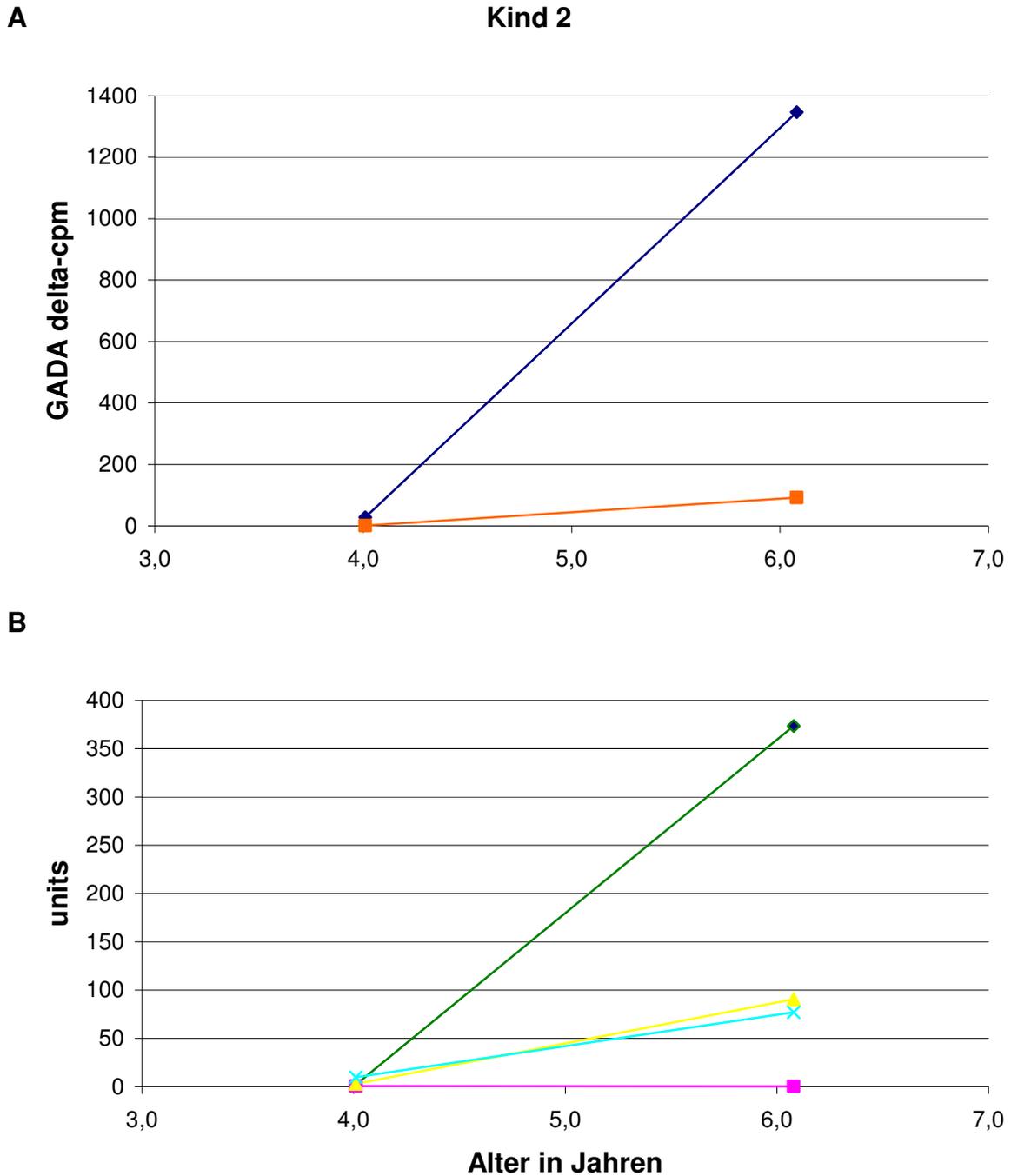


Abbildung 13: IgG-GADA, IgM-GADA und die GADA Epitope COOH, NH₂, GAD67 und NASTU bei Kind 2

Die x-Achse stellt das Alter des Kindes in Jahren dar. (A) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der GADA- Δ cpm. Die blaue Linie stellt die gemessenen Δ cpm für IgG-GADA dar, während die orange Linie die Δ cpm für IgM zeigt. (B) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der GADA-Epitope in Units abgeleitet aus einer Standardkurve. Die 4 Graphen

4. Ergebnisse

stehen für die aus derselben Probe gemessenen GADA-Epitope COOH (grün), NH₂ (pink), GAD67 (gelb) und NASTU (türkis).

Von Kind 2 waren nur 2 Proben verfügbar. Hier zeigt sich, dass sowohl IgG- als auch IgM-GADA im Laufe von 2 Jahren ansteigen. Bei der Auswertung der Epitop-Spezifitäten bleibt NH₂ negativ, GAD67 und NASTU steigen leicht an, während GAD-COOH erneut deutlich positiv ist. Wie auch bei Kind 1 beschrieben, lassen sich zusammen mit einer neu auftretenden IgM-Positivität auch neu festzustellende spezifische Autoantikörper gegen GAD-COOH und GAD-NASTU nachweisen.

4. Ergebnisse

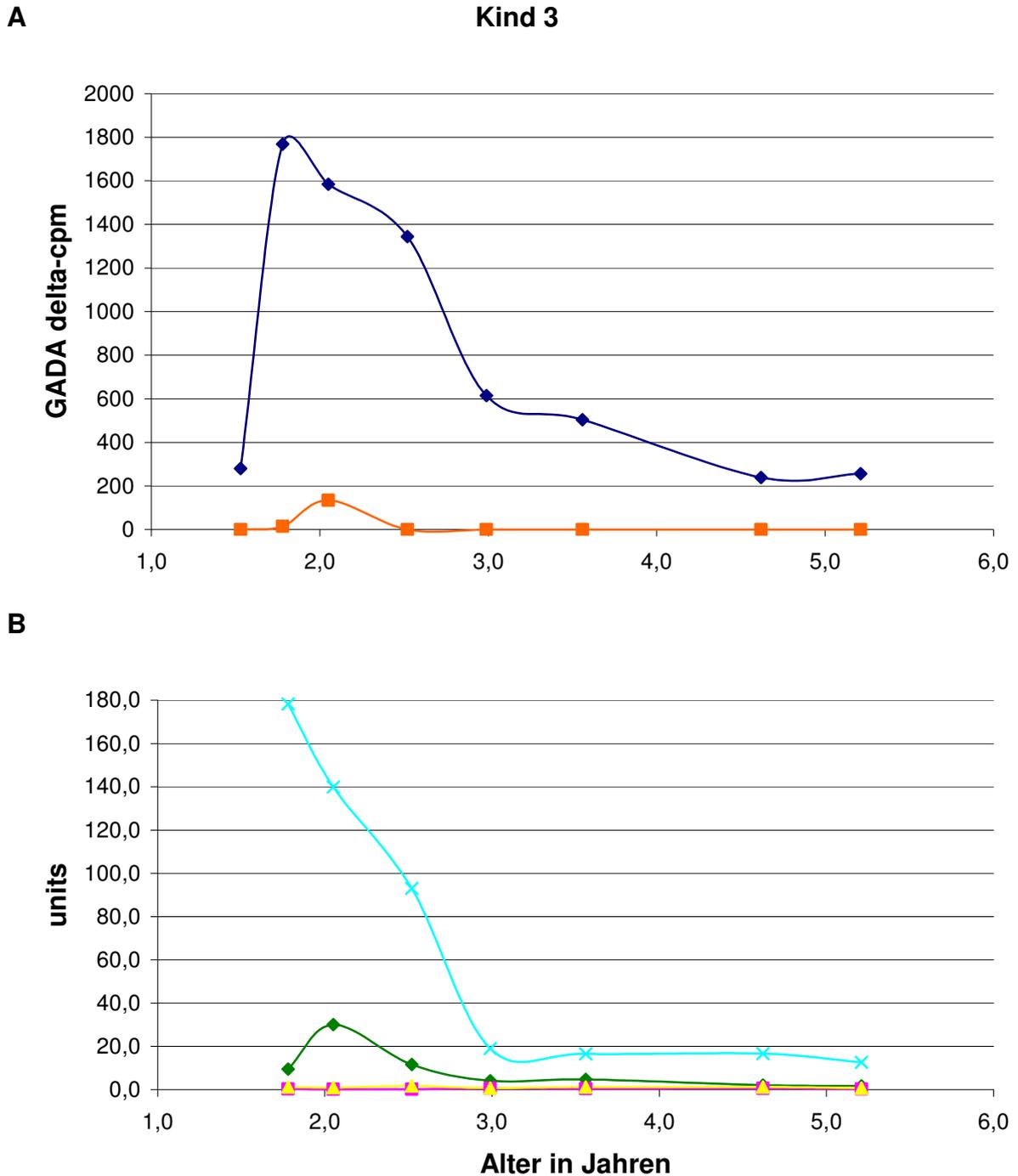


Abbildung 14: IgG-GADA, IgM-GADA und die GADA Epitope COOH, NH₂, GAD67 und NASTU bei Kind 3

Die x-Achse stellt das Alter des Kindes in Jahren dar. (A) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der GADA- Δ cpm. Die blaue Linie stellt die gemessenen Δ cpm für IgG-GADA dar, während die orange Linie die Δ cpm für IgM zeigt. (B) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der GADA-Epitope in Units abgeleitet aus einer Standardkurve. Die 4 Graphen

4. Ergebnisse

stehen für die aus derselben Probe gemessenen GADA-Epitope COOH (grün), NH2 (pink), GAD67 (gelb) und NASTU (türkis).

Bei Kind 3 kann dargestellt werden, dass zuerst IgG-GADA den höchsten Titerwert erreichen und IgM-GADA im Verlauf danach positiv werden. Auch hier zeigt sich kein Reifungsprozess von IgM zu IgG. Festzustellen ist, dass auch bei Kind 3 der Anstieg der IgM-GADA parallel zum Anstieg des Epitops COOH verläuft, was sich anhand der beiden ähnlichen Kurvenverläufe von IgM-GADA (Abbildung 14 A, orange Linie) und COOH (Abbildung 14 B, grüne Linie) verdeutlichen lässt. NASTU ist erneut positiv, sinkt allerdings im Verlauf der Serumproben parallel zu IgG-GADA stark ab. NH2 und GAD67 konnten nicht nachgewiesen werden.

4. Ergebnisse

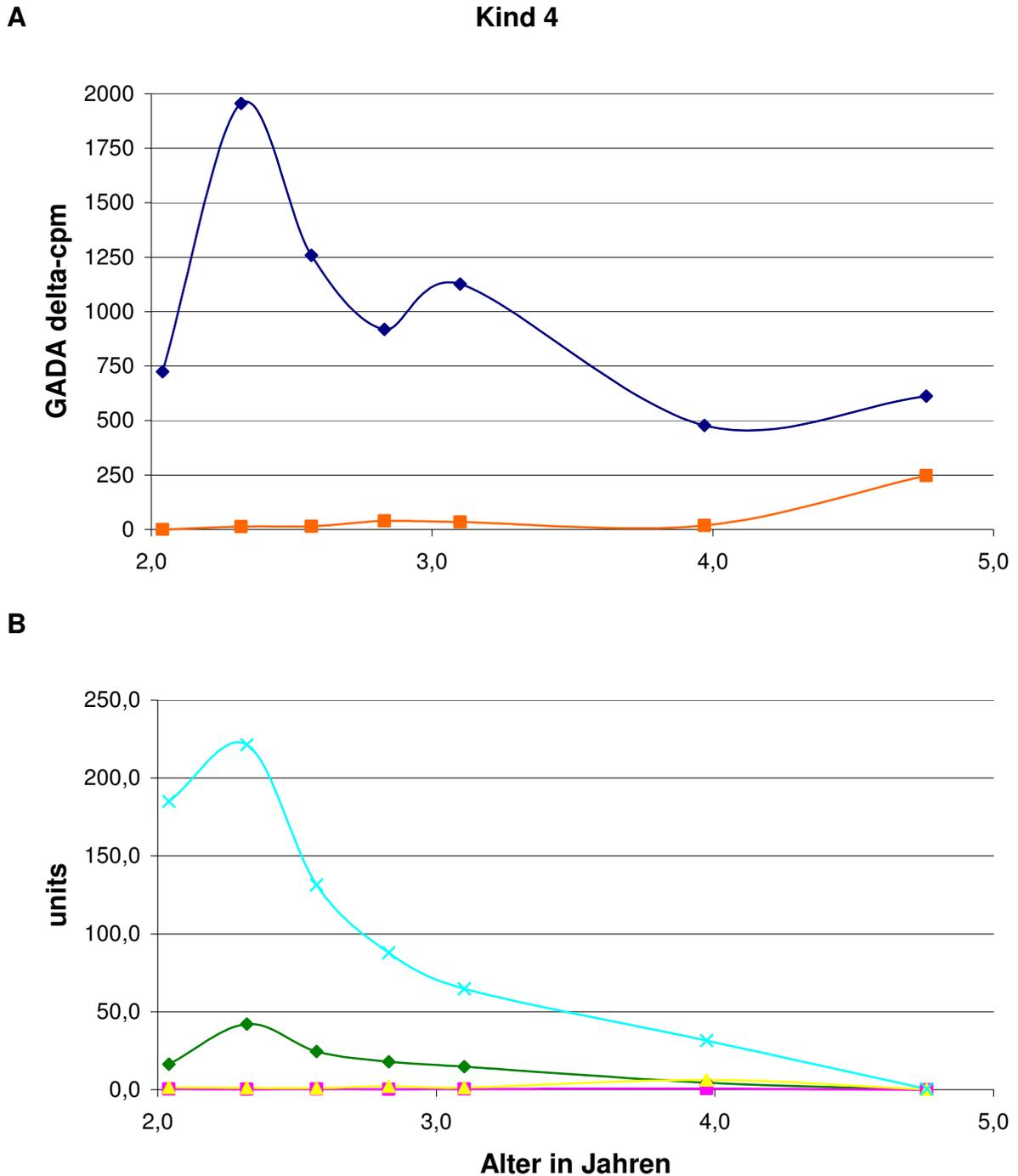


Abbildung 15: IgG-GADA, IgM-GADA und die GADA Epitope COOH, NH₂, GAD67 und NASTU bei Kind 4

Die x-Achse stellt das Alter des Kindes in Jahren dar. (A) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der GADA- Δ cpm. Die blaue Linie stellt die gemessenen Δ cpm für IgG-GADA dar, während die orange Linie die Δ cpm für IgM zeigt. (B) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der GADA-Epitope in Units abgeleitet aus einer Standardkurve. Die 4 Graphen

4. Ergebnisse

stehen für die aus derselben Probe gemessenen GADA-Epitope COOH (grün), NH₂ (pink), GAD67 (gelb) und NASTU (türkis).

In Abbildung 15 zeigt sich eine geringe Erhöhung der IgM nach einem hohen Titer IgG-GADA und im Verlauf bei einem nachfolgenden IgG-Anstieg gleichzeitig eine deutliche Erhöhung der IgM-GADA. NASTU kann erneut parallel zu IgG-GADA im deutlich positiven Bereich detektiert werden. Bei COOH kommt es zu einem leichten Anstieg und einem anschließenden Absinken in den negativen Bereich. Bei Kind 4 lässt sich kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von COOH bzw. NASTU und einer IgM-GADA-Positivität darlegen.

4. Ergebnisse

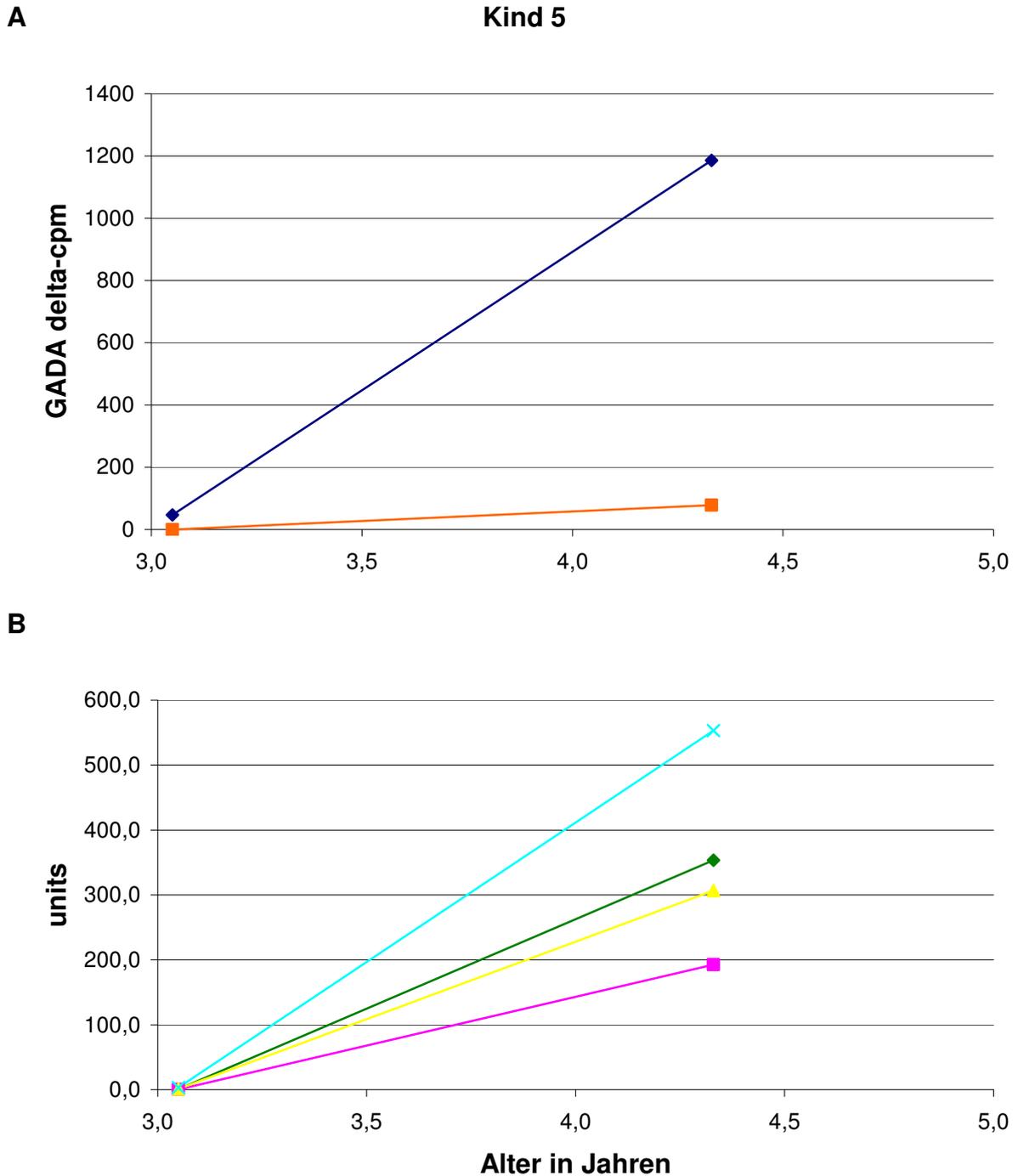


Abbildung 16: IgG-GADA, IgM-GADA und die GADA Epitope COOH, NH₂, GAD67 und NASTU bei Kind 5

Die x-Achse stellt das Alter des Kindes in Jahren dar. (A) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der GADA- Δ cpm. Die blaue Linie stellt die gemessenen Δ cpm für IgG-GADA dar, während die orange Linie die Δ cpm für IgM zeigt. (B) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der GADA-Epitope in Units abgeleitet aus einer Standardkurve. Die 4 Graphen

4. Ergebnisse

stehen für die aus derselben Probe gemessenen GADA-Epitope COOH (grün), NH₂ (pink), GAD67 (gelb) und NASTU (türkis).

Bei Kind 5 lagen nur 2 Serumproben zur Analyse vor. In Abbildung 16 zeigt sich ein Anstieg der IgG-GADA und eine leichte Erhöhung der IgM-GADA im Laufe eines Jahres. Alle 4 getesteten Epitop-Spezifitäten konnten in der entsprechenden Serumprobe ebenfalls nachgewiesen werden. Hier konnten somit GADA gegen multiple Regionen des Moleküls gleichzeitig mit IgM-GADA festgestellt werden.

4. Ergebnisse

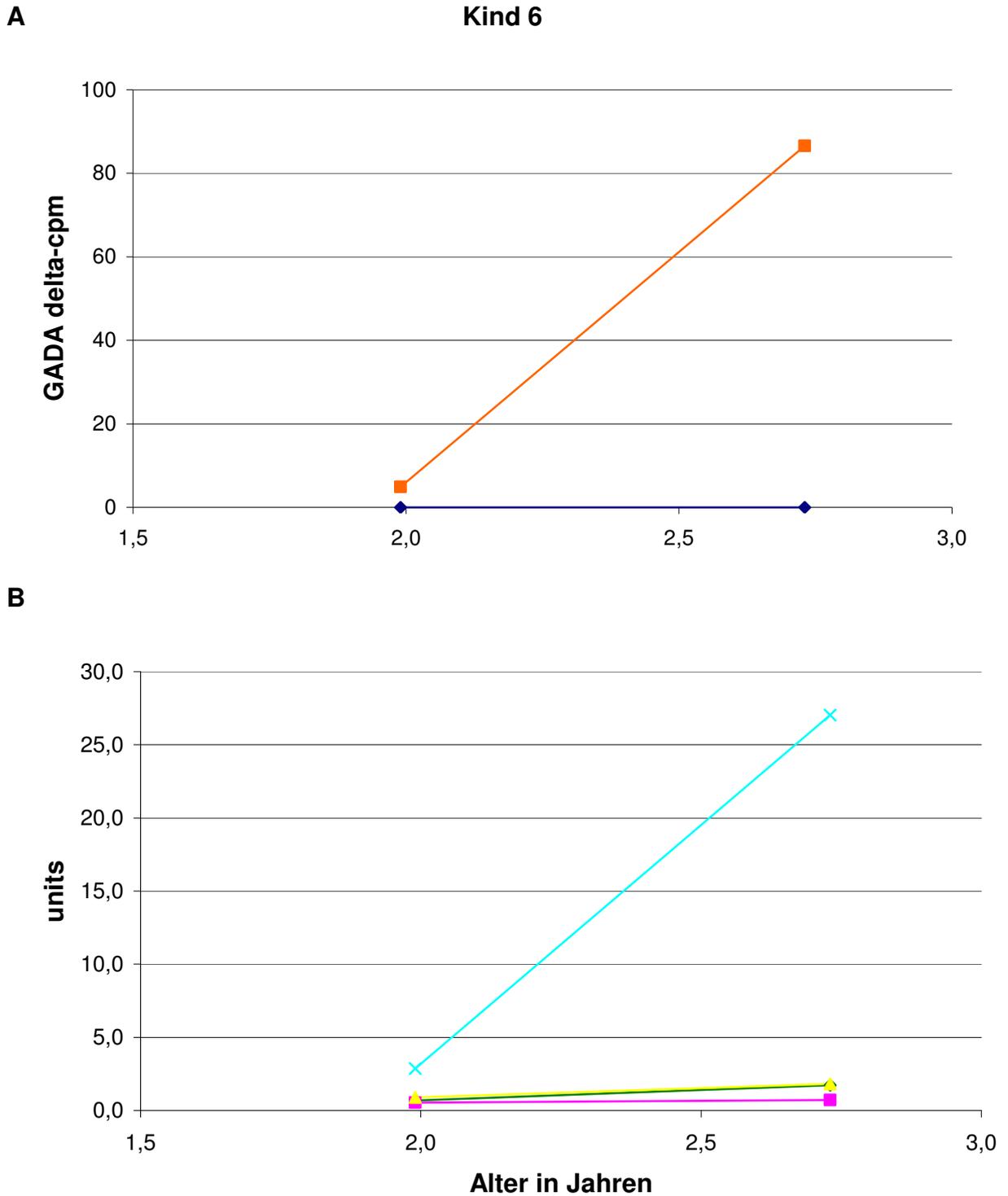


Abbildung 17: IgG-GADA, IgM-GADA und die GADA Epitope COOH, NH₂, GAD67 und NASTU bei Kind 6

Die x-Achse stellt das Alter des Kindes in Jahren dar. (A) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der GADA- Δ cpm. Die blaue Linie stellt die gemessenen Δ cpm für IgG-GADA

4. Ergebnisse

dar, während die orange Linie die Δcpm für IgM zeigt. (B) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der GADA-Epitope in Units abgeleitet aus einer Standardkurve. Die 4 Graphen stehen für die aus derselben Probe gemessenen GADA-Epitope COOH (grün), NH₂ (pink), GAD67 (gelb) und NASTU (türkis).

Kind 6 stellt eine Besonderheit dar, denn hier wurden in 2 aufeinander folgenden Blutproben positive Werte für IgM-GADA festgestellt, während in beiden Proben keine IgG-GADA detektiert werden konnten. Das erste gewonnene Serum liegt knapp über dem Hintergrundlevel des Testansatzes (5,0 Δcpm). Das darauf folgende Serum hingegen liegt deutlich im IgM-GADA positiven Bereich (86,6 Δcpm). Die Epitope NH₂, GAD67 und auch COOH bleiben negativ, wohingegen NASTU in der zweiten Serumprobe detektiert wurde.

4. Ergebnisse

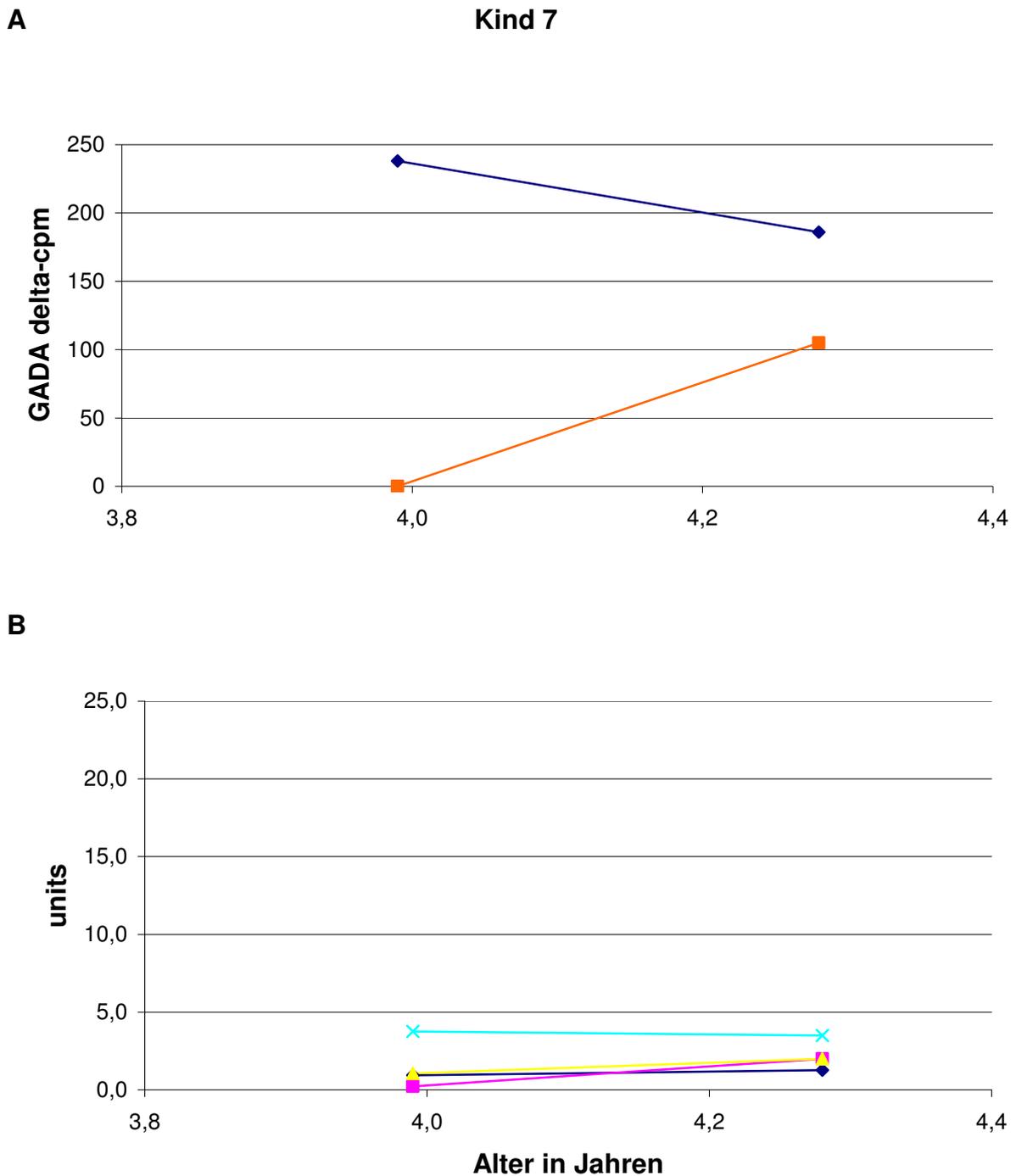


Abbildung 18: IgG-GADA, IgM-GADA und die GADA Epitope COOH, NH₂, GAD67 und NASTU bei Kind 7

Die x-Achse stellt das Alter des Kindes in Jahren dar. (A) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der GADA- Δ cpm. Die blaue Linie stellt die gemessenen Δ cpm für IgG-GADA dar, während die orange Linie die Δ cpm für IgM zeigt. (B) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der GADA-Epitope in Units abgeleitet aus einer Standardkurve. Die 4 Graphen

4. Ergebnisse

stehen für die aus derselben Probe gemessenen GADA-Epitope COOH (grün), NH₂ (pink), GAD67 (gelb) und NASTU (türkis).

Interessanterweise sinken bei Kind 7 die IgG-GADA innerhalb von ein paar Monaten (Alter 3,99 und 4,28 Jahre) klar ab, während IgM-GADA deutlich auf einen Wert über 100 Δ cpm ansteigen. Alle Epitope bleiben im negativen Bereich unter 5 Units.

4. Ergebnisse

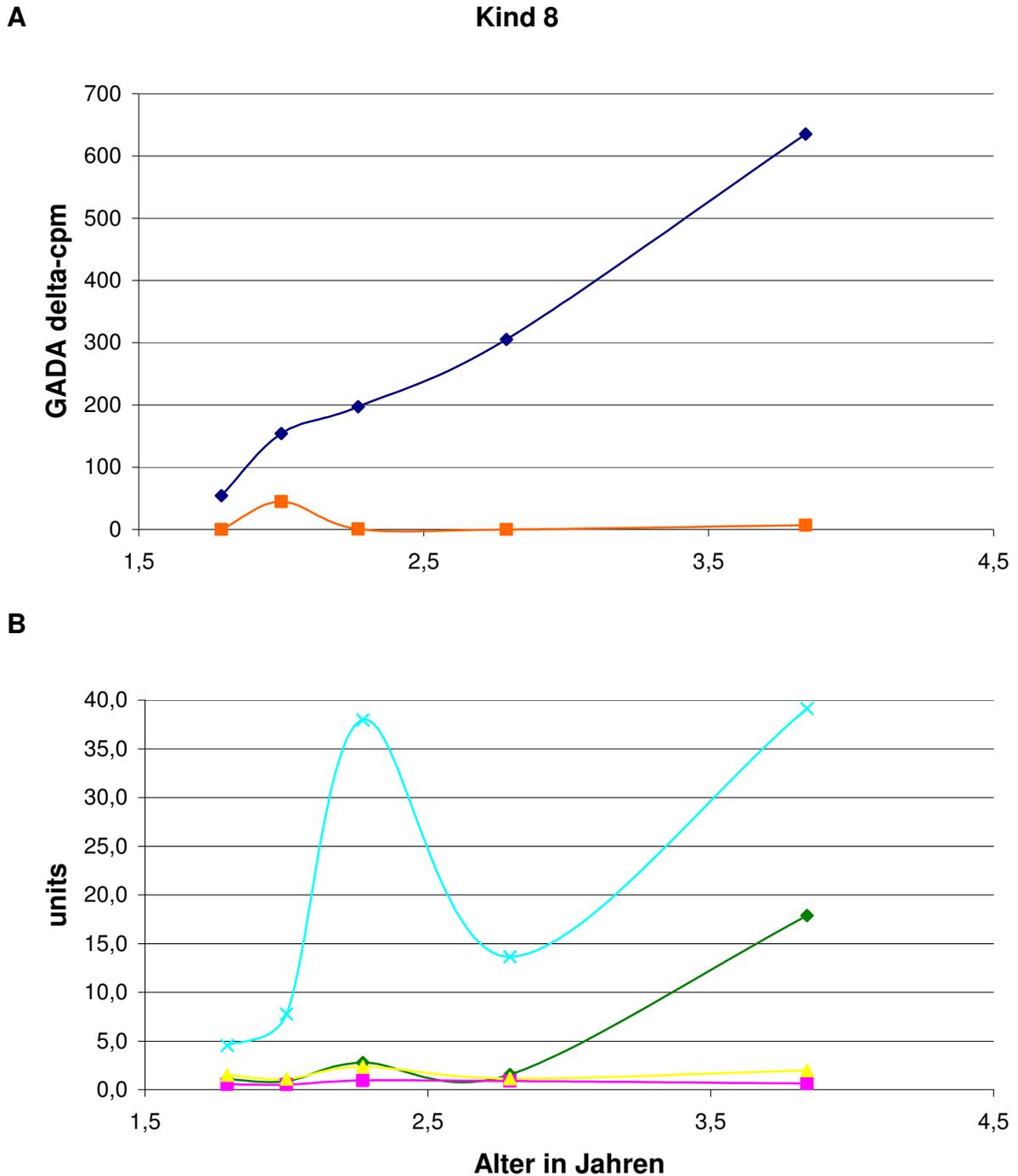


Abbildung 19: IgG-GADA, IgM-GADA und die GADA Epitope COOH, NH₂, GAD67 und NASTU bei Kind 8

Die x-Achse stellt das Alter des Kindes in Jahren dar. (A) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der GADA- Δ cpm. Die blaue Linie stellt die gemessenen Δ cpm für IgG-GADA dar, während die orange Linie die Δ cpm für IgM zeigt. (B) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der GADA-Epitope in Units abgeleitet aus einer Standardkurve. Die 4 Graphen

4. Ergebnisse

stehen für die aus derselben Probe gemessenen GADA-Epitope COOH (grün), NH₂ (pink), GAD67 (gelb) und NASTU (türkis).

Es zeigt sich ein zeitgleicher Anstieg der IgM- und IgG-GADA. Während IgG in den folgenden Proben weiter ansteigt, sinken IgM-GADA wieder und sind im folgenden nicht mehr nachweisbar. Bei der Bestimmung der Epitop-Spezifitäten lässt sich bei Kind 8 folgendes feststellen: COOH und NASTU steigen im Verlauf parallel zu IgG-GADA. NH₂ und GAD67 lassen sich auch bei Kind 8 nicht nachweisen. Es lässt sich in diesem Fall kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von IgM-GADA und dem Vorhandensein von Epitop-Spezifitäten darlegen.

4. Ergebnisse

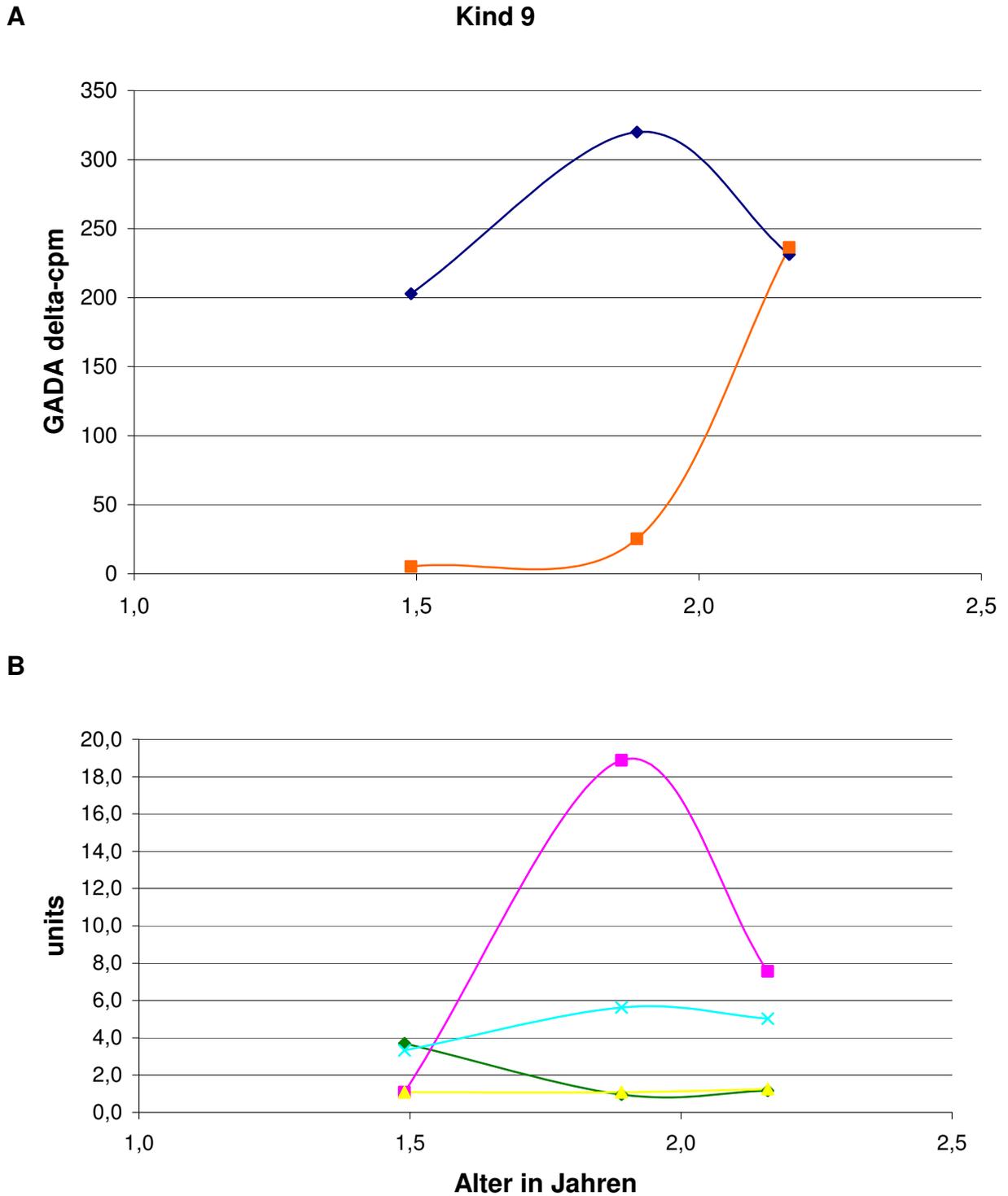


Abbildung 20: IgG-GADA, IgM-GADA und die GADA Epitope COOH, NH₂, GAD67 und NASTU bei Kind 9

Die x-Achse stellt das Alter des Kindes in Jahren dar. (A) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der GADA- Δ cpm. Die blaue Linie stellt die gemessenen Δ cpm für IgG-GADA

4. Ergebnisse

dar, während die orange Linie die Δcpm für IgM zeigt. (B) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der GADA-Epitope in Units abgeleitet aus einer Standardkurve. Die 4 Graphen stehen für die aus derselben Probe gemessenen GADA-Epitope COOH (grün), NH₂ (pink), GAD67 (gelb) und NASTU (türkis).

Wie auch bei Kind 7 (Abbildung 18), lässt sich bei Kind 9 ein Anstieg der IgM-GADA beobachten, nachdem ein IgG-GADA Peak-Wert erreicht wurde und IgG-GADA bereits wieder absinken. Es zeigt sich erstmals eine leichte Erhöhung von GAD-NH₂-Autoantikörpern, welche parallel zum Kurvenverlauf von IgG-GADA verlaufen. COOH, NASTU und GAD67 bleiben im negativen Bereich.

Auch in Abbildung 20 kann keine Korrelation zwischen dem Auftreten von IgM-GADA und den verschiedenen Epitop-Spezifitäten nachgewiesen werden.

In Zusammenschau aller IgM-GADA-positiven Probanden und der jeweiligen Messergebnisse für IgG-GADA, IgM-GADA und für die Epitope COOH, NH₂, GAD67 und NASTU kann festgestellt werden, dass in keinem Fall IgM-GADA auftreten, bevor es zu einem Anstieg von IgG-GADA kommt. Vielmehr treten IgM-GADA im Verlauf einer IgG-Positivität auf. In 4 von 9 Fällen (44%) kommt es zu einem IgM-GADA Anstieg im Anschluss an einen IgG-GADA Höchstwert und in 4 von 9 Fällen (44%) zeigt sich zeitgleich in derselben Probe eine Positivität für IgG- und IgM-GADA. In einem Fall konnten in 2 Seren positive Werte für IgM-GADA detektiert werden, während keine IgG-GADA enthalten waren (Abbildung 17).

Bezüglich des Auftretens der verschiedenen Epitop-Spezifitäten lassen sich folgende Aussagen treffen: In nur einer Serumprobe der IgM-GADA positiven Studienteilnehmer konnten alle Epitop-Spezifitäten festgestellt werden. Darüber hinaus konnten keine GAD67-Autoantikörper nachgewiesen werden und nur bei einem Kind kam es außerdem zu einer leichten Erhöhung der NH₂-GADA. COOH und NASTU konnten hingegen in einigen Seren im deutlich positiven Bereich detektiert werden. Bei 4 Probanden (44%) lässt sich kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Epitop-Spezifitäten und IgM-GADA feststellen. Jedoch wird bei 5 von 9 Kindern (56%) ein COOH-Anstieg parallel zur Erhöhung der IgM-GADA beobachtet. Bei 5 Kindern (56%) kommt es zu einem parallelen Kurvenverlauf von NASTU und IgM-GADA.

4.2.3. Messungen der IgG- und IgM-IA-2A

4.2.3.1. Darstellung aller getesteten Serumproben

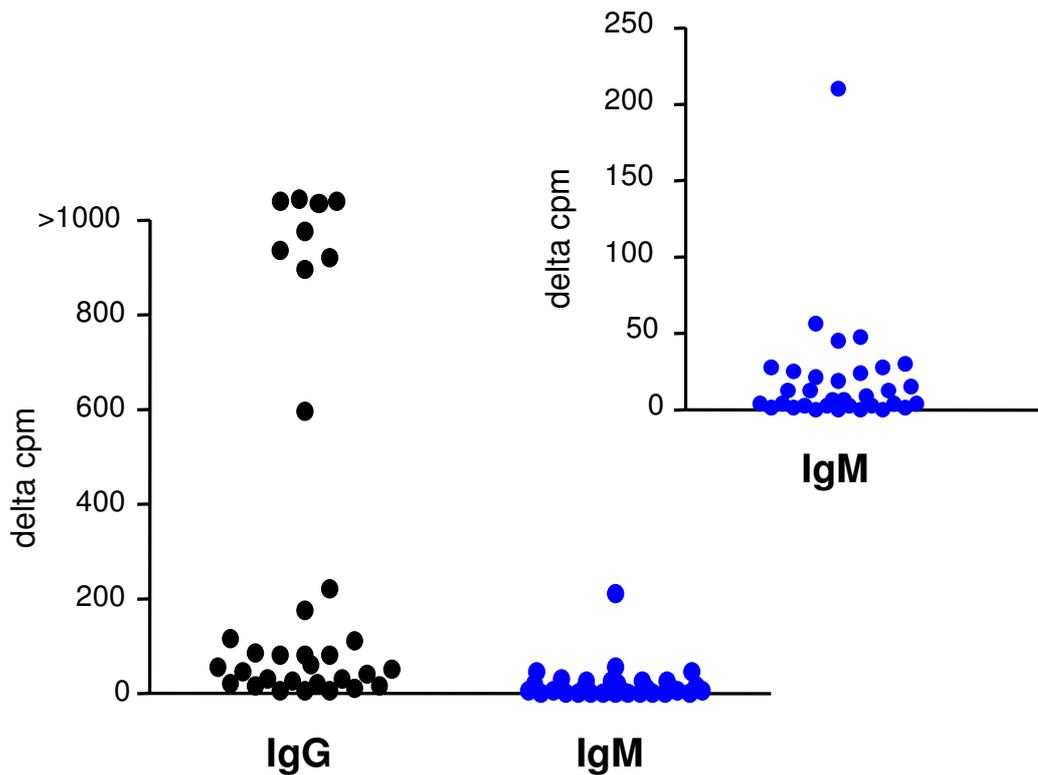


Abbildung 21: Darstellung der getesteten IgG- und IgM IA-2A

Schwarz dargestellt sind IgG-IA-2A bis zu einem Bereich von 1000 Δ cpm. Schwarze Punkte an dieser Grenze liegen oberhalb 1000 Δ cpm. Blaue Punkte demonstrieren die Messergebnisse der IgM-IA-2A. Die rechte obere Grafik zeigt eine detailliertere Ansicht der IgM-IA-2A bis zu einem Bereich von 250 Δ cpm.

Dargestellt sind 33 Proben von 6 getesteten Kindern. Insgesamt wiesen 2 der 6 Kinder IgM-IA-2A im Verlauf wie folgt auf:

4.2.3.2. Darstellung aller getesteten Serumproben eines Individuums

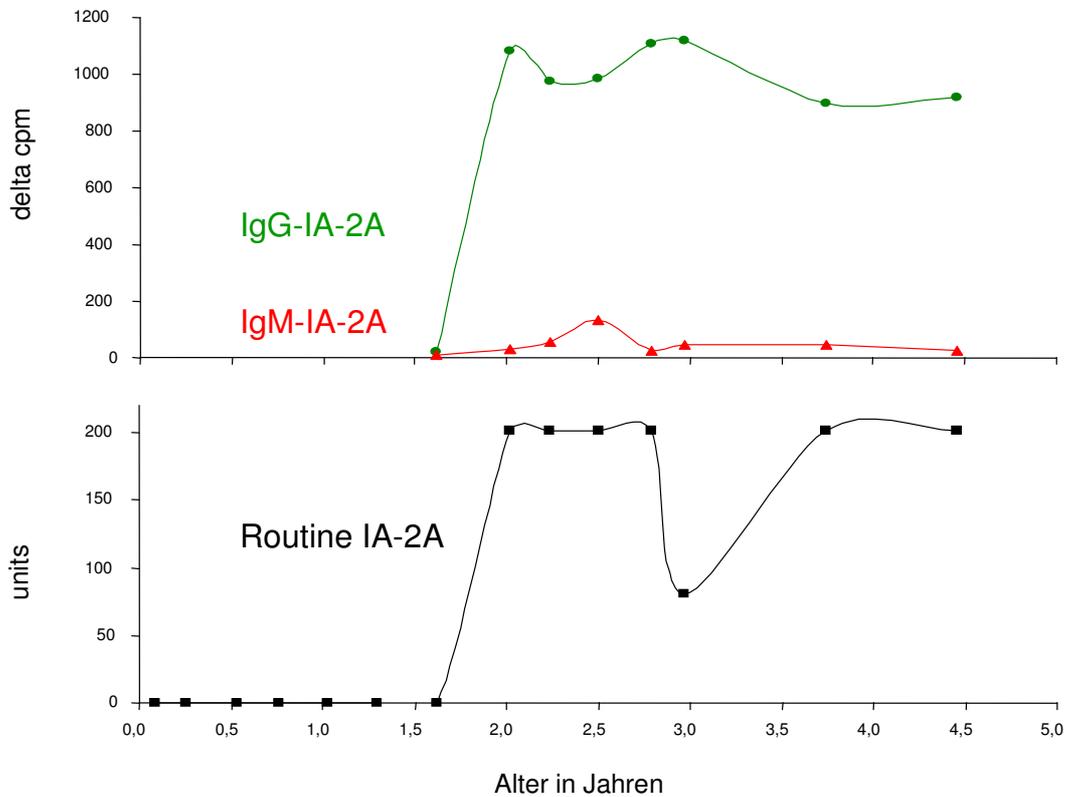


Abbildung 22: IA-2A-Isotypen im Verlauf bei einem prädiabetischen Individuum (Kind 10)

Die x-Achse stellt das Alter in Jahren bis zu einem Alter von 5 Jahren dar. Die untere Grafik zeigt die auf eine Standardkurve bezogenen units des Routine-Assays (schwarze Linie), während die obere Grafik die gemessenen Δcpm für IgG (grüne Linie) und IgM (rote Linie) darstellt.

Abbildung 24 ist eine Darstellung der Messwerte eines Individuums des Studienkollektivs (Kind 10) über die Zeit der Studienteilnahme hinweg. Es zeigt sich hier, dass die Kurven des Routine-Assays und die Messwerte für IgG-IA-2A des neu etablierten Messverfahrens sehr parallel verlaufen. Dies lässt schlussfolgern, dass die Abtrennung und der Transfer des Überstandes auch hier das Ergebnis für IgG-Autoantikörper nicht verfälschen.

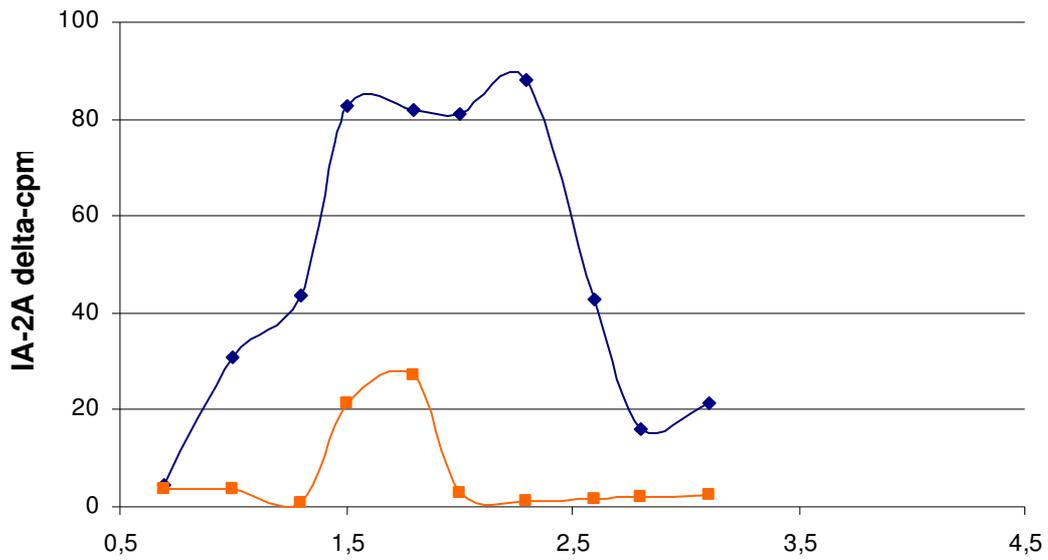
4. Ergebnisse

Im Alter von ungefähr 2,5 Jahren erfolgt eine leichte Erhöhung der IgM-IA-2A auf Werte von 21,4 Δ cpm und 24,2 Δ cpm. Anschließend kommt es wieder zu einer IgM-IA-2A-Negativität. Auch bei der Analyse der IA-2A kommt es zur Detektion von IgM erst nach einer bereits verifizierten Präsenz von IgG, also wieder erst im Verlauf der Autoantikörper-Positivität. Dies spricht für Reimmunisierungsprozesse im Verlauf des präklinischen Diabetes.

4. Ergebnisse

4.2.3.3. IgM-IA-2A positive Kinder im Verlauf und korrespondierende IA-2A-Epitopmesswerte

A Kind 4



B

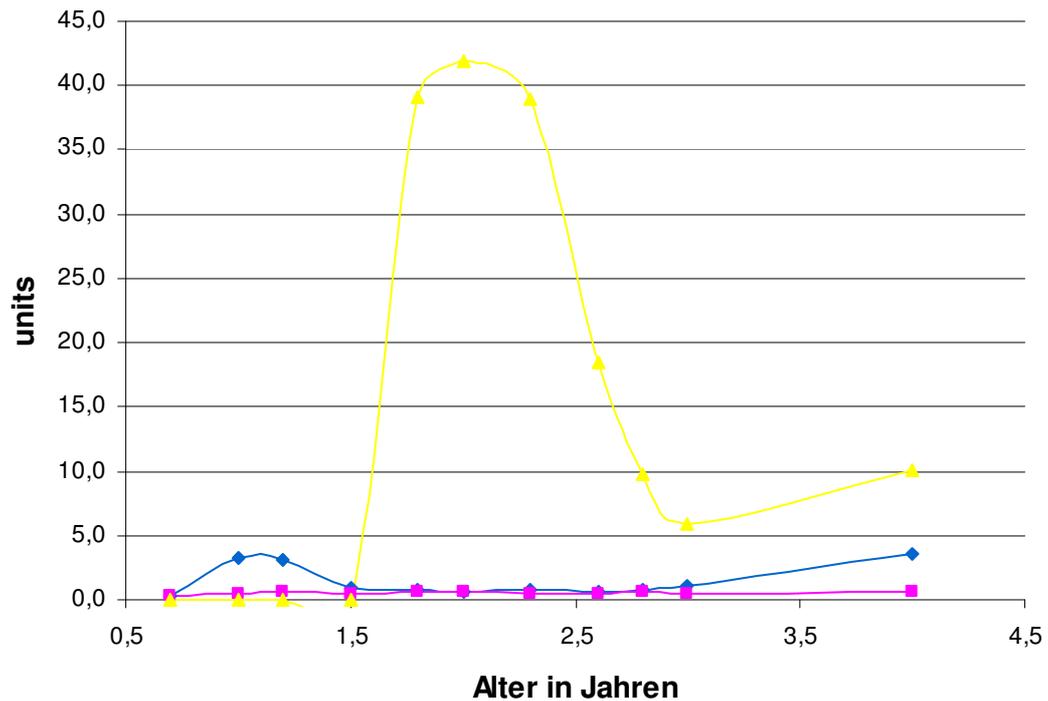


Abbildung 23: IgG-IA-2A, IgM-IA-2A und die IA-2A Epitope PTP, β -PTP und JM bei Kind 4

Die x-Achse stellt das Alter des Kindes in Jahren dar. (A) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der IA-2A- Δ cpm. Die blaue Linie stellt die gemessenen Δ cpm für IgG-IA-2A dar, während die orange Linie die Δ cpm für IgM zeigt. (B) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der IA-2A-Epitope in Units abgeleitet aus einer Standardkurve. Die 3 Graphen stehen für die aus derselben Probe gemessenen IA-2A-Epitope PTP (türkis), β -PTP (rosa) und JM (gelb).

4. Ergebnisse

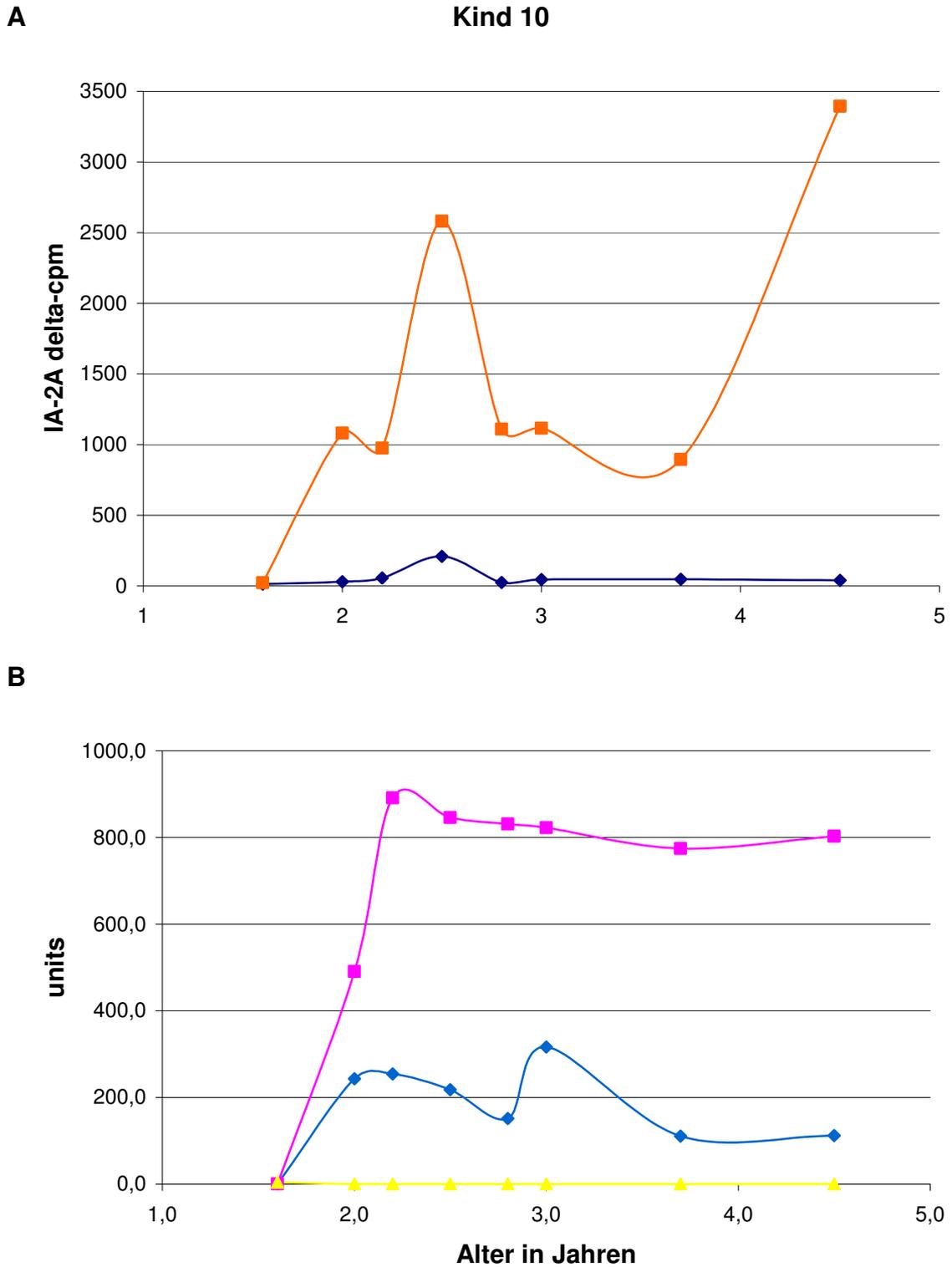


Abbildung 24: IgG-IA-2A, IgM-IA-2A und die IA-2A Epitope PTP, β -PTP und JM bei Kind 10

4. Ergebnisse

Die x-Achse stellt das Alter des Kindes in Jahren dar. (A) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der IA-2A- Δ cpm. Die blaue Linie stellt die gemessenen Δ cpm für IgG-IA-2A dar, während die orange Linie die Δ cpm für IgM zeigt. (B) Die y-Achse zeigt die gemessenen Werte der IA-2A-Epitope in Units abgeleitet aus einer Standardkurve. Die 3 Graphen stehen für die aus derselben Probe gemessenen IA-2A-Epitope PTP (türkis), β -PTP (rosa) und JM (gelb).

In den Abbildungen 22 und 23 sind die Messergebnisse der beiden IgM-IA-2A-positiven Kinder dargestellt. Kind 4 weist nur leicht erhöhte IgM-IA-2A auf, wohingegen bei Kind 10 deutlich positive IgM-Werte vorliegen. Bei Kind 10 kommt es zu einem Anstieg der IgM-IA-2A zeitgleich mit einer deutlichen Erhöhung der Epitope IA-2 PTP und IA-2 β PTP (Abbildung 23). Bei Kind 4 lässt sich nur ein geringer Anstieg des Epitops IA-2 JM feststellen, der ebenfalls zeitgleich mit dem Auftreten von IgM-IA-2A zu beobachten ist (Abbildung 22).

Die Darstellung der Messergebnisse der beiden IgM-IA-2A positiven Kinder lässt erkennen, dass mit dem Auftreten von IgM-IA-2A zeitgleich auch Erhöhungen der unterschiedlichen IA-2A Epitope festzustellen sind.

5. Diskussion

Typ 1 Diabetes ist eine progressive, autoimmune Stoffwechselerkrankung. Im Laufe der Entstehung dieser Erkrankung kommt es in der Bauchspeicheldrüse zum Funktionsverlust der insulin-produzierenden β -Zellen der Langerhans-Inseln. Dies führt letztendlich zu einem absoluten Insulinmangel bei Betroffenen und somit zu den vielfältigen Symptomen dieser Störung.

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass es sich beim Typ 1 Diabetes um eine Autoimmunkrankheit handelt, bei der sich Immunzellen autoreaktiv gegen körpereigene Strukturen des Pankreas richten. Dies lässt sich durch das Detektieren von Autoantikörpern gegen Strukturen der β -Zellen im peripheren Blut nachweisen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob bei Kindern, die mit dem Typ 1 Diabetes assoziierte IgG-Autoantikörper gegen Insulin, GAD und IA-2 aufweisen, auch IgM-Autoantikörper gegen diese Strukturen gefunden werden können.

Der Fokus lag darauf aufzuzeigen, in welchem klinischen Stadium der Typ 1 Diabetes Entstehung IgM-Autoantikörper auftreten. Als zusätzliche Fragestellung wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob es - ähnlich wie beispielsweise bei viralen Infekten - einen initialen Reifungsprozess von IgM zu IgG gibt. Dies wurde untersucht, indem für jedes untersuchte Autoantikörper-positive Kind die Serumprobe vor der ersten IgG-positiven Probe auf IgM getestet wurde. Hierfür wurden etablierte und zu dieser Zeit routinemäßig in der Forschergruppe Diabetes verwendete Radioliganden-Bindungsassays für IgG-IAA mit radioaktiv markiertem Jodid ($^{125}\text{-I}$) und für GADA bzw. IA-2A mit radioaktiv markiertem Methionin (^{35}S -Methionin) in abgewandelter Form zur Detektion von IgM-Autoantikörpern etabliert und verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden Blutproben analysiert, die im Rahmen der BABYDIÄT-Studie gesammelt und routinemäßig auf das Vorhandensein von Diabetes-assoziierten IgG-Autoantikörpern getestet wurden.

Insgesamt soll die Arbeit zu einem besseren Verständnis der im Vorfeld einer Diabetes-Erkrankung ablaufenden immunologischen Prozesse im Körper eines Betroffenen verhelfen und detaillierter darlegen, worin der Ausgangspunkt für diese Autoimmunerkrankung liegen könnte.

5.1. Vorkommen und mögliche Bedeutung von IgM-Autoantikörpern beim Typ 1 Diabetes

Es gab bisher nur wenige Untersuchungen, bei denen das Auftreten von IgM-Inselautoantikörpern getestet wurde. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind nicht eindeutig und lassen keine klaren Aussagen über die Bedeutung von IgM-IAA, IgM-GADA oder auch IgM-IA-2A zu.

Bodansky et al. waren 1986 die ersten, die gezielt nach IgM-IAA und IgM-ICA gesucht hatten und die Frage formulierten, ob es einen Übergang von IgM-Antikörpern zu den „reifen“ IgG gibt. Eingebettet war diese Fragestellung in die Untersuchung, ob die Inselautoimmunität in Abhängigkeit von akuten viralen Infektionen auftritt. Bodansky et al. detektieren damals mit Hilfe eines „enzyme-linked-immunoabsorbent assay“ (ELISA) (Dean 1986) IgM-IAA und IgG-IAA in großer Zahl. Es wurden sogar mehr Positivitäten für IgM-IAA festgestellt als für IgG. Aus heutiger Sicht ist jedoch eindeutig zu proklamieren, dass Bodansky et al. mit ihrer Messmethode nicht spezifisch IgG-IAA bzw. IgM-IAA dargestellt haben können (Bodansky 1986), da von Bonifacio et al. 1990 veröffentlicht, dargelegt werden konnte, dass das verwendete Messverfahren ELISA kein sensitives und spezifisches Verfahren ist, um im Rahmen des Typ 1 Diabetes auftretende Autoantikörper zu detektieren (Bonifacio 1990).

Weiterhin wurde 1999 im Rahmen der BABYDIAB-Studie festgestellt, dass es bei Kindern von Eltern, die an Typ 1 Diabetes erkrankt sind und Autoantikörper entwickeln, meist zuerst zu einem Anstieg eines Autoantikörpers kommt (Bonifacio 1999). Dieser sinkt daraufhin wieder ab, bevor später im Verlauf vor einer Diabetes-Manifestation meist mehrere Autoantikörper nachgewiesen werden können. Dies spricht dafür, dass es innerhalb der prädiabetischen Phase zu Reimmunisierungsprozessen und ferner zu immunologischen Regulationen und Gegenregulationen bei der Reaktion gegen die verschiedenen Antigene kommt. Zusätzlich wurde hier auch nach IgM-IAA, -GADA und -IA-2A gesucht. Bonifacio et al. verwendeten einen isotypen-spezifischen, biotinylierten, monoklonalen, anti-humanen Anti-

körper der Maus, welcher gegen humanes IgM gerichtet war und an Sepharose-beads gekoppelt im Routine-Assay verwendet wurde. Es zeigte sich jedoch keine Positivität für IgM (Bonifacio 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand der Autoantikörperverlaufskurven für GADA und IA-2A gezeigt, dass IgM erst im Verlauf einer IgG-Autoantikörper-Positivität auftreten. Dies spricht ebenfalls dafür, dass es während der Zeit vom Auftreten des ersten Autoantikörpers bis hin zur letztendlichen Diabetes-Manifestation dynamische Immunprozesse ablaufen.

Von Naserke et al. konnte 1999 die höhere Sensitivität des Protein A/G-Radioliganden-Bindungsassays zur Detektion von IgG-IAA im Vergleich zum damals konventionellen Verfahren dargelegt werden. Es wurden versuchsweise 14 Samples in einer modifizierten Form des gleichen Messverfahrens auf IgM-IAA getestet. Hierzu verwendeten auch sie anstatt der herkömmlichen Sepharose den speziellen monoklonalen Mausantikörper (PharMingen, San Diego, CA), um speziell IgM-IAA zu binden. Es konnten mit diesem Versuchsansatz jedoch in keiner der Proben IgM-IAA nachgewiesen werden. Hier wurde also ebenfalls in einer dem Routine-Assay ähnlichen Form nach IgM-IAA gesucht. Es zeigte sich jedoch auch hier keine aus dem Background-Level hervortretende IgM-IAA Positivität (Naserke 1999). Es konnte ferner gezeigt werden, dass IgG-IAA bereits früh nach der Geburt auftreten und der Protein A/G Radiobindungs-Assay eine hohe Sensitivität für diese Messung der IAA aufweist (Naserke 1999).

Auch im Rahmen dieser Arbeit konnten nur bei einem Probanden positive Werte für IgM-IAA festgestellt werden. Im Nachhinein musste aber verifiziert werden, dass bei diesem Kind eine Erkrankung an Diabetes vorlag und diese Werte somit nicht als prädiabetische Autoimmunität gewertet werden können, sondern als gegen therapeutisch exogen zugeführtes Insulin gerichtete Immunität angesehen werden muss.

Petersen et al. untersuchten 1999 Kinder aus der DiMe-Studie (Childhood Diabetes in Finland) nach GADA-Isotypen. Sie verwendeten ebenfalls einen auf Streptavidinbeads gekoppelten monoklonalen Anti-human IgM-Antikörper und stellten

fest, dass IgM und IgE vor allem bei den „Nicht-Progressoren“, also bei Kindern, die im Verlauf der Studie nicht an Typ 1 Diabetes erkrankten, auftraten und folglich als eine unreife Form der Autoimmunität interpretiert wurden (Petersen 1999). Diesen Ergebnissen entgegengesetzt stellten Hoppu et al. hingegen 2004 fest, dass bei „Progressoren“ am häufigsten IgG1- und IgM-GADA detektiert werden können (Hoppu 2004b).

Auch Hawa et al. suchten 2000 mit einem biotinylierten Maus-Antikörper im Radioliganden-Bindungsassay nach IgM-GADA und IgM-IA-2A. Es zeigten sich allerdings nur in einem von 15 getesteten Seren IgM-GADA und in keinem der getesteten Seren IgM-IA-2A (Hawa 2000).

Von Achenbach et al. gab es im Jahr 2004 die letzte Veröffentlichung, in der das Auftreten von IgM-Autoantikörpern beschrieben wurde. Achenbach et al. fanden IgA- und IgM-Autoantikörper in 12 bis 17 % von 180 untersuchten Kindern, jeweils für IAA, GADA und IA-2A. In diesem Studienaufbau wurde ebenfalls das zuvor beschriebene Verfahren mit einem biotinylierten Mausantikörper gekoppelt an Streptavidin-Sepharosebeads verwendet.

Darüber hinaus gab es auch einige Untersuchungen bezüglich anderer Autoantikörper-Isotypen. Doch auch hier konnten lediglich Tendenzen festgestellt bzw. Theorien erhoben und keine generellen Aussagen in Hinblick auf die Entstehung des Typ 1 Diabetes aufgestellt werden. Koczwarra et al. untersuchten 2007 Proben aus dem BABYDIAB-Studienkollektiv auf IgA-IAA, um herauszufinden, ob es zu einem Anstoß der Autoimmunprozesse beim Typ 1 Diabetes über Vorgänge in Schleimhäuten kommt, wo IgA hauptsächlich vorkommen. Der Versuchsansatz war ähnlich konzipiert, wie das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Verfahren für IgM-Autoantikörper. Es wurde eine Anti-human-IgA-Agarose (Sigma Aldrich, USA) äquivalent zur Anti-Human IgM-Agarose verwendet und ebenfalls ein Transfer-schritt zur Trennung der IgG und IgA durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass einige IAA eventuell nicht auf einen Kontakt mit menschlichem Insulin, sondern auf Immunisierungsvorgänge in Schleimhäuten zurückzuführen sind (Koczwarra 2007).

Ferner untersuchten Hoppu et al. 2006 45 Kinder, welche im Rahmen der DIPP-Studie (Finnish Type 1 Diabetes Prediction and Prevention Study) eine IA-2A Positivität entwickelten. Hoppu et al. kamen zu dem Ergebnis, dass es bei Kindern, die IgE-IA-2A aufwiesen, weniger häufig zu einer Diabetes-Manifestation kam, als bei Kindern ohne IgE-IA-2A. Somit kann das Auftreten von IgE-IA-2A möglicherweise als protektiv in Bezug auf den Typ 1 Diabetes angesehen werden (Hoppu 2006).

Zusammenfassend kann aufgezeigt werden, dass bisherige Studien keine richtungsweisenden Ergebnisse bezüglich des Auftretens von IgM-Autoantikörpern liefern. IgM-IAA wurden bisher nur in einer Veröffentlichung beschrieben (Achenbach 2004), während IgM-GADA und IgM-IA-2A in einigen Untersuchungen in geringer Anzahl detektiert werden konnten (Petersen 1999 / Hawa 2000 / Achenbach 2004). In keiner der Veröffentlichungen konnte allerdings eine Theorie aufgestellt werden, zu welchem Zeitpunkt IgM-Autoantikörper auftreten und welche Rolle sie im Geschehen um den Immunprozess bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes spielen.

Ein neuerer Übersichtsartikel von Elkon et al. weist in Bezug auf IgM-Autoantikörper bei Autoimmunerkrankungen allgemein in eine andere Richtung. Elkon et al. postulieren, dass Autoantikörper in verschiedenen Qualitäten und mit unterschiedlicher Bedeutung für das Immunsystem auftreten. Es gibt natürliche Antikörper, die im Körper nachweisbar sind, ohne dass ein pathologischer Prozess vorliegt. Diese natürlichen Antikörper reagieren sowohl auf Fremdorganismen, wie Bakterien oder Pilze, als auch gegen körpereigene Antigene und sind somit für die Ausbildung und den Haushalt des Immunsystems und das Gleichgewicht von Antigenen und Antikörpern verantwortlich. Meist handelt es sich bei diesen so genannten natürlichen Antikörpern um IgM-Antikörper. Diese sind niedrig-affine und polyreaktive Antikörper bzw. Autoantikörper und bilden den natürlichen Abwehrmechanismus des Körpers. Einen pathologischen Prozess stellen nach Elkon et al. IgG dar, welche über eine hohe Affinität verfügen und durch somatische Hy-

permutation der Immunglobuline entstanden sind. Für Elkon et al. haben IgM-Autoantikörper primär keinen Krankheitswert und sind daher singulär auftretend kein Anzeichen für ein unnatürliches Autoimmungeschehen der Körpers.

Allerdings stellen Elkon et al. keinen Bezug dazu her, zu welchem Anteil IgM-Autoantikörper der Ausgangspunkt für eine mögliche somatische Hypermutation und die Entwicklung von hoch-affinen, pathologischen IgG-Autoantikörpern sind. Ferner wird keine Aussage zu IgM-Autoantikörpern gemacht, die erst im Verlauf einer IgG-Autoantikörper-Positivität auftreten (Elkon 2008).

Fügt man diese Erkenntnisse zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit, lässt sich schlussfolgern, dass es beim Typ 1 Diabetes, so wie womöglich auch bei anderen Autoimmunerkrankungen, nicht zu einem Reifungsprozess von IgM- zu IgG-Autoantikörpern kommt. Vielmehr lässt sich schlussfolgern, dass IgM-Autoantikörper, die gegen zahlreiche Autoantigene des Körpers gerichtet sind, beim gesunden Individuum vorkommen und an sich keinen Krankheitswert haben, da sie die natürliche Immunabwehr des Körpers bilden. Offen bleibt die Frage, ob dies auch gilt, wenn bereits zuvor IgG-Autoantikörper nachgewiesen werden konnten und im Verlauf eines eindeutig pathologischen Geschehens IgM-Autoantikörper hinzukommen.

Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen hat die Spezifität der Autoantikörper einen großen Nutzen in der Diagnostik und Prävention, so beispielsweise die Anti-CCP-Autoantikörper bei der Rheumatoiden Arthritis. Doch in der Regel wird IgG-Autoantikörpern auch im Rahmen anderer Autoimmunerkrankungen diagnostisch die größte Bedeutung zugeschrieben (Kokkonen 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Kindern, die einen HLA-Risikogenotyp aufweisen, mindestens einen an Typ 1 Diabetes erkrankten erstgradig Verwandten haben und eine Autoantikörper-Positivität entwickeln, IgM-GADA und IgM-IA-2A, jedoch keine IgM-IAA gefunden werden können. Aus der folgenden Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich schließen, dass IgM-Autoantikörper mit dem untersuchten Studienkollektiv nicht primär, also

vor der Detektion von IgG-Autoantikörpern, festzustellen sind. Dies bestätigt die Theorie, dass der ursprüngliche Autoimmunprozess direkt mit in der Regel hochaffinen IgG-Autoantikörpern angestoßen wird (Achenbach 2004).

Es kann also hier nicht von einem initialen Reifungsprozess von IgM zu IgG ausgegangen werden, sondern vom Auftreten von Reimmunisierungsprozessen im Verlauf des präklinischen Diabetes. Es könnte beispielsweise sein, dass zusätzliche Epitope oder noch unbekanntes zusätzliche Antigene in das Immungeschehen mit einbezogen werden und somit eine später auftretende IgM-Positivität erklärt werden kann.

Es ergaben sich bei den durchgeführten Messungen für IAA keine IgM-IAA im getesteten Studienkollektiv. Lediglich bei einem Kind wurden positive IgM-IAA festgestellt. Bei diesem Kind aber kam es zu einer Diabetes-Manifestation vor der entsprechenden Blutprobe. Somit es handelt sich bei den gemessenen IgM-IAA wahrscheinlich um Antikörper gegen exogen zugeführtes Insulin.

Für GADA ergaben sich bei 9 von 25 (36%) getesteten Kindern positive IgM-Autoantikörper. In einer detaillierten Darstellung der Ergebnisse dieser IgM-GADA positiven Kinder und der zugehörigen GADA-Epitop-Messungen für COOH, NH₂, GAD67 und NASTU bestätigte sich, dass es zu keinem Reifungsschritt über IgM zu IgG kommt. In 4 von 9 Fällen konnten IgM-GADA zeitgleich mit IgG-GADA detektiert werden und in weiteren 4 von 9 Fällen erst im Verlauf der IgG-GADA-Positivität. Bei einem Kind konnten in zwei Proben positive Werte für IgM-GADA festgestellt werden, während in derselben Probe keine IgG-GADA detektiert wurden.

Betrachtet man das Auftreten der verschiedenen Epitop-Spezifitäten, wird deutlich, dass sich bei 4 Probanden (44%) kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Epitop-Spezifitäten und IgM-GADA feststellen lässt. Wohingegen bei 4 von 9 Kindern (44%) ein gleichzeitiger COOH- und NASTU-Anstieg parallel zur Erhöhung von IgM-GADA und bei zusätzlich jeweils einem Kind (56%) ein paralleler Kurvenverlauf von NASTU beziehungsweise von COOH und IgM-GADA beobachtet werden kann. In nur einer Serumprobe der IgM-GADA positiven Studienteil-

nehmer konnten alle Epitop-Spezifitäten festgestellt werden. Darüber hinaus konnten keine GAD67-Autoantikörper nachgewiesen werden und nur bei einem Kind kam es zu einer leichten Erhöhung der NH2-GADA. Somit bestätigt die Bestimmung der Epitop-Spezifitäten die Hypothese, dass IgM-Autoantikörper prädiabetisch im Verlauf einer IgG-Autoantikörper-Positivität auftreten und eine Umstrukturierung des Autoimmunprozesses mit Hinzukommen neuer autoantigener Strukturen symbolisieren.

Bei den Messungen für IgM-IA-2A zeigten sich 2 von 6 Kindern (33%) positiv. Auch bei den beiden Kindern kam es zu einer IgM-Positivität im Verlauf. Zudem konnte bei beiden Kindern zeitgleich mit dem Auftreten von IgM-IA-2A auch eine Erhöhung der verschiedenen IA-2 Epitope festgestellt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit kann dargelegt werden, dass IgM-Autoantikörper im Rahmen des präklinischen Typ 1 Diabetes nur in geringem Maße detektiert werden können. In 80 getesteten Seren wurden keine IgM-IAA gefunden, was sich größtenteils mit den Ergebnissen der Untersuchungen, bei denen ähnliche Messverfahren verwendet wurden, deckt (Bonifacio 1999 / Naserke 1999). 36% Prozent der untersuchten Kinder wiesen in mindestens einer Serumprobe IgM-GADA auf und bei insgesamt 33% der getesteten Kinder konnten mindestens einmal IgM-IA-2A detektiert werden.

5.2. Evaluation des neu etablierten Messverfahrens

Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, wie diese zu bewerten sind und welche Stärken und Schwächen die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode gegenüber den bisher durchgeführten Messverfahren hat.

Eine Besonderheit des im Rahmen dieser Arbeit etablierten Messverfahrens ist die Verwendung der Anti-human IgM-Agarose zur Bindung von IgM-Autoantikörpern. Nach einem ersten Schritt, der dem international standardisierten Routine-Testverfahren für IgG-Autoantikörper entspricht und zur IgG-Autoantikörper Präzipitation führt, wurde der ungebundene Überstand des jeweiligen Serumröhrchens

bzw. des jeweiligen Wells mit einer langen feinen Pipette vom Oberrand abpipetiert und in ein neues Behältnis transferiert. In diesem neuen Gefäß befanden sich im Anschluss an diesen Schritt keine IgG-Autoantikörper mehr, was in vorherigen Untersuchungen nicht ausreichend sichergestellt werden konnte. Hier ließ sich nicht sicher ausschließen, dass in Serumproben, die teilweise extrem hohe IgG-Autoantikörper-Titer aufweisen, bei der Suche nach Isotypen fälschlicherweise auch IgG-cpm mit gemessen wurden.

Mit der Untersuchung von Nabelschnurproben (Abbildung 7) konnte nachgewiesen werden, dass es beim Transferschritt nicht zu einer Übertragung von IgG-Immunpräzipitaten kommt. In Nabelschnurblutproben sollte grundsätzlich nur mütterliches IgG zu finden sein, welches über die Plazenta übertragen wird, und keine IgM, da die körpereigene Produktion des Neugeborenen erst im Laufe einiger Monate zum Anstoß kommt und IgM kein plazentagängiges Molekül darstellt. Bei den Messungen zeigten sich bei jeweils 15 (IAA), 14 (GADA) und 9 (IA-2A) der getesteten Seren, dass IgG teilweise sehr hohe mediane Titerwerte erreichten: IgG-IAA 5651,9 Δ cpm, IgG-GADA 1123,1 Δ cpm und IgG-IA-2A 1018,0 Δ cpm. IgM hingegen wurden im sehr niedrigen Bereich, vergleichbar in etwa mit den in den Versuchsansätzen mit getesteten Negativseren, zur Bereinigung um die unspezifische Bindung, detektiert: IgM-IAA 23,8 Δ cpm, IgM-GADA 0 Δ cpm und IgM-IA-2A 9,1 Δ cpm.

Ferner konnten bei einem Kind in zwei aufeinander folgenden Blutproben IgM-GADA festgestellt werden, während es in beiden für IgG-GADA negativ war (Abbildung 17). Hiermit lässt sich zeigen, dass das Messverfahren sensitiv IgM feststellt, wenn keine IgG-Autoantikörper im Serum enthalten sind. Es werden folglich im oben beschriebenen Transferschritt keine radioaktiv markierten Immunpräzipitate übertragen.

Im Gegensatz zu vorherigen Studien wurden somit eindeutig keine IgG-Autoantikörper-Präzipitate fälschlicherweise detektiert, sondern die um die unspezifische Bindung der Negativseren bereinigten IgM- Δ cpm stellen ausschließlich den Gehalt an IgM-Autoantikörpern in der jeweiligen Serumprobe dar.

Mit der Gegenüberstellung der bei jedem Versuchsansatz mit getesteten Positiv- und Negativkontrollen (Abbildung 6) wird deutlich, dass die Messgenauigkeit und die Vergleichbarkeit der verschiedenen Testansätze miteinander sehr gut sind. Die Variationskoeffizienten der Messergebnisse, die von der variierenden jeweiligen Radioaktivität des Ausgangsmaterials abhängig sind, sind gering (Tabelle 4).

Im Studienkollektiv dieser Arbeit wurden keine IgM-IAA festgestellt. Es konnte aber anhand eines IgM-positiv getesteten Kindes, welches während des Studienverlaufs an Typ 1 Diabetes erkrankte, eindeutig nachgewiesen werden, dass die neu etablierte Messmethode sensitiv für IgM-IAA ist (Tabelle 8). Hier traten IgM-IAA in für IgM relativ hohen Titermengen von 181,0 Δ cpm auf, was in zwei weiteren Versuchsansätzen mit derselben Serumprobe bestätigt werden konnte. Es konnte also deutlich gemacht werden, dass sich mit der Methode durchaus IgM-IAA darstellen lassen. Nicht zu beantworten bleibt jedoch die Frage, ob auch sehr geringe Mengen IgM-IAA festgestellt werden können oder ob die Bindung an die Anti-human IgM-Agarose erst bei höheren Mengen von IgM-IAA ein positives Ergebnis zeigt. Bisher ist nur in einer Publikation (Achenbach 2004) das Auftreten von IgM-IAA in geringen Mengen beschrieben. In dieser Publikation wird jedoch nicht deutlich, in wie vielen Proben genau IgM-IAA detektiert wurden, und es bleibt fraglich, inwieweit mit der damals verwendeten Methode mit einem biotinylierten IgM-Mausantikörper gekoppelt an Streptavidinbeads wirklich konkret IgM-IAA gebunden wurden.

Für IgM-GADA und IgM-IA-2A wurden auch schon in früheren Untersuchungen positive Ergebnisse in geringen Mengen bestätigt. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass in einigen Proben IgM-Autoantikörper nachgewiesen werden können. In dem für diese Arbeit entwickelten Messverfahren zeigten sich IgM-GADA und IgM-IA-2A mit allerdings deutlich geringeren Titerhöhen (unter 1000 Δ cpm) im Vergleich zu IgG-Autoantikörpern im Bereich über 10000 Δ cpm.

Ein weiterer wichtiger Faktor, der das generell spärliche Auftreten von IgM-positiven Proben in dieser Arbeit und auch in früheren Veröffentlichungen erklären kann, ist der zeitliche Abstand der abgenommenen Blutproben. IgM-Antikörper

sind im Rahmen der Immunreaktion meist in einem sehr kurzen Zeitraum von teilweise nur einigen Stunden nachweisbar (Janeway 2009). Bedenkt man, dass die Blutproben der getesteten Kinder von Geburt an etwa alle drei Monate abgenommen wurden, ist dies ein relativ langer Zeitraum, während dessen eventuell kurzzeitig IgM nachweisbar sein könnten, allerdings im Rahmen dieses Studiendesigns nicht detektiert werden konnten. Ein möglicher Weg, um dies aufzuklären, wäre ein kleineres Studienkollektiv auszuwählen und bei diesem die Abstände der Blutabnahmen deutlich zu verkürzen. Dies ist allerdings mit einem erheblichen Aufwand und mit erheblicher Belastung für die teilnehmenden Familien mit ihren Kindern und dem an der Studie beteiligten Fachpersonal verbunden und somit nur sehr schwer durchführbar.

5.3. Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein neues Messverfahren zur Detektion von IgM-Autoantikörpern etabliert werden. Es wurde gezeigt, dass der modifizierte Radioliganden-Bindungsassay sehr spezifisch sowohl für die Detektion von IgG- als auch von IgM-Autoantikörper ist. In den Abbildungen 9, 11 und 22 ist deutlich zu erkennen, dass die Ergebnisse für IgG nach der Abtrennung des Überstandes mit den Ergebnissen des international standardisierten Routine-Assays (Bonifacio 2010) vergleichbar sind und es zu keiner Verfälschung des Ergebnisses kommt. Es bleibt die Frage, wie sensitiv IgM mit der Anti-human IgM-Agarose gebunden werden können und ob auch geringe Mengen IgM-IAA, -GADA oder -IA-2A für ein positives Messergebnis ausreichen. Ein Vorteil des Verfahrens ist in jedem Fall die zuvor dargelegte Gewissheit, dass nicht fälschlicherweise IgG-Präzipitate bestimmt werden, da diese nachweislich im ersten Schritt des Testansatzes abgetrennt werden.

Nachdem die Ergebnisse dieser Arbeit darauf schließen lassen, dass es zu keinem Reifungsschritt der Autoantikörper über eine Vorstufe IgM zu den reifen Antikörpern IgG kommt, wird in Zukunft wichtig sein, das Augenmerk von Untersuchungen auf die Zeit ab Auftreten des ersten IgG-Autoantikörpers bis zur letztend-

lichen Manifestation des Typ 1 Diabetes zu legen, um noch genauer aufzuklären, inwieweit Reimmunisierungsmechanismen, immunmodulierende Prozesse, das Auftreten von Autoantikörpersubklassen, –isotypen, Epitop-Spezifitäten und multiplen Autoantikörpern das Risiko, tatsächlich zu erkranken, beeinflussen und verändern.

6. Zusammenfassung und Zukunftsaussicht

Typ 1 Diabetes ist eine multifaktorielle Autoimmunerkrankung, bei der es zu einer langsamen Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen der Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse und somit schließlich zu einem absoluten Mangel an Insulin im Körper eines Betroffenen kommt. Bis heute ist die Pathogenese dieser Erkrankung nicht genau geklärt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Prozess der Entstehung des Typ 1 Diabetes vor einer Manifestation noch genauer aufzuklären, um somit in Zukunft möglicherweise früher intervenieren zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues Messverfahren etabliert. Es wurden die zu dieser Zeit routinemäßig in der Forschergruppe Diabetes verwendeten Radioliganden-Bindungsassays für IgG-IAA mit radioaktiv markiertem Jodid (^{125}I) und für GADA bzw. IA-2A mit radioaktiv markiertem Methionin (^{35}S -Methionin) abgewandelt und zur Detektion von IgM-Autoantikörpern verwendet.

Die untersuchten Blutproben stammten aus dem Kollektiv der BABYDIÄT-Studie von Frau Prof. Dr. Ziegler. Diese wurden im Vorfeld dieser Arbeit routinemäßig auf das Vorhandensein von Diabetes-assoziierten IgG-Autoantikörpern getestet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

- Es konnte gezeigt werden, dass bei Kindern, die einen HLA-Risikogenotyp aufweisen und mindestens einen an Typ 1 Diabetes erkrankten erstgradig Verwandten haben und eine Autoantikörper-Positivität entwickeln, IgM-GADA und IgM-IA-2A, jedoch keine IgM-IAA gefunden werden können.
- Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass es während der prädiabetischen Immunprozesse nicht zu einem Reifungsschritt von IgM zu IgG kommt, wie es beispielsweise bei Virusinfekten der Fall ist. Vielmehr kommt es entweder zeitgleich zu einer Erhöhung von IgG- und IgM-Autoantikörpern oder IgM-Autoantikörper treten erst im Verlauf von einigen Monaten oder sogar Jahren nach einem erstmals positiv detektierten IgG-Autoantikörper auf.

- Es kann folglich festgestellt werden, dass es zu keiner initialen Reifung von mit Typ 1 Diabetes assoziierten Autoantikörpern über eine Vorstufe IgM zu den reifen IgG kommt.

Es ergaben sich bei den durchgeführten Messungen für IAA keine IgM-IAA im getesteten Studienkollektiv. Lediglich bei einem Kind wurden positive IgM-IAA festgestellt. Bei diesem Kind allerdings kam es zu einer Diabetes-Manifestation vor der entsprechenden Blutprobe. Somit handelt es sich bei den gemessenen IgM-IAA sehr wahrscheinlich um Antikörper gegen therapeutisch exogen zugeführtes Insulin und nicht um Autoantikörper gegen endogenes Insulin.

Für GADA ergaben sich bei 9 von 25 (36%) getesteten Kindern positive IgM-Autoantikörper. In einer detaillierten Darstellung der Ergebnisse dieser IgM-GADA positiven Kinder und der zugehörigen GADA-Epitop-Messungen für COOH, NH₂, GAD67 und NASTU bestätigte sich, dass es zu keinem Reifungsschritt über IgM zu IgG kommt. In 4 von 9 Fällen (44%) konnten IgM-GADA zeitgleich mit IgG-GADA detektiert werden und in weiteren 4 von 9 Fällen (44%) erst im Verlauf der IgG-GADA-Positivität. Bei einem Kind konnten in zwei Proben positive Werte für IgM-GADA festgestellt werden, während in derselben Probe keine IgG-GADA detektiert wurden. Bei der Bestimmung der verschiedenen Epitop-Spezifitäten wurde deutlich, dass sich bei 4 Probanden (44%) kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Epitop-Spezifitäten und IgM-GADA feststellen lässt. Wohingegen bei 4 von 9 Kindern (44%) ein gleichzeitiger COOH- und NASTU-Anstieg parallel zur Erhöhung von IgM-GADA und bei zusätzlich jeweils einem Kind (56%) ein paralleler Kurvenverlauf von NASTU beziehungsweise von COOH und IgM-GADA beobachtet werden kann. Somit bestätigte die Bestimmung der Epitop-Spezifitäten die Hypothese, dass IgM-Autoantikörper prädiabetisch im Verlauf einer IgG-Autoantikörper-Positivität auftreten und eine Umstrukturierung des Autoimmunprozesses mit Hinzukommen neuer autoantigener Strukturen reflektieren.

Bei den Messungen für IgM-IA-2A zeigten sich 2 von 6 Kindern (33%) positiv. Bei beiden Kindern kam es zu einer IgM-Positivität im Verlauf der IgG-IA-2A-Positivität und es konnte eine Erhöhung der verschiedenen IA-2 Epitope zeitgleich mit dem Anstieg der IgM-IA-2A festgestellt werden.

Bisherige Erkenntnisse bezüglich IgM-IAA, IgM-GADA und IgM-IA-2A sind nicht eindeutig und lieferten daher keine richtungsweisenden Ergebnisse.

Bei IgM Antikörpern handelt es sich um natürlich vorkommende Antikörper, welche die unspezifische Immunabwehr des Körpers bilden. Es wurde diskutiert, ob IgM-Autoantikörper im Rahmen von Autoimmunerkrankungen einen pathologischen Prozess markieren oder als natürliche Autoantikörper ohne Krankheitswert auch bei gesunden Individuen festzustellen sind.

Insgesamt sollte die Arbeit zu einem besseren Verständnis der Pathogenese des Typ 1 Diabetes beitragen. Die immunologischen Vorgänge, die im Vorfeld einer Diabetes-Manifestation ablaufen, konnten in Hinblick auf das Auftreten von IgM-Autoantikörperisotypen detaillierter beschrieben werden und es wurde ein Messverfahren entwickelt, um nach nachgewiesener Abtrennung von IgG-Autoantikörpern IgM-Autoantikörper zu detektieren. Im Rahmen der Möglichkeiten des untersuchten Studienkollektivs konnte nachgewiesen werden, dass es zu keinem Reifungsschritt von IgM- zu IgG-Autoantikörpern kommt. IgM-Autoantikörper für GADA und IA-2A können im Verlauf nachgewiesen werden. Offen bleibt jedoch die Frage, was die somatische Hypermutation der Immunglobuline mit der Bildung hoch-affiner IgG im Vorfeld einer Diabetes-Manifestation anstößt. In Zukunft wird es wichtig sein, das Zusammenspiel aus Genetik, Umweltfaktoren, Lebensbedingungen und Sozialfaktoren von Risikopatienten noch genauer zu beschreiben und zu untersuchen. Sowohl der Typ 1 Diabetes als auch der Typ 2 Diabetes entwickelten sich in den letzten Jahren und Jahrzehnten zu bedeutsamen Volkskrankheiten. Es wird sehr wichtig sein, auslösende Faktoren klar zu definieren und Mechanismen zu finden, prädiabetische Prozesse zu beeinflussen, um die rapide steigende Inzidenz des Diabetes einzudämmen.

7. Literaturverzeichnis

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T-lymphocytes. *Nature* 383, 787-793, 1996

Achenbach P, Warncke K, Reiter J et al (2004) Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics. *Diabetes* 53, 384–392, 2004a

Achenbach P, Koczwara K, Knopff A, Naserke H, Ziegler AG, Bonifacio E. Mature high-affinity immune responses to (pro)insulin anticipate the autoimmune cascade that leads to type 1 diabetes. *J Clin Invest* 114, 589–597, 2004b

Achenbach P, Warncke K, Reiter J, Williams AJ, Ziegler AG, Bingley PJ, Bonifacio E. Type 1 diabetes risk assessment: improvement by follow-up measurements in young islet autoantibody-positive relatives. *Diabetologia* 49, 2969–2976, 2006

Achenbach P, Pan L, Ziegler AG. Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1. *Diabetologie* 2, R25-R39, 2007

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

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 31,S55–S60, 2008

Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358(9277), 221-229, 2001

Atkinson MA. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *J Pediatr* 144(5), 684-685, 2004

Atkinson MA, Kaufman DL, Newman D, Tobin AJ, Maclaren NK. Islet cell cytoplasmic autoantibody reactivity to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 91, 350-356, 1993

Baekkeskov S, Nielsen JH, Marner B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark A. Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature* 298, 167-169, 1982

Baekkeskov S, Warnock G, Christie M, v.Rajotte R, Larsen PM, Fey S. Revelation of specificity to 64K autoantibodies in IDDM serums by high-resolution 2-D gel electrophoresis. Unambiguous identification of 64K target antigen. *Diabetes* 38, 1133-1141, 1989

Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, De Camilli P. Identification of the 64k autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347, 151-156, 1990

Barker JM, Barriga KJ, Yu L, Miao D, Erlich HA, Norris JM, Eisenbarth GS, Rewers M. Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *J Clin Endocrinol Metab* 89, 3896-3902, 2004

Barnett AH, Eff C, Leslie RDG, Pyke DA. Diabetes in identical twins: a study of 200 pairs. *Diabetologia* 20, 404-409, 1981

Berger W, Gries FA, Koschinsky T, Toeller M. Diabetes mellitus. In: W. Siegenthaler, W. Kaufmann, H. Hornbostel, H.D. Waller (Hrsg.): *Lehrbuch der Inneren Medizin*, Thieme, Stuttgart, New York, 1277-1304, 1992

Bingley PJ, Bonifacio E, Ziegler AG, Schatz DA, Atkinson MA, Eisenbarth GS. Proposed guidelines on screening for risk of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24, 398, 2001

Blom L, Nystrom L, Dahlquist G. The Swedish childhood diabetes study. Vaccinations and infections as risk determinants for diabetes in childhood. *Diabetologia* 34, 176-181, 1991

Bodansky HJ, Grant PJ, Dean BM, McNally J, Bottazzo GF, Hambling MH, Wales JK. Islet-cell antibodies and insulin autoantibodies in association with common viral infections. *Lancet*, 1351-1353, 1986

Bonifacio E, Boitard C, Gleichmann H, Shattock MA, Molenaar JL, Bottazzo GF. Assessment of precision, concordance, specificity, and sensitivity of islet cell antibody measurement in 41 assays. *Diabetologia* 33(12), 731-736, 1990

Bonifacio E, Lampasona V, Bingley PJ. IA-2 (islet cell antigen 512) is the primary target of humoral autoimmunity against type 1 diabetes-associated tyrosine phosphatase autoantigens. *J Immunol* 161, 2648-2654, 1998a

Bonifacio E, Ziegler AG, Hummel M, Dittler J, Lampasona V, Pastore MR, Bosi E. Gluten: is it also a determinant of islet autoimmunity? *Diabetes Metab Rev* 14 (3), 258-259, 1998b

Bonifacio E, Scirpoli M, Kredel K, Fuchtenbusch M, Ziegler AG. Early autoantibody responses in prediabetes are IgG1 dominated and suggest antigen-specific regulation. *J Immunol* 163(1), 525-532, 1999

Bonifacio E, Lampasona V, Bernasconi L, Ziegler AG. Maturation of the humoral autoimmune response to epitopes of GAD in preclinical childhood type 1 diabetes. *Diabetes* 49, 202-208, 2000

Bonifacio E, Hummel M, Walter M, Schmid S, Ziegler AG. IDDM1 and multiple family history of type 1 diabetes combine to identify neonates at high risk for type 1 diabetes. *Diabetes Care* 27, 2695-2700, 2004

Bonifacio E, Pfluger M, Marienfeld S, Winkler C, Hummel M, Ziegler AG. Maternal type 1 diabetes reduces the risk of islet autoantibodies: relationships with birth-weight and maternal HbA(1c). *Diabetologia* 51, 1245–1252, 2008

Bonifacio E, Yu L, Williams AK, Eisenbarth GS, Bingley PJ, Marcovina SM, Adler K, Ziegler AG, Mueller PW, Schatz DA, Krischer JP, Steffes MW, Akolkar B. Harmonization of glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2 autoantibody assays for national institute of diabetes and digestive and kidney diseases consortia. *J Clin Endocrinol Metab* 95(7), 3360-3367, 2010

Botazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*, 1974

Castano L, Eisenbarth GS. Type-1 diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse and rat. *Annu Rev Immunol* 8, 647-679, 1990

Casu A, Pascutto C, Bernardinelli L, Songini M. Type 1 diabetes among Sardinian children is increasing: the Sardinian diabetes register for children aged 0-14 years (1989-1999). *Diabetes Care* 27, 1623-1629, 2004

Cerna M. Genetics of autoimmune diabetes mellitus. *Wien Med Wochenschr* 158, 2-12, 2008

Christie MR, Genovese S, Cassidy D, Bosi E, Brown TJ, Lai M, Bonifacio E, Botazzo GF. Antibodies to islet 37k antigen, but not to glutamate decarboxylase, dis-

criminate rapid progression to IDDM in endocrine autoimmunity. *Diabetes* 43(10), 1254-1259, 1994

Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, Copeman JB, Cordell HJ, Pritchard LE, Reed PW, Gough SCL, Jenkins SC, Palmer SM, Balfour KM, Rowe B, Farall M, Barnett AH, Bain SC, Todd JA. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* 371,130-136, 1994

Daw K, Powers A. Two distinct glutamic acid decarboxylase autoantibody specificities in IDDM target different epitopes. *Diabetes* 44, 216-220, 1995

Dean BM, Becker F, McNally JM et al. Insulin autoantibodies in the pre-diabetic period: correlation with islet cell antibodies and development of diabetes. *Diabetologia* 29, 339, 1986

Decochez K, Tits J, Coolens JL, Van Gaal L, Krzentowski G, Winnock F, Anckaert E, Weets I, Pipeleers DG, Gorus FK. High frequency of persisting or increasing islet-specific autoantibody levels after diagnosis of type 1 diabetes presenting before 40 years of age. The Belgian Diabetes Registry. *Diabetes Care* 23(6), 838-844, 2000

DeStefano F, Mullooly JP, Okoro CA, Chen RT, Marcy SM, Ward JI, Vadheim CM, Black SB, Shinefield HR, Davis RL, Bohlke K. Childhood vaccinations, vaccination timing, and risk of type 1 diabetes mellitus. *Pediatrics* 108, E112, 2001

Edelmann GM. Antibody structure and molecular immunology. *Science* 180, 830-840, 1973

Eggstein M, Luft D. Diabetes mellitus in: R.Gross, P. Schölmerich und W. Gerok (Hrsg.): *Die Innere Medizin*, 8. Aufl, Schattauer, Stuttgart, 888-922, 1994

Eehalt S, Willasch A, Hub R, Ranke MB, Neu A. Explosionsartiger Inzidenzanstieg des Typ 1 Diabetes bei Kindern und Jugendlichen seit der Jahrtausendwende in Deutschland. *Diabetologie und Stoffwechsel* 1, 44, 2006

Elkon K, Casali P. Nature and functions of autoantibodies. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4(9): 491–498, 2008

Ellis TM, Atkinson MA. The clinical significance of an autoimmune response against glutamic acid decarboxylase. *Nat Med* 2(2), 148-153, 1996

Eisenbarth GS. Update in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 2403-2407, 2007

Eisenbarth GS. Primer immunology/autoimmunity. In: *Type 1 Diabetes: Molecular, Cellular and Clinical Immunology*. Eisenbarth GS, Lafferty KJ, Eds. New York, Oxford University Press, 3-18, 1996

Fagot-Campagna A, Pettitt DJ, Engelgau MM, Burrows NR, Geiss LS, Gregg EW, Williamson DF, Venkat Narayan KM. Type 2 diabetes among North adolescents: An epidemiologic health perspective. *The Journal of Pediatrics* 136, 664-672, 2000

Forsgren S, Andersson A, Hillron V, Soderstrom A, Holmberg D. Immunoglobulin-mediated prevention of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Scand J Immunol* 34 (4), 445-451, 1991

Füchtenbusch M, Ziegler AG. Umweltfaktoren in der Pathogenese des Typ-1-Diabetes. *Diabetes und Stoffwechsel* 4, 1–9, 1995

Gardner SG, Bingley PJ, Sawtell PA, Weeks S, Gale EA. Rising incidence of insulin dependent diabetes in children aged under 5 years in the Oxford region: time trend analysis. The Bart's-Oxford Study Group. *BMJ* 315(7110), 713–717, 1997

Gepts W, Lecompte PM. The pancreatic islets in diabetes. *Am J Med* 70, 105-115, 1981

Gianani R, Rabin DU, Verge CF, Yu L, Babu SR, Pietropaolo M, Eisenbarth GS. ICA512 autoantibody radioassay. *Diabetes* 44, 1340-1344, 1995

Gillespie KM. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ* 175(2), 165-170, 2006

Green A, Patterson CC. Trends in the incidence of childhood-onset diabetes in Europe 1989-1998. *Diabetologia* 44, B3-8, 2001

Grubin CE, Daniels T, Toivola B, Landin-Olsson M, Hagopian WA, Li L, Karlson AE, Boel E, Michelsen B, Lernmark A. A novel radioligand binding assay to determine diagnostic accuracy of isoform-specific glutamic acid decarboxylase antibodies in childhood IDDM. *Diabetologia* 37 (4), 344-350, 1994

Gyürüs E, Patterson C, Soltész G. Constantly rising or peaks and plateaus?" Incidence of childhood type 1 diabetes in Hungary (1989-2009). *Orv Hetil* 152(42), 1692-1697, 2011

Hanninen A, Jalkanen S, Salmi M, Toikkanen S, Nikolakaros G, Simell O. Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 90, 1901-1910, 1992

Haskins K, McDuffie M: Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet-specific T cell clone. *Science* 249, 1433-1436, 1990

Haskins K, Wegmann D. Diabetogenic T-cell clons. *Diabetes* 45,1299-1305, 1996

Hawa MI, Fava D, Medici F, Deng YJ, Notkins AL, De Mattia G, Leslie RD. Antibodies to IA-2 and GAD65 in type 1 and type 2 diabetes: isotype restriction and polyclonality. *Diabetes Care* 23(2), 228-233, 2000

Honeyman M. How robust is the evidence for viruses in the induction of type 1 diabetes? *Curr Opin Immunol* 17, 616-623, 2005

Hoppu S, Ronkainen MS, Kimpimäki T, Simell S, Korhonen S, Ilonen J, Simell O, Knip M. Insulin autoantibody isotypes during the prediabetic process in young children with increased genetic risk of type 1 diabetes. *Pediatr Res* 55(2), 236-242, 2004a

Hoppu S, Ronkainen MS, Kulmala P, Akerblom HK, Knip M; Childhood Diabetes in Finland Study Group. GAD65 antibody isotypes and epitope recognition during the prediabetic process in siblings of children with type I diabetes. *Clin Exp Immunol* 136(1), 120-128, 2004b

Hoppu S, Härkönen T, Ronkainen MS, Simell S, Hekkala A, Toivonen A, Ilonen J, Simell O, Knip M. 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, 2006

Hummel M, Fuchtenbusch M, Schenker M, Ziegler AG. No major association of breast-feeding, vaccinations, and childhood viral diseases with early islet autoimmunity in the German BABYDIAB Study. *Diabetes Care* 23, 969-974, 2000

Hummel M, Bonifacio E, Schmid S, Walter M, Knopff A, Ziegler AG. Brief communication: early appearance of islet autoantibodies predicts childhood type 1 diabetes in offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med* 140, 882-886, 2004

Hummel S, Winkler C, Schoen S, Knopff A, Marienfeld S, Bonifacio E, Ziegler AG. Breastfeeding habits in families with Type 1 diabetes. *Diabet Med* 24, 671-676, 2007c

Hummel S, Pflüger M, Hummel M, Bonifacio E, Ziegler AG. Primary Dietary Intervention Study to Reduce the Risk of Islet Autoimmunity in Children at Increased Risk for Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 34(6), 1301–1305, 2011

Hviid A, Stellfeld M, Wohlfahrt J, Melbye M. Childhood vaccination and type 1 diabetes. *N Engl J Med* 350, 1398-1404, 2004

Hyoty H, Taylor KW. The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia* 45, 1353-1361, 2002

Hyponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 358, 1500-1503, 2001

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

Jaeckel E, von Boehmer H, Manns MP. Antigen-specific FoxP3-transduced T-cells can control established type 1 diabetes. *Diabetes* 54 (2), 306-310, 2005

Janeway CA, Murphy K, Travers P, Walport M. Janeway Immunologie. 7. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 479-515, 2009

Jefferson T, Demicheli V. No evidence that vaccines cause insulin dependent diabetes mellitus. J Epidemiol Community Health 52, 674-675, 1998

Juhela S, Hyöty H, Uibo R, Meriste SH, Uibo O, Lonrot M, Halminen M, Simmel O, Ilonen J. Comparison of enterovirus-specific cellular immunity in two populations of young children vaccinated with inactivated or live poliovirus vaccines. Clin Exp Immunol 117, 100-105, 1999

Karjalainen J, Salmela P, Ilonen J, Surcel HM, Knip M. A comparison of childhood and adult type 1 diabetes. N.Eng. J Med 320, 881, 1989

Karvonen M, Cepaitis Z, Tuomilehto J. Association between type 1 diabetes and Haemophilus influenzae type b vaccination: birth cohort study. Bmj 318, 1169-1172, 1999

Karvonen M, Vik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Care 23 (10), 1516-1526, 2000

Kockum I, Wassmuth R, Holmberg E, Michelsen B, Lernmark A. HLA-DQ primarily confers protection and HLA-DR susceptibility in type I (insulindependent) diabetes studied in population-based affected families and controls. Am J Hum Genet 53, 150-167, 1993

Koczwara K, Muller D, Achenbach P, Ziegler AG, Bonifacio E. Identification of insulin autoantibodies of IgA isotype that preferentially target non-human insulin. Clin Immunol 124(1), 77-82, 2007

Kokkonen H, Mullazehi M, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Rönnelid J, Rantapää-Dahlqvist S. Antibodies of IgG, IgA and IgM isotypes against cyclic citrullinated peptide precede the development of rheumatoid arthritis Arthritis Res Ther 13(1), R13, 2011

Knip M, Veijola R, Virtanen SM, Hyöty H, Vaarala O, Akerblom HK. Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. Diabetes 54(2), 125–136, 2005

Köbberling J, Tillil H. Diabetestypen: Gemeinsamkeiten und Unterschiede. In: H.Drost, FA Gries, K.Jahnke (Hrsg.): Der insulinabhängige Diabetes mellitus (IDDM). Ätiologische und therapeutische Probleme. Schattauer, Stuttgart, New York, 50-65, 1991

Kraft W, Reusch C. Endokrine Organe in: Kraft W. (Hrsg.): Kleintierkrankheiten. 2.Aufl., Ulmer, Stuttgart, 469-507, 1990

Lammi N, Karvonen M, Tuomilehto J. Do microbes have a causal role in type 1 diabetes? Med Sci Monit 11, RA63-69, 2005

Lammi N, Taskinen O, Moltchanova E, Notkola IL, Eriksson JG, Tuomilehto J, Karvonen M. A high incidence of type 1 diabetes and an alarming increase in the

incidence of type 2 diabetes among young adults in Finland between 1992 and 1996. *Diabetologia* 50, 1393-1400, 2007

Lammi N, Blomstedt PA, Moltchanova E, Eriksson JG, Tuomilehto J, Karvonen M. Marked temporal increase in the incidence of type 1 and type 2 diabetes among young adults in Finland. *Diabetologia* 51, 897-899, 2008

Lampasona V, Bearzatto M, Genovese S, Bosi E, Ferrari M, Bonifacio E. Autoantibodies in insulin-dependent diabetes recognize distinct cytoplasmatic domains of the tyrosine phosphatase-like IA-2 autoantigen. *J Immunol* 157, 2707-2711, 1996

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

Lan MS, Wasserfall C, Maclaren NK, Notkins AL. IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(13), 6367-6370, 1996

Le Devehat C, Khodabandehlou T, Zhao H, Vimeux M. Role and limits of glycemic regulation in the pathogenesis of diabetic microangiopathy. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 17, 363-370, 1997

Leslie RD, Pozzilli P. Type I diabetes masquerading as type II diabetes. Possible implications for prevention and treatment. *Diabetes Care* 17, 1214-1219, 1994

Leslie RD, Atkinson MA, Notkins AL. Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 42(1), 3-14, 1999

Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 16, 34-38, 1995

Lohmann T, Hawa M, Leslie RD, Lane R, Picard J, Londei M. Immune reactivity to glutamic acid decarboxylase 65 in stiffman syndrome and type 1 diabetes mellitus. *Lancet* 356(9223), 31-35, 2000

Martin S, Kolb H, Lampeter EF. Aktuelle therapeutische Strategie des Typ 1 Diabetes und seiner präklinischen Vorstadien. *Internist* 37, 1289-1304, 1996

Milstein C. From antibody structure to immunological diversification of immune response. *Science* 231. 1261-1268, 1986

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357, 1986

Naserke HE, Ziegler AG, Lampasona V, Bonifacio E. Early development and spreading of autoantibodies to epitopes of IA-2 and their association with progression to type 1 diabetes. *J Immunology* 161, 6963-6969, 1998

Naserke HE, Bonifacio E, Ziegler AG. Immunoglobulin G insulin autoantibodies in BABYDIAB offspring appear postnatally: sensitive early detection using a protein A/G-based radiobinding assay. *J. Clin Endocrinol Metab* 84, 1239–1243, 1999

Neu A, Willasch A, Eehalt S, Kehrler M, Hub R, Ranke MB. Diabetes incidence in children of different nationalities: an epidemiological approach to the pathogenesis of diabetes. *Diabetologia* 44 (3), B21-26, 2001b

Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C, Bosi E, Larrad MT, Rios MS, Chow CC, Cockram CS, Jacobs K, Mijovic C, Bain SC, Barnett AH, Vandewalle CL, Schuit F, Gorus FK, Tosi R, Pozzilli P, Todd JA. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Hum Mol Genet* 5, 1075-1080, 1996

Noorchashm H, Noorchashm N, Kern J, Rostami SY, Barker CF, Naji A. B-cells are required for the initiation of insulinitis in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 46 (6), 941-946, 1997

Norris JM, Beaty B, Klingensmith G, Yu L, Hoffman M, Chase HP, Ehrlich HA, Hamman RF, Eisenbarth GS, Rewers M. Lack of association between early exposure to cow's milk protein and beta-cell autoimmunity. Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Jama* 276, 609-614, 1996

Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, Hoffmann M, Eisenbarth GS, Ehrlich HA, Rewers M. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA* 290, 1713–1720, 2003

Olmos P, A'Hern R, Heaton DA, et al. The significance of the concordance rate for type 1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins. *Diabetologia* 31, 747–750, 1988

O'Reilly LA, Hutchings PR, Crocker PR, Simpson E, L, T, Kioussis D, Takei F, Baird J, Cooke A. Characterization of pancreatic islet infiltrates in NOD mice: effect of cell transfer and transgene expression. *Eur J Immunol* 21, 1171-1180, 1991

Ostman J, Lonnberg G, Arnqvist HJ, Blohme G, Bolinder J, Ekbohm Schnell A, Eriksson JW, Gudbjornsdottir S, Sundkvist G, Nystrom L. Gender differences and temporal variation in the incidence of type 1 diabetes: results of 8012 cases in the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden 1983-2002. *J Intern Med* 263, 386-394, 2008

Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science* 222(4630), 1337–1339, 1983

Patterson CC, Dahlquist G, Gyürüs E, Green A, Soltesz G. 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), 2027–2033, 2009

Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76, 241-251, 1994

Petersen JS, Kulmala P, Clausen JT, Knip M, Dyrberg T. 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), 276-281, 1999

Porter RR. Structural studies of immunoglobulins. Science 180, 713-716, 1973

Pugliese A, Zeller M, Fernandez A, Zalcborg LJ, Bartlett RJ, Ricordi C, Pietropaolo M, Eisenbarth GS, Bennett ST, Patel DD. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. Nat Genet 15, 293-297, 1997

Rabinovitch A, Suarez-Pinzon. Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes. Cell Biochem Biophys 48, 159-163, 2007

Redondo MJ, Jeffrey J, Fain PR, Eisenbarth GS, Orban T. Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. N Engl J Med 359, 2849-2850, 2008

Rewers M, Bugawan TL, Norris JM, Blair A, Beaty B, Hoffman M, McDuffie RS, Hamman RF, Klingensmith G, Eisenbarth GS, Ehrlich HA. Newborn screening for HLA markers associated with IDDM: diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). Diabetologia 39, 807-812, 1996

Robles DT, Eisenbarth GS. Type 1A diabetes induced by infection and immunization. J Autoimmun 16, 355-362, 2001

Roll U, Ziegler AG. Combined antibody screening for improved prediction of IDDM – modern strategies. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105, 1-14, 1997

Rosenbauer J, Du Prel JB, Icks A, Holl RW, Grabert M, Giani G, Group icED WS. Common childhood vaccination and the risk for type 1 diabetes - an ecological study in Germany. Abstract Conference 33rd Annual Meeting of the International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes, 2007b

Schenker M, Hummel M, Ferber K, Walter M, Keller E, Albert ED, Janka HU, Kastendiek C, Sorger M, Louwen F, Ziegler AG. Early expression and high prevalence of islet autoantibodies for DR3/4 heterozygous and DR4/4 homozygous offspring of parents with Type I diabetes: the German BABYDIAB study. *Diabetologia* 42, 671-677, 1999

Schlosser M, Koczwara K, Kenk H, Strebelow M, Rjasanowski I, Wassmuth R, Achenbach P, Ziegler AG, Bonifacio E. In insulin-autoantibody-positive children from the general population, antibody affinity identifies those at high and low risk. *Diabetologia* 48, 1830-1832, 2005

Schmid S, Buuck D, Knopff A, Bonifacio E, Ziegler AG. BABYDIET, a feasibility study to prevent the appearance of islet autoantibodies in relatives of patients with Type 1 diabetes by delaying exposure to gluten. *Diabetologia* 47, 1130-1131, 2004a

Schmid S, Koczwara K, Schwinghammer S, Lampasona V, Ziegler AG, Bonifacio E. Delayed exposure to wheat and barley proteins reduces diabetes incidence in non-obese diabetic mice. *Clin Immunol* 111, 108-118, 2004b

Schuppan D. Current Concepts of Celiac Disease Pathogenesis. *Gastroenterology* 119, 234-242, 2000

Scott P. Selective differentiation of CD4+ T-helper cell subsets. *Curr Opin Immunol* 5, 391-397, 1993

SEARCH: The SEARCH Study Group. SEARCH for Diabetes in Youth: a multi-center study of the prevalence, incidence and classification of diabetes mellitus in youth. *Control Clin Trials* 25, 458–471, 2004

Serreze DV, Chapman HD, Varnum DS, Hanson MS, Reifsnyder PC, Richard SD, Fleming SA, Leiter EH, Shultz LD. B lymphocytes are essential for the initiation of the T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new „speed congenic“ stock of NOD. *J Exp Med* 184 (5), 2049-2053, 1996

Silveira PA, Johnson E, Chapman HD, Bui T, Tisch RM, Serreze DV. The preferential ability of B lymphocytes to act as diabetogenic APC in NOD mice depends on expression of self-antigen-specific immunoglobulin receptors. *Eur J Immunol* 32 (12), 3657-3666, 2002

Simitsek PD, Campbell DG, Lanzavecchia A, Fairweather N, Watts C. Modulation of antigen processing by bound antibodies can boost or suppress class II major histocompatibility complex presentation of different T cell determinants. *J Exp Med* 181 (6), 1957-1963, 1995

Sipetic S, Vlajinac H, Kocev N, Bjekic M, Sajic S. Early infant diet and risk of type 1 diabetes mellitus in Belgrade children. *Nutrition* 21, 474-479, 2005

Szopa TM, Titchener PA, Portwood ND, Taylor KW. Diabetes mellitus due to viruses – some recent developments. *Diabetologia* 36, 687-695, 1993

TEDDY Study Group, Rewers M, Barriga K, Baxter J, Eisenbarth G, Gesualdo P, Hoffman M, Ide L, Norris J, Waugh K, Simell OG, Nanto-Salonen K, Ilonen J, Knip M, Veijola R, Simell T, Hyoty H, Virtanen SM, Kronberg-Kippila C, Torma M, Simmell B, Ruohonen E, Romo M, Mantymaki E, Niininen T, Nyblom M, Stenius A, Lernmark A, Agardh D, Almgren P, Andersson-Turpeinen M, Andren-Aronsson C, Ask M, Carlsson UM, Cilio C, Bremer J, Ericson-Hallstrom E, Gerardsson J, Gustavsson B, Hansson G, Hansson I, Hansen M, Hyberg S, Hakansson R, Ivarsson S, Johanson J, Larsson H, Lernmark B, Markan M, Melin J, Mansson-Martinez M, Nilsson A, Rahmati K, Jarvirova MS, Sjoberg B, Torn C, Wallin A, Wigheden I, Wimar A, Hagopian WA, Hui P, Brantley M, Crouch CC, Hay KM, Ayres S, Hammar C, Steptikova V, Skidmore J, Bang B, Mulenga D, Vanneman N, Ewing J, Whitaker I, Wion E, Arrecis E, Trope L, Becker D, Franciscus M, Dalmagro-Elias M, Daftary A, Krischer JP, Abbondandolo M, Ballard L, Bounmananh L, Brown R, Cuthbertson D, Foster C, Gowda V, Lee HS, Liu S, Malloy J, McCarthy C, McLeod W, Nallamshetty L, Smith S, Uusitalo U, Vehik K, Yang J, Akolkar B, Briese T, Erlich H, Johnson SB. The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) Study. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1150, 1-13, 2008

Thivolet CH, Beaufriere B, Gebuhrer L, Chatelain P, Orgiazzi J, Francois R. Auto-antibodies and genetic factors associated with the development of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in first degree relatives of diabetic patients. *Diabetologia* 34, 186-191, 1991

Thomson G. HLA DR antigens and susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Hum Genet* 36, 1309-1317, 1984

Tisch R, McDevitt. Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: *Cell* Vol 85, 291–297, 1996

Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, Bailey R, Nejentsev S, Field SF, Payne F, Lowe CE, Szeszkó JS, Hafler JP, Zeitels L, Yang JH, Vella A, Nutland S, Stevens HE, Schuilenburg H, Coleman G, Mairuria M, Meadows W, Smink LJ, Healy B, Burren OS, Lam AA, Ovington NR, Allen J, Adlem E, Leung HT, Wallace C, Howson JM, Guja C, Ionescu-Tîrgoviște C; Genetics of Type 1 Diabetes in Finland, Simmonds MJ, Heward JM, Gough SC; Wellcome Trust Case Control Consortium, Dunger DB, Wicker LS, Clayton DG. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet* 39(7), 857-864, 2007

Torn C, Mueller PW, Schlosser M, Bonifacio E, Bingley PJ. Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. *Diabetologia* 51, 846-852, 2008

Tuomilehto J, Karvonen M, Pitkaniemi J, Virtala E, Kohtamaki K, Toivanen L, Tuomilehto-Wolf E. Record-high incidence of Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus in Finnish children. The Finnish Childhood Type I Diabetes Registry Group. *Diabetologia* 42, 655-660, 1999

Virtanen SM, Rasanen L, Aro A, Lindstrom J, Sippola H, Lounamaa R, Toivanen L, Tuomilehto J, Akerblom HK. Infant feeding in Finnish children less than 7 yr of

age with newly diagnosed IDDM. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetes Care* 14, 415-417, 1991

Virtanen SM, Kenward MG, Erkkola M, Kautiainen S, Kronberg-Kippila C, Hakulinen T, Ahonen S, Uusitalo L, Niinisto S, Veijola R, Simell O, Ilonen J, Knip M. Age at introduction of new foods and advanced beta cell autoimmunity in young children with HLA-conferred susceptibility to type 1 diabetes. *Diabetologia* 49, 1512-1521, 2006

Walter M, Albert E, Conrad M, Keller E, Hummel M, Ferber K, Barrat BJ, Todd JA, Ziegler AG, Bonifacio E. IDDM2/insulin VNTR modifies risk conferred by IDDM1/HLA for development of Type 1 Diabetes and associated autoimmunity. *Diabetologia* 46, 712-720, 2003

Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet* 6, 109-118, 2005

Warram JH, Krolewski AS, Gottlieb MS, Kahn CR. Differences in risk of insulin-dependent diabetes in offspring of diabetic mothers and diabetic fathers. *N Engl J Med* 311, 149-152, 1984

Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, Rewers M, Eisenbarth GS, Jensen J, Davidson HW, Hutton JC. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *PNAS* 104(43), 17040–17045, 2007

Wicker LS, Miller BJ, Mullen Y. Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes* 35(8), 855-860, 1986

Wilkin TJ. Insulin autoantibodies as markers for type I diabetes. *Endocrine Rev* 11, 92-104, 1990

Williams AJK, Bingley PJ, Bonifacio E, Palmer JP, Gale EAM. A novel micro-assay for insulin-autoantibodies. *J Autoimmunity* 10, 473-478, 1997

WHO. World Health Organization: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications: Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva, World Health Org., 1999

Yu L, Robles DT, Abiru N, Kaur P, Rewers M, Kelemen K, Eisenbarth GS. Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: Evidence for early determination of subsequent diabetes. *PNAS* 97, 1701-1706, 2000

Ziegler AG, Eisenbarth GS. Immunology of diabetes. In: *The Diabetes Annual/5*. (Alberti KGMM, Krall LP, eds.) Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 22-50, 1990

Ziegler AG, Hillebrand B, Rabl W, Mayrhofer M, Mollenhauer U, Vordemann J, Lenz A, Standl E. On the appearance of islet associated autoimmunity in offspring of diabetic mothers: a prospective study from birth. *Diabetologia* 36, 402, 1993

Ziegler AG, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes* 48, 460-481, 1999

Ziegler AG, Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA* 290 (13), 1771–1772, 2003

Ziegler AG, Nepom GT. Prediction and pathogenesis in type 1 diabetes. *Immunity* 32, 468–478, 2010

8. Anhang

8.1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:

IgG-Autoantikörper-Positivität des Kollektivs der BABYDIÄT-Studie in
Abhängigkeit vom Geschlecht und zusätzlich medianes Alter bei
Serokonversion - 26 -

Tabelle 2:

Geräte für die IAA-Messungen..... - 33 -

Tabelle 3:

Chemikalien für die IAA-Messungen - 33 -

Tabelle 4:

Geräte für die GADA/IA-2A-Messungen..... - 39 -

Tabelle 5:

Chemikalien für die GADA/IA-2A-Messungen - 40 -

Tabelle 6:

Mediane Messergebnisse der Positiv- und Negativkontrollen in den neu
etablierten Messmethoden zur simultanen Messung von IgM- und IgG-IAA, -
GADA und -IA-2A..... - 43 -

Tabelle 7:

Variationskoeffizienten der mit getesteten Positiv- und Negativkontrollen für
IgG-IAA, IgM-IAA, IgG-GADA, IgM-GADA, IgG-IA-2A und IgM-IA-2A - 44 -

Tabelle 8:

Messergebnisse einer IgM-IAA positiven Serumprobe - 48 -

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:

Entstehung des BABYDIÄT-Studienkollektivs (nach Hummel 2011) - 23 -

Abbildung 2:

Konzeption der BABYDIÄT-Interventionsstudie - 24 -

Abbildung 3:

Follow-up des BABYDIÄT-Studienkollektivs - 25 -

Abbildung 4:

IgG-Autoantikörper Positivität des Studienkollektivs - 27 -

Abbildung 5:

An Typ 1 Diabetes erkrankte Verwandte ersten Grades des
BABYDIÄT-Kollektivs - 27 -

Abbildung 6:

Darstellung der Interassay-Varianzen mittels Positiv- und Negativkontrollen
..... - 41 -

Abbildung 7:

IgG- und IgM-Autoantikörper in Nabelschnurseren - 45 -

Abbildung 8:

Darstellung der getesteten IgG- und IgM-IAA - 47 -

Abbildung 9:

IAA-Isotypen im Verlauf bei einem prädiabetischen Individuum..... - 49 -

Abbildung 10:

Darstellung der getesteten IgG- und IgM-GADA - 51 -

Abbildung 11:

GADA-Isotypen im Verlauf bei einem prädiabetischen Individuum - 53 -

Abbildung 12:

IgG-GADA, IgM-GADA und die GADA Epitope COOH, NH₂, GAD67 und
NASTU bei Kind 1 - 55 -

Abbildung 13:

IgG-GADA, IgM-GADA und die GADA Epitope COOH, NH₂, GAD67 und
NASTU bei Kind 2 - 57 -

Abbildung 14:

IgG-GADA, IgM-GADA und die GADA Epitope COOH, NH₂, GAD67 und NASTU bei Kind 3 - 59 -

Abbildung 15:

IgG-GADA, IgM-GADA und die GADA Epitope COOH, NH₂, GAD67 und NASTU bei Kind 4 - 61 -

Abbildung 16:

IgG-GADA, IgM-GADA und die GADA Epitope COOH, NH₂, GAD67 und NASTU bei Kind 5 - 63 -

Abbildung 17:

IgG-GADA, IgM-GADA und die GADA Epitope COOH, NH₂, GAD67 und NASTU bei Kind 6 - 65 -

Abbildung 18:

IgG-GADA, IgM-GADA und die GADA Epitope COOH, NH₂, GAD67 und NASTU bei Kind 7 - 67 -

Abbildung 19:

IgG-GADA, IgM-GADA und die GADA Epitope COOH, NH₂, GAD67 und NASTU bei Kind 8 - 69 -

Abbildung 20:

IgG-GADA, IgM-GADA und die GADA Epitope COOH, NH₂, GAD67 und NASTU bei Kind 9 - 71 -

Abbildung 21:

Darstellung der getesteten IgG- und IgM IA-2A - 73 -

Abbildung 22:

IA-2A-Isotypen im Verlauf bei einem prädiabetischen Individuum.....- 74 -

Abbildung 23:

IgG-IA-2A, IgM-IA-2A und die IA-2A Epitope PTP, β -PTP und JM bei Kind 4..... - 76 -

Abbildung 24:

IgG-IA-2A, IgM-IA-2A und die IA-2A Epitope PTP, β -PTP und JM bei Kind 10.....- 78 -

8.3. Abkürzungsverzeichnis

cpm	Counts per minute
CCP	Cyclisches citrulliniertes Peptid
DAISY	Diabetes Autoimmunity Study in the Young
DNA	Deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GADA	Glutamat-Decarboxylase
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IA-2	Thyrosinphosphatase-homologes Protein IA-2
IAA	Insulinautoantikörper
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
NOD	Non-obese diabetic
pAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
RBA	Radioliganden-Bindungsassay
TEDDY	The Environmental Determinants of Diabetes in the Young
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

8. Anhang

WHO World Health Organization

ZnT8 Zinktransporter 8

8.4. Danksagung

Es ist an der Zeit, denjenigen zu danken, die mich begleitet und unterstützt haben und die an der Fertigstellung dieser Dissertation maßgeblich beteiligt waren.

Besonderer Dank gilt dabei zunächst meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Anette-G. Ziegler für die Vergabe des Promotionsthemas und für die Möglichkeit, diese Dissertation am Institut für Diabetesforschung durchführen zu können. Neben der wertvollen wissenschaftlichen Betreuung meines Dissertationsprojektes bin ich ihr dankbar für die große Unterstützung und die zahlreichen Anregungen und kreativen Ideen.

Frau Dr. Kerstin Adler danke ich für ihr unermüdliches Korrekturlesen, ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei der Planung und Durchführung der Arbeit und die freundschaftliche Betreuung während der gesamten Zeit.

Frau Annette Jäger, Frau Stephanie Krause und Frau Ulrike Mollenhauer danke ich für ihre Hilfsbereitschaft beim Erlernen der Versuchsansätze und Unterstützung im Labor und für die Durchführung der immunologischen Untersuchungen.

Auch danken möchte ich den anderen Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe des Instituts für Diabetesforschung für die angenehme Arbeitsatmosphäre und gemeinsame Aktivitäten.

Ferner möchte ich mich bei Ruth Chmiel, Maren Pflüger, Sandra Hummel, Christiane Winkler, Peter Achenbach und Ezio Bonifacio für die Bereicherung durch immer neue Ideen und den Gedankenaustausch rund um die hier vorgelegte Arbeit bedanken.

Maximilian, meinen Eltern und Geschwistern Ursula und Veronika bin ich sehr dankbar für die liebevolle und vielseitige Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.