



Dr. med. Clemens Jaeger

**ZUR BEDEUTUNG EINER
DIFFERENZIIERTEN AUTOANTIKÖRPER- UND
ANTIKÖRPERANALYTIK IN DER DIABETOLOGIE**

HABILITATIONSSCHRIFT
zur Erlangung der Venia legendi
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Quellenangabe Coverbild:
www.handzeichen-gegen-krebs.de/download/Andocken_Antikoerper.jpg

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik und Poliklinik III
Leiter: Prof. Dr. R.G. Bretzel
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen

Zur Bedeutung einer differenzierten Autoantikörper- und Antikörperanalytik in der Diabetologie

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia legendi
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig Universität

vorgelegt von Dr. med. Clemens Jaeger

Giessen 2005

*"Hypothesen sind Netze, nur der wird fangen, der
auswirft...."*

Novalis
(1772-1801)

Meiner Familie

GLIEDERUNG

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
LISTE DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN.....	III
VORWORT	V
1. EINLEITUNG	1
1.1 "Diabetes und Immunologie - eine vielfältige Beziehung"	1
1.2 Autoantikörper und Antikörper in der Diabetologie	10
1.2.1 Autoantikörper in der Immundiagnostik des Diabetes mellitus	10
1.2.2 Antikörperbildung gegen exogenes Insulin	16
1.3 Antikörper in der Diagnostik häufiger koinzidenter Erkrankungen	18
1.3.1 Autoantikörper bei den Autoimmun Polyglandulären Syndromen	18
1.3.2 Antikörperdiagnostik der Zöliakie	20
1.4 Methodenkritik der Autoantikörperdiagnostik	23
2. FRAGESTELLUNGEN DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN	28
2.1 Prädiktion und Prävention des Typ 1 Diabetes mellitus	29
2.2 Frühdiagnostik häufiger koinzidenter Erkrankungen	32
2.3 Klassifikation des Diabetes mellitus mit Manifestation im Erwachsenenalter	34
2.4 Autoantikörper bei inselzelltransplantierten Patienten mit Typ 1 D. m.	35
2.5 Insulin-Antikörper als Ursache von Komplikationen unter Insulintherapie	37
3. DARSTELLUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE	38
3.1 Prädiktion und Prävention des Typ 1 Diabetes mellitus	38
3.1.1 Die Giessen - Bad Oeynhausen Familienstudie	38
3.1.2 Vergleich der ICA vs. komb. GADA/anti-IA-2Ak-Testung	45
3.1.3 Die ENDIT - Studie	48

3.2 Frühdiagnostik häufiger koinzidenter Erkrankungen	56
3.2.1 Organspezifische Autoantikörper und Zöliakie assoziierte Antikörper bei Patienten mit Typ 1 Diabetes und Verwandten	56
3.2.2 TSH-Entwicklung über 7 Jahre bei Schilddrüsen-Ak positiven erstgradigen Verwandten von Typ 1 Diabetikern	61
3.3 Klassifikation des Diabetes mellitus mit Manifestation im Erwachsenenalter	66
3.3.1 Autoantikörperprävalenz und Prädiktion frühzeitiger Insulinbedürftigkeit bei Diabetesmanifestation im Erwachsenenalter	66
3.4 Autoantikörper bei inselzelltransplantierten Patienten mit Typ 1 Diabetes mellitus	69
3.4.1 Autoantikörper bei Langzeit-Typ 1 Diabetikern vor ITX	69
3.4.2 Einfluß der Immunsuppression auf die Autoantikörperbildung	71
3.4.3 Autoantikörper in der Risikostratifizierung des Inseltransplantatüberlebes	74
3.5 Insulin-Antikörper als Ursache von Komplikationen unter Insulintherapie	80
3.5.1 Algorithmus zu Diagnose und Management immunologischer Komplikationen unter Insulintherapie	80
3.5.2 Exemplarische Darstellung der Befunde in vier Kasuistiken	85
4. ZUSAMMENFASSUNG UND ABSCHLIEBENDE BETRACHTUNG	92
5. LITERATURVERZEICHNIS	97
6. DANKSAGUNG	111
7. ANLAGEN	
Anlage 1: Ausgewählte Publikationen ad 3.1.....	113
Anlage 2: Ausgewählte Publikationen ad 3.2.....	145
Anlage 3: Ausgewählte Publikationen ad 3.3.....	159
Anlage 4: Ausgewählte Publikationen ad 3.4.....	164
Anlage 5: Ausgewählte Publikationen ad 3.5.....	184
Anlage 6: Curriculum Vitae	191

LISTE DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

AAK	Autoantikörper
APS	Autoimmun Polyglanduläre Syndrome
BMI	Body Mass Index
CDC	Centers for Disease Control
CSII	Continuous Subcutaneous Insulin Infusion
DASP	Diabetes Autoantibody Standardization Programme
DENIS	Deutsche Nikotinamid Interventionsstudie
DPT-1	Diabetes Prevention Trial in Type 1 Diabetes
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENDIT	European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial
GADA	Glutamat Decarboxylase Antikörper
IAA	Insulinautoantikörper
ICA	Inselzellantikörper
ICA512	Inselzellantigen 512 (Tyrosinphosphatase IA-2)
IDDM	Insulinabhängiger Diabetes Mellitus ("Typ 1 Diabetes")
IDS	Immunology of Diabetes Society
IDW	Immunology in Diabetes Workshop
ITX	Inselzelltransplantation
ivGTT	Intravenöser Glucosetoleranz Test
JDFu	Juvenile Diabetes Foundation units
LADA	Latent Autoimmune Diabetes in Adults
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
NIDDM	Nicht Insulinabhängiger Diabetes Mellitus ("Typ 2 Diabetes")
NOD	Nonobese Diabetic (Mouse)
oGTT	Oraler Glucosetoleranz Test
PAI-1	Plasminogenaktivator Inhibitor-1
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PRIST	Paper Radioimmunosorbent Test
RAST	Radioallergosorbent Test
RIA	Radioimmunoassay
ROC	Receiver Operator Characteristics

VORWORT

Die vorliegende Habilitationsschrift faßt die Ergebnisse experimenteller und klinischer Untersuchungen zusammen, in deren Zentrum die Charakterisierung der Antikörper- und Autoantikörperbildung mit ihren diagnostischen und therapeutischen Implikationen bei Patienten mit manifestem Diabetes mellitus und Vorstadien, sowie bei Langzeit-Typ 1 Diabetikern vor- bzw. nach Inselzelltransplantation stehen. Ein weiterer Fokus liegt auf der Früherkennung der häufig mit dem Typ 1 Diabetes assoziierten Erkrankungen wie der Zöliakie und anderen koinzidierenden Autoimmunerkrankungen (sogenannte "Autoimmun polyglanduläre Syndrome").

Die im Rahmen dieser Habilitation durchgeführten experimentellen und klinischen Untersuchungen wurden im Zeitraum 1993-2003 an der Medizinischen Klinik und Poliklinik III des Zentrums für Innere Medizin (Leiter: Prof. Dr. R.G. Bretzel), Justus-Liebig Universität in Giessen und in dem an vorgenannter Klinik angegliederten Immunologischen Labor (Leiter, Bereich Immunendokrinologie/Gastroenterologie: Dr. C. Jaeger) durchgeführt.

Die vorgelegte Arbeit stützt sich u.a. auf die Tätigkeit folgender Doktoranden der Humanmedizin, die ich als Leiter der Arbeitsgruppe Immunendokrinologie bei der Durchführung ihrer Arbeiten betreut habe: Martina Herrmann (Tag der Disputation: 02.06.1999); Jens Allendörfer (Tag der Disputation: 14.02.2000); Anne Kathrin Strödter (Tag der Disputation: 05.06.2002). Außerdem fanden in diese Habilitationsschrift die Ergebnisse von Dr. med. Erifili Hatzigelaki (jetzt: Hellenic National Diabetes Center, Athens University, Athen, Griechenland) Eingang, die im Zeitraum 1995-1997 ihr "postdoctoral fellowship" in unserer Arbeitsgruppe absolvierte. Beigetragen zu den hier vorgelegten Ergebnissen haben der Chemielaborant Michael Stein, die Arzthelferin Sabine Scherer und die Medizinisch Technischen Assistentinnen Jutta Schmidt, Sabine Schaum und Silke Hecker.

Meine wissenschaftliche Tätigkeit konnte ich in zahlreichen Kooperationen entwickeln. Unter den externen Kooperationen seien insbesondere Forschungsaufenthalte bei Dr. Thomas Dyrberg, Abteilung für Assayentwicklung, Novo Nordisk, Bagsvaard, Dänemark erwähnt. Weiterhin bestand eine enge Kooperation mit Prof. Petzoldt und Mitarbeitern (Universität Bochum, Diabeteszentrum Bad Oeynhausen) im Rahmen der Giessen-Bad Oeynhausen

Familienstudie, deren Koordination ich 1994 übernommen habe. Im Zuge der internationalen multizentrischen Studie ENDIT ergaben sich in meiner Funktion als nationaler Studienkoordinator der deutschen ENDIT-Beteiligung ab 1994 eine enge internationale Zusammenarbeit mit der Studienleitung in London, später Bristol (Prof. Edwin Gale und Dr. Polly Bingley, Division of Diabetes and Metabolism, University of Bristol, UK) und zahlreichen Kollegen aus den teilnehmenden europäischen Ländern. Auf nationaler Ebene sei auf die Kooperation mit den angeschlossenen 16 lokalen deutschen ENDIT-Prüfärztezentren hingewiesen. Darüberhinaus bestand eine sehr fruchtbare kliniksinterne Kooperation mit der Arbeitsgruppe Klinische Inselzelltransplantation unter der Leitung von Dr. Mathias Brendel, sowie eine enge Zusammenarbeit mit Dr. Michael Eckhard, Dr. Erika Mäser, Dr. Thomas Discher, Dr. Mathias Lumpe, Dr. Christine Helfrich, Dr. Christian Georg (alle Medizinische Klinik und Poliklinik III) bei der Rekrutierung und Betreuung der Probanden und Patienten für die verschiedenen Forschungsvorhaben.

Finanziell gefördert wurden die Untersuchungen an den Inselzelltransplantierten Patienten durch eine Projektbeteiligung im Rahmen eines Single Centre Grant der Juvenile Diabetes Research Foundation International (JDRFI), sowie durch das National Institutes of Diabetes, Digestive and Kidney Disease (NIDDK, Grant DK 56962) und durch eine Projektförderung der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG). Die ENDIT-Studiengruppe wird finanziert durch EU-Mittel (PL92 0957 und PL 95 0771) sowie durch die Juvenile Diabetes Research Foundation International (Grant 4-2000-943). Die Giessen-Bad Oeynhausen Familienstudie wurde unterstützt durch nicht gebundene Forschungsmittel der Hoechst Pharma Deutschland AG (Dr. D. Leihener).

Die vorliegende Habilitationsschrift ist in zwei Teile gegliedert. In Teil 1 wird in der EINLEITUNG in die Thematik eingeführt und der gegenwärtige Kenntnisstand bezüglich Autoantikörper und Antikörper bei Diabetes mellitus dargestellt. Hieraus werden dann die FRAGESTELLUNGEN DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN abgeleitet. Eine Übersicht über die wichtigsten Ergebnisse mit kurzer Diskussion vor dem Hintergrund der aktualisierten Literatur (einschließlich der, nach Veröffentlichung der eigenen Ergebnisse, neu erschienenen Publikationen) folgt in der DARSTELLUNG DER EIGENEN ERGEBNISSE UND DISKUSSION. Die ZUSAMMENFASSUNG UND ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNG skizziert nochmals die Hauptlinien der vorliegenden Habilitationsschrift, gefolgt vom

LITERATURVERZEICHNIS, in dem die Referenzen zu den vorangegangenen Kapiteln aufgeführt sind.

Der Teil 2 umfaßt die LISTE DER ANLAGEN mit den der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Publikationen. Die Darstellung der Methoden, Einzelheiten der gewonnenen Ergebnisse und detaillierte Diskussion der einzelnen Teilbereiche sind den jeweiligen Manuskripten zu entnehmen.

1 EINLEITUNG

1.1 "Diabetes und Immunologie - eine vielfältige Beziehung"

Die Beziehungen zwischen Diabetes und Immunologie haben in den letzten hundert Jahren entscheidend die Therapie des Diabetes beeinflusst und das Verständnis für die Erkrankung geprägt. Während heute bei dieser Thematik vornehmlich die Tatsache assoziiert wird, daß der Typ 1 Diabetes eine Autoimmunerkrankung darstellt, stand medizinhistorisch die "Insulinimmunologie" am Anfang.

Bereits vor der ersten Isolierung klinisch verwertbaren Insulins durch Banting und Best im August des Jahres 1921 (Banting & Best, 1922) gab es zahlreiche Versuche, Insulin zu extrahieren. Insbesondere der Berliner Internist G. L. Zülzer isolierte schon ab 1903 ein wirksames Präparat, mußte jedoch wegen nicht beherrschbarer allergisch-toxischer Reaktionen 1909 seine Arbeiten einstellen. Unmittelbar nach der Entdeckung des Insulins beschrieben Joslin et al. vier Fälle von Urticaria unter den weltweit ersten 85 Patienten, die jemals mit Insulin behandelt worden waren (Joslin et al., 1922). Erst seit den 70-iger Jahren des letzten Jahrhunderts reduzierten chromatographische Verfahren signifikant die Anzahl der Immunreaktionen. Im folgenden war dann im wesentlichen die Speziespezifität der Insuline (Schwein vs. Rind) entscheidend für die Häufigkeit der Immunreaktionen. Seit der gentechnischen Herstellung der Humaninsuline sind Immunreaktionen heute nur noch seltene Phänomene. Im Einzelfall sind sie jedoch für den betroffenen Patienten von größter therapeutischer Relevanz und nicht selten die verkannte Ursache einer instabilen Stoffwechsellaage. Die Entwicklung eines Algorithmus zur Differentialdiagnose und Therapie der heute immer noch relevanten immunologischen Komplikationen unter Insulintherapie ist Teil der vorliegenden Arbeit.

In der zweiten Hälfte des vorigen Jahrhunderts, parallel zum immer rascher voranschreitenden medizinisch- wissenschaftlichen Fortschritt, entwickelte sich das Thema "Diabetes und Immunologie" weit über die Beziehungen des Insulins zum Immunsystem hinaus. 1965 fand Gepts eine Infiltration des Pankreas mit mononukleären Zellen bei Patienten mit juvenilem Diabetes (Gepts et al., 1965). Sechs Jahre später folgte die Erstbeschreibung einer gegen das Pankreas gerichteten zellulären Immunreaktion bei Patienten mit juvenilem Diabetes mellitus

(Nerup et al., 1971). Einen Meilenstein im Verständnis des Typ 1 Diabetes als Autoimmunerkrankung stellen die Arbeiten von Bottazzo dar mit der Erstbeschreibung der Inselzell-Antikörper (ICA) im Jahre 1974 (Bottazzo et al., 1974) und der Prägung des Begriffs der "Insulinitis" als morphologisches Korrelat des Autoimmunprozesses beim Typ 1 Diabetes. Bottazzo und Mitarbeiter erhoben diese Befunde bei der Untersuchung der Bauchspeicheldrüse eines 12-Jährigen Mädchens, welches bei Manifestation eines insulinabhängigen Diabetes (IDDM) verstorben war (Bottazzo et al., 1985).

In den letzten Jahren konnten zahlreiche Mechanismen der Betazell-Zerstörung auch auf molekularer Ebene charakterisiert werden. So wurden entscheidende Interaktionen zwischen den Immunzellen und Zytokinen, Induktion pathologischer intrazellulärer Signalwege und die Rolle freier Radikale in dem komplexen Netzwerk der Betazell-Zerstörung identifiziert, was zum sogenannten "Kopenhagener Modell" der Betazell-Zerstörung führte mit Erstbeschreibung 1994 durch Nerup (Nerup et al., 1994). Inzwischen ist dieses Modell, dem Erkenntnisfortschritt folgend, mehrfach aktualisiert worden, um der wachsenden Komplexität Rechnung zu tragen und logische Verknüpfungen zwischen den zunehmend detaillierter beschriebenen Einzelfaktoren herzustellen (Review in Freiesleben et al., 1999). Wichtige Arbeiten zu dem Teilaspekt eines verminderten Abwehrpotentials der Betazelle als prädisponierender Faktor der Betazell-Zerstörung durch proinflammatorische Attacken und oxidativen Streß sowie hieraus resultierend mögliche Ansätze für Betazell protektive Strategien wurden durch Tiedge und Mitarbeitern erarbeitet (Review in Tiedge et al., 2003).

Während das "Kopenhagener Modell" eher die ablaufenden Mechanismen im Rahmen der autoimmunen Betazell-Zerstörung beschreibt, wendet sich das Konzept des "Immunologischen Toleranzverlustes vs. Toleranzinduktion" der Frage nach den Ursachen der Initiierung des Autoimmunprozesses und einer möglichen therapeutischen Beeinflußbarkeit zu. Diese Konzept beschreibt immunologische Toleranz als Abwesenheit einer Immunreaktion bei fehlender Immunsuppression. Mit wenigen Ausnahmen entwickeln die meisten Menschen ein Immunsystem, welches tolerant ist gegenüber den eigenen Organsystemen und gegenüber den Dingen, die sie zu sich nehmen. Bei ca. 1 aus 300 Menschen kommt es jedoch zum Verlust der Toleranz gegen die Betazellen des Pankreas, das Ergebnis ist der Typ 1 Diabetes. Interferiert man nach eingetretenem Toleranzverlust therapeutisch, beispielsweise durch Gabe von Cyclosporin mit den T-Zellen als Hauptträger der Immunreaktion, so kann der Krankheitsprozeß gestoppt werden. Gelänge es jedoch, den

Toleranzverlust selbst zu verhindern, könnte man im Sinne einer Primärprävention der Erkrankung vorbeugen. Bei denjenigen Patienten wiederum, die bereits an klinisch manifestem Typ 1 Diabetes leiden, bestünde in der Logik dieses Konzeptes eine erfolgversprechende Strategie in der Toleranzinduktion z.B. gegenüber Inselzelltransplantaten. Grundprinzipien dieses Modells sind in *Abbildung 1* dargestellt. Eine Übersicht gibt die Arbeit des Banting-Preisträgers Aldo A. Rossini anlässlich der Banting Lecture 2003 (Rossini, 2004).

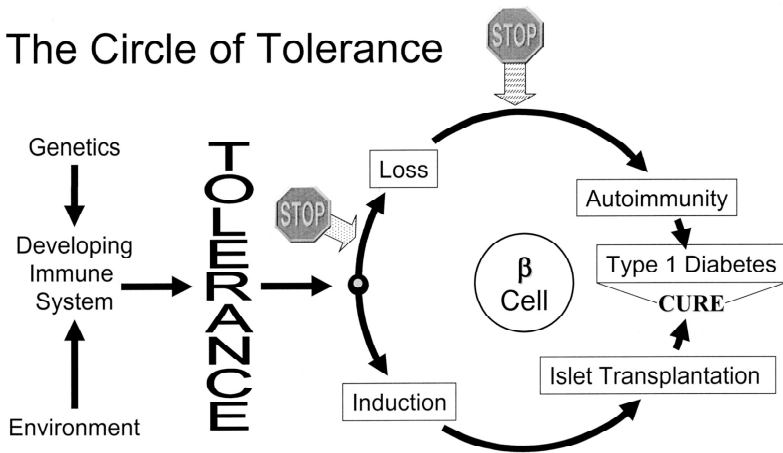


Abb. 1: "Circle of Tolerance" (mod. nach Rossini, 2004). Im sich entwickelnden Immunsystem entsteht auf Basis der genetischen Prädisposition und Umwelteinflüssen Toleranz. Der Verlust der Toleranz gegenüber Betazellen führt zum Typ 1 Diabetes. Interventionsmöglichkeiten bestehen potentiell vor dem Toleranzverlust (Primärprävention) oder nach eingetretenem Toleranzverlust (Sekundärprävention). Bei manifester Erkrankung könnte die Induktion einer Toleranz z.B. gegen Inselzelltransplantate den Typ 1 Diabetes heilen.

Wie sehr diese Entwicklungen das Verständnis für die Erkrankung Diabetes mellitus beeinflusst haben wird auch daran erkennbar, daß alleine in den letzten 30 Jahren drei verschiedene Klassifikationen des Diabetes mellitus entwickelt wurden, um dem Erkenntnisfortschritt gerecht zu werden.

In den frühen 70-iger Jahren war das Alter das Hauptkriterium zur Klassifikation und führte zu den heute immer noch umgangssprachlich verwendeten, aber irreführenden Begriffen des "jugendlichen Diabetes" vs. "Altersdiabetes". Es wurde allerdings rasch klar, daß die verschiedenen Formen des Diabetes in allen Altersgruppen auftreten können, so daß nun in einer neuen Klassifikation das klinische Kriterium der "Insulinbedürftigkeit" zur Unterscheidung herangezogen wurde. Nach heutigem Verständnis war auch dieses Kriterium nicht befriedigend, da es pathogenetische Mechanismen nahelegte, die einer genauen Überprüfung nicht standhielten. So begründet beispielsweise das Kriterium einer fehlenden Insulinbedürftigkeit nicht den Ausschluß eines Autoimmunprozesses an den Beta-Zellen des Pankreas. Dies wird augenfällig bei älteren Patienten mit später Manifestation eines Diabetes mellitus, der durch einen modifizierten Autoimmunprozeß ausgelöst wird mit nachweisbaren Autoantikörpern bei Diagnosestellung, klinisch jedoch zunächst als Typ 2 Diabetes imponierend und Monate bis Jahre ohne Insulinsubstitution auskommen kann. Dies hatte zwischenzeitlich zur Prägung des Begriffs "LADA, latent autoimmune diabetes in adults" geführt, der jedoch inzwischen weitgehend zugunsten eines genaueren Verständnisses des modifizierten Autoimmunprozesses verlassen ist. Die Bedeutung dieser Erkenntnisse wird auch dadurch deutlich, daß in der UKPDS-Studie, an 5102 als Typ 2 Diabetiker klassifizierten Patienten, in 10-15% Autoantikörper wie GADA oder ICA gefunden wurden (Turner et al., 1997). Wenn aus epidemiologischer Sicht bisher das Verhältnis von Typ 1 Diabetes zu Typ 2 Diabetes mit ca. 1:10 angegeben wurde, so verdoppelt sich der Prozentsatz der Patienten mit Autoimmundiabetes nun auf mindestens 1:5 durch den Anteil der als Typ 2 Diabetiker fehlklassifizierten Patienten mit eigentlich autoimmuner Genese. Der Nachweis der Autoantikörper bildet hier ein wichtiges Kriterium zur korrekten Klassifizierung. Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit leisten einen Beitrag zur Charakterisierung dieser Patienten einschließlich der Vorhersage einer späteren Insulinbedürftigkeit bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

Grundlegend neue Erkenntnisse zu Epidemiologie und Pathogenese der verschiedenen Diabetesformen und das vertiefte immunologische Verständnis führten zu der von der amerikanischen Diabetes-Gesellschaft 1997 eingeführten und 2001 von der Deutschen Diabetes Gesellschaft übernommenen Klassifikation, die einer ätiologischen und pathogenetisch begründeten Einteilung folgt (Kerner et al., 2001). Es wird derzeit unterschieden zwischen Diabetes mellitus Typ 1 mit Betazell-Zerstörung und konsekutiv absolutem Insulinmangel, Diabetes mellitus Typ 2, charakterisiert durch Insulinresistenz und

Insulinmangel in unterschiedlicher Ausprägung, sowie weiteren Diabetestypen mit bekannter Ursache und dem Gestationsdiabetes.

Nach der Erstbeschreibung der Inselzell-Antikörper 1974 folgte bereits 1976 die Entdeckung von Inselzell-Antikörpern in klinisch und phänotypisch noch gesunden Individuen, die erst später im Verlauf einen Diabetes entwickelten (Irvine et al., 1976). Diese Erkenntnis einer möglicherweise langen prädiabetischen Phase vor dem klinisch manifesten Typ 1 Diabetes mellitus löste in den folgenden Jahrzehnten intensive Forschungsbemühungen und groß angelegte Studien aus, die zunächst eine Untersuchung des natürlichen Verlaufs des Prädiabetes zum Ziel hatten und in deren Folge dann Prädiktionsmodelle zur Vorhersage der Erkrankungswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von verschiedenen Markern entwickelt wurden. Das heutige Verständnis des Prä-Typ 1 Diabetes wird vereinfacht in *Abbildung 2* dargestellt.

Die Ursachen für die Initiierung der autoimmunologisch verursachten Zerstörung der Beta-Zellen ist im Detail noch nicht verstanden. Wahrscheinlich treffen noch unbekannte exogene Faktoren zusammen mit der inzwischen gut definierten genetischen Prädisposition, so daß der Autoimmunprozeß angestoßen wird und es zum Toleranzverlust kommt (s.a. Rossini, 2004). Forschungen der letzten Jahre weisen dem Heat Shock Protein (HSP 70) eine zentrale Rolle in der frühen Phase des Autoimmunprozesses zu. Das HSP 70 wird aus nekrotischen Zellen freigesetzt und ist in der Lage, T-Zell-Toleranz *in vivo* in Autoimmunität zu konvertieren (Millar et al., 2003).

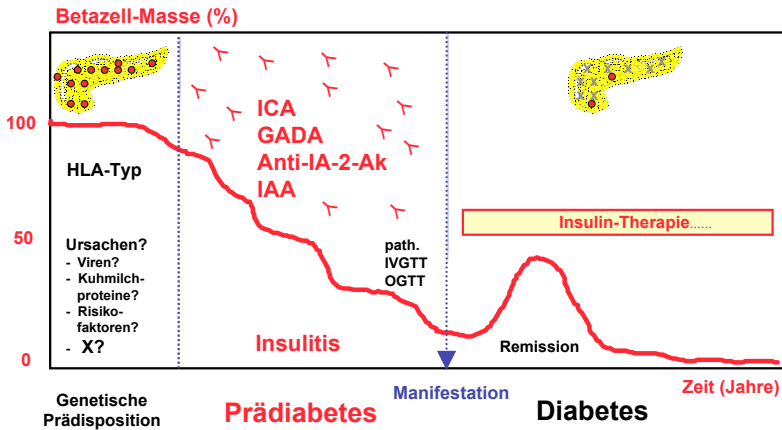


Abb. 2: Pathogenese des Typ 1 Diabetes.

Das "Kopenhagener Modell" (Nerup et al., 1994; Freiesleben et al., 1999) beschreibt Einzelheiten der ablaufenden pathologischen Prozesse bei der Betazell-Zerstörung. Über wahrscheinlich viele Jahre, bei den spät manifestierenden Typ 1 Diabetikern im Erwachsenenalter möglicherweise auch episodisch über Jahrzehnte, kommt es zur Abnahme der Betazell-Masse, und damit der endogenen Insulin-Sekretionsreserve. Das endokrine Pankreas hat eine große Funktionsreserve in der Aufrechterhaltung des Glukosestoffwechsels. Wird jedoch eine kritische Grenze von ca. 20% unterschritten, resultiert die dann auch klinisch evidente diabetische Stoffwechsellage. Die Patienten werden symptomatisch, häufig in der Endphase getriggert über einen Infekt, der eine erhöhte Insulinsekretion einfordert, die von den wenigen verbliebenen Betazellen nicht mehr geleistet werden kann. Es resultiert die Insulinbedürftigkeit. Die Autoantikörper sind die frühesten Marker der ablaufenden autoimmunologisch vermittelten Betazell-Zerstörung im Stadium des Prädiabetes, sie sind der "Rauch des Feuers" (Bottazzo, persönliche Mitteilung) und eröffnen in geradezu modellhafter Weise die Möglichkeit einer Intervention, im Sinne einer Sekundärprävention, zu einem sehr frühen Zeitpunkt, wenn noch eine ausreichende Betazell-Masse vorhanden ist, um einen ausgeglichenen Stoffwechsel zu gewährleisten. Verglichen mit den Autoantikörpern werden die metabolischen Marker im Prädiabetes erst kurz vor Manifestation auffällig, zunächst der ivGTT, und dann als letztes der oGTT.

Inzwischen ist bekannt, daß die Autoantikörper häufig bereits im Kleinkindesalter nachweisbar sind, der Autoimmunprozeß also sehr früh beginnen kann. Zwei große prospektive Studien widmen sich verschiedenen Fragestellungen bei Kindern mit erhöhtem Diabetesrisiko (z.B. Kinder diabetischer Mütter oder Kinder mit bestimmten genetischen Risikomerkmale), die "Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY)" und die "BABYDIAB-Studie". Zur Frage eines erhöhten Diabetesrisikos durch diaplazentare Übertragung von Autoantikörpern geben beide Studien Hinweise, daß die diaplazentare Übertragung von Autoantikörpern in diesen Konstellationen kein erhöhtes Risiko für persistierende Autoimmunität darstellt (Stanley et al., 2004; Koczwara et al., 2004).

Die frühen Studien zur Charakterisierung des Prä-Typ 1 Diabetes nutzten neben metabolischen Markern die bis dahin einzig verfügbaren Inselzell-Antikörper als immunologische Marker (Tarn et al., 1988; Bonifacio et al., 1990). Nach der Identifizierung weiterer Antikörperspezifitäten, insbesondere Antikörper gegen die 65 K-Isoform der Glutamat-Decarboxylase (GADA) (Baekkeskov et al., 1990) und Antikörper gegen den intracytoplasmatischen Anteil der Tyrosinphosphatase IA-2/ICA512 (Bonifacio et al., 1995; Payton et al., 1995) standen nun zusätzliche Parameter zur Verfügung, die genauer charakterisiert und in Bezug auf ihren prädiktiven Wert einer späteren Diabetesentwicklung bereits im Stadium des Prädiabetes definiert werden sollten. Dies hatte die 1985 begonnene Giessen-Bad Oeynhausen Familienstudie zum Ziel, die bei 882 erstgradigen Verwandten von Patienten mit Typ 1 Diabetes über elf Jahre prospektiv die Diabetesinzidenz und Antikörperprävalenzen untersucht hat.

Die Ergebnisse dieser Studie, in der neben den diabetesrelevanten Antikörpern auch ein erweitertes Antikörperspektrum im Hinblick auf die autoimmunen polyglandulären Syndrome II/III (APS) und die Zöliakie untersucht wurde, sind zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Ziel ist es, effiziente Screeningstrategien für die Erfassung früher Stadien des Typ 1 Diabetes und häufig hiermit assoziierter Erkrankungen zu entwickeln, um präventiv intervenieren zu können.

Ein Beispiel für solch eine Intervention beim Typ 1 Diabetes im Stadium des Prädiabetes (Sekundärprävention) stellt die internationale Multicenter-Studie ENDIT (European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial) dar mit dem Ziel, die spätere Entwicklung des Typ 1 Diabetes zu verzögern oder gar zu verhindern. In den Jahren 1992 - 2002 wurden mehr als

30.000 erstgradige Verwandte auf das Vorhandensein von Autoantikörpern untersucht und ggf. in die prospektive plazebo-kontrollierte und doppelblind randomisierte Interventionsstudie eingeschlossen. Die Ergebnisse dieser Studie, gewonnen in der Funktion als nationaler Studienkoordinator der deutschen ENDIT-Beteiligung, fließen ebenfalls in die vorliegende Arbeit ein.

Besonders evident wird die Beziehung zwischen Diabetes und Immunologie beim biologischen Ersatz des erkrankten Inselapparates durch Inselzelltransplantation (ITX) als Therapieprinzip bei Patienten mit Typ 1 Diabetes. Neben den klassischen Mechanismen der allogenen Transplantatabstoßung gefährdet zusätzlich der beim Empfänger zugrundeliegende pathologische Autoimmunprozeß, der primär das Empfängerpankreas selbst geschädigt hat, das Überleben des Inselzelltransplantates. Die prinzipielle Bedeutung dieser "disease recurrence" konnte in einer eindrucksvollen Untersuchung an eineiigen Zwillingen gezeigt werden. Das Pankreasspendertransplantat des nicht diabetischen Zwilling wurde vom Empfänger, dem an Typ 1 Diabetes erkrankten Zwilling, innerhalb weniger Wochen zerstört (Sibley et al., 1985). Die Effektormechanismen der Betazell-Zerstörung sind vorrangig in dem komplexen Regelwerk des zellulären Immunsystems mit den Interaktionen u.a. im Bereich der Zytokine und Chemokine anzusiedeln. Den Antikörpern als Bestandteil des humoralen Immunsystems kann jedoch, ähnlich wie beim Typ 1 Diabetes, eine entscheidende Rolle als Marker des ablaufenden Autoimmunprozesses zukommen. Die Charakterisierung der Autoantikörper bei Langzeit-Typ 1 Diabetikern vor- und nach Inselzelltransplantation in Gegenwart verschiedener Immunsuppressiva stellen in Analogie zu den Untersuchungen im Prädiabetes einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit dar.

Wenn von den vielfältigen Beziehungen zwischen Diabetes und Immunologie die Rede ist, sollen abschließend noch einige Aspekte nicht unerwähnt bleiben, wenngleich sie nicht zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind. Immungenetische Analysen haben seit der ersten Publikation im Jahre 1973 (Singal & Blajchman, 1973) ganz wesentlich zum Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankung und darüberhinaus der biologischen Bedeutung des HLA-Komplexes beigetragen. Ein weiterer Aspekt der Wechselbeziehung zwischen Diabetes und Immunologie ist die gesteigerte Infektbereitschaft des Diabetikers, insbesondere für bakteriell bedingte Erkrankungen oder aber die verlangsamte Heilung nach Unfällen und Operationen. Dies wird besonders augenfällig beim "diabetischen Fuß-Syndrom". Interessante Untersuchungen aus jüngster Zeit finden eine Assoziation zwischen

Insulin Resistenz und vermehrter subklinischer Inflammation, erhöhtem CRP, Fibrinogen sowie erhöhten PAI-1-Spiegeln (Haffner, 2003). Hieraus werden vermehrte proinflammatorische Prozesse in der Pathogenese der Atherosklerose beim Prä-Typ 2 Diabetiker abgeleitet, ein weiteres Beispiel für die Wechselbeziehungen zwischen Diabetes und Immunologie.

Zusammenfassend sei angemerkt, daß die Immunologie in der Vergangenheit entscheidend zum Verständnis der Erkrankung Diabetes mellitus beigetragen hat und auch zukünftig richtungsweisende Erkenntnisse aus dem Wechselspiel zwischen "Diabetes und Immunologie" erwachsen werden. Die vorliegende Arbeit beleuchtet einen Teilaspekt dieses Wechselspiels mit Fokus auf die "Bedeutung einer differenzierten Autoantikörper- und Antikörperanalytik in der Diabetologie".

1.2 Autoantikörper und Antikörper in der Diabetologie

1.2.1 Autoantikörper in der Immundiagnostik des Diabetes mellitus

Unterschieden werden derzeit vier, inzwischen gut charakterisierte Autoantikörperspezifitäten: Die Inselzell-Antikörper (ICA), die Autoantikörper gegen die 65 K-Isoform der Glutamatdecarboxylase (GADA), Autoantikörper gegen den intracytoplasmatischen Teil einer Tyrosinphosphatase IA-2/ICA 512 (anti-IA-2 Ak) und die Insulin-Auto-Antikörper (IAA). Darüberhinaus sind noch weitere Antigene und Autoantigene beschrieben worden, deren Stellenwert jedoch noch nicht abschließend bewertet werden kann. Hier seien u.a. nur das IA-2 β (Phogrin), das 38 K-Antigen, das 65 K Heat Shock Protein und die Carboxypeptidase H erwähnt.

Die Erstbeschreibung der Inselzell-Antikörper (ICA) bei Patienten mit insulinpflichtigem Diabetes mellitus und weiteren autoimmunen Polyendokrinopathien stammt von Bottazzo (Bottazzo et al., 1974). Die Datenlage für die ICA ist naturgemäß sehr gut, da es sich bei den ICA um den ersten und damit am längsten systematisch untersuchten immunologischen Marker handelt. Diese Antikörper werden bis heute durch indirekte Immunfluoreszenz auf Kryostatanschnitten von humanem Pankreas der Blutgruppe 0 nachgewiesen. Die indirekte Immunfluoreszenz hat jedoch methodenimmanente Probleme durch die Subjektivität in der Beurteilung, mit der auch nur eine Semiquantifizierung in Titerstufen möglich ist. Darüberhinaus ist der Test schlecht für Massenuntersuchungen mit hohem Probendurchsatz anwendbar. Dies stand einer weiten Verbreitung im Wege. So gelang zwar trotz großer internationaler Bemühungen mit internationalen Workshops eine Verbesserung der Standardisierung, die jedoch nach wie vor unbefriedigend bleibt (Marner et al., 1986; Bonifacio et al., 1990; Lernmark et al., 1991). Zu diesen methodischen Problemen kommt hinzu, daß je nach verwendeter Labormethode und Expertise in Kollektiven aus frisch manifestierten Typ 1 Diabetikern zwar eine gute Spezifität mit 98% erreichbar ist, die Sensitivität jedoch mit nur ca. 70-80% unbefriedigend bleibt (Landin-Olsson et al., 1989).

Inzwischen wurde erkannt, daß es sich bei den Inselzell-Antikörpern um eine heterogene Gruppe von Antikörpern handelt, die gegen unterschiedliche Antigene der Betazelle gerichtet sind. Vereinfacht gesagt handelt es sich also bei der unter dem Mikroskop erkennbaren

Anfärbung der Inseln (ICA) um die globale Erfassung einer polyvalenten humoralen Immunreaktion gegen verschiedene Antigene der Betazelle ohne genaue Differenzierung der humoralen Immunantwort auf Antigenebene. Somit ist die ICA-Testung ein natürlicher AK-Kombinationstest. Er hat naheliegenderweise jedoch als Einzeltest nach wie vor die höchste Spezifität und Sensitivität bezüglich Diagnostik und Prädiktion eines sich entwickelnden Typ 1 Diabetes.

Die Differenzierung der humoralen Immunantwort gegen Betazell-Antigene gelingt heute deutlich genauer durch die Differenzierung in Antikörper gegen die 65 K-Isoform der Glutamatdecarboxylase (GADA) und Antikörper gegen den intracytoplasmatischen Teil einer Tyrosinphosphatase IA-2/ICA512 (anti-IA-2 Ak). Durch die Identifizierung beider Zielantigene ist es gelungen, zwei zentrale Antigene der Betazelle auf molekularer Ebene zu charakterisieren, die einen Großteil der spezifischen ICA-Färbung ausmachen (Bonifacio et al., 1995; Atkinson et al., 1993; Richter et al., 1992; Myers et al., 1995). Inzwischen stehen zuverlässige Assays auf Basis der gentechnisch hergestellten rekombinanten Antigene zur Verfügung.

Antikörper gegen ein 64-K-Inselzellprotein wurden 1982 erstmals von Baekkeskov et al. beschrieben (Baekkeskov et al., 1982). 1990 gelang die Identifizierung des 64 K-Proteins als GABA-synthetisierendes Enzym Glutamatdecarboxylase (GAD) wiederum durch die Arbeitsgruppe um Baekkeskov (Baekkeskov et al., 1990). Es existiert neben der 65 K-Isoform noch eine zweite 67 K-Isoform, die jedoch für den humanen Typ 1 Diabetes keine Bedeutung hat. Die Haupt-Epitopregionen auf dem GAD-Molekül, die von den Antikörpern erkannt werden, liegen im Bereich der AS 240-435 und 451-570. GADA finden sich bei ca. 60% neu manifestierter Typ 1 Diabetiker und sind im Vergleich zu anderen Antikörpern sehr sensitive, aber weniger spezifische Marker für den Typ 1 Diabetes. Sie müssen deshalb zur Verbesserung der Spezifität mit anderen Markern kombiniert werden (Seissler et al., 1996).

Anti-IA-2-Antikörper binden an transmembranöse Proteine mit der Bezeichnung IA-2 (auch ICA 512), die zu den Tyrosinphosphatasen gehören. Die Antikörperbindungsstellen liegen im intracytoplasmatischen Anteil. Noch vor der molekularen Identifizierung zeitgleich durch zwei Arbeitsgruppen im Jahre 1995 (Bonifacio et al., 1995; Payton et al., 1995) waren beide Antigene als 40 K- und 37 K- Protein und diese wiederum als tryptische Spaltprodukte eines 64 K-Proteins bekannt. Anti-IA-2-Ak sind sehr spezifisch für den Typ 1 Diabetes und

kommen bei etwa 60% von neu manifestierten Typ 1 Diabetikern vor. Im Prädiabetes sind sie mit einer raschen Krankheitsprogression assoziiert (Christie et al., 1997).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß die im Fluoreszenzmikroskop sichtbare ICA-Färbung durch die Reaktion der Serumantikörper mit verschiedenen B-Zellantigenen zustande kommt, von denen die beiden zentralen als GAD-65 und Tyrosinphosphatase IA-2/ICA512 identifiziert sind. Da sie jedoch nicht die gesamte ICA-Bindung ausmachen, wird vermutet, daß weitere, bisher noch unbekannte, ICA-Antigene existieren. Eine Übersicht über das Verständnis des "Binnenverhältnis" der AAK untereinander gibt *Abbildung 3*.

Das Spektrum der Autoantikörper wird komplettiert durch die Insulin-Auto-Antikörper (IAA), die eine Sonderstellung einnehmen. Es handelt sich um Antikörper gegen das körpereigene Hormon Insulin und nicht um subzelluläre Strukturen der Betazellen oder Membranen. Die Insulin-Auto-Antikörper treten definitionsgemäß vor exogener Insulingabe auf (s.a. 1.2.2), d.h. die Bestimmung von IAA unter exogener Insulintherapie ist nicht aussagefähig. Die IAA-Bestimmung gelingt zuverlässig nur in Radioimmunoassays, dies wurde in zahlreichen workshops bestätigt, die Bestimmung im ELISA ist obsolet (Kuglin et al., 1990). Die IAA sind hochaffin und erkennen Epitope des Insulinmoleküls, die die Aminosäuren 8-13 der Alpha-Kette und 1-3 der Beta-Kette umfassen (Castano et al., 1993). Sie werden bei ca. 20-70% frisch manifestierter Typ 1 Diabetiker gefunden. Die große Streuung kommt dadurch zustande, daß die Prävalenz der IAA umgekehrt proportional dem Alter bei Diabetesmanifestation ist, am häufigsten sind die IAA bei Kindern unter 5 Jahren (Ziegler et al., 1991). Der Schwerpunkt der IAA-Bestimmung liegt im Bereich der Diagnostik des Typ 1 Diabetes im Kindesalter und bei der Prädiktion.

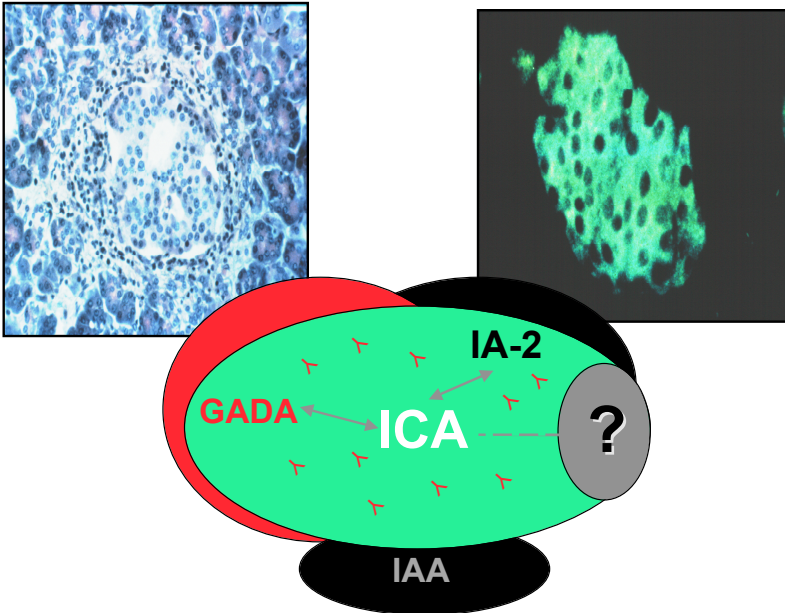


Abb. 3: Die Abbildung zeigt eine native Insel (oben links), umgeben von exokrinem Gewebe (HE-Färbung, Vergr. 400x). Gegenübergestellt die ICA-Färbung mittels indirekter Immunfluoreszenz (oben rechts, Vergr. 400x). Darunter eine schematische Darstellung der ICA-Zusammensetzung aus überwiegend GADA und anti-IA-2-Ak sowie einem kleinen Anteil noch nicht näher charakterisierter weiterer AAK und IAA.

In extrem seltenen Fällen können die Insulin-Auto-Antikörper in sehr hohen Titern quantitativ relevant Insulin binden und zum sogenannten Insulin-Autoimmunsyndrom führen mit spontaner Hypoglykämie, Hyperinsulinämie und gestörter Glucosetoleranz bis hin zum manifesten Diabetes. Die Erstbeschreibung erfolgte durch Hirata (Hirata & Ishizu, 1972). Weitere Fallberichte folgten, u.a. auch an unserer Klinik durch Discher (Discher et al., 1990) und kürzlich durch Lohmann (Lohmann et al., 2001).

Die Immundiagnostik auf Basis der vier Autoantikörper (ICA, GADA, anti-IA-2-Ak, IAA) hat in der klinischen Diabetologie einen etablierten Stellenwert bei der Diabetesmanifestation mit dem Ziel einer korrekten Klassifizierung und bei der Frühdiagnostik nichtdiabetischer Risikopopulationen.

Die Autoantikörpertestung bei Patienten zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation ist hilfreich zur differentialdiagnostischen Unterscheidung gegenüber Patienten mit Typ 2 Diabetes, MODY-Diabetes (maturity onset diabetes in young people), hereditären oder sekundären Diabetesformen. Durch die kombinierte Testung mehrerer Autoantikörper im Vergleich zur Einzeltestung können Sensitivität und Spezifität der Immundiagnostik verbessert werden. Die Kombination aller vier Autoantikörpertests ergibt die höchste Sensitivität von nahezu 100% bei Patienten unter 30 Jahren, nach dem 30. Lebensjahr ist die Sensitivität deutlich geringer. Vom methodischen Standpunkt aus ist interessant, daß die Dreifachbestimmung der vergleichsweise einfach zu bestimmenden definierten Autoantikörper IAA, GADA und anti-IA-2-Ak der Vierfachbestimmung fast ebenbürtig ist, in dieser Altersgruppe die ICA-Bestimmung also verzichtbar erscheint. Andererseits sind im höheren Lebensalter neben den GADA die ICA am häufigsten positiv im Verhältnis zu den IAA oder anti-IA-2-Ak. Gerade zur Erfassung der älteren Typ 1 Diabetiker empfiehlt sich also die Bestimmung insbesondere der GADA und ICA (mod. nach Ziegler & Scherbaum, 1999). Die Charakterisierung insbesondere der GADA in dieser Altersgruppe auch im Hinblick auf eine spätere Insulinabhängigkeit ist Teil der vorliegenden Arbeit.

Die Frühdiagnostik nichtdiabetischer Risikopopulationen kann erwogen werden bei Verwandten von Typ 1 Diabetikern, Patienten mit autoimmun polyglandulären Syndromen, Patienten mit Zöliakie und Frauen mit Gestationsdiabetes. *Tabelle 1* zeigt die Häufigkeit des Typ 1 Diabetes in den genannten Populationen.

Allgemeinbevölkerung	0.3%
Risikopopulationen	
Verwandte ersten Grades	3-8%
Gestationsdiabetikerinnen	6-10%
Autoimmun polyglanduläres Syndrom I	5%
Autoimmun polyglanduläres Syndrom II	50%
Zöliakie	5%

Tab. 1: Häufigkeit des Typ 1 Diabetes in verschiedenen Populationen (modifiziert nach Ziegler & Scherbaum, 1999)

Die Autoantikörperdiagnostik in diesen Populationen hat zum Ziel, möglichst frühzeitig im Krankheitsprozeß einen sich entwickelnden Typ 1 Diabetes zu identifizieren, um ggf. präventiv intervenieren zu können. Obwohl die bisherigen Studien zur Sekundärprävention (ENDIT, DENIS, DPT-1) noch keine positiven Ergebnisse in dieser Hinsicht erbracht haben, erscheint ein Screening unter folgenden Gesichtspunkten sinnvoll: Das Wissen um die Insulinitis schafft zum einen Aufmerksamkeit für das Erkennen und die richtige Zuordnung von Frühsymptomen bei Manifestation der Krankheit als Voraussetzung einer optimalen Therapie und ermöglicht zum anderen die Erprobung von Maßnahmen zur Prävention des manifesten Diabetes (mod. nach Ziegler & Scherbaum, 1999). Die Screeningoption bei derzeit "noch" fehlender Möglichkeit einer wirksamen Prävention wird sehr kontrovers diskutiert. In jedem Fall ist eine ausführliche Aufklärung möglicher Kandidaten über die verschiedenen Aspekte der Screeningmaßnahme zu fordern, um eine eigenverantwortliche Entscheidung für oder gegen die Autoantikörperbestimmung zu gewährleisten.

Insbesondere in der Risikopopulation der erstgradigen Verwandten von Typ 1 Diabetikern haben groß angelegte Studien wesentliche Informationen über die Sensitivität, Spezifität und den positiven prädiktiven Wert der Autoantikörperdiagnostik erbracht. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Giessen-Bad Oeynhausen Familienstudie an 882 erstgradigen Verwandten von Typ 1 Diabetikern mit prospektiver Beobachtung über mehr als 12 Jahre hatte die Charakterisierung der diabetesrelevanten Autoantikörper in Hinsicht auf eine spätere Diabetesmanifestation zum Ziel. ICA positive Probanden mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes wurden der Präventionsstudie ENDIT zugeführt.

Bisher wenig erforscht ist die Autoantikörperprävalenz bei Langzeit Typ 1 Diabetikern vor- und nach Inselzelltransplantation. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Langzeit-Typ 1 Diabetiker systematisch untersucht hinsichtlich der Autoantikörperprävalenz, möglichen Zusammenhängen mit residualem C-Peptid, Neuropathie oder definiertem HLA-Status. Darüberhinaus wurde der Einfluß von Immunsuppressiva untersucht und bei Inselzelltransplantierten Patienten die Autoantikörperverläufe in Korrelation zur Funktion des Inseltransplantates analysiert, um potentiell unterschiedliche Prognosegruppen zu identifizieren.

1.2.2 Antikörperbildung gegen exogenes Insulin

Insulin kann im Organismus verschiedene Immunantworten hervorrufen. Entscheidend für die Zuordnung ist, ob bereits eine Exposition gegen exogenes Insulin stattgefunden hat oder nicht.

Gut definiert ist zum einen die Autoantikörperbildung gegen das körpereigene Hormon ohne vorherige exogene Insulinexposition bei Patienten im Rahmen des Autoimmunprozesses eines Typ 1 Diabetes und bei dem sehr seltenen Insulin Autoimmunsyndrom. Dies wurde im vorherigen Abschnitt genauer behandelt (s.a. 1.2.1). Im Gegensatz hierzu kann es unter exogener Insulingabe im Rahmen der Insulintherapie zur Bildung von Insulin-Antikörpern kommen. Dies ist keinesfalls an das Vorhandensein eines Autoimmundiabetes gebunden. Es können alle Patienten betroffen sein, die eine Insulintherapie erhalten.

Über die Immunogenität exogen verabreichten Insulins ist viel spekuliert worden. Physiologischerweise wird das Insulin portalvenös sezerniert, die biologisch wirksame Form im Plasma ist das Monomer. Die subcutane Verabreichung ist unphysiologisch und setzt mit der Injektion einen, wenn auch kleinen, immunologischen Stimulus. Das subcutane Hautkompartiment ist reich an Makrophagen und Antigen präsentierenden Zellen. Darüberhinaus liegt das Insulin dort längere Zeit als Polymer vor, z.B. als Hexamer oder Dimer, wodurch die sterische Konformation mit Präsentation der antigenen Determinanten möglicherweise so verändert wird, daß es zur Induktion der Immunreaktion kommt (Airaghi et al., 2001; Kumar, 1997). Insbesondere die Antikörper-Antigen-Interaktionen sind konformationsabhängig, während die zelluläre Immunreaktion eher durch lineare Epitope nach Antigenprozessierung, koexprimiert mit MHC-Produkten u.a. auf Antigen präsentierenden Zellen, initiiert wird (Brostoff et al., 1991).

Das klinische Bild der Immunreaktionen unter exogener Insulintherapie hat sich in den letzten Jahrzehnten gewandelt. Während früher oft schwere Reaktionen durch die Verunreinigungen in den Präparationen beobachtet wurden und zudem die verwendeten tierischen Insuline relativ immunogen waren, hat nach der chromatografischen Aufreinigung der Insulinpräparationen ab den 70-iger Jahren und letztlich durch die gentechnische Herstellung des Humaninsulins die Häufigkeit der Immunreaktionen deutlich abgenommen (Federlin, 1985; Francis et al., 1985; Schernthaner, 1993). Trotzdem beobachtet man auch unter

Verwendung von Humaninsulin in vielen Fällen eine Insulin-Antikörperbildung der Klasse IgG, aber auch der Klasse IgE (Velcovsky & Federlin K, 1982).

Unterschieden werden zwei verschiedene Mechanismen bei den immunologisch vermittelten Komplikationen unter Insulintherapie: 1.) Die Bildung von Insulin spezifischen IgE-Antikörpern, verbunden mit lokalen Hautreaktionen und in Einzelfällen auch generalisierend bis zur Anaphylaxie. Es handelt sich um die klassische Insulinallergie vom Typ 1 nach Coombs und Gell, die im klinischen Erscheinungsbild jedoch immer von einer Reaktion gegen Inhaltsstoffe bzw. galenische Zusätze wie z.B. Protamin abzugrenzen ist. 2.) Die Bildung von Insulin spezifischen IgG-Antikörpern, die als neutralisierende Antikörper metabolisch signifikant Insulin binden bzw. neutralisieren und so zu einer instabilen Stoffwechsellage beitragen können durch die gestörte Insulinkinetik mit Insulin-Komplexbildung und häufig verzögerter Dissoziation (Federlin et al., 1971). In ganz seltenen Fällen treten beide Mechanismen bei einem Patienten gleichzeitig auf (s.a. 3.5.2).

Während die klassische Insulinallergie heute sehr selten ist, finden sich Insulin spezifische IgG-Antikörper relativ häufig. In einer Studie an 578 Patienten unter Insulintherapie mit Humaninsulin wurde nach 2 Jahren Therapie in über 50% der Fälle eine Bildung von Insulin spezifischen IgG-Antikörpern beobachtet (Scherthaner, 1993). Schon niedrige Titer von Insulin spezifischen Antikörpern gegen humanes rekombinantes Insulin können durch eine temporäre Neutralisierung des Insulins die Insulinprofile beeinflussen mit signifikanten metabolischen Konsequenzen wie instabile Stoffwechsellage oder Hypoglykämien (van Haeften et al., 1989; Francis et al., 1985).

Es bleibt jedoch festzuhalten, daß nicht in jedem Fall diese Insulin spezifischen IgG-Antikörper klinisch relevant sind, da das Bindungsverhalten aufgrund unterschiedlicher Antikörper-Aviditäten verschieden ausgeprägt sein kann und letztlich nur in wenigen Fällen eine klinisch relevante Insulinbindung mit schweren metabolischen Komplikationen resultiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben wir eine Methode zur Differenzierung des Bindungsverhaltens der Insulin spezifischen Antikörper adaptiert, modifiziert und einen standardisierten Algorithmus zu Diagnose und Management der heute immer noch relevanten immunologischen Komplikationen unter Insulintherapie etabliert.

1.3 Antikörper in der Diagnostik häufiger koinzidenter Erkrankungen

1.3.1 Autoantikörper bei den Autoimmun Polyglandulären Syndromen (APS)

Autoimmun Polyglanduläre Syndrome (APS) sind durch das gemeinsame Auftreten verschiedener Autoimmunerkrankungen gekennzeichnet, die vorwiegend endokrine Drüsen betreffen. Ursprünglich klassifiziert durch Neufeld (Neufeld et al., 1980) unterscheidet man die sehr seltene juvenile Form (APS Typ I, auch APECED-Syndrom), die sich im Kindes- und Jugendalter zumeist mit einer mukokutanen Candidiasis, dem idiopathischen Hypoparathyreoidismus und der Nebennierenrindeninsuffizienz manifestiert. Inzwischen konnte mittels Kopplungsanalysen der Gendefekt auf Chromosom 21 lokalisiert werden, es handelt sich um eine monogene Erkrankung (Nagamine et al., 1997). Das APS Typ I ist nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Hiervon unterschieden wird eine adulte Form (APS Typ II) mit multifaktorieller genetischer Grundlage (polygene Erkrankung), bei der das gemeinsame Auftreten einer Autoimmunthyreopathie (z.B. Hashimoto Thyreoiditis), die Nebennierenrindeninsuffizienz (M. Addison) und der Typ 1 Diabetes vorherrschend sind. Manchmal wird noch ein Typ III vom Typ II abgegrenzt, wenn keine Nebennierenrindeninsuffizienz, aber eine atrophe Autoimmungastritis (ggf. mit Perniciosa) vorliegt. Für das APS Typ II ist eine familiäre Häufung bekannt. Die Prävalenz wird mit 15-45 Erkrankungen pro Million Einwohner angegeben, Frauen sind 1.6-3mal häufiger betroffen als Männer. Die assoziierten Autoimmunopathien manifestieren sich zumeist mit Beginn des zweiten oder dritten Lebensjahrzehntes, können sich aber mit deutlich abfallender Tendenz noch bis ins sechste Lebensjahrzehnt ausbilden (Forster et al., 1999; Neufeld et al., 1980).

Die autoimmune Genese dieser Erkrankungen wurde auf die Beobachtung zurückgeführt, daß in den betroffenen Drüsen eine lymphozytäre Infiltration mit Zerstörung und konsekutivem Funktionsausfall des Organs gefunden wird, und parallel hierzu organspezifische Autoantikörper im Serum nachweisbar sind. Darüberhinaus besteht eine Assoziation mit definierten HLA DR/DQ Genen (Riley, 1992; Gambelungho et al., 1999).

Organspezifische Autoantikörper gegen die verschiedenen endokrinen Drüsen bieten nicht nur Einblicke in die Pathogenese der Erkrankungen und ermöglichen die Diagnose bei Funktionsstörungen des jeweils geschädigten Organs, sondern können auch in Risikopopulationen, vergleichbar dem Vorgehen beim Typ 1 Diabetes, zur Frühdiagnostik noch asymptomatischer Patienten herangezogen werden (Rabinowe & Eisenbarth, 1986; Bigazzi, 1990; Riley, 1992).

Als Risikopopulationen im Hinblick auf ein potentielles Autoimmun Polyglanduläres Syndrom müssen alle Patienten betrachtet werden, die bereits von einer endokrinen Autoimmunerkrankung betroffen sind. In Anbetracht der langen Zeitintervalle zwischen dem Auftreten der verschiedenen Endokrinopathien erscheint es sinnvoll, gezielt und regelmäßig nach weiteren Immunendokrinopathien zu suchen.

Das Spektrum der für die Autoimmun Polyglandulären Syndrome relevanten Autoantikörper ist breit. Der Typ 1 Diabetes ist u.a. mit den Autoantikörpern GADA, anti-IA-2-Ak, IAA und ICA assoziiert (s.a. 1.2.2). Bei der Hashimoto Thyreoiditis finden sich häufig Autoantikörper gegen Thyreoperoxidase und die weniger spezifischen Autoantikörper gegen Thyreoglobulin (Gilmour et al., 2000; Petri et al., 1991). Anti-Parietalzell-Ak und Nebennierenrinden-Ak sind signifikant assoziiert mit dem Auftreten einer atrophischen Autoimmungastritis bzw. eines Morbus Addison (Stewart et al., 1999; Volta et al., 1997; Weetman, 1995; Betterle et al., 1997; Yu et al., 1999). Diese Liste ließe sich noch deutlich erweitern, insbesondere bei differenzierter Betrachtung der jeweiligen molekularen Zielantigene, von denen fortlaufend neue identifiziert und charakterisiert werden, insbesondere als Komponenten innerhalb des Zytochrom-P450-Systems (u.a. 17 Alpha-Hydroxylase, 21-Hydroxylase) oder als Enzyme der Neurotransmittersynthese (u.a. aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase, Tryptophan-Hydroxylase). An dieser Stelle sei jedoch aus Platzgründen auf die einschlägige und weiterführende Literatur verwiesen (Übersicht in Vogel et al., 2002).

Unter Screening-Gesichtspunkten ist es wichtig, eine Indexerkrankung zu definieren, bei deren Auftreten nach weiteren, häufig koinzidierenden Erkrankungen, gesucht wird. Als Indexerkrankung kann sowohl die Hashimoto Thyreoiditis gewählt werden, als auch der Typ 1 Diabetes. Beide gehören zu den häufig vertretenen Entitäten innerhalb des APS Typ 2. Bei Auftreten eines M. Addison sollte in jedem Fall nach weiteren Autoimmunopathien gesucht werden, allerdings ist die Prävalenz des M. Addison so niedrig, daß er sich im Rahmen

größerer Screeningprogramme nicht als Indexerkrankung eignet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben wir den Typ 1 Diabetes als Indexerkrankung definiert, um nach weiteren Manifestationen eines APS Typ 2 zu suchen.

1.3.2 Antikörperdiagnostik der Zöliakie

Die Zöliakie ist eine Erkrankung des proximalen Dünndarms mit einem Zottenschwund der Dünndarmschleimhaut, die in der Regel sowohl morphologisch wie auch klinisch auf eine glutenfreie Diät anspricht. Beim klinischen Vollbild der Zöliakie stehen die Leitsymptome Gewichtsverlust, Durchfälle und ein Blähbauch als Ausdruck der Malabsorption im Vordergrund. Folgen dieser Malabsorption sind Defizienzen in verschiedenen Kompartimenten, die sich u.a. als Anämie, Osteoporose oder Wachstumsretardierung äußern kann. Als Spätfolgen ist eine erhöhte Inzidenz für Non Hodgkin Lymphome gesichert, insbesondere für das meist spät erkannte und schwer zu therapierende, T-Zell Lymphom des Dünndarms.

Besonders interessant im Zusammenhang mit den Fragestellungen der vorliegenden Arbeit, ist die Assoziation der Zöliakie mit dem Diabetes mellitus Typ 1. Eine manifeste Zöliakie findet sich bei 5% der Typ I Diabetiker, die Prävalenz Zöliakie assoziierter Antikörperphänomene wird von verschiedenen Arbeitsgruppen noch deutlich höher mit ca. 10-15% angegeben. Neueste Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Ziegler mit Ergebnissen aus der BABYDIAB Studie legen möglicherweise einen kausalen Zusammenhang frühkindlicher Glutenexposition mit der Entwicklung der Typ 1 Diabetes assoziierten AAK nahe, die als Surrogatmarker eng mit dem späteren Auftreten eines Autoimmundiabetes assoziiert sind (Ziegler et al., 2003).

Das klinische Erscheinungsbild der Zöliakie hat sich im letzten Jahrzehnt gewandelt. Seltener tritt das Vollbild mit massiven Durchfällen und Gewichtsverlust auf, wesentlicher häufiger sind die stillen oder oligosymptomatischen Formen, bei denen sich klinisch zwar eine abgeflachte Mucosa, aber nur gelegentlich eine Anämie, ein Eisenmangel oder eine Osteopenie findet (Caspary & Stein, 1999).

Die Primärdiagnostik insbesondere der asymptomatischen oder oligosymptomatischen Formen hat sich durch die Weiterentwicklung der serologische Antikörperbestimmung grundlegend gewandelt und zu einem neuen Verständnis der Erkrankung geführt. Seit Jahrzehnten wurde die Bestimmung von Gliadin-Ak eingesetzt, die jedoch eine unbefriedigende Sensitivität (ca. 65-90%) und Spezifität (70-95%) mit völlig unzureichenden Vorhersagewerten aufweisen.

Table 2 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Marker.

Serologischer Test	Sensitivität	Spezifität	positiver präd. Wert	negativer präd. Werte
Endomysium-IgA (ind. Immunfl.)	85-98	97-100	98-100	80-95
anti-huTransG-IgA (ELISA)	93	99	99	93
anti-Gliadin-IgG (ELISA)	69-85	73-90	20-95	41-88
anti-Gliadin-IgA (ELISA)	75-90	82-95	28-100	65-100

Tab. 2: Testspezifische Charakteristika der verschiedenen Zöliakie-assoziierten Antikörper (modifiziert nach Farrell & Kelly, 2002).

Später setzten sich die Endomysium-Ak mit hoher Sensitivität (ca. 95%) und hoher Spezifität (100%) und Vorhersagewerten zwischen 90-100% durch. Nachteil der Endomysium-Ak-Bestimmung ist jedoch der Nachweis mittels Immunfluoreszenz an Affenösofagusmuskulatur.

Vergleichbar der Situation bei den Inselzell-Antikörpern (s.a. 1.2.2) gab es intensive Bemühungen, das Zielantigen auf molekularer Ebene zu identifizieren, um dann über eine gentechnische rekombinante Herstellung zuverlässige Assaysysteme zu entwickeln. Der Berliner Arbeitsgruppe von Dr. W. Dieterich, Prof. Schuppan und Prof. Riecken gelang 1997 die Identifizierung des Enzyms Gewebstransglutaminase als das Zielantigen der

Endomysium-Ak (Dieterich et al., 1997). Diese stellen nun den Goldstandard in der Antikörperdiagnostik der Zöliakie dar.

In der Diagnostik der Zöliakie ist die Biopsie mit der Klassifikation nach MARSH immer noch der Goldstandard, wird aber insbesondere in den asymptomatischen oder oligosymptomatischen Stadien durch die neue Serodiagnostik ergänzt. Entsprechend dem sogenannten Eisberg-Konzept (Mäki & Collin, 1997) bestätigen die Antikörper die Diagnose bei positiver Biopsie (die prinzipiell mehrdeutig sein kann), definieren jedoch auch bei negativer Biopsie latente Stadien der Zöliakie, deren genauer klinischer Stellenwert einschließlich ihrer Prognose noch nicht abschließend beurteilt werden kann. Die Prävalenz aller Stadien zusammen wird heute in westlichen Ländern mit 1:300 angegeben und liegt damit ähnlich hoch wie die Prävalenz des Typ 1 Diabetes.

Abbildung 4 gibt eine Übersicht der verschiedenen Stadien der Zöliakie in Abhängigkeit vom Antikörperstatus, dem klinischen Bild und dem Biopsieergebnis, klassifiziert nach MARSH.

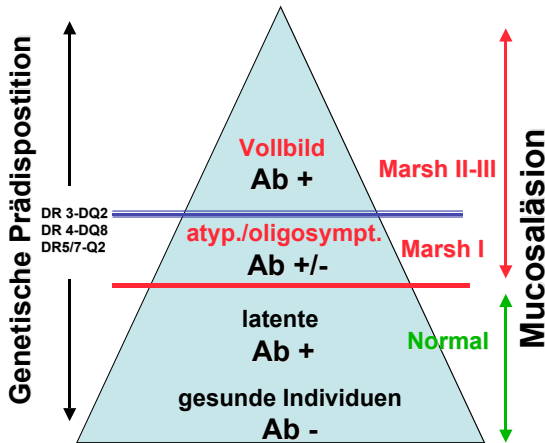


Abb. 4: Eisberg-Modell der Zöliakie, modifiziert nach Mäki & Collin, 1997. Dargestellt sind die verschiedenen Stadien der Zöliakie abhängig vom Ausmaß der Mucosaläsion, dem Antikörperstatus und dem klinischen Bild. Die blaue Linie symbolisiert die klinische Wahrnehmungsschwelle der typischen Zöliakie assoziierten Symptome.

1.4 Methodenkritik der Autoantikörperdiagnostik

Autoantikörper sind Immunglobuline, die gegen körpereigene Antigene (Autoantigene) gerichtet sind. Unabhängig von ihrer möglichen pathogenetischen Wirkung (z.B. bei den TSH-Rezeptor-Ak) kommt einer Vielzahl von Autoantikörpern eine große klinische Bedeutung in der Frühdiagnostik, Differentialdiagnostik und Prognostik von Autoimmunerkrankungen zu.

In den letzten Jahren ist es zu einer fast explosionsartigen Zunahme von Autoantikörperuntersuchungen gekommen. Dies birgt gewisse Gefahren. Zum einen ist bisher die Standardisierung der Autoantikörperbestimmung trotz vielfacher Bemühungen noch nicht auf dem Niveau der klinisch-chemischen Parameter, und es gibt kein offizielles Zulassungsverfahren für diagnostische Assaysysteme zur Sicherstellung etablierter Qualitätsstandards, vergleichbar z.B. der über BfArM regulierten Medikamentenzulassung. Dies führt dazu, daß die Qualität der auf dem Markt verfügbaren Assays sehr unterschiedlich ist. Zum anderen sind viele diagnostisch relevante Autoantikörper in ihrer Feinspezifität heterogen. Mit unterschiedlichen Assays werden daher häufig unterschiedliche Untergruppen von Autoantikörpern erfasst, d.h. die Ergebnisse bezüglich einer bestimmten Spezifität können je nach eingesetzter Methode differieren. Autoantikörperbefunde bedürfen daher immer einer besonderen Interpretation.

Zu fordern sind für die serologische Diagnostik Tests mit hoher Sensitivität und Spezifität (>95%), woraus sich dann brauchbare positive und negative Vorhersagewerte ableiten lassen. Bei der Festlegung der sogenannten Normbereiche (häufig erhoben an Blutspendern, die sensu stricto nur einer epidemiologischen Stichprobe entsprechen) ist jedoch zu beachten, daß Sensitivität und Spezifität invers korrelieren, und daher die Definition dieser Normbereiche immer einen Kompromiß darstellen (ggf. Optimierung über ROC-Plots), bezogen auf den individuellen Parameter und seinen geplanten Einsatz. Bei Screeninguntersuchungen ist das erklärte Ziel, möglichst vollständig alle Risikopersonen eines Kollektivs zu erfassen, der Test wird auf Kosten der Spezifität sehr sensitiv ausgelegt sein unter in Kaufnahme falsch positiver Ergebnisse. Erst mit einem zweiten Anschlußtest gelingt dann häufig die erforderliche Verbesserung der Spezifität. In der gezielten Diagnostik zur Bestätigung eines

klinischen Erkrankungsverdachts wird man dagegen primär eine hohe Spezifität fordern (auf Kosten der Sensitivität), um das Risiko falsch positiver Resultate zu minimieren.

Ein einfaches Rechenbeispiel soll verdeutlichen, daß vor allem bei seltenen Erkrankungen das Risiko der Fehlinterpretation groß ist. Bei Erkrankungen mit einer Prävalenz von 1:100.000 wird ein sehr guter Test mit einer Spezifität von 99%, d.h. ein Test, der mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:100 falsch positiv ist, häufig falsch und nur selten richtig positiv sein. Bei einer Sensitivität von 100% und einer ungezielten Anwendung im Rahmen von "Screening" wäre dieser Test nach 100.000 Proben 999mal falsch und nur einmal richtig positiv. Je mehr andere Parameter jedoch einbezogen werden (z.B. Kombination verschiedener Antikörperbefunde), desto günstiger wird die diagnostische Aussagefähigkeit der Autoantikörperbefunde.

Hinzu kommen in der Autoantikörperbestimmung methodenspezifische Besonderheiten. Es seien beispielhaft nur einige Aspekte genannt, die für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Parameter von Bedeutung sind. Die indirekte Immunfluoreszenz ist in besonderem Maße Untersucherabhängig und stellt oft nur einen Eingangstest als Screeningverfahren dar, da es Antikörperkombinationen erfäßt und nicht molekular identifizierte Autoantigene (z.B. ICA, s.a. 1.2.2). Für andere Parameter, wie z.B. die IAA, ist gezeigt worden, daß die ELISA-Technologie deutlich schlechter abschneidet als der kompetitive RIA mit 7 Tagen Inkubation (Kuglin et al., 1990). Für GADA und anti-IA-2-Ak gilt, daß die betreffenden Autoantigene z.B. beim klassischen "Coating" auf ELISA-Platten ihre native sterische Konformation ändern, und dann als lineare Epitope von den Autoantikörpern schlechter erkannt werden, so daß ein deutlicher Verlust an Sensitivität droht. Diese Parameter müssen daher in Flüssigphasenassays (meist als RIA) bestimmt werden.

Bei der Durchführung von Autoantikörperanalysen und deren Interpretation sollten daher drei Grundvoraussetzungen erfüllt sein:

- 1.) Die Bestimmungsmethode muß dem Parameter adäquat sein (z.B. keine Bestimmung von ICA auf Affenpankreas; keine Messung der IAA im ELISA; GADA oder anti-IA-2-Ak in Flüssigphasenassays; nach Möglichkeit Einsatz von hochreinen/rekombinant hergestellten Autoantigenpräparationen etc.).

- 2.) Die verwendeten Assays müssen qualitätskontrolliert sein in den entscheidenden Kategorien Sensitivität ("krank als krank erkennen"), Spezifität ("gesund als gesund erkennen"), Konsistenz ("Rate an Übereinstimmung bei Doppelbestimmung, intra-/inter-Assay-Varianz") und Validität (Testresultat außerhalb der 3. Standardabweichung vom Goldstandard). Dies setzt Ringversuche voraus mit internationalen Referenzseren, die jedoch bisher nur für wenige Autoantikörperspezifitäten verfügbar sind.
- 3.) Die Interpretation der Befunde sollte unter Kenntnis der methodischen Besonderheiten und unter Einbeziehung des klinischen Kontext erfolgen.

Im folgenden Abschnitt werden einige Aspekte zu den im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Autoantikörper-Assays skizziert. Genauere Einzelheiten sind den jeweiligen, im Anhang aufgeführten, Publikationen zu entnehmen.

Die Bestimmung der ICA erfolgte im Giessener Labor durch indirekte Immunfluoreszenz auf humanem Pankreas der Blutgruppe 0 in Doppelbestimmungen mit Titration bis zum Endtiter. In jedem Ansatz wird eine Positivkontrolle und mehrere Negativkontrollen mitgeführt. Die Positivkontrolle ist abgeglichen gegen ein internationales Referenzserum mit einem Titer von 20 JDFunits (Juvenile Diabetes Foundation Units), zur Verfügung gestellt durch die Immunology of Diabetes Society (IDS) und eingesetzt im Immunology of Diabetes ICA-Proficiency Program (IDW). Während der gesamten Zeit der Giessen-Bad Oeynhausen Familienstudie erfolgte die regelmäßige Teilnahme an den IDW Workshops (#3/5/7/9/11) zur Standardisierung der ICA. Die Ergebnisse lagen durchgehend bei 95-100% in den Kategorien Sensitivität, Spezifität, Konsistenz und Validität. Parallel hierzu wurde im Rahmen der ENDIT-Studie für die Screening und Rekrutierungsphase über regelmäßige Ringversuche mit Aussendung verblindeter Seren innerhalb des ENDIT-Studienverbundes die Qualität der ICA-Bestimmung sichergestellt.

Die IAA-Bestimmung erfolgte im kompetitiven RIA mit Inkubation der Proben über 7 Tage. Dieses Assayprinzip gilt als der Goldstandard (Kuglin et al., 1990) und wurde, wie die ICA, regelmäßig in den IDW-Workshops (#2/4/6) qualitätskontrolliert. Die Ergebnisse für Sensitivität, Spezifität, Konsistenz und Validität lagen, wie bei der ICA-Bestimmung, zwischen 95-100%. Neuere Entwicklungen zur IAA-Bestimmung sind Mikroassays (RIA) mit kurzer Inkubationszeit und geringem Probenvolumen (Naserke et al., 1998), die vergleichbare

Ergebnisse bringen. Die ersten Ringversuche lassen erwarten, daß dieses Assayprinzip die bisherige Bestimmungsmethode ablösen wird.

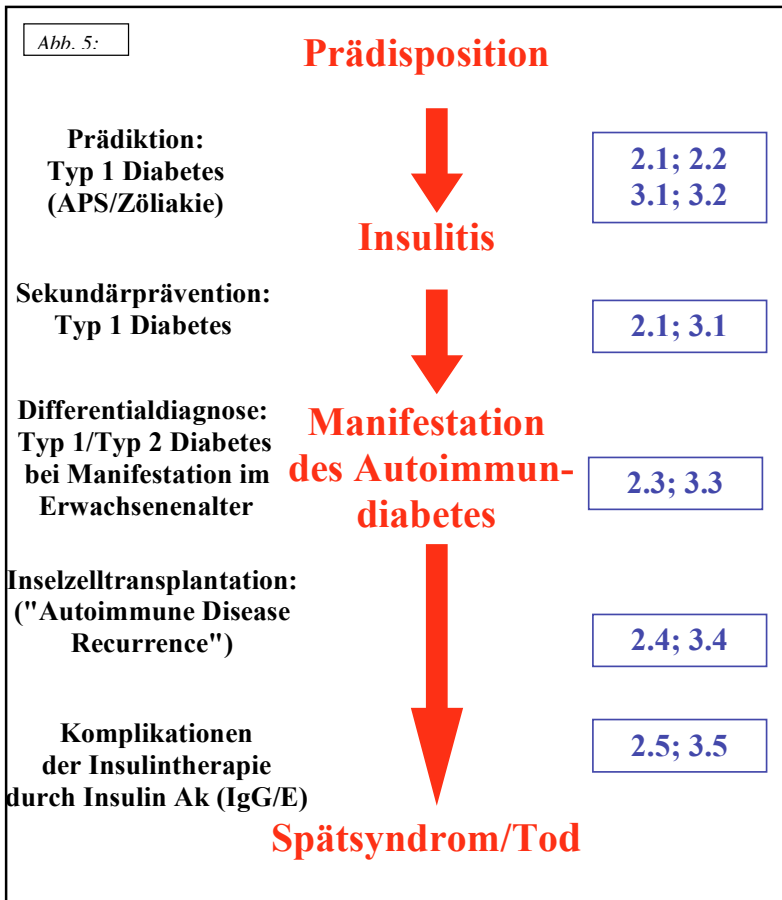
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zur Bestimmung der 64 K Ak zunächst der ursprünglich durch Christie (Christie et al., 1990) beschriebene Immunpräzipitationsassay mit Autoradiografie etabliert gemäß einer Modifikation durch Seissler (Seissler et al., 1992). Nach Identifikation der Glutamatdecarboxylase als Zielantigen der 64 K-Ak war dann zwischenzeitlich ein Radioimmunoassay durch Petersen und Dyrberg (Petersen et al., 1994) entwickelt worden. Während eines Forschungsaufenthaltes in der vorgenannten Arbeitsgruppe konnte die Technik durch den Autor adaptiert und im Giessener Labor etabliert werden. Für diesen Assay wird das Antigen rekombinant über eine Proteinexpression hergestellt. Ausgangsmaterial ist cDNA, kodierend für humane GAD 65, die über eine in vitro Transkription zu mRNA und nachfolgend durch in vitro Translation in Gegenwart von radioaktiv markiertem ³⁵S-Methionin zu radioaktiv markierter, humaner GAD 65 exprimiert wird. Patientenserum wird mit der markierten GAD 65 immunpräzipitiert (Füssigphasen-Assay) und dann an Protein-A-Sepharose adsorbiert, gefolgt von der Quantifizierung im Beta-Counter. Die anti-IA-2-Ak-Bestimmung folgt dem gleichen Prinzip. In den folgenden Jahren wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Medipan (Selchow, Deutschland) dieses Testprinzip in kommerziell verfügbare Assays für die Detektion von GADA und anti-IA-2-Ak nach dem IRMA-Prinzip umgesetzt. Diese Assays wurden im 1. Diabetes Autoantibody Standardization Program (DASP, Nachfolge der IDW-Workshops), veranlaßt durch die IDS in Zusammenarbeit mit den US-Amerikanischen Centres For Disease Control (CDC), evaluiert. Aufgrund des guten Abschneidens im DASP ist das Giessener Labor seit dem 17.04.2002 als Referenzlabor und Schulungslabor für die Bestimmung von anti-IA-2-Ak und GADA akkreditiert (Dr. C. Jaeger: CDC - 0136).

Zu den Einzelheiten der darüberhinaus im Rahmen der vorliegenden Untersuchung angewendeten Assays zur Detektion spezifischer Autoantikörper gegen Thyreoglobulin, Thyreoperoxidase, Nebennierenrinde, Parietalzellen, Gewebstransglutaminase-A sowie Gliadin IgG/IgA sei auf die Publikationen im Anhang verwiesen. Dies gilt im Besonderen für die Methodik der Insulin-Ak-Bestimmung (IgG/IgE) mit Analyse des Dissoziationsverhaltens bei der Entwicklung des Algorithmus zur Abklärung immunologischer Komplikationen unter Insulintherapie (s.a. 1.2.1 und 3.4).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß die hier zur Anwendung gekommenen Testsysteme den oben beschriebenen, spezifischen Anforderungen bei der Autoantikörperdetektion entsprechen. Die erzielten Ergebnisse bieten somit eine valide Grundlage für weiterführende Analysen und Interpretationen.

2 FRAGESTELLUNG DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN

Eine Übersicht über die Fragestellungen der eigenen Untersuchungen gibt *Abbildung 5*. Entlang des natürlichen Verlaufs der Erkrankung sind die für Antikörper- und Autoantikörperanalytik relevanten Themenfelder aufgelistet. Gegenübergestellt finden sich die Verweise auf die zugehörigen Kapitel mit Abhandlung der jeweiligen Fragestellungen.



2.1 Prädiktion und Prävention des Typ 1 Diabetes

Weltweit gesehen liegen die Länder mit der höchsten Inzidenz an Typ 1 Diabetes innerhalb Europas. Große epidemiologische Studien weisen einen jährlichen Anstieg der Inzidenz von 3-4% aus (EURODIAB ACE Study Group, 2000). In Finnland beobachtet man eine Vervierfachung der Prävalenz, verglichen mit den 50iger Jahren (Tuomilehto et al., 1999). Nach 20-25 Jahren Krankheitsdauer entwickeln ca. 50% der Typ 1 Diabetiker eine klinisch manifeste diabetische Nephropathie (Makroalbuminurie), nahezu 100% eine diabetische Retinopathie und ca. 40-70% eine Neuropathie. Hinzu kommt die ca. 15-fach erhöhte Amputationsrate aufgrund des diabetischen Fuß-Syndroms und die deutlich erhöhte kardiovaskuläre Mortalität (Bretzel, 2000).

Es liegt daher nahe, Anstrengungen zu unternehmen, den Typ 1 Diabetes im Stadium des Prädiabetes zu erfassen und Prädiktionsmodelle mit Blick auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit zu entwickeln. Auf der Basis einer gesicherten Voraussage der Erkrankungswahrscheinlichkeit kann dann therapeutisch interveniert werden mit dem Ziel einer Prävention des Typ 1 Diabetes. Auch der Blick auf die Folgekomplikationen bei manifestem Typ 1 Diabetes mellitus unterstreicht die Notwendigkeit, präventive Strategien im Sinne einer Primär- oder Sekundärprävention zu entwickeln, die potentiell kurativ sind.

Eine Prädiktion des Typ 1 Diabetes im Stadium des Prädiabetes ist prinzipiell möglich. Sie bietet sich insbesondere bei erstgradigen Verwandten von Typ 1 Diabetikern an, die bereits aufgrund des ähnlichen genetischen Hintergrundes ein erhöhtes Risiko (ca. 3-8%) für die Entwicklung des Typ 1 Diabetes aufweisen, und damit eine ideale Zielgruppe zur Etablierung von Prädiktionsmodellen darstellt. Vor Identifikation der GADA und anti-IA-2-Ak wurden bereits Prädiktionsmodelle auf Basis von ICA und IAA-Messungen beschrieben (Tarn et al., 1988; Bonifacio et al., 1990; Riley et al., 1990). Diese wurden jedoch meist innerhalb von Hochrisikokollektiven erarbeitet mit einem hohen Hintergrundrisiko entweder durch Präselektion für ICA-Positivität oder durch einen großen Anteil von Verwandten aus Multiplex-Familien (Familien mit mehr als einem Typ 1 Diabetiker) und überwiegender Rekrutierung von Geschwistern mit höherem Risiko verglichen mit Eltern. Diese Selektion der untersuchten Kollektive und die Beschränkung auf die Marker ICA und ggf. IAA

erschwerte die Verallgemeinerung der erarbeiteten Prädiktionsmodelle als Grundlage für weiterführende Interventionsstudien.

Ziel unserer Untersuchungen im Rahmen der Giessen-Bad Oeynhausen Familienstudie (1985-1997) war es, in einer prospektiven Studie ein möglichst präzises und differenziertes Prädiktionsmodell zur Risikostratifizierung noch gesunder Familienangehöriger von Patienten mit Typ 1 Diabetes zu erarbeiten. Im Unterschied zu früheren Untersuchungen handelt es sich bei der hier vorgestellten Studienpopulation um ein hinsichtlich der Altersstruktur typisch internistisches Probandenkollektiv (Eltern, Geschwister und Kinder von Typ 1 Diabetikern, überwiegend aus Simplex Familien) mit relativ niedriger Inzidenz und ohne Vorselektion für ICA-Positivität im Vergleich zu bisher überwiegend untersuchten Hochrisikokollektiven (ICA-Vorselektion, überwiegend Geschwister von Typ 1 Diabetikern, hoher Anteil aus Multiplex-Familien). Weiterhin sollten neben den bereits etablierten Markern ICA und IAA jetzt auch die neuen Autoantikörper GADA, anti-IA-2-Ak und verschiedene Kombinationen aller vier Autoantikörper auf ihren prädiktiven Wert hinsichtlich späterer Entwicklung eines Typ 1 Diabetes untersucht werden. Die erzielten Ergebnisse werden unter 3.1.1 dargestellt.

In einer gesonderten Querschnittsuntersuchung an Seren von 1436 erstgradigen Verwandten von Typ 1 Diabetikern (Giessen-Bad Oeynhausen Kohorte und ENDIT-Screeningpopulation s.u.), haben wir zur Untermauerung des Zwei-Schritt-Screeningmodells mit initialer GADA/anti-IA-2-Ak-Testung die Häufigkeitsverteilungen der AAK nochmals untersucht unter der Fragestellung, ob eine kombinierte GADA/anti-IA-2-Ak-Testung die initiale histochemische ICA-Testung beim Screening ersetzen kann. Die Ergebnisse sind unter 3.1.2 dargestellt.

Parallel hierzu wurden erste Versuche hinsichtlich einer Sekundärprävention des Typ 1 Diabetes unternommen. Sowohl im Tierversuch als auch in offenen, unkontrollierten Pilotstudien hatten sich Hinweise für eine potentiell erfolgreiche Prävention zum einen durch parenterale Insulingabe und zum anderen durch orale Verabreichung von Nikotinamid in hoher Dosis ergeben. Zur Überprüfung dieser beiden therapeutischen Ansätze wurde in den USA der DPT-1 (Diabetes Prevention Trial in Type 1 Diabetes) aufgelegt (DPT-Type 1 Diabetes Study Group, 2002) und in Europa die internationale Multicenter-Studie ENDIT (European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial) initiiert. Beide Studien hatten das Ziel, die spätere Entwicklung des Typ 1 Diabetes zu verzögern oder gar zu verhindern.

Im Zuge der ENDIT-Studie wurden in den Jahren 1992 - 2002 in Europa, Kanada und Texas (insgesamt 20 teilnehmende Nationen) mehr als 30.000 erstgradige Verwandte auf das Vorhandensein von ICA untersucht und ggf. in die prospektive plazebo-kontrollierte und doppelblind randomisierte Interventionsstudie ENDIT eingeschlossen. Neben den bereits innerhalb der Giessen-Bad Oeynhausener Familienstudie identifizierten Hochrisikopatienten wurden in Deutschland noch zusätzlich ca. 1200 weitere erstgradige Verwandte hinsichtlich einer möglichen Eignung für ENDIT gescreent und dann ggf. in die Studie aufgenommen. Die Ergebnisse der ENDIT-Studie, gewonnen in der Funktion als nationaler Studienkoordinator der deutschen Beteiligung, werden unter 3.1.3 dargestellt.

2.2 Frühdiagnostik häufiger koinzidenter Erkrankungen

Das Autoimmun Polyglanduläre Syndrom Typ 2 (APS Typ 2) wird dominiert durch das gemeinsame Auftreten von Typ 1 Diabetes, Autoimmunthyreoiditis, M. Addison und gelegentlich auch einer Autoimmungastritis. Es tritt familiär gehäuft auf mit einer Prävalenz von 15-45/Mio. Einwohner. Das APS Typ 2 kann sich inkomplett manifestieren, die einzelnen Komponenten können mit Latenzen von Jahrzehnten klinisch evident werden (s.a. 1.3.1).

Die klinischen Konsequenzen bei Koinzidenz dieser Erkrankungen liegen einerseits in den negativen Auswirkungen der jeweiligen einzelnen Erkrankung (Hyperglykämie, Hypothyreose, Hypocortizismus, Anämie), andererseits jedoch auch in den jeweiligen Wechselwirkungen wie beispielsweise die instabile Stoffwechsellage ("Brittle Diabetes") eines Typ 1 Diabetes durch Verlust der Gegenregulation beim M. Addison oder die Wechselwirkungen bei gleichzeitigem Vorliegen einer latenten Hypothyreose (Übersicht in Cooper, 2001). Die Früherkennung eines APS Typ 2 hat daher naheliegende therapeutische Konsequenzen. Sie liegen u.a. in einer frühzeitigen isohormonalen Therapie und Vermeidung von Komplikationen wie Hypothyreose, Addison-Krise oder Instabilität des koinzidenten Typ 1 Diabetes innerhalb des APS.

Unter Screening-Gesichtspunkten ist es wichtig, eine Indexerkrankung zu definieren, bei deren Auftreten nach weiteren Erkrankungen aus dem Formenkreis des APS Typ 2 gesucht wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben wir den Typ 1 Diabetes als Indexerkrankung definiert und bei den Teilnehmern der Giessen-Bad Oeynhausen Familienstudie sowohl die manifest an Typ 1 Diabetes erkrankten Indexpatienten als auch deren erstgradige Verwandte im Sinne einer Querschnittsuntersuchung auf das, für das APS Typ 2 relevante Autoantikörper-Spektrum untersucht. Unser Ziel war es, eine effiziente und rationale Screeningstrategie zur aktiven Fallfindung möglicher APS Typ 2 bei manifest erkrankten Typ 1 Diabetikern und ihren erstgradigen Verwandten abzuleiten. Der Einschluß der erstgradigen Verwandten erfolgte aufgrund der bekannten familiären Häufung des APS Typ 2 bei Familienangehörigen mit ähnlichem genetischen Hintergrund. (Forster et al., 1999; Neufeld et al., 1980). Die erzielten Ergebnisse werden unter 3.2.1 dargestellt.

Im Verlauf der Untersuchungen ergab sich eine Häufung von Schilddrüsen-Ak bei den erstgradigen Verwandten von Typ 1 Diabetikern. In einer anschließenden Längsschnittuntersuchung haben wir die TSH-Entwicklung bei 427 dieser erstgradigen Verwandten über 7 Jahre nachverfolgt, um die Frage einer möglichen Progression der Hashimoto Thyreoiditis mit Verschlechterung der Stoffwechsellage zu klären. Die Ergebnisse werden unter 3.2.2 dargestellt.

Eine weitere, häufig mit dem Typ 1 Diabetes koinzidierende Erkrankung ist die Zöliakie (s.a. 1.3.2). Die hohe Koinzidenz der Zöliakie bei Typ 1 Diabetikern wird neben anderen Faktoren auf einen ähnlichen genetischen Hintergrund beider Erkrankungen zurückgeführt (Cronin et al., 1997; Corazza & Gasbarrini, 1995; Houlston et al., 1997; Sollid et al., 1989). Die Wechselwirkungen bei gleichzeitigem Auftreten beider Erkrankungen liegen auf der Hand. Bei Typ 1 Diabetikern, die zugleich an Zöliakie leiden, ist mit häufigen Hypoglykämien, Durchfällen und instabilem Diabetes zu rechnen. Eine möglichst frühzeitige Diagnose ist Voraussetzung für eine gute Prognose der, durch glutenfreie Diät alleine, erfolgreich behandelbaren Zöliakie.

Ähnlich wie bei den Autoimmun Polyglandulären Syndromen liegt daher ein Zöliakie-Screening auf Basis der gut etablierten Antikörper (anti-transG-IgA, Gliadin IgG/IgA) nahe, um so eine Frühdiagnose der Zöliakie zu ermöglichen. Die Giessen-Bad Oeynhausener Familienstudie bietet sich für diese Untersuchungen an und ermöglicht es, die Prävalenz der Zöliakie assoziierten Antikörper bei den manifest erkrankten Typ 1 Diabetikern zu erfassen und gleichzeitig erstmalig die Häufigkeiten dieser Antikörper bei ihren erstgradigen Verwandten mit ähnlichem genetischen Hintergrund zu untersuchen. Darstellung der Ergebnisse unter 3.2.1.

2.3 Klassifikation des Diabetes mellitus mit Manifestation im Erwachsenenalter

Bereits kurz nach der Charakterisierung der GAD 65 Antikörper häuften sich Berichte über eine relativ hohe Prävalenz (10-15%) an positiven GADA-Befunde bei Patienten, die klinisch als Typ 2 Diabetiker imponierten. Der Begriff des LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adulthood) wurde eingeführt (Tuomi et al., 1993; Zimmet et al., 1994). Dieser impliziert eine autoimmune Genese mit Betazell-Zerstörung als wichtigen Mechanismus in der Pathogenese einer Subgruppe von Patienten mit Diabetesmanifestation im Erwachsenenalter, die rasch zur Insulinbedürftigkeit voranschreiten. Die damals gültige WHO-Klassifikation, die nicht ätiologisch ausgerichtet war, sondern auf der Differenzierung nach Insulinbedürftigkeit in IDDM und NIDDM beruhte, verlor durch diese Überlegungen zunehmend an Trennschärfe.

Seit 1992 werden Seren von Patienten mit Diabetesmanifestation jenseits des 30. Lebensjahres in unserer Serumbank gesammelt, die zum Zeitpunkt der Manifestation nach der damals gültigen WHO-Klassifikation als NIDDM (Typ 2 Diabetiker) zu klassifizieren waren. Nach der Etablierung des GADA-Assays in unserem Labor 1994 begannen wir eine systematische Analyse auf GADA und ICA sowohl der vorhandenen, als auch prospektiv neuer Seren aus dieser Patientengruppe. Ziel war es, die klinischen und immunologischen Parameter zu erfassen und mit der Dauer bis zum Eintritt einer Insulinbedürftigkeit im Sinne eines "Sekundärversagen" zu korrelieren, um so Hinweise für die vermutete autoimmune Genese bei sogenannten NIDDM-Patienten (Typ 2 Diabetiker) zu erhalten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse der 1996 durchgeführten Zwischenauswertung unter 3.3.1 vorgestellt.

2.4 Autoantikörper bei Inselzelltransplantierten Patienten mit Typ 1 Diabetes mellitus

Derzeit stellt sich die Indikation zur Inselzelltransplantation (ITX) aufgrund der nach ITX lebenslang notwendigen Immunsuppression nahezu ausschließlich bei Typ 1 Diabetikern mit chronischer Niereninsuffizienz und Dialysebehandlung, die auf ein Nierentransplantat warten oder bereits nierentransplantiert sind und aus diesem Grunde ohnehin immunsuppressiv behandelt werden müssen (Bretzel et al., 2001). Kürzlich wurde am Transplantationszentrum in Edmonton (Alberta, Kanada) eine Modifikation des bisherigen Inselzelltransplantationsverfahrens eingeführt, bei dem Typ 1 Diabetiker nach einem speziellen Protokoll ("Edmonton-Protokoll") transplantiert wurden, die noch keine Einschränkung der Nierenfunktion aufwiesen (Shapiro et al., 2000). Angeregt durch die Edmonton-Daten mit bisher unerreichten Raten an Inselzelltransplantatfunktion und Insulinunabhängigkeit wurde vor kurzem, finanziert unter dem Dach des neu etablierten internationalen "Immune Tolerance Network (ITN)", eine internationale Multicenterstudie aufgelegt (Teilnehmer: Edmonton, Miami, Minneapolis, St. Louis, Boston, Seattle, Giessen, Genf und Mailand), um die Wirksamkeit und Sicherheit des "Edmonton-Protokoll" zu überprüfen (Übersicht in Brendel et al., 2003).

Trotz großer Fortschritte im Bereich der klinischen Inselzelltransplantation bleibt jedoch ein grundsätzliches Problem bestehen. Die Allotransplantation Langerhansscher Inseln bei Patienten mit Autoimmundiabetes (Typ 1 Diabetes) bedeutet eine Reexposition des Empfängerorganismus gegen die ursprünglichen, den Autoimmunprozess auslösenden und perpetuierenden Autoantigene. Das Schicksal der transplantierten Inselzellen wird demnach bestimmt durch eine Kombination von unspezifischer Inflammation, spezifischer Alloreaktivität und der wiederkehrender Autoimmunität (Übersicht in Hering & Ricordi, 1999). Die potentielle Gefährdung der transplantierten Inselzellen durch "autoimmune disease recurrence" steht im Mittelpunkt der hier vorgestellten Untersuchungen. Sie ist in zahlreichen Tierversuchen belegt (u.a. Terada et al., 1988; Wang et al., 1988; Stegall et al., 1996; Bartlett et al., 1995). Einen Meilenstein in der Bearbeitung dieser Fragen im klinischen Setting stellt die Pankreastransplantation bei eineiigen Zwillingen durch Sutherland und Mitarbeiter dar. Das Pankreasspendertransplantat des nicht diabetischen Zwilling wurde vom Empfänger, dem an Typ 1 Diabetes erkrankten Zwilling, innerhalb weniger Wochen zerstört (Sibley et al.,

1985). Exemplarisch seien einige Arbeiten aus der klinischen Transplantation erwähnt, die ebenfalls eine wieder aufgetretene autoimmune Insulinitis sowohl nach Pankreastransplantation (Tyden et al., 1996; Braghi et al., 2000), als auch nach Inselzelltransplantation (Stegall et al., 1996) gezeigt haben.

Im derzeitigen Setting der Inselzelltransplantation erfolgt die Übertragung der Inseln zu einem relativ späten Zeitpunkt, viele Jahre nach Manifestation des Typ 1 Diabetes. Während die immunologische Charakterisierung des Prädiabetes und des Diabetes zum Zeitpunkt der Manifestation bereits weit vorangekommen ist, existieren nur wenig vergleichbare Daten zur immunologischen Charakterisierung der Langzeit-Typ 1 Diabetiker.

Autoantikörper stellen im Prädiabetes etablierte Surrogatmarker der gegen die Inseln gerichteten Autoimmunität dar. Ziel der hier vorgestellten Arbeiten war es daher, in Analogie zur Situation im Prädiabetes, die Generierung der Autoantikörper ICA, GADA und anti-IA-2-Ak bei Langzeit-Typ 1 Diabetikern vor- und nach Inselzelltransplantation zu untersuchen. Im speziellen interessierten hierbei die Prävalenz der AAK bei Langzeit-Typ 1 Diabetikern einschließlich der Untersuchung möglicher Ursachen für die Persistenz dieser Autoimmunphänomene sowie die Frage nach dem Einfluß einer Immunsuppression auf die AAK-Bildung. Von besonderem Interesse war dann die Frage, ob den AAK möglicherweise eine Indikatorfunktion für ein verkürztes Inselzelltransplantatüberleben zukommt, und sie daher möglicherweise für eine prognostische Stratifizierung herangezogen werden können. Die erzielten Ergebnisse werden unter 3.4.1-3 dargestellt.

2.5 Insulin-Antikörper als Ursache von Komplikationen unter Insulintherapie

Obwohl die immunologischen Komplikationen unter Insulintherapie nach Einführung der Humaninsuline in die Therapie insgesamt selten geworden sind, ist das Spektrum der möglichen Manifestationen breit. Eindrücklich und direkt richtungsweisend sind allergische Hautreaktionen unmittelbar nach der Insulininjektion. Diese müssen jedoch differenziert werden hinsichtlich einer klassischen "Insulinallergie" oder einer allergischen Reaktion gegen galenische Zusätze wie z.B. Protamin, Cresol etc. Ganz vereinzelt treten auch systemische Reaktionen im Sinne einer generalisierten Anaphylaxie auf.

In ihrer möglichen Kausalität vieldeutiger sind die Manifestationen potentieller immunologischer Komplikationen unter dem Bild der "schlechten BZ-Einstellung mit hohem HbA1c", der Insulinresistenz, häufiger nächtlicher Unterzuckerungen oder unter dem Bild des hochgradig instabilen, sogenannten "Brittle Diabetes". Hier ist die Differentialdiagnose sehr umfangreich. Nicht selten jedoch wird eine mögliche immunologische Ursache durch insulinbindende Antikörper überhaupt nicht mehr in die Differentialdiagnose einbezogen und folgerichtig daher übersehen. Eine Tatsache, die für den betroffenen Patienten von erheblicher Bedeutung sein kann.

Ein standardisiertes Vorgehen zur Differenzierung der genannten immunologischen Komplikationen ist essentiell bei der Diagnosefindung und notwendige Voraussetzung vor Einleitung spezifischer Therapiemaßnahmen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben wir einen Algorithmus zur systematischen Abklärung dieser immunologischen Komplikationen entwickelt, ergänzt um Vorschläge zur Therapie. Dieser Algorithmus wird unter 3.5.1 aufgeführt und erläutert. Im nachfolgenden Kapitel (3.5.2) werden die erzielten Ergebnisse bei vier repräsentativen Patienten mit immunologischen Komplikationen unter Anwendung dieses Algorithmus dargestellt.

3 DARSTELLUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE

3.1. Prädiktion und Prävention des Typ 1 Diabetes mellitus

Die im folgenden dargestellten Ergebnisse entstammen der ersten Zwischenauswertung (1997) der Giessen-Bad Oeynhausen Familienstudie, deren Koordination ich ab 1994 übernommen habe, und der internationalen Multicenter-Studie ENDIT, für die ich als Nationaler Studienkoordinator der deutschen Beteiligung ebenfalls seit 1994 tätig bin.

3.1.1 Die Giessen-Bad Oeynhausen Familienstudie

Ab 1985 wurden insgesamt 882 gesunde, erstgradige Familienangehörige aus 264 Familien mit mindestens einem bereits an Typ 1 Diabetes erkrankten Mitglied (Index-Patient) hinsichtlich einer späteren Diabetesentwicklung in regelmäßigen Abständen prospektiv untersucht, und Serumproben gewonnen, die zunächst auf ICA und IAA, nach 1994 und rückwirkend zusätzlich auf GADA und anti-IA-2-Ak untersucht wurden. Bei den Probanden handelte es sich um 485 Eltern (Alter im Median: 43 Jahre), 382 Geschwister (Alter im Median: 16 Jahre) und 15 Kinder (Alter im Median: 17 Jahre) von Patienten mit Typ 1 Diabetes. 44 Studienteilnehmer kamen aus Familien mit bereits mehr als einem erkrankten Mitglied, sogenannten Multiplex Familien im Unterschied zu Simplex Familien mit bisher nur einem erkrankten Mitglied. Der Beobachtungszeitraum betrug im Median 10.3 Jahre (Spanne 0.9-11.4 Jahre) und bis zur ersten Zwischenauswertung im Oktober 1997 hatten 16 Probanden einen Typ 1 Diabetes neu entwickelt. Im Rahmen der hier vorgestellten Analyse wurden die Serumproben verwendet, die bei Studieneintritt von den Probanden entnommen wurden.

Die Häufigkeit für ICA, IAA, GADA und anti-IA-2-Ak betragen 4.9%, 3.3%, 7.6% und 4.0%. Insgesamt waren 103 Probanden (11.6%) positiv für mindestens 1 AAK. Unter diesen Probanden wiesen 53 eine Positivität für genau 1 AAK auf, während 33 Probanden für 2 AAK-Spezifitäten und 17 Studienteilnehmer für 3 oder 4 AAK positiv waren. Bei kombinierter Analyse aller 4 AAK zusammen fiel auf, daß die Kombination von GADA und anti-IA-2-Ak über 93% der ICA-positiven Individuen mit ICA-Titern von 20 JDF oder mehr

erfaßte, ein Indiz dafür, daß die kombinierte Testung der molekular definierten Autoantigene die ICA-Testung ohne größeren Informationsverlust ersetzen kann (s.a. 3.1.2).

Während des Beobachtungszeitraums von über 12 Jahren entwickelten 16 Probanden neu einen Diabetes mellitus Typ 1. Die Zeit zwischen Studieneintritt bis zur Manifestation betrug im Median 3.4 Jahre (Spanne: 0.92 - 10.25). Innerhalb dieser Gruppe der neu manifestierten Patienten betragen die AAK-Häufigkeiten für ICA, IAA, GADA und anti-IA-2Ak 81%, 50%, 81% und 63%. Nur ein Proband war positiv für nur 1 AAK, 31% wiesen 2 AAK und 63% 3 oder 4 AAK auf. Auffällig war eine höhere Sensitivität für die Kombination von GADA mit anti-IA-2-Ak, mit der 94% der späteren Diabetesfälle richtig vorhergesagt werden konnten im Vergleich zu nur 81% bei alleiniger ICA-Testung. Auch dies unterstreicht die potentielle Überlegenheit eines GADA und anti-IA-2-Ak basierten Primär-Screenings.

Besonders von Interesse waren die Zielgrößen "Absolutes Erkrankungsrisiko" und "Relatives Erkrankungsrisiko", die Analyse von "Autoantikörperkombinationen" und die "Testung eines Zwei-Schritt-Screening-Modells" mit initialer GADA & anti-IA-2-Ak-Testung, gefolgt von ICA und IAA-Testung im zweiten Schritt.

Das "Absolute Erkrankungsrisiko" wurde mittels Life Table Analyse nach Kaplan & Meier abgeschätzt und mittels Log-Rank-Statistik nach Mantel auf signifikante Unterschiede überprüft. Das 5-Jahresrisiko bzw. 10-Jahresrisiko (positiver Vorhersagewert) wurde getrennt in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern in zunächst univariater Analyse ermittelt.

Tabelle 3 zeigt das 5-Jahres- bzw. 10-Jahresrisiko in Abhängigkeit von epidemiologischen Parametern (Herkunft aus Multiplex vs. Simplex-Familien, sowie Verwandtschaftsverhältnis zum Index-Patienten) und in Abhängigkeit verschiedener AAK-Konstellationen einschließlich des p-Niveaus für signifikante Unterschiede.

Tab. 3 Absolutes Erkrankungsrisiko in Abhängigkeit von familiärer Belastung, Verwandtschaftsgrad sowie verschiedenen Autoantikörperkonstellationen bei erstgradigen Verwandten von Typ 1 Diabetikern. Daten in Prozent (95% Konfidenzintervall). Kaplan-Meier-Analyse und Log-Rank-Vergleich.

Risikofaktor	5-Jahres- risiko	10-Jahres- risiko	p-Niveau
Familiäre Belastung			
Simplex	1.2 (0.5-1.9)	1.6 (0.8-2.5)	
Multiplex	2.3 (0-0.6)	4.6 (0-10.3)	<0.05 vs. Simplex
Verwandtschaftsverhältnis			
Elternteil	0.4 (0-1.3)	0.9 (0-2.3)	
Geschwister	2.5 (0.9-4.0)	2.9 (1.2-4.6)	<0.001 vs. Elternteil
Nachkomme	6.7 (0-19.5)	13.3 (0-30.9)	<0.001 vs. Elternteil
Gesamte Studienpopulation			
ICA positiv	23.3 (10.4-36.1)	37.2 (17.6-56.8)	<0.001 vs. ICA neg.
ICA < 20 JDFu	8.3 (7.0-9.6)	8.3 (7.0-9.6)	<0.001 vs. ICA neg.
ICA ≥ 20 JDFu	29.0 (12.7-45.3)	38.1 (19.4-56.9)	<0.001 vs. ICA neg.
GADA positiv	12.0 (4.0-19.8)	20.1 (9.3-30.8)	<0.001 vs. GAD neg.
IAA positiv	24.1 (8.2-40.0)	27.6 (11.0-44.1)	<0.001 vs. IAA neg.
anti-IA-2-Ak positiv	25.7 (10.9-40.5)	29.4 (13.6-45.2)	<0.001 vs. IA-2 neg.
1 Ak positiv	kein Diabetes	2.1 (0-4.3)	<0.05 vs. Ak neg.
2 Ak positiv	18.2 (9.1-27.3)	24.6 (11.2-38.0)	<0.001 vs. Ak neg.
3 oder 4 Ak positiv	54.8 (32.7-76.9)	64.3 (41.1-87.5)	<0.001 ns. Ak neg.
Geschwister und Kinder			
ICA positiv	32.1 (14.5-49.8)	41.3 (21.8-60.8)	<0.001 vs. ICA neg.
ICA ≥ 20 JDFu	41.0 (19.9-61.9)	52.2 (30.0-74.5)	<0.001 vs. ICA neg.
GADA positiv	8.3 (7.1-9.5)	25.6 (11.4-39.8)	<0.001 vs. GAD neg.
IAA positiv	31.8 (11.9-51.7)	36.3 (15.8-56.9)	<0.001 vs. IAA neg.
anti-IA-2-Ak positiv	40.9 (19.9-61.8)	46.8 (24.9-68.8)	<0.001 vs. IA-2 neg.
1 Ak positiv	kein Diabetes	kein Diabetes	
2 Ak positiv	20.4 (9.1-31.7)	31.2 (18.4-44.1)	<0.001 vs. Ak neg.
3 oder 4 Ak positiv	64.3 (38.7-89.9)	74.0 (50.3-98.6)	<0.001 vs. Ak neg.

Mit Hilfe des Cox Proportional Hazards Model wurde in einem zweiten Schritt in multivariater Analyse das "Relative Erkrankungsrisiko" ermittelt. Dies hat den Vorteil einer gleichzeitigen Einbeziehung mehrerer Risikofaktoren in die Risikoabschätzung bei verschiedensten Risikofaktorkonstellationen und vermittelt einen guten Eindruck über unterschiedliche Gewichtungen der einzelnen Risikofaktoren.

Table 4 listet das relative Erkrankungsrisiko auf.

Risikofaktor	relatives Risiko	p-Niveau
Modell 1: Gesamte Studienpopulation		
familiäre Belastung	16.1 (2.5-105.6)	<0.01
Geschwister/Kinder	3.8 (1.2-16.3)	<0.05
ICA positiv	15.2 (2.8-82.1)	<0.01
GADA positiv	9.2 (1.9-44.4)	<0.01
IAA positiv	4.9 (1.4-16.4)	<0.01
anti-IA-2-Ak positiv	4.3 (1.4-13.5)	<0.05

Modell 2: Geschwister/Kinder	relatives Risiko	p-Niveau
familiäre Belastung	18.6 (2.4-142.1)	<0.01
ICA positiv	15.6 (2.0-121.1)	<0.01
anti-IA-2-Ak positiv	11.4 (2.5-52.3)	<0.01
IAA positiv	5.2 (1.5-18.4)	<0.05
GADA positiv	4.0 (0.9-17.8)	<0.05

Tab.4 Multivariate Analyse des relativen Erkrankungsrisikos in Abhängigkeit verschiedener Risikofaktoren. Analyse mittels Cox Proportional Hazards Model. Zur Verdeutlichung sollen zwei Auswertungsbeispiele angeführt werden. Beispiel 1: Ein Proband, der ICA-positiv ist, hat ein 15.2-fach erhöhtes Risiko (Modell 1), verglichen mit einem ICA-negativen Proband bei sonst gleichen Variablen. Beispiel 2: Ein Geschwister (Modell 2), der GADA, anti-IA-2-Ak und ICA positiv ist, hat ein $4.0 \times 11.4 \times 15.6 = 711$ -fach erhöhtes Erkrankungsrisiko im Vergleich zu einem AAK-negativen Geschwister.

Betrachtet man "Autoantikörperkombinationen", findet sich als zentrales Ergebnis eine hoch signifikante Korrelation ($p < 0.001$) zwischen einer steigenden Anzahl positiver Autoantikörperbefunde und einem zunehmenden Erkrankungsrisiko. Keiner der Autoantikörper negativen Probanden entwickelte einen Typ 1 Diabetes. Im Vergleich hierzu betrug das 10-Jahresrisiko in der Gruppe der Geschwister und Kinder mit 3 oder 4 positiven Autoantikörperbefunden 74% (95% KI: 50.3-98.6).

Eine Screeningstrategie mit kombinierter Testung auf GADA & anti-IA-2-Ak im ersten Schritt mit nachfolgender Testung positiver Probanden auf ICA und IAA im 2. Schritt erlaubt eine Risikoabschätzung bereits im 5-Jahreszeitraum von bis zu 67% (95%-KI: 39-90).

Abbildung 6 zeigt die Überlebenskurven ohne Diabetes in Abhängigkeit von der Anzahl positiver AAK-Befunde unter Verwendung des Zwei-Schritt-Screening-Modells.

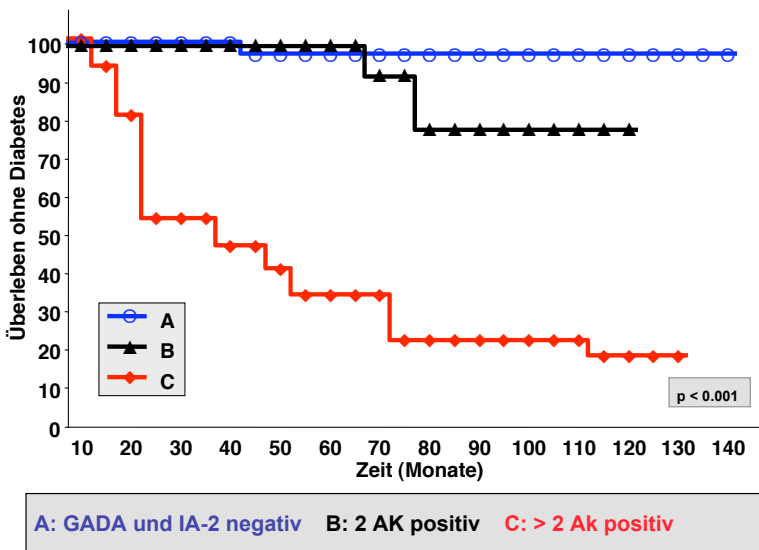


Abb. 6: Life-Table-Analyse des Diabetesfreien Überlebens in Abhängigkeit vom Autoantikörperstatus bei Screening nach dem Zwei-Schritt-Modell mit initial kombinierter GADA/anti-IA-2-Ak-Testung und Nachtestung positiver Individuen auf ICA und IAA. In der Gruppe mit >2 positiven AAK erkrankten 3 von 4 Probanden innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 10 Jahren manifest an einem Typ 1 Diabetes.

Zusammenfassend läßt sich folgendes festhalten: Das Erkrankungsrisiko für die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes bei erstgradigen Familienangehörigen betroffener Patienten steigt signifikant mit der Anzahl der positiven Autoantikörperbefunde ($p < 0.001$). Angehörige aus Multiplex Familien haben ein signifikant höheres Erkrankungsrisiko als Familienangehörige aus Simplex Familien ($p < 0.05$). Eltern haben ein signifikant geringeres Erkrankungsrisiko als Geschwister und Kinder von Typ 1 Diabetikern ($p < 0.05$). Die vorgeschlagene Screening-Strategie mit initialer Testung auf GADA und anti-IA-2-Ak mit Nachttestung positiver Probanden für ICA und IAA löst die methodischen Probleme großer Testreihen für ICA und IAA, da nur die im ersten Schritt positiven Probanden auf ICA/IAA nachgetestet werden müssen. Dieses Screening-Modell verbindet eine hohe Sensitivität (94% der später tatsächlich erkrankten Individuen wurden erkannt) mit einer 5-Jahres-Risikoabschätzung für die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes von bis zu 67%. Es wird damit die Voraussage ermöglicht, daß 2 von 3 Probanden innerhalb eines 5-Jahreszeitraums einen Typ 1 Diabetes entwickeln werden, wenn im Serum 3 oder 4 Autoantikörper positiv sind.

Die frühen Studien zur Prädiktion des Typ 1 Diabetes (Tarn et al., 1988; Bonifacio et al., 1990; Riley et al., 1990) basierten auf den zu der damaligen Zeit verfügbaren ICA und IAA-Bestimmungen. Die Kohorten bestanden überwiegend aus Hochrisikokollektiven mit hohem Hintergrundrisiko entweder durch Präselektion für ICA-Positivität oder durch einen großen Anteil von Verwandten aus Multiplex-Familien und überwiegender Rekrutierung von Geschwistern mit höherem Risiko verglichen mit Eltern. Einige dieser Kohorten wurden dann bei Verfügbarkeit von Seren für GADA und anti-IA-2Ak nachuntersucht, wobei sich sehr hohe Prädiktionsniveaus ergaben. So z.B. in der Bart-Windsor Studie, in der bei Nachttestung ein 5-Jahresrisiko von 88% bei drei oder mehr positiven AAK gefunden wurde (Bingley et al., 1994). Eine andere Studie aus Denver vom Barbara Davis Center ergab 100% Prädiktion bei 3 positiven Autoantikörpern unabhängig von ICA (Verge et al., 1996). Diese hohen Prädiktionsniveaus unterliegen dem Bias der Vorselektion der Ausgangskollektive und stellen somit keine verlässliche Grundlage für die Planung prospektiver Präventionsstudien dar. Sowohl während der DENIS-Studie (Lampeter et al., 1998), als auch in der ENDIT-Studie (Gale EAM, persönliche Mitteilung, Publikation in Vorbereitung) fand sich eine niedrigere Diabetesinzidenz und ein niedrigeres Prädiktionsniveau als aus den vorgenannten (jedoch vorselektierten) Prädiktionsstudien zu erwarten gewesen wäre.

Diese eingeschränkte Beurteilbarkeit der vorgenannten Studien waren der Ausgangspunkt unserer 1997 durchgeführten Zwischenanalyse der Giessen-Bad Oeynhausen Familienstudie, deren Kohorte nicht für ICA-Positivität vorselektiert ist und von einem eher niedrigen Hintergrundrisikos durch niedrigen Anteil an Multiplex-Angehörigen und hohem Anteil an Eltern von Typ 1 Diabetikern ausgeht. Die von uns gewonnenen Ergebnisse werden bestätigt u.a. durch die Schwabinger Kohorte, die bei Vorliegen von 3 oder mehr Autoantikörpern ein nahezu identisches 5-Jahresrisiko von 64% beschreibt (Roll & Ziegler, 1997), welches ebenfalls deutlich niedriger liegt im Vergleich zu den vorgenannten 88% vs. 100%.

Eine korrekte Risikoabschätzung ist für die Planung und Durchführung prospektiver Präventionsstudien unabdingbar, die Implikationen für die Berechnung des Umfangs der Screeningpopulationen, Abschätzung der Rekrutierungsraten, statistische Annahmen bei der Definition der H0 und H1-Hypothesen etc. sind naheliegend. Exakte und differenzierte Risikoabschätzungen der Erkrankungswahrscheinlichkeiten, wie die von uns im Rahmen der Giessen-Bad Oeynhausen Familienstudie erarbeiteten Prädiktionsmodelle, bieten die notwendige Voraussetzung für zukünftige Studien zur Prävention des Typ 1 Diabetes.

Ein weiteres zentrales Ergebnis der Giessen-Bad Oeynhausen Familienstudie war der Nachweis, daß eine Zwei-Schritt-Screening Strategie mit initialer Testung auf GADA und anti-IA-2-Ak und Nachttestung nur der positiven Probanden für ICA und IAA keinen signifikanten Informationsverlust, sondern tendentiell eine Verbesserung der Sensitivität und des Vorhersagewertes erbringt. Unabhängig hiervon ermöglicht erst dieses Vorgehen einen breiten Einsatz dieser Parameter auf Populationsebene bedingt durch die methodischen Schwierigkeiten insbesondere der ICA-Testung (s.a. 1.2.2 und 1.4). Die Ergebnisse aus der Giessen-Bad Oeynhausen Familienstudie werden u.a. bestätigt durch zwei vergleichbare Untersuchungen (Dittler et al., 1998; Seissler et al., 1996). Eine noch differenziertere Betrachtungsweise gelingt durch zusätzliche Analyse der IgG-Subklassen, durch die ein 5-Jahres-Prädiktionsniveau von bis zu 89% in bestimmten Konstellationen erreicht werden kann (Achenbach et al., 2004). Ob dieses Vorgehen in die Routine Eingang finden wird, bleibt allerdings abzuwarten.

Neben anderen Untersuchungen hat die Evidenz aus den genannten Studien zu den gleichlautenden "Empfehlungen zum praktischen Vorgehen bei der Untersuchung von

Risikogruppen zur Frühdiagnostik des Typ 1 Diabetes" geführt (Ziegler & Scherbaum, in Mehnert Standl Usadel (Hrsg) Diabetologie in Klinik und Praxis, 4. Auflage, 1999).

3.1.2 Vergleich der ICA vs. komb. GADA/anti-IA-2Ak-Testung

Der Ersatz einer initialen ICA-Testung durch kombinierte GADA/anti-IA-2-Ak-Bestimmung beim Screening von Risikopopulationen ist in vielerlei Hinsicht attraktiv. Hierbei sind besonders methodische Probleme bei der ICA-Bewertung zu nennen wie die Untersucherabhängigkeit, schwierige Standardisierung sowie die Tatsache, daß die Methode der indirekten Immunfluoreszenz nicht für große Probenaufkommen geeignet ist (s.a. 1.2.1 und 1.4). Die Entwicklung zuverlässiger Testsysteme auf Basis rekombinanter GAD 65 und IA-2 hat hier große Fortschritte gebracht. Hinzu kommt jedoch das grundsätzliche Problem, daß bei Manifestation des Typ 1 Diabetes ca. 20-30% der Patienten ICA-negativ sind, und eine Screeningstrategie, basierend auf initialer ICA-Testung, diese ICA-negativen Risikoprobanden nicht erfassen wird. Der Stellenwert einer kombinierten GADA/anti-IA-2-Ak-Testung anstelle einer ICA-Testung soll nachfolgend im direkten Vergleich kritisch bewertet werden.

Die hier vorgestellte Analyse vergleicht die Prävalenzen von ICA, GADA und anti-IA-2-Ak in einem großen Kollektiv erstgradiger Verwandter von Typ 1 Diabetikern. Die Serumproben der Familienangehörigen von Typ 1 Diabetikern aus der Giessen-Bad Oeynhausen Familienstudie (n=882) wurden hierzu mit den ca. 600 Serumproben aus dem ENDIT-Screeningprogramm zusammengefaßt, und die ICA, GADA und anti-IA-2-AK-Daten analysiert. Zunächst interessierte die Prävalenz in Abhängigkeit vom Alter.

Tabelle 5 gibt eine Übersicht. Auffällig ist, daß bei einer mittleren Häufigkeit der ICA von 6.8% die Prävalenz mit steigendem Lebensalter abnimmt. Die GADA zeigen eine Prävalenz von durchschnittlich 9.4% mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 20.-40. Lebensjahr. Im Vergleich hierzu liegt die anti-IA-2-Ak-Prävalenz mit im Mittel 3.6% am niedrigsten mit einem relativen Häufigkeitsgipfel im jugendlichen Alter. Diese Ergebnisse bestätigen zahlreiche bereits publizierte Daten (Übersicht in Ziegler & Scherbaum, 1999).

Alter der Probanden	ICA		GADA		anti-IA-2-Ak	
	n	%	n	%	n	%
0-9 (n=267)	30	11.2	22	8.2	14	5.2
10-19 (n=356)	44	12.4	28	7.9	15	4.2
20-29 (n=175)	12	6.8	23	13.1	8	4.6
30-39 (n=230)	4	1.7	32	13.9	7	3.0
≥ 40 (n=408)	8	2.0	30	7.4	8	2.0
Gesamt (n=1436)	98	6.8	135	9.4	52	3.6

Tab. 5 Prävalenz der Autoantikörper in Abhängigkeit vom Probandenalter bei n=1436 erstgradigen Verwandten von Patienten mit Typ 1 Diabetes.

Aus der unterschiedlichen Häufigkeitsverteilung der GADA (hohe Prävalenz in höherem Lebensalter) in Kombination mit anti-IA-2-Ak (hohe Prävalenz in jugendlichem Alter) resultiert jedoch möglicherweise der günstige synergistische Effekt bei kombiniertem Screening. Hinzu kommt, daß aus Untersuchungen bei frisch manifestierten Typ 1 Diabetikern bekannt ist, daß die GADA eine hohe Sensitivität bei relativ schlechter Spezifität aufweisen, die anti-IA-2-Ak jedoch genau umgekehrt eine sehr hohe Spezifität bei niedrigerer Sensitivität zeigen. Solch eine Kombination ist gerade unter Screening-Gesichtspunkten sinnvoll (s.a. unter 1.4).

Bei der Analyse der Häufigkeiten für ICA, GADA und anti-IA-2-Ak einschließlich des gemeinsamen Auftretens ergab sich folgende Verteilung: Insgesamt 181 Probanden wiesen mindestens einen der drei AAK auf. Die Seren von 105 Probanden waren für genau 1 AAK positiv, 48 Probanden waren positiv für 2 AAK und 28 für alle drei AAK.

Abbildung 7 zeigt die Verteilung. Unter den 181 AAK positiven Probanden wiesen nur 25 (14%) ausschließlich ICA auf. Bei der genaueren Analyse dieser Probanden fiel auf, daß es sich hierbei um Seren mit niedrig titrigen ICA (5 bzw. 10 JDFu) handelte.

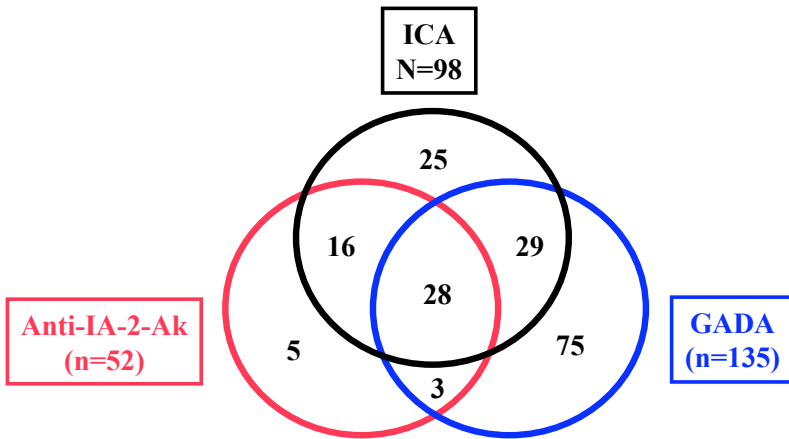


Abb. 7: Darstellung der Häufigkeiten für ICA, GADA und anti-IA-2-Ak sowie gleichzeitiges Auftreten mehrerer AAK bei 181 Probanden mit mindestens einem positiven AAK (Ausgangspopulation n=1436 erstgradige Verwandte von Typ 1 Diabetikern). Die Anzahl der Probanden mit mehrfach positiven AAK-Befunden sind den jeweiligen Schnittmengen zu entnehmen.

Aus der Literatur ist bekannt, daß insbesondere die hoch titrigen ICA mit einem hohen Erkrankungsrisiko assoziiert sind (Bonifacio et al., 1990; Bonifacio et al., 1995; Bingley et al., 1994). Die Ergebnisse der Giessen-Bad Oeynhausen Familienstudie unterstreichen dies (s.a. 3.1.1). Darüberhinaus konnte dort gezeigt werden, daß bei kombinierter GADA/anti-IA-2-Ak-Testung 93% der ICA mit 20 JDFu oder mehr erkannt wurden im Vergleich zu 62% der ICA mit nur 5 bzw 10 JDFu ($p < 0.05$).

In einer abschließenden Bewertung bleibt festzuhalten, daß beim Risikoscreening erstgradiger Verwandter von Typ 1 Diabetikern die initiale ICA-Testung durch eine kombinierte GADA/anti-IA-2-Ak-Bestimmung ersetzt werden kann. Dieses Vorgehen erfaßt den weit überwiegenden Teil der relevanten Zielgruppe (Probanden mit ICA von 20 JDFu oder mehr) und darüberhinaus potentiell ICA negative Probanden mit ebenfalls erhöhtem Diabetesrisiko. Durch eine Nachtstellung positiver Probanden auf ICA und IAA, wie im vorausgegangenen Kapitel vorgeschlagen, kann anschließend der positive prädiktive Wert

hinsichtlich einer Risikoabschätzung der späteren Erkrankungswahrscheinlichkeit noch weiter verbessert werden.

Weiter gestützt wird diese Einschätzung durch vergleichbare Untersuchungen in anderen Kollektiven (frisch manifestierte IDDM-Patienten, Patienten mit anderen organspezifischen Erkrankungen einschließlich APS-Patienten). Auch hier erscheint die histochemische ICA-Messung ersetzbar durch eine kombinierte GADA/anti-IA-2-Ak-Testung, die einen Großteil der ICA-Reaktivität ausmacht (Wiest-Ladenburger et al., 1997).

3.1.3 Die ENDIT-Studie

Präventive Maßnahmen können auf verschiedene Verlaufsstadien einer Erkrankung Einfluß nehmen. Man unterscheidet zwischen Primärprävention, Sekundärprävention und Tertiärprävention, dies je nach Stadium der Erkrankung und Beginn der präventiven Maßnahmen.

Abbildung 8 verdeutlicht die verschiedenen Präventionsstrategien bezogen auf den Typ 1 Diabetes mellitus.

Vor dem Hintergrund der heute bekannten Autoimmungese des Typ 1 Diabetes mit Destruktion der Betazellen, zielt die Primärprävention im Sinne eines kurativen Ansatzes auf die Verhinderung der Initiierung des Autoimmungeschehens. Eine grundsätzliche Voraussetzung bei allen primärpräventiven Maßnahmen ist die Notwendigkeit, krankheitsauslösende Ursachen oder Risikofaktoren identifiziert zu haben. Dies ist für den Typ 1 Diabetes noch nicht gewährleistet, so daß die bisherigen Studien mit primärpräventivem Ansatz ihre Rationale im wesentlichen aus epidemiologisch gefundenen Assoziationen beziehen. Als aktuelles Beispiel sei auf die aus der BABYDIAB-Studie der Münchener Arbeitsgruppe um Frau Prof. Ziegler stammende These einer Assoziation von früherer Glutenexposition mit dem Auftreten von IAA, ICA, GADA und anti-IA-2Ak verwiesen (Ziegler et al., 2003). Als Konsequenz aus diesen Ergebnissen wurde kürzlich in München die BABY-DIÄT Studie aufgelegt, die prospektiv der Frage nachgeht, ob eine Glutenfreie Diät während der ersten Lebensmonate zu einer Reduktion der AAK und konsekutiv des Auftretens eines Typ 1 Diabetes führt. Definitive Fortschritte in der

Primärprävention sind wahrscheinlich erst dann zu erwarten, wenn die auslösenden Ursachen und Risikokonstellationen des Typ 1 Diabetes besser verstanden sind.

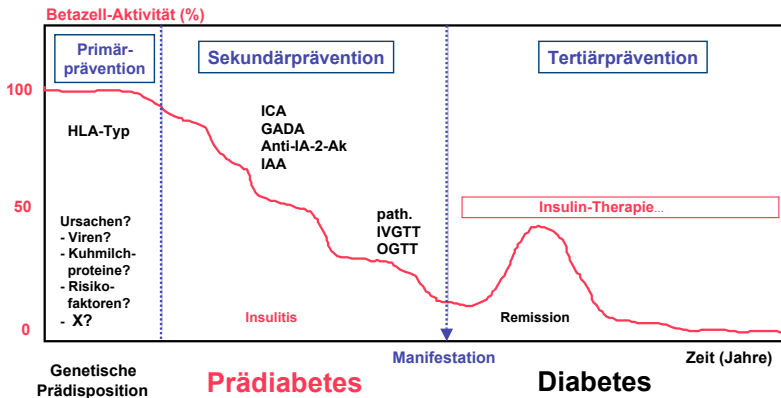
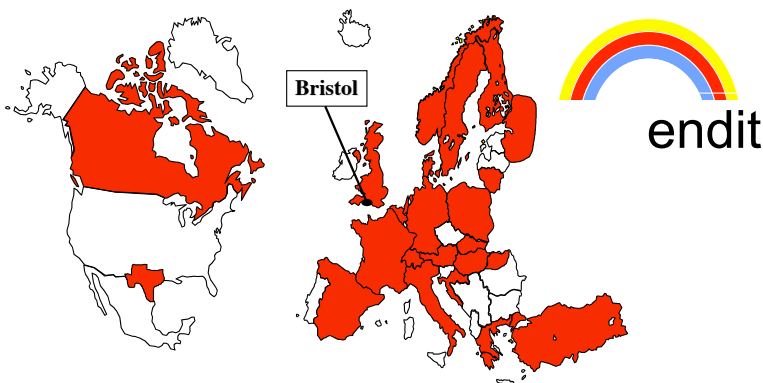


Abb. 8: Unterschiedliche Strategien zur Prävention des Typ 1 Diabetes in verschiedenen Stadien der Erkrankung.

Bei der Sekundärprävention ist der Autoimmunprozeß bereits etabliert, es ist jedoch noch nicht zur klinischen Manifestation des Diabetes gekommen. Voraussetzungen für eine erfolgreiche Sekundärprävention sind ein langes präklinische Stadium und akurate Tests zur Frühdiagnose. Beide Voraussetzungen sind beim Typ 1 Diabetes erfüllt. Das lange präklinische Stadium kann 10 Jahre und mehr andauern, und die inzwischen etablierten Prädiktionsmodelle (s.a. 3.1.1) erlauben eine frühzeitige Diagnose des ablaufenden Autoimmungeschehens. Hierdurch ist eine Selektion von Hochrisikokollektiven möglich, in denen eine Sekundärprävention versucht werden kann.

Die beste Evidenz hinsichtlich einer potentiell erfolgreichen Sekundärprävention lag für Insulin und Nikotinamid vor und stammte aus Tierversuchen, kleinen Pilotstudien sowie großen unkontrollierten Untersuchungen. In den USA prüft der Diabetes Prevention Trial in Type 1 Diabetes (DPT-1) die parenterale und orale Applikation von Insulin in AAK positiven Risikokollektiven. Die Ergebnisse des parenteralen Studienarmes liegen bereits vor, die

parenterale Insulingabe hat zu keiner signifikanten Reduktion der Diabetesinzidenz geführt (DPT-Type 1 Diabetes Study Group, 2002). Die Ergebnisse des oralen Studienarmes stehen noch aus.



European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial

Abb. 9: Übersichtsdarstellung der teilnehmenden Länder am European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT)

Die ENDIT-Studie (European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial) hat die Sekundärprävention des Typ 1 Diabetes durch orale Hochdosis-Nikotinamid-Applikation überprüft. Die Rationale für den Einsatz von Nikotinamid hatte sich aus in vitro-Untersuchungen, Tiermodellen und Pilotstudien ergeben (Übersicht in Gale, 1996). Die Planungen der ENDIT-Studie begannen Anfang der 90-iger Jahre. Es handelt sich um eine prospektive, doppelblind, plazebokontrollierte und randomisierte Interventionsstudie. Insgesamt 20 Länder nahmen teil (Abbildung 9). Sitz der Studienleitung war zunächst London, später Bristol mit Prof. E. Gale und Dr. P. Bingley. In jedem der angeschlossenen Länder wurde eine nationale Studienleitung mit einem verantwortlichen Studienkoordinator etabliert, der auf nationaler Ebene die korrekte Durchführung von ENDIT sicherstellte. In Deutschland erfolgte die Studienkoordination von Giessen aus (Nationaler Studienkoordinator: Dr. C. Jaeger) mit 16 nachgeordneten lokalen Prüfärztezentren.

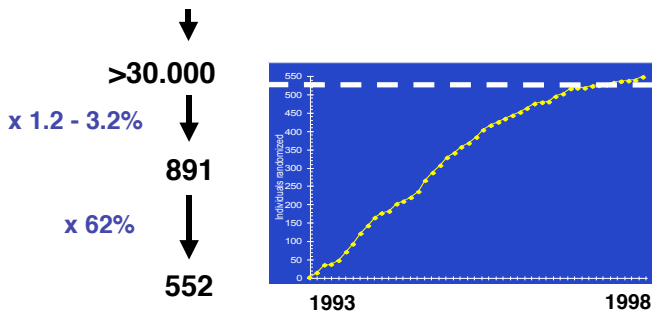
Im Rahmen der ENDIT-Studie wurden mehr als 30.000 erstgradige Verwandte auf AAK gescreent und bei Eignung entsprechend den vorgegebenen Ein- bzw. Ausschlußkriterien in die Studie eingeschlossen. *Abbildung 10* gibt eine Übersicht über den Studienverlauf mit der Rekrutierungs- und Behandlungsphase.

1991-1993: Planung der Studie



endit

1993-1998: Screening / Rekrutierung



1993-2002: Behandlungsphase und Studienende

Abb.10: Zeitlicher Ablauf der ENDIT-Studie mit Planungsphase, Screening und Rekrutierung sowie anschließender Behandlungsphase. Die Prävalenz für das Einschlußkriterium ICA-Titer von 20 JDF oder mehr war bei 1,2-3,2% der gescreenten Familienangehörigen erfüllt (je nach teilnehmendem Land). 62% dieser ICA positiven Familienangehörigen erfüllten sämtliche Einschlußkriterien, haben der Teilnahme zugestimmt und konnten in die Studie aufgenommen werden.

Innerhalb der deutschen ENDIT-Beteiligung wurden der Studie einerseits identifizierte Hochrisikoprobanden aus der Giessen-Bad Oeynhausen Familienstudie zugeführt, die aus einer Grundgesamtheit von insgesamt 882 untersuchten Familienangehörigen von Typ 1 Diabetikern stammten. Darüberhinaus wurden de novo ca. 600 weitere erstgradige Verwandte auf eine mögliche Eignung für ENDIT untersucht. Wegen der parallel auf nationaler Ebene initiierten pädiatrischen Studie DENIS (Deutsche Nikotinamid Interventionsstudie) wurden in

Deutschland geeignete Probanden, die jünger als 12 Jahre waren, DENIS zugeführt, während ältere Probanden in ENDIT eingeschlossen wurden. *Abbildung 11* zeigt den Studienverlauf der deutschen ENDIT-Beteiligung.

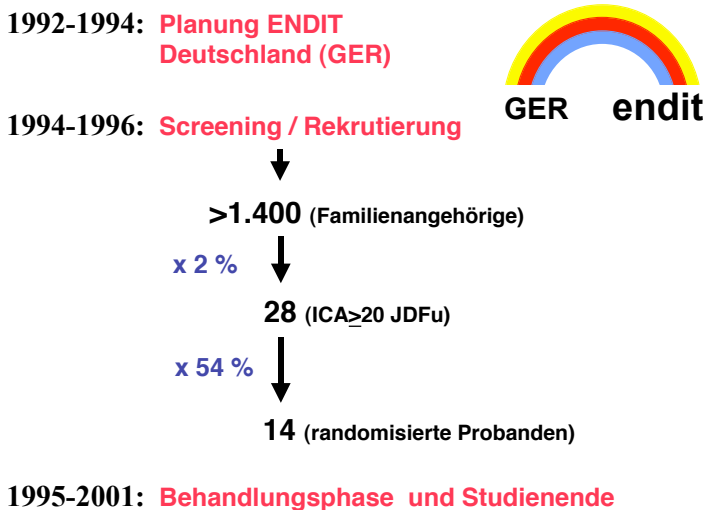


Abb. 11: Zeitlicher Verlauf der deutschen ENDIT-Beteiligung innerhalb des Gesamt-Studienverbundes. Die Prävalenz für das Einschlusskriterium ICA-Titer von 20 JDF oder mehr war bei 2% der gescreenten Familienangehörigen erfüllt. 54% dieser ICA positiven Familienangehörigen erfüllten sämtliche Einschlusskriterien, haben der Teilnahme zugestimmt und konnten in die Studie aufgenommen werden.

Die DENIS-Studie erbrachte bereits 1998 den ersten Hinweis, daß Nikotinamid in einem selektierten Hochrisikokollektiv keinen signifikanten Effekt hat (Lampeter et al., 1998). Eingeschlossen in DENIS waren Geschwister <12 Jahre von Typ 1 Diabetikern, die eine sehr aggressive Insulinitis aufweisen, die Testhypothese lautete auf Reduktion der Inzidenz von 30% auf 6%. Die ENDIT-Studie mit einem anderen Probandenkollektiv, größeren Teilnehmerzahlen und konservativerer Testhypothese (Reduktion der Inzidenz von 40% auf 26%) ist seit 2002 beendet. Die Ergebnisse liegen inzwischen vor, es hat sich auch hier keine

signifikante Reduktion der Diabetesinzidenz ergeben. *Abbildung 12* zeigt den Kurvenverlauf der Verum vs. Placebogruppe.

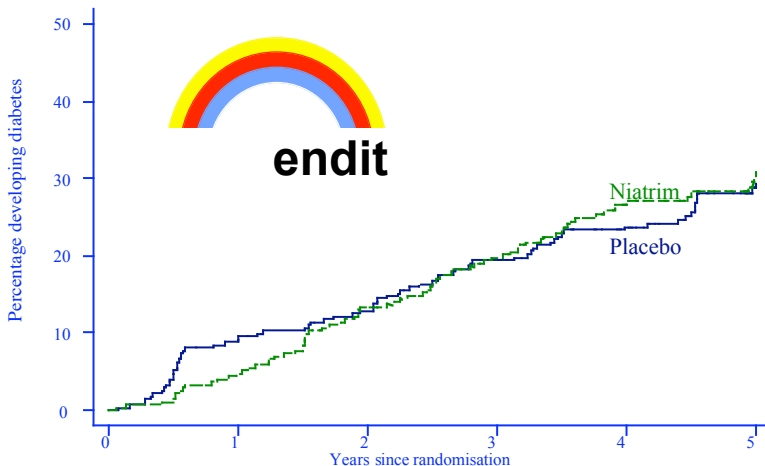


Abb. 12: Kurvenverlauf der Diabetesinzidenz in der Verum vs. Placebogruppe. Kein signifikanter Unterschied

Das Fazit aus den großen kontrollierten Studien muß daher lauten: Weder durch parenterale Insulingabe (DPT-1), noch durch Hochdosis Nikotinamid oral (ENDIT, DENIS) kann eine erfolgreiche Sekundärprävention des Typ 1 Diabetes erreicht werden. Positiv zu bemerken bleibt, daß durch ENDIT gezeigt werden konnte, daß die Testung von potentiellen Interventionsstrategien auf multinationaler Ebene über große Zeiträume auf hohem wissenschaftlichen Niveau möglich ist. Darüberhinaus werden die Nachauswertungen u.a. zu den verwendeten Prädiktionsmodellen aufgrund der Größe der Kollektive sehr valide Ergebnisse erbringen. Hierauf aufbauend wird eine sehr viel genauere und zutreffendere Planung zukünftiger Präventionsstudien möglich sein.

Derzeit geht die Tendenz in der Forschung zur Prävention des Typ 1 Diabetes dahin, neue potentielle Interventionsstrategien zunächst im Sinne einer Tertiärprävention bei Manifestation des Typ 1 Diabetes zu überprüfen. Hier ist der methodische Aufwand zur

Rekrutierung ausreichender Probandenzahlen und die kürzere Studiendauer besser geeignet, mehrere potentielle Strategien gleichzeitig in parallelen Studien zu überprüfen. Primärer Endpunkt aller dieser Studien ist der Erhalt der Betazell-Reserve, gemessen am basalen und stimulierten C-Peptid. Sekundäre Endpunkte umfassen HbA1c, Insulinbedarf, Nüchternblutglukose sowie das zelluläre und humorale Immunmonitoring.

Beispielhaft seien vier derzeit verfolgte Strategien aufgeführt, die in dem genannten Setting einer Tertiärprävention bei frisch manifestierten Typ 1 Diabetikern untersucht werden:

- 1) In Belgien, Paris und München läuft derzeit die Rekrutierung von 80 neu manifestierten, erwachsenen Typ 1 Diabetikern für die placebokontrollierte, doppelblinde Phase-II-Studie mit dem aglykosylierten, nicht mitogenen monoklonalen CD3-Antikörper YTH 12.5 (ChAgly CD3), der über 6 Tage intravenös gegeben wird. Die Nachbeobachtung läuft über 18 Monate.
- 2) Zentren in Leipzig und München beteiligen sich an einer weltweit an 40 Zentren durchgeführten placebokontrollierten Phase-II-Studie, die die subkutane Gabe unterschiedlicher Dosen des alterierten Peptidliganden APL-NBI-6024 alle 4 Wochen über 24 Monate bei insgesamt 388 adoleszenten und erwachsenen Patienten mit frisch manifestiertem Typ 1 Diabetes evaluiert.
- 3) In München läuft seit November 2000 eine offene, kontrollierte Studie, die Immunintervention mit täglich 0.25 Mikrogramm 1,25-Dihydroxy-Vitamin D3 über 9 Monate bei 20 frisch manifestierten Typ 1 Diabetikern testet.
- 4) Das Deutsche Diabetes Forschungsinstitut (DDFI) in Düsseldorf beteiligt sich neben Zentren in England und Italien an einer europäischen Multizenter Phase-II-Studie, die bei GADA positiven spät manifestierten Diabetikern ("LADA") den Effekt einer subkutanen Gabe des immunmodulatorischen Peptids p277 (DiaPep 277) auf die Endpunkte stimulierte C-Peptid und Insulinabhängigkeit im Sinne einer Sekundärprävention testen. Das Heat-Shock-Protein DiaPep 277 war bereits in einer israelischen Studie erfolgreich bei frisch manifestierten Typ 1 Diabetikern eingesetzt worden, die endogene Insulinproduktion ließ sich im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrollen über den Beobachtungszeitraum von 10 Monaten erhalten.

Gerade das 4. Beispiel zeigt, daß eine erfolgreich getestete Intervention im Setting der Tertiärprävention (bei klinischer Manifestation des Diabetes) dann umgehend in Anschlußuntersuchungen auf Wirksamkeit auch im Rahmen einer Sekundärprävention

getestet werden kann. Dieses Vorgehen wird in Zukunft zeitlich effektiver und unter besserer Ausnutzung der knappen Ressourcen zu neuen präventiven Strategien auch in der Sekundärprävention führen.

3.2 Frühdiagnostik häufiger koinzidenter Erkrankungen

3.2.1 Organspezifische Autoantikörper und Zöliakie assoziierte Antikörper bei Patienten mit Typ 1 Diabetes und Verwandten

Für die Untersuchung standen die Eingangspuben der teilnehmenden Probanden aus der Giessen-Bad Oeynhausien Familienstudie zur Verfügung, die aliquotiert in unserer Serumbank bei -20 °C gelagert werden. Zu Details der Studienpopulation sei auf 3.1.1 verwiesen. Ergänzt wurde die Analyse durch Einschluss einer Kontrollgruppe (n=150) mit gesunden Probanden, die eine leere Familienanamnese für Typ 1 Diabetes aufwiesen und nach Alter und Geschlecht der Gruppe der erstgradigen Verwandten vergleichbar waren ("gematchte Kontrollen"). Die zentralen Ergebnisse zur Prävalenz, signifikanten Unterschieden und zur Koinzidenz der organspezifischen Autoantikörper sowie Zöliakie assoziierten Antikörper werden im folgenden zusammengefasst. *Tabelle 6* und *Abbildung 13* zeigen die Häufigkeiten der Typ 1 Diabetes und Hashimoto Thyreoiditis (AIT) assoziierten Antikörper.

	Typ 1 D. m. n=197	Erstgr. Verwandte n=882	Ges. Kontrollen n=150
Diabetes AAK			
ICA pos.	82.1*	4.9*	1.3
GADA pos.	76.0*	7.6*	2.6
anti-IA-2-Ak pos.	44.4*	4.0*	0.6
IAA pos.	37.8*	3.4	0.6
≥ IAAk pos.	93.4*	11.6*	4.0
Schilddrüsen-AAk			
TPO+/-TG Ak pos.	18.4*	7.8*	3.2

Tab. 6: Prävalenzen der Typ 1 Diabetes assoziierten AAK und Schilddrüsen AAK bei manifest erkrankten Typ 1 Diabetikern, erstgradigen Verwandten und gesunden Kontrollen. Daten in Prozent (%), *p<0.05.

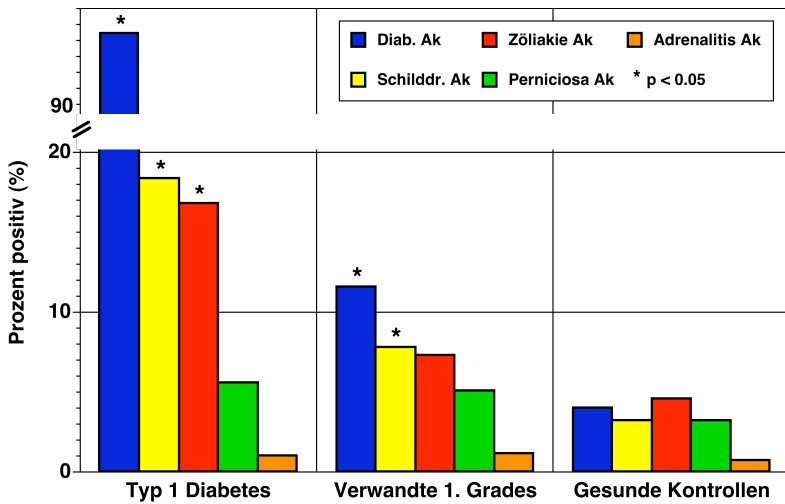


Abb. 13: AAK-Häufigkeiten bei Patienten mit Typ 1 Diabetes, erstgradigen Verwandten und gesunden Kontrollen. Die Daten sind geordnet nach Krankheitsspezifischen Antikörpern/Autoantikörpern (* $p < 0.05$).

In *Tabelle 7* und *Abbildung 13* sind die Häufigkeiten für die Zöliakie assoziierten Antikörper, Nebennierenrindenantikörper und Magen-Schleimhaut-Ak aufgelistet. Bei den frisch manifestierten Typ 1 Diabetikern bestätigten sich erwartungsgemäß die signifikant höhere Prävalenz der Zöliakie assoziierten Antikörper ($p < 0.05$), jeder sechste Typ 1 Diabetiker war positiv für diese Ak. Bei den erstgradigen Verwandten dagegen bestand nur ein Trend hin zu erhöhter Antikörperprävalenz, der jedoch in unserem Kollektiv nicht signifikant war ($p > 0.05$). Die Prävalenz für die Nebennierenantikörper und Magen-Schleimhaut Ak unterschied sich nicht signifikant in allen drei Gruppen und lag insgesamt niedrig. Ein generelles Screening ohne klinischen Verdacht erscheint nicht sinnvoll.

	Typ 1 Diabetiker n=197	Erstgrad. Verw. n=882	Gesunde Kontr. n=150
Zöliakie AAK			
Gliadin IgG pos.	10.2*	5.6	3.2
Gliadin IgA pos.	7.6*	2.6	2.0
transG-IgA pos.	9.7*	3.2	2.6
≥ 1 Ak pos.	16.8*	7.3	4.6
Autoimmungastritis			
Magenschl.-Ak pos.	5.6	6.0	3.2
Adrenalitis assoz. Ak			
Nebennieren Ak pos.	1.0	1.1	0.7

Tab. 7: Prävalenzen der Zöliakie assoziierten AK, Magenschleimhaut-Ak und Nebennierenrinden-Ak bei manifest erkrankten Typ 1 Diabetikern, erstgradigen Verwandten und gesunden Kontrollen. Daten in Prozent (%), *p<0.05.

Bei der Untersuchung auf Koinzidenz verschiedener krankheitsspezifischer Ak als Hinweis für ein Clustering dieser Erkrankungen zeigten in der Gruppe der frisch manifestierten Diabetiker 54/197 (27%) positive Ak-Befunde spezifisch für zwei oder mehr der Erkrankungen AIT, Typ 1 Diabetes und Zöliakie, verglichen mit immerhin noch 28/882 (3%) bei den erstgradigen Verwandten und 0/150 in der Kontrollgruppe (p<0.05).

Abbildung 14 zeigt die unterschiedlichen Schnittmengen in den jeweiligen Kollektiven.

Schilddrüse Diabetes Zöliakie

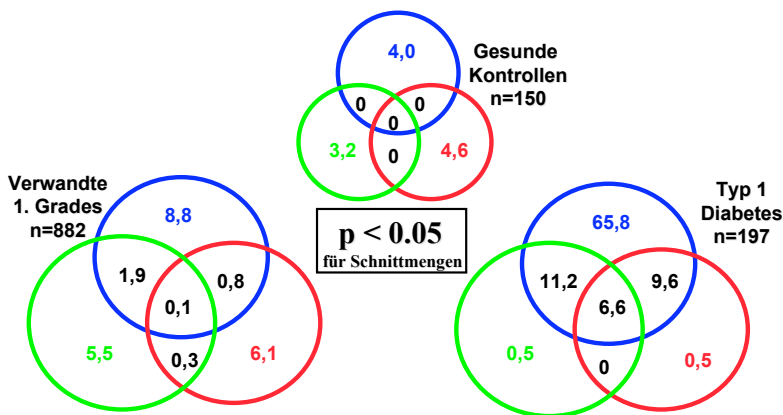


Abb. 14: Koinzidenz krankheitspezifischer Antikörper/Autoantikörper bei manifest erkrankten Typ 1 Diabetikern, erstgradigen Verwandten und gesunden Kontrollen. Signifikante Häufung von mehrfach positiven Probanden sowohl in der Gruppe der manifest erkrankten Typ 1 Diabetiker, als auch bei den erstgradigen Verwandten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ($p < 0.05$).

Die von uns gefundenen Ergebnisse bei den manifest erkrankten Typ 1 Diabetikern bestätigen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen sowohl für die mit AIT, als auch die mit Zöliakie assoziierten Antikörperbefunde (Seissler et al., 1999; Holl et al., 1998; Lampasona et al., 1998), und unterstreichen somit die Validität der eingesetzten Assays. Der Vorteil der hier vorgelegten Studie liegt jedoch darin, daß erstmalig das gesamte Spektrum der relevanten organspezifischen AAK (APS Typ 2) und Zöliakie assoziierten Ak in einem Kollektiv unter Einschluß auch der erstgradigen Verwandten untersucht wurde. So ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung interessant, daß immerhin jeder fünfzehnte manifest erkrankte Typ 1 Diabetiker gleichzeitig noch AIT-assozierte Ak plus Zöliakie relevante Antikörperphänomene aufweist. Dies unterstreicht die Notwendigkeit zu gezielten

Screeningbemühungen, da diese Patienten neben ihrem Typ 1 Diabetes noch zusätzlich sowohl von latenter/manifester Hypothyreose, als auch von Malabsorption unterschiedlichen Ausmaßes betroffen sein können. Auch die Arbeitsgemeinschaft Pädiatrische Diabetologie (AGPD) empfiehlt eine Bestimmung der Schilddrüsen-Antikörper bei Diabetes-Manifestation und danach in ein- bis zweijährlichen Abständen (AGPD, 2004).

Nur sehr wenig Daten existieren bisher zu den Antikörperhäufigkeiten bei erstgradigen Verwandten von Typ 1 Diabetikern. Zentraler Befund unserer Untersuchungen war ein signifikant erhöhtes Niveau an Schilddrüsenautoimmunität auch bei den Familienangehörigen der Typ 1 Diabetiker. Jeder zwölfte Proband wies AIT assoziierte Ak auf. Dies veranlaßte uns, die basalen TSH-Spiegel in die Analyse mit einzubeziehen und im Verlauf über 7 Jahre nachzuverfolgen (s.a. 3.2.2). Im Gegensatz hierzu fanden wir in unserer Analyse keine signifikant erhöhte Rate an Zöliakie assoziierten Ak. Dieses Ergebnis ist diskrepant zu einer Untersuchung von Hummel et al (Hummel et al., 2000). Der Unterschied wird möglicherweise erklärbar durch die unterschiedlichen Ausgangskollektive mit einem hohen Prozentsatz von Eltern und Geschwistern in unserer Untersuchung, verglichen mit einem überwiegendem Anteil an Kindern diabetischer Eltern in der Münchener Studie, die aufgrund erhöhter Ak-Prävalenzen zum Screening in dieser Subpopulation rät.

Zusammenfassend lassen die erhobenen Daten im Sinne einer "aktiven Fallfindung", insbesondere im Rahmen von Spezialsprechstunden (Diabetes-Zentren, Schwerpunktpraxen, etc.) folgendes Vorgehen sinnvoll erscheinen:

1. Frisch manifestierte Diabetiker sollten auf das gleichzeitige Vorliegen einer Autoimmunthyreoiditis und/oder Zöliakie untersucht werden.
2. Bei erstgradigen Verwandten von Typ 1 Diabetikern erscheint neben der Suche nach einem möglichen Prädiabetes zusätzlich ein Screening auf Autoimmuneroiditis sinnvoll. Ohne klinischen Verdacht empfehlen wir jedoch kein generelles Screening hinsichtlich Zöliakie.

Das vorgeschlagene Procedere ist nichtinvasiv, die Antikörperanalysen können aus kleinen Serumproben durchgeführt werden und die Ak-Assays sind für ein großes Probenaufkommen geeignet. So wird die frühzeitige Diagnose bisher nicht erkannter Fälle von Autoimmun Polyglandulären Syndromen Typ 2 und/oder Zöliakie ermöglicht. Dies wiederum bietet die Voraussetzung für eine effektive Behandlung der drohenden Komplikationen wie

Hypothyreose, Malabsorptionssyndrome, "Brittle Diabetes" sowie anderer schwerer, mit diesen Erkrankungen einhergehender, Komplikationen.

3.2.2 TSH-Entwicklung über 7 Jahre bei Schilddrüsen-Ak positiven erstgradigen Verwandten von Typ 1 Diabetikern

Der unerwartete Befund signifikant erhöhter AIT assoziierter Ak auch bei erstgradigen Verwandten von Typ 1 Diabetikern veranlaßte uns, in einer Längsschnittuntersuchung das basale TSH zum Zeitpunkt 0 und nach 7 Jahren zu untersuchen, um eine möglicherweise bereits vorhandene und potentiell voranschreitende hypothyreote Stoffwechsellage zu erfassen.

Hierzu untersuchten wir 425 erstgradige Verwandte von Typ 1 Diabetikern (n=199 Geschwister/Kinder, n=226 Eltern). Als Kontrollgruppe schlossen wir n=125 gesunde Probanden mit einem TSH zwischen 1-3 $\mu\text{U/l}$ ein, deren Anamnese für Schilddrüsenerkrankungen leer war und die eine nach Alter und Geschlecht vergleichbare Verteilung aufwiesen ("gematchte Kontrollen").

Es wiesen insgesamt 50 der erstgradigen Verwandten AIT assoziierte Ak auf (11.7%), die Prävalenz in der Kontrollgruppe betrug nur 3.2% ($p < 0.05$). Die Gegenüberstellung der basalen TSH-Konzentrationen zum Studieneintritt zeigt *Abbildung 15*. Sowohl in der Subgruppe der Geschwister und Kinder von Typ 1 Diabetikern, als auch bei den Eltern lagen bereits bei Studieneintritt die basalen TSH-Konzentrationen signifikant höher mit Einzelwerten bis 4.5 mU/l.

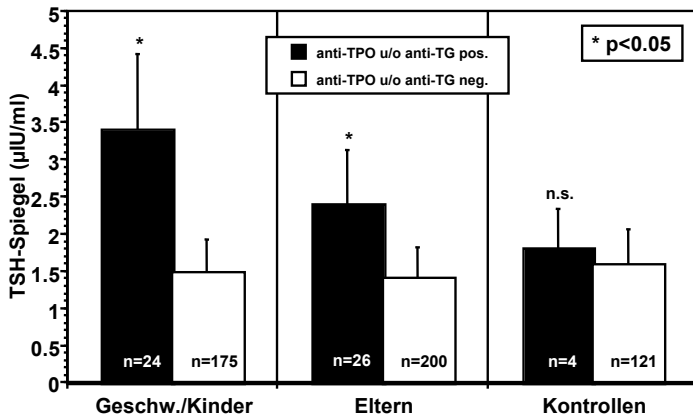


Abb.15: Basale Serumkonzentrationen von TSH in Abhängigkeit vom AK-Status bei erstgradigen Verwandten von Typ 1 Diabetikern und gesunden Kontrollen. Signifikant höhere basale TSH-Spiegel bei den Ak-positiven vs. Ak-negativen Verwandten (vs. Kontrollen) und signifikant höhere TSH-Spiegel bei Ak-positiven Geschwistern bzw. Kindern vs. Ak-positiven Eltern ($p < 0.05$).

Abbildung 16 zeigt die basalen TSH-Konzentrationen zum Zeitpunkt 0 und nach 7 Jahren. Im Zeitverlauf nach 7 Jahren zeigten die Ak positiven Probanden einen signifikanten weiteren Anstieg des basalen TSH sowohl bei den Geschwistern und Kindern als auch bei den Eltern. Kontrollbestimmungen bei den Ak-positiven Kontrollen ($n=4$) waren nicht verfügbar. Im Vergleich blieb das basale TSH bei den Ak negativen Probanden im Zeitverlauf von 7 Jahren unverändert (Daten nicht aufgeführt).

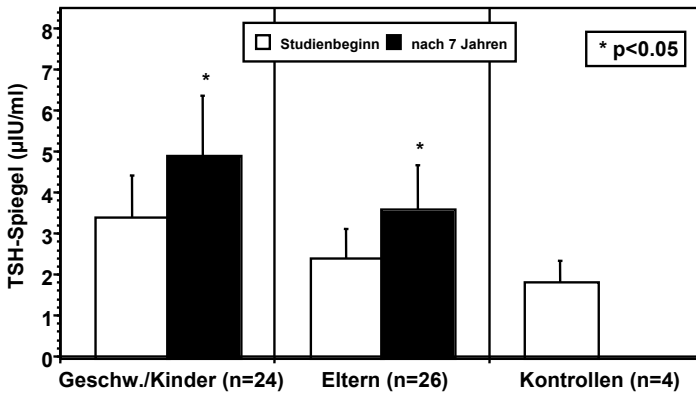


Abb.16: Basale TSH-Konzentration zum Studienbeginn und nach 7 Jahren bei den Ak-positiven erstgradigen Verwandten von Typ 1 Diabetikern. Signifikanter Anstieg des basalen TSH im Zeitverlauf ($p < 0.05$).

Zusammenfassend fanden sich AIT assoziierte Ak in ca. 11% in Seren erstgradiger Verwandter von Typ 1 Diabetikern. Ak positive Probanden wiesen signifikant höhere basale TSH-Konzentrationen auf als Ak negative. Darüberhinaus zeigten Ak positive Familienangehörige im Gegensatz zu Ak negativen einen signifikanten Anstieg der basalen TSH-Konzentration im Zeitverlauf als Hinweis auf die sich verschlechternde Stoffwechsellage im Zuge der progredienten Hashimoto Thyreoiditis.

Die klinische Relevanz eines Screenings auf Hashimoto Thyreoiditis leitet sich aus der möglichen einfachen und kostengünstigen therapeutischen Konsequenz mit Durchführung einer isohormonalen Therapie ab. Das Screening mittels Schilddrüsenantikörpern und/oder basalem TSH hat sich in einer großen Analyse, dem Wickham Survey mit 2800 Probanden und Nachbeobachtung über 20 Jahre, als effektiv zur frühzeitigen Erfassung späterer

manifeste Hypothyreosen erwiesen, die meist durch die Hashimoto Thyreoiditis verursacht werden (Vanderpump et al., 1995). Für alleinige SD-Ak-Positivität wurde eine jährliche Progressionsrate hin zu manifester Hypothyreose von ca. 2.1% ermittelt, bei alleiniger TSH-Erhöhung lag das Risiko bei 2.6% und bei kombinierter SD-Ak-Positivität zusammen mit erhöhtem basalen TSH stieg diese Progressionsrate weiter auf 4.3%.

Der von uns beobachtete signifikante TSH-Anstieg über den Zeitraum von 7 Jahren bei den SD-Ak positiven erstgradigen Verwandten von Patienten mit Typ 1 Diabetes ist gut vereinbar mit diesen vorbeschriebenen Resultaten. Es eröffnet die Perspektive, eine zukünftig drohende manifeste Hypothyreose frühzeitig, also noch im Stadium der subklinischen (latenten) Hypothyreose, zu erfassen. Hierdurch könnten diese Patienten einer spezifischen Therapie zugeführt werden mit dem Ziel des Erhalts der euthyreoten Stoffwechsellage bei normalen TSH-Spiegeln.

In einer 1998 erschienenen Arbeit wurde eine "Number needed to treat-Analyse" für Patienten mit subklinischer (latente) Hypothyreose vorgestellt, die zeigt, daß je nach Alter und TSH-Spiegeln zwischen 4.3-14.3 Patienten behandelt werden müßten, um einen Progress hin zu manifester Hypothyreose zu verhindern (Helfand & Refern, 1998). Diese Rate liegt in vergleichbaren Größenordnungen, die auch für andere präventive Ansätze in der Medizin akzeptiert werden, wie z.B. die Statintherapie bei Hypercholesterinämie (Kumana et al., 1999).

Zu den günstigen Effekten einer isohormonalen Therapie bereits im Stadium der subklinischen Hypothyreose und möglicherweise auch im Stadium der Euthyreose sei auf kürzlich publizierte Übersichten verwiesen (Cooper, 2001; Usadel & Schumm-Draeger, 2003). Grundsätzlich sind folgende, wesentliche Gesichtspunkte bei der Therapieentscheidung zu bedenken: Verhinderung eines Übergangs der subklinischen in die manifeste Hypothyreose, Einfluss auf Serumlipide und das damit verbundene kardiovaskuläre Risiko, Einfluss auf milde klinische Symptome der subklinischen Hypothyreose einschließlich neurologisch/psychiatrischer Abnormalitäten und ein potentiell günstiger Effekt der isohormonalen Therapie auf den Verlauf der Autoimmunthyreoiditis.

Zusammenfassend erscheint ein breites Screening erstgradig Verwandter von Typ 1 Diabetikern auf Schilddrüsenantikörper und ggf. TSH-basal sinnvoll. Orientiert an der

aktuellen Datenlage in der Literatur sollte dann im Falle positiver Ak-Nachweise und/oder erhöhter basaler TSH-Spiegel eine isohormonale Therapie mit L-Thyroxin erwogen werden.

3.3 Klassifikation des Diabetes mellitus mit Manifestation im Erwachsenenalter

3.3.1 Autoantikörperprävalenz und Prädiktion frühzeitiger Insulinbedürftigkeit bei Diabetesmanifestation im Erwachsenenalter

Die hier vorgestellte Untersuchung umfaßt insgesamt 150 konsekutive Patienten, die in der Diabetesambulanz der Medizinischen Klinik und Poliklinik III vorgestellt wurden, und bei denen ein NIDDM (nach WHO-Klassifikation) neu diagnostiziert wurde. Einschlusskriterium war ein Lebensalter bei Manifestation von 30 Jahren oder älter. Innerhalb der Kohorte war das Geschlechterverhältnis ausgeglichen und die Anzahl der eingeschlossenen Patienten in den einzelnen Dekaden (30-40, 41-50, 51-60) prozentual gleich verteilt. Übergewichtig (BMI>27 bei Männern, BMI>25 bei Frauen, entsprechend Kriterien der National Diabetes Data Group; Harris, 1995) waren 92 Patienten (61%) des Studienkollektivs. Der primäre Endpunkt einer Insulinbedürftigkeit, bereits innerhalb der ersten 2 Jahre nach Diagnosestellung, wurde von 22 Patienten (15%) erreicht.

Eine Auflistung der klinischen Kenngrößen in Abhängigkeit vom ICA-Status zeigt *Tabelle 8*.

	Geschlecht		Alter bei Diagnose			Übergewicht		Insulinbedürftigkeit	
	männlich	weiblich	30-40	41-50	51-60	ja	nein	≤2 Jahre	>2Jahre
ICA + (n=11)	5	6	4	4	3	8	3	3	8
ICA - (n=139)	67	72	41	44	54	84	55	19	120
	72	78	45	48	57	92	58	22	128

Tab. 8: Klinische Charakteristika der Studienpopulation in Abhängigkeit vom ICA-Status.
Keine signifikanten Unterschiede.

Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der untersuchten Parameter (Geschlecht, Alter bei Diagnosestellung oder Übergewichtigkeit). ICA-Positivität war in unserer Kohorte nicht mit früher Insulinbedürftigkeit assoziiert.

Bei der Gegenüberstellung der Parameter in Abhängigkeit vom GADA-Status fand sich dagegen eine signifikante Assoziation zwischen GADA-Positivität und Insulinbedürftigkeit bereits innerhalb der ersten 2 Jahre nach Diagnosestellung des NIDDM (* $p < 0.05$). *Tabelle 9* gibt eine Übersicht über die Daten. Wie schon bei ICA-Positivität fand sich ansonsten keine signifikante Assoziation zwischen positiven GADA und den anderen Parametern (Geschlecht, Alter bei Diagnosestellung oder Übergewicht).

	Geschlecht		Alter bei Diagnose			Übergewicht		Insulinbedürftigkeit	
	männlich	weiblich	30-40	41-50	51-60	ja	nein	≤2 Jahre	>2Jahre
GADA + (n=18)	4	14	6	3	9	10	8	7*	11*
GADA - (n=132)	68	64	39	45	48	83	49	15*	117*
	72	78	45	48	57	93	57	22	128

Tab. 9: Klinische Charakteristika der Studienpopulation in Abhängigkeit vom GADA-Status. Signifikante Assoziation zwischen GADA-Positivität und Insulinbedürftigkeit bereits innerhalb der ersten 2 Jahre nach Diagnosestellung des Diabetes ($p < 0.05$).

Interessant war, in Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Untersucher (Gottsäter et al., 1994), der Befund, daß Übergewicht bei Diagnosestellung nicht signifikant mit früher Insulinbedürftigkeit (Daten nicht aufgeführt) korrelierte, und damit in unserer Untersuchung keinen eigenständigen Prädiktionsfaktor darstellte. Carlsson und Mitarbeiter beschrieben kürzlich ebenfalls übergewichtige "LADA"-Patienten, so daß der Parameter der Übergewichtigkeit in der Differenzierung möglicherweise eher nachrangig zu bewerten ist (Carlsson et al., 2000).

Beim Vergleich der verschiedenen Parameter zur Charakterisierung eines spät manifestierenden Typ 1 Diabetes nach neuer Klassifikation mit früher Insulinbedürftigkeit sind sicherlich in erster Linie die GADA von Bedeutung und, mit Einschränkung, die ICA. Entsprechend einer Nachauswertung der UKPD-Studie, die eine der umfangreichsten Untersuchungen zu dieser Thematik darstellt, differenziert der klinische Phänotyp mit erhöhtem BMI insbesondere bei älteren Patienten nicht hinsichtlich einer frühen

Insulinbedürftigkeit, hier sind die AAK das entscheidende Kriterium. Bei jüngeren Patienten ist jedoch ein schlankerer Habitus bei AAK positiven Patienten häufiger zu beobachten, die früh insulinbedürftig werden, so daß hier dem klinischen Phänotyp neben den AAK eine gewisse Bedeutung zukommt (Turner et al., 1997).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, das nach frühen ICA-basierten Befunden aus den 80-iger Jahren (u.a. Groop et al., 1986; DiMario et al., 1983) erst die breite Verfügbarkeit der GADA-Bestimmung mit großangelegten Untersuchungen in den 90-iger Jahren (u.a. Turner et al., 1997; Niskanen et al., 1995; Zimmet, 1995; Littorin et al., 1999; Schranz et al., 2000) zu einem neuen Verständnis des Autoimmundiabetes geführt haben. Es ist nunmehr klar, daß der Autoimmundiabetes in jedem Lebensalter auftreten kann und daß verschiedene Verlaufsformen der Betazell-Zerstörung mit zeitlich unterschiedlicher Progression möglich sind (Seissler et al., 1998; Pozilli & DiMario, 2001; Scherthner G et al., 2001).

Da nach den genannten Studien ca. 10-15% der klinisch als Typ 2 Diabetiker imponierenden Patienten dem Typ 1 Diabetes (Immunologisch bedingt) zuzurechnen sind, bedeutet dies epidemiologisch nahezu eine Verdoppelung der bisher angenommen Prävalenz des Autoimmundiabetes. Dies hat gravierende Auswirkungen hinsichtlich möglicher neuer Behandlungsstrategien. Eine Diskussion dieser Aspekte ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich, es wird auf die einschlägige Literatur verwiesen. Exemplarisch sei unter Verweis auf 3.1.3 nur erwähnt, daß auch für die Etablierung neuer Strategien zur Prävention eines Autoimmundiabetes der spät manifestierende Typ 1 Diabetes eine geeignete Zielgruppe darstellt. Diese Patienten fallen über die diabetische Stoffwechsellage auf und sind dann über AAK-Bestimmung relativ einfach zu identifizieren. Sie weisen häufig noch eine signifikante Restsekretion auf, die potentiell durch eine geeignete Intervention erhalten werden kann. Erste erfolgreiche Versuche in diese Richtung sind z.B. mit DiaPep277 bereits unternommen (Raz et al., 2001). Interventionen, die in diesem Setting erfolgreich sind, können dann in einem zweiten Schritt in der klassischen Sekundärprävention hinsichtlich ihrer Wirksamkeit evaluiert werden, also vor klinischer Manifestation des Diabetes mellitus.

Das vertiefte immunologische Verständnis hat folgerichtig Eingang gefunden in die neue, ätiologisch ausgerichtete Klassifikation des Diabetes mellitus, die von der amerikanischen Diabetes-Gesellschaft 1997 eingeführt und 2001 von der Deutschen Diabetes Gesellschaft übernommen wurde (Kerner et al., 2001).

3.4 Autoantikörper bei Inselzelltransplantierten Patienten mit Typ 1 Diabetes mellitus

3.4.1 Autoantikörper bei Langzeit-Typ 1 Diabetikern vor ITX

Nimmt man an, daß die autoimmunologisch vermittelte Zerstörung der Betazellen des Pankreas beim Typ 1 Diabetes zu einer fortschreitenden Abnahme der Betazellmasse führt, so wäre zu erwarten, daß eine Korrelation zwischen der Intensität der Autoimmunreaktion und der Abnahme der Betazellmasse in den Jahren nach Manifestation des Typ 1 Diabetes besteht. Demnach wäre bei Langzeit-Typ 1 Diabetikern nur noch ein niedriges Niveau an Autoreaktivität zu erwarten, und letztendlich müßten nach Untergang der Betazellen der Nachschub an exprimiertem Autoantigen versiegen und die Autoimmunphänome verschwinden. In der Vergangenheit wurden auch immer wieder Zusammenhänge zwischen dem Autoantikörperstatus und dem Auftreten bzw. Verlauf von diabetischen Sekundärkomplikationen vermutet. Von besonderem Interesse ist dabei die diabetische autonome und periphere Neuropathie, tritt sie doch häufig sehr früh auf und eines der Betazell-Autoantigene, die Glutamatdecarboxylase, wird außerhalb der Betazellen auch in Neuronen exprimiert (Sorenson et al., 1991).

In der hier vorgestellten Arbeit wurden daher erstmals an einem großen Kollektiv (*Tabelle 10*) von Langzeit-Typ 1 Diabetikern folgende Fragen untersucht: Korreliert die Autoimmunität mit einer möglicherweise noch vorhandenen, residualen Betazellfunktion? Besteht ein Zusammenhang zwischen persistierender Autoimmunität und autonomer oder peripherer Neuropathie sowie dem Genotyp, im speziellen den HLA Klasse II-Antigen-Merkmalen des Patienten? Schließlich wurde die Frage nach der Prävalenz, Geschlechtseinflüssen und der Diabetesdauer auf die Persistenz der Autoantikörper gestellt. Die Untersuchungen erfolgten an 105 Typ 1 Diabetikern mit einer Diabetesdauer von 10-46 Jahren (im Median 21 Jahre). Als Kontrollkollektive dienten 100 frisch manifestierte Typ 1 Diabetiker und 100 Stoffwechselfgesunde.

	Gesunde Kontrollen (n=100)	Frisch manifest. Typ 1 Diabetiker (n=105)	Langzeit Typ 1 Diabetiker (n=100)
Alter			
Median	33	21	36
Spanne	18-55	13-28	20-60
Geschlecht (M/W)	53/47	56/44	48/57
Diabetesdauer			
Median	-	frisch manifestiert	21
Spanne	-	frisch manifestiert	10-46
GADA positiv	3%	79%	32%
ICA positiv	1%	82%	20%
anti-IA-2-Ak positiv	1%	72%	24%
≥ 1 AAK positiv	-	89%	43%

Tab.10: Klinische Charakteristika der Studienpopulationen und AAK Prävalenzen.

Auffällig war insbesondere, daß auch nach im Median 21 Jahren Diabetesdauer noch in 32% positive Befunde für GADA, in 20% positiver Nachweis von ICA und in 24% Positivität für anti-IA-2-Ak beobachtet wurde. Zusammen betrachtet war bei immerhin 43% der Langzeit-Typ 1 Diabetiker noch mindestens 1 AAK nachweisbar. Eine später publizierte longitudinale Studie zur Prävalenz von AAK nach Manifestation des Typ 1 Diabetes über einen Zeitraum von 10 Jahren bestätigt unsere Beobachtungen. Obwohl auch in dieser Untersuchung ein Abfall der Autoantikörperhäufigkeiten gesehen wurde, waren nach 10 Jahren noch 66% der Patienten für mindestens einen AAK positiv, 42% wiesen sogar zwei oder alle drei AAK auf (Savola et al., 1998). Insbesondere die GADA-Ak persistieren länger im Vergleich zu ICA und anti-IA-2-Ak. Unsere Untersuchungen zeigten weiterhin einen signifikant höheren Prozentsatz positiver AAK-Befunde bei Frauen im Vergleich zu Männern ($p < 0.05$).

Die Daten zur Prävalenz zeigen, daß nahezu jeder 2. Langzeit-Typ 1 Diabetiker noch AAK gegen Inselautoantigene generiert. Entsprechend den eingangs formulierten Thesen gingen wir nun der Frage nach, ob eine residuale Betazellfunktion, das Auftreten einer Neuropathie

oder ein definierter HLA-Status möglicherweise mit dieser persistierenden humoralen Autoimmunreaktion bei Langzeit-Typ 1 Diabetikern korreliert.

Eine residuale Betazellfunktion (nach Hendriksen Kriterien, Hendriksen et al., 1977) im Sinne noch vorhandenen C-Peptids wurde in 23% der Patienten gefunden. Hierbei ist nicht von einer metabolischen Wirksamkeit auszugehen, sondern die "C-Peptid-Response" wird als Hinweis für residuale Betazellmasse respektive noch vorhandener Autoantigene angesehen. Die statistische Überprüfung erbrachte jedoch keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem AAK-Status und einer positiven "C-Peptid-Response" nach Hendriksen. Basierend auf einem standardisierten Untersuchungsprogramm mit Berücksichtigung typischer Symptome und objektivierbarer Funktionstests wurde eine periphere Neuropathie in 79% und eine autonome Neuropathie in 67% der Langzeit-Typ 1 Diabetiker gefunden. Auch hier ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem AAK-Status und dem Vorhandensein einer Neuropathie. Hinsichtlich des HLA-Status fand sich die Konstellation HLA-DR 4/X in 47%, HLA-DR 3/X in 22% und HLA-DR3/DR4 in 23% der Fälle. Die Korrelation des AAK-Status mit spezifischen HLA-Konstellationen zeigte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Zusammenhang.

Bis heute ist die Ursache der persistierenden humoralen Autoimmunphänomene bei Langzeit-Typ 1 Diabetikern nicht abschließend geklärt. Aus der klinischen Diabetologie gab es bisher keine Hinweise, daß die persistierenden AAK einen Einfluß auf das klinische Management einschließlich diagnostischer oder therapeutischer Entscheidungen bei Langzeit-Typ 1 Diabetikern haben. Daher rückten diese Fragen auch nicht in den Fokus der bisherigen Forschung. Besondere Bedeutung gewinnen diese Aspekte jedoch im Zusammenhang mit einer geplanten Inselzelltransplantation bei Langzeit-Typ 1 Diabetikern, da sie potentiell als Hinweis für einen fortbestehenden Autoimmunprozeß gewertet werden müssen. Hierzu wird unter 3.4.2 und 3.4.3 genaueres ausgeführt.

3.4.2 Einfluß der Immunsuppression auf die Autoantikörperbildung

Die potentielle Bedeutung einer wieder auftretenden autoimmunen Zerstörung transplanterter Inselzellen ist mehrfach sowohl im Tiermodell als auch in der klinischen Pankreas- und Inselzelltransplantation gezeigt worden. Nach den ersten Untersuchungen durch Sutherland und Mitarbeiter war jedoch die vorherrschende Meinung, daß die Immunsuppression, die

aufgrund der drohenden Allo-Abstoßung verabreicht werden muß, in jedem Fall ausreichen würde, um auch die "autoimmune disease recurrence" zu verhindern (Sibley et al., 1985). Dies wird inzwischen durch zahlreiche Untersuchungen in Frage gestellt. In Tiermodellen des spontanen Autoimmundiabetes (NOD-Maus und BB-Ratte) konnte gezeigt werden, daß die klassischen Immunsuppressiva nicht in der Lage waren, die autoimmune Zerstörung von syngenen Inselzelltransplantaten zu verhindern (u.a. Terada et al., 1988; Wang et al., 1988; Stegall et al., 1996; Bartlett et al., 1995). Im klinischen Setting wurde von verschiedenen Untersuchern sowohl nach humaner Pankreastransplantation als auch Inselzelltransplantation trotz kombinierter Immunsuppression (Cyclosporin, Azathioprin und Steroide) eine autoimmun vermittelte Insulinitis (histologisch verifiziert) der transplantierten Inseln beobachtet (Tyden et al., 1996; Stegall et al., 1996).

Die angeführten Arbeiten stützen die These, daß eine konventionelle Immunsuppression nicht ausreicht, die Autoreaktivität zu unterdrücken. Es stellt sich nun die Frage nach dem Einfluß der Immunsuppression für die Generierung von GADA, ICA und anti-IA-2-Ak, deren Bedeutung als prognostische Indikatoren vor und nach Inselzelltransplantation im Rahmen unserer Untersuchungen evaluiert werden soll.

In diesem Zusammenhang ist eine Studie aus den 80-iger Jahren von besonderer Bedeutung, in der bei 132 frisch manifestierten Typ 1 Diabetikern in einer kontrollierten, randomisierten und plazebokontrollierten Studie Cyclosporin verabreicht wurde unter der Vorstellung, hiermit die Autoreaktivität zu supprimieren und die noch vorhandene residuale Betazellmasse zu erhalten (Canadian European Randomized Control Trial Group, 1988). Die Seren aus dieser Studie wurden mittlerweile für die Autoantikörper nachanalysiert. Hierbei zeigte sich, daß die ICA-Bildung nicht blockiert wurde, sondern nur die ICA-Titer tendentiell abnahmen. Besonders auffällig war, daß Cyclosporin keinen Einfluß auf die GADA hatte, die in Prävalenz und Titerhöhe unverändert blieben (Mandrup-Poulsen et al., 1990; Petersen et al., 1994; De Filippo et al., 1996).

Unser Ziel war es, diese Ergebnisse bei Langzeit-Typ 1 Diabetikern zu reproduzieren. Um einen möglichen Einfluß der Inseltransplantation selbst auf die AAK-Bildung auszuschließen, wurden zwei Gruppen von Langzeit Typ 1 Diabetikern gebildet, die dann miteinander verglichen wurden. Die eine Gruppe bestand aus 30 Langzeit-Typ 1 Diabetikern, die noch nicht nierentransplantiert waren und daher keine Immunsuppression erhielten. Die zweite

Gruppe bestand aus 30 nach Alter, Geschlecht und Diabetesdauer "gematchten" Patienten, die bereits nierentransplantiert waren und nachfolgend mit einer konventionellen Immunsuppression, bestehend aus Cyclosporin, Azathioprin und Steroiden, behandelt wurden. *Tabelle 11* zeigt die Ergebnisse.

	Langzeit-Typ 1 Diabetiker keine Immunsuppr. (n=30)	Langzeit-Typ 1 Diabetiker immunsupprimiert (n=30)
Alter, Median	41.0 (32-54)	42.0 (33-52)
Geschlecht (M/W)	19/11	22/8
Diabetsdauer, Median	28.5 (17-35)	29.0 (16-41)
GADA positiv	20%	23%
anti-IA-2-Ak positiv	16%	13%
ICA positiv	20%	3%*
≥ 1 AAK positiv	33%	27%

Tab.11: Einfluß der Immunsuppression auf die AAK-Bildung bei Langzeit-Typ 1 Diabetikern (*p<0.05)

Auffällig war, daß in der Gruppe mit klassischer Dreifach-Immunsuppression zwar die ICA signifikant (p<0.05) geringer nachweisbar waren, jedoch sowohl die GADA, als auch die anti-IA-2-Ak in nahezu unveränderter Häufigkeit und Titerhöhe trotz Immunsuppression nachweisbar waren. Bei gemeinsamer Betrachtung aller AAK fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen für das Auftreten von mindestens einem AAK.

Ein Vorteil der oben angeführten Analyse ist, daß es sich um eine Betrachtung der AAK in Abhängigkeit von Immunsuppression ohne einen möglicherweise modifizierenden Einfluß einer ITX handelt. Ein Nachteil ist dagegen die Querschnittsuntersuchung, die die Aussagefähigkeit einschränkt. In einer Anschlußuntersuchung haben wir daher bei 21 Patienten in einer Längsschnittuntersuchung vor- und nach ITX mit anschließender klassischer Dreifach-Immunsuppression sowohl die Prävalenz, als auch die Titer der AAK untersucht. Auch hier bestätigten sich die Befunde, daß insbesondere die GADA und in geringerem Maße auch ICA und anti-IA-2-Ak unter Immunsuppression persistieren (Daten nicht aufgeführt, s. Publikationen im Anhang).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß eine klassische Immunsuppression nur geringe Effekte auf die Autoantikörperbildung hat. Die ersten Hinweise hierfür stammten aus den Untersuchungen bei frisch manifestierten Typ 1 Diabetikern und wurden von uns erstmalig auch bei Langzeit-Typ 1 Diabetiker vor- und nach kombinierter Nieren-/Inselzelltransplantation bestätigt. Inzwischen haben mehrere Forschergruppen nach Pankreastransplantation ähnliche Ergebnisse erzielt und publiziert (Braghi et al., 2000; Esmatjes et al., 1998; Sundkvist et al., 1998).

3.4.3 Autoantikörper in der Risikostratifizierung des Inselzelltransplantat-überlebens

In den vorausgegangenen Kapiteln haben wir zeigen können, daß auch bei Langzeit-Typ 1 Diabetikern noch bei jedem zweiten Patienten mindestens ein Autoantikörper (GADA, ICA, anti-IA-2-Ak) zu finden ist, und daß eine klassische Immunsuppression, bestehend aus Cyclosporin, Azathioprin und Steroiden, nur einen gering modifizierenden Einfluß auf die Generierung dieser AAK hat. Spricht man den AAK eine Markerfunktion für den ablaufenden Autoimmunprozeß zu und dies kann als weitgehend gesichert gelten, dann sind mögliche Korrelationen zwischen definierten AAK-Konstellationen und dem Inselzelltransplantatüberleben von besonderer Bedeutung. Untersuchungen hierzu stehen im Mittelpunkt des folgenden Kapitels und basieren auf dem weltweit größten Patientenkollektiv nach Inselzelltransplantation am Giessener Zentrum.

Insgesamt wurden 56 Patienten (n=37 mit simultaner Nieren und Inselzelltransplantation-SIK; n=19 mit Inselzell- nach Nierentransplantation-IAK) in die Untersuchung einbezogen, die in Giessen eine Inselzelltransplantation erhalten haben. Die kumulative Nachbeobachtungszeit in der SIK-Gruppe betrug 88.3 Jahre, in der IAK-Gruppe 32.5 Jahre. Insgesamt ergibt sich demnach eine kumulative Gesamt-Nachbeobachtungszeit von mehr als 120 Patientenjahren nach Inselzelltransplantation.

In allen Fällen wurden vor- und nach ITX Serumproben auf c-Peptid und Autoantikörper untersucht. Alle Patienten waren vor ITX c-Peptid negativ (<0.02 ng/ml). Von irreversiblen Inselzelltransplantatverlust wurde ausgegangen, wenn nach einer Phase der c-Peptid-Positivität post-ITX das c-Peptid erneut in zwei aufeinanderfolgenden Bestimmungen negativ ausfiel (<0.02 ng/ml).

In Abhängigkeit vom AAK-Status wurden vier Patientengruppen definiert: Patienten, die vor- und nach ITX AAK negativ waren (Gruppe 1). Patienten, die nach ITX ≥ 1 AAK verloren haben (Gruppe 2). Patienten, deren AAK persistierten, die also vor- und nach ITX für ≥ 1 AAK positiv waren (Gruppe 3) und Patienten, die nach ITX erstmalig neu ≥ 1 AAK entwickelten (Gruppe 4).

Entsprechend der Arbeitshypothese, daß persistierende oder wiederkehrende Autoreaktivität mit verkürztem Inselzelltransplantatüberleben assoziiert ist, definierten wir zwei Hauptgruppen, eine mit postuliertem niedrigen und eine zweite mit postuliertem hohem Risiko eines frühzeitigen Inselzelltransplantatverlustes. *Tabelle 12* gibt eine Übersicht über die Gruppen und den Anteil der Patienten mit Verlust der Inselzellen während des Beobachtungszeitraumes.

		Inselzelltransplantatverlust	
		Anzahl (n)	%
Niedriges Risiko	≥ 1 AAK vor/nach ITX		
Gruppe 1	- / -	10/31	31
Gruppe 2	+ / -	0/8	0
Hohes Risiko			
Gruppe 3	+ / +	5/9	55
Gruppe 4	- / +	6/8	75
Kumulativ		21/56	37

Tab.12: Stratifizierung der Inselzelltransplantierten Patienten nach unterschiedlichem AAK-Verlauf in zwei Hauptgruppen mit jeweils 2 Untergruppen. Dargestellt ist auch die beobachtete Rate an Inselzelltransplantatversagen während des Beobachtungszeitraumes.

Insgesamt kam es in 37% der Fälle zum Verlust des Inselzelltransplantates während des Beobachtungszeitraumes. Diese "Event rate" ist hinreichend für eine detaillierte Analyse des Inselzelltransplantatüberlebens in Abhängigkeit vom AAK-Status und damit Zugehörigkeit zu

den vordefinierten Risikogruppen. Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch einige Ergebnisse auf Basis von Life-Table-Analysen mit Log-Rank-Vergleichen.

Abbildung 17 zeigt die gemeinsame Analyse der SIK und IAK-Patienten (n=56, >120 Patientenjahre nach ITX). Aufgeführt ist der Kurvenverlauf für kombinierte AAK-Gruppen entsprechend der Zugehörigkeit zur Patientengruppe mit angenommenen niedrigem Risiko, verglichen mit der Hochrisiko-Gruppe. Die Patienten, die keinerlei AAK-Phänomen aufwiesen und die, die nach ITX AAK verloren haben, also negativ wurden, wiesen ein signifikant verlängertes Inselzelltransplantatüberleben auf, verglichen mit denjenigen Patienten, die durchgehend AAK positiv waren oder aber nach ITX serokonvertierten und neu AAK generierten (p=0.0018).

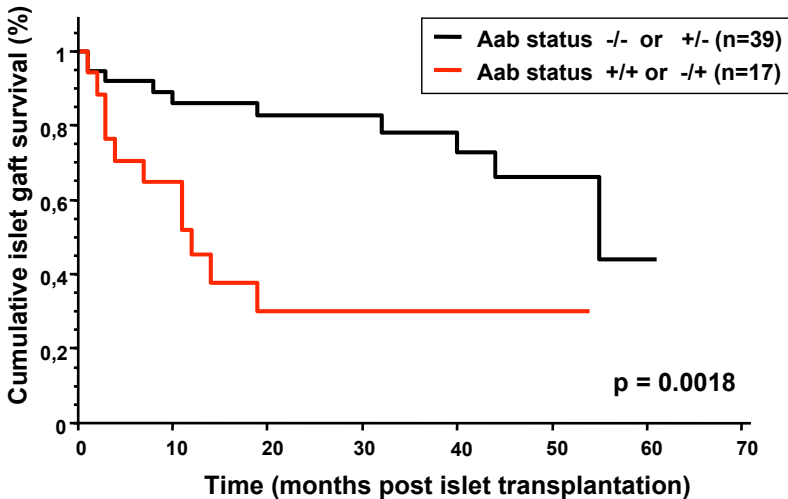


Abb.17: Kumulatives Inselzelltransplantatüberleben in Abhängigkeit vom AAK-Status. Dargestellt ist der Kurvenverlauf für kombinierte AAK-Gruppen entsprechend den verschiedenen Risikogruppen (-/- und +/- versus +/+ und -/+). Diejenigen Patienten, die vor- und nach ITX AAK negativ waren oder aber im Verlauf AAK verloren, wiesen ein signifikant verlängertes Transplantatüberleben auf (p=0.0018).

Abbildung 18 zeigt den Kurvenverlauf für alle 4 AAK-Gruppen getrennt. Die Patienten, in deren Serum vor- und nach ITX keine AAK gefunden wurden (-/-), wiesen ein signifikant verlängertes Transplantatüberleben auf, verglichen mit durchgehend AAK-positiven (+/+) Patienten ($p=0.041$). Der Verlust von AAK-Positivität (+/-) im Verlauf war mit einem signifikant günstigeren Transplantatüberleben assoziiert ($p=0.014$). Im Gegensatz hierzu wurde das ungünstigste Ergebnis in der Patientengruppe mit Serokonversion von AAK-Negativität zu AAK-Positivität (-/+) beobachtet ($p=0.024$).

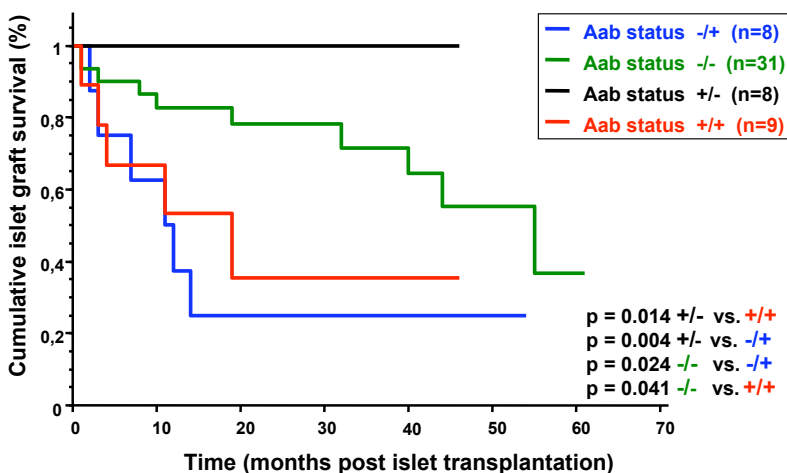


Abb.18: Analoge Darstellung des kumulativen Inselzelltransplantatüberlebens getrennt für alle vier AAK-Gruppen. Aufgelistet ist auch das Signifikanzniveau der jeweiligen Log-Rank-Vergleiche.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, daß ein regelmäßiges Monitoring der Autoantikörper vor- und nach Inselzelltransplantation eine Stratifizierung der Patienten in signifikant unterschiedliche Prognosegruppen ermöglicht. Die vorgestellten Daten ermöglichen darüber hinaus in der Verlaufsbeobachtung bei Veränderungen des AAK-Status eine Abschätzung der dann geänderten Prognose. Hieraus können potentiell neue, risikoadaptierte Strategien für das Management Inselzelltransplanterter Patienten abgeleitet werden.

Die Erstbeschreibung der Zusammenhänge zwischen den genannten Autoantikörpern und dem Inselzelltransplantatüberleben erfolgte durch uns auf Basis der hier skizzierten Untersuchungen. Zwischenzeitlich haben verschiedene andere Arbeitsgruppen (für Inselzell- und Pankreastransplantation) die Ergebnisse überprüft und bestätigt. So findet u.a. die Mailänder Gruppe und die Gruppe in Lyon in ihren Kollektiven nahezu identische AAK-Prävalenzen, Koinzidenzen und AAK-Verläufe. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen wurde bei Persistenz, Stimulation oder bei Neuauftreten der AAK ein schlechteres "outcome" seitens der Transplantatfunktion beobachtet (Braghi et al., 2000; Thivolet et al., 2000; Bosi et al., 2001).

Zusammenfassend schließen wir aus den vorgestellten Daten, daß Autoantikörper auch nach langem Bestehen des Typ 1 Diabetes in einem hohen Prozentsatz persistieren. Klassische konventionelle Immunsuppressiva haben allenfalls gering modulierenden Einfluß auf die Autoantikörperbildung, trotz Immunsuppression können die Titer ansteigen, oder es kann zu einem Neuauftreten von AAK (Serokonversion) kommen. Korreliert man die AAK mit dem Inselzelltransplantatüberleben, gelingt eine prognostische Stratifizierung der Patienten in verschiedenen Risikogruppen bzw. Abschätzung der geänderten Prognose bei sich änderndem AAK-Status. Zusammen mit der Evidenz aus zahlreichen Tierversuchen und klinischen Studien unterstützen die vorgestellten Daten die These, daß wiederkehrende Autoimmunität auch unter konventioneller Immunsuppression vorkommt und zum Verlust des Transplantates führen kann.

Der Beitrag der "wiederkehrenden Autoimmunität" am Transplantatverlust, also die Bedeutung innerhalb der verschiedenen Ursachen des Transplantatversagens einschließlich der unspezifischen Inflammation und der Alloreaktivität bleibt noch genauer zu untersuchen. Hier wird das methodische Spektrum erweitert werden müssen, insbesondere um zelluläre Marker und Zytokin/Chemokin-Untersuchungen auf mRNA- oder Proteinebene mit dem Ziel einer differenzierten Betrachtung der Allo- und der Autoreaktivität. Erste erfolgreiche Versuche in diese Richtung wurden mit Kombinationen von humoralen- und zellulären Markern (Reaktivität von PBMC) in allerdings kleinen Pilotstudien unternommen (Brooks-Worrell et al., 2000; Roep et al, 1999). In unserer Arbeitsgruppe wird derzeit ein Monitoring auf Basis verschiedenster Markerkombinationen untersucht. Dies schließt auf der humoralen Seite neben den Autoantikörpern zahlreiche Zytokine und Chemokine ein, ergänzt auf der zellulären Seite durch Proliferationsassay im Kompartiment der PBMC und ELISPOT-

Analysen. Dieser Ansatz ist vielversprechend, es sollte hiermit gelingen, Marker zu entwickeln, die ein "Immunologisches Monitoring" mit der Option einer Intervention bei drohendem Transplantatverlust ermöglichen. Das "metabolische Monitoring" des Inselzelltransplantates ist hinsichtlich Beurteilung eines drohenden Inselzellverlustes, analog zur Situation im Prädiabetes (s.a. 2.1 und 3.1.1), nicht sensitiv genug und zeigt erst spät den dann irreversiblen Transplantatverlust.

Ein differenziertes Monitoring erscheint jedoch nur sinnvoll, wenn immunsuppressive- oder Toleranz induzierende Strategien entwickelt werden, die in der Lage sind, sowohl die Allo- als auch die Autoreaktivität zu unterdrücken, um so die Langzeiterfolge der Inselzelltransplantation als Therapiekonzept zu verbessern. Hier existiert ein breites Forschungsfeld und gerade in den letzten Jahren wurden innovative und neue Konzepte entwickelt (Übersicht in Bretzel, 2003). Ein Beispiel ist das bereits erwähnte "Edmonton-Protokoll", dessen Vorteile u.a. in einer maßgeschneiderten Immunsuppression liegen. Dieses Protokoll ist Sirolimus basiert und Steroid-frei, beinhaltet eine initiale Induktionsimmunsuppression gegen aktivierte Lymphozyten und niedrig dosierte Calcineurin-Inhibitoren. Die Erfolgsraten mit diesem Protokoll sind bisher unerreicht (Shapiro, et. al., 2000).

Zahlreiche neue Techniken werden derzeit präklinisch in Tiermodellen erprobt. Beispielhaft seien gentherapeutische Ansätze erwähnt zur Verbesserung der "Stressresistenz" und "Verringerung der Immunogenität" der Inselzellen vor Transplantation oder neue immunsuppressive bzw. immunmodulierende Strategien (u.a. Zhang et al., 2003; Koulmanda et al., 2003; Guo et al., 2001; Makhlof et al., 2002; Giannoukakis et al., 1999; Yoon et al., 1999; Schwartz et al., 1999).

Aus den Synergien der vielen neuen und innovativen Techniken einschließlich der Stammzell-Therapie, Immunmodulation, Toleranzinduktion und Gentherapie, werden in naher Zukunft weitere, signifikante Fortschritte bei der klinischen Inselzelltransplantation zu erwarten sein (Bretzel, 2003).

3.5 Insulin-Antikörper als Ursache von Komplikationen unter Insulintherapie

3.5.1 Algorithmus zu Diagnose und Management immunologischer Komplikationen unter Insulintherapie

Pathophysiologisch liegt den immunologischen Komplikationen der Insulintherapie mit den häufigsten Manifestationen als Hautreaktion und instabilem Diabetes eine Insulin spezifische Antikörperbildung der Klasse IgE u/o IgG zugrunde. Zur Differenzierung schlagen wir ein standardisiertes Vorgehen nach dem in *Abbildung 19* dargestellten Algorithmus vor.

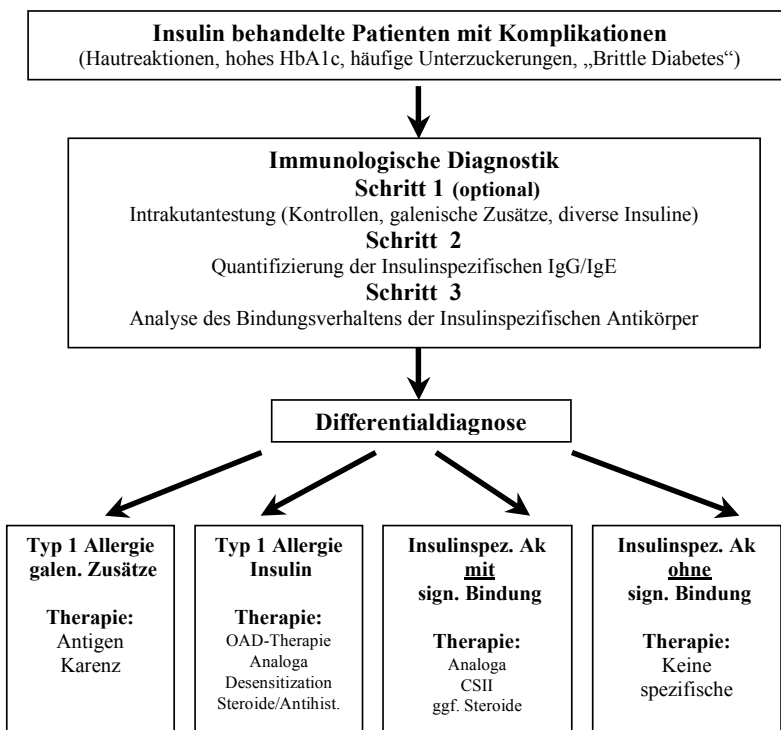


Abb.19: Algorithmus zum Management immunologischer Komplikationen der Insulintherapie

Ursache der Hautreaktionen sind zumeist Antikörper der IgE-Klasse, die zu einer klassischen Sofortreaktion Typ 1 nach Coombs und Gell führen. Typ III und Typ IV Reaktionen können zwar theoretisch vorkommen, sind im Zeitalter der Humaninsuline jedoch sehr selten geworden (Federlin, 1985; Schernthaner, 1993). Die Ig-E-Bildung kann gegen das Insulinmolekül selber gerichtet sein, in diesem Fall handelt es sich um die "klassische Insulinallergie", oder aber sie richtet sich gegen galenische Zusätze. Das klinische Erscheinungsbild ist meist die Hautreaktion mit Rötung, Juckreiz und Quaddelbildung unmittelbar nach Injektion. Seltener ist die systemische Anaphylaxie. Da IgE überwiegend an Basophile und Mastzellen gebunden vorliegt und nur in Spuren als Serumprotein zirkuliert, ist eine relevante, metabolisch wirksame Insulinbindung bei den Antikörpern der IgE-Klasse im Vergleich zu den IgG-Antikörpern nachrangig.

Treten bei einem Patienten die geschilderten Hautreaktionen auf, so sollte zunächst eine Intrakutantestung durchgeführt werden (Schritt 1 des Algorithmus). Diese umfaßt eine Positiv-Kontrolle (0.01% Histamin), die Negativ-Kontrolle (0.9% NaCl) sowie definierte Testlösungen mit den relevanten galenischen Zusätzen wie z.B. Protamin, Cresol, Phenol etc. (Insuman® Testlösungen). Ergänzt wird das Spektrum durch die aktuell dem Patienten verabreichten Insuline (5 U/ml). Unter therapeutischen Gesichtspunkten sollten auch Analoga (LysPro, Insulin Aspart, Glargine) und alternative Insuline anderer Hersteller in gleicher Sitzung getestet werden, zukünftig auch das neue Verzögerungsinsulin Detemir. Hierdurch gelingt eine Differenzierung, ob es sich um eine klassische Insulinallergie handelt, oder aber die Hautreaktion auf einer Allergie gegen einen der galenischen Zusätze beruht. Im Falle einer positiven Hautreaktion auf Insulin, sollte im Sinne einer internen Kontrolle der Test auf Insulinspezifisches IgE positiv ausfallen (Schritt 2 des Algorithmus).

Die therapeutische Konsequenz bei einem positiven Hauttest liegt in der Allergenkarenz. Besteht beispielsweise eine Allergie gegen Protamin, so müssen in der Therapie Protamin-basierte Verzögerungsinsuline vermieden werden. Liegt eine klassische Insulinallergie vor, so muß zunächst überprüft werden, ob der Patient zwingend insulinabhängig ist oder eine maximale orale Therapie möglicherweise ausreichend ist. Sollten in der Hauttestung die Analoga negativ getestet sein, kann ein Therapieversuch auf Basis von Analoga versucht werden. Sowohl für LysPro, als auch für Insulin Aspart und Glargine konnte gezeigt werden, daß eine Insulinallergie hiermit erfolgreich behandelbar ist (Näf et al., 2001; Kumar et al., 1997; Eapen et al., 2000; Airaghi et al., 2001; Moriyama et al., 2001). Sollte eine exogene

Substitution von Insulin oder Analoga nicht möglich sein, kann probatorisch eine Desensibilisierung nach Galloway (Galloway & deShazo, 1990) versucht werden, die jedoch bei ca. 30% der Patienten nicht anhaltend gelingt. Im Falle eines Therapieversagens aller vorgenannter Optionen kann eine kombinierte Therapie mit Steroiden und Antihistaminika, begleitend zur Insulinapplikation, erfolgreich sein (Ganz, 1990; Scherthner, 1993).

Im Gegensatz zur IgE-vermittelten Hautreaktion kann die Bildung hochtitriger und hochavidier insulinspezifischer Antikörper der Klasse IgG über eine signifikante Insulinbindung eine Neutralisierung des Insulin verursachen mit konsekutiv instabiler Stoffwechsellage des Diabetes unter dem klinischen Bild des "Brittle Diabetes". Je nach Avidität der Antikörper haben die gebildeten Insulin/Antikörperkomplexe ein unterschiedliches Dissoziationsverhalten, so daß die Pharmakokinetik des s.c. applizierten Insulins nicht mehr zuverlässig vorhergesagt werden kann. Es kann so postprandial aufgrund der Insulinneutralisierung zur Hyperglykämie kommen, gefolgt von einer Hypoglykämie im Intervall bei Dissoziation des Komplexes mit Freisetzung wirksamen Insulins zur Unzeit (van Haefen et al., 1987; van Haefen et al., 1989; Federlin, 1985; Scherthner, 1993). Dies kann wiederum gefolgt sein von reaktiven Hyperglykämien, das klinisch resultierende Bild ist der "Brittle Diabetes". Die Hypoglykämien treten oft nachts bzw. in den frühen Morgenstunden auf, hier sind möglicherweise auch pH-Verschiebungen neben anderen Faktoren für das Dissoziationsverhalten von Bedeutung.

Im Schritt 2 des Algorithmus folgt daher bei Patienten mit entsprechender Symptomatik die quantitative Bestimmung des Gesamt-IgG und Gesamt IgE, sowie der insulinspezifischen IgG und IgE-Antikörper, wobei letztere einen ev. positiven Hauttest auf Insulin bestätigen sollten als Voraussetzung der Diagnose "Insulinallergie". Zahlreiche Arbeitsgruppen haben gezeigt, daß es unter Insulintherapie in mehr als 50% der Patienten zur IgG-Bildung gegen Insulin kommt. Nur bei ganz wenigen Patienten entstehen jedoch die vorgenannten Komplikationen. Die quantitative Analyse der Antikörpertiter alleine ist also nicht ausschlaggebend für das Ausmaß der Insulinbindung/Neutralisierung. Je nach Avidität der multivalenten Antikörper mit dem multivalenten Insulinmolekül kann die Bindungsenergie unterschiedlich sein, es resultiert ein unterschiedliches Bindungsverhalten. Zur Abschätzung der individuellen Insulinbindung und Dissoziationskinetik und damit auch zur Abschätzung der klinischen Relevanz der nachgewiesenen Antikörper für den betroffenen Patienten, haben wir den Algorithmus um Schritt 3 erweitert. Hier wird das Antikörper-Bindungsverhalten und die

zeitabhängige Insulin/Ak-Dissoziation in einem ex vivo/in vitro Assay untersucht. Hierbei wird das, von endogenem Insulin gereinigte Serum, nach Aliquotierung mit J^{125} -markiertem Humaninsulin inkubiert. Die Probe wird angesäuert und Methylcellulose als Insulin-Adsorbens zugegeben. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0, 20, 60, 90, 120, 240 Minuten) wird in den Aliquota durch Zentrifugation das adsorbierte freie Insulin vom Ak-gebundenen Insulin getrennt und beide Fraktionen im Gamma-Counter quantifiziert. Das Verhältnis beider Fraktionen vermittelt eine, klinisch gut verwertbare, Abschätzung für das Ausmaß einer initialen Insulinbindung und der nachfolgenden Freisetzung durch Dissoziation im Zeitverlauf bis 4 Stunden (s.a. Publikation im Anhang). Normalerweise beträgt die Bindung ca. 2-3%.

Abbildung 20 zeigt beispielhaft die Auswertung eines Patienten mit hochtitrigen, hoch aviden Insulin-Ak und konsekutiv hoher Insulinbindung mit verzögerter Freisetzung. Vereinfacht bedeutet dies einen hohen Anteil (hier ca. 70%) an neutralisiertem und damit unwirksamen Insulin kurz nach der Insulinapplikation mit postprandial resultierender Hyperglykämie. Mit Zeitverzögerung über Stunden erfolgt dann die Dissoziation des Komplexes, Freisetzung des Insulin und konsekutiv eine Hypoglykämie. Hieraus resultiert eine nicht vorhersagbare Insulinkinetik und klinisch das Bild des "Brittle Diabetes".

Insulin/Ak - Dissoziation

Patientennr. : 469/01

Eingangsdatum : 06.02.01

Arzt/Station : Dr. Jaeger St. I

Name : ██████████ geb.: ██████████

Abnahme		0 min	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	240 min.
Normalpatient	Gesamtakt.	55669	53755	50591	51503	52396	50863
freies Insulin	Pellet	54060	52284	49293	50231	51087	49631
geb. Insulin	Überstand	1609	1471	1298	1272	1309	1232
Quotient	geb./frei Insulin	0,03	0,028	0,025	0,025	0,025	0,024
%	geb./ Gesamt.	2,9%	2,7%	2,5%	2,48%	2,4%	2,4%
Patient	Gesamtakt.	55379	50580	49388	47113	61808	72092
freies Insulin	Pellet	16080	18614	20694	23418	35478	45995
geb. Insulin	Überstand	39319	31966	28694	23699	26330	26097
Quotient	geb./frei Insulin	2,95	1,72	1,39	1,01	0,74	0,57
%	geb./Gesamt	71%	63,2%	58,1%	50,3%	42,6%	36,2%

Insulinantikörper mE/ml

Beurteilung: Signifikante Titer, hohes Bindungsniveau, verzögerte Dissoziation – klinisch relevant!!!

RIND: 0,22 mE/ml

SCHWEIN: 0,28 mE/ml

HUMAN: 0,38 mE/ml


Dr. C. Jaeger
 Dr. med. C. Jaeger
 Med. Klinik Thyroid Poliklinik
 Rothhölzli 6, 35392 Gießen

Abb.20: Exemplarische Darstellung der Bindungsanalyse bei einem Patienten mit hochtitrigen insulinspezifischen IgG-Ak, hohem Bindungsniveau und verzögerter Freisetzung (Originalbefund).

Eine vorhersehbare und definierte Insulinkinetik ist Voraussetzung einer zuverlässigen und guten BZ-Einstellung. Ist es bei einem Patienten zur Bildung von hoch aviden, Insulinspezifischen Antikörpern gekommen, ist diese Insulinkinetik nicht mehr vorhersagbar. Besonders unübersichtlich wird die Situation bei Verwendung von Verzögerungsinsulinen, da hier neben der Ak-bedingten Verzögerung noch die pharmakologische Verzögerung als zusätzliche Variable der Insulinwirkung hinzukommt. An diesem Punkt setzt der therapeutische Ansatz mit CSII (kontinuierliche, subkutane Insulininfusion) oder Insulinpumpentherapie an, bei der nur schnell wirksames Insulin verwandt wird, welches als individuell adaptierte Basalrate plus Mahlzeitenabhängige Bolusgabe über einen s.c. liegenden Katheter appliziert wird. Durch den Einsatz der Insulinpumpe wird somit eine Variable (Verzögerungsinsulin) eliminiert, und es gelingt eine weitaus bessere Adaptation der Insulinzufuhr an den individuellen Bedarf des Patienten. Am günstigsten ist dieser Effekt bei Verwendung eines der kurzwirksamen Insulinanaloga (LysPro oder Insulin Aspart) in der Pumpe, da hier potentiell neben der günstigen metabolischen Wirkung noch eine

immunologische Wirkung mit Umgehung der Insulinbindung bei fehlender Kreuzreaktivität wirksam werden kann, wie schon für die klassische "Insulinallergie" gezeigt (s.o.). In der Literatur ist bisher ein Fall beschrieben, bei dem durch Insulin LysPro via CSII eine immunologische Insulinresistenz erfolgreich behandelt werden konnte (Lahtela, 1997). In unserem Zentrum haben wir inzwischen 7 Patienten mit signifikanter Insulinbindung aufgrund insulinspez. IgG-Ak mit diesem Regime und gutem Erfolg behandelt (s.a. 3.5.2). Sollte dies nicht erfolgreich sein, ist in einigen Fällen jedoch auch hier eine längerfristige Steroidtherapie erforderlich mit dem Ziel, die Neubildung der Ak zu supprimieren (Ganz et al., 1990).

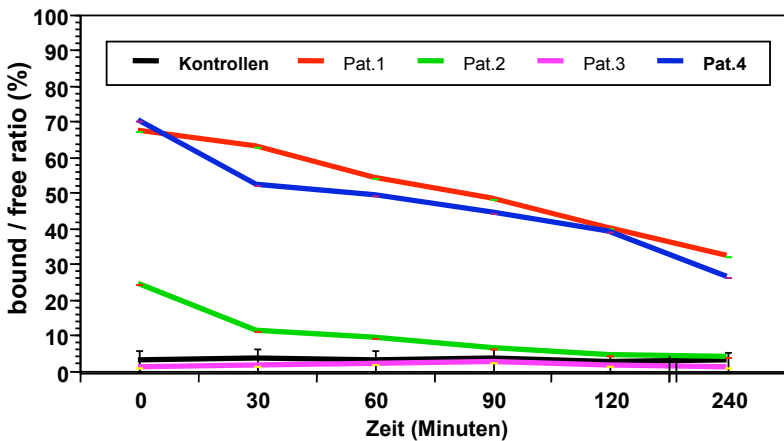
Abschließend sei noch erwähnt, daß in Fällen mit positivem Nachweis von insulinspezifischem IgG (Schritt 2) aber fehlender, signifikanter Insulinbindung (Schritt 3) nicht zwingend therapeutische Konsequenzen gezogen werden müssen. Hier wird deutlich, daß nicht der alleinige quantitative Nachweis der Insulinspezifischen Antikörper im Schritt 2 des Algorithmus, sondern erst die Analyse des Bindungsverhaltens (Schritt 3) eine Abschätzung der klinischen Relevanz der Insulinantikörper ermöglicht und damit die Grundlage für therapeutische Entscheidungen liefert. Somit sollte bei entsprechendem klinischem Verdacht zunächst die quantitative Analyse (Schritt 2) auf insulinspezifische Antikörper erfolgen. Bei negativem Ausfall erübrigt sich die Analyse des Bindungsverhaltens (Schritt 3), bei positivem Ausfall ist sie jedoch zur Interpretation zwingend erforderlich. Die Durchführung der Hauttestung (Schritt 1) ist optional und kann auf die Patienten mit dermalen Reaktionen beschränkt bleiben.

3.5.2 Exemplarische Darstellung der Befunde in vier Kasuistiken

Im Rahmen des hier vorgestellten Algorithmus zu Diagnose und Management immunologischer Komplikationen unter Insulintherapie ist im Hinblick auf die Differenzierung der klinischen Relevanz nachgewiesener Insulinspezifischer Antikörper (Schritt 2) die Analyse des Bindungsverhaltens (Schritt 3) von besonderer Bedeutung. *Abbildung 21* zeigt die individuellen Verläufe der nachfolgend vorgestellten Patienten, die Interpretation der Befunde erfolgt im Zusammenhang mit der jeweiligen Kasuistik. Ergänzend wurden 10 Typ 1 Diabetiker und 10 Typ 2 Diabetiker unter Insulintherapie ohne Therapie-assoziierte Komplikationen oder allergischer Diathese in der Anamnese und mit gut

eingestelltem Diabetes (HbA1c <7%) sowie einem Insulin-Tagesbedarf von weniger als 0.6 IU/kg als Kontrollen eingeschlossen.

Abb.21: Insulinbindung in Prozent (%) durch Insulin spezifische IgG-Antikörper und zeitlicher Verlauf der Dissoziation in Seren von 4 Patienten mit immunologisch vermittelten Komplikationen unter Insulintherapie. Patient #1 und #4 zeigen eine hohe initiale Bindung mit verzögerter Freisetzung (normal: <3%, n=20 Kontrollen). Patient #2 weist nur eine geringe Bindung mit schneller Freisetzung auf, Patient #3 zeigt keine signifikante Insulinbindung.



Kasuistik 1:

Es handelt sich um eine 24-jährige Patientin mit einem Typ 1 Diabetes seit 7 Jahren, beginnender Nephropathie, keine Neuropathie oder Retinopathie, schlanker Habitus (169 cm, 60 kg, BMI: 21). Die bisherige Therapie umfaßte eine intensiviertere Insulintherapie mit Protaphane, Actrapid und Semilente (Basis/Bolus) seit Diagnosestellung. An relevanten Begleiterkrankungen besteht eine art. Hypertonie. Die Vorstellung in unserer Diabetes-Ambulanz erfolgte wegen extrem schwankender BZ-Werte, häufigen Hyperglykämien und insbesondere nächtlichen Hypoglykämien. Das HbA1c lag bei 8.9%, die Patientin war seit Jahren als noncompliant eingeschätzt worden, der Insulinbedarf lag zeitweilig bei mehr als

150 IU/die. Es bestanden keine Hautreaktionen. Die Sekretionsanalyse zeigt erwartungsgemäß keine relevante, verbliebene C-Peptid-Reserve mehr (nü/pp <0.01 ng/ml).

Die immunologische Evaluierung entsprechend dem vorgestellten Algorithmus erbrachte im Intracutantest erwartungsgemäß keine positiven Reaktionen. In Übereinstimmung mit den negativen Hautreaktionen wurden auch keine insulinspezifischen IgE-Antikörper beobachtet. Im Gegensatz hierzu fanden sich jedoch hochtitrige insulinspezifische Antikörper der IgG-Klasse bei noch normalem Gesamt-IgG. Die Analyse des Bindungsverhaltens zeigte eine initial massiv erhöhte Insulinbindung mit bis zu 70% und eine verzögerte Freisetzung im Zeitverlauf (*Abbildung 21*). Die Diagnose lautet demnach auf "immunologische Insulinresistenz", bedingt durch insulinneutralisierende Antikörper der Klasse IgG.

Therapeutisch wurde die Patientin erfolgreich auf Insulinpumpentherapie mit Insulin Aspart umgestellt. Die Stoffwechsellage ist deutlich stabilisiert, das aktuelle HbA1c liegt bei 6.1%, die Patientin hat <1/Hypoglykämie/Monat, bisher war kein Kortison erforderlich.

Kasuistik 2:

Es handelt sich um eine 21-jährigen Patientin mit einem Typ 1 Diabetes seit 12 Jahren. Es besteht eine Nephropathie Stadium III und eine incipiente periphere Neuropathie. An Begleiterkrankungen findet sich eine Struma diffusa in Euthyreose und eine art. Hypertonie. Anlässlich eines Screening auf Vorliegen eines möglichen autoimmun polyendokrinen Syndroms, welches sich nicht bestätigte, waren bei dieser Patientin hochtitrige Insulinspezifische IgG-Ak als Zufallsbefund beschrieben worden. Die Patientin weist keine Hautreaktionen auf, sie hat unter intensivierter Insulintherapie (Basis/Bolus) eine gute BZ-Einstellung mit einem HbA1c von 6.9% ohne unklare Hypoglykämien. In der Sekretionsanalyse erwartungsgemäß keine residuale Betazellfunktion (c-Peptid nü/pp <0.1 ng/ml).

Die immunologische Evaluierung erbrachte im Intracutantest keine Hautreaktionen. Bei der Quantifizierung der Antikörper bestätigten sich die deutlich erhöhten Titer der Insulinspezifischen IgG bei negativem Insulinspezifischem IgE-Befund und normalem Gesamt IgG/IgE. *Abbildung 21* zeigt das Bindungsverhalten der Insulinspezifischen IgG bei dieser Patientin. Auffällig ist hier ein relativ niedriges Bindungsniveau mit initial ca. 22% Bindung und rascher Dissoziation. Dieses Bindungsniveau ist klinisch meist ohne

signifikanten Einfluß auf die Pharmakokinetik, was auch zu dem klinischen Bild dieser Patientin paßt. Die Diagnose lautet daher auf Insulinspezifische IgG-Ak ohne signifikante Bindung, eine spezifische Therapie ist nicht erforderlich.

Kasustik 3:

Vorgestellt werden die Befunde einer 73-jährigen Patientin mit einem Typ 2 Diabetes seit 18 Jahren. Bis vor 2 Jahren wurde der Diabetes oral therapiert, dann Umstellung auf Insuman comp 25 subcutan. An Begleiterkrankungen besteht eine art. Hypertonie, eine koronare Herzerkrankung, intermittierendes Vorhofflimmern, eine asymptomatische Cholecystolithiasis und eine Struma multinodosa in Euthyreose.

Aktueller Vorstellungsgrund in unserer Diabetes Ambulanz waren schwerste urticarielle Sofortreaktionen lokal nach s.c. Insulininjektion mit Rötung, Quaddel und Juckreiz. Konsekutiv war die Stoffwechsellage unzureichend mit einem HbA1c von 8.6%. Die Sekretionsanalyse zeigt eine verbliebene und stimulierbare endogenen Insulinreserve (c-Peptid-Werte nü/pp 1.8 ng/ml vs. 3.7 ng/ml).

Der Intrakutantest brachte bereits die Diagnose einer Protaminallergie. *Abbildung 22* zeigt den rechten Unterarm der Patientin mit der Positiv- und Negativ-Kontrolle sowie den Testlösungen mit den galenischen Zusätzen. Testlösung 8/9 enthalten Protamin und reagieren positiv. Auf dem anderen Unterarm zeigten alle Protamin-verzögerten Insulinpräparationen ebenfalls positive Reaktionen, während die schnell wirksamen Insuline und Analoga keine Reaktion zeigten. Bei der Quantifizierung der Immunglobuline fand sich lediglich ein erhöhtes Gesamt IgE bei normalem Gesamt IgG und negativen Insulinspezifischen IgG- bzw. IgE-Befunden. Die Bindungsanalyse bestätigte erwartungsgemäß keine signifikante Insulinbindung (*Abbildung 21*). Hier lautet die Diagnose demnach auf Typ 1 Allergie gegen Protamin mit lokalen Resorptionsstörungen und konsekutiv schlechter BZ-Einstellung.

Intracutan-Hauttest (Insulin)

Name: XXXXXXXXXX
 Geburtsdatum : XXXXXXXXXX
 Arzt/ Station :
 Datum :



Nr.		Sofortreaktion	verzögert	spät
1	NaCl	/	/	/
2	Histamin	++	/	/
3	Test.A	/	/	/
4	Test.B	/	/	/
5	Test.C	/	/	/
6	Test.D	/	/	/
7	Test.E	/	/	/
8	Test.F	++	/	/
9	Test.G	++	/	/
10	Höchst Ins.Basal	++	/	/
11	Höchst Ins. Rapid	/	/	/
12	Höchst Lantus	/	/	/
13	Lilly HI Normal	/	/	/
14	Lilly HI Basal	++	/	/
15	Lilly Humalog	/	/	/
16	NOVO Protaphan	++	/	/
17	NOVO Acrapid	/	/	/
18				
19				

Diagnose: Protamin-sulfat-Allergie


 Dr. med. C. J. J. J.
 Med. Klinik III und Poliklinik
 Robert-Koch-Str. 54
 53105 Bonn

Abb.22: Intracutantest: Negativkontrolle (1), Positivkontrolle (2), positive Reaktion auf Protamin (8, 9), negative Reaktion auf andere galenische Zusätze (3, 4, 5, 6, 7), Originalbefund.

Therapeutisch konnte bei erhaltener und stimulierbarer endogener Insulinreserve (s.o.) eine Rückumstellung auf alleinige orale antidiabetische Therapie erfolgreich durchgeführt werden. Die Einstellung ist befriedigend mit einem HbA1c von 7.6%. Alternativ könnte die Patientin zukünftig, falls erforderlich, auch mit schnell wirksamen Insulinen oder Analoga im Sinne einer prandialen Insulinsubstitution therapiert werden. Ergänzend hat die Patientin noch einen Allergieausweis erhalten (Cave: Heparin-Antagonisierung z.B. bei Herzkatheteruntersuchungen).

Kasustik 4:

Es handelt sich um einen 57-jährigen Patienten mit pankreoprivem Diabetes mellitus infolge Pyloruserhaltender Duodeno-Teilpankreatektomie wegen Malignomverdacht, der sich am Resektat nicht bestätigt hatte. Präoperativ zeigte der Patient das Bild eines Typ 2 Diabetes, postoperativ nun zusätzlich die pankreoprive Komponente. Aktuelle Therapie mit Berlinsulin30/70, vorher diverse andere Mischinsuline. An relevanten Begleiterkrankungen findet sich eine exokrine Pankreasinsuffizienz, eine art. Hypertonie und eine Struma multinodosa in Euthyreose.

Aktuell erfolgte die Vorstellung wegen schwerster Sofortreaktionen nach s.c. Insulininjektion mit Rötung, Quaddel und Juckreiz. Zusätzlich bestand ein "Brittle Diabetes" mit stark schwankenden BZ-Werten, häufigen Entgleisungen mit Hyper- und schweren Hypoglykämien. Das HbA1c lag bei 9.3%, der Patient hatte Gewicht abgenommen (von 82 kg auf 64 kg bei einer Körpergröße von 170 cm; aktueller BMI: 22). Die Sekretionsanalyse zeigt eine verbliebene endogene Insulinreserve. Die c-Peptid-Werte liegen jedoch auf einem hohen Plateau-Level mit bereits nü 4.1 ng/ml und fehlender Stimulierbarkeit auf pp 4.5 ng/ml (Insulinresistenz, hier immunologisch bedingt durch Insulin-Ak, s.u.).

Die immunologische Evaluierung zeigte im Intrakutantest heftigste Sofortreaktionen auf sämtliche applizierten Insuline, jedoch keine Reaktionen auf die Testlösungen mit den galenischen Zusätzen. Bei der Quantifizierung der Antikörper fanden sich extrem erhöhte Werte sowohl für das Insulinspezifische IgE, aber auch für das Insulinspezifische IgG. Auch das Gesamt IgE war erhöht, und es fand sich im Differentialblutbild eine Eosinophilie. Das Gesamt IgG war hoch normal. Bei der Analyse des Bindungsverhaltens zeigte sich eine extrem hohe initiale Bindung mit ca. 70% und verzögerter Dissoziation (*Abbildung 21*). Die Diagnose in diesem Fall lautet auf eine Kombination verschiedener immunologischer Komplikationen mit IgE-vermittelter Sofortreaktion im Sinne einer "klassischen Insulinallergie" und zusätzlich eine IgG-vermittelte immunologische Insulinresistenz durch zirkulierende und Insulinneutralisierende Antikörper. Diese Befunde erklären das klinische Bild sowohl der Hautreaktionen als auch den "Brittle Diabetes".

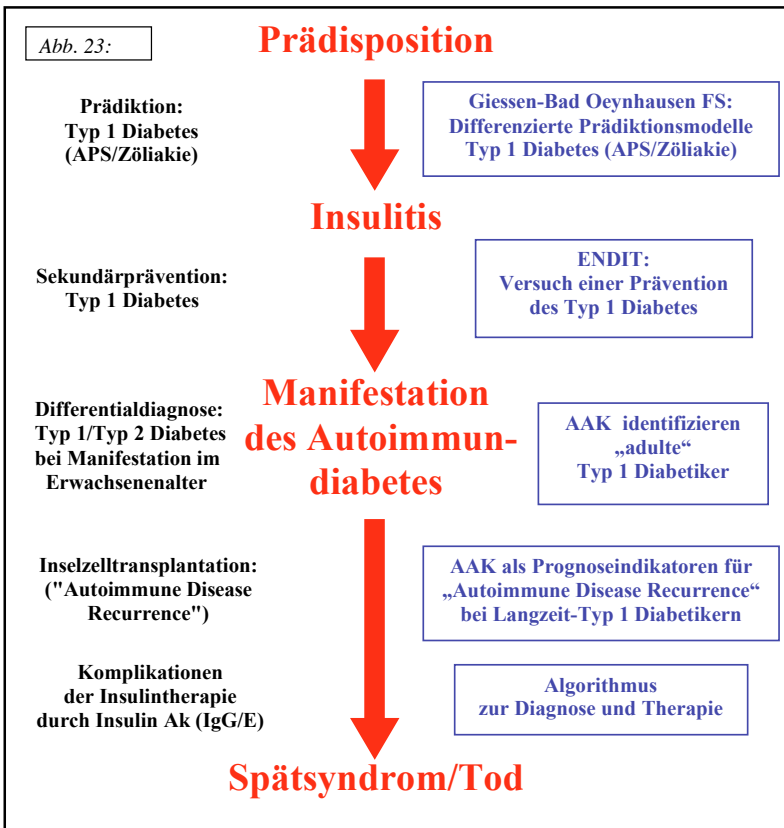
Therapeutisch versuchten wir zunächst eine Desensibilisierung in aufsteigenden Konzentrationen nach Galloway und deShazo (Galloway & deShazo, 1990), die jedoch nicht erfolgreich war. Auf eine i.v. Insulingabe unter der Vorstellung einer "Absättigung" der Antikörper haben wir in Anbetracht der Anaphylaxiegefahr bei hohem IgE und Eosinophilie

verzichtet. Da der Patient initial noch eine endogene Funktionsreserve aufwies, haben wir zunächst einen Versuch mit maximaler oraler antidiabetischer Therapie unternommen (Glinid, Biguanid, Sensitizer), um eine exogene Insulinsubstitution hinauszuzögern. Dies war zunächst erfolgreich, nach 4 Monaten trat jedoch eine Erschöpfung des Restpankreas auf, die c-Peptid-Werte fielen auf <0.6 ng/ml ohne Stimulierbarkeit. Die stationäre Wiederaufnahme des Patienten erfolgte in der Ketoazidose, er war nun zwingend auf exogene Insulinsubstitution angewiesen. Unter Kortisonstoßtherapie, ergänzt um H1/H2-Blockade gelang dann bei ausschließlicher Therapie mit dem Insulin-Analogen LysPro eine exogene Insulinsubstitution ohne Hautreaktionen und mit zunehmender Stabilisierung der BZ-Einstellung. Die Reduktion der Kortisondosis wurde am Niveau der Hautreaktion titriert, im Labor zeigte sich im Verlauf ein langsamer Abfall der Antikörperkonzentrationen und des Bindungsniveaus. Aktuell ist der Patient unter diesem Regime mit prandialer LysPro-Therapie in Kombination mit derzeit 12.5 mg Decortin H und H1/H2-Blockade weitgehend beschwerdefrei, insbesondere ohne Hautreaktionen. Das HbA1c liegt bei 7.4%, und die Hypoglykämierate ist deutlich gesunken.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß immunologische Reaktionen gegen Humaninsuline oder galenische Zusätze seltene Komplikationen darstellen, die im Einzelfall jedoch für das individuelle Management der Patienten sowie für deren Prognose von größter Bedeutung sein können. In diesem Kapitel wurden exemplarisch vier Kasuistiken von Patienten behandelt, die mit typischen immunologischen Komplikationen unter Insulintherapie in unserer Diabetes-Ambulanz vorstellig wurden. Der dargestellte Algorithmus ermöglichte in allen Fällen eine Differentialdiagnose dieser Komplikationen und eine Abschätzung der klinischen Relevanz des Problems. Hierdurch werden die verschiedenen immunologisch vermittelten Komplikationen der Insulintherapie individuell therapierbar. Derzeit planen wir in Zusammenarbeit mit der Gruppe Diabetes der Arbeitsgemeinschaft Pädiatrische Endokrinologie (APE, Prof. Schönau, Universität Köln und Prof. Holl, Universität Ulm) eine Deutschlandweite Studie zur klinischen Bedeutung der Insulin-Antikörper bei Kindern mit Typ 1 Diabetes.

4. ZUSAMMENFASSUNG UND ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNG

Die innerhalb der Diabetologie relevanten Themenfelder für Antikörper- und Autoantikörperanalysen listet nochmals *Abbildung 23* auf, entlang des natürlichen Verlaufs der Erkrankung. Gegenübergestellt sind die jeweiligen Forschungsprojekte, die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegen. Ein zentrales Anliegen war hierbei die Implementierung der neuen Autoantikörperspezifitäten GADA sowie anti-IA-2-Ak und ihre Charakterisierung unter den jeweiligen Fragestellungen zusätzlich zu den bereits bekannten und etablierten Markern.



Zentrale Voraussetzung für die Interpretation der Antikörper- und Autoantikörperbefunde sind zuverlässige Nachweismethoden. Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden wurde dies sichergestellt durch methodische Innovationen und regelmäßige Überprüfung der Assays in Ringversuchen mit besonderem Fokus auf die hier neu etablierten Assays für die GADA und anti-IA-2-Ak Bestimmungen. Die Ergebnisse in den Workshops haben zur Akreditierung des Labors als Referenzlabor durch die "Immunology of Diabetes Society (IDS)" unter dem Dach der "Centers For Disease Control (CDC)" geführt (Dr. C. Jaeger: CDC-0136).

Ein Schwerpunkt der Untersuchungen lag im Bereich des Prädiabetes mit der Entwicklung differenzierter Prädiktionsmodelle als Grundlage präventiver Maßnahmen mit dem Ziel der Verhinderung oder Verzögerung eines Typ 1 Diabetes. Die WHO Kriterien für Massenscreening mit dem Ziel einer Prädiktion und Prävention umfassen 5 Kriterien (WHO mass screening recommendations: <http://www.who.int/en>): 1) Eine frühe Erkennung der Erkrankung ist schwierig auf Basis rein klinischer Kriterien. 2) Es muß sich um eine häufige Erkrankung handeln. 3) Falls nicht erkannt, muß die Erkrankung zu schweren Komplikationen führen. Diese Kriterien sind für den Typ 1 Diabetes sämtlich erfüllt. Die Jahre bis Jahrzehnte andauernde Phase des Prädiabetes ist auf Basis klinischer Kriterien nicht zu erkennen und der Typ 1 Diabetes, mit einer Prävalenz von 1:300 (in definierten Hochrisikokollektiven wie z.B. erstgradige Verwandte von Typ 1 Diabetikern ca. 1:20), führt nach Manifestation zu schwerwiegenden Komplikationen. Vor diesem Hintergrund kann der Typ 1 Diabetes als Modellerkrankung für die Entwicklung von Screening- und Präventionsstrategien angesehen werden.

Auf die Qualität der Screening-Strategie zielt das 4. Kriterium der WHO ab: "Der Screeningtest muß eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen". Hier setzt die Giessen-Bad Oeynhausen Familienstudie an. Es gelang unter Einschluß der neuen Autoantikörperspezifitäten und nach Etablierung valider Testsysteme eine deutliche Verbesserung der bestehenden Prädiktionsmodelle. Insbesondere das vorgeschlagene Zwei-Schritt-Screening-Modell mit initial kombinierter GADA/anti-IA-2-Ak Testung und Nachtestung positiver Individuen auf ICA/IAA erzielt eine Sensitivität von über 94% bei positiven Vorhersagewerten hinsichtlich manifester Erkrankung von bis zu 70% in einem 5-Jahreszeitraum. Gleichzeitig eröffnet erst dieses methodische Vorgehen die Möglichkeit eines Massenscreening. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß die kombinierte GADA/anti-IA-2-

Testung, im Gegensatz zur früher verwendeten, ICA-basierten Strategie, sensitiver ist und methodisch einfacher, zuverlässiger und damit kostengünstiger durchgeführt werden kann.

Das 5. WHO-Kriterium fordert eine wirksame Behandlungsoption. Dies war der Ansatzpunkt für die ENDIT-Studie mit dem Ziel einer Sekundärprävention des Typ 1 Diabetes im Stadium des Prädiabetes durch hochdosierte orale Verabreichung von Nikotinamid. Diese Präventionsstrategie hat sich als nicht erfolgreich erwiesen. Derzeit werden jedoch zahlreiche alternative Protokolle bei frisch manifestierten Typ 1 Diabetikern evaluiert. Vorausgesetzt, diese Protokolle sind erfolgreich, können diese Strategien auch in der frühen Prävention des Typ 1 Diabetes eingesetzt werden.

Zusammenfassend sind also die Voraussetzungen für ein Massenscreening auf Typ 1 Diabetes nach WHO-Kriterien noch nicht vollständig erfüllt. Die großen Fortschritte bei der Prädiktion des Typ 1 Diabetes und die vielversprechenden neuen Interventionsstrategien lassen jedoch erwarten, daß eine Prävention des Typ 1 Diabetes zukünftig erreichbar sein wird. Untersuchungen hierzu sind in Planung oder bereits aufgelegt, erste Ergebnisse werden in Kürze verfügbar sein. Einige dieser Studien werden durch das neu etablierte TrialNet mit Sitz in den USA koordiniert, einem internationalen Netzwerk für die Erforschung neuer Therapien des Typ 1 Diabetes (Walter M et al., 2003).

Basierend auf den, in der Giessen-Bad Oeynhausener Kohorte, aufgefallenen hohen Koinzidenzen für Erkrankungen aus dem Formenkreis der Autoimmun Polyendokrinen Syndrome (APS) und der Zöliakie leiten wir ergänzend eine Empfehlung zum gezielten Screening im Sinne einer aktiven Fallfindung ("active case finding strategy") bei manifest erkrankten Typ 1 Diabetikern und ihren erstgradigen Verwandten ab: Manifest erkrankte Typ 1 Diabetiker sollten aufgrund der signifikanten Koinzidenzen auf SD-Antikörper (TPO \pm TG) und Zöliakie assoziierte Ak (anti-TransG-IgA \pm Gliadin) untersucht werden. Auch bei den erstgradigen Verwandten sollte, ergänzend zum Screening auf Prä-Typ 1 Diabetes und basierend auf der signifikanten Koinzidenz zusätzlich nach SD-Antikörpern (TPO \pm TG) gesucht werden. Dies insbesondere vor dem Hintergrund, daß sowohl für die Hashimoto-Thyreoiditis mit isohormonaler Therapie, als auch für die durch Diät alleine behandelbare Zöliakie, im Unterschied zum Prä-Typ 1 Diabetes, bereits etablierte Therapien zur Verfügung stehen.

Die Autoantikörperanalyse bei Manifestation eines Diabetes mellitus war Gegenstand weiterer Untersuchungen. Insbesondere die neu etablierten GADA identifizieren in ca. 10% der Fälle Patienten mit Autoimmundiabetes (Typ 1 Diabetes), die primär klinisch als Typ 2 Diabetiker imponieren, noch nicht insulinpflichtig sind, jedoch rasch zum "Sekundärversagen" voranschreiten. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Befunden anderer Arbeitsgruppen zur Häufigkeit der AAK bei Manifestation des Diabetes und der Assoziation mit früher Insulinpflichtigkeit. Die neue Klassifikation des Diabetes mellitus trägt dem Rechnung, über mögliche therapeutische Konsequenzen besteht derzeit noch kein Konsens. Diese Patienten stellen jedoch eine interessante Zielgruppe für sekundärpräventive Maßnahmen dar, da zum Zeitpunkt der Manifestation meißt noch eine signifikante residuale Betazellmasse besteht, deren Erhalt nach Ergebnissen des "Diabetes Control and Complications Trial-DCCT" (Steffes et al., 2003) einen günstigen Effekt auf die BZ-Einstellung und die Entwicklung des Spätsyndroms hat.

Die Charakterisierung der Autoantikörperantwort bei Langzeit-Typ 1 Diabetikern und die Implikationen für die Inselzelltransplantation bildeten einen weiteren Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit. So konnte erstmals am weltweit größten Kollektiv inselzelltransplantierten Patienten an einem Zentrum gezeigt werden, daß die Persistenz oder das Neuauftreten dieser AAK mit verkürztem Transplantatüberleben einhergeht, während Patienten, die negativ bleiben oder AAK im Verlauf verlieren, ein signifikant längeres Transplantatüberleben aufwiesen. So erlauben die Autoantikörperverläufe zwar im klinischen Monitoring keine zeitnahe Intervention im Sinne von "Rescue"-Strategien. Ein regelmäßiges AAK-Monitoring eröffnet jedoch die Möglichkeit einer prognostischen Stratifizierung in Abhängigkeit vom AAK-Status und damit potentiell die Option einer risikoadaptierten Immunsuppression.

Interessant sind insbesondere unsere Beobachtungen, daß die AAK durch die klassischen Immunsuppressiva offenbar nicht beeinflußt werden. Diese Befunde stützen die Hypothese einer "Disease Recurrence" als relevanten Effektormechanismus beim "immunologischen Transplantatverlust" unter klassischer Immunsuppression. Konsequenterweise wird nach neuen immunsuppressiven Protokollen gesucht, die nicht nur nicht diabetogen sind (z.B. steroidfrei), sondern sowohl die Alloreaktivität als auch die Autoreaktivität supprimieren. Das neu entwickelte, sehr erfolgreiche "Edmonton Protokoll" (Shapiro et al., 2000) verzichtet auf die klassischen Immunsuppressiva, ist Sirolimus basiert mit niedrig dosiertem Calcineurin-

Inhibitor (Tacrolimus) unter initialem Einsatz eines Interleukin 2 Rezeptor Antikörper (Daclizumab). Im Tiermodell der NOD-Maus, dem derzeit besten Modell für "Disease recurrence", hat dieses Protokoll, und hier insbesondere die Hinzunahme des Daclizumab, zu einer signifikanten Verlängerung des Inselzelltransplantatüberlebens geführt (Molano et al., 2003). Die verbesserte Suppression der "Disease Recurrence" durch dieses neue Protokoll trägt möglicherweise zu den verbesserten Ergebnissen bei. Die Evaluierung der Autoantikörpergenerierung unter diesem neuen Protokoll einschließlich weiterer humoraler und zellulärer Marker ist Gegenstand aktueller Studien mit dem Ziel, Abstoßungsmarker zu entwickeln und durch ein zeitnahes klinisches Monitoring die Erfolge der Inselzelltransplantation weiter zu verbessern.

Ein weiteres Projekt hatte zum Ziel, die mit Insulintherapie assoziierten, antikörpervermittelten Komplikationen genauer zu untersuchen. Diese sind insgesamt zwar selten, klinisch jedoch oft vieldeutig und im Einzelfall schwierig zu behandeln. Der hier erarbeitete Algorithmus zur Differentialdiagnose und zum Management der durch Insulinspezifische Antikörper der Klasse IgE und IgG verursachten Komplikationen erlaubt die definitive Differentialdiagnose der Komplikationen als Voraussetzung einer erfolgreichen Therapie. Die Evaluierung einer möglichen Antikörpergenerierung gegen die neu entwickelten Insulin-Analoga oder gegen inhalierbares Insulin sind Gegenstand aktueller Studien.

Die vorgestellten Arbeiten zeigen das breite Spektrum einer differenzierten Antikörper- und Autoantikörperanalytik innerhalb der Diabetologie. Bereits etablierte Indikationen der Analytik wurden unter Berücksichtigung der neuen AAK erweitert und genauer charakterisiert, sowie neue Indikationen, wie beispielsweise der Einsatz der Autoantikörperbestimmung bei der Inselzelltransplantation, erstmals evaluiert. Somit leistet die vorliegende Arbeit einen Beitrag zum tieferen Verständnis und innovativen Einsatz der Autoantikörper- und Antikörperanalytik in der Diabetologie.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Achenbach P, Warncke K, Reiter J, Naserke HE, Williams AJK, Bingley PJ, Bonifacio E, Ziegler AG (2004) Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics. *Diabetes* 53: 384-392
- AGPD (2004) Statements der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Diabetologie (AGPD) und der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) zur Behandlung und Langzeitbetreuung von Kinder und Jugendlichen mit Diabetes. *Diabetes und Stoffwechsel* 13: 48-62
- Airaghi L, Lorini M, Tedeschi A (2001) The insulin analog aspart: a safe alternative in insulin allergy. *Diabetes Care* 24: 2000
- Atkinson MA, Kaufman DL, Newman D, Tobin AJ, Maclaren NK (1993) Islet cell cytoplasmic autoantibody reactivity to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 91: 350-356
- Baekkeskov S, Nielsen JH, Marnier B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark A (1982) Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature* 298: 167-169
- Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen, DeCamilli P (1990) Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347: 151-156
- Banting FG, Best CH (1922) The internal secretion of the Pancreas. *J Lab Clin Med* 7: 251-266
- Bartlett ST, Chin T, Dirden B, Quereshi A, Hadley G (1995) Inclusion of peripancreatic lymph node cells prevents recurrent autoimmune destruction of islet transplants: evidence of donor chimerism. *Surgery* 118: 392-397
- Betterle CM, Volpato M, Smith BR (1997) Adrenal cortex and steroid 21-hydroxylase autoantibodies in adult patients with organ-specific autoimmune diseases: Markers of low progression to overt Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 932-938
- Bigazzi PE (1990) Autoimmunity in diabetes mellitus and polyendocrine syndromes: current concepts of pathogenesis and etiology. *Immunol Ser* 52: 295-322
- Bingley P,J, Christie MR, Bonifacio E, Bonfanti R, Shattock M, Monte MT, Bottazzo GF, Gale EAM (1994) Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody positive relatives. *Diabetes* 43: 1304-1310

- Bonifacio E, Bingely PJ, Shattock M, Dean BM, Dunger D, Gale EA, Bottazzo GF (1990) Quantification of islet-cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 335: 147-149
- Bonifacio E, Boitard C, Gleichmann H, Shattock MA, Molenaar JL, Bottazzo GF (1990) Assessment of precision, concordance, specificity and sensitivity of islet cell antibody measurement in 41 assays. *Diabetologia* 33: 731-736
- Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E (1995) Identification of tyrosine phosphatase-like IA-2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes related 37/40K autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *J Immunol* 155: 5419-5426
- Bonifacio E, Genovese S, Braghi S, Bazzigaluppi E, Lampasona V, Bingely PJ, Rogge I, Pastore MR, Boggetti E, Bottazzo GF (1995) Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity. *Diabetologia* 38: 816-822
- Bosi E, Braghi S, Maffi P, Scirpoli M, Bertuzzi F, Pozza G, Secchi A, Bonifacio E (2001) Autoantibody response to islet transplantation. *Diabetes* 50: 2464-2471
- Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D (1974) Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 30: 1279-1283
- Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, MacKay EH, Swift PG, Gamble DR (1985) In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N Engl J Med* 8: 353-360
- Braghi S, Bonifacio E, Secchi A, Di Carlo V, Pozza G, Bosi E (2000) Modulation of humoral islet autoimmunity by pancreas allotransplantation influences allograft outcome in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 49: 218-224
- Brendel MD, Eckhard M, Brandhorst D, Brandhorst H, Winter D, Jaeger C, Jahr H, Ziegler A, Iken M, Hongwei S, Weimer R, Rau W, Padberg W, Bretzel RG (2003) Inselzelltransplantation-aktueller Stand und Perspektiven. *Diabetes und Stoffwechsel* 5: 239-252
- Bretzel RG (2000) Sozioökonomische Aspekte des Diabetes mellitus und seiner Folgeschäden. In Bretzel (Hrsg): *Diabetes mellitus-Prävention und Therapie diabetischer Folgeerkrankungen*, 1. Auflage, Seiten 199-214. UNI-MED, Bremen
- Bretzel RG, Brendel M, Eckhard M, Brandhorst D, Jaeger C, Hatzigelaki E, Federlin K (2001) Islet transplantation: present clinical situation and future aspects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109: 384-399
- Bretzel RG (2003) Pancreatic islet and stem cell transplantation in diabetes mellitus: results and perspectives. *Adv Exp Med Bio* 534: 69-96

- Brooks-Worrell BM, Peterson KP, Peterson CM, Palmer JP, Jovanovic L (2000) Reactivation of type 1 diabetes in patients receiving human fetal pancreatic tissue transplants without immunosuppression. *Transplantation* 69: 166-172
- Brostoff J, Scadding GK, Male D, Roitt IM (1991) Functions of the adaptive Immune system. In: Brostoff J, Scadding GK, Male D, Roitt IM (Hrsg.): *Clinical Immunology*, 1. Auflage, Seiten 1.1.-1.6. Gower Medical Publishing, London
- Canadian European Randomized Control Trial Group (1988) Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention. Association of 1 year of cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion. *Diabetes* 37: 1574-1582
- Carlsson A, Sundkvist G, Groop L, Tuomi T (2000) Insulin and glucagon secretion in patients with slowly progressing autoimmune diabetes (LADA). *J Clin Endocrinol Metab* 85: 76-80
- Casparly WF, Stein J (1999) Disease of the small intestine. *Europ J Gastroenterol Hepatol* 11: 21-25
- Castano L, Ziegler AG, Ziegler R, Shoelson S, Eisenbarth GS (1993) Characterization of insulin autoantibodies in relatives of patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 42: 1202-1209
- Christie M, Pipeleers DG, Lernmark A, Baekkeskov S (1990) Cellular and subcellular localization of a Mr 64000 protein autoantigen in insulin-dependent diabetes. *J. Biol Chem* 265: 376-381
- Christie M, Roll U, Payton MA, Hatfield EC, Ziegler AG (1997) Validity of screening for individuals at risk for type 1 diabetes by combined analysis of antibodies to recombinant proteins. *Diabetes Care* 20: 965-970
- Cooper SD (2001) Subclinical hypothyroidism. *N Engl J Med* 345: 260-265
- Corazza GR, Gasbarrini G: Celiac disease in adults (1995). *Baillieres Clin Gastroenterol* 9: 329-350
- Cronin CC, Feighery A, Ferriss JB, Liddy C, Shanahan F, Feighery C (1997) High prevalence of celiac disease among patients with insulin-dependent (type 1) diabetes mellitus. *Am J Gastroenterol* 92: 2210-2212
- Diabetes Prevention Trial-Type 1 Diabetes Study Group (2002) Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 346: 1685-1691
- De Filippo G, Carel JC, Boitard C, Bougneres PF (1996) Long-term results of early cyclosporin therapy in juvenile IDDM. *Diabetes* 45: 101-104

- Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D (1997) Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 3: 797-801
- DiMario U, Irvine WJ, Borseley DQ, Kyner JL, Weston J, Galfo C (1983) Immune abnormalities in diabetic patients not requiring insulin at diagnosis. *Diabetologia* 25: 392-395
- Discher T, Seipke G, Friedmann E, Velcovsky HG, Federlin K (1990) Recurrent hypoglycemia in the insulin autoimmune syndrome. *Dtsch Med Wschr* 115: 1950-1955
- Dittler J, Seidel D, Schenker M, Ziegler AG (1998) GADIA2-combi determination as first-line screening for improved prediction of type 1 diabetes in relatives. *Diabetes* 47: 592-597
- Esmatjes E, Rodriguez-Villar C, Ricart MJ, Casamitjana R, Martorell J, Sabater L, Astudillo E, Fernandes-Cruz L (1998) Recurrence of immunological markers for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in immunosuppressed patients after pancreas transplantation. *Transplantation* 66: 128-131
- Eapen SS, Connor EI, Gern JE (2000) Insulin desensitization with insulin lispro and an insulin pump in a 5-year-old child. *Ann Allergy Asthma Immunol* 86: 395-397
- EURODIAB ACE Study Group (2000) Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. *Lancet* 355: 873-876
- Farrell RJ, Kelly CP (2002) Celiac sprue. *N Engl J Med* 17: 180-188
- Federlin K (1985) Diabetes mellitus and immunology - a manifold interrelation. *Immun Infekt* 15: 1893-1899
- Federlin K, Ditschuneit H, Pfeiffer EF (1971) Insulinallergie und Insulinresistenz. In: Pfeiffer (Hrsg) *Diabetes mellitus Bd II*, 1. Auflage, Seiten 1141-1177, J.F. Lehmanns Verlag, München
- Forster G, Krummenauer F, Kuhn I, Beyer J, Kahaly G (1999) Polyglandular autoimmune syndrome typ II: Epidemiology and forms of manifestation. *Dtsch Med Wschr* 124: 1476-1481
- Francis AJ, Hanning I, Alberti KGGM (1985) The influence of insulin antibody levels on the plasma profiles and action of subcutaneously injected human and bovine short acting insulins. *Diabetologia* 28: 330-334
- Freiesleben De Blasio B, Bak P, Pociot F, Karlens AE, Nerup J (1999) Onset of type 1 diabetes: a dynamical instability. *Diabetes* 48: 1677-1685

- Gale EA (1996) Nicotinamide: potential for the prevention of type 1 diabetes? *Horm Metab Res* 28: 361-364
- Galloway JA, deShazo RD (1990) In *Diabetes mellitus: theory and practice*. Ellenberg M, Rifkin H, Eds. New Hyde Park, NY Med Exam, pp 506-508
- Gambelunghe G, Falornie A, Ghaderi M (1999) Mikrosatellite polymorphism of the MHC class I chain-related (MIC-A and MIC-B) genes marks the risk for autoimmune Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 3701-3707
- Ganz MG, Untermann T, Roberts M, Uy R, Sahgal S, Samter M, Grammer LC (1990) Resistance and allergy to recombinant human insulin. *J Allergy Clin Immunol* 86: 45-52
- Gepts W (1965) Pathological anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 14: 619-633
- Giannoukakis M, Rudert WA, Robbins PD, Trucco M (1999) Targeting autoimmune diabetes with gene therapy. *Diabetes* 48: 2107-2121
- Gilmour J, Brownlee Y, Foster P, Geekie C, Kelly P, Robertson S, Wade E, Braun HB, Staub U, Michel G, Lazarus JH, Parkes AB (2000) The quantitative measurement of autoantibodies to thyroglobulin and thyroid peroxidase by automated microparticle based immunoassays in Hashimoto's disease, Graves disease and a follow-up study on postpartum thyroid disease. *Clin Lab* 46: 57-61
- Gottsäter A, Landin-Olsson M, Lernmark A, Fernlund P, Sundkvist G (1994) Islet cell antibodies are associated with beta-cell failure also in adult onset diabetic patients. *Acta Diabetol* 31: 226-231
- Groop LC, Bottazzo GF, Doniach D (1986) Islet cell antibodies identify latent type 1 diabetes in patients aged 35-75 years at diagnosis. *Diabetes* 35: 237-241
- Guo Z, Wu T, Kirchoff N, Mital D, Williams JW, Azuma M, Sutherland DE, Hering BJ (2001) Immunotherapy with nondepleting anti-CD4 monoclonal antibodies but not CD28 antagonists protects islet graft in spontaneously diabetic NOD mice from autoimmune destruction and allogeneic and xenogeneic graft rejection. *Transplantation* 71: 1656-1665
- Haffner SM (2003) Insulin resistance, inflammation, and the prediabetic state. *Am J Cardiol* 92: 18J-26J
- Harris ML (1995) Epidemiologic studies on the pathogenesis of non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Clin Invest Med* 18: 231-239

- Helfand M, Refern CC (1998) Screening for thyroid disease: an update. *Ann Intern Med* 129:144-158
- Hendriksen C, Faber OK, Drejer J, Binder C (1977) Prevalence of residual beta cell function in insulin treated diabetics evaluated by the plasma C-peptide response to intravenous glucagon. *Diabetologia* 13: 615-619
- Hering BJ, Ricordi C (1999) Results, research priorities, and reasons for optimism: islet transplantation for patients with type 1 diabetes. *Graft* 2: 12-27
- Hirata Y, Ishizu H (1972) Elevated insulin-binding capacity of serum proteins in a case with spontaneous hypoglycemia and mild diabetes not treated with insulin. *Thoku J Exp Med* 107: 277-286
- Holl RW, Boehm B, Loos V, Grabert M, Heinze E, Homoki J (1998) Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes: effect of age, gender and HLA type. *Horm Metabol Res* 52: 113-118
- Houlston RS, Tomlinson IP, Ford D, Seal S, Marossy AM, Ferguson A, Holmes GK, Hosie KB, Howdle PD, Jewell DP, Godkin A, Kerr GD, Kumar P, Logan RF, Love AH, Johnston S, Marsh MN, Mitton S, O'Donoghue D, Roberts A, Walker-Smith JA, Stratton MF (1997) Linkage analysis of candidate regions for celiac disease genes. *Hum Mol Genet* 6: 1335-1339
- Hummel M, Bonifacio E, Stern M, Dittler J, Schimmel A, Ziegler AG (2000) Development of celiac disease-associated antibodies in offspring of parents with type 1 diabetes. *Diabetologia* 43: 1005-1011
- Irvine WJ, Gray RS, McCallum CJ (1976) Pancreatic islet-cell antibody as a marker for asymptomatic and latent diabetes and prediabetes. *Lancet* 20: 1097-1102
- Joslin E, Gray H, Root R (1922) Insulin in Hospital and home. *J Metabolic Res* 2: 651-658
- Kerner W, Fuchs C, Redaelli M, Böhm BO, Köbberling J, Scherbaum W, Tillil H (2001) Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes Mellitus. In: Scherbaum WA, Lauterbach KW, Joost HG, Hrsg. *Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinien DDG, 2001*
- Koulmanda M, Quipo A, Smith RN, Auchincloss H Jr. (2003) Pig islet xenografts are resistant to autoimmune destruction by non-obese diabetic recipients after anti-CD4 treatment. *Xenotransplantation* 10: 178-184
- Kocza K, Bonifacio E, Ziegler AG (2004) Transmission of maternal islet antibodies and risk of autoimmune diabetes in offspring of mothers with type 1 diabetes. *Diabetes* 53: 1-4

- Kuglin B, Kolb H, Greenbaum C, Maclaren NK, Lernmark A, Palmer JP (1990) Workshop Report: The fourth international workshop on the standardization of insulin autoantibody measurement. *Diabetologia* 33: 147-150
- Kumana CR, Cheung BMY, Lauder IJ (1999) Gauging the impact of statins using number needed to treat. *JAMA* 282: 1899-1901
- Kumar D (1997) Lispro analog for the treatment of generalized allergy to human insulin. *Diabetes Care* 20: 1357-1359
- Lahtela JT, Knip M, Paul R, Antonen J, Salmi J (1997) Severe antibody-mediated human insulin resistance: successful treatment with the insulin analog lispro. a case report. *Diabetes Care* 20: 71-73
- Lampasona V, Bazzigaluppi E, Barera G, Bonifacio E (1998) Tissue transglutaminase and combined screening for celiac disease and type 1 diabetes associated autoantibodies. *Lancet* 352: 1192-1193
- Landin-Olsson M, Karlsson A, Dahlquist G, Blom L, Lernmark A, Sundkvist G (1989) Islet cell and other organ-specific autoantibodies in all children developing type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in Sweden during one year and in matched control children. *Diabetologia* 32: 387-395
- Lampeter EF, Klinghammer A, Scherbaum W, Heinze E, Haastert B, Giani G, Kolb H and the DENIS Group (1998) The Deutsche Nicotinamide Intervention Study. *Diabetes* 47: 980-984
- Lernmark A, Molenaar JL, von Beers WA, Yamagucki Y, Nagataki S, Ludvigsson J, Maclaren NK (1991) The fourth international serum exchange workshop to standardize cytoplasmic islet cell antibodies: The Immunology and Diabetes workshops and participating Laboratories. *Diabetologia* 34: 534-535
- Littorin B, Sundkvist G, Hagopian W, Landin-Olsson M, Lernmark A, Ostman J, Arnqvist HI, Blohme G, Bolinder J, Eriksson JW, Lithner F, Schersten B, Wibell L (1999) Islet cell and glutamic acid decarboxylase antibodies present at diagnosis of diabetes predict the need for insulin treatment: a cohort study in young adults whose disease was initially labeled as type 2 or unclassifiable diabetes. *Diabetes Care* 22: 409-412
- Lohmann T, Kratzsch J, Kellner K, Witzigmann H, Hauss J, Paschke R (2001) Severe hypoglycemia due to insulin autoimmune syndrome with insulin autoantibodies crossreactive to proinsulin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109: 245-248
- Mäki M, Collin P (1997) Celiac disease. *Lancet* 349: 1755-1759

- Makhlouf L, Kishimoto K, Smith RN, Abdi R, Koulmanda M, Winn HJ, Auchincloss H jr., Sayegh MH (2002) The role of autoimmunity in islet allograft destruction. Major histocompatibility complex class II matching is necessary for autoimmune destruction of allogeneic islet transplants after T-cell costimulatory blockade. *Diabetes* 51: 3202-3210
- Mandrup-Poulsen T, Molvig J, Andersen HU, Helqvist S, Spinass GA, Munck M, the Canadian-European Randomized Control Trial Group (1990) Lack of predictive value of islet cell antibodies, insulin antibodies and HLA-DR phenotype for remission in cyclosporin-treated IDDM patients. *Diabetes* 39: 204-210
- Marner B, Lernmark A, Nerup J, Molenaar JL, Tuk CW, Bruining GJ (1986) Analysis of islet cell antibodies on frozen sections of human pancreas. *Diabetologia* 25: 93-96
- Millar DG, Garza KM, Odermatt B, Elford AR, Ono N, Li Z, Ohashi PS (2003) Hsp 70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo. *Nature Medicine* 9: 1469-1472
- Molano RD, Pileggi A, Berney T, Poggioli R, Zahr E, Oliver R, Malek TR, Ricordi C, Inverardi L (2003) Long-term islet allograft survival in nonobese diabetic mice treated with tacrolimus, rapamycin, and anti-interleukin-2 antibody. *Transplantation* 75: 1812-1819
- Moriyama H, Nagata M, Fujihira K, Yamada K, Chowdhury SA, Chakrabarty S, Zhenzi J, Yasuda H, Ueda H, Yokono K (2001) Treatment with human analog insulin glargine resolves a generalized allergy to human insulin in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24: 411-412
- Myers MA, Rabin DU, Rowley MJ (1995) Pancreatic islet cell cytoplasmic antibody in diabetes is represented by antibodies to islet cell antigen 512 and glutamic acid decarboxylase. *Diabetes* 44: 1290-1295
- Näf S, Esmatjes E, Recadens M, Valero A, Halperin I, Levy I, Gomis R. Continuous subcutaneous insulin infusion in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2001 25: 634-635
- Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, Krohn KJ, Lalioti MD, Mullis PE, Antonarakis SE, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, Shimizu N (1997) Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* 17: 393-398
- Naserke HE, Dozio N, Ziegler AG, Bonifacio E (1998) Comparison of a novel micro-assay for insulin autoantibodies with the conventional radiobinding assay. *Diabetologia* 41: 681-683

- Neufeld M, Maclaren NK, Blizzard RM (1980) Autoimmune polyendocrine Syndromes. *Pediatr Ann* 9: 154-162
- Nerup J, Andersen OO, Bendixen G, Egeberg J, Poulsen JE (1971) Anti-pancreatic cellular hypersensitivity in diabetes mellitus. *Diabetes* 20: 424-427
- Nerup J, Mandrup-Poulsen T, Helqvist S, Andersen HU, Pociot F, Reimers JI, Cuartero BG, Karlens AE, Bjerre U, Lorenzen T (1994) On the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 37: 82-89
- Niskanen LK, Tuomi T, Karjaainen J, Groop LC, Uusitupa MI (1995) GAD antibodies in NIDDM: ten-year follow-up from the diagnosis. *Diabetes Care* 18: 1557-1565
- Payton MA, Hawkes CJ, Christie MR (1995) Relationship of the 37.000 and 40.000 Mr tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 (ICA 512). *J Clin Invest* 96: 1506-1511
- Petersen JS, Hejnaes KR, Moody A, Karlens AE, Marshall MO, Hoier-Madsen M, Boel E, Michelsen BK, Dyrberg T (1994) Detection of GAD 65 antibodies in diabetes and other autoimmune diseases using a simple radioligand assay. *Diabetes* 34: 459-467
- Petersen JS, Dyrberg T, Karlens AE, Molvig J, Michelsen B, Nerup J, Mandrup-Poulsen T, the Candian-European Randomized Control Trial Group (1994) Glutamic acid decarboxylase (GAD 65) autoantibodies in prediction of betacell function and remission in recent-onset IDDM after cyclosporin treatment. *Diabetes* 43: 1291-1296
- Petri M, Karlson EW, Cooper DS, Ladenson PW (1991) Autoantibody tests in autoimmune thyroid disease: a case-control study. *J Rheumatol* 18: 1529-1531
- Pozzilli P & DiMario U (2001) Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (latent autoimmune diabetes in adult): definition, characterization, and potential prevention. *Diabetes Care* 24: 1460-1467
- Rabinowe SL, Eisenbarth GS (1986) Polyglandular autoimmunity. *Adv Intern Med* 31: 293-307
- Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, Cohen IR (2001) Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat shock protein peptid (DiaPep 277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet* 358: 1749-1753
- Richter W, Endl J, Eiermann TH, Brandt M, Kientsch-Engel R, Thivolet C, Junfer H, Scherbaum WA (1992) Human monoclonal islet cell antibodies from a patient with insulin-dependent diabetes mellitus reveal glutamate decarboxylase as the target antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8467-8471

- Riley WJ, MacLaren NK, Krischer J, Spillar RP, Silverstein JH, Schatz DA, Schwartz S, Malone J, Shah S, Vadheim C, Rotter JL (1990) A prospective study of the development of diabetes in relatives of patients with insulin-dependent diabetes. *N Engl J. Med* 323: 1167-1172
- Riley WJ (1992) Autoimmune polyglandular Syndromes. *Horm Res* 38: 9-15
- Roep BO, Stobbe I, Duinkerken G, van Rood JJ, Lernmark A, Keymeulen B, Pipeleers D, Claas FHJ, deVries RRP (1999) Auto-and alloimmune reactivity to human islet allografts transplanted into type-1 diabetic patients. *Diabetes* 48: 484-490
- Roll U, Ziegler AG (1997) Combined antibody screening for improved prediction of IDDM - Modern strategies. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105: 1-14
- Rossini AA (2004) Autoimmune Diabetes and the Circle of Tolerance. *Diabetes* 53: 267-275
- Savola K, Sabbah E, Kulmala P, Vähäsalo P, Ilonen J, Knip M (1998) Autoantibodies associated with type 1 diabetes mellitus persist after diagnosis in children. *Diabetologia* 41: 1293-1297
- Scherthaner (1993) Immunogenicity and allergic potential of animal and human insulins. *Diabetes Care* 16: 155-165
- Scherthaner G, Hink S, Kopp HP, Muzyka B, Streit G, Kroiss A (2001) Progress in the characterization of slowly progressive autoimmune diabetes in adult patients (LADA of type 1.5 diabetes). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109: 94-108
- Schranz DB, Bekris L, Landin-Olsson M, Torn C, Nilang A, Toll A, Sjöström J, Grönlund H, Lernmark A (2000) Newly diagnosed latent autoimmune diabetes in adults (LADA) is associated with low level glutamate decarboxylase (GAD65) and IA-2 autoantibodies: Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Horm Metab Res* 32: 133-138
- Schumm-Dräger PM, Padberg S, Heller K (1999) Prophylactic levothyroxine therapy in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107: 84-87
- Schwartz RS (1999) The new immunology-the end of immunosuppressive drug therapy? *N Engl J Med* 340: 1754-1756
- Seissler J, Hering B, Richter W, Glück M, Yassin NGF, Bretzel RG, Boehm BO, Federlin K, Scherbaum K (1992) Antibodies to the Mr 64000 (64K) protein in islet cell antibody positive non-diabetic individuals indicate high risk for impaired beta-cell function. *Diabetologia* 35: 550-554
- Seissler J, Amann J, Mauch L, Haubruck H, Wolfahrt S, Bieg S, Richter W, Holl R, Heinze E, Northemann W, Scherbaum WA (1993) Prevalence of autoantibodies to the Mr 65.000 and Mr 67.000 isoform of glutamate decarboxylase (GAD) and type 1 diabetes

- mellitus with coexisting autoimmune polyendocrine syndrome II. *Autoimmunity* 19: 231-238
- Seissler J, Morgenthaler NG, Achenbach P, Lampeter EF, Glawe D, Payton M, Christie M, Scherbaum WA (1996) Combined screening for autoantibodies to IA-2 and antibodies to glutamic acid decarboxylase in first degree relatives of patients with IDDM. The DENIS Study Group. *Deutsche Nikotinamid Interventions-Studie. Diabetologia* 39: 1351-1356
- Seissler J, de Sonnaville JJ, Morgenthaler NG, Steinbrenner H, Glawe D, Khoo-Morgenthaler UY, Lan MS, Notkins AL, Heine RJ, Scherbaum WA (1998) Immunological heterogeneity in type 1 diabetes: presence of autoantibody patterns in patients with acute onset and slowly progressive disease. *Diabetologia* 41: 891-897
- Seissler J, Schott M, Boms S, Wohlrab U, Ostendorf B, Morgenthaler NG, Scherbaum WA (1999) Autoantibodies to human tissue transglutaminase identify silent coeliac disease in type 1 diabetes. *Diabetologia* 42: 1440-1441
- Shapiro AJM, Lakey JRT, Ryan AE, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV (2000) Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343: 230-238
- Sibley R, Sutherland D, Goetz F (1985) Recurrent diabetes mellitus in the pancreas iso and allograft. *Lab Invest* 53: 132-144
- Singal DP, Blajchman MA (1997) Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. *Diabetes* 22: 429-432
- Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vardtal F, Thorsby E (1989) Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med* 169: 345-350
- Sorenson RL, Garry DG, Brelje TC (1991) Structural and functional considerations of GABA in islets of Langerhans, beta cells and nerves. *Diabetes* 40: 1365-1374
- Stanley HM, Norris JM, Barriga K, Hoffman M, Yu L, Miao D, Erlich H, Eisenbarth GS, Rewers M (2004) Is presence of islet autoantibodies at birth associated with development of persistent islet autoimmunity? *Diabetes Care* 27: 497-502
- Steffes MW, Sibley S, Jackson M, Thomas W (2003) Betacell function and the development of diabetes-related complications in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care* 26: 832-836

- Stegall MD, Lafferty KJ, Kam I, Gill RG (1996) Evidence of recurrent autoimmunity in human allogeneic islet transplantation. *Transplantation* 63: 1272-1274
- Stegall MD, Lobermann Z, Ostrowska A (1996) Autoimmune destruction of islet grafts in the NOD mouse is resistant to 15-deoxyspergualin but sensitive to anti-CD4 antibody. *J Surg Res* 64: 156-160
- Stewart LA, van-Driel IR, Toh BH, Gleeson PA (1999) Species-specific distribution of alpha-galactosyl epitopes on the gastric H/K ATPase beta-subunit. *Glycobiology* 9: 601-616
- Sundkvist G, Tyden G, Karlsson FA, Bolinder J (1998) Islet autoimmunity before and after pancreas transplantation in patients with type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 41: 1532-1534
- Tarn AC, Thomas JM, Dean BM, Ingram D, Schwarz G, Bottazzo GF, Gale EA (1988) Predicting insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1: 845-850
- Terada M, Salzer M, Lennartz K, Mullen F (1988) The effect of H2 compatibility on pancreatic beta cell survival in the nonobese diabetic mouse. *Transplantation* 45: 622-627
- Thivolet Ch, Abou-Amara S, Martin X, Lefrancois N, Petruzzo P, McGregor B, Bosshard S, Dubernard JM (2000) Serological markers of recurrent beta cell destruction in diabetic patients undergoing pancreatic transplantation. *Transplantation* 69: 99-103
- Tiedge M (2003) Betazell-Zerstörung im Autoimmundiabetes: Zytokine, freie Radikale und die Schwäche, sich dagegen zu wehren. *Diabetes und Stoffwechsel* 12: 189-192
- Tuomi T, Groop LC, Zimmet PZ, Rowley MJ, Knowles W, Mackay IR (1993) Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non insulin-dependent onset of disease. *Diabetes* 42: 359-362
- Tuomilehto J, Karvonen E, Pitkaniemi J, Virtala E, Kohtamaki K, Toivanen L, Tuomilehto-Wolf E (1999) Record-high incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes in Finnish children. The Finnish Childhood Type 1 Diabetes Registry Group. *Diabetologia* 42: 655-660
- Turner R, Stratton I, Horton V, Manley S, Zimmet P, Mackay IR, Shattock M, Bottazzo GF, Holman R. (1997) UKPDS 25: Autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. UK Prospective Diabetes Study Group. *Lancet* 31: 351-376
- Tyden G, Reinhold FP, Sundkvist G, Bolinder J (1996) Recurrence of autoimmune diabetes mellitus in recipients of cadaveric pancreatic grafts. *N Engl J Med* 335: 860-863

- Usadel KH, Schumm-Draeger PM (2003) Autoimmunthyreoiditis: Behandlung mit schilddrüsenhormonen bei subklinischer Hypothyreose oder schon bei Euthyreose. *Internist* 44: 433-439
- Vanderpump MP, Tunbridge WM, French JM, Appleton D, Bates D, Clark F, Grimley EJ, Hasan DM, Rodgers H, Tunbridge F (1995) The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Wickham Survey. *Clin Endocrinol (Oxf)* 43: 55-68
- van Haeften TW (1989) Clinical significance of insulin antibodies in insulin-treated diabetic patients. *Diabetes Care* 12: 641-648
- van Haeften TW, Heiling VJ, Gerich JE (1987) Adverse effects of insulin antibodies on postprandial plasma glucose and insulin profiles in diabetic patients without immune insulin resistance. Implications for intensive insulin regimens. *Diabetes* 36: 305-309
- Velcovsky H, Federlin K (1982) Insulin-specific IgG and IgE antibody response in type 1 diabetic subjects exclusively treated with human insulin (recombinant DNA). *Diabetes Care* 5: 126-131
- Verge CF, Gianni R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS (1996) Prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives using a combination of Insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 45: 926-933
- Vogel A, Strassburg C, Brabant G, Manns MP (2002) Autoimmun polyglanduläre Syndrome. *Dtsch Ärzteblatt* 21: 1194-1199
- Volta U, De-Franceschi L, Molinaro N, Tetta C, Bianchi FB (1997) Organ-specific autoantibodies in celiac disease: do they represent an epiphenomenon or the expression of associated autoimmune disorders? *Ital J Gastroenterol Hepatol* 29: 18-21
- Walter M, Ziegler AG, Achenbach P (2003) TrialNet - ein internationales Netzwerk für die Erforschung neuer Therapien des Typ 1 Diabetes. *Diabetes und Stoffwechsel* 12: 263-269
- Wang Y, McDuffie M, Nomikos IN, Hao L, Lafferty KJ (1988) Effect of cyclosporin on immunologically mediated diabetes in nonobese diabetic mice. *Transplantation* 46: 1018-1028
- Weetman AP (1995) Autoimmunity to steroid-producing cells and familial polyendocrine autoimmunity. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 9: 157-174
- Wiest-Ladenburger U, Hartmann R, Hartmann U, Berling K, Boehm BO, Richter W (1997) Combined analysis and single-step detection of GAD 65 and IA-2 autoantibodies in IDDM can replace the histochemical islet cell antibody test. *Diabetes* 46: 565-571

- Yoon JW, Yoon CS, Lim HW, Huang QQ, Kang Y, Pyun KH, Hirasawa K, Sherwin RS, Jun HS (1999) Control of autoimmune diabetes in NOD mice by GAD expression or suppression in beta cells. *Science* 284: 1183-1187
- Yu L, Brewer KW, Gates S, Wu A, Wang T, Babu SR, Gottlieb PA, Freed BM, Noble J, Erlich HA, Rewers MJ, Eisenbarth GS (1999) DRB1*04 and DQ alleles: expression of 21-hydroxylase autoantibodies and risk of progression to Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 328-335
- Zhang YC, Pileggi A, Agarwal A, Molano RD, Powers M, Brusko T, Wasserfall C, Goudy K, Zahr E, Poggioli R, Scott-Jorgensen M, Campbell-Thompson M, Crawford JM, Nick H, Flo T, Ellis TM, Ricordi C, Inverardi L, Atkinson MA (2003) Adeno-associated virus-mediated IL-10 gene therapy inhibits diabetes recurrence in syngeneic islet cell transplantation of NOD mice. *Diabetes* 52: 708-716
- Ziegler AG, Rabl W, Albert E, Standl E (1991) Insulin-Autoantikörper und Inselzell-Antikörper in Abhängigkeit vom Manifestationsalter und HLA-Phänotyp bei Patienten mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes. *Dtsch Med Wschr* 116: 1737-1741
- Ziegler AG, Scherbaum WA: Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese des Typ 1 Diabetes. In Mehnert, Standl, Usadel (Hrsg) *Diabetologie in Klinik und Praxis*, 4. Auflage. Seiten 40-52. Thieme Verlag, Stuttgart, 1999
- Ziegler AG, Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E (2003) Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes associated autoantibodies. *JAMA* 290: 1721-1728
- Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay IT, Rowley MJ, Knowles W, Cohen M (1994) Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabetic Med* 23: 299-303
- Zimmet PZ (1995) The pathogenesis and prevention of diabetes in adults: genes, autoimmunity, and demography. *Diabetes Care* 18: 1050-1064

6. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. R.G. Bretzel, Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik III am Klinikum der Justus-Liebig Universität Giessen, bin ich zutiefst zu Dank verpflichtet. Bereits seit meiner Dissertation in seiner Arbeitsgruppe zum Thema der xenogenen Inselzelltransplantation bin ich meinem akademischen Lehrer eng verbunden. Er hat meine Freude an der Wissenschaft geweckt, mich kontinuierlich unterstützt und mir großzügig Raum zum eigenständigen wissenschaftlichen Arbeiten gegeben. Besonders dankbar bin ich auch für die fundierte klinische Ausbildung in der Poliklinischen Inneren Medizin, die ich unter seiner Anleitung durchlaufen konnte und die mich geprägt hat. Der durch ihn vertretene, ganzheitlicher Ansatz in der Betreuung internistischer Patienten sind mir Vorbild und Ansporn.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Drs. h.c. K. Federlin, em. Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik III am Klinikum der Justus-Liebig Universität Giessen, der mich früh auf die Spur der Immunologie beim Diabetes mellitus gebracht hat. Sein langjähriges und stetes Engagement für immunologische Themen in der Diabetologie hat mein Interesse für diese Fragestellungen geweckt. Er ermöglichte mir früh die Mitwirkung im Immunologischen Labor an der Medizinischen Klinik und Poliklinik III und hat so ideale Voraussetzungen zum wissenschaftlichen Arbeiten neben der klinischen Tätigkeit geschaffen.

Zum Gelingen dieser Arbeit haben seit 1994 viele Mitarbeiter des Immunologischen Labors beigetragen. Besonders erwähnen möchte ich Frau Sabine Scherer, Garantin für zuverlässige ICA-Bestimmung und verantwortlich für unsere immer umfangreichere Serumbank, die im Zuge der Giessen Bad Oeynhausen Familienstudie entstanden ist. Herrn Michael Stein danke ich für vielfache methodische Hilfestellungen. Frau Jutta Schmidt gilt mein Dank für die Methodenpflege bei der Messung der Insulin-Antikörper und der Dissoziation. Frau Sabine Schaum und Frau Silke Hecker danke ich für ihr Engagement bei der Durchführung der Autoantikörperassays. Meinen sehr aktiven DoktorandInnen Frau cand. med. Martina Herrmann, Frau cand. med. Anne Strödter und Herrn cand. med. Jens Allendörfer verdanke ich substantielle Beiträge zu dieser Arbeit. Besonders hervorheben möchte ich die gute und produktive Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Erifile Hatziagelaki, die ihr „postdoctoral fellowship“ in unserer Arbeitsgruppe absolviert hat. Allen möchte ich an dieser Stelle

nochmals für ihre Unterstützung, ihre Anregungen und ihre Einsatzfreude danken, die wesentlich zum guten Arbeitsklima im Immunologischen Labor beigetragen haben.

Eine Reihe von Kollaborationen waren Voraussetzung für das Gelingen dieser Arbeit. Herrn Dr. Thomas Dyrberg danke ich für die freundliche Aufnahme und Unterweisung während meines Aufenthaltes als Research Fellow in der Forschungsabteilung, NovoNordisk A/S, Bagsvaerd, Dänemark. Prägend war auch die Zusammenarbeit mit der ENDIT-Studienleitung in London, später Bristol. Stellvertretend sei hier Professor Edwin AM Gale genannt, dessen Kompetenz, Persönlichkeit und Aufrichtigkeit beispielhaft sind und der durch seine Authentizität erst die Durchführung dieser großen internationalen Studie über einen Zeitraum von mehr als 10 Jahren möglich gemacht hat. Auch die Giessen-Bad Oeynhausener Familienstudie wäre nicht möglich gewesen ohne die hervorragende Kooperation mit Herrn Prof. Dr. med. R. Petzoldt, Direktor der Diabetesklinik am Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen in Bad Oeynhausener Universitätsklinik der Ruhr Universität Bochum. Danken möchte ich insbesondere auch meinen Kooperationspartnern aus der Arbeitsgruppe Klinische Inselzelltransplantation an unserer Klinik, Herrn Dr. med. Mathias Brendel und Herrn Dr. med. Michael Eckhard für die langjährige freundschaftliche und kreative Zusammenarbeit.

Herrn Andreas Schultz sei für die stets hilfsbereite und exzellente technische Unterstützung bei der Abfassung des Manuskripts gedankt.

Abschließend gilt mein ganz persönlicher Dank Rose, Alena und Dominik für ihre geduldige, manchmal ungestüme, manchmal sanfte Erinnerung an das Leben jenseits von Wissenschaft und klinischer Medizin.

Anlage 1 Ausgewählte Publikationen ad 3.1

Jaeger C, Hatzigelaki E, Stroedter A, Becker F, Scherer S, Petzoldt R, Federlin K, Bretzel RG (1999) The Giessen-Bad Oeynhausen family study: Improved prediction of type I diabetes in a low incidence population of relatives using combinations of autoantibodies in a dual step model. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107: 496-505

Hatzigelaki E, **Jaeger C**, Petzoldt R, Seissler J, Scherbaum WA, Federlin K, Bretzel RG (1999) The combination of antibodies to GAD-65 and IA-2ic can replace the islet-cell antibody assay to identify subjects at risk for type 1 diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 31: 564-569

The European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (**ENDIT Group**, E.A.M. Gale (2003) Intervening before the onset of Type 1 diabetes: baseline data from the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT). *Diabetologia* 46: 339-346

The European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (**ENDIT Group** (2004) European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT): a randomized controlled trial of intervention before the onset of type 1 diabetes. *The Lancet* 363: 925-31

The Giessen-Bad Oeynhausen family study: Improved prediction of type I diabetes in a low incidence population of relatives using combinations of islet autoantibodies in a dual step model

C. Jaeger¹, E. Hatziagelaki¹, A. Stroedter¹, F. Becker¹, S. Scherer¹, R. Petzoldt², K. Federlin¹, R.G. Bretzel¹

¹ Third Medical Department, Justus-Liebig University, Giessen, Germany

² University of Bochum, Diabetes Center at Bad Oeynhausen, Germany

Key words: Prediction, islet autoantibodies, family study, prediabetes, autoimmunity

Summary: To determine the value of a combined antibody screening for prediction of type I diabetes in a low incidence cohort, we prospectively studied 882 first-degree relatives (485 parents, 382 siblings and 15 offsprings) for up to 11 years who were not preselected for islet cell antibody (ICA) status. During the observation period, 16 individuals developed diabetes. The first serum sample obtained at study entry was analyzed for ICA and antibodies to insulin (IAA), glutamic acid decarboxylase (GADA) and anti-IA-2ic. A multivariate analysis, according to the Cox proportional hazard model considering the joint effects of all baseline variables, selected the four antibodies and the specific family history as significant risk confounding factors ($p < 0.05$). Further analysis by Kaplan-Meier Life-table methods confirmed a significantly increasing risk of diabetes with the number of autoantibodies present ($p < 0.001$). In accordance with the Cox model, relatives with more than one affected family member (a multiplex pedigree) and siblings and offsprings vs. parents were at increased risk of IDDM ($p < 0.05$). In addition to technical problems, a screening strategy based on initial ICA testing has the potential of missing ICA negative subjects among future cases of type I diabetes (19% were ICA negative in

the present study) and we therefore set out to evaluate an alternative approach using a dual step strategy with a combination of GADA and anti-IA-2ic for initial screening followed by retesting of positive individuals for ICA and IAA. The combination of GADA and anti-IA-2ic for primary screening (step 1) proved to be more sensitive, identifying 94% of future cases of type I diabetes compared to 81% using ICA as initial test and this antibody combination identified 93% of those individuals with ICA of 20 JDF or more. Retesting of positive individuals for ICA and IAA (step 2) significantly improved the positive predictive value conferring a risk of diabetes for siblings and offsprings with more than 2 antibodies within 5 years of 67% (95%CI: 39–90). We conclude that the prognosis of contracting IDDM in relatives is strongly related to the number of autoantibodies present, but the family history should be additionally considered for individual risk assessment. The proposed screening strategy could overcome the inherent problems of the ICA and IAA assays for large-scale screening. In the present study it allows 5-year risk estimates of up to 67% identifying 94% of future cases of type I diabetes.

Abbreviations: ICA, islet cell antibodies; IAA, insulin autoantibodies; GADA, autoantibodies to glutamic acid decarboxylase; IA-2ic, intracytoplasmic domain of tyrosine phosphatase IA-2; JDF, Juvenile Diabetes Foundation; CI, 95% confidence interval; SD, standard deviation; vs., versus.

Introduction

First degree relatives of patients with type I diabetes have an increased risk of developing diabetes themselves and various studies in these familiar cases of diabetes have shown that the presence of diabetes-associated antibodies, such as islet cell antibodies (ICA) and insulin autoantibodies (IAA) confer increasing risk for future development of type I diabetes (Irvine et al., 1976; Srikanta et al., 1985; Dean et al., 1986). Until recently, cytoplasmic islet cell antibodies (ICA) are the most widely used markers to estimate the risk for type I diabetes (Tarn et al., 1988; Bonifacio et al.,

1990a; Riley et al., 1990). At recent onset of the disease approximately 20–30% of the patients are ICA-negative implicating that a screening strategy based solely on ICA potentially has the limitation of missing ICA-negative individuals among future cases of type I diabetes. In addition the quantification of ICA detection has proven difficult to standardize despite improvements resulting from international workshops (Bonifacio et al., 1990b; Lernmark et al., 1991; Marner et al., 1986; Landin Olsson, 1990). The identification of GAD 65 (Baekkeskov et al., 1990) and IA-2/ICA512 (Bonifacio et al., 1995; Payton et al., 1995) as major target islet autoantigens, both contributing to the ICA-staining (Bonifacio et al., 1995;

Atkinson et al., 1993; Richter et al., 1992; Myers et al., 1995) and the subsequent development of antibody assays based on recombinant proteins (Petersen et al., 1994; Paton et al., 1995) gives the potential to improve the prediction of type I diabetes by combined antibody screening. Recent studies in populations, however preselected for ICA-positivity, have shown that the presence of multiple antibodies improves prediction (Bingley et al., 1994; Verge et al., 1996). As an alternative approach initial testing for the combination of GADA and anti-IA-2 α c antibodies has been suggested to replace the histochemical ICA-test (Wiest-Ladenburger et al., 1997; Seissler et al., 1996; Kulmala et al., 1998; Dittler et al., 1998). In the present study, in a cohort of 882 relatives including a high percentage of parents expected to be at a lower risk, we assessed the predictive value of the specific family history together with ICA, IAA, GADA, anti-IA-2 α c and different combinations by following them prospectively and unselected for ICA for up to 11 years. We found that initial screening for GADA and anti-IA-2 α c identifies almost all individuals with ICA of 20 JDF or more and this antibody combination proved to be more sensitive identifying future cases of type I diabetes than primary screening for ICA alone. Retesting of the GADA and/or anti-IA-2 α c antibody positive individuals for IAA and ICA significantly increased the positive predictive value. This dual step model allows efficient large-scale screening and provides a powerful strategy for risk assessment in type I diabetes.

Subjects, materials and methods

Subjects. The Giessen – Bad Oeynhausen prospective family study was started in 1985 as a collaboration between the Third Medical Department of the Giessen University and the Diabetes Center at Bad Oeynhausen, University of Bochum (Becker et al., 1990). Informed consent was obtained from the subjects and their parents, respectively, and the study design was approved by the University of Giessen institutional review board. A total of 882 nondiabetic first degree relatives of 264 patients with type I diabetes diagnosed before age of 21 were consecutively recruited for this prospective survey.

The relatives studied included 485 parents (227 fathers and 258 mothers, 55% of the population), 382 siblings and 15 offsprings of patients with type I diabetes. The gender distribution was balanced with 418 males and 464 females. The age of each relative was defined as that person's age at the time of initial testing. Among the parents the median age was 43 years (range: 22–59 years) and in the group of siblings and offsprings we found a median age of 16 years (range: 2–41 years) and 17 years (range: 5–24 years), respectively. Our study population contained 44 nondiabetic members of families (5% of the sample) in which

more than one relative had type I diabetes at the time of the initial testing. The terminus simplex denotes a family in which the person has a single relative with type I diabetes, whereas, a multiplex pedigree refers to a person with two or more such relatives.

The median duration of follow-up was 10.3 years (range: 0.9–11.4 years) and only subjects of whom follow-up data was available were included in the study. The relatives were contacted regularly by telephone or mail to determine whether they had developed diabetes and as of October 1997 sixteen individuals (3 parents, 2 offsprings and 11 siblings) have progressed to overt disease after a median follow-up of 3.4 years (range: 0.9–10.3 years).

After March 1995, six of the relatives included in the present study agreed to participate in the ongoing European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT) evaluating the ability of oral nicotinamide to prevent or delay the onset of diabetes. In the survival analysis, the follow-up of these individuals was ended at the time of entry into the trial, although they were included in the overall analysis of the frequency of autoantibodies among the relatives.

Human Sera. Serum samples were obtained for autoantibody detection at study entry and close to the diagnosis of the index patient in the family. In subgroups repeated sampling and an IVGTT was performed where possible but according to the design of the present study we focussed on the autoantibody analysis arising from the first serum sample drawn at study entry. All sera were immediately stored in aliquots at -20°C in our serum bank before testing. While the ICA-detection was performed consecutively during the study when the probands were recruited the initial serum samples were now retested for GADA, IAA and anti-IA-2 α c antibodies. Only in 21 cases we had to rely on a sequential serum sample, which was drawn less than one year after study entry because there was no sufficient volume left from the initial sample.

Autoantibody assays. Islet cell antibodies (ICA) were determined by classical immunofluorescence technique, using 4 μm cryostat sections of freshly frozen blood group 0 human pancreas as substrate and a fluorescein conjugated goat anti-human IgG antibody. Undiluted sera screened positive were then titred by doubling dilutions. Calibrated standard sera were included and the end-point titres were converted to JDF units. The detection limit of the assay is 5 JDF units. This assay is regularly evaluated in the International Diabetes Workshop series on standardization of the islet cell antibody assay and over the years of the study it achieved ratings of 100% for sensitivity and specificity in the 3rd, 7th and 9th serum exchange.

Insulin autoantibodies (IAA) were determined in a competitive fluid-phase radiobinding assay. After removal of endogenous insulin with acid-charcoal

duplicate serum samples were incubated for 7 days at 4°C with ¹²⁵I-labelled human insulin (Hoechst-Frankfurt, Germany) in the presence or absence of an excess of cold insulin. The bound tracer was precipitated with polyethylene glycol, washed and counted. The specific binding was calculated and IAA levels were expressed in nU/ml. A subject was considered to be positive for IAA in case of levels exceeding three times the standard deviation above the mean of 150 healthy control subjects without a family history of IDDM. This assay achieved 91% for sensitivity and 100% specificity in the 6th International Diabetes Workshop on IAA.

Antibodies to glutamic acid decarboxylase (GADA) were detected in a radioligand GAD 65 Ab assay, using as tracer recombinant, *in vitro* translated, human islet ³⁵S-methionin-labelled GAD 65 according to the protocol developed by Petersen et al. (Petersen et al., 1994). Antibody levels are expressed as index values: GAD 65 antibody index = (cpm unknown sample-cpm neg. standard serum) / cpm pos. standard serum - cpm neg. standard serum. The cDNA encoding for human GAD 65 was generously donated by Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark. The cut-off index level for GAD 65 antibody positivity was determined from 150 healthy volunteers. Sera with GAD 65 antibody index values above the mean index plus three times the standard deviation were regarded as positive. All samples were tested in triplicate and the index calculated with the mean of triplicates. In the 1st International Diabetes Workshop this assay performed with 91% specificity and 86% sensitivity.

Autoantibodies to the intracytoplasmic domain to tyrosine phosphatase like protein IA-2 (anti-IA-2ic) were measured by Dr. J. Seissler at Leipzig University as described recently (Seissler et al., 1996). Briefly, ³⁵S-methionin-labelled, human recombinant IA-2ic was produced by coupled *in vitro* transcription and translation. After incubation overnight the immune complexes were bound on Protein A Sepharose and bound radioactivity was counted in a liquid scintillation counter. To achieve high specificity the cut off for antibody positivity was set at mean plus four times the standard deviation of antibody levels in 100 normal controls. In the combined autoantibody workshop this assay had a diagnostic sensitivity of 73% and a specificity of 96% for type I diabetes.

Statistical analysis. For the comparison of proportions and correlations between the baseline variables (the four antibodies, type of relationship, type of pedigree, age and sex) the data were evaluated using chi-square statistics, the Mann Whitney U test and Spearman's non-parametric correlation analysis where appropriate. Life-Table methods were used to

estimate the risk of type I diabetes (Kaplan and Meier, 1958). Follow-up started from the date of the initial serum sample tested and ended with the last contact with the subject, randomisation to ENDIT or the onset of type I diabetes, whichever came first. Log-rank statistics were applied to compare survival curves (Mantel, 1966) and separately the positive predictive value for each risk factor or combination was calculated after 5 and 10 years. For multivariate analysis we used the Cox proportional hazards model (Cox, 1972) to simultaneously determine the contributions of the baseline variables (potential risk factors) and different combinations to the prediction of diabetes. The proportional hazards analysis has the ability to investigate joint effects and the significance of different risk factors under consideration and the magnitude of their effects on the relative risk (hazard ratio) can be estimated. Results are expressed as proportions (95% confidence interval) or medians (range) unless otherwise indicated and a p-value of less than 0.05 was considered significant. The data analysis has been carried out using SPSS 6.1.3 software.

Results

Overall frequency and co-occurrence of autoantibodies.

In our cohort of 882 non-diabetic first-degree relatives of patients with type I diabetes the overall frequencies for ICA, GADA, anti-IA-2ic and IAA were 4.9% (n = 43), 7.6% (n = 67), 4.0% (n = 35) and 3.3% (n = 29), respectively.

Looking at all relatives together 103 (11.6%) individuals were found to be positive for at least one autoantibody. Of these subjects 53 (6% of all relatives) were positive for only one antibody specificity with 32 of them belonging to the group of parents (21 were single GADA positive, 8 were single ICA positive, only one parent was single positive for IAA and 2 parents were single anti-IA-2ic positive). Thirty-three subjects (3.7% of all relatives) had 2 markers and 17 subjects (1.9% of all relatives) were tested positive for 3 or 4 antibodies. Further analyzing these 103 subjects with at least one positive marker we observed the presence of multiple autoantibodies (≤ 3) significantly ($p < 0.05$) more frequent in the subgroup of siblings and offsprings compared to the group of parents, reflecting the increased cumulative risk of type I diabetes in siblings and offsprings. There was no significant association of the prevalence of any antibody or combination with gender or type of pedigree (simplex vs. multiplex). In contrast, we observed anti-IA2ic, IAA and ICA significantly ($p < 0.05$) more frequent in younger age groups, whereas, no significant difference was found with regard to GADA in the different age groups.

Analyzing for associations between the four autoantibodies we found that combinations between the

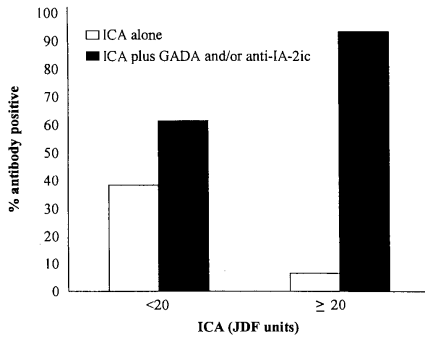


Fig. 1 Association between ICA, GADA and anti-IA-2ic antibodies grouped according to levels of ICA. A combined primary screening for GADA and/or anti-IA-2ic antibodies identified 93% and 62% of individuals with ICA of ≥ 20 JDF or < 20 JDF, respectively ($p < 0.02$).

four antibodies were significantly ($p < 0.01$) more frequent depending on higher titres of ICA and GADA. By focussing on ICA, GADA and anti-IA-2ic the most striking finding was that a combined screening for GADA and/or anti-IA-2ic identified 28 out of 30 (93%) individuals with ICA of 20 JDF or more and still 62% (8 out of 13) of subjects with ICA of 5 or 10 JDF (Fig. 1, $p < 0.02$).

Family members who progressed to type I diabetes.

The characteristics of the 16 family members who developed type I diabetes during follow-up are shown in Table 1. The median time to diagnosis was 3.4 years (range: 0.9–10.3 years). Among the parents only

3 out of 485 (0.6%) progressed to type I diabetes during the observation period. By contrast, in the group of siblings and offsprings 13 out of 397 (3.3%) acquired the disease. Looking at the type of pedigree 2 out of 44 (4.5%) members of multiplex families have developed type I diabetes compared to 14 out of 838 (1.7%) relatives with simplex pedigrees. Among the sixteen prediabetic relatives 81% had positive results for ICA and GADA, 50% for IAA and 63% for anti-IA-2ic and none of the patients was negative for all antibody specificities. Only one prediabetic relative was single positive for GADA, 31% (5/16) were double positive and 63% (10/16) had positive results for three or more of the autoantibodies. Interestingly, a combined screening for GADA and anti-IA-2ic was more sensitive compared to single ICA-testing identifying 94% vs 81% of the future cases of type I diabetes, respectively.

Effect of family history and individual autoantibodies on the positive predictive value. The cumulative risk for the development of type I diabetes in 5 or 10 years is given in Table 2 classified according to the type of pedigree and type of relationship to the family member with diabetes. In addition, the cumulative risk associated with each of the four autoantibody specificities is given for all relatives together and separately for the group of siblings and offsprings.

As shown in Table 2 multiplex pedigrees have a significantly ($p < 0.05$) increased risk of type I diabetes compared to relatives with only one diabetic patient in the family (simplex pedigree) and the cumulative risk for siblings and offsprings compared to the parents is also considerably increased ($p < 0.001$). In addition, each individual autoantibody is associated with a significant ($p < 0.001$) increase in the 5 or 10-years cumulative risk and this effect is especially

Table 1 Characteristics of subjects who developed type I diabetes during follow-up

TOR	Gender	Age at study entry	Type of pedigree	ICA (JDF)	IAA (nU/ml)	GADA (index)	anti-IA-2ic (units)	IDDM free survival (months)
Parent	M	38	sim.	10	–	0.85	–	59
Parent	M	38	sim.	–	–	0.62	–	98
Parent	F	47	sim.	10	–	0.62	–	123
Offspring	M	7	mul.	80	480	–	–	39
Offspring	M	20	mul.	–	–	0.47	67	62
Sibling	M	16	sim.	–	781	0.31	21	12
Sibling	M	12	sim.	160	–	0.35	15	38
Sibling	M	11	sim.	20	250	0.45	–	72
Sibling	F	13	sim.	320	140	–	9.8	46
Sibling	F	8	sim.	640	2000	0.67	8.1	11
Sibling	F	14	sim.	40	1800	0.72	42	19
Sibling	M	12	sim.	20	–	0.85	–	68
Sibling	F	7	sim.	320	120	0.52	7.1	14
Sibling	M	17	sim.	160	–	0.6	9	18
Sibling	F	22	sim.	320	–	0.34	56	42
Sibling	M	6	sim.	80	122	–	58	24

TOR, type of relationship to family member with IDDM; simplex (sim.) vs. multiplex (mul.) denotes a family in which the person studied has a single relative with IDDM vs. a family in which there are two or more such relatives; JDF, Juvenile Diabetes Foundation

Table 2 Risk of type I diabetes stratified for family history and different autoantibodies or combinations in first degree relatives (n = 882) of patients with type I diabetes

	Risk by 5 years	Risk by 10 years	p-level
Type of pedigree			
Simplex	1.2 (0.5–1.9)	1.6 (0.8–2.5)	
Multiplex	2.3 (0–6.8)	4.6 (0–10.3)	< 0.05 vs. simplex
Type of relationship			
Parent	0.4 (0–1.3)	< 0.9 (0–2.3)	
Sibling	2.5 (0.9–4.0)	2.9 (1.2–4.6)	< 0.001 vs. parents
Offspring	6.7 (0–19.5)	13.3 (0–30.9)	< 0.001 vs. parents
All relatives			
ICA pos.	23.3 (10.4–36.1)	37.2 (17.6–56.8)	< 0.001 vs. ICA neg.
ICA < 20 JDF	8.3 (7.0–9.6)	8.3 (7.0–9.6)	< 0.001 vs. ICA neg.
ICA ≤ 20 JDF	29.0 (12.7–45.3)	38.1 (19.4–56.9)	< 0.001 vs. ICA neg.
GADA pos.	12.0 (4.0–19.8)	20.1 (9.3–30.8)	< 0.001 vs. GADA neg.
IAA pos.	24.1 (8.2–40.0)	27.6 (11.0–44.1)	< 0.001 vs. IAA neg.
Anti-IA-2ic pos.	25.7 (10.9–40.5)	29.4 (13.6–45.2)	< 0.001 vs. anti-IA-2ic neg.
1 antibody pos.	no IDDM	2.1 (0–4.3)	< 0.05 vs. antibody neg.
2 antibodies pos.	18.2 (9.1–27.3)	24.6 (11.2–38.0)	< 0.001 vs. antibody neg.
≥ 3 antibodies pos.	54.8 (32.7–76.9)	64.3 (41.1–87.5)	< 0.001 vs. antibody neg.
Siblings and offsprings			
ICA pos.	32.1 (14.5–49.8)	41.3 (21.8–60.8)	< 0.001 vs. ICA neg.
ICA ≥ 20 JDF	41.0 (19.9–61.9)	52.2 (30.0–74.5)	< 0.001 vs. ICA neg.
GADA pos.	8.3 (7.1–9.5)	25.6 (11.4–39.8)	< 0.001 vs. GADA neg.
IAA pos.	31.8 (11.9–51.7)	36.3 (15.8–56.9)	< 0.001 vs. IAA neg.
Anti-IA-2ic pos.	40.9 (19.9–61.8)	46.8 (24.9–68.8)	< 0.001 vs. anti-IA-2ic neg.
1 antibody pos.	no IDDM	no IDDM	
2 antibodies pos.	20.4 (9.1–31.7)	31.2 (18.4–44.1)	< 0.001 vs. antibody neg.
≥ 3 antibodies pos.	64.3 (38.7–89.9)	74.0 (50.3–98.6)	< 0.001 vs. antibody neg.

Data are % (95% CI). Cumulative risk after 5 and 10 years of follow-up, calculated by survival analysis and compared with log-rank statistics.

pronounced in the subgroup of siblings and offsprings. Quantitative measurement of islet cell antibodies revealed that ICA of 20 JDF or more remain the best single marker for prediction either in the whole study population or in the subgroup of siblings and offsprings (Table 2). We observed no significant association with gender (data not shown).

Multivariate analysis in the Cox proportional hazards model. As a cross-check for the survival analysis and to further quantify the effects of the baseline variables in a multivariate model we performed an analysis according to the Cox proportional hazards model. A Cox regression procedure that considered all baseline variables selected type of relationship, type of pedigree and the individual autoantibodies as significant risk confounding factors ($p < 0.05$). Age was not significant, probably because of the close correlation and therefore redundancy of the information regarding age and the type of relationship to diabetic proband which has been classified as the group of parents at older age (median: 43 years) or siblings and offsprings at young age (median: 16 and 17 years). The gender was also not significant in this model.

A second proportional hazards analysis was performed with only these significant factors to provide better estimates of effects and significance. Table 3 gives a summary of the results, the estimated relative risk (hazard ratio) and the level of significance. This relative risk may be interpreted as the estimated ratio of hazards (probability of type I diabetes) associated with a change for each of the risk factors, after controlling for the other factors in the model. Thus, the risk for type I diabetes is about 9.2 times greater for relatives who are GADA positive (Model 1: All relatives). In accordance with the observations from the survival analysis ICA are associated with the highest relative risk among the four autoantibodies in both models. Interestingly, GADA contributed a higher relative risk to the hazard ratio if all relatives including the high proportion of parents are considered (relative risk: 9.2) compared to the subgroup of siblings and offsprings (relative risk: 4.0). Conversely, anti-IA-2ic made the higher contribution to the risk ratio in the subgroup of siblings and offsprings (Model 2) compared to Model 1 (relative risk: 11.3 vs. 4.3). Risk assessment in this multivariate analysis in

Table 3 Simultaneous evaluation of factors contributing to the relative risk of progression to type I diabetes

Risk factor	Relative risk	p-level
Model 1: All relatives		
Type of pedigree	16.1 (2.5–105.6)	<0.01
Siblings/offsprings	3.8 (1.2–16.3)	<0.05
ICA	15.2 (2.8–82.1)	<0.01
GADA	9.2 (1.9–44.4)	<0.01
IAA	4.9 (1.4–16.4)	<0.01
Anti-IA-2ic	4.3 (1.4–13.5)	<0.05
Model 2: Siblings/offsprings		
Type of pedigree	18.6 (2.4–142.1)	<0.01
ICA	15.6 (2.0–121.1)	<0.01
Anti-IA-2ic	11.4 (2.5–52.3)	<0.01
IAA	5.2 (1.5–18.4)	<0.05
GADA	4.0 (0.9–17.8)	<0.05

Data are relative risk (95%CI), calculated with Cox proportional hazard model. The relative risk (acquiring type I diabetes) provides a clinical interpretation of the magnitude of the effect associated with each risk factor, adjusted for the other variables in that model. For example, the relative risk of 15.6 associated with a positive ICA-test in Model 2 indicates, that, other factors held constant, the risk of development of type I diabetes increases 15.6 times. Reference categories: Relative risk is given for antibody positivity compared with antibody negativity and regarding type of pedigree the relative risk for a multiplex pedigree is shown compared with a simplex pedigree. In Model 1 the relative risk for siblings and offsprings is shown compared with parents.

case of presence of multiple risk factors is calculated by multiplication of the individual risk ratio clearly indicating that the combination of antibodies is more predictive than a single autoantibody test. Overall, the results of the proportional hazards model proved to agree well with the survival data of the Kaplan-Meier estimates.

Combining autoantibodies. Considering the whole antibody panel there was a significant ($p < 0.001$) increase in the risk of progression to type I diabetes among all relatives according to the number of autoantibodies tested comparing zero, one, two, three or more autoantibodies. None of the autoantibody negative patients developed diabetes and of 53 single antibody positive individuals only one developed diabetes conferring a cumulative risk of type I diabetes in 10 years of 2.2% (0–6.3). Of the 33 individuals with 2 autoantibodies 5 acquired diabetes and the 10-years cumulative risk was 37.3% (23.2–51.4). The group of 17 relatives with 3 or 4 autoantibodies contributed 10 of the 16 cases of type I diabetes in the present study. The cumulative 10-years-risk of diabetes in this group was 64.3% (CI: 41.1–87.5) and focussed on siblings and offsprings the risk was 74.0% (50.3–98.6) (Table 2).

To further evaluate the feasibility of a screening strategy based on initial screening only for GADA and anti-IA-2ic with retesting of positive individuals for ICA and IAA we reanalyzed the data according to this dual step model. Figure 2 shows the corresponding Kaplan-Meier estimates based on the whole study population (Fig. 2A) and for the subgroup of siblings and offsprings (Fig. 2B). The relatives were

stratified according to this stepwise approach initially evaluating only the GADA and anti-IA-2ic status. Group A refers to GADA and anti-IA-2ic negative individuals. In those relatives positive for GADA and/or anti-IA-2ic the whole panel of autoantibodies was then considered for calculation. Group B refers to individuals with 2 antibodies and group C is formed by subjects with more than 2 autoantibodies. Applying the proposed screening strategy on our cohort we found that those individuals who tested positive for more than 2 autoantibodies had a cumulative risk of type I diabetes in 5 years of 52.9% (28.7–77.1) if the whole study population is considered (Figure 2A) and the risk further increased in the subgroup of siblings and offsprings with an estimated cumulative risk of type I diabetes in 5 years of 67.3% (38.7–89.9) (Figure 2B). This screening strategy offers a considerably increased positive predictive value compared to the gold-standard of prediction using $ICA \geq 20$ JDF and combines a higher sensitivity for the identification of future cases of type I diabetes with a screening format suitable for large population studies.

Discussion

Until recently strategies for prediction of type I diabetes have been based almost exclusively on the detection of ICA (Dean et al., 1986; Tarn et al., 1988; Bonifacio et al., 1990a; Riley et al., 1990) but additional screening for other autoantibodies has been suggested to improve prediction (Bingley et al., 1994; Verge et

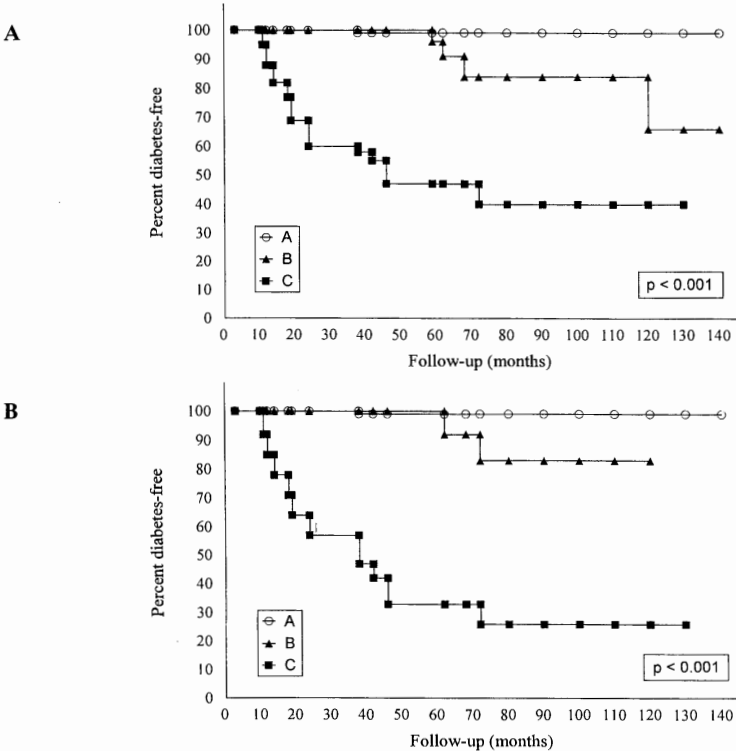


Fig. 2 The IDDM-free survival of first-degree relatives stratified according to the dual step model with initial screening for GADA and anti-IA-2ic (step 1) followed by scoring for ICA and IAA in those individuals positive for GADA and/or anti-IA-2ic antibodies (step 2). Group A refers to GADA and anti-IA-2ic negative subjects, group B and C represent the survival curves for individuals who underwent the whole screening procedure (step 1 and 2) and who are positive for two antibodies (group B) or more than two autoantibodies (group C). (A) Data for all relatives tested (siblings, offsprings and parents, n=882). (B) Data for the subgroup of siblings and offsprings (n = 397).

al., 1996). However, these study populations were pre-selected for ICA positive individuals and several cohorts studied until now consisted mainly of siblings known to be at the highest risk among the relatives. This prompted us to evaluate the independent contributions of the specific family history and antibodies to IAA, GADA, anti-IA-2ic, ICA or combinations to the prediction of type I diabetes in a large and unselected but low incidence cohort of 485 parents, 383 siblings and 15 offsprings of patients with type I diabetes followed for progression to diabetes for up to 11 years.

Future screening programs to predict type I diabetes in a large population will require high sensitivity

and specificity, a high positive predictive value and should be based on generally available and reproducible assay formats suitable for large-scale testing of sera. The former gold standard of a screening strategy based only on ICA is hampered by the inherent problems of the immunohistochemical ICA assay depending on good quality pancreatic tissue and the need for subjective scoring with difficulties in standardization and quantification. Moreover, a screening strategy based on ICA for primary screening potentially excludes ICA negative subjects among future cases of type I diabetes from the benefit of treatment. In the Gainesville study 13 of 40 (33%) individuals who progressed to overt disease during the study per-

iod were ICA-negative on initial testing (Riley et al., 1990) and in the Montreal family study, of the 19 siblings who developed diabetes, only 10 (53%) were ICA positive at the time of the first test (Schiffrin et al., 1993). Current analysis of the Bart's-Windsor and Bart's-Oxford family studies has shown that 7 of 28 future cases were ICA-negative at entry, and that 4 of these had no detectable ICA during follow-up (Bingley et al., 1994). In the present study 19% of future cases were ICA negative on initial testing. By contrast, 94% of future cases of type I diabetes were positively identified by a combined screening for GADA and anti-IA-2ic demonstrating that this approach potentially is more sensitive than primary screening for ICA. Furthermore, in 93% of those individuals known to be at high risk of progression to the disease indicated by ICA of 20 JDF or more GADA and/or anti-IA-2ic antibodies were present which is similar to results that have been reported recently (Seissler et al., 1996). However, the sensitivity of a screening test is reciprocally related to its specificity and the positive predictive value. We therefore set out to develop a screening strategy by using multiple antibodies that combines a high sensitivity with a high positive predictive value and with assay formats suitable for large-scale screening.

The cumulative incidence rates for type I diabetes of 0.9% for parents and 2.9% for siblings found in the present study of 882 first-degree relatives after 10 years of follow-up tended to be lower than reported by others. Deschamps et al. (Deschamps et al., 1992) described 4.4% for siblings and 1.1% for parents and Riley et al. (Riley et al., 1990) found 3.5% for siblings. This can be explained in part by the higher proportion of multiplex pedigrees in both populations (e.g. 18% in the Gainesville Study, Riley et al., 1990) compared to our present cohort with only 5% of multiplex pedigrees, indicating an increased genetic background risk in the other study populations. As reported previously (Schiffrin et al., 1993; Riley et al., 1990; Deschamps et al., 1992), we confirm in the present study the increased risk of multiplex pedigrees compared to simplex pedigrees and the higher risk of type I diabetes for siblings and offsprings compared to parents. In this study siblings and offsprings had a 3.8-fold increased risk of diabetes compared to parents as determined by Cox regression analysis. These observations indicate that the specific family history confers differential risk and should be considered for individual risk assessment. We therefore report our results of the life-table analysis and the proportional hazards model separately for the whole study population and the subgroup of siblings and offsprings.

In the present study the prevalences of the four autoantibodies and combinations are lower than reported previously (Bingley et al., 1994; Verge et al., 1996). Both study populations are preselected for

ICA. The relatives studied by Verge et al. form a heterogeneous group with 71 individuals who were identified to be ICA positive by screening approximately 10,000 relatives of whom the GADA and anti-IA-2ic status is not included in the analysis. Only the subgroup of 683 individuals (BDC1 cohort) is unselected for ICA. Interestingly, comparing our antibody frequencies with those from the BDC1 cohort we observed very similar prevalences for GADA, anti-IA-2ic, IAA and combinations. Conversely, stratifying our study population for ICA positive individuals we confirm the higher autoantibody prevalences (data not shown), which is consistent with the observation that GADA and anti-IA-2ic antibodies coincide with ICA (Wiest-Ladenburger et al., 1997; Seissler et al., 1996). This potential bias influences the calculations of the positive predictive value, the sensitivity and specificity which tend to be higher than reported in our present study.

ICA of 20 JDF or more appeared to be the best single marker for prediction of later type I diabetes in the present study conferring a 10-years risk of 52% in siblings and offsprings of patients with IDDM which is very similar to the results reported by other investigators (Tarn et al., 1988; Bonifacio et al., 1990a; Riley et al., 1990; Bingley et al., 1994; Bingley et al., 1993). As shown in the proportional hazard model ICA are associated with a 15-fold increased relative risk for progression to type I diabetes either in the whole study population or in the subgroup of siblings and offsprings. By contrast, GADA confers the higher risk in the whole study population including the high proportion of parents (55% of the sample), whereas, anti-IA-2ic antibodies carry the higher risk in the subgroup of siblings and offsprings. This possibly indicates synergistic effects in a combined strategy with GADA and anti-IA-2ic for primary screening compared to ICA and is consistent with the hypothesis that GADA and anti-IA-2ic represent two major subfractions of ICA (Payton et al., 1995; Atkinson et al., 1993; Richter et al., 1992; Myers et al., 1992; Wiest-Ladenburger et al., 1997; Seissler et al., 1996). The multivariate proportional hazard model allows to estimate joint effects of multiple risk factors by multiplication of the individual hazard ratio (relative risk) clearly demonstrating that a combined screening approach for multiple antibodies is superior combined to single tests. The results from the proportional hazard model proved to agree well with the data from the life-table analysis and we observed a significant ($p < 0.001$) increase in the risk of type I diabetes depending on the numbers of autoantibodies present, which is similar to previous reports (Bingley et al., 1994; Verge et al., 1996; Christie et al., 1997; Roll et al., 1994; Bonifacio et al., 1996). In the present study the estimated 10-years risk for individuals positive for more than 2 antibodies was 74% (50–99) for siblings and offsprings.

Recently, it has been suggested that primary screening for GADA and anti-IA-2 α c antibodies can replace the ICA-test (Wiest-Ladenburger et al., 1997; Seissler et al., 1996; Savola et al., 1998; Dittler et al., 1998; Kulmala et al., 1998). In the present study this approach was more sensitive than primary ICA-testing, however, this was on the expense of a lower positive predictive value and specificity. We therefore developed a dual step model with retesting of GADA and/or anti-IA-2 α c positive individuals (step1) for ICA and IAA (step 2) in order to increase the positive predictive value. As a feasibility study we applied this strategy on our cohort and could achieve 5-years risk estimates for individuals with more than 2 antibodies in the range of 53% (29–77%) if the whole study population was considered and 67% (39–90%) for siblings and offsprings. This screening strategy has the advantage of semiautomated and well standardized assay formats for primary screening for GADA and anti-IA-2 α c antibodies, whereas, the labour intensive and difficult ICA and IAA assays have to be performed only in the significantly reduced number of individuals with predetermined levels of GADA and/or anti-IA-2 α c antibodies. This dual step model provides a rapid, simple and effective means to start screening programs on a large scale. In this study it proved to be more sensitive than primary screening for ICA with a positive predictive value that allows to estimate that 2 out of 3 individuals with more than 2 antibodies will progress to type I diabetes after 5 years of follow up. Interestingly, a recent study has extended a similar screening approach to risk assessment in the general population (Bingley et al., 1997).

We conclude that the prognosis of contracting type I diabetes in first-degree relatives is strongly related to the number of autoantibodies present. However, the level of prediction in our study tended to be lower than reported previously probably because the cohort of the present study was unselected for ICA, has included a high number of parents and presents with a low percentage of multiplex pedigrees. For targeting of those individuals who might benefit most from therapy the specific family history must be considered in addition to the autoantibody status. The proposed screening strategy based on a dual step model with primary screening for GADA and anti-IA-2 α c antibodies and second line testing of the positive individuals (GADA and/or anti-IA-2 α c) for ICA and IAA has the potential to overcome the inherent problems of the ICA and the IAA assays for large-scale screening and proved to be a powerful approach to identify subjects at increased risk for type I diabetes as a prerequisite for future prevention trials.

Acknowledgments: This study was supported by an unrestricted grant donated by Hoechst Pharma Deutschland (Dr. Leihener), Bad Soden, Germany. We would like to thank all of the families participating in the Giessen-Bad Oeynhausen family study and the

late Professor H. Sauer, Bad Oeynhausen, for excellent assistance in organizing the study. The authors gratefully acknowledge M. Stein, technician, for excellent laboratory assistance performing the IAA and GADA assays at the laboratory for Immunology of the Third Medical Department at Giessen University. We thank Dr. Thomas Dyrberg, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark, for the donation of cDNA encoding for human GAD 65. Finally we are indebted to Professor W.A. Scherbaum and Dr. J. Seissler at Leipzig University for performing the anti-IA-2 α c antibody assays.

References

- 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, Aanstoot HJ, Christgau S, Rietz A, Solimena M, Cascalho M, Folli R, Richter-Olesen H, DeCamilli P: Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347: 151–156, 1990
- Becker F, Buschler H, Scherer S, Petzoldt H, Sauer H, Bretzel RG, Federlin K: Identifying the pre-diabetic state in type 1 diabetes: Condition for early intervention. *J Autoimmun* 3: 639–642, 1990
- Bingley PJ, Bonifacio E, Gale EAM: Can we really predict IDDM? *Diabetes* 42: 213–220, 1993
- Bingley PJ, Christie MR, Bonifacio E, Bonfanti R, Shattock M, Fonte MT, Bottazzo GF, Gale EAM: Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody positive relatives. *Diabetes* 43: 1304–1310, 1994
- Bingley PJ, Bonifacio E, Williams AJK, Genovese S, Bottazzo GF, Gale EAM: Prediction of IDDM in the general population – Strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes* 46: 1701–1710, 1997
- Bonifacio E, Bingley PJ, Shattock M, Dean BM, Dunger D, Gale EAM, Bottazzo GF: Quantification of islet cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 335: 147–149, 1990a
- 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: 731–736, 1990b
- Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E: Identification of tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes related 37/40K autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *J Immunol* 155: 5419–5426, 1995
- Bonifacio E, Genovese S, Braghi S, Bazzigalupi E, Lampasona V, Bingley PJ, Rogge L, Pastore MR, Bognetti E, Bottazzo GF, Gale EAM, Bosi E: Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity. *Diabetologia* 38: 816–822, 1996
- Christie MR, Roll U, Payton MA, Hatfield EC, Ziegler AG: Validity of screening for individuals at risk for type 1 diabetes by combined analysis of antibodies to recombinant proteins. *Diab Care* 20: 695–670, 1997
- Cox DR: Regression models and life-tables. *J R Stat Soc* 34: 187–220, 1997
- Dean BM, Becker F, McNally JM, Tarn AC, Schwartz G, Gale EAM, Bottazzo GF: Insulin autoantibodies in the pre-diabetic period: correlation with islet-cell antibodies and development of diabetes. *Diabetologia* 29: 339–342, 1986
- Deschamps I, Boitard C, Hors J, Busson M, Marcelli-Barge A, Mogenet A, Robert JF: Life table analysis of the risk of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in siblings according to islet cell antibodies and HLA markers. *Diabetologia* 35: 951–957, 1992

- Dittler J, Seidel D, Schenker M, Ziegler AG: GADIA2-combi determination as first-line screening for improved prediction of type I diabetes in relatives. *Diabetes* 47: 592–597, 1998
- Irvine WJ, Gray RS, McCallum CJ: Pancreatic islet-cell antibody as a marker for asymptomatic and latent diabetes and prediabetes. *Lancet* 2: 1097–1102, 1976
- Kaplan EL, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53: 457–481, 1958
- Kulmala P, Savola K, Petersen JS, Vahasalo P, Karjalainen J, Lopponen T, Dyrberg T, Akerblom HK, Knip M: Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings of children with diabetes. A population-based study. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *J Clin Invest* 101: 327–336, 1998
- Landin-Olsson M: Precision of the islet-cell antibody assay depends on the pancreas. *J Clin Lab Anal* 4: 289–294, 1990
- Lernmark A, Molenaar JL, van Beers WA, Yamaguchi Y, Nagataki S, Ludvigsson J, Maclaren NK: The Fourth International Serum Exchange Workshop to standardize cytoplasmic islet cell antibodies: the Immunology and Diabetes Workshops and Participating Laboratories. *Diabetologia* 34: 534–535, 1991
- Mantel N: Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep* 50: 163–170, 1966
- Marnar B, Sernmark A, Nerup J, Molenaar JL, Tuk CW, Bruining GJ: Analysis of islet cell antibodies on frozen sections of human pancreas. *Diabetologia* 25: 93–96, 1986
- Myers MA, Rabin DU, Rowley MJ: Pancreatic islet cell cytoplasmic antibody in diabetes is represented by antibodies to islet cell antigen 512 and glutamic acid decarboxylase. *Diabetes* 44: 1290–1295, 1995
- Payton MA, Hawkes CJ, Christie MR: Relationship of the 37,000 and 40,000 Mr tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 (ICA 512). *J Clin Invest* 96: 1506–1511, 1995
- Petersen JS, Hejnaes KR, Moody A, Karlens AE, Marshall MO, Hoir-Madsen M, Boel E, Michelsen B, Dyrberg T: Detection of GAD 65 antibodies in diabetes and other autoimmune disease using a simple radioligand assay. *Diabetes* 43: 459–467, 1994
- Richter W, Endl J, Eiermann TH, Brandt M, Kientsch-Engel R, Thivolet C, Junfer H, Scherbaum WA: Human monoclonal islet cell antibodies from a patient with insulin-dependent diabetes mellitus reveal glutamate decarboxylase as the target antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8467–8471, 1992
- Riley WJ, MacLaren NK, Krischer J, Spillar RP, Silverstein JH, Schatz DA, Schwartz S, Malone J, Shah S, Vadheim C, Rotter JL: A prospective study of the development of diabetes in relatives of patients with insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* 323: 1167–1172, 1990
- Roll U, Christie MR, Standl E, Ziegler AG: Association of anti-GAD antibodies with islet cell antibodies and insulin autoantibodies in first-degree relatives of type I diabetic patients. *Diabetes* 43: 154–160, 1994
- Savola K, Bonifacio E, Sabbah E, Kulmala P, Vähäsalo P, Karjalainen J, Tuomilehto-Wolf E, Meriläinen J, Akerblom HK, Knip M and the Childhood Diabetes in Finland Study Group: IA-2 antibodies – a sensitive marker of IDDM with clinical onset in childhood and adolescence. *Diabetologia* 41: 424–429, 1998
- Schiffman A, Colle E, Ciampi A, Hendricks L, Poussier P: Different rates of conversion to IDDM in siblings of type I diabetic children: The Montreal family study. *Diab Res Clin Prac* 21: 75–84, 1993
- Seissler J, Morgenthaler NG, Achenbach P, Lampeter EF, Glawe D, Payton M, Christie M, Scherbaum WA and the DENIS Study Group: Combined screening for autoantibodies to IA-2 and antibodies to glutamic acid decarboxylase in first degree relatives of patients with IDDM. *Diabetologia* 39: 1351–1356, 1996
- Srikanta S, Ganda OP, Rabizadeh A, Soeldner JS, Eisenbarth GS: First-degree relatives of patients with Type I diabetes mellitus: islet-cell antibodies and abnormal insulin secretion. *N Engl J Med* 313: 461–464, 1985
- Tarn A, Dean B, Schwarz G, Thomas J, Ingram D, Bottazzo GF: Predicting insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1: 845–850, 1988
- Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS: Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 45: 926–933, 1996
- Wiest-Ladenburger U, Hartmann R, Hartmann U, Berling K, Böhm BO, Richter W: Combined analysis and single-step detection of GAD 65 and IA2 autoantibodies in IDDM can replace the histochemical islet cell antibody test. *Diabetes* 46: 565–571, 1997

Clemens Jaeger, MD
Third Medical Department and Policlinic
Justus-Liebig-University
Rodthohl 6
D-35385 Giessen
Germany
Tel.: +49 641 99 42752
Fax: +49 641 99 42759

The Combination of Antibodies to GAD-65 and IA-2ic Can Replace the Islet-Cell Antibody Assay to Identify Subjects at Risk of Type 1 Diabetes Mellitus

E. Hatzigelaki¹, C. Jaeger¹, R. Petzoldt², J. Seissler³, W. A. Scherbaum³, K. Federlin¹, R. G. Bretzel¹

¹Third Medical Department and Policlinic, Justus-Liebig University, Giessen, Germany

²Diabetes Clinic, Bad-Oeynhausen, Germany

³Diabetes Research Institute, University of Düsseldorf, Germany

First-degree relatives of type 1 diabetic patients are at increased risk of developing diabetes and, until recently, islet cell antibodies (ICA) have represented the major risk marker used for identification of individuals at increased risk for subsequent progression to diabetes. In order to determine the value of antibodies to GAD-65 and IA-2ic to identify individuals at high risk for type 1 diabetes mellitus, we measured both autoantibodies and ICA in 1436 first-degree relatives of patients with type 1 diabetes. In addition, the sera were analyzed for thyroid, adrenal and gastric-parietal cell autoantibodies as markers for possible polyendocrine involvement. GAD-65 Abs were found in 135 out of 1436 (9.4%) first-degree relatives and in 57 of 98 (58.2%) ICA-positive subjects. IA-2ic were detected in 52 of 1436 (3.6%) first-degree relatives and in 44 of 98 (44.8%) ICA-positive relatives. IA-2ic and/or GAD-65 were detected in 73 of 98 (74.5%) ICA-positive relatives. Interestingly, antibodies to GAD-65 and/or IA-2ic were present in 91.2% of individuals with more than 20 JDF-units. Anti-IA-2ic and GAD-65 were positively correlated with high levels of ICA. Anti-IA-2ic and GAD-65 were found in 19% and 48.5% of subjects with ICA levels of 5–20 JDF-u but in 68.8% and 76.5% of individuals with ICA of 40 JDF-u or more, respectively ($p < 0.001$), compared to subjects with ICA levels less than 5 JDF-u. When autoantibody frequencies among the relatives were analyzed according to relationship to the proband, the offspring and siblings had a higher frequency of ICA and IA-2ic ($p < 0.05$) than the subgroup of parents. A significant association was observed between IA-2ic and thyroid antibodies. In addition, higher levels of IA-2ic were found in relatives with positive TPO antibodies ($p < 0.001$); this correlation was particularly strong in offspring and siblings ($p < 0.01$). Determination of GAD-65 and IA-2ic antibodies may be considered as an alternative to primary ICA-screening, enabling the screening of large populations.

Key words: Islet Autoantibodies – Prediction of Type 1 Diabetes Mellitus – Family Study

Introduction

Type 1 diabetes mellitus is considered to be a chronic autoimmune disease leading to a progressive destruction of β -cells in the pancreatic islets of Langerhans and to insulin deficiency [1]. This process is highly selective and, although it appears to be T-cell mediated [2], a large number of antibodies have been identified which recognize antigens specific in the context of type 1 diabetes mellitus.

The knowledge that the disease has, despite its sudden onset, a latency period [3] has arisen from the detection of diabetes-related autoantibodies long before clinical diagnosis. Detection of such autoantibodies during a latency period before clinical onset of the diabetes disease in still non-diabetic individuals can enable the identification of individuals at risk of type 1 diabetes mellitus.

ICA and IAA are the most widely used antibody markers in risk assessment [4, 5]. About 80% of first-degree relatives who develop type 1 diabetes have detectable ICA, and unaffected relatives with ICA are at greatly increased risk of developing the disease [6]. However, the large scale screening test was limited because of the technical difficulties, i.e., semiquantitative results of ICA [7, 8] and the cumbersome technique of detecting IAA has rendered the testing of larger populations impossible. However, several studies have analyzed the value of other antibody markers such as IAA, GAD-65 and antibodies to IA-2ic in both ICA+ and ICA– in order to improve our ability to predict diabetes development [9–14].

It has been shown that primary screening for IAA of GAD 65-Ab alone is less predictable and specific than ICA alone [9, 15–17].

It is possible through other additional markers, such as antibodies to 37 kDa and 40 kDa, to improve the prediction of type 1 diabetes. But these antibodies are unable to identify all individuals [13, 18]. Recently, several autoantigens involved in type 1 diabetes have been identified, including the 40 kDa antigen as the intracytoplasmic domain of the tyrosine phosphatase IA-2 [19, 20]. Due to the cloning of the human IA-2ic cDNA, it

is now possible to use assays suitable for screening of large-scale populations.

In this study, we determined the value of antibodies to IA-2ic and GAD-65 for identification of individuals at risk for type 1 diabetes mellitus, and we compared the prevalence of those antibodies with the presence of ICA antibodies in a large population of first-degree relatives of patients with type 1 diabetes. According to our results, we suggest that the combined screening for IA-2ic and GAD-65 antibodies may be considered as an alternative to the ICA assay being more suitable for screening large populations.

Materials and Methods

Sera were obtained from 1436 first-degree relatives of patients with type 1 diabetes (756 women, 680 men), aged between 1–70 years. The distribution of the relatives was as follows: parents 594 (41.4%), siblings 676 (47.1%) and children 166 (11.6%). The median age was as following: 43 yrs for parents, 15 yrs for siblings and 9 yrs for children.

The relatives were recruited from the Giessen-Bad Oeynhausen family study and Giessen ENDIT screening program. None were diabetic patients when the first serum sample was drawn.

The sera analyzed for autoantibodies to ICA, GAD-65 and IA-2ic. In addition to these autoantibodies, the sera of all individuals were analyzed for thyroid, adrenal and gastric parietal cell autoantibodies as a possible indicator for polyendocrine syndromes.

Informed consent was obtained from the subjects or their parents, and the study design was approved by the Justus-Liebig University ethics committee.

Measurement of ICA

Islet cell antibodies were assessed by indirect immunofluorescence using cryostat sections of human blood group 0 pancreas as substrate with undiluted patient serum. Results were converted to Juvenile Diabetes Foundation (JDF) units using the JDF standard serum. The detection limit of the assay is 5 JDF units. This assay is regularly tested in the International Diabetes Workshop series on standardization of the ICA assay (Lab ID number 148), and over the years of the study, it achieved ratings of 100% for sensitivity and specificity in the 3rd, 7th and 9th serum exchange.

Detection of antibodies to GAD

Antibodies to human GAD 65 were determined in a radioligand immunoprecipitation assay as described by Petersen et al. [21]. Briefly, cDNA encoding for human GAD-65 was translated with a commercially available system (Promega, USA) in the presence of [³⁵S]-methionine. The cDNA was generously donated by Novo Nordisk. Radiolabeled GAD-65 was incubated overnight at 4°C with 2 µl of serum. The immune complexes were isolated with protein-A-sepharose (Pharmacia, Germany) and transferred to a 96-well filtration system. After washing the immune complexes, the bottom of each well in the filtration units was punched out. Scintillation fluid was added,

then counted in a scintillation counter. Values were expressed as index values: GAD-65 index = cpm (unknown sample) – [cpm (negative standard serum)/cpm (positive standard serum)] – cpm (negative standard serum). Samples with GAD-65 antibody index values above the mean plus three times the standard deviation of 100 healthy control subjects were regarded as positive. The intraassay coefficient of variation of a median binding serum was 5.0% (n=10), and the interassay coefficient of variation was 10.1% (n=9). This assay has been evaluated in the International Diabetes Workshop series on standardization of GADA (ab ID number 148). In the 1st IDW, this assay performed with 91% specificity and 86% sensitivity.

Detection of antibodies to IA-2ic

Autoantibodies to tyrosine phosphatase such as protein IA-2 (anti-IA-2) were determined using radiolabeled recombinant antigens in a 96-well assay format as described recently [22]. Plasmid cDNA coding for the intracytoplasmic domains of human IA-2 (amino acids 603–979) was transcribed/translated *in vitro* using a TNT rabbit reticulocyte lysate system (Promega) with [³⁵S]-methionine (10 mCi/ml, > 1000 Ci/mmol, Amersham, UK) according to the manufacturer's instructions. Aliquots of 10 000 cpm [³⁵S]-labeled proteins were incubated with 5 µl serum in 50 µl buffer A (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4 with 0.1% BSA, 5 mM methionine, 5 mM benzamide, 2 mM PMSF, 2 mM EDTA, 0.1% trasyolol, 0.5% Triton X 100) in 96-well microtiter plates (Greiner, Nuertingen, Germany). After overnight incubation, immune complexes were bound on 20 µl Protein A Sepharose and washed extensively with buffer A on 96-well filtration plates (Millipore, Bedford, MA). Bound radioactivity was determined in a liquid scintillation counter and antibody levels were expressed in arbitrary units (AU) calculated as follows: $U = (\text{cpm [test serum]} - \text{cpm [negative standard serum]}) / (\text{cpm [positive standard serum]} - \text{cpm [negative standard serum]}) \times 100$. In each experiment, the same positive and negative standard sera were included in duplicates. To achieve high specificity of antibody detection, the cut-off for antibody positivity was set as the 99th percentile of normal controls (3.4 IA-2ic U). The intraassay and interassay coefficients of variation of the GAD antibody assay were 9.6% and 13.9%, respectively. In the Combined Antibody Workshop, this assay had a diagnostic sensitivity of 72.5% and a specificity of 96% for type 1 diabetes (Lab ID number BV).

Other autoantibodies

Thyroid autoantibodies

(TG and TPO Ab) were determined with a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant human TG or TPO as substrate (Medizintechnik GmbH, Elias, Freiburg, Germany). A quantity of 10 µl of serum was incubated for 15 min and, after washing, the second antibody was added for another 15 min. After termination of the reaction, the sample was read at 492 nm in an automated ELISA reader. Titres of > 100 were considered positive. The standardization of the TPO Ab assay was carried out against the WHO standard serum NIBSC 66/387.

Adrenal autoantibodies and antibodies to gastric parietal cells (GPC-Ab)

Adrenal autoantibodies and antibodies to gastric parietal cells (GPC-Ab) were detected by indirect immunofluorescence on cryostat sections of rat adrenal gland and stomach as substrate.

Statistical analysis

Comparison between groups was done by Mann-Whitney U-test, Wilcoxon test, Chi-square test with Yates correction where appropriate. Correlations were calculated according to Spearman rank correlation coefficient, analysis of variance (ANOVA) and Kruskal-Wallis analysis by ranks was applied, and multiple range analysis according to Scheffe's method was used where appropriate. Elaboration of data was accomplished by the Statgraphics Statistical Package. A p-value of less than 0.05 was considered to be significant.

Results

We studied 1436 first-degree relatives of patients with type 1 diabetes. Among them 98 (6.8%) subjects were tested positive for ICA (mean age 15.8 ± 10.9), 135 (9.4%) for GAD-65 (mean age 25.7 ± 14.1) and 52 (3.6%) for IA-2ic antibodies (mean age 20.2 ± 13.3), respectively. The distribution of the antibodies in different age groups is illustrated in Table 1. We found that 28 (2.0%) individuals were positive for all three antibodies, 48 (3.3%) had two positive antibodies and 105 (7.3%) were positive for only one antibody (ICA or GAD-65 or IA-2ic) (Fig. 1).

Table 1 Prevalence of autoantibodies (IA-2ic, GAD-65 and ICA) in first-degree relatives of patients with type 1 diabetes

Subjects Age (years)	ICA		GAD-65		IA-2	
	n	%	n	%	n	%
0-9 (n=267)	30	(11.2)	22	(8.2)	14	(5.2)
10-19 (n=356)	44	(12.4)	28	(7.9)	15	(4.2)
20-29 (n=175)	12	(6.8)	23	(13.1)	8	(4.6)
30-39 (n=230)	4	(1.7)	32	(13.9)	7	(3.0)
≥40 (n=408)	8	(2.0)	30	(7.4)	8	(2.0)
Total (n=1436)	98	(6.8)	135	(9.4)	52	(3.6)

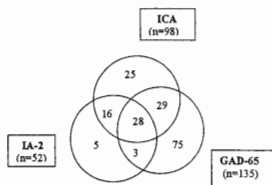


Fig. 1 Combination of IA-2ic, GAD-65 and ICA antibodies in first-degree relatives of patients with type 1 diabetes.

There was no significant association regarding sex in any of these antibodies. Using the one-way analysis of variance, the effect of age on ICA, IA-2ic and GAD-65 antibody positivity was analyzed. According to the results, the aforementioned effect is statistically significant for ICA (F-ratio = 46.7, $p < 0.001$) and IA-2ic antibodies (F-ratio = 11.8, $p < 0.001$), i.e., positive antibodies (ICA or IA-2ic) occurred more frequently in childhood than in adulthood. This was not observed in GAD-65-positive individuals (F-ratio = 0.23, $p > 0.1$). When antibody frequencies were analyzed according to the different age groups, IA-2ic and/or GAD-65 were more frequent in younger relatives ($p < 0.04$) and the same was observed for ICA and/or GAD-65 antibodies concerning the age groups ($p < 0.001$).

Frequency of autoantibodies according to relationship to the proband

According to Kruskal-Wallis and ANOVA analysis, there was a significant association between the ICA and IA-2ic antibody positivity and the relationship to the diabetic proband. Higher antibody positivity was observed in the subgroup of offsprings and siblings than in that of parents, $p < 0.05$.

There was no significant association ($p > 0.05$) between GAD-65 antibody positivity and the relationship to the diabetic proband (Fig. 2).

Association between the three antibodies

ICA were found to be positively correlated with GAD-65 and IA-2ic antibodies ($r = 0.63$ and $p < 0.001$, $r = 0.54$ and $p < 0.001$, respectively), whereas the correlation between GAD-65 and IA-2ic was lower ($r = 0.36$, $p < 0.05$). IA-2ic were detected in 44 (44.8%) and GAD-65 in 57 (58.2%) of 98 ICA positive relatives, respectively.

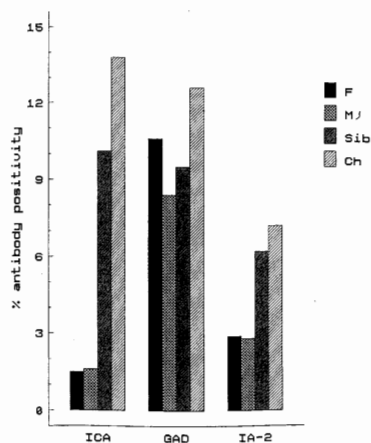


Fig. 2 Comparison of autoantibody positivity between the subgroups of Female/Male and Ch/Sib.

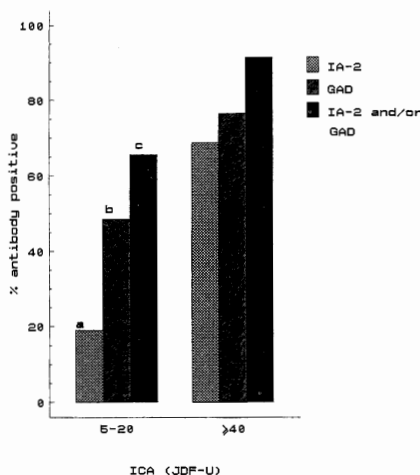


Fig. 3 Comparison of IA-2ic and GAD-65 Abs with ICA Ab level 5–20 JDF-u vs. ICA level ≥ 40 JDF-u; a: $p < 0.01$, b: $p < 0.01$ and c: $p < 0.001$.

A significant association of IA-2ic and GAD-65 antibodies was found in subjects with ICA levels of 5–20 JDF-u (12 out of 64, 19% and 31 out of 64, 48.5%) respectively ($p < 0.001$) or with ICA levels of 40 JDF-u or more (22 out of 34, 65% and 26 out of 34, 76.5%) respectively ($p < 0.001$), compared to subjects with ICA levels less than 5 JDF-u (Fig. 3). Combined screening for the presence of either IA-2ic and/or GAD-65 identified 73 out of 98 (74.5%) of all ICA positive relatives and 91.2% of individuals with high ICA level (≥ 40 JDF-u), (Fig. 3).

In the 25 relatives who had ICA alone (1.7% of the total population), ICA levels (38.8 ± 36.2) JDF-u were significantly lower than in sera with one ($n = 73$, 59.8 ± 48.2) JDF-u, $p < 0.01$ or two additional markers ($n = 28$, 98.4 ± 65.9) JDF-u, $p < 0.001$.

Association with other autoantibodies

According to the ANOVA analysis technique, a statistically significant correlation was found between IA-2ic and thyroid (TG and/or TPO) antibodies.

Further analysis showed that higher levels of IA-2ic observed on those subjects with TPO antibody positivity ($p < 0.001$). A positive trend, however not significant, was found in the association between ICA and TPO antibodies ($p = 0.09$). The association between islet cell autoantibodies and thyroid Abs was stronger ($p < 0.01$) in the subgroup of offsprings and siblings. Among subjects with islet-autoantibody positivity, 2 (0.7%) were tested positive for adrenal-AAb and 11 (4%) for GPC. There was no significant association of any antibody (ICA/GAD-65/IA-2ic) with adrenal (6 out of 1436, 0.4%) and gastric parietal-cell antibodies (67 out of 1436, 4.7%).

Discussion

In recent years, interest has focused on predicting type 1 diabetes mellitus in first-degree relatives of diabetic patients and in the general population. The slowness of diabetes development allows the detection of immunology abnormalities prior to diabetes onset. The onset of the disease is becoming increasingly predictable through the detection of associated autoantibodies [23].

Prediction of future type 1 diabetes, however, has been hampered using only the conventional risk markers such as ICA or IAA. Recent studies suggest that a better predictive value may be obtained if several markers are combined [24,25].

In this study, antibodies to GAD-65 and IA-2ic were determined in 1436 first-degree relatives of type 1 diabetic patients, and we compared these antibodies with ICA, which are the most widely used antibody marker in risk assessment [4,5,18,26,27]. Since GAD-65 and IA-2ic antibodies are detected at a high frequency in new onset type 1 diabetic patients and may precede clinical onset by several years [24,25,28,29], we addressed their relation to ICA antibodies in individuals at risk of type 1 diabetes.

Antibodies to GAD-65 were found to be present in 9.4% (135 out of 1436 first-degree relatives), and this prevalence is higher in comparison to previous study. However, we have to point out that our study population was different, as we included a high proportion of parents (41.4%). Antibodies to GAD-65 were found to be significantly more frequent in ICA-positive individuals and correlate positively with higher levels of ICA. These findings are in agreement with previous reports [21,30–32]. GAD-65 identified 76.5% of all ICA ≥ 40 positive relatives.

Additional analysis of antibodies to IA-2ic can improve the prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives and in general population [18]. IA-2ic antibodies were present in 3.6% of our study population, and this prevalence seems to be in the same range of the frequencies for ICA and IAA antibodies [5,6,9,18,22]. IA-2ic identified 44.8% of all ICA positive individuals and occurred more frequently in subjects with ICA titer ≥ 40 JDF-u (68.8%). The prevalence of IA-2ic antibodies in ICA-positive first-degree relatives is not comparable with previous studies because of our different study population [18,33].

Combined screening for the presence of either GAD-65 and/or IA-2ic antibodies detected 74.5% of all ICA-positive relatives. This combined screening test appears to be more affordable and suitable for large-scale testing of sera, as it overcomes the technical difficulties usually encountered in the determination of ICA antibodies. Among the 25 subjects (1.7% of the study population) who were exclusively ICA-positive, 19 (76%) individuals had ICA titer ≤ 10 JDF-u indicating that only a small number of subjects at high risk of progressing onto disease onset could remain undetectable by the screening of GAD-65 or IA-2ic antibodies. Conversely, antibodies to GAD-65 and/or IA-2ic were found to be present in 91.2% of the relatives with ICA more than 20 JDF-u. This result confirms, once again, that the correlations between GAD-65 and/or IA-2ic and high titer of ICA antibodies increases the positive predictive value for the diabetes disease [18,34,35]. Individuals progressing to type 1 diabetes express two or more of the islet autoantibodies

[36]. Thus, quantitative analysis of a series of autoantibodies will be essential for identifying individuals at risk for type 1 diabetes.

Most of the ICA negative but GADA and/or IA-2ic positive relatives had GADA only. The high frequencies of single GADA may be explained by higher ages included in our study.

The tendency for subjects with ICA in the present and other studies to be positive for IA-2ic or GAD-65 is consistent with the hypothesis that ICA are composed to a degree of antibodies to these two antigens. This correlation indicates that these antibodies may be useful in predicting the disease onset.

When antibody frequencies were analyzed according to the relationship to the diabetic proband, the offsprings and siblings had a higher frequency of ICA and IA-2ic Abs than parents (Fig. 2). These findings are in agreement with previous observations on a preferential occurrence of antibody positivity at younger ages [37,38].

We observed no correlation between antibodies and gender. The prevalence of ICA and IA-2ic was significantly higher in younger age groups, but GAD-65 Ab were seen with the same frequencies in all age groups. It is known that the diagnostic sensitivity and specificity of GAD-65 Ab varies with the age at disease onset, with the highest sensitivity in older ages [39].

Type 1 diabetes mellitus is well known to be associated with the development of other autoimmune diseases including thyroid autoimmunity, Addison's disease and pernicious anemia. Since only limited information was available about the appearance of other organ-specific autoantibodies in subjects at risk of type 1 diabetes, we analyzed thyroid, adrenal and gastric parietal cell antibodies in our population. A positive correlation was observed between IA-2ic and thyroid antibodies. Higher levels of IA-2ic were observed in subjects with TPO-antibody positivity. A positive trend, however not significant, was found between ICA and TPO Abs. This positive correlation between islet autoantibodies and thyroid Abs was stronger in the subgroup of offspring and siblings. These data suggest that a subgroup of islet antibody-positive 1st degree relatives of type 1 diabetes also suffer from a latent or subclinical thyroid disease. This hypothesis must be confirmed in follow-up studies.

Combination of markers will probably improve our capability to predict the disease and screen for those who will go on to develop clinical type 1 diabetes mellitus, as opposed to those who display signs of beta-cell specific autoimmunity without ever overtly presenting with diabetes. However, the risk of diabetes is dependent on the type and combination of antibodies found in the sera of first-degree relatives.

In summary, GAD-65 and IA-2ic antibodies are easily detectable in a single combined assay system. This antibody combination identifies almost all first-degree relatives with ICA of more than 20 JDF-units, so far considered to be at high risk for developing type 1 diabetes mellitus. In addition, screening of thyroid Abs is recommended by those 1st degree relatives positive for islet-autoantibodies. We conclude that the combination of GAD-65 and anti-IA-2ic antibodies are potentially the antibodies of choice for first-line screening.

References

- Eisenbarth GS. Type 1 diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 1986; 314: 1360–1368
- Boitard C, Debray-Sachs M, Pouplard A, Assan R, Hamburger J. Lymphocytes from diabetics suppress insulin release *in vitro*. *Diabetologia* 1981; 21: 41–46
- Gorsuch AN, Spencer KM, Lister J, McNally JM, Dean BM, Bottazzo GF, Cudworth AG. The natural history of Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus: evidence for a long prediabetic period. *Lancet* 1981; II: 1363–1365
- Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 1974; II: 1279–1283
- Bonifacio E, Bingley PJ, Shattock M, Dunger D, Gale EAM, Bottazzo GF. Quantification of islet-cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1990; 335: 147–149
- Tarn AC, Thomas JM, Dean BM, et al. Predicting insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1988; I: 845–850
- 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* 1990; 33: 731–736
- Lernmark A, Molenaar JL, van Beers WA, Yamaguchi Y, Nagataki S, Ludvigsson J, Maclaren NK. The Fourth International Serum Exchange Workshop to standardise cytoplasmic islet cell antibodies: the Immunology and Diabetes Workshops and Participating Laboratories. *Diabetologia* 1991; 34: 534–535
- Roll U, Christie MR, Standl E, Ziegler A. Association of anti-GAD antibodies with islet cell antibodies and insulin autoantibodies in first-degree relatives of type 1 diabetic patients. *Diabetes* 1994; 43: 154–160
- Seissler J, Hering B, Richter W, et al. Antibodies to the Mr 64000 (64K) protein in islet cell antibody positive non-diabetic individuals indicate high risk for impaired beta-cell function. *Diabetologia* 1992; 35: 550–554
- Chaillous L, Delamairé M, Elmansour A, et al. Combined analysis of islet cell antibodies which cross-react with mouse pancreas, antibodies to the Mr 64000 islet cell protein, and antibodies to glutamate decarboxylase in subjects at risk for IDDM. *Diabetologia* 1994; 37: 491–499
- Christie MR, Tun RYM, Lo SSS, et al. Antibodies to GAD and tryptic fragments of islet 64K antigen as distinct markers for development of IDDM. *Diabetes* 1992; 41: 782–786
- Christie M, Genovese S, Cassidy D, et al. Antibodies to islet 37K antigen, but not to glutamate decarboxylase, discriminate rapid progression to IDDM in endocrine autoimmunity. *Diabetes* 1994; 43: 1254–1259
- Bonifacio E, Genovese S, Braghi S, et al. Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity. *Diabetologia* 1995; 38: 816–822
- Aanstoot HJ, Sigurdsson E, Jaffe M, et al. Value of antibodies to GAD-65 combined with islet cell cytoplasmic antibodies for predicting IDDM in a childhood population. *Diabetologia* 1994; 37: 917–924
- Yu L, Gianani R, Eisenbarth GS. Quantitation of glutamic acid decarboxylase autoantibody levels in prospectively evaluated relatives of patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 1994; 43: 1229–1233
- Schott M, Schatz D, Atkinson M, et al. GAD-65 autoantibodies increase the predictability but not the sensitivity of islet cell and insulin autoantibodies for developing insulin dependent diabetes mellitus. *J Autoimmun* 1994; 7: 865–872
- Bingley PJ, Christie MR, Bonifacio E, et al. Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. *Diabetes* 1994; 43: 1304–1310

- ¹⁹ Payton MA, Hawkes CJ, Christie MR. Relationship of the 37 000- and 40 000 Mr tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 (ICA 512). *J Clin Invest* 1995; 96: 1506–1511
- ²⁰ Lan MS, Goto Y, Notkins AL. Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma. *DNA Cell Biol* 1994; 5: 505–514
- ²¹ Petersen JS, Hejnaes KR, Moody A, Karlsen AE, Marshall MO, Hoier-Madsen M, Boel E, Michelsen B, Dyrberg T. Detection of GAD-65 antibodies in diabetes and other autoimmune diseases using a simple radioligand assay. *Diabetes* 1994; 43: 459–467
- ²² Seissler J, Morgenthaler NG, Achenbach P, Lampeter EF, Glawe D, Payton M, Christie M, Scherbaum WA, and the DENIS Study Group. Combined screening for autoantibodies to IA-2 and antibodies to glutamic acid decarboxylase in first-degree relatives of patients with IDDM. *Diabetologia* 1996; 39: 1351–1356
- ²³ Maclaren NK. How, when and why to predict IDDM. *Diabetes* 1988; 37: 1591–1594
- ²⁴ Atkinson MA, Maclaren NK, Scharp DW, Lacy PE, Riley WJ. 64 000 Mr autoantibodies as predictors of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1990; 335: 1357–1360
- ²⁵ Betterle C, Presotto F, Pedini B, Moro L, Slack RS, Zanette F, Zanchetta R. Islet cell and insulin autoantibodies in organ-specific autoimmune patients. Their behaviour and predictive value for the development of type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. A 10-year follow-up study. *Diabetologia* 1987; 30: 292–297
- ²⁶ Riley WJ, Maclaren NK, Krischer J, et al. A prospective study of the development of diabetes in relatives of patients with insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* 1990; 323: 1167–1172
- ²⁷ Knip M, Vahasalo P, Karjalainen J, Lounamaa R, Akerblom HK, and the Childhood Diabetes in Finland Study group. Natural history of preclinical IDDM in high risk siblings. *Diabetologia* 1994; 37: 388–393
- ²⁸ Christie M, Landin-Olsson M, Sundkvist G, Dahlquist G, Lernmark A, Baekkeskov S. Antibodies to a Mr 64 000 islet cell protein in Swedish children with newly diagnosed Type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1988; 31: 597–602
- ²⁹ Baermeier H, McCulloch D, Neifing J, Rajotte R, Palmer J, Lernmark A. Progression of beta-cell dysfunction is associated with 64K antibodies in first degree relatives of IDDM patients. *Diabetes* 1990; 39 (Suppl 1): 122A
- ³⁰ Seissler J, Amann J, Mauch I, et al. Prevalence of autoantibodies to the 65- and 67-kD isoforms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1993; 92: 1394–1399
- ³¹ Verge CF, Howard NJ, Rowley MJ, et al. Anti-glutamate decarboxylase and other antibodies at the onset of childhood IDDM: a population-based study. *Diabetologia* 1994; 37: 1113–1120
- ³² Hagopian WA, Sanjeevi CB, Kockum I, et al. Glutamate decarboxylase-, insulin-, and islet cell-antibodies and HLA typing to detect diabetes in a general population-based study of Swedish children. *J Clin Invest* 1995; 95: 1505–1511
- ³³ Ongagna CJ, Marshal-Levy C. Anti-37 kDa antibodies are associated with the development of IDDM in individuals with islet cell antibodies. *Diabetologia* 1995; 38: 370–375
- ³⁴ Thivolet CH, Tappaz M, Durand A, Petersen J, et al. Glutamic acid decarboxylase (GAD) autoantibodies are additional predictive markers of type I (insulin-dependent) diabetes mellitus in high risk individuals. *Diabetologia* 1992; 35: 570–576
- ³⁵ Bingley PJ, Bonifacio E, Williams AJK, Genovese S, Bottazzo GF, Gale EAM. Prediction of IDDM in the General Population – Strategies Based on Combinations of Autoantibody. *Diabetes* 1997; 46: 1701–1710
- ³⁶ Simone E, Eisenbarth GS. Chronic Autoimmunity of Type I Diabetes. *Horm Metab Res* 1996; 28: 332–336
- ³⁷ Bingley PJ, Bonifacio E, Shattock M, et al. Can islet cell antibodies predict IDDM in the general population? *Diabetes care* 1993; 16: 45–50
- ³⁸ Roll U, Christie MR, Fuechtenbusch M, et al. Perinatal autoimmunity in offspring of diabetic parents: the German multicenter BABY-DIAB study. Detection of humoral immune responses to islet antigens in early childhood. *Diabetes* 1996; 45: 967–973
- ³⁹ Kockum I, Lernmark A, Dahlquist G, et al. Genetic and immunological findings in patients with newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 1996; 28: 344–347

Requests for reprints should be addressed to:

E. Hatziageorgaki, M.D.

Lykourgou Str. 7
16675 Athens
Greece

Phone: +30 (1) 7211635

Fax: +30 (1) 7211635

E-Mail: eri@hndc.gr

Intervening before the onset of Type 1 diabetes: baseline data from the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT)

The European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT) Group*¹, E. A. M. Gale²

¹ Diabetes and Metabolism, Division of Medicine, University of Bristol, Bristol, UK

² Medical School Unit, Southmead Hospital, Bristol, UK

Abstract

Aims/hypothesis. To set up a clinical trial to establish whether nicotinamide can prevent or delay clinical onset of Type 1 diabetes.

Method. The European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial is a randomised, double-blind, placebo-controlled intervention trial undertaken in 18 European countries, Canada and the USA. Entry criteria were a first-degree family history of Type 1 diabetes, age 3–40 years, confirmed islet cell antibody (ICA) levels greater than or equal to 20 JDF units, and a non-diabetic OGTT; the study group was further characterised by intravenous glucose tolerance testing, measurement of antibodies to GAD, IA-2 and insulin and HLA class II genotyping.

Results. ICA screening was carried out in approximately 30,000 first-degree relatives. A total of 1004 individuals fulfilled ICA criteria for eligibility, and 552 (288 male) were randomised to treatment. Of these, 331 were aged less than 20 years (87% siblings and 13% offspring of the proband with diabetes) and 221 were 20 years of age

or more (76% parents, 21% siblings and 3% offspring). Oral glucose tolerance was normal in 500 and impaired in 52 (9.4%), and first phase insulin response in the IV-GTT was below the 10th centile in 34%. Additional islet autoantibodies were identified in 354 trial entrants. Diabetes-associated HLA class II haplotypes were found in 84% of the younger age group and 80% of the older group. The protective haplotype HLA-DQA1*0102-DQB1*0602 was found in 10% overall.

Conclusions/interpretation. ENDIT has shown that a trial of an intervention designed to halt or delay progression to Type 1 diabetes can be carried out on a multinational collaborative basis, as and when potentially safe and effective forms of intervention become available. Primary screening with biochemically defined autoantibodies will substantially reduce the number of lower risk individuals to be included in future intervention trials. [Diabetologia (2003) 46:339–346]

Keywords Type 1 diabetes, ENDIT, nicotinamide, prediction, prevention, ICA, DPT-1.

Received: 19 August 2002 / Revised: 13 November 2002
Published online: 27 February 2003
© Springer-Verlag 2003

Corresponding author: E. A. M. Gale, Medical School Unit, Southmead Hospital, Bristol, BS10 5NB UK
E-mail: edwin.gale@bristol.ac.uk

Abbreviations: ENDIT, European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial; ICA, Islet cell autoantibodies; IA-2, Protein tyrosine phosphatase IA-2; IAA, Islet autoantibodies; FPIR, First phase insulin response; IDS, Immunology of Diabetes Society; SSO, Sequence specific oligonucleotides; NOD, Non-obese diabetic; BB, Bio-breed; PARP, Poly (ADP)-ribose polymerase; JDF, Juvenile Diabetes Federation.

* For a full list of the group members see acknowledgements

Europe includes countries with the highest incidence of Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in the world. These rates continue to rise rapidly, and the EURODIAB TIGER Concerted Action has shown an annual 3 to 4% increase in the incidence of childhood diabetes across our continent [1]. In Finland, it is estimated that childhood diabetes is now four times as common as it was in the 1950s [2]. There is currently no means of preventing or curing this disorder. Type 1 diabetes can, however, be predicted by screening for islet autoantibodies, and both animal and human pilot studies suggest that prevention is possible. The US Diabetes Prevention Trial – Type 1 (DPT-1) has recently reported experience

with parenteral insulin therapy in high risk relatives of an individual with Type 1 diabetes [3]. Here we show baseline data from a trial of high-dose oral nicotinamide, and demonstrate that a candidate preventive measure can be tested successfully on a multinational collaborative basis.

Methods

Study Design. ENDIT is a randomised, double-blind, placebo controlled trial designed to test whether daily oral administration of high dose nicotinamide can produce a clinically useful reduction in the rate of progression to Type 1 diabetes in relatives at increased risk of contracting the disease. The null hypothesis is that nicotinamide at a dose of 1.2 g/m² cannot achieve a 35 to 40% reduction in the rate of progression to Type 1 diabetes over a five year period. The study is designed to have 90% power to detect such a difference at the 5% significance level, based on the assumption that non-diabetic first-degree relatives under the age of 40 with confirmed levels of islet cell antibodies (ICA) greater than or equal to 20 JDF units have more than 40% risk of insulin therapy within 5 years. Sample size calculations showed that a minimum of 211 in each group would be needed to achieve this.

Inclusion Criteria. First-degree relatives of patients who developed Type 1 diabetes before age 20, and who were themselves aged between 3 and 40 years, were eligible for screening. At the start of the study, the upper age limit for inclusion was 60 years, but this was lowered in 1995 following a multicentre analysis which showed that the risk associated with ICA in relatives above age 40 was low [4]. Family members over age 40 who had already been recruited and screened received an explanation of this revised risk estimate but were allowed to proceed to randomisation if they so wished.

Study organisation. Study co-ordination and data management were carried out centrally. Participants have been identified via 354 local centres in 20 countries in Europe, Canada and the USA (Table 1). Participation in each country is organised through one to two national co-ordinators, who are responsible for all communications with local centres and for ensuring local compliance with the protocol. The protocol was approved by the research ethics committee or equivalent in each participating centre, and also by the appropriate national drug regulatory authorities. Written informed consent was obtained from all participants.

Screening. Eligible first-degree relatives were screened for ICA. A second sample was requested from any relative with ICA greater than or equal to 5 JDF units on initial testing. Those with ICA greater than or equal to 20 JDF units in at least one sample as measured in the central laboratory and with ICA greater than or equal to 5 JDF units in the other sample were invited to undergo further evaluation.

Other inclusion criteria. Prior to randomisation a full clinical assessment was carried out with determination of standard biochemical and haematological safety parameters, oral glucose tolerance test and intravenous glucose tolerance test. Height and weight were measured at the outset in all participants, and Tanner staging carried out on children; an X-ray of the left wrist was taken to estimate bone age in all children under the age of 14.

Table 1.

Local Centre	Individuals under 20 years old at randomisation	Individuals over 20 years old at randomisation
Austria	3	6
Belgium ^a	2	-
Canada ^a	39	34
Croatia	-	1
Denmark	12	18
Finland ^a	54	27
France ^a	16	1
Germany ^a	10	4
Greece	4	3
Hungary	20	8
Italy ^a	6	2
Norway	17	19
Poland	43	23
Russia	8	4
Spain ^a	20	15
Sweden ^a	9	14
Switzerland	8	3
Turkey	4	6
United Kingdom ^a	37	29
USA (Texas) ^a	19	4

^a Initial ICA testing in local laboratory

Exclusion criteria. Individuals with any chronic disease likely to affect outcome, toxicity or compliance, women who were breast feeding, pregnant or of child bearing age and not using effective contraception, and anyone taking vitamin preparations containing nicotinamide were excluded from the study. Those found to have diabetes on oral glucose tolerance testing were also excluded.

Oral glucose tolerance test (OGTT). Oral glucose (1.75 g/kg body weight, up to a maximum of 75 g) was administered following an overnight fast. Venous plasma samples collected at 0 and 120 minutes were tested for glucose in the local study centre laboratory, and diabetes and impaired glucose tolerance were defined using WHO criteria [5].

Intravenous glucose tolerance test (IVGTT). IVGTTs were carried out according to the ICARUS protocol [6]. A glucose dose of 0.5 g/kg, up to a maximum of 35 g, was infused over 3 min ± 15 s, and blood samples collected at -5, 0, 1, 3, 5 and 10 min. First phase insulin response was calculated as the sum of the insulin levels at +1 and +3 min.

Islet cell antibodies. The initial ICA assay in all or most samples was carried out in local laboratories in ten countries (Table 1), and all ICA testing was done in the central laboratory for the remainder. Samples found to have ICA greater than or equal to 5 JDF units in local laboratories were sent to the central laboratory for confirmation. All local laboratories participated in a sample exchange and workshop programme to ensure that assay sensitivity was maintained throughout the period of screening, but study entry was based solely upon results from the central laboratory.

ICA determination in the central laboratory was performed by indirect immunofluorescence [7]. Briefly, sera were incubated on sections of human pancreas for 30 min at room temperature. After washing, bound antibody was revealed using a sheep anti-human immunoglobulin (GAM) FITC conjugate

(TBS, Birmingham, UK). The sections were examined in a blinded fashion under a fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany) by two observers. All samples were initially assayed at a 1 in 2 dilution and assigned an arbitrary intensity score from 0 to 7. Samples with an intensity score of 1 or greater were re-assayed in a quantification assay [8], while those samples with an intensity score of less than 1 were considered negative. Five standards and two internal controls were included in each assay. Overall assay performance was monitored by the inclusion of 3 coded "external" quality control samples in every 100 samples assayed and the inter assay coefficient of variation (CV) of the ICA assay was 51% at 14 JDF units, 35% at 38 JDF units and 22% at 60 JDF units. The ICA assay achieved 81% sensitivity with 86% specificity in the First Immunology of Diabetes Society (IDS) Combined Antibody Workshop [9]. A number of pancreas substrates were used during the course of the study. To maintain consistency, each new substrate was evaluated in parallel with the old substrate by measuring ICA on a panel of 140 samples.

GAD and IA-2_{ic} autoantibodies. Autoantibodies to GAD and IA-2_{ic} were measured in radiobinding assays in the Division of Medicine, University of Bristol, UK [10], and considered positive if above the 97.5th centile of a control population of 2860 schoolchildren. The GAD antibody assay achieved 91% sensitivity with 99% specificity, and the IA-2 antibody assay achieved 74% sensitivity with 99% specificity in the first Immunology of Diabetes Society (IDS) combined antibody workshop [9].

Insulin autoantibodies. Samples were assayed for insulin autoantibodies in the Division of Medicine, University of Bristol, UK [11], using a format similar to that used for measuring GAD and IA-2 antibodies. Immune complexes were isolated using protein A sepharose. Bound counts for each sample were calculated after subtraction of background counts, and results were expressed in arbitrary units derived from a standard curve. Sera with insulin binding above 0.4 units were tested in a competition assay in which each sample was incubated with label in the presence of excess unlabelled insulin (Humulin, Lilly, Basingstoke, Hants, UK). Specific bound counts were converted into arbitrary units as described above. Samples assayed for insulin autoantibodies were considered positive if they had levels above the 97.5th centile of the schoolchildren. The assay achieved 58% sensitivity with 99% specificity on the samples included in the First IDS Combined Antibody Workshop [9].

Insulin assay. Plasma insulin was measured in a single laboratory at the Steno Diabetes Centre, Gentofte, Denmark using an enzyme-linked two-site immunoassay [12]. The method uses two murine monoclonal antibodies that bind to different epitopes on the insulin molecule and shows a less than 1% cross-reactivity with intact human proinsulin. During the course of the study, kits produced by two manufacturers (ELISA, Dako, Ely, UK) and (Autodelphia, Wallac Oy, Turku, Finland) were used for insulin measurement. The kits were based on the same immunochemistry and detailed method comparison showed results obtained by both methods to be essentially identical. To allow comparison of IVGTT results with FPIR centiles obtained in the University of Washington, Seattle and used for DPT-1, 105 samples spanning the range 0–500 pmol/l were assayed in both laboratories. The regression equation of insulin concentration measured in Seattle on the insulin concentration measured in the Steno laboratory was used to derive a correction factor to standardise the measurement to the Seattle assay [13].

HLA genotyping. HLA genotyping was carried out in the Institute of Transplantation Immunology, National Hospital, Oslo, Norway. Typing of HLA-DQA1, -DQB1 and -DRB1*04 subtypes were mainly done using PCR-SSO [14]. A few samples were also typed for DQA1, DQB1 and/or DRB1*04 subtypes with an allele specific PCR kit (Olerup SSP Genovision, Oslo, Norway) and/or with a reverse dot-blot kit (Reli-SSOP, Dynal, Oslo, Norway).

Results

First-degree relatives were screened from 20 countries (Table 1). Initial ICA testing on approximately 16 000 samples was carried out in local laboratories and 3402 of these were sent to the central laboratory for confirmation of ICA positivity, while samples from a further 13 718 relatives were first tested for ICA in the central laboratory. Approximately 16% of those tested were above age 40 when the first screening sample was collected.

A total of 1004 individuals fulfilled the ICA criteria for eligibility of whom 552 were randomised. The reasons for non-randomisation of the remainder are shown in Fig. 1.

Nationality is shown in Table 1 and other subject characteristics are shown in Table 2. Of 552 relatives randomised, 331 were below age 20 years and 221 aged more than 20. In the younger age group 87% were siblings of a diabetic proband and 13% were offspring. In the older age group 21% were siblings, 76% were parents and 3% were offspring.

Islet autoantibodies. Overall, 64% of those randomised had at least one other antibody marker in addition to ICA, representing 76% of those aged less than 20 and 46% of those above this age.

HLA class II. The diabetes-associated haplotypes HLA-DQA1*03-DQB1*0302 (DQ8) and/or HLA-DQA1*0501-DQB1*0201 (DQ2) were found in 84% of the younger age group and 80% of the older group. The high-risk DQ2/DQ8 heterozygous genotype was found in 23% of the younger and 14% of the older group respectively. The protective HLA-DQA1*0102-DQB1*0602 (DQ6) was found in 8% of those below age 20 and 12% of the older group. This haplotype was associated with ICA alone in 26 individuals, with one additional antibody in 11, with two additional antibodies in four, and with three additional antibodies in nine individuals. For technical reasons, genotyping could not be carried out on 33 samples (21 below age 20).

Oral glucose tolerance. Overall, of 552 individuals randomised, 52 (9%) had impaired glucose tolerance (IGT) by WHO criteria in the initial oral glucose tolerance test. Those with ICA alone were less likely to have IGT than those with additional antibodies (4%

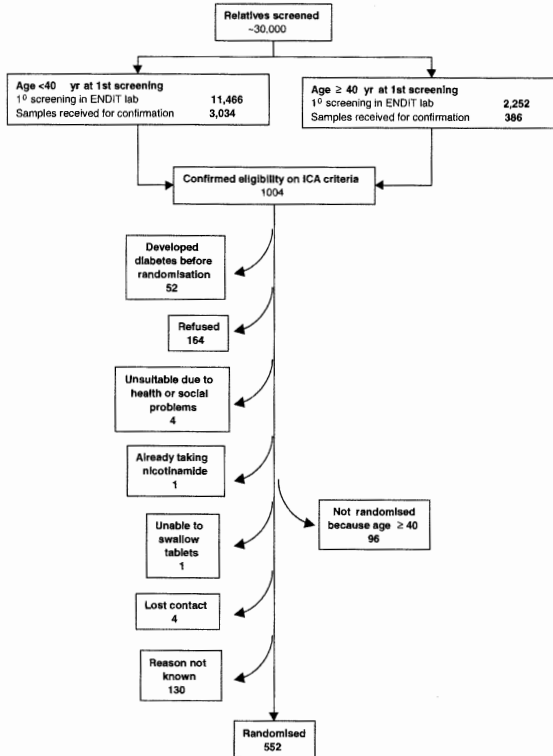


Fig. 1. Subject disposal

vs. 12%, $\chi^2=10.5$, $p=0.001$). Of 50 individuals with DQ6, 10% had IGT compared with 9% in the remainder. ($\chi^2=0.04$, $p=0.85$).

First phase insulin response. The median (range) first phase insulin response, measured as 1+3 min insulin levels in the intravenous glucose tolerance test, was 362 pmol/l (43–1960 pmol/l) in those under age 20 years and 476 pmol/l (8–2666 pmol/l) in the older age group. Overall, 164 of 487 tested (34%) had FPIR below the equivalent of the 10th centile used as an entry criterion for the parenteral arm of DPT-1; 100 individuals in the younger age group (34%) and 64 in the older age group (33%). Those with ICA alone were less likely to have an FPIR below the 10th centile than those with additional antibodies (19% vs. 42%, $\chi^2=26.52$, $p<0.0001$). The frequency of low FPIR was

however similar in individuals with an HLA-DQ6 haplotype and those who did not carry the protective haplotype (27% vs. 34%, $\chi^2=1.11$, $p=0.29$). For technical reasons, including sample haemolysis, FPIR was not available on 65 individuals (38 below age 20).

Discussion

The prodromal phase preceding the onset of Type 1 diabetes is characterised by progressive beta-cell destruction and the appearance of circulating islet auto-antibody markers, thus providing an opportunity for intervention to halt or delay the disease process. Prophylaxis of diabetes has been achieved, sometimes with lasting protection, using a variety of interventions in two animal models of spontaneous autoimmune diabetes, the NOD mouse and the BB rat. Early human studies of immune intervention concentrated

Table 2. Baseline Characteristics of Trial Entrants

		Age below 20 <i>n</i> (%)	Age above 20 <i>n</i> (%)
Total Subjects Randomised		331	221
Sex	Male	194 (59)	94 (43)
	Female	137 (41)	127 (57)
Age	<5 yrs	15 (5)	–
	5–9 yrs	113 (34)	–
	10–14 yrs	124 (37)	–
	15–19 yrs	79 (24)	–
	20–24 yrs	–	31 (14)
	25–29 yrs	–	20 (9)
	30–34 yrs	–	48 (22)
	35–39 yrs	–	83 (37)
	≥ 40 yrs	–	39 (18)
Relationship to Proband	Mother	–	105 (48)
	Father	–	63 (28)
	Offspring	42 (13)	6 (3)
	Sibling	289 (87)	47 (21)
Islet Autoantibodies	Median ICA	50 JDFu	40 JDFu
	GADA ≥97.5 th centile	233 (70)	95 (43)
	IA-2A ≥97.5 th centile	181 (55)	50 (23)
	IAA ≥97.5 th centile	190 (57)	38 (17)
No. of Additional Antibodies	None	80 (24)	118 (54)
	1 antibody	36 (11)	45 (20)
	2 antibodies	77 (23)	36 (16)
	3 antibodies	138 (42)	22 (10)
HLA-DQ Genotype	<i>No. tested</i>	310	209
	DQ2/DQ8	73 (24)	28 (14)
	DQ8/DQ8	20 (6)	13 (6)
	DQ2/DQ2	21 (7)	10 (5)
	DQ8/X	90 (29)	50 (24)
	DQ2/X	41 (13)	44 (21)
	DQX/DQX	41 (13)	38 (18)
	DQ6/DQ8	5 (2)	7 (3)
	DQ6/DQ2	8 (3)	15 (7)
	DQ6/X	10 (3)	4 (2)
	DQ6/DQ6	1 (–)	–
Oral glucose tolerance	Normal glucose tolerance	296 (89)	204 (92)
	Impaired glucose tolerance	35 (11)	17 (8)
First phase insulin response	<i>No. tested</i>	293	194
	Median (range) (pmmol/l)	362 (43–1960)	445 (8–2666)

on the attempt to prolong beta-cell function in recently diagnosed patients requiring insulin therapy. Prospective randomised placebo controlled double-blind studies showed, for example, that Cyclosporin A can protect beta-cell function to the extent that some 25% of patients on Cyclosporin were able to control their diabetes on diet alone one year after diagnosis, as against 5 to 10% of controls [15, 16]. Unfortunately this benefit does not persist, and the high rate of complications has limited this approach to therapy. Since the great majority of beta-cells seem to have been destroyed by the time of clinical presentation, it seems reasonable to conclude that earlier intervention, at a stage when

the beta-cell mass is relatively intact, could produce a more lasting benefit.

Once autoimmunity has been activated, beta cells are destroyed by a cellular immune response which involves cytotoxic T cells and macrophages and results in release of proinflammatory cytokines. Impaired insulin secretion and beta-cell damage are thought to result from generation of nitric oxide and/or oxygen free radicals within the cell [17]. Single strand DNA damage leads to activation of the DNA repair enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP). PARP is an abundant nuclear protein which shuttles onto and repairs DNA strand breaks. In doing so it consumes nic-

otinamide adenine dinucleotide (NAD), transferring the dinucleotide moiety of NAD to poly (ADP-ribose). Activation of PARP thus results in depletion of intracellular NAD levels, resulting in a rapid fall in available intracellular energy levels. Excessive activation of PARP and depletion of intracellular NAD levels are precursors of cell death. Excessive poly (ADP-ribose) formation due to PARP activation contributes to programmed cell death through energy starvation as the result of NAD consumption. The protective effect of nicotinamide upon murine beta cells is thought to be mediated by this pathway [18, 19, 20, 21], but it could differ in its effects upon human beta cells [22]. Previous trials in high risk individuals have reached conflicting conclusions [23, 24].

Nicotinamide is the amide of nicotinic acid; both are components of vitamin B3. Although their action as anti-pellagra vitamins is similar, their metabolic effects are quite different. In particular, nicotinic acid has clinical uses as a vasodilator and lipid lowering agent, and induces insulin resistance. These effects are not seen to any significant extent with nicotinamide, and insulin secretion is unaffected [25] although it has also been reported to induce a milder degree of insulin resistance [26]. Nicotinamide is water-soluble, and readily absorbed by mouth. Pharmacokinetic studies carried out by our group have shown that human metabolism is predominantly by methylation to N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide, in which form it is excreted in the urine; oxidation to nicotinamide oxide also occurs, but there is no direct conversion to nicotinic acid [27, 28]. At high doses, such as those used in ENDIT, peak levels of nicotinamide of 0.3–1.0 mmol/l are seen in the circulation; the 50% inhibition concentration of nicotinamide for PARP is about 0.1 mmol/l [29]. The safety profile of high dose nicotinamide has been reviewed, and the ratio of risk to benefit would be highly favourable if efficacy can be shown [30].

First-degree relatives of a child with Type 1 diabetes are at increased risk of progression to the disease, and are highly motivated to participate in such studies; it is therefore logical to offer intervention to people in this category. Although now largely superseded by measurement of other autoantibodies, ICA for many years formed the basis of diabetes prediction, and were used to identify high risk of progression in ENDIT, as in current US studies of intervention in pre-type 1 diabetes [3]. Family studies have shown that 2 to 2.5% of siblings and parents of a child with diabetes have ICA greater than or equal to 20 JDF units, and that 40% of those aged less than 40 years will progress to insulin treatment within 5 years of first detection. This risk is increased if additional autoantibodies to GAD, IA-2 or insulin are detected [31, 32], or if first phase insulin secretion is impaired [4].

The US Diabetes Prevention Trial – Type 1 (DPT-1) started shortly after ENDIT and has screened more

than 70 000 first-degree relatives for ICA. The results of intervention using parental insulin have recently been reported [3], and a second trial using oral insulin is in progress. These studies require very large-scale participation, and in Europe are most logically done on a multinational basis. For this reason simple robust entry criteria were selected for ENDIT, and the IVGTT was not used as a randomisation criterion. The parenteral arm of DPT-1 required an FPIR below 10% of a control population, and 37% of ENDIT participants would have fallen into this category. Since DPT-1 selected individuals with a low insulin response, it is not surprising that 33% had evidence of metabolic decompensation in the form of impaired glucose tolerance, as against 9% of those in ENDIT.

When ENDIT was planned (the study began in 1994), risk assessment by means of autoantibodies other than ICA had not been validated. Since then it has been shown that primary screening for autoantibodies against biochemically defined islet antigens has the potential to provide an enriched sample for future intervention trials [33]. In the light of present knowledge we would now have excluded the 198 ENDIT participants who had ICA without other islet autoantibodies, and we have confirmed a lower rate of IGT and low FPIR in this group. Other intervention studies have also excluded patients carrying the protective haplotype HLA-DQA1*0102-DQB1*0602 (DQ6) [3]. Within ENDIT, however, of 50 individuals with DQ6, 26 had ICA alone but the remainder had more than one autoantibody; nine had all four. In addition the frequency of both low FPIR and IGT in the subgroup with DQ6 were similar to those in the individuals who did not carry this haplotype. Further study will be needed to establish which individuals with DQ6 should be excluded from future intervention trials.

The outcome of ENDIT will be announced shortly, but we have learned several lessons. First, and most important, we have established that it is feasible to launch a multinational collaborative intervention trial involving both Europe and North America. In consequence, promising interventions can now be tested before the onset of end-stage beta-cell failure. The corollary is, however, that intervention at this stage of the disease must be undertaken on a continental scale, which means that only the most promising interventions can be tested in this way. Validated surrogate end-points for diabetes development would shorten the time scale of such interventions, but have yet to be developed. For this reason the current emphasis is upon testing interventions which might offer beta-cell rescue following clinical diagnosis of Type 1 diabetes, although this carries the risk that interventions of possible value earlier in the disease pathway might be discarded because they are ineffective in the latter stages of the disease [34]. As and when future interventions become available however, ENDIT has

shown that high quality, relatively low-budget interventions before clinical onset can be carried out on a multinational collaborative basis, as and when potentially safe and effective forms of intervention become available. It is to be hoped that Europe will be able to develop funding mechanisms capable of supporting such long-term ventures.

Acknowledgements. The final phase of ENDIT was funded by Juvenile Diabetes Research Foundation grant 4-2000-943; earlier phases were funded by European Union grants PL92 0957 and PL95 0771. We are grateful to Novo Nordisk for additional financial support throughout the period of the trial and for their help in provision of the trial tablets. We thank the many technical, nursing and medical staff in the participating centres for all their help in running the trial.

***The ENDIT Group:**

Co-ordinator: E.A.M. Gale; **Deputy Co-ordinators:** P.J. Bingley, M. Knip.

Study Administrators: C.L. Emmett, H. Swankie, S. Fewell, P. Kearsey.

National Co-ordinators: Austria: E. Schober; Belgium: F.K. Gorus; Canada: J. Dupre, J. Mahon; Croatia: V. Profozic; Denmark: J.L. Reimers; T. Mandrup-Poulsen; England: P.J. Bingley; Finland: M. Knip; France: C. Levy-Marchal; Germany: C. Jaeger; Greece: C. Bartsocas, A. Vazeou; Hungary: M. Györkö, G. Soltesz, L. Madacsy, Italy: M.R. Pastore, P. Pozzilli; Northern Ireland: D.J. Carson, H. Tennett; Norway: K. Dahl-Jørgensen, G. Joner; Poland: I. Kinalska, A. Mrozikiewicz; Russia: Y. Vaykhonsky; Scotland: K. Robertson; Spain: A. de Leiva, M.T. Martinez-Larrad, M. Serrano-Rios; Sweden: J. Ludvigsson; Switzerland: E.J. Schoenle; Texas: W.J. Riley; Turkey: M.T. Yilmaz.

Laboratory Support: University of Bristol: K.M. Gillespie, H. Gillmore, W.P.T. Moore, A. Norcross, A.J.K. Williams; Steno Diabetes Centre, Gentofte: B. Dinesen, S. Kjellberg, T. Mandrup-Poulsen, H. Niebling; National Hospital, Oslo: H.E. Akselsen, E. Thorsby, D.E. Undlien.

Data and Safety Monitoring Committee: A.L. Drash, O. Agenes, G. Dahlquist, A. Laupacis, A.E.M. McLean, J. Nerup, B. Weber.

Writing Committee: E.A.M. Gale, P.J. Bingley, C.L. Emmett.

References

1. EURODIAB ACE Study Group (2000) Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. *Lancet* 355:873-876
2. Tuomilehto J, Karvonen E, Pitkaniemi J et al. (1999) Record-high incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes in Finnish children. The Finnish Childhood Type 1 Diabetes Registry Group. *Diabetologia* 42:655-660
3. Diabetes Prevention Trial-Type 1 Diabetes Study Group (2002) Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. *New Engl J Med* 346:1685-1691
4. Bingley PJ for the ICARUS Group (1996) Interactions of age, islet cell antibodies, insulin autoantibodies and first phase insulin response in predicting risk of progression to IDDM in relatives: the ICARUS data set. *Diabetes* 45: 1720-1728

5. World Health Organization (1985) Diabetes mellitus: Report of a WHO Study Group. WHO Technical Report Series No 727, World Health Organisation, Geneva
6. Bingley PJ, Coleman P, Eisenbarth GS et al. (1992) Standardization of NGTT to predict IDDM. *Diabetes Care* 15:1313-1316
7. Williams AJK, Bingley PJ, Moore WPM, Gale EAM and the ENDIT screening group (2002) Islet autoantibodies, nationality and gender: a multinational screening study in first-degree relatives of patients with Type 1 diabetes. *Diabetologia* 45:217-223
8. Bonifacio E, Bingley PJ, Shattock M et al. (1990) Quantification of islet cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 335:147-149
9. Verge CF, Stenger D, Bonifacio E et al. (1998) Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes: Combinatorial Islet Autoantibody Workshop. *Diabetes* 47:1857-1866
10. Bingley PJ, Bonifacio E, Williams AJK, Genovese S, Bottazzo GF, Gale EAM (1997) Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes* 46:1701-1710
11. Williams AJK, Bingley PJ, Bonifacio E, Palmer JP, Gale EAM (1997) A novel microassay for insulin autoantibodies. *J Autoimmun* 10:473-478
12. Andersen L, Dinesen B, Jørgensen PN, Poulsen F, Røder ME (1993) Enzyme immunoassay for intact human insulin in serum or plasma. *Clin Chem* 39:578-582
13. McCulloch DK, Bingley PJ, Colman R, Jackson R, Gale EAM, ICARUS group (1993) Comparison of bolus and infusion protocols for determining acute insulin response to intravenous glucose in normal humans. *Diabetes Care* 16:911-915
14. Undlien DE, Friede T, Rammensee HG et al (1997) HLA-encoded genetic predisposition in IDDM: DR4 subtypes may be associated with different degrees of protection. *Diabetes* 46:143-149
15. Feutren G, Papoz L, Assan R et al. (1986) Cyclosporin increases the rate and length of remission in insulin-dependent diabetes of recent onset. Results of a multicentre double-blind trial. *Lancet* ii: 119-124
16. Canadian-European Randomized Control Trial Group (1988) Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention: association of Iyr of Cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion. *Diabetes* 37:1574-1582
17. Eizirik DL, Pavlovic D (1997) Is there a role for nitric oxide in beta cell dysfunction and damage in IDDM? *Diabet Metab Rev* 13:293-307
18. Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH (1994) Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 263:687-689
19. Mandrup-Poulsen T, Reimers JI, Andersen HU et al. (1993) Nicotinamide treatment in the prevention of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 9:295-309
20. Burkart V, Wang Z-Q, Radons J et al. (1999) Mice lacking the poly (ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta cell destruction and diabetes development induced by Streptozocin. *Nat Med* 5:314-319
21. Kolb H, Burkart V (1999) Nicotinamide in type 1 diabetes. Mechanism of action revisited. *Diabetes Care* 22 [Suppl 2]: B16-B20
22. Hoorens A, Pipeleers D (1999) Nicotinamide protects human beta cells against chemically-induced necrosis, but not against cytokine-induced apoptosis. *Diabetologia* 42:55-59
23. Elliott RB, Chase HP (1991) Prevention or delay of Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in children using nicotinamide. *Diabetologia* 34:362-365

24. Lampeter EF, Klinghammer A, Scherbaum WA et al. (1998) The Deutsche Nicotinamide Intervention Study: an attempt to prevent Type 1 diabetes. *Diabetes* 47:980-984
25. Bingley PJ, Caldas C, Bonfanti R, Gale EAM (1993) Nicotinamide and insulin secretion in normal subjects. *Diabetologia* 36:675-677
26. Greenbaum CI, Sears KL, Kahn SE, Palmer JP (1996) Nicotinamide's effect on glucose metabolism in subjects at risk for IDDM. *Diabetes* 45:1631-1634
27. Gillmor HA, Bolton CH, Hopton H et al. (1999) Measurement of nicotinamide and N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide in plasma by high performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography* 13:360-362
28. Moore WPT, Bolton CH, Downs, L, Gillmor HA, Gale EAM (2000) Measurement of n-methyl-2-pyridone-carboxamide in urine by high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 14:69-71
29. Pociot F, Reimers JI, Andersen HU (1993) Nicotinamide - biological actions and therapeutic potential in diabetes prevention. IDIG Workshop, Copenhagen, Denmark, 4-5 December 1992. *Diabetologia* 36:574-576
30. Knip M, Douek IF, Moore WPT et al. (2001) Safety of high-dose nicotinamide: a review. *Diabetologia* 43:1337-1345
31. Bingley PJ, Christie MR, Bonifacio E et al. (1994) Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. *Diabetes* 43:1304-1310
32. Verge CF, Gianini R, Kawaski E et al. (1996) Prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 45:926-933
33. Bingley PJ, Williams AJK, Gale EAM (1999) Optimized autoantibody-based risk assessment in family members: implications for future intervention trials. *Diabetes Care* 22:1796-1801
34. Kolb H, Gale EAM (2001) Does partial preservation of residual β -cell function justify immune intervention in recent onset Type I diabetes? *Diabetologia* 44:1349-1353

European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT): a randomised controlled trial of intervention before the onset of type 1 diabetes

European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT) Group*

Summary

Background Results of studies in animals and human beings suggest that type 1 diabetes is preventable. Nicotinamide prevents autoimmune diabetes in animal models, possibly through inhibition of the DNA repair enzyme poly-ADP-ribose polymerase and prevention of β -cell NAD depletion. We aimed to assess whether high dose nicotinamide prevents or delays clinical onset of diabetes in people with a first-degree family history of type 1 diabetes.

Method We did a randomised double-blind placebo-controlled trial of nicotinamide in 552 relatives with confirmed islet cell antibody (ICA) levels of 20 Juvenile Diabetes Federation (JDF) units or more, and a non-diabetic oral glucose tolerance test. Participants were recruited from 18 European countries, Canada, and the USA, and were randomly allocated oral modified release nicotinamide (1.2 g/m²) or placebo for 5 years. Random allocation was done with a pseudorandom number generator and we used size balanced blocks of four and stratified by age and national group. Primary outcome was development of diabetes, as defined by WHO criteria. Analysis was done on an intention-to-treat basis.

Findings There was no difference in the development of diabetes between the treatment groups. Of 159 participants who developed diabetes in the course of the trial, 82 were taking nicotinamide and 77 were on placebo. The unadjusted hazard ratio for development of diabetes was 1.07 (95% CI 0.78–1.45; $p=0.69$), and the hazard ratio adjusted for age-at-entry, baseline glucose tolerance, and number of islet autoantibodies detected was 1.01 (0.73–1.38; $p=0.97$). Of 168 (30.4%) participants who withdrew from the trial, 83 were on placebo. The number of serious adverse events did not differ between treatment groups. Nicotinamide treatment did not affect growth in children or first-phase insulin secretion.

Interpretation Large-scale controlled trials of interventions designed to prevent the onset of type 1 diabetes are feasible, but nicotinamide was ineffective at the dose we used.

Lancet 2004; **363**: 925–31
See *Commentary* page 910

*Members listed at end of paper

Correspondence to: Prof Edwin A M Gale, Diabetes and Metabolism Medical School Unit, Southmead Hospital, Bristol BS10 5NB, UK (e-mail: edwin.gale@bristol.ac.uk)

Introduction

Type 1 diabetes might be a preventable disease. Many successful interventions have been described in the non-obese diabetic (NOD) mouse.¹ In human beings, results of prospective studies in high-risk relatives of people with diabetes have shown a long latent period between the first appearance of circulating autoantibodies directed against antigens derived from pancreatic islets and the clinical onset of the disease.² Multiple autoantibodies are present in most newly diagnosed cases at the time of diagnosis, and their presence is highly predictive of progression to disease in otherwise healthy first-degree relatives.³ Type 1 diabetes is a serious and currently incurable disease with a prodrome that offers a long window of opportunity for screening. Inexpensive validated methods are available. On this basis, screening and intervention before the onset of type 1 diabetes would be justified if there were a cost-effective means of intervention.

Pretreatment with high dose nicotinamide has been known for many years to prevent the development of diabetes in rats treated with streptozotocin. Nicotinamide also prevents or delays the onset of diabetes in the non-obese diabetic mouse, and results of in-vitro studies have shown that it can prevent β -cell damage. Nicotinamide affords a degree of protection to β cells after the diagnosis of diabetes in humans⁴ and has been reported to prevent the development of diabetes in schoolchildren with islet-cell antibodies (ICA).⁵ The results of small pilot studies of nicotinamide in high-risk relatives were also promising.⁶ As the safety profile in humans seems favourable,⁷ we aimed to assess whether high dose nicotinamide could delay or prevent the onset of diabetes in people at high risk of progression to the disease.

First-degree relatives of a patient with type 1 diabetes provided an accessible and highly motivated population for such an intervention. Furthermore, the risk of progression to disease associated with ICA and other antibody markers has been accurately quantified for this group of people, with remarkable consensus between studies throughout the world.^{8,9} However, the logistics of such a study are daunting, since only a small proportion of first-degree relatives are at high enough risk of the disease to justify intervention. Of the 84 228 relatives screened for the Diabetes Prevention Trial—Type 1 (DPT-1), only 339 participants were identified for inclusion in the trial of parenteral insulin to prevent type 1 diabetes in high risk individuals.¹⁰ A screening exercise of this size needs the resources of a whole continent, and therefore, this investigator-led study included participants from 18 European countries, Canada, and a group in the USA.

Methods

The protocol and outcome of the screening stages of ENDIT have been published elsewhere.¹¹

Participants

We screened first-degree relatives of patients who developed type 1 diabetes before age 20 years, and who were themselves aged between 3 and 40 years. The original upper age limit of 60 years was lowered to 40 years in 1995 after results of a multicentre analysis showed that relatives older than 40 years with ICA were at low risk of progression to diabetes.¹⁰ We explained this finding to family members older than 40 years of age who had been screened and recruited, and they were allowed to remain in the trial and be included in the randomisation process if they so wished. We screened more than 30 000 eligible relatives for ICA. Participants were recruited through 354 clinical centres in 18 European countries, Canada, and the USA between 1990 and 1998. We included patients who had an ICA level of 20 Juvenile Diabetes Federation (JDF) units or more in at least one sample, as measured in the central laboratory, and an ICA level of 5 JDF units or more in the other sample. We excluded people who: had a chronic disease that was likely to affect outcome, toxicity, or adherence to the protocol; women who were breastfeeding, pregnant, or of childbearing age and not using effective contraception; and anyone taking vitamin preparations containing nicotinamide. Participants who were shown to have diabetes on oral glucose tolerance testing were also excluded.

The protocol was approved by the research ethics committee or equivalent in each participating centre, and also by the appropriate national drug regulatory authorities. Written informed consent was obtained from all participants.

Procedures

Participants were randomly allocated either oral modified release nicotinamide (Ferrosan AC, Copenhagen, Denmark) at a dose of 1.2 g/m² daily up to a maximum of 3 g/day or placebo for 5 years in two divided doses. The randomisation sequence was generated with a computerised pseudorandom number generator and had balanced blocks of size four. Randomisation was stratified by age (younger and older than age 20 years) and by national group. Because some national groups recruited small numbers of participants, we pooled randomisation for Austria and Switzerland; for Italy, Greece, and Croatia; and for Belgium and the UK. Randomisation codes for the appropriate age-group were allocated sequentially by the national coordinator. All study personnel remained unaware of the patients' treatment allocation for the duration of the study. Study medication was supplied by the manufacturers to the national coordinating centres labelled only with the randomisation code. Emergency unblinding could be done by opening sealed code envelopes held at each national coordinating centre. The study monitor checked that these envelopes were intact at least once a year and at the end of the study.

We reviewed participants at baseline, 1 month, and 6 months after study entry and every 6 months thereafter. At each visit we did a clinical examination and recorded height and weight, adverse events, checked biochemical and haematological variables, and the number of returned tablets. Oral glucose tolerance testing was mandatory at baseline and 6, 18, 30, 42, 54, and 60 months. An intravenous glucose tolerance test (IVGTT) was also mandatory at baseline and whenever possible, was repeated at 12, 24, 36, 48, and 60 months.

We tried to keep in contact with all participants who had withdrawn from the study for reasons other than development of diabetes, to determine their diabetes status.

Our primary outcome was the development of diabetes, as defined by WHO criteria. Additional prespecified outcomes were first-phase insulin release in the intravenous glucose tolerance test, and growth in children.

Testing procedures and assays

Oral glucose tolerance test (OGTT)

Oral glucose (1.75 g/kg bodyweight, up to a maximum of 75 g) was administered after an overnight fast. We took venous plasma samples at 0 and 120 min and tested for glucose in the local study centre laboratory. Diabetes and impaired glucose tolerance were defined by WHO criteria.¹¹

Intravenous glucose tolerance test

Tests were done in accordance with the Islet Cell Autoantibody Register Users Study (ICARUS) protocol.¹⁴ A glucose dose of 0.5 g/kg, up to a maximum of 35 g, was infused over 3 min (+ or - 15 s), and we took blood samples at -5, 0, 1, 3, 5, and 10 min. First-phase insulin response (FPIR) was calculated as the sum of the insulin concentrations at 1 and 3 min after the end of the infusion.

Islet autoantibodies

Baseline samples from all participants were tested for ICA and autoantibodies to glutamic acid decarboxylase (GAD), IA-2, and insulin in the laboratories of the Division of Medicine, University of Bristol as previously described.¹⁵ Samples were judged positive if concentrations were at or above the 97.5th percentile of concentrations in a control population of 2860 schoolchildren.

The ICA assay was shown to have 81% sensitivity with 86% specificity in the First Immunology of Diabetes Society (IDS) Combined Antibody Workshop; and radiobinding assays for autoantibodies to GAD, IA-2, and insulin, had 91% sensitivity with 99% specificity, and 74% sensitivity with 99% specificity, and 58% sensitivity with 99% specificity, respectively.¹⁶

Insulin assay

Plasma insulin was measured in one laboratory at the Steno Diabetes Centre, Gentofte, Denmark in an enzyme-linked two-site immunoassay.¹⁷ To allow for comparison of intravenous glucose tolerance test results with age-specific percentiles for FPIR obtained in the University of Washington, Seattle, USA and used for DPT-1,¹¹ 105 samples spanning the range 0-500 pmol/L were assayed in both laboratories. The regression equation of insulin concentration measured in Seattle on the insulin concentration measured in the Steno laboratory was used to derive a correction factor to standardise the measurement to the Seattle assay.¹⁸

Statistical analysis

We calculated that our target sample size was 528 participants for the study to have 90% power to detect a 40% reduction in the rate of progression to type 1 diabetes over a 5-year period, with a two-tailed significance of 0.05. We assumed that non-diabetic first-degree relatives under the age of 40 with confirmed ICA level of 20 JDF units or more have a 35% risk of insulin therapy within 5 years. Sample size calculations showed that a minimum of 211 subjects in each group would be needed to detect a reduction in progression to diabetes from 35% to 21%. We estimated that about 20% of participants would withdraw during the trial and, therefore, we aimed to recruit a minimum of 264 people to each group.

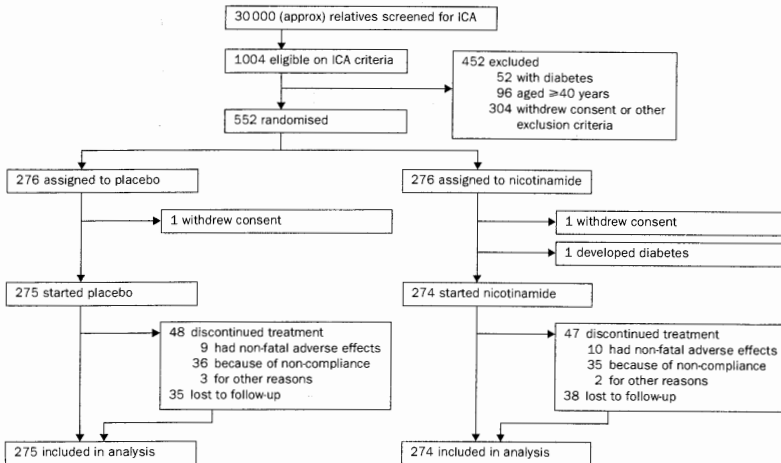


Figure 1: Trial profile

An independent data and safety monitoring committee reviewed safety data every year. We planned to do an interim analysis of the primary outcome after half the participants had completed 3 years of follow-up. The prespecified rules for stopping the trial were, for efficacy, a decrease in the incidence of diabetes of more than 50% with p less than 0.0001 (two sided logrank test) and, for harm, an increased progression to diabetes with p less than 0.05. The interim analysis was completed in March, 1999. The original plan was to do the final analysis in May, 2003, after all participants had completed 5 years of follow-up. Recruitment to the study, however, took longer than originally foreseen, and the data and safety monitoring committee decided that a second interim analysis should be undertaken in December, 2001, because, by that time, 484 participants (88%) had either developed diabetes or had completed 5 years follow-up, and another 28 people (5%) had withdrawn from the study and were lost to follow-up. On the basis of results from the interim analysis, the trial was stopped in May, 2002, because the treatment was deemed futile. Analysis of other outcomes and of subgroups was then completed.

Statistical analyses were done by an independent statistician in accordance with a predefined plan. All analyses were by intention-to-treat. Cox proportional hazards models were used to analyse the time-to-event outcome, and estimates of both the unadjusted and adjusted (controlling for the baseline covariates; age, glucose tolerance and number of antibodies ≥ 97.5 th centile) treatment effect was obtained. Results are reported as number of participants and events for each treatment group, and hazard ratios (95% CI) and p values from the Cox model analyses. The treatment effect was assessed in a small number of prespecified subgroups based on sex, age, oral glucose tolerance, number of islet autoantibodies, and FPIR. Time-to-event curves were constructed with the Kaplan-Meier method.

We calculated SD scores for height and weight using cross sectional stature and weight reference curves for the UK.¹⁹ The effect of treatment on height or weight SD scores and FPIR over time was investigated with a generalised estimating equation approach, taking into account the correlation between the repeated

	Placebo (n=276)	Nicotinamide (n=276)
Started randomised treatment	275	274
Age at randomisation (years)		
<5	8 (3%)	7 (3%)
5-9	56 (20%)	57 (21%)
10-14	61 (22%)	63 (23%)
15-19	38 (14%)	39 (14%)
20-24	15 (5%)	16 (6%)
25-29	10 (4%)	10 (4%)
30-34	26 (9%)	21 (8%)
35-39	45 (16%)	38 (14%)
≥ 40	16 (6%)	23 (8%)
Male sex	143 (52%)	144 (53%)
Relationship to diabetic relative		
Child	26 (9%)	22 (8%)
Sibling	163 (59%)	171 (63%)
Mother	57 (21%)	47 (17%)
Father	29 (11%)	34 (12%)
120 min plasma glucose (mmol/L)		
<7.8	247 (90%)	250 (91%)
≥ 7.8	28 (10%)	24 (9%)
Islet autoantibodies ≥ 97.5 th percentile:		
ICA only	108 (39%)	89 (32%)
+1 additional antibody	35 (13%)	46 (17%)
+2 additional antibodies	57 (21%)	54 (20%)
+3 additional antibodies	75 (27%)	85 (31%)
Age-specific FPIR*		
Below 10th percentile†	96 (37%)	90 (36%)
≥ 10 th percentile	160 (63%)	159 (64%)

Data are number (%). *FPIR missing for 19 participants in placebo group and 25 in nicotineamide group. †10th percentile is equivalent to 430.5 pmol/L for participants younger than 8 years and 217.5 pmol/L for those older than 8 years, standardised to the Seattle assay.²¹

Table 1: Participants' baseline characteristics

	Placebo (n=83 (30%))	Nicotinamide (n=85 (31%))
Age at randomisation (years)		
<5	2 (2%)	1 (1%)
5-9	10 (12%)	9 (11%)
10-14	13 (16%)	18 (21%)
15-19	13 (16%)	18 (21%)
20-24	8 (10%)	7 (8%)
25-29	8 (10%)	3 (4%)
30-34	11 (13%)	12 (14%)
35-39	15 (18%)	10 (12%)
≥40	3 (4%)	7 (8%)
Male sex	42 (51)	40 (47)
Glucose at baseline (mmol/L)		
<7.8	78 (94%)	82 (96%)
≥7.8	5 (6%)	3 (4%)
Number of antibodies at baseline		
≥ICA only	41 (49%)	33 (39%)
≥+1	14 (17%)	19 (22%)
≥+2	15 (18%)	21 (25%)
≥+3	13 (16%)	12 (14%)
Age-specific FPIR at baseline*		
≥Low (below 10th centile)†	23 (29%)	28 (35%)
≥Normal	57 (71%)	51 (65%)

Data are number (% of participants who withdrew from the trial). *Of 44 participants with missing FPIR data, 3 of 19 on placebo and 6 of 25 on nicotinamide withdrew from study. †10th percentile is equivalent to 430.5 pmol/L for participants younger than 8 years and 717.5 pmol/L for those older than 8 years, standardised to the Seattle assay.¹¹

Table 2: Characteristics of participants who discontinued treatment or who were lost to follow-up

measurements on individuals. A Gaussian distribution was assumed for all of the three outcomes (we noted that FPIR was positively skewed and, therefore, we did a log transformation) and the identity link was used. Independent and autoregressive correlation structures were tested, both producing very similar results. SEs were calculated with the sandwich estimator.

Role of the funding source

Ferrosan A/C, which at the start of the study was a wholly-owned subsidiary of Novo-Nordisk, provided all the trial medication and the randomisation list was generated by Novo-Nordisk. Neither this company nor the major sponsors of the study (The European Union and Juvenile Diabetes Research Foundation) had a role in

	Placebo (n=275)	Nicotinamide (n=274)	Hazard ratio (95% CI)	p
Overall	77 (28%)	82 (30%)	1.07 (0.78-1.45)*	0.69
Sex				
Male	47 (33%)	48 (33%)	0.99 (0.66-1.48)*	0.97
Female	30 (23%)	34 (26%)	1.17 (0.71-1.90)*	0.53
Age at baseline (years)				
<20	66 (40%)	64 (39%)	0.98 (0.69-1.39)*	0.91
≥20	11 (10%)	18 (17%)	1.42 (0.70-2.90)*	0.33
Glucose intolerance				
Normal	60 (24%)	64 (26%)	1.04 (0.73-1.48)*	0.81
Impaired	17 (61%)	18 (75%)	1.56 (0.80-3.03)*	0.19
Antibodies ≥97.5th percentile:				
ICA only	0 (0%)	3 (3%)	NA	
ICA with ≥1 additional antibody	77 (46%)	79 (43%)	0.91 (0.66-1.24)*	0.54
FPIR				
Normal (≥10th percentile)	23 (14%)	28 (18%)	1.23 (0.71-2.13)*	0.47
Low (below 10th percentile)	50 (52%)	41 (46%)	0.82 (0.55-1.25)*	0.36

Data are n (%). Unless otherwise stated. *Unadjusted model, †Adjusted for baseline covariates: age, glucose tolerance, and number of antibodies ≥97.5th centile.

Table 3: Hazard ratios for developing diabetes within 5 years

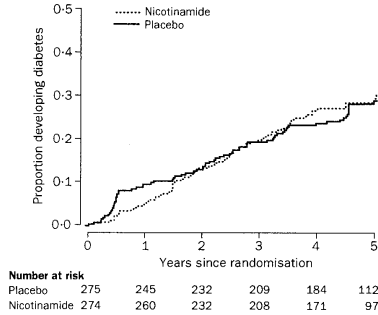


Figure 2: Kaplan-Meier failure curve

study design, data collection, data analysis, data interpretation, or the writing of the report.

Results

Between June, 1994, and May, 1998, we enrolled 552 participants. The interval between collection of samples for ICA positivity and randomisation was less than 18 months in all but 11 participants, and less than 2 years in all but one who was randomly allocated to treatment 26 months after ICA positivity was confirmed. Figure 1 shows the trial profile. Of 552 individuals randomly allocated to a study group, 549 started their trial medication.

Participants' baseline characteristics are shown in table 1.

The primary outcome variable of diabetes status after 5 years of follow-up was established in 447 of 549 participants (87%), including 95 participants who discontinued treatment before the end of the follow-up period but who remained in contact with local investigators. Figure 1 shows the group allocation and reasons for treatment discontinuation for these 95 people. Another 73 participants (13%) were lost to follow-up before completion of the trial (figure 1). Median follow-up in people lost to follow-up was 3.3 years (IQR 2.3-4.0 years). The distribution of discontinued treatment and loss to follow-up did not differ across demographic and risk-factor subgroups (table 2). Emergency unblinding was done for four participants.

The main outcomes of the trial are shown in table 3 and figure 2. Nicotinamide treatment did not have any discernible effect on the primary outcome—ie, progression to diabetes. 159 participants developed diabetes within 5 years of randomisation to treatment, 82 (30%) in the active treatment group and 77 (28%) in the placebo group. The unadjusted Cox proportional hazard estimate showed no difference between the placebo and nicotinamide groups on an intention-to-treat basis (table 3). Nor did we note any difference between groups after adjustment for age at baseline, glucose concentrations at 2-h glucose in the OGTT, and number of islet autoantibodies (table 3). We did not adjust the hazard ratio for FPIR at baseline, because these data were missing for 19 people in the placebo group and 25 in the active treatment group.

Data in table 3 show that there was no evidence of a treatment effect in groups divided on the basis of age, sex,

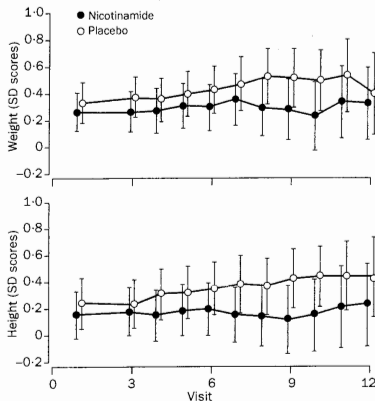


Figure 3: Mean changes in weight and height in participants younger than 20 years. Vertical bars show 95% CI.

oral tolerance status, antibody status, or first-phase insulin response.

Secondary outcomes relating to the effects of treatment on growth and FPIR were analysed using the generalised estimating equation. Figure 3 shows the changes in weight and height during the trial of participants of age less than 20 years at the start of the trial and figure 4 shows changes in FPIR during the trial for all participants. There were no differences between groups for any of the secondary outcomes (height: $p=0.71$, weight: $p=0.64$, FPIR: $p=0.81$).

Regular safety analyses done throughout the trial showed no differences between the treatment groups with respect to adverse events. 35 serious adverse events were reported in 18 participants in the active treatment group and 15 in the placebo group, not including hospital admission at diabetes onset. At every visit, the two groups did not differ with respect to the number of adverse events reported, the systems of the body affected, or the severity of events (data not shown). Increased concentrations of alanine transaminase, aspartate transaminase, or gamma glutamyl transpeptidase (more than three times the upper limit of

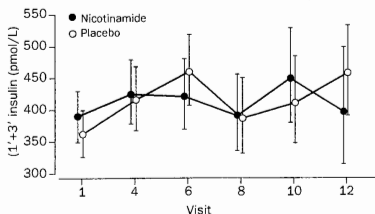


Figure 4: Changes in first-phase insulin response. Data are geometric means and vertical bars show 95% CI.

normal in the local laboratory) were noted in nine participants during the trial. Of these, five were taking active treatment group and four were on placebo. Six women became pregnant during the trial, four in the nicotinamide group and two in placebo. Trial medication was stopped as soon as pregnancy was confirmed. No congenital abnormalities were reported in the offspring.

Discussion

We have shown that at the doses used, nicotinamide is ineffective in the prevention of type 1 diabetes. The proportion of relatives who developed diabetes within 5 years was almost identical in those treated with nicotinamide and those on placebo, and there was no suggestion of a treatment effect in any of the subgroups defined by well established markers of additional risk. Type 1 diabetes meets every criterion for a disease for which screening would be justified²⁰ save one: we lack an effective form of intervention. Excellent predictive markers exist in the form of circulating autoantibodies directed against a range of islet antigens. These antibodies can be detected many years before the clinical onset of type 1 diabetes and they mark a prodromal phase during which there is progressive β -cell destruction,²¹ thus providing an opportunity for intervention to halt or delay the disease process before hyperglycaemia occurs.²² Our study was based on detection of high-titre ICA, a well validated marker of risk for progression to type 1 diabetes.

Nicotinamide is a component of vitamin B3 that has been known for many years to offer protection in animal models of diabetes induced by alloxan or streptozotocin,²³ and against spontaneous diabetes in the NOD mouse.²⁴ In type 1 diabetes, β cells are destroyed by a cellular immune response which involves cytotoxic T cells and macrophages and results in release of proinflammatory cytokines. Downstream events include single strand DNA damage leading to activation of the DNA repair enzyme, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), which shuttles onto and repairs DNA strand breaks. In doing so it consumes nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), transferring the dinucleotide moiety of NAD to poly(ADP-ribose), resulting in a rapid fall in available intracellular energy levels. Excessive activation of PARP and depletion of intracellular NAD are precursors of cell death, and the protective effect of nicotinamide on β cells is thought to be mediated by inhibition of this pathway.^{12,25} Nicotinamide has been tried in human type 1 diabetes both at diagnosis and before clinical onset of the disease with varying results. A meta-analysis of nicotinamide treatment following diagnosis showed better preservation of C-peptide secretion at 12 months, although metabolic control was unaffected,⁶ and studies in ICA-positive relatives and in schoolchildren with no family history of diabetes have been reported to delay or prevent the onset of diabetes.^{5,6} Our review of published work suggested that nicotinamide at the dose tested could achieve partial PARP inhibition in humans and its safety profile seemed good.²⁶ We, therefore, set out to assess whether treatment with nicotinamide at the high doses used in previous studies could produce a clinically useful reduction in development of diabetes in relatives of people with type 1 diabetes.

Our findings contrast with results from most earlier studies in humans,^{5,6} although they do accord with findings from a small German trial in young siblings of patients with type 1 diabetes.²⁷ Our study was adequately powered to detect a 35–45% reduction in the risk of developing diabetes within 5 years, and the close overlap

between the treatment groups makes it unlikely that smaller treatment effects have been overlooked. Despite the logistical difficulties of running a study in 18 European countries, Canada, and the USA, we were able to deliver a high quality study with few protocol violations. The overall number of participants who failed to complete the study according to protocol was 31%, somewhat higher than the 20% we anticipated, but we did exceed our recruitment target and the power of the study was not greatly affected. Of 168 who discontinued treatment, 95 remained under follow-up for the duration of the study, and the primary outcome could therefore be ascertained in 87% of those randomised. The numbers of patients from each treatment group and their baseline characteristics were evenly balanced in those who were lost to follow-up and the remainder; therefore, these withdrawals are unlikely to have affected the validity of our main conclusions. The cumulative risk of progression to diabetes in our placebo group was lower than we expected, probably because our risk estimates were based on observational studies which included all cases, whereas intervention studies will not include early progressors who develop diabetes while the screening programme is underway. Although our own safety review was reassuring,⁷ concerns have been raised about the potential effects of nicotinamide on growth in children²⁸ and on residual insulin secretion.²⁷ These concerns were shown to be unfounded, and no adverse effects of nicotinamide were identified even at doses 30–50 times higher than the recommended daily intake.

The failure to confirm findings in animal studies might be related to the lower dose used in humans, or to the fact that nicotinamide was given at a much later stage of the disease process in humans than in rodents. Another possible explanation relates to species-related differences in the islets themselves. It has, for example, been shown that nicotinamide protects isolated human islets against chemically-induced necrosis, but not against cytokine-induced apoptosis.²⁹

Although both trials were negative, the enduring lesson from ENDIT and DPT-1 is that such trials can be done at all.³⁰ The logistics remain daunting, however, especially when there is a lack of substantial central funding, as was the case with ENDIT. Europe currently has no effective funding mechanism to support long-term trials on the scale of ENDIT, and therefore, this investigator-led study relied heavily on the motivation of investigators and participants. Results from both trials re-emphasised that diabetes can be predicted, and in ENDIT 29% of first-degree relatives, identified simply on the basis of high concentrations of ICA, progressed to diabetes within 5 years. Our results also lent support to the assertion that risk of progression to diabetes increases in proportion to the number of autoantibody markers present in the circulation. Because of improved screening strategies, future trials will require fewer participants, and nearly all participants selected for inclusion and exposed to potential risks of intervention will at some stage develop the disease. High-throughput automated screening methods will greatly simplify future trials of this type, and the resulting improvement in screening efficiency would have enabled two interventions to be tested within the ENDIT screening population.³¹

Our work shows the feasibility of large-scale multinational studies of interventions to delay or prevent the onset of type 1 diabetes. The limiting factor for these studies remains the lack of a safe and validated intervention. In view of the massive investment of time and energy needed to do trials on this scale, it may be

necessary to test other interventions in people with newly diagnosed diabetes before trials in non-diabetic people at high risk of the disease, despite the fact that the therapeutic effect might differ at different stages of the disease. An important lesson from DPT-1 and ENDIT is that both animal studies and small pilot studies in humans can be very misleading, and international consensus on the scale, design, and interpretation of future pilot studies will be needed. The twice daily dosage schedule in ENDIT was difficult for participants to sustain over a long study, and simplicity of administration should be a major consideration in planning future interventions. The doctor seeing a patient with new-onset type 1 diabetes has until now been in the position of a nephrologist unable to diagnose renal failure until his patients require dialysis. Results from ENDIT and DPT-1 have shown that this era is coming to an end, and give us hope that type 1 diabetes will, in time, be a preventable disease.

*The ENDIT Group:

Co-ordinator—E A M Gale (University of Bristol, UK).

Deputy coordinators—P J Bingley (University of Bristol, UK); M Knip (Helsinki University Hospital, Finland).

Study administrators—C L Emmett, H Swankie, S Fellw, P Kearsey (University of Bristol).

National co-ordinators—E Schober (Austria); F K Gorus (Belgium); J Dupre, J L Mahon (Canada); V Profcic (Croatia); JI Reimers T Mandrup-Poulsen (Denmark); M Knip (Finland); C Levy-Marchal (France); C Jaeger (Germany); C Barotocas, A Vazou (Greece); M Gyorko, G Soltesz L Madacsy (Hungary); M R Pastore, P Pozzilli (Italy); K Dahl-Jørgensen, G Joner (Norway); I Kinalska, A Mroziewicz (Poland); Y Vaykhovskiy (Russia); A de Leiva, M T Martinez-Larrad, D Mauricio, M Serrano-Rios (Spain); J Ludvigsson (Sweden); E J Schenle (Switzerland); M T Yilmaz (Turkey); P J Bingley (England); D J Carson, H Tenet (Northern Ireland); K Robertson (Scotland); W J Riley (USA).

Laboratory support—K M Gillespie, H Gillmor, W P T Moore, A Norcross, A J K Williams (University of Bristol); B Dinesen, S Kjellberg, T Mandrup-Poulsen, H Niebing (Steno Diabetes Centre, Gentofte, Denmark); H E Akseelsen, E Thorstved, DE Undlien (National Hospital, Oslo, Norway).

Statistical analysis—T Collier, P Hardy, S Sharpe, S Pocock (London School of Hygiene and Tropical Medicine).

Study monitors—S Ollier, D Ollier (QED Partnership, Milton Keynes, UK).

Data and safety monitoring committee—A I Draab, O Aagenes,

C Dahlquist, A Lavacsics, A E M McLellan, J Merrip, B Weber. Writing committee—E A M Gale, P J Bingley, C L Emmett, T Collier.

Conflict of interest statement

The writing committee have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

We thank Sug Framming for his support; the many ENDIT local investigators in 20 countries for their help in this study; and the many people who provided technical support. Above all, we thank participants and their families.

The study was funded by the Juvenile Diabetes Research Foundation (4-2000-943) and the European Union (PL92 0957 and PL95 0771). Further support was given by Novo-Nordisk A/S as well as local funding bodies in the participating countries.

References

- 1 Atkinson MA, Leiter EH. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? *Nat Med* 1999; 5: 601–04.
- 2 Gorsuch AN, Spencer KM, Lister J, et al. Evidence for a long prediabetic period in Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Lancet* 1981; 2: 1363–65.
- 3 Bingley PJ, Bonifacio E, Ziegler AG, Schatz DA, Atkinson MA, Eisenbarth GS. Proposed guidelines for screening for risk of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24: 398.
- 4 Pozzilli P, Kolb H, Browne PD. The Nicotinamide Trialists. Meta-analysis of nicotinamide treatment in patients with recent-onset IDDM. *Diabetes Care* 1996; 19: 1377–83.
- 5 Elliott RB, Pilcher CC, Fergusson DM, Stewart AW. A population based strategy to prevent insulin-dependent diabetes using nicotinamide. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1996; 9: 501–09.
- 6 Elliott RB, Chase HP. Prevention or delay of Type 1 (insulin-

- dependent) diabetes mellitus in children using nicotinamide. *Diabetologia* 1991; **34**: 362-65.
- 7 Knip M, Douek IF, Moore WPT, et al. Safety of high-dose nicotinamide: a review. *Diabetologia* 2000; **43**: 1337-45.
 - 8 Bonifacio E, Bingley PJ, Dean BM, et al. Quantification of islet-cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1990; **335**: 147-49.
 - 9 Riley WJ, Maclaren NK, Krischer J, et al. A prospective study of the development of diabetes in relatives of patients with insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* 1990; **323**: 1167-72.
 - 10 Bingley PJ, for the ICARUS Group. Interactions of age, islet cell antibodies, insulin autoantibodies, and first-phase insulin response in predicting risk of progression to IDDM in ICA+ relatives: the ICARUS data set. *Diabetes* 1996; **45**: 1720-28.
 - 11 Diabetes Prevention Trial-Type 1 Diabetes Study Group. Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2002; **346**: 1658-91.
 - 12 The European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT) group. Intervening before the onset of Type 1 diabetes: baseline data from the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT). *Diabetologia* 2003; **46**: 339-46.
 - 13 WHO. Diabetes Mellitus: Report of a WHO Study Group. Geneva: World Health Organization; 1985.
 - 14 Bingley PJ, Colman PG, Eisenbarth GS, et al. Standardization of IVGTT to predict IDDM. *Diabetes Care* 1992; **15**: 93-102.
 - 15 Bingley PJ, Bonifacio E, Williams AJK, Genovese S, Bottazzo GF, Gale EAM. Prediction of IDDM in the general population. Strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes* 1997; **46**: 1701-10.
 - 16 Verge CF, Stenger D, Bonifacio E, et al. Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes: Combinatorial Islet Autoantibody Workshop. *Diabetes* 1998; **47**: 1857-66.
 - 17 Andersen L, Dinesen B, Jørgensen PN, Poulsen F, Røder ME. Enzyme immunoassay for intact human insulin in serum or plasma. *Clin Chem* 1993; **39**: 578-82.
 - 18 McCulloch DK, Bingley PJ, Colman PG, Jackson RA, Gale EAM, The ICARUS Group. Comparison of bolus and infusion protocols for determining acute insulin response to intravenous glucose in normal humans. *Diabetes Care* 1993; **16**: 911-15.
 - 19 Freeman JV, Cole TJ, Chinn S, Jones PRM, White EM, Preece MA. Cross sectional stature and weight reference curves for the UK, 1990. *Arch Dis Child* 1995; **73**: 17-24.
 - 20 Wilson JMG, Junger G. Principles and practice of screening for disease. Geneva: WHO; 1968.
 - 21 Gardner SG, Gale EAM, Williams AJK, et al. Progression to diabetes in relatives with islet autoantibodies; is it inevitable? *Diabetes Care* 1999; **22**: 2049-54.
 - 22 Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 2001; **358**: 221-29.
 - 23 Dulin WE, Wyse BM, Kalamazoo MS. Studies on the ability of compounds to block the diabetogenic activity of streptozotocin. *Diabetes* 1969; **18**: 459-66.
 - 24 Yamada K, Nonaka K, Hanafusa T, Miyazaki A, Toyoshima H, Tarui S. Preventive and therapeutic effects of large-dose nicotinamide injections on diabetes associated with insulinitis. *Diabetes* 1982; **31**: 749-53.
 - 25 Mandrup-Poulsen T, Reimers JJ, Andersen HU, et al. Nicotinamide treatment in the prevention of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res* 1993; **9**: 295-309.
 - 26 Pociot F, Reimers JJ, Andersen HU. Nicotinamide—biological actions and therapeutic potential in diabetes prevention. IDG Workshop, Copenhagen, Denmark, 4-5 December 1992. *Diabetologia* 1993; **36**: 574-76.
 - 27 Lampeter EF, Klinghammer A, Scherbaum WA, et al. The Deutsche Nicotinamide Intervention Study: an attempt to prevent type 1 diabetes. *Diabetes* 1998; **47**: 980-84.
 - 28 Perley A, Macklin B, Renwick AG, Wilkin TJ. The pharmacokinetics of nicotinamide in humans and rodents. *Diabetes* 1995; **44**: 152-55.
 - 29 Hoorens A, Pipeleers D. Nicotinamide protects human beta cells against chemically-induced necrosis but not against cytokine-induced apoptosis. *Diabetologia* 1999; **42**: 55-59.
 - 30 Gale EAM. Can we change the course of beta-cell destruction in type 1 diabetes? *N Engl J Med* 2002; **346**: 1740-42.
 - 31 Bingley PJ, Williams AJK, Gale EAM. Optimized autoantibody-based risk assessment in family members. *Diabetes Care* 1999; **22**: 1796-801.

Anlage 2 Ausgewählte Publikationen ad 3.2

Jaeger C, Hatziagelaki E, Petzoldt R, Bretzel RG (2001) Comparative analysis of organ-specific autoantibodies and celiac disease-associated antibodies in type 1 diabetic patients, their first degree relatives and healthy control subjects. *Diabetes Care* 24: 27-32

Jaeger C, Hatziagelaki E, Bretzel RG (2002) Schilddrüsenantikörper und basale TSH-Spiegel bei 425 erstgradig Verwandten von Typ 1 Diabetikern im Langzeitverlauf über 7 Jahre. In: *Schilddrüse und Autoimmunität*, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG: Schilddrüse 2001: S. 27-34

Comparative Analysis of Organ-Specific Autoantibodies and Celiac Disease-Associated Antibodies in Type 1 Diabetic Patients, Their First-Degree Relatives, and Healthy Control Subjects

CLEMENS JAEGER, MD
ERIFILI HATZIGELAKI, MD

RÜDIGER PETZOLDT, MD, PHD
REINHARD G. BRETZEL, MD, PHD

OBJECTIVE — In type 1 diabetes the coexistence with other endocrine diseases and organ-specific autoantibodies has been frequently reported leading to the concept of autoimmune polyendocrine syndrome (APS). In addition, an association of type 1 diabetes with celiac disease has been described. These disorders share a similar genetic background, and first-degree relatives of type 1 diabetic patients may also be affected significantly. Screening for specific antibodies allows early diagnosis of these disorders.

RESEARCH DESIGN AND METHODS — In the present cross-sectional study, we analyzed sera from 197 recent-onset type 1 diabetic patients at the time of diagnosis, 882 first-degree relatives, and sera of 150 healthy control subjects for prevalence and co-occurrence of the following antibodies (method: insulin autoantibodies (radioimmunoassay); GAD and IA-2 antibodies (radioligand assay); islet cell antibody, anti-adrenal cortex antibodies, and anti-gastric parietal cell antibodies (indirect immunofluorescence), anti-thyroglobulin and anti-thyroid peroxidase antibodies; and gliadin IgG/A and tissue-transglutaminase IgA (enzyme-linked immunosorbent assay)).

RESULTS — The overall frequency of gastric parietal cell antibodies and adrenal antibodies did not differ significantly among groups. In contrast, type 1 diabetes-associated antibodies and thyroid antibodies were significantly more frequent both in recent-onset type 1 diabetic patients and in the group of first-degree relatives ($P < 0.05$). The prevalence of gliadin IgG/IgA and transglutaminase IgA was significantly higher in the group of recent-onset type 1 diabetic patients ($P < 0.05$), but the difference between first-degree relatives and control subjects did not reach statistical significance. Focusing on the coexistence of antibodies, the group of recent-onset type 1 diabetic patients presented with 27.4% of the subjects testing antibody-positive-specific for two or more of the envisaged disorders (i.e., type 1 diabetes, autoimmune thyroiditis, and celiac disease) compared with 3.1% in the group of first-degree relatives and 0 of 150 in the control population ($P < 0.05$).

CONCLUSIONS — We conclude that, in an active case-finding strategy, recent-onset type 1 diabetic patients should be routinely screened at least for concomitant autoimmune thyroid disease and additionally for celiac disease. Screening in their first-degree relatives should include at a minimum the search for thyroid autoimmunity in addition to screening for pre-type 1 diabetes.

Diabetes Care 24:27–32, 2001

From the Third Medical Department and Policlinic (C.J., E.H., R.G.B.), Justus-Liebig-University, Giessen; and the Diabetes Center at Bad Oeynhausen (R.P.), University of Bochum, Bochum, Germany.

Address correspondence and reprint requests to Clemens Jaeger, MD, Third Medical Department and Policlinic, Justus-Liebig-University, Rodthohl 6, 35385, Giessen, Germany.

Received for publication 25 July 2000 and accepted in revised form 3 October 2000.

Abbreviations: APS, autoimmune polyendocrine syndrome; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; GADA, GAD65 antibodies; GPC, gastric parietal cell; IAA, insulin autoantibodies; ICA, islet cell antibodies; TG, thyroglobulin; TPO, thyroid peroxidase; tTGC, tissue transglutaminase C; WHO, World Health Organization.

A table elsewhere in this issue shows conventional and Système International (SI) units and conversion factors for many substances.

The first evidence that type 1 diabetes might be a disease of autoimmune origin came from the observation that type 1 diabetes is often associated with other endocrine autoimmune disorders. Type 1 diabetes was later added as a third component to the description of Schmidt's syndrome (1), consisting originally of autoimmune thyroiditis and adrenalitis. This overlap of different autoimmune disorders has led to the concept of autoimmune polyendocrine syndrome (APS) with the clinical or subclinical involvement of several organs in the same subject or family (2–4). In addition, celiac disease is significantly associated with type 1 diabetes (5–8), which is supposed to be the result of an interplay among genetic, hormonal, and immunological factors (9–11). Based on the hypothesis that the frequent coexistence of these diseases can be explained at least in part by their similar genetic background, we addressed the question whether first-degree relatives of type 1 diabetic patients might be significantly affected by these disorders.

Circulating autoantibodies are a hallmark of clinical or subclinical autoimmune polyendocrine disease, particularly in APS II (i.e., Carpenter's syndrome, type 1 diabetes, Hashimoto thyroiditis, adrenalitis) and APS III (type 1 diabetes, autoimmune thyroid disease, pernicious anemia). The measurement of specific antibodies allows early diagnosis of these disorders including preclinical stages of celiac disease. Focusing on type 1 diabetes as the index diagnosis to consider screening for potential APS and celiac disease, we aimed to determine the significance of the different antibody prevalences and levels of coexistence in 882 first-degree relatives of type 1 diabetic patients. For conclusive interpretation of the data, we determined additionally autoantibody prevalences in 197 recent-onset type 1 diabetic patients and in 150 healthy individuals, serving as positive versus negative control subjects, respectively. We screened our study population for islet cell antibody-

Table 1—Prevalence of type 1 diabetes- and thyroid disease-associated autoantibodies in patients with type 1 diabetes at recent onset, first-degree relatives of type 1 diabetic patients, and healthy control subjects

	Recent-onset type 1 diabetic patients	First-degree relatives	Healthy control subjects
<i>n</i>	197	882	150
Type 1 diabetes-associated antibodies			
ICA	82.1*	4.9*	1.3
Anti-GADA	76.0*	7.6*	2.6
Anti-IA-2 antibodies	44.4*	4.0*	0.6
IAA	37.8*	3.4	0.6
≥1 antibody*	93.4*	11.6*	4.0
Thyroid disease-associated antibodies			
Anti-TPO ± TG antibodies	18.4*	7.8*	3.2

*Significantly different ($P < 0.05$).

ies (ICA), insulin autoantibodies (IAA), GAD65 antibodies (GADA), anti-IA-2 antibodies, anti-adrenal cortex antibodies, anti-gastric parietal cell (GPC) antibodies, anti-thyroglobulin (TG) antibodies, and anti-thyroid peroxidase (TPO) antibodies. In addition, screening for celiac disease was performed by measuring antibodies to gliadin (IgG/IgA) and IgA autoantibodies to tissue transglutaminase C (tTGC), the recently identified target autoantigen of the endomysial antibodies (12). The data gained in this analysis are supposed to provide a rationale for screening programs for active case-finding strategies in specialized centers (e.g., diabetes outpatient clinics).

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Subjects and human sera

The study population consisted of 197 patients at onset of type 1 diabetes, diagnosed according to World Health Organization (WHO) criteria. The median age of the recent-onset type 1 diabetic patients was 16 years (range 5–27), and 112 were men. The study population also included 882 first-degree relatives who were recruited from the Giessen-Bad Oeynhausen prospective family study (13), of which 485 were parents (median age 43 years, range 22–59), 382 were siblings, and 15 were offspring of type 1 diabetic patients (median age 16 years, range 2–41). As a control group, we additionally analyzed sera from 150 healthy individuals without a family history of diabetes who were age- and sex-matched to the group of first-degree relatives. The serum samples were drawn before insulin treat-

ment was instituted in the recent-onset type 1 diabetic patients, and in the first-degree relatives, blood was drawn close to the time of diagnosis of the index patient. Sera were immediately stored in aliquots at -20°C in our serum bank before testing. Informed consent was obtained before blood sampling.

Antibody assays

The type 1 diabetes-associated autoantibodies (i.e., ICA, IAA, and GADA) and the intracytoplasmic domain of the tyrosine phosphatase-like protein IA-2 (anti-IA-2) were measured by standard methods, established in our laboratory and evaluated in Immunology of Diabetes Society proficiency tests as described previously (13). Briefly, ICA were detected by the indirect immunofluorescence technique on cryostat sections of human pancreas, blood group O. GADA and anti-IA-2 antibodies were measured in a fluid phase radioligand binding assay with human GAD65 or the tyrosine phosphatase-like protein IA-2 as substrate. IAA were determined in a competitive radioimmunoassay. Adrenal cortex autoantibodies and GPC antibodies were detected by indirect immunofluorescence on 4- μm cryostat sections of fresh frozen guinea pig adrenal gland tissue or stomach. The celiac disease-associated IgG/IgA directed to gliadin and IgA targeting tTGC were evaluated by means of a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) utilizing highly purified tissue transglutaminase from guinea pig as substrate (Medipan Diagnostica, Selchow, Germany). Thyroid autoantibodies directed to TG and microsomal antigens (TPO) were determined in an ELISA based on recom-

binant human TG or TPO. The standardization of the TPO antibodies assay was carried out against the WHO standard serum NIBSC 66/387 (Medizintechnik; Elias, Freiburg, Germany).

Statistics

For comparison between groups, χ^2 statistics, Fisher's exact test, and Mann-Whitney U test were applied where appropriate. A P value of <0.05 was considered significant. The data analysis was carried out using the SPSS 6.1.3 software.

RESULTS

Prevalence of autoantibodies

The overall frequencies of type 1 diabetes- and thyroid disease-associated antibodies in the study population and in the healthy control subjects are shown in Table 1 and Fig. 1. Because type 1 diabetes was chosen as the index diagnosis in this study, we naturally observed a significantly higher frequency of humoral markers of type 1 diabetes-associated autoimmunity in the group of recent-onset type 1 diabetic patients and in the group of first-degree relatives compared with healthy control subjects ($P < 0.05$). In addition, there was a general increase of thyroid autoimmunity in the recent-onset type 1 diabetic patients and in the first-degree relatives compared with healthy control subjects. The prevalence of anti-TPO ± TG antibodies was significantly higher both in the recent-onset type 1 diabetic patients and in their first-degree relatives compared with the control group ($P < 0.05$). Because it has long been realized that thyroid autoimmunity increases with age, we analyzed the frequencies in the subgroup of parents compared with siblings and offspring. We confirmed significantly higher prevalences against thyroid antigens in the older age group (parents) ($P < 0.05$) (data not shown). Nevertheless, looking at the overall frequencies of anti-TPO ± TG antibodies in the group of first-degree relatives compared with the age- and sex-matched control group, we still observed a significant increase in thyroid autoimmunity in the first-degree relatives compared with the control subjects ($P < 0.05$). This finding suggests an increased level of thyroid autoimmunity independent of age in first-degree relatives of patients with type 1 diabetes.

Table 2 and Fig. 1 show the overall frequency of celiac disease-associated anti-

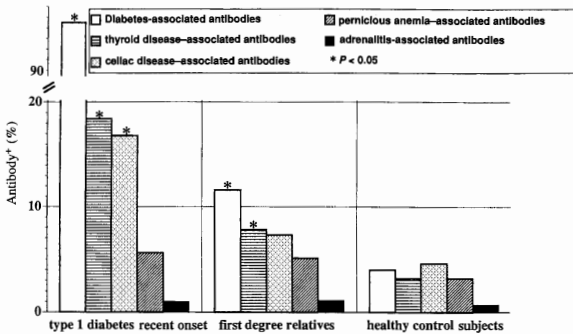


Figure 1—Antibody prevalences in type 1 diabetic patients, first-degree relatives, and healthy control subjects. Data are stratified for disease-specific antibodies (recent-onset type 1 diabetes, autoimmune thyroid disease, celiac disease, pernicious anemia, and Addison's disease). In cases in which more than one antibody specificity is pertinent for the respective disease, the data are shown as positivity for ≥ 1 antibody. Significant differences ($P < 0.05$) are encoded with an asterisk (*).

bodies, GPC antibodies, and adrenal cortex antibodies in the study population and in the control group. We observed a significant increase in the frequency of anti-gliadin IgG, anti-gliadin IgA, and anti-transglutaminase IgA as potential markers for celiac disease in the group of recent-onset type 1 diabetic patients ($P < 0.05$). In addition, there was a trend for higher prevalences of celiac disease-associated antibodies in the group of first-degree relatives compared with the control group, but this difference did not reach statistical significance. The prevalence for GPC antibodies did not differ significantly between groups; however, there was a significant increase in GPC antibodies positivity depending on older age in the group of first-degree relatives ($P < 0.05$) (data not shown). Adrenal cortex antibodies were only detected at very low prevalence levels and were not significantly different between groups.

Co-occurrence of autoantibodies

As shown before, the antibody prevalence study has revealed significant differences for three of the five disorders under consideration (i.e., recent-onset type 1 diabetes, autoimmune thyroid disease, and celiac disease). Figure 2 shows the data analysis with regard to co-occurrence of disease-specific antibodies by focusing on antibody positivity for two or more of the envisaged disorders (recent-onset type 1 diabetes, autoimmune thyroid disease, and

celiac disease). In the healthy control subjects, the overall level of antibody positivity and titers were low, and we did not observe any subject with positivity for more than one disease-specific antibody (0/150). By contrast, in the group of patients with recent-onset type 1 diabetes, a significant ($P < 0.05$) proportion of patients was positive for two or more disease-specific antibodies (54/197, 27.4%). The level of coexistence for thyroid antibodies- and/or celiac disease-associated antibodies was 11.2 and 9.6%, respectively, and 6.6% were triple positive. Interestingly, when looking at the group of first-degree relatives, we found 27/882

(3.1%) double or triple positive, also demonstrating a significant ($P < 0.05$) overlap of disease-specific antibodies in first-degree relatives of type 1 diabetic patients compared with the control subjects ($P < 0.05$). Thus, we observed a significant clustering of disease-specific antibodies both in recent-onset type 1 diabetic patients (thyroid antibodies and celiac disease-associated antibodies) and in their first-degree relatives (thyroid antibodies in addition to type 1 diabetes-associated antibodies).

CONCLUSIONS

The clinically established entity of APS II and III reflect a significant overlap of different endocrine disorders of autoimmune origin in one subject, leading to differential therapeutic concepts (4). Recently, several reports have described a frequent association of celiac disease and type 1 diabetes (6,7,14,15), which has obvious therapeutic implications. A gluten-free diet may improve the diarrhea in some patients with type 1 diabetes where the reason for diarrhea is underlying celiac disease, and the diet may improve control of diabetes by normalizing the nutritional-hormonal balance (5,16,17). These considerations provide a strong rationale for screening strategies for the early diagnosis of suspected APS and/or celiac disease in populations at risk. In the present study, we have chosen type 1 diabetes as the index diagnosis to consider screening and have included first-degree relatives because of the suspected genetic predisposition of these disorders.

For screening purposes, detection of autoantibodies is most efficient to diagnose preclinical endocrine dysfunction. This is well established for pre-type 1 diabetes by

Table 2—Prevalence of organ-specific autoantibodies in patients with type 1 diabetes at recent-onset, first-degree relatives of type 1 diabetic patients, and healthy control subjects

	Recent-onset type 1 diabetic patients	First-degree relatives	Healthy control subjects
<i>n</i>	197	882	150
Celiac disease-associated antibodies			
Anti-gliadin IgG	10.2*	5.6	3.2
Anti-gliadin IgA	7.6*	2.6	2.0
Anti-transglutaminase IgA	9.7*	3.2	2.6
≥ 1 antibody*	16.8*	7.3	4.6
Pernicious anemia-associated antibodies			
Anti-GPC antibodies	5.6	6.0	3.2
Adrenailitis-associated antibodies			
Anti-adrenal antibodies	1.0	1.1	0.7

*Significantly different ($P < 0.05$).

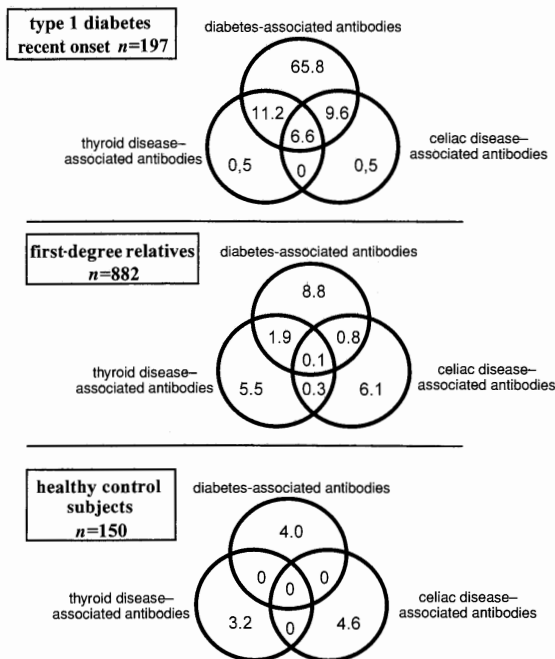


Figure 2—Coexistence of disease-specific antibodies relevant for type 1 diabetes, autoimmune thyroid disease, and celiac disease in healthy control subjects, type 1 diabetic patients at onset of the disease, and their first-degree relatives. Significant differences for the proportions of individuals being double or triple positive both for the group of recent-onset type 1 diabetic patients and for the group of first-degree relatives compared with control subjects ($P < 0.05$).

assessment for ICA, IAA, GADA, and anti-IA-2 antibodies (13,18,19). Moreover, autoimmune thyroid disease may present with anti-TPO antibodies and/or anti-TG antibodies (20,21), and anti-GPC antibodies or anti-adrenal cortex antibodies are significantly associated with pernicious anemia or Addison's disease-associated adrenalitis, respectively (22–26). In celiac disease, a major breakthrough was the identification of tTG as the target antigen of the endomysial antibodies (12,15,27,28). The panel of antibodies, selected for screening in our present study, therefore included ICA, IAA, GADA, anti-IA-2, anti-TPO antibodies, anti-TG antibodies, anti-GPC antibodies, and anti-adrenal cortex antibodies and was

supplemented with anti-gliadin IgG/IgA and anti-tTG antibodies. Because in clinical practice, even in specialized centers, it is not suitable to screen all individuals for the whole panel of antibodies, the data arising from this analysis should provide a rationale for an active case finding strategy that is efficient and based on epidemiological data.

Focusing on the group of recent-onset type 1 diabetic patients, we observed autoantibody frequencies very similar to previously published data, confirming a reasonable sensitivity and specificity of the assay systems used. Signs of autoimmune thyroid disease were found in one of five recent-onset type 1 diabetic patients, and one of six was positive for one or more of

the celiac disease-associated antibodies, which is well in accordance with recent observations from other investigators (8,29,30). Interestingly, 6.6% (1 of 15) were triple positive for thyroid antibodies and celiac disease-associated antibodies in addition to type 1 diabetes-related autoimmune markers. We conclude from these high frequencies and levels of coexistence that recent-onset type 1 diabetic patients should be screened at a minimum for presence of thyroid antibodies and celiac disease-associated antibodies to facilitate differential and optimal therapy. As described by others, the prevalences for anti-GPC antibodies and anti-adrenal cortex antibodies were low (26,31) and did not differ among groups. A screening for these antibodies in recent-onset type 1 diabetic patients without a certain level of suspicion seems not to be justified.

In the group of first-degree relatives of type 1 diabetic patients, 11.6% were positive for at least one of the diabetes-associated autoantibodies. Based on these antibodies, refined prediction models for future development of type 1 diabetes are clinically well established, and several intervention studies are underway aiming to prevent type 1 diabetes in these individuals at risk. In contrast, only few data exist in first-degree relatives of type 1 diabetic patients comprising the whole panel of antibodies relevant for APS II/III and celiac disease, which is in the focus of our present study. In 7.8% of the cases (1 of 13), we observed signs of anti-thyroid autoimmunity and in 2% (1 of 50) a coexistence of type 1 diabetes-associated antibodies with anti-thyroid antibodies. We suggest from these data that screening in first-degree relatives of patients with type 1 diabetes should include the search for thyroid autoimmunity in addition to screening for pre-type 1 diabetes. Celiac disease-associated antibodies were not significantly higher compared with the control group. Although there was a positive trend with 7.6% positivity for celiac disease-associated antibodies in the group of first-degree relatives compared with only 4.6% in the control group, this difference was not statistically significant. The rate at which celiac disease is diagnosed depends on the level of suspicion for the disease. From our data, we cannot recommend a general screening of first-degree relatives for celiac disease-associated antibodies. Nevertheless, a potentially increased risk for celiac disease at least in the subgroup of children

from diabetic parents should be considered because of a recent report that offspring of type 1 diabetic parents have a seven times higher risk to develop tTGC than healthy control subjects (32). In our group of first-degree relatives, offspring were the minority, representing only 1.7% of the population, while the majority were siblings and parents of type 1 diabetic patients. As in the group of recent-onset type 1 diabetic patients, the overall frequencies for anti-GPC antibodies and anti-adrenal cortex antibodies were low and not significantly different from the control group. Thus, a general screening for anti-GPC antibodies and anti-adrenal cortex antibodies in first-degree relatives of type 1 diabetic patients cannot be recommended.

Because of the cross-sectional design of the present study, we cannot answer the question related to an optimal time point for screening or repeated blood sampling. However, at least for celiac disease, a follow-up study in type 1 diabetic patients has shown that celiac disease tends to develop soon after diabetes has occurred. Routine screening for celiac disease repeatedly during the first years after the diagnosis of type 1 diabetes is suggested by the authors (33).

In summary, our data provide evidence that in an active case finding strategy, recent-onset type 1 diabetic patients should be screened routinely for concomitant autoimmune thyroid disease and additionally for celiac disease. Screening in their first-degree relatives should include at a minimum the search for thyroid autoimmunity in addition to screening for pre-type 1 diabetes and can be extended for anti-tTGC antibodies and anti-gliadin antibodies depending on the level of suspicion for celiac disease (e.g., in offspring of diabetic parents). A general screening for anti-GPC and anti-adrenal cortex antibodies without clinical suspicion for the disease appears not to be justified. In case of autoantibody positivity, further diagnostic tools should be considered including metabolic testing or jejunal biopsy to verify the diagnosis. The screening procedure suggested in our present study is noninvasive by using standardized antibody assays performed on small amounts of serum and is suitable for large-scale screening. It has the potential to identify undiagnosed cases of APS and/or celiac disease, which is essential to prevent complications such as hypothyroidism, nutritional deficiencies, and other severe complications associated with these disorders.

Acknowledgments— The skillful technical assistance of M. Stein, S. Scherer, J. Schmidt, S. Hecker, and S. Schaum is gratefully acknowledged.

References

- Schmidt MB: Eine biglanduläre Erkrankung: Nebennieren und Schilddrüse bei Morbus Addison. *Verh Dtsch Pathol Ges* 21:212–221, 1964
- Rabinow SL, Eisenbarth GS: Polyglandular autoimmunity. *Adv Intern Med* 31:293–307, 1986
- Bigazzi PE: Autoimmunity in diabetes and polyendocrine syndromes: current concepts of pathogenesis and etiology. *Immunol Ser* 52:295–322, 1990
- Riley WJ: Autoimmune polyglandular syndromes. *Horm Res* 38:9–15, 1992
- Murray JA: The widening spectrum of celiac disease. *Am J Clin Nutr* 69:354–365, 1999
- Mann NS, Mann SK: Celiac sprue and insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Gastroenterol* 17:354–355, 1993
- Cronin CC, Shanahan F: Insulin-dependent diabetes mellitus and coeliac disease. *Lancet* 349:1096–1097, 1997
- Seissler J, Schott M, Boms S, Wohlrab U, Ostendorf B, Morgenthaler NG, Scherbaum WA: Autoantibodies to human tissue transglutaminase identify silent coeliac disease in type 1 diabetes. *Diabetologia* 42:1440–1441, 1999
- Corazza GR, Gasbarrini G: Celiac disease in adults. *Baillieres Clin Gastroenterol* 9:329–350, 1995
- Houlston RS, Tomlinson IP, Ford D, Seal S, Marossy AM, Ferguson A, Holmes GK, Hosie KB, Howdle PD, Jewell DP, Godkin A, Kerr GD, Kumar P, Logan RF, Love AH, Johnston S, Marsh MN, Mitton S, O'Donoghue D, Roberts A, Walker-Smith JA, Stratton MF: Linkage analysis of candidate regions for celiac disease genes. *Hum Mol Genet* 6:1335–1339, 1997
- Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vardal F, Thorsby E: Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ α/β heterodimer. *J Exp Med* 169:345–350, 1989
- Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D: Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 3:797–801, 1997
- Jaeger C, Hatzigelaki E, Stroeder A, Becker F, Scherer S, Petzoldt R, Federlin K, Bretzel RG: The Giessen-Bad Oeynhausen family study: improved prediction of type 1 diabetes in a low incidence population of relatives using combinations of islet autoantibodies in a dual step model. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107:496–505, 1999
- Collin P, Salmi J, Hallström O, Oksa H, Oksala H, Maki M: High frequency of celiac disease in adult patients with type 1 diabetes. *Scand J Gastroenterol* 24:81–84, 1989
- Maki M, Collin P: Celiac disease. *Lancet* 349:1755–1759, 1997
- Bradbury SL, Scarpello JHB: Recurrent hypoglycaemia as the presenting symptom of celiac disease in a patient with type 1 diabetes. *Pract Diabetes Intern* 16:89–90, 1999
- Valdovinos MA, Camilleri M, Zimmermann BR: Chronic diarrhea in diabetes: mechanisms and an approach to diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 68:691–702, 1993
- Bonifacio E, Genovese S, Braghi S, Bazzigaluppi E, Lampasona V, Bingley PJ, Rogge L, Pastore MR, Bognetti E, Bottazzo GF, Gale EAM, Bosi E: Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity. *Diabetologia* 38:816–822, 1996
- Roll U, Ziegler A: Combined antibody screening for improved prediction of IDDM: modern strategies. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105:1–14, 1997
- Gilmour J, Brownlee Y, Foster P, Geekie C, Kelly P, Robertson S, Wade E, Braun HB, Staub U, Michel G, Lazarus JH, Parkes AB: The quantitative measurement of autoantibodies to thyroglobulin and thyroid peroxidase by automated microparticle based immunoassays in Hashimoto's disease, Graves disease and a follow-up study on postpartum thyroid disease. *Clin Lab* 46:57–61, 2000
- Petri M, Karlson EW, Cooper DS, Ladenson PW: Autoantibody tests in autoimmune thyroid disease: a case-control study. *J Rheumatol* 18:1529–1531, 1991
- Stewart LA, van-Driel IR, To HH, Gleeson PA: Species-specific distribution of α -galactosyl epitopes on the gastric H/K ATPase B-subunit. *Glycobiology* 9:601–616, 1999
- Volta U, De-Franceschi L, Molinaro N, Tetta C, Bianchi FB: Organ-specific autoantibodies in celiac disease: do they represent an epiphenomenon or the expression of associated autoimmune disorders? *Ital J Gastroenterol Hepatol* 29:18–21, 1997
- Weetman AP: Autoimmunity to steroid-producing cells and familial polyendocrine autoimmunity. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 9:157–174, 1995
- Betterle CM, Volpato M, Smith BR: Adrenal cortex and steroid 21-hydroxylase autoantibodies in adult patients with organ-specific autoimmune diseases: markers of low progression to overt Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 82:932–938, 1997
- Yu L, Brewer KW, Gates S, Wu A, Wang T, Babu SR, Gottlieb PA, Freed BM, Noble J, Erlich HA, Rewers MJ, Eisenbarth GS: DRB1*04 and DQ alleles: expression of 21-hydroxylase autoantibodies and risk of progression to Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 84:328–335, 1999
- Dieterich W, Laag E, Schöpfer H, Volta U,

- Ferguson A, Gillet H, Riecken EO, Schuppan D: Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology* 115:1317-1321, 1998
28. Carassi C, Ratsch M, Fabiani E, Rossini M, Bordicchia F, Candela F, Coppa GV, Giorgi PL: Celiac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 343:200-203, 1994
29. Holl RW, Boehm B, Loos V, Grabert M, Heinze E, Hornoki J: Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes: effect of age, gender and HLA type. *Horm Metabol Res* 52:113-118, 1998
30. Lampasona V, Bazzigaluppi E, Barera G, Bonifacio E: Tissue transglutaminase and combined screening for celiac disease and type 1 diabetes-associated autoantibodies. *Lancet* 352:1192-1193, 1998
31. Kontiainen S, Schlenzka A, Koskimies S, Rilva A, Maenpaa J: Autoantibodies and autoimmune diseases in young diabetics. *Diabetes Res* 13:151-156, 1990
32. Hummel M, Bonifacio E, Stern M, Dittler J, Schimmel A, Ziegler AG: Development of celiac disease-associated antibodies in offspring of parents with type 1 diabetes. *Diabetologia* 43:1005-1011, 2000
33. Saukkonen T, Savilahti E, Reijonen H, Ilonen J, Tuomilehto-Wolf E, Akerblom HK, the Childhood Diabetes in Finland Study Group: celiac disease: frequent occurrence after clinical onset of insulin dependent diabetes. *Diabet Med* 13:464-470, 1996

Schilddrüsenantikörper und basale TSH-Spiegel bei 425 erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern im Langzeitverlauf über sieben Jahre

C. Jaeger, E. Hatziagelaki, R. Petzoldt, R. G. Bretzel

Einleitung

Bei Patienten mit manifestem Typ-1-Diabetes werden serologisch häufig Anzeichen einer Hashimoto-Thyroiditis (anti-TPO-Ak und/oder anti-TG-Ak) festgestellt. Die beschriebenen Häufigkeiten liegen je nach Altersstruktur und Geschlechtsverteilung zwischen ca. 10–30 % [6, 9, 11, 12, 14]. In einer eigenen Untersuchung an 197 Typ-1-Diabetikern fanden wir TPO-Ak und/oder TG-Ak in 18,4 % der Fälle [7]. Die Kombination verschiedener Autoimmunerkrankungen mit Manifestation an mindestens zwei endokrinen Organen hat zur Definition der autoimmunen polyendokrinen Syndrome geführt, als deren Ursache unter anderem ein gemeinsamer genetischer Hintergrund diskutiert wird [1, 13, 15]. Erstgradig Verwandte von Typ-1-Diabetikern haben aufgrund des ähnlichen genetischen Hintergrunds selbst ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Typ-1-Diabetes [4]. Es stehen jedoch nur wenige Daten zur Verfügung, um die Frage beantworten zu können, ob Verwandte 1. Grades von Typ-1-Diabetikern nicht auch ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Autoimmunthyroiditis Hashimoto haben. Ziel unserer Untersuchung war daher ein Screening der Serumproben von 425 erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern auf anti-TPO und/oder anti-TG-Ak sowie die Bestimmung des basalen TSH über sieben Jahre hinweg unter folgenden Fragestellungen:

1. Wie hoch ist die Prävalenz der anti-TPO und/oder anti-TG-Ak in diesem Kollektiv verglichen mit einer Kontrollgruppe (Querschnittsuntersuchung)?
2. Wie hoch liegen die basalen TSH-Spiegel in den Gruppen der Ak-positiven, verglichen mit den Ak-negativen Verwandten und in der Kontrollgruppe (Querschnittsuntersuchung)?
3. Wie ist die Entwicklung der basalen TSH-Spiegel über einen Zeitraum von sieben Jahren bei den anti-TPO- und/oder anti-TG-Ak-positiven verglichen mit den Ak-negativen erstgradig Verwandten von Patienten mit Typ-1-Diabetes (Längsschnittuntersuchung)?

Probanden und Methoden

Probanden

Die untersuchten Serumproben stammen aus der Giessen/Bad-Oeynhausen-Familienstudie [8]. In dieser Langzeitstudie wurden in den Jahren 1985 bis 1997 prospektiv erstgradig Verwandte von Patienten mit Typ-1-Diabetes auf assoziierte Ak gescreent und die Inzidenz des Typ-1-Diabetes in dieser Kohorte beobachtet. In die aktuelle Analyse wurden Serumproben von 425 Verwandten einbezogen, bei denen ein ausreichendes Probenvolumen für die Analyse auf anti-TPO bzw. anti-TG-Ak und die TSH-Bestimmung zum Zeitpunkt 0 und nach sieben Jahren Studiendauer verfügbar waren. Unter den 425 Probanden waren $n = 199$ Geschwister bzw. Kinder von Patienten mit Typ-1-Diabetes, das mittlere Alter betrug $18,4 \pm 8,6$ Jahre, das Geschlechterverhältnis M/W: 78/121. Darüberhinaus waren 226 Eltern diabetischer Kinder eingeschlossen, mittleres Alter $42 \pm 9,4$ Jahre, Geschlechtsverteilung M/W: 95/131. Als Kontrollgruppe wurden Seren von $n = 125$ gesunden Freiwilligen untersucht, deren Anamnese für Schilddrüsenerkrankungen leer war und die ein basales TSH zwischen 1 mU/l bis 3 mU/l aufwiesen. Die Alterstruktur und Geschlechtsverteilung der gesunden Kontrollen war vergleichbar mit der Alters- bzw. Geschlechtsverteilung der Verwandten, mittleres Alter: $31 \pm 16,4$ Jahre, Geschlechterverhältnis M/W: 47/78.

Antikörperassays

Anti-TPO-Ak wurden in einem kommerziell verfügbaren Synelisa (Pharmacia & Upjohn) bestimmt. Hierbei bindet rekombinante humane Schilddrüsenperoxidase, an den Synelisa-Pins immobilisiert, spezifisch TPO-Antikörper. Der Normalbereich ist mit < 60 IU/ml angegeben, der Graubereich zwischen 60–100 IU/ml. Für die vorliegende Untersuchung wurden nur Seren mit anti-TPO-Konzentrationen > 100 IU/ml als positiv bewertet. Die Kalibrierung des Synelisa-TPO-Ak-Assays ist gegen die internationale WHO-Referenzpräparation NIBSC 66/386 erfolgt. Intra-Assay-Varianz und Inter-Assay-Varianz liegen für Proben mittlerer Ak-Konzentration bei 4,5 % vs. 6,8 %.

Anti-TG-Ak wurden in einem kommerziell verfügbaren Synelisa (Pharmacia & Upjohn) bestimmt. Der Synelisa-TG-Ak-Assay ist ein indirekter, nicht kompetitiver Enzym-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von Thyreoglobulin-Antikörpern, basierend auf humanem TG als Festphase. Der Normalbereich ist mit < 60 IU/ml angegeben, der Graubereich zwischen 60–100 IU/ml. Für die vorliegende Untersuchung wurden nur Seren mit anti-TG-Konzentrationen > 100 IU/ml als positiv bewertet. Die Kalibrierung des Synelisa-TG-Ak-Assays ist gegen die internationale WHO-Referenzpräparation NIBSC 65/93 erfolgt. Intra-Assay-Varianz und Inter-Assay-Varianz liegen für Proben mittlerer Ak-Konzentration bei 4,4 % vs. 6,7 %.

TSH-Assay

Die basalen TSH-Spiegel wurden in einem kommerziell verfügbaren, hoch sensitiven automatischen Chemoluminescence-System (ACS:180, Bayer) bestimmt. Der Messbereich des ACS:180 ist mit 0,01 mU/l bis 150 mU/l angegeben, der Erwartungswert bei Euthyreose liegt zwischen 0,35 bis 5,50 mU/l. Der ACS:180 TSH-Test ist gegen die 2. IRP 80/558 (WHO) kalibriert. Die Intra-Assay-Varianz beträgt für Proben niedriger, mittlerer und hoher TSH-Konzentrationen 4,7 % vs. 3,9 % vs. 4,9 %. Die Wiederfindungsraten nach Verdünnung liegen im Mittel bei 107 %.

Ergebnisse

Prävalenz der SD-Ak

Insgesamt wiesen 50 der erstgradigen Verwandten SD-Ak (anti-TPO und/oder anti-TG-Ak) auf (11,7 %). In der Kontrollgruppe (schilddrüsengesunde Freiwillige mit einem basalen TSH zwischen 1–3 mU/l) lag die Prävalenz bei 3,2 %. Die Prävalenz der SD-Ak bei den Verwandten war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,01$) erhöht, sowohl in der Gruppe der Geschwister bzw. Kinder mit 12,1 %, als auch bei den Eltern diabetischer Kinder mit 11,6 %.

Basale TSH-Spiegel vs. Ak-Status

Anti-TPO- und/oder anti-TG-Ak-positive erstgradige Verwandte wiesen signifikant ($p < 0,05$) höhere basale TSH-Spiegel auf als Ak-negative Verwandte (Abb. 1). Darü-

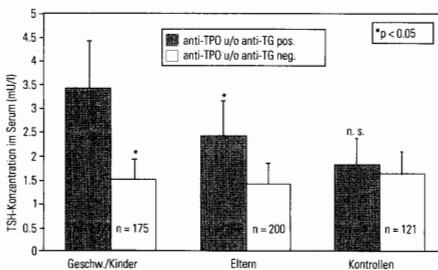


Abb. 1: Basale Serumkonzentration von TSH in Abhängigkeit vom Ak-Status bei erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern (Geschwister bzw. Kinder: $n = 199$; Eltern: $n = 226$) und gesunder Kontrollgruppe ($n = 125$). Signifikant ($*p < 0,05$) höhere basale TSH-Spiegel bei den Ak-positiven vs. Ak-negativen und signifikant ($*p < 0,05$) höhere TSH-Spiegel bei Ak-positiven Geschwistern bzw. Kindern vs. Ak-positiven Eltern

berhinaus lagen die basalen TSH-Spiegel SD-Ak-positiver Geschwister bzw. Kinder mit $3,4 \pm 1,1$ mU/l signifikant höher als die basalen TSH-Spiegel der Eltern diabetischer Kinder mit $2,5 \pm 0,8$ mU/l ($p < 0,05$). Die basalen TSH-Spiegel der SD-Ak-negativen Verwandten lagen im gleichen Niveau wie die basalen TSH-Spiegel der Kontrollen (n. s.).

Basale TSH-Spiegel im Zeitverlauf

Die Entwicklung der basalen TSH-Spiegel bei den anti-TPO- und/oder anti-TG-Ak-positiven erstgradigen Verwandten zeigt Abb. 2. In der Gruppe der Geschwister bzw. Kinder beobachteten wir einen signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg des basalen TSH von

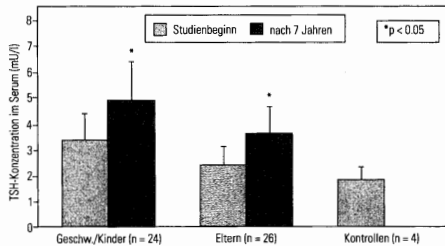


Abb. 2: Basale TSH-Serumkonzentration zum Studienbeginn und nach sieben Jahren bei den Ak-positiven erstgradigen Verwandten von Typ-1-Diabetikern (Geschwister bzw. Kinder: $n = 24$, Eltern: $n = 26$). Signifikanter ($*p < 0,05$) Anstieg des basalen TSH im Zeitverlauf

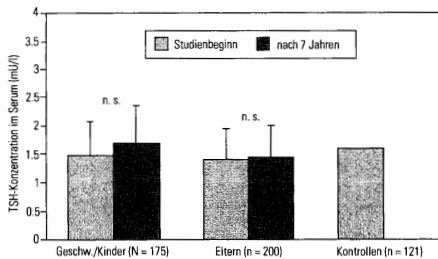


Abb. 3: Basale Serumkonzentration von TSH zum Studienbeginn und nach sieben Jahren bei den Ak-negativen erstgradigen Verwandten von Typ-1-Diabetikern (Geschwister bzw. Kinder: $n = 175$, Eltern: $n = 200$). Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der TSH-Spiegel

$3,4 \pm 1,1$ mU/l zum Zeitpunkt der ersten Serumprobe auf $4,8 \pm 1,3$ mU/l in der Probe nach sieben Jahren Verlauf. Auch in der Gruppe der Eltern diabetischer Kinder war ein signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg des basalen TSH über die Zeit von $2,5 \pm 0,8$ mU/l auf $3,8 \pm 1,1$ zu verzeichnen. Die TSH-Spiegel der Ak-negativen erstgradigen Verwandten zeigten keinen signifikanten Anstieg über die Zeit und lagen sämtlich im Niveau der Kontrollgruppe (Abb. 3).

Zusammenfassung

Ein generelles und regelmäßiges Screening der Allgemeinbevölkerung auf Schilddrüsenantikörper und basales TSH scheint nicht realisierbar. Unter dem Gesichtspunkt eines präventiven Ansatzes müssen jedoch, je nach verfügbaren Ressourcen im jeweiligen Gesundheitssystem, rationelle Screeningstrategien gefunden werden, die es erlauben, eine möglichst hohe Zahl zukünftiger Patienten zu erfassen. Hierbei muss sich eine rationelle Screeningstrategie sinnvollerweise zunächst auf Risikopopulationen beschränken, die eine erhöhte Inzidenz für die jeweilige Erkrankung aufweisen.

Die vorliegende Untersuchung zeigt erstmalig für die erstgradig Verwandten von Patienten mit Typ-1-Diabetes signifikant erhöhte Prävalenzen für SD-Antikörper (ca. 11 % für anti-TPO und/oder anti-TG-Ak) mit signifikant erhöhten basalen TSH-Spiegeln im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen und eine progressive Verschlechterung der Stoffwechsellage im Sinne einer potentiellen bzw. manifesten Hypothyreose im Langzeitverlauf. Die Prävalenz der SD-Ak in unserer Kontrollgruppe lag mit 3,2 % etwas niedriger als in der Literatur zuvor beschrieben. Die große, populationsbasierte Tromso-Studie an 2551 Personen in Norwegen hatte Prävalenzen von 6,1 % vs. 2,8 % für anti-TPO vs. anti-TG-Ak gezeigt [2]. Der Grund für diese niedrigere Ak-Prävalenz liegt am ehesten in unserer Vorauswahl der Kontrollgruppen als anamnestisch SD-gesunde Freiwillige mit einem TSH im engeren Normbereich zwischen 1–3 mU/l. Zudem könnten genetische und Umgebungsfaktoren (z. B. Ernährung) zu den unterschiedlichen Prävalenzen beigetragen haben.

Die erhöhte Antikörperprävalenz bei den erstgradig Verwandten deutet darauf hin, dass diese Personengruppe ein Risikokollektiv für eine erhöhte Inzidenz von Hashimoto-Thyroiditis darstellt. Sie sollte als mögliche Zielgruppe in eine Screeningstrategie für Hashimoto-Thyroiditis aufgenommen werden.

Die klinische Relevanz eines Screenings auf Hashimoto-Thyroiditis leitet sich aus der möglichen einfachen und kostengünstigen therapeutischen Konsequenz mit Durchführung einer isohormonalen Therapie ab. Das Screening mittels Schilddrüsenantikörpern und/oder basalem TSH hat sich in einer großen Analyse, dem Wickham-Survey mit 2800 Probanden und Nachbeobachtung über 20 Jahre hinweg, als effektiv zur frühzeitigen Erfassung späterer manifester Hypothyreosen erwiesen, die meist durch die

Hashimoto-Thyroiditis verursacht werden [18]. Für alleinige SD-Ak-Positivität wurde eine jährliche Progressionsrate hin zu manifester Hypothyreose von ca. 2,1 % ermittelt, bei alleiniger TSH-Erhöhung lag das Risiko bei 2,6 % und bei kombinierter SD-Ak-Positivität zusammen mit erhöhtem basalen TSH stieg diese Progressionsrate weiter auf 4,3 %. Der von uns beobachtete signifikante TSH-Anstieg über den Zeitraum von sieben Jahren bei den SD-Ak-positiven erstgradigen Verwandten von Patienten mit Typ-1-Diabetes ist gut vereinbar mit diesen zuvor beschriebenen Resultaten. Dies eröffnet die Perspektive, eine zukünftig drohende manifeste Hypothyreose frühzeitig, also noch im Stadium der subklinischen (potentiellen) Hypothyreose, zu erfassen. Hierdurch könnten diese Patienten einer spezifischen Therapie zugeführt werden mit dem Ziel des Erhalts der euthyreoten Stoffwechsellaage bei normalen TSH-Spiegeln.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurde eine „Number needed to treat“-Analyse für Patienten mit subklinischer (potentieller) Hypothyreose vorgestellt, die zeigt, dass je nach Alter und TSH-Spiegeln zwischen 4,3 bis 14,3 Patienten behandelt werden müßten, um einen Progress hin zu manifester Hypothyreose zu verhindern [5]. Diese Rate liegt in vergleichbaren Größenordnungen, die auch für andere präventive Ansätze in der Medizin akzeptiert werden, wie z. B. die Statintherapie bei Hypercholesterinämie [10].

Eine detaillierte Darstellung der Nutzen/Risiko-Abwägung einer isohormonalen Therapie bei subklinischer (potentieller) Hypothyreose ist nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Hier darf auf die kürzlich im *New England Journal of Medicine* erschienene Übersichtsarbeit von S. D. Cooper verwiesen werden, in der der Autor u. a. zu der Schlußfolgerung kommt, dass eine isohormonale Therapie auch asymptomatischer Personen mit positiven SD-Ak-Tests sinnvoll ist [3]. Diese Auffassung wird gestützt durch tierexperimentelle und klinische Arbeiten von Schumm-Draeger et al. [16, 17].

Basierend auf den hier erhobenen Daten schlagen wir daher zusammenfassend ein breites Screening erstgradig Verwandter von Typ-1-Diabetikern auf Schilddrüsenantikörper und ggf. TSH-basal vor. Orientiert an der aktuellen Datenlage in der Literatur sollte dann im Falle positiver Ak-Nachweise und/oder erhöhter basaler TSH-Spiegel eine isohormonale Therapie mit L-Thyroxin erwogen werden.

Literatur

- [1] Bigazzi, P. E.: Autoimmunity in diabetes and polyendocrine syndromes: current concepts of pathogenesis and etiology. *Immunol. Ser.* 52 (1990) 295–322.
- [2] Bryhni, B., S. Aanderud, J. Sundsfjord et al.: Thyroid antibodies in northern Norway: prevalence, persistence and relevance. *J. Intern. Med.* 239 (1996) 517–523.
- [3] Cooper, S. D.: Subclinical hypothyroidism. *N. Engl. J. Med.* 345 (2001) 260–265.
- [4] Green, A.: Prevention of IDDM: the genetic epidemiologic perspective. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 34, Suppl. 1 (1996) 101–106.

- [5] Helfand, M., C. C. Refern: Screening for thyroid disease: an update. *Ann. Intern. Med.* 129 (1998) 144–158.
- [6] Holl, R. W., B. Boehm, V. Loos et al.: Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes: effect of age, gender and HLA type. *Horm. Metabol. Res.* 52 (1998) 113–118.
- [7] Jaeger, C., E. Hatzigelaki, R. Petzoldt et al.: Comparative analysis of organ-specific autoantibodies and celiac disease-associated antibodies in type 1 diabetic patients, their first degree relatives and in healthy control subjects. *Diabetes Care* 24 (2001) 27–32.
- [8] Jaeger, C., E. Hatzigelaki, A. Stroedter et al.: The Giessen-Bad Oeynhausen family study: improved prediction of type 1 diabetes in a low incidence population of relatives using combinations of islet autoantibodies in a dual step model. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 107 (1999) 496–505.
- [9] Kontiainen, S., A. Schlenzka, S. Koskimies et al.: Autoantibodies and autoimmune diseases in young diabetics. *Diabetes Res.* 13 (1990) 151–156.
- [10] Kumana, C. R., B. M. Y. Cheung, I. J. Lauder: Gauging the impact of statins using number needed to treat. *J. Amer. Med. Assoc.* 282 (1999) 1899–1901.
- [11] Lorini, R., G. d'Annunzio, L. Vitali et al.: IDDM and autoimmune thyroid disease in the pediatric age group. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 9, Suppl. 1 (1996) 89–94.
- [12] McCanlies, E., L. A. O'Leary, T. P. Foley et al.: Hashimoto's thyroiditis and insulin-dependent diabetes mellitus: differences among individuals with and without abnormal thyroid function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (1998) 1548–1551.
- [13] Rabinowe, S. L., G. S. Eisenbarth: Polyglandular autoimmunity. *Adv. Intern. Med.* 31 (1986) 293–307.
- [14] Radetti, G., C. Paganini, L. Gentili et al.: Frequency of Hashimoto's thyroiditis in children with type 1 diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* 32 (1995) 121–124.
- [15] Riley, W. J.: Autoimmune polyglandular syndromes: *Horm. Res.* 38 (1992) 9–15.
- [16] Schumm-Draeger, P. M., B. E. Wenzel: In vivo models in thyroid research. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 104 (1996) Suppl. 3.
- [17] Schumm-Draeger, P. M., S. Padberg, K. Heller: Prophylactic levothyroxine therapy in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 107, Suppl. 3 (1999) 84–87.
- [18] Vanderpump, M. P., W. M. Tunbridge, J. M. French et al.: The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham survey. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 43 (1995) 55–68.

Anlage 3 Ausgewählte Publikationen ad 3.3

Hatzigelaki E, **Jaeger C**, Mäser E, Bretzel RG, Federlin K (1996) GAD 65 antibody positivity in adult-onset diabetic patients is associated with early progression to clinical insulin dependency. Acta Diabetologica 33: 291-294

E. Hatzigelaki · C. Jaeger · E. Maeser · R. G. Bretzel
K. Federlin

GAD 65 antibody but not ICA positivity in adult-onset diabetic patients is associated with early progression to clinical insulin dependency

Received: 14 June 1996 / Accepted in revised form: 10 September 1996

Abstract Correct classification of diabetic patients in adulthood at the time of diagnosis is often difficult. Some may be initially diagnosed as having non-insulin-dependent diabetes mellitus and be treated with diet and/or oral hypoglycaemic agents (OHA) but later require insulin treatment. Islet cell antibodies and antibodies to GAD 65 have been associated with the development of insulin deficiency in this group of patients. In the present study, 150 patients with the initial diagnosis of type 2 diabetes mellitus in adulthood (30–60 years) were seen regularly over a period of 5 years in our diabetes outpatient clinic. Though treatment was started with diet or diet plus OHA, insulin therapy had to be introduced in a subset of patients. In all cases, serum obtained at the time of the initial diagnosis was analysed for islet cell antibodies and GAD 65 antibodies, as well as for thyroid and adrenal autoantibodies as possible markers for polyendocrine involvement. Islet cell antibody status, body mass index and the presence of thyroid and adrenal autoantibodies showed no significant correlation to subsequent insulin requirement (<2 years after diagnosis). In contrast, GAD 65 antibodies were significantly associated with the occurrence of clinical insulin dependency less than 2 years after the initial diagnosis ($P<0.01$), thus identifying a substantial proportion of patients requiring insulin therapy within the first 2 years after the diagnosis of type 2 diabetes. Determination of GAD 65 antibodies in patients with late-onset diabetes may contribute to their correct classification and adequate treatment.

Key words GAD 65 antibodies · Islet cell antibodies · Organ-specific antibodies · Prediction · Insulin-dependent diabetes mellitus in adulthood

Introduction

In patients with late-onset diabetes the classification into type 1 or type 2 based on the classical symptoms of diabetes [1] may be difficult. Type 1 diabetes in adult patients can be insidious in onset and progress rather slowly. Initially, affected patients may be classified as having type 2 diabetes and be treated with diet and/or oral hypoglycaemic agents (OHA). However, some of these patients subsequently require insulin therapy and appear to have a pathogenesis similar to that of juvenile-onset cases [2, 3]. It is important to distinguish whether this is due to secondary failure of OHA or to the fact that these patients are indeed type 1 diabetics, initially misdiagnosed as type 2 [4, 5]. The presence of islet cell antibodies (ICA) [6–8] and especially GAD 65 antibodies in patients with onset of diabetes later in life has been considered to have predictive value for the so-called latent autoimmune diabetes in adults (LADA) [9, 10].

The purpose of the present study was to investigate autoimmune markers in patients with late-onset diabetes, possibly misclassified as type 2 diabetes. Some of these individuals may suffer from type 1 diabetes, and an autoimmune reaction may lead to progressive impairment in beta-cell function. In a retrospective study, we investigated 150 consecutive patients with newly diagnosed type 2 diabetes, aged between 30–60 years, from our outpatient clinic. The frequency of ICA and autoantibodies to GAD 65 related to body mass index (BMI), and subsequent clinical insulin dependency (<2 years after diagnosis) was studied in this population. The potential identification of a substantial proportion of late-onset diabetic patients with autoimmune beta-cell destruction, indicated by GAD 65 antibodies, could have important implications not just for the correct classification of the diabetes but, more importantly, for the clinical management of the patients.

E. Hatzigelaki (✉) · C. Jaeger · E. Maeser · R. G. Bretzel
K. Federlin
Third Medical Department and Policlinic,
Justus-Liebig University, Rodthohl 6,
D-35385 Giessen, Germany

Materials and methods

In this retrospective study 150 diabetic patients (73 men, 77 women), aged between 30 and 60 years were evaluated. All patients gave their informed consent, and the protocol was approved by the Justus Liebig University ethics committee. Patients with any infection, liver disease or pregnancy were excluded from our study. The patients were admitted consecutively to the diabetic unit after hyperglycaemia had been diagnosed by their general practitioners. The antibody status as well as the age and BMI of these patients at the time of diagnosis of type 2 diabetes are shown in Tables 1 and 2. Only individuals with complete data for all parameters were included in the study. In all cases, serum taken at the time of diagnosis was available. All of the patients were seen in a 5-year period (1990–1994) by the same physician in our diabetes outpatient clinic with the initial diagnosis of type 2 diabetes, based on the diagnostic criteria for non-insulin-dependent diabetes mellitus recommended by WHO. All patients were initially treated with diet alone or with diet plus OHA. The decision to commence insulin therapy was based on clinical grounds. Patient selection occurred prior to the measurement of GAD 65 antibodies and ICA. The decision to start insulin therapy was made independently of the results. Obesity was defined according to the National Diabetes Data Group (NDDG) criteria as a BMI in men of more than 27 and in women of more than 25. In addition to determination of autoantibodies to GAD 65 and ICA, the sera of all individuals were routinely analysed for thyroid and adrenal autoantibodies as a possible indicator for polyendocrine syndromes.

Antibodies to human GAD 65 were determined in a radioligand immunoprecipitation assay as described by Petersen et al. [11]. Briefly, cDNA encoding for human GAD 65 was transcribed and translated with a commercially available system (Promega, USA) in the presence of ³⁵S-methionine. The cDNA was generously donated by Novo Nordisk. Radiolabelled GAD 65 was incubated overnight at 4°C with 2 ml of serum. The immune complexes were isolated with protein-A-sepharose (Pharmacia, Germany) and transferred to a 96-well filtration system. After washing of the immune complexes, the bottom of each well in the filtration units was punched out. Scintillation fluid was added and then was counted in a scintillation counter. Values were expressed as index values: GAD 65 index = cpm (unknown sample) – cpm (negative standard serum) / cpm (positive standard serum) – cpm (negative standard serum). Samples with GAD 65 antibody index values above the mean plus twice the standard deviation of 100 healthy control subjects were regarded as positive. The intra-assay coefficient of variation was 5.0% ($n=10$), and the inter-assay coefficient of variation was 10.1% ($n=9$).

Islet cell antibodies were assessed by indirect immunofluorescence using cryostat sections of human blood group O pancreas as substrate with undiluted patient serum. Results were converted to Juvenile Diabetes Foundation (JDF) units using the JDF standard serum. The detection limit of the assay is 5 JDF units, but in this study a positive result was defined as 10 JDF units or more. This assay is regularly tested in the IDW proficiency workshop series on standardization of the ICA assay, and performed with 100% sensitivity and 100% specificity over the 5 years of the study.

Thyroid autoantibodies (TG and TPO Ab) were determined with a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant human TG or TPO as substrate (Medi-zintechnik GmbH, Elias, Freiburg, Germany). A quantity of 10 ml of serum were incubated for 15 min and, after washing, the second antibody was added for another 15 min. After termination of the reaction, the sample was read at 492 nm in an automated ELISA reader. Titres of >100 IU/ml for women and >60 IU/ml for men were considered positive.

Adrenal autoantibodies were detected by indirect immunofluorescence on cryostat sections of rat as substrate. The sera were initially diluted 1:10.

Statistical analysis was performed by using Fisher's exact test after Yates' correction in order to determine statistical significance between group frequencies. The test was two-tailed, and $P<0.05$ was chosen as the level of significance.

Results

Islet cell antibodies, thyroid and adrenal autoantibodies

As shown in Table 1, ICA were present in 11 (7.3%) of the 150 patients. No significant influence on the prevalence of ICA was observed for sex, age at diagnosis, BMI or time to clinical insulin dependency (Table 2). The prevalence of thyroid antibodies (e.g. TG and TPO Ab positivity) and adrenal antibodies was 9% (13 of 150) vs 7% (10 of 150; Table 1). There was no significant association of thyroid autoantibody positivity with early insulin dependency, GAD 65 antibody positivity, ICA positivity or obesity. Adrenal antibodies also showed no significant correlation and

Table 1 Antibody (Ab) characteristics of the study population (diabetic patients with the initial diagnosis of NIDDM, $n=150$). Thyroid Ab positivity (pos.) is defined as TG and TPO-Ab positivity. ICA islet cell antibodies, GAD glutamate decarboxylase

Characteristics	Number of patients (%)
Thyroid Ab pos.	13 (9)
Adrenal Ab pos.	10 (7)
Thyroid and adrenal Ab pos.	1
ICA pos.	11 (7)
GAD 65 Ab pos.	18 (12)
ICA and GAD 65 Ab pos.	2

Table 2 Frequency (n) of islet cell- and GAD 65 antibody-positive patients ($n=150$) according to sex, age at diagnosis, body mass index (BMI) and period of time until clinical insulin dependency occurred

	(n)	Sex*		Age (years) at diagnosis			BMI		Time to insulin dependency (years)**	
		Male	Female	30–40	41–50	51–60	Obese	Nonobese	≤2	>2
ICA positive	11	5	6	4	4	3	8	3	3	8
ICA negative	139	67	72	41	44	54	84	55	19	120
GAD 65 Ab positive**	18	4	14	6	3	9	10	8	7	11
GAD 65 Ab negative	132	68	64	39	45	48	83	49	15	17

* $P<0.05$; ** $P<0.01$

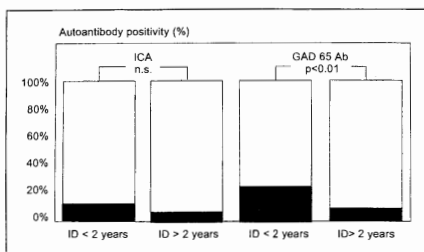


Fig. 1 Insulin dependency (ID) related to autoantibody positivity (GAD 65 Ab vs ICA)

were not significantly associated with thyroid antibody positivity.

GAD 65 antibodies

The frequency of GAD 65 antibody-positive patients according to age, sex, BMI and ICA status is shown in Table 2. At the time of diagnosis, GAD 65 antibody positivity was observed in 18 (12%) of 150 diabetic patients. No significant association was found between presence or absence GAD 65 antibodies and age at diagnosis. Obesity was also not significantly associated with GAD 65 antibody positivity. In contrast, a significant association was observed between GAD 65 antibody positivity and sex: GAD 65 antibodies were significantly more frequent in females than in males ($P<0.05$). In addition, individuals progressing to clinical insulin dependency within 2 years were significantly more frequently positive for autoantibodies to GAD 65 than those with a time to insulin dependency of more than 2 years ($P<0.01$). ICA did not show this association (Fig. 1, Table 2).

Discussion

It has been demonstrated in previous studies that the presence of ICA in diabetic patients initially treated with diet and/or hypoglycaemic agents is a useful predictor for subsequent insulin dependency in a subgroup of adult patients initially diagnosed as having type 2 diabetes [6, 12–14]. This fraction of diabetic patients tended to have a shorter duration of diabetes before the introduction of insulin treatment, lower BMI and subsequent deterioration of beta-cell function [6, 12, 15]. Patients who initially present with type 2 diabetes at diagnosis but subsequently progress to early insulin dependency appear to have many features of type 1 diabetes, including increased frequency of HLA-DR3 and DR4 [16–19] and other organ-specific autoantibodies [16]. This subgroup of patients has been described as suf-

fering from a so-called LADA, i.e. latent autoimmune diabetes in adults, characterized by GAD 65 antibody positivity and rapid progression to insulin dependency [10]. In contrast to previous studies on selected populations, we investigated unselected and consecutively recruited patients with the initial diagnosis of non-insulin-dependent diabetes mellitus. We demonstrated that GAD 65 antibody positivity was significantly associated ($P<0.01$) with rapid progression to insulin dependency. We found a higher prevalence of GAD 65 antibody positivity than in a previous study [20]. This could be explained by the different age distribution of patients. In contrast, ICA and BMI showed no significant association with early insulin dependency in this population, presenting with the initial diagnosis of type 2 diabetes according to WHO criteria. Furthermore, no relationship between ICA or GAD 65 antibodies and BMI could be determined. We observed, though, a higher frequency of GAD 65 autoantibodies in females than in males ($P<0.05$), but no statistically significant correlation could be found between sex and early insulin dependency. Other organ-specific antibodies (TG Ab, TPO Ab and adrenal autoantibodies) also appeared to have no significant association with early insulin dependency, GAD 65 or ICA antibody positivity, or BMI.

The results of the present study of 150 diabetic patients suggest that the early need for insulin treatment in diabetes presenting initially as type 2 is not necessarily related to secondary failure of diet and/or OHA therapy. In a subgroup of patients, beta-cell autoimmunity may be the most important factor in progressive deterioration in beta-cell function. In our hands, therefore, GAD 65 antibodies provide the best way to predict which patients with apparent type 2 diabetes mellitus at diagnosis will later need insulin treatment. The presence of GAD 65 antibodies is useful to identify a subgroup of latent type 1 diabetic patients within this group of apparent type 2 diabetic patients, reinforcing the concept of heterogeneity in type 2 diabetes [9, 10, 21–23].

In conclusion, determination of GAD 65 antibodies in patients with late-onset diabetes may contribute to the correct classification and adequate treatment of patients with onset of diabetes in adulthood.

Acknowledgements We are grateful to Dr. T. Dyrberg, Novo Nordisk, for the donation of cDNA encoding for human GAD 65. The expert technical assistance of Mrs. S. Scherer and Mr. M. Stein is acknowledged.

References

- Harris MI, Zimmet P (1992) Classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. In: Keen H, DeFronzo R, Alberti KGMM, Zimmet P (eds) *The international textbook of diabetes mellitus*. Wiley, London, pp 3–18
- Hother-Nielsen O, Faber O, Sorensen NS, Beck-Nielsen H (1988) Classification of newly diagnosed diabetic patients as insulin-requiring or non-insulin-requiring based on clinical and biochemical variables. *Diabetes Care* 11:531–537
- MacIver D, McNally P, Shaw D, Hearnshaw J (1988) Predicting future treatment of diabetes mellitus from characteristics available at presentation. *Diabetic Med* 5:766–770

4. Groop LC, Eriksson J, Ekstrand A, Franssila-Kallunki A, Saloranta C, Miettinen A (1991) Metabolic characteristics of autoimmune diabetes in adults. *Diabetologia* 34:46–51
5. Kobayashi T, Tamemoto K, Nakanishi K, Kato N, Okubo M, Kajio H (1993) Immunogenetic and clinical characterization of slowly progressive IDDM. *Diabetes Care* 16:780–788
6. Groop LC, Bottazzo GF, Doniach D (1986) Islet cell antibodies identify latent type I diabetes in patients aged 35–75 years at diagnosis. *Diabetes* 35:237–241
7. Kobayashi T, Itoh T, Kasaka K, Sato K, Tsuji K (1987) Time course of islet cell antibodies and b cell function in non-insulin-dependent stage of Type I diabetes. *Diabetes* 36:510–517
8. Gottsäter A, Landian-Olsson M, Fernlund P, Lernmark A, Sundkvist G (1993) b-cell function in relation to islet cell antibodies (ICA) during the first three years after the clinical diagnosis of diabetes in non-insulin-dependent (type II) diabetic patients. *Diabetes Care* 16:902–910
9. Tuomi T, Groop LC, Zimmet PZ, Rowley MJ, Knowles W, Mackay IR (1993) Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulin-dependent onset of disease. *Diabetes* 42:359–362
10. Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay IR, Rowley MJ, Knowles W, Cohen M (1994) Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabetic Med*: 299–303
11. Petersen JS, Hejnaes KR, Moody A, Karlsen AE, Marshall MO, Hoier-Madsen M (1994) Detection of GAD 65 antibodies in diabetes and other autoimmune disease using a simple radioligand assay. *Diabetes* 43:459–467
12. Irvine WJ, Gray RS, McCallum CJ, Duncan LJP (1977) Clinical and pathogenic significance of pancreatic-islet-cell antibodies in diabetes treated with oral hypoglycaemic agents. *Lancet* 1:1025–1027
13. Groop L, Pelkonen R, Roakmiej J, Bottazzo G, Doniach D (1986) Secondary failure treatment with oral antidiabetic agents in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes Care* 9:129–132
14. Irvine WJ, Sawers JSA, Feek CM, Prescott RJ, Duncan LJP (1979) The value of islet cell antibody in predicting secondary failure of oral hypoglycaemic agent therapy in diabetes mellitus. *J Clin Lab Immunol* 2:23–26
15. Gleichmann H, Zörcher B, Greulich B, Gries FA, Henrichs HR, Bertrams J (1984) Correlation of islet cell antibodies and HLA-DR phenotypes with diabetes mellitus in adults. *Diabetologia* 27:90–92
16. Groop LC, Miettinen A, Groop P, Meri S, Koskimies S, Bottazzo GF (1988) Organ-specific autoimmunity and HLA-DR antigens as markers for β -cell destruction in patients with type II diabetes. *Diabetes* 37:99–103
17. Rich SS, French LR, Sprafka JM (1993) HLA-associated susceptibility to Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the Wadena City Health Study. *Diabetologia* 36:234–238
18. DiMario U, Irvine WJ, Borsev DQ, Kyner JL, Weston J, Galfo C (1983) Immune abnormalities in diabetic patients not requiring insulin at diagnosis. *Diabetologia* 25:392–395
19. Irvine WJ, McCallum CJ, Gray RS, Cambell CJ, Duncan LJP, Farquhar JW (1977) Pancreatic islet cell antibodies in diabetes mellitus correlated with the duration and type of diabetes, coexistent autoimmune disease and HLA-type. *Diabetes* 26:138–147
20. Ninskanen LK, Tuomi T, Karjalainen J, Groop LC, Kusitupa MI (1995) GAD antibodies in NIDDM. *Diabetes care* 18:1557–1565
21. Hagopian WA, Karlsen AE, Gottsater A (1993) Quantitative assay using recombinant human islet glutamic acid decarboxylase (GAD 65) shows that 65 K autoantibody positivity at onset predicts diabetes type. *J Clin Invest* 91:368–374
22. Rowley MJ, Mackay IR, Chen Q-Y, Knowles WJ, Zimmet PZ (1992) Antibodies to glutamic acid decarboxylase discriminate major type of diabetes mellitus. *Diabetes* 41:548–551
23. Bottazzo GF, Cudworth AG, Moul AJ, Doniach D, Festenstein H (1978) Evidence for a primary autoimmune type of diabetes mellitus (type IB). *Br Med J* 2:1253–1255

ANNOUNCEMENT

Update of Research and Development in Diabetic Eye Disease 7th Meeting of the European Association for the Study of Diabetic Eye Complications (EASDEC)

Amsterdam, The Netherlands, 18–19 July 1997

Topics: Glycation, growth factors, cataract and diabetes; oral and poster free communications. Abstract must be submitted, before 15

February 1997, to: Prof. Francesco Bandello, Secretary EASDEC, Department of Ophthalmology, University of Ferrara, Arcispedale S. Anna, C. so Giovecca, 203, I-44100 Ferrara, Italy, Fax (39) 532 206338.

Information: Prof. B. C. P. Polak, MD, The Rotterdam Eye Hospital, P.O. Box 70030, 3000 LM Rotterdam, The Netherlands, Fax (31) 10 4017655

Anlage 4 Ausgewählte Publikationen ad 3.4

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

Jaeger C, Hering BJ, Hatziagelaki E, Federlin K, Bretzel RG (1999) Glutamic acid decarboxylase antibodies are more frequent than islet cell antibodies in islet transplanted IDDM patients and persist or occur despite immunosuppression. *J Mol Med* 77: 45-48

Jaeger C, Hering BJ, Dyrberg T, Federlin K, Bretzel RG (1996) Islet cell antibodies and GAD 65 antibodies in IDDM patients undergoing kidney and islet after kidney transplantation. *Transplantation* 62: 424-426

Jaeger C, Brendel MD, Hering BJ, Eckhard M, Federlin K, Bretzel RG (1998) IA-2 autoantibodies are only positive in association with GAD 65 and islet cell antibodies in islet transplanted IDDM patients. *Transpl Proc* 30: 659-660

Jaeger C, Brendel MD, Hering BJ, Eckhard M, Bretzel RG (1997) Progressive islet graft failure occurs significantly earlier in autoantibody positive than in autoantibody negative IDDM recipients of intrahepatic islet allografts. *Diabetes* 46: 1907-1910

Persistent GAD 65 Antibodies in Longstanding IDDM are not Associated with Residual Beta-Cell Function, Neuropathy or HLA-DR Status

C. Jaeger¹, J. Allendorfer¹, E. Hatziagelaki¹, T. Dyrberg², K. H. Bergis³, K. Federlin¹, R. G. Bretzel¹

¹ Third Medical Department and Policlinic, Justus Liebig University, Giessen, Germany

² Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark

³ Diabetes Clinic, Bad Mergentheim, Germany

Persistent humoral autoimmunity to the enzyme glutamic acid decarboxylase (GAD) has been described in a substantial proportion of patients with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) of long duration. The source of the stimulus for this autoimmune reactivity is still unknown. Because the GAD 65 isoform is mainly expressed in pancreatic beta-cells and in the nervous system we investigated in the present study of the largest number of well characterized patients with longstanding IDDM ($n = 105$; median duration: 21 years; range: 10–46 years) the presence of autoantibodies to GAD 65 and their relationship to a residual C-peptide response or peripheral and autonomic neuropathy. Additionally we studied the HLA-DR status relative to GAD 65 antibodies in 86 out of the 105 individuals. One hundred healthy control subjects and 100 recent onset IDDM patients were also studied for GAD 65 antibodies. GAD 65 antibodies were detected in a radioligand-binding-assay with recombinant human GAD 65 and were present in 32% of the long-term diabetic patients, 82% of the recent onset IDDM patients and in 3% of the healthy control subjects. A preserved C-peptide response to i.v. glucagon (*Hendriksen* criteria) was observed in 23% of the long-term IDDM patients. Autonomic neuropathy and peripheral neuropathy was identified using criteria based on both symptoms and formal testing giving a frequency of 67% vs 79%. The HLA specific DR 4/X was observed in 47% and HLA-DR 3/X in 22% of the long-term IDDM patients. Patients who were heterozygous for DR3/DR4 were found in 23% of the cases. GAD 65 antibodies were significantly less frequent in the long-term IDDM patients compared to recent onset IDDM ($p < 0.001$), and diabetes duration showed a significant negative correlation with GAD 65 antibody index levels ($r = 0.22$, $p < 0.01$). Interestingly, GAD 65 antibodies were not significantly correlated either with residual beta-cell function or neuropathy and no particular HLA-DR status was associated with persistent GAD 65 antibodies. In conclusion neither residual beta-cell function nor diabetic neuropathy or a certain HLA-DR specificity are exclusively associated with persistent autoimmunity directed to GAD 65 in longstanding IDDM. The stimulus for the persistent humoral immune response and its significance for the disease process and its complications remain to be established.

Key words: Glutamic Acid Decarboxylase Antibodies – Residual Beta-Cell Function – Diabetic Neuropathy – Longstanding IDDM – Humoral Autoimmunity

Introduction

Humoral autoimmunity directed towards islet cell antigens in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) has been studied extensively during the last decades. The first recognition of this phenomenon was the identification of islet cell antibodies (ICA) (1), followed by the definition of a variety of other antigens including insulin autoantibodies (IAA) (2). A major breakthrough was the identification of the former 64 kDa islet cell antigen as glutamic acid decarboxylase (GAD) (3) representing one of the major target antigens. If an autoimmune process is the major factor leading to the gradual reduction of the beta-cell mass, we would expect to find a correlation between the rate of decline in beta-cell function and the intensity of the autoimmune response over the years after diagnosis. Thus, in long-term IDDM patients, we would expect a low level of IDDM-specific autoimmunity. The proposed correlation between humoral autoimmunity and duration of diabetes is well established for islet cell antibodies (4,5). In contrast the reported prevalences of GAD 65 antibodies in long-term diabetic patient is unexpectedly high, e.g. 61% in an Asian population (5) or 63% in Australian IDDM patients (6). The stimulus for the persistent autoimmunity directed to GAD 65 is still unknown. The 65 kDa protein is the major isoform expressed in human pancreatic islets and the nervous tissue (7–10). This distribution prompted us to look for a link between GAD 65 antibodies and a preserved residual beta cell function or peripheral (PNP) vs. autonomic neuropathy (ANP) in 105 long-term diabetic patients with a median duration of 21 years (10–46 years). In order to define a residual beta cell function, we used the indirect *Hendriksen* criteria (11), peripheral and autonomic neuropathy was identified using criteria based on both symptoms and formal testing. Additionally, we studied the HLA-DR status relative to GAD 65 antibodies in 86 out of the 105 individuals. For the detection of GAD 65 antibodies we have also included in this study 100 healthy controls with

an age distribution similar to the study population and 100 recent onset diabetic patients.

Materials and Methods

Subjects

One hundred-five long-term diabetic patients were included in the study. The patients were recruited between 1992–1995 undergoing the regular screening program for the Giessen islet transplantation project. All of the protocols were approved by the Justus Liebig University ethical committee. Additional serum samples from one hundred healthy volunteers without a family history of IDDM (median age: 33 years, range: 18–55) and sera from one hundred recent-onset diabetic patients (median age: 21, range 13–28) were obtained at the time of diagnosis for detection of GAD 65 antibodies. The clinical characteristics are shown in Table 1.

Autoantibody assay and HLA typing

GAD 65 antibodies were detected in a radioligand GAD 65 Ab assay, using a tracer recombinant, *in vitro* translated, human islet (³⁵S)-methionin-labelled GAD 65 according to the protocol developed by *Petersen et al.* (12). Antibody levels are expressed as index values: GAD 65 antibody index = cpm [unknown sample] – cpm [neg. standard serum]/cpm [pos. standard serum] – cpm [neg. standard serum]. The cDNA encoding for human GAD 65 was generously donated by Novo Nordisk A/S, Denmark. The intra-assay variation of one medium-binding GAD 65 antibody-positive serum was 5% (n = 10) and the inter-assay variation was 10.1% (n = 9). The cut-off index level for GAD 65 antibody positivity was determined from 100 healthy control subjects showing an age distribution similar to the study population. Sera with GAD 65 antibody index values above the mean index plus two times the standard deviation were regarded as positive. All samples were tested in triplicate and the index calculated with the mean of triplicates. This assay has been evaluated in the IDW proficiency workshop series on standardization of GADA performing with 91% specificity and 86% sensitivity. HLAs were typed in 86 of the 105 individuals selected on the basis of availability for processing capacity in our Department of Immunohaematology and Blood Bank, JLU Giessen according to a standardized protocol. There were no differences in the clinical characteristics between the 86 HLA typed subjects and the remaining 19 individuals, without. HLA typing was performed by a standard microcytotoxicity test (13).

Assessment of residual beta-cell function

We defined the presence of residual beta-cell function depending on a positive C-peptide response after i.v. injection of 1 mg of glucagon according to *Hendriksen's* criteria (11). That is, IDDM patients, whose increase of serum C-peptide (Δ C-peptide) during the i.v. glucagon test exceeded a 10.2% increase (three times value of the intraassay coefficient of variation at low concentrations of C-peptide) from the mean baseline C-peptide levels in the long-term IDDM patients, were regarded as positive for a C-peptide response (CPR). C-peptide levels were measured baseline and 6 minutes after stimulation following i.v. injection of 1 mg of glucagon. The assay was performed in cases where fasting blood glucose did not exceed the range of 80–160 mg/dl. The assay used was a sensitive C-peptide-RIA (¹²⁵I) incubated overnight, competition analysis and PEG-separation (H. Biermann GmbH, Diagnostic Products Corporation, Bad Nauheim, Germany). The detection limit of the assay is 0.05 ng/ml, the intra-assay variation at low concentrations is 3.4% and the inter-assay variation at low concentration is 10.0%.

Assessment of neuropathy (ANP vs PNP)

Autonomic vs. peripheral neuropathy was assessed according to a standardized protocol performed routinely in our department. Briefly, the protocol is based both on symptoms and formal testing as described previously by *Ziegler et al.* (14). For autonomic neuropathy (ANP) the following symptoms were recorded: diabetic diarrhea, vomiting due to gastroparesis, gustatory sweating, bladder paresis and postural hypotension. The formal testing for small-fiber ANP included standard cardiovascular tests of heart rate variability, heart rate increase on standing at 15 s, Valsalva ratio and postural systolic blood pressure decrease on standing (14). The analysis was made on an automated system integrated with a personal computer. Autonomic neuropathy was assumed in case of 3 out of 5 positive tests. Peripheral neuropathy (PNP) was assessed by clinical and neurological examination, including ankle reflexes and presence of neuropathic foot ulcers together with recording of the vibration sensory thresholds and the thermal sensory thresholds. The results were scored and evaluated for clinical purposes on a dichotomic basis as ANS and/or PNP present or not by comparison with an age-corrected healthy control population.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS software. *Fisher's* exact test (two-tailed) was used to determine statistical significance of differences between group frequencies. *Wilcoxon*

Parameter	recent-onset IDDM patients (n = 100)	long-term IDDM patients (n = 105)	healthy controls (n = 100)
Age			
Median (years)	21	36	33
Range (years)	13–28	20–60	18–55
Duration of Diabetes			
Median (years)	r.o.	21	–
Range (years)	r.o.	10–46	–
Sex (M/F)	56/44	48/57	53/47

Table 1 Clinical characteristics of the study population; r.o., recent onset.

Scores (Rank Sums) were applied where appropriate. The relationship between GAD 65 antibody index levels and numerical parameters was evaluated using the Spearman correlation test. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

GAD 65 antibodies in normal controls and in diabetic patients

The prevalence of GAD 65 antibodies in the healthy control population was 3%, identifying 3 out of 100 healthy subjects, all with very low GAD 65 antibody index levels, one of them within the third standard deviation. Among the recent onset diabetic patients there was a significantly higher prevalence of GAD 65 antibodies than in patients with longstanding IDDM (79% and 32% respectively, $p < 0.001$). Index levels of the GAD 65 antibody positive individuals were also significantly higher ($p < 0.001$) among the recent-onset diabetic patients compared with long-term IDDM patients (Fig. 1).

Relationship between GAD 65 antibodies and diabetes duration

The median duration of diabetes in the group of long-term IDDM patients was 21 years (range: 10–46 years). In the group of long-term IDDM patients there was a significant ($r = 0.22$; $p < 0.01$) negative correlation between the index levels of GAD 65 antibodies and diabetes duration (Fig. 2). The age at onset was not significantly associated with persistent GAD 65 antibodies.

GAD 65 antibodies in relation to residual beta-cell function

A positive CPR response following i. v. stimulation with 1 mg of glucagon was found in 23% of the patients (24/105). The frequency of GAD 65 antibodies in long-term diabetic patients who were positive for CPR is shown in Table 2. Among the CPR-positive patients ($n = 24$), 9 were positive for GAD 65 antibodies, whereas, in the group of CPR-negative patients ($n = 81$), 25 of the individuals were GAD 65 antibody positive. There was no significant difference in the distribution of GAD 65 antibodies with regard to residual beta cell function. Further-

more the GAD 65 antibody index levels also were not significantly different related to positive or negative C-peptide response (Table 2).

GAD 65 antibodies in relation to HLA-DR status

In our study population the HLA specificity DR 4/X was observed in 47% and HLA-DR 3/X in 22%. Patients who were heterozygous for DR3/DR4 were found in 23% of the cases. The frequency of GAD 65 antibodies in patients who were positive or negative for a certain HLA-DR antigen is shown in Table 2. GAD 65 antibody positivity and index levels did not differ significantly between patients with certain HLA-DR antigens (Table 2).

Relationship between GAD 65 antibodies and neuropathy

Autonomic neuropathy was diagnosed in 67% (70/105) of the long-term diabetic patients and peripheral neuropathy was observed in 79% (83/105) of the patients. Combined ANP and PNP was found in 63% (66/105). This high percentage of ANP and PNP in our study population is due to our patient recruitment and screening procedure for possible islet transplantation. In the diabetic patients with long-term IDDM, no association was found between GAD 65 antibody positivity and the presence of autonomic and/or peripheral neuropathy (Table 2).

Relationship between residual beta-cell function and duration of diabetes

According to our definition of residual beta-cell function, we observed a positive CPR in 23% of the long-term IDDM patients after a median duration of diabetes of 21 years (range: 10–46 years). Subgrouped into decades after the onset of diabetes, we observed a positive CPR in 32% of the long-term IDDM patients within the first ten years after diagnosis, 25% were still CPR-positive 11–20 years after the onset of disease. In the next decades we observed a positive C-peptide response according to the Hendriksen criteria in 20% and 16% of the case, respectively.

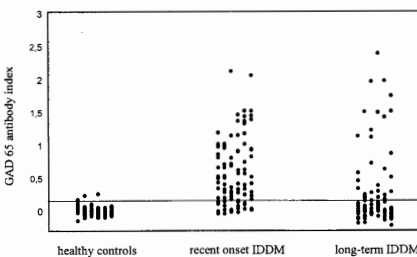


Fig. 1 GAD 65 antibody index levels in healthy controls ($n = 100$), recent-onset IDDM patients ($n = 100$) and patients with long-term IDDM ($n = 105$). Significantly different frequencies ($p < 0.001$) and index levels ($p < 0.001$) between recent-onset and long-term IDDM patients. The dashed line indicates upper limit of normal range of 100 healthy controls without a family history of IDDM (mean plus two times the standard deviation).

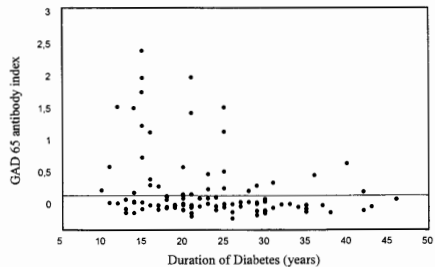


Fig. 2 Significant negative correlation ($r = 0.22$, $p < 0.01$) between diabetes duration (years) and GAD 65 antibody index levels. Horizontal bar represents upper limit of normal range (mean plus two times the standard deviation of 100 healthy controls without a family history of IDDM).

Table 2 Prevalence of GAD 65 antibodies (GAD 65 Ab) in long-term IDDM patients (n = 105) classified according to residual C-peptide response (CPR) to i. v. glucagon and peripheral (PNP) vs. autonomic (ANP) neuropathy.

	n (%)	CPR		PNP pos.	Neuropathy		ANP neg.
		Responder	Nonresponder		PNP neg.	ANP pos.	
Total subjects	105	24 (23)	81 (77)	83 (79)	22 (21)	70 (67)	35 (33)
GAD 65 Ab pos.	34 (32)	9	25	27	7	25	9
GAD 65 Ab neg.	71 (68)	15	56	56	15	45	26

Data are n (%). No significant differences were observed.

Table 3 Prevalence of GAD 65 antibodies in long-term IDDM patients (n = 86) classified according to the HLA-DR phenotype of the patients.

	n (%)	HLA-DR type			
		DR3/X	DR4/X	DR3/4	DRX/X
Total subjects	86	19 (22)	40 (47)	20 (23)	7 (8)
GAD 65 Ab pos.	28 (33)	5	13	6	4
GAD 65 AB neg.	58 (67)	14	27	14	3

Data are n (%). X is an HLA-DR antigen other than DR3 or DR4. No significant differences were observed.

Discussion

The prevalence of GAD 65 antibodies in an Asian population of IDDM patients with a disease duration of 3–28 years has been reported to be 61% (5). In Australian IDDM patients with long-term IDDM, Rowley et al. described GAD 65 antibody positivity in 63% of the patients (6). To our knowledge, the present study is the largest reported up to now, and in contrast to the previous observations, we could not confirm the high GAD 65 antibody prevalences, but found only 32% positive for GAD 65 antibodies after a median duration of 21 years. This difference is possibly due to the very expanded range of diabetes from 10–46 years in the present study. In support of this theory diabetes duration was negatively correlated with GAD 65 antibody frequency and index levels, indicating that there is a decline in GAD 65 antibody positivity over time. Interestingly, Seissler et al. have demonstrated a similar frequency of GAD 65 antibodies (25%, 8/32) in a small group of patients of the same geographical region (Germany) after a diabetes duration of more than ten years (15). This possibly indicates that ethnic differences may also play a role as previously suggested (16). Since we found the frequency of GAD 65 antibodies to be 82% in recent onset IDDM patients, it seems unlikely that a low sensitivity of the assay is the reason for the lower prevalence of GAD 65 antibodies in our study population of longstanding IDDM patients.

The relatively high frequency of GAD 65 antibodies in long-term IDDM patients compared to other autoantibodies, such as islet cell antibodies, raises the question about the nature and the source of the inciting stimulus for humoral autoimmunity directed to GAD 65 in long-term IDDM. The persistent GAD 65 antibody production must rely on a continuous antigenic stimulation. Beside the nervous system, the 65 kDa isoform of the enzyme glutamic acid decarboxylase is expressed mainly in the pancreatic islet cells (7–10). It is conceivable

that a surviving small number of beta cells can provide the antigenic stimulus to the production of islet specific autoantibodies, even in long-term IDDM. Determination of the C-peptide concentration before and after stimulation with glucagon has been found to reflect beta cell function quantitatively. Hendrikson et al. described a good correlation between the C-peptide response to stimulation with glucagon compared to a standardized meal and defined criteria to assess residual beta-cell function even in long-term IDDM patients (11). We observed a positive C-peptide response in 23% of the cases, which is a lower prevalence than in the previous study by Hendrikson et al. (11) who found a positive CPR in 42% of the cases after a mean disease duration of 12 years. Nakanishi et al. described a positive CPR of 66% after a mean duration of 9 years using modified criteria (17). Comparing the duration of IDDM in the former studies with the median duration of 21 years in the present study, our results appear to be in accordance with the previous investigations. Most striking, we could not find any correlation between GAD 65 antibody generation and residual beta-cell function. In this study GAD 65 antibody frequency and index levels did not differ significantly in patients with a positive or negative CPR in the i. v. glucagon test.

Since persistent GAD 65 autoantibodies cannot be explained by a preserved beta-cell function, we and others have speculated that persistent autoimmunity to GAD may result from extra-pancreatic expression of the molecule. GAD is abundant in nervous structures including ganglia (18), making it an obvious candidate target of autoaggression in IDDM patients. The preliminary report by Kaufmann et al. provided an attractive hypothesis linking autoimmunity directed to GAD with diabetic neuropathy and a Coxsackie B4 virus infection (19), but a recent study clearly showed a lack of relationship between GAD 65 antibodies and autonomic neuropathy (20). These findings have been confirmed by other investigators (21,22) and reflect exactly the results of the present study. Thus, there is no significant difference in frequency or index levels between the patients with or without ANP and/or PNP.

Because there was no link between persistent GAD 65 autoantibodies and either residual beta-cell function or neuropathy, we further addressed the question whether persistent autoimmunity to GAD is associated with certain HLA-DR antigens. The high frequency of DR3 and/or DR4 haplotypes in our population of long-term IDDM patients is in accordance with observations in other European diabetic populations (23). A recent study has suggested control of the humoral response on IDDM by HLA class II genes. GAD 65 antibodies were less frequent in DR4 subjects, ICA were not associated with particular HLA DR or DQ alleles (24). Serjeantson et al. reported similar GAD 65 antibody frequencies in Australian DR3 and DR4 subjects, but

found a higher prevalence of GAD 65 antibodies in DR3/DR4 subjects than in those with one antigen other than DR3 or DR4 (25). In the present study of long-term IDDM patients we could not find any differences in the distribution of certain HLA DR specificities related to GAD 65 antibody prevalence or index levels. However, this must be evaluated on the background of the limited number of subjects typed in the present study (n = 86) subgrouped by a relatively low GAD 65 antibody prevalence in long-term IDDM patients.

We conclude that there is no correlation between humoral autoimmunity to GAD 65 and diabetic neuropathy. Furthermore, the persistence of GAD 65 antibodies is independent of residual beta-cell function and expression of specific HLA alleles. The nature of the stimulus responsible for the persistence of these autoantibodies in long-term IDDM and its significance for the natural history of the disease remains to be characterized.

Acknowledgements

The authors express sincerest gratitude to the following, whose contributions were essential to this research: *Michael Stein*, technician, for technical assistance; *Ursula Mueller*, technician, for performing the tests on neuropathy; *Ralf Grossmann*, medical student, for assistance with recruitment and study of patients; Drs. *Christian Mueller-Eckhard*, *Gertrud Mueller-Eckhard* and *Anne Lattermann*, Department of Immunohaematology and Blood Bank, for HLA-typing of IDDM patients.

References

- Bottazzo, G. F., A. Florin-Christensen, D. Doniach: Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 2: 1279–1282 (1974)
- Palmer, J. P., C. P. Asplin, P. Clemons, K. Lyen, O. Tatpati, P. K. Rahu, T. L. Paquette: Insulin antibodies in insulin-dependent diabetes before insulin treatment. *Science* 222: 1337–1339 (1983)
- Baekkeskov, S., H. J. Aanstoot, S. Christgau, A. Reetz, M. Solimena, M. Cascalho, F. Folli, H. Richter-Olesen, P. DeCamilli: Identification of the 64 kDa autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347: 151–156 (1990)
- Irvine, W. J., C. J. McCallum, R. S. Gray, G. J. Cambell, L. P. J. Duncan, J. W. Farquhar, H. Vaughan, P. J. Morris: Pancreatic islet cell antibodies in diabetes mellitus correlated with the duration and type of diabetes, co-existent autoimmune disease, and HLA-type. *Diabetes* 26: 138–147 (1977)
- Kawasaki, E., H. Takino, M. Yano, S. Uotani, K. Matsumoto, Y. Yamaguchi, S. Akazawa, S. Nagataki: Evaluation of islet specific autoantibodies in Japanese patients with insulin-dependent diabetes mellitus: A comparison between autoantibodies to glutamic acid decarboxylase, autoantibodies to 64 kDa islet cell protein and islet cell antibodies. *J. Autoimmun.* 7: 791–802 (1994)
- Rollew, M. J., J. R. Mackay, Q. Y. Chen, W. J. Knowles, P. Z. Zimmet: Antibodies to glutamic acid decarboxylase discriminate major types of diabetes mellitus. *Diabetes* 41: 548–551 (1992)
- Christgau, S., H. J. Aanstoot, H. Schierbeck, K. Begley, S. Tullin, K. Hejnaes, S. Baekkeskov: Membrane anchoring of the autoantigen GAD 65 to microvesicles in pancreatic beta-cells by palmitoylation in the NH2-terminal domain. *J. Cell Biol.* 118: 309–314 (1992)
- Christgau, S., H. Schierbeck, L. Aanstoot, L. Aargaard, K. Begley, H. Kofod, K. Hejnaes, S. Baekkeskov: Pancreatic beta cells express two autoantigenic forms of glutamic acid decarboxylase, a 65 kDa hydrophilic and a 64 kDa amphiphilic form which can be both membrane bound and soluble. *J. Biol. Chem.* 266: 21257–21263 (1991)
- Tuomi, A., M. Solimena, M. Matteoli, F. Folli, K. Takei, P. DeCamilli: GABA and pancreatic beta cells: Colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion. *EMBO J.* 10: 1275–1284 (1991)
- Sorenson, R. L., D. G. Garry, T. C. Brelje: Structural and functional considerations of GABA in islets of Langerhans, beta cells and nerves. *Diabetes* 40: 1365–1374 (1991)
- Hendriksen, C., O. K. Faber, J. Drejer, C. Binder: Prevalence of residual beta cell function in insulin treated diabetics evaluated by the plasma C-peptide response to intravenous glucagon. *Diabetologia* 13: 615–619 (1977)
- Petersen, J. S., K. R. Hejnaes, A. Moody, A. E. Karlens, M. O. Marshall, M. Hoier-Madsen, E. Boel, B. K. Michelsen, T. Dyrberg: Detection of GAD 65 antibodies in diabetes and other autoimmune diseases using a simple radioligand assay. *Diabetes* 43: 459–467 (1994)
- Terasaki, P. E., D. Bernoco, M. S. Park, G. Ozturk, Y. Iwai: Microproduct testing for HLA-A, HLA-B, HLA-C, and HLA-D antigens. *Am. J. Clin. Pathol.* 69: 103–120 (1978)
- Ziegler, D., I. Cizmci, K. Wiefels, H. Berger, F. A. Gries: Peripheral and autonomic nerve function in long-term insulin-dependent diabetes. *Diab. Res.* 4: 9–14 (1987)
- Seissler, J., J. Amann, L. Mauch, H. Haubruck, S. Wolfahrt, S. Bieg, W. Richter, R. Holl, E. Heinze, W. Norhtemann, W. A. Scherbaum: Prevalence of autoantibodies to the 65- and 67-kD isoforms of glutamic acid decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 92: 1394–1399 (1993)
- Zimmet, P. Z., M. J. Rowley, J. R. Machay, J. Knowles, Q. Y. Chen, H. Chapman, S. W. Sergeantson: The ethnic distribution of antibodies to glutamic acid decarboxylase: presence and levels in insulin-dependent diabetes mellitus in European and Asian subjects. *J. Diab. Comp.* 7: 1–7 (1993)
- Nakanishi, K., T. Kobayashi, H. Miyashita, M. Ohkubo, T. Sugimoto, T. Murase, K. Kosaka, K. Inouye, M. Kono: Relationship among islet cell antibodies, residual beta cell function, and metabolic control in patients with insulin-dependent diabetes mellitus of long duration: Use of a sensitive C-peptide radioimmunoassay. *Metabolism* 39: 925–930 (1990)
- Erdo, S. L., J. R. Wolff: Gamma-aminobutyric acid outside the mammalian brain. *J. Neurochem.* 54: 363–372 (1990)
- Kaufmann, D. L., M. G. Erlander, M. Clare-Salzier, M. A. Atkinson, N. K. Maclaren, A. J. Tobin: Autoimmunity of two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 89: 283–292 (1992)
- Zanone, M. M., J. S. Petersen, M. Peakman, C. J. Mathias, P. J. Watkins, T. Dyrberg, D. Vergani: High prevalence of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in long-standing IDDM is not a marker of symptomatic autonomic neuropathy. *Diabetes* 43: 1146–1151 (1994)
- Roll, U., A. Nuber, A. Schröder, E. Gerlach, H. U. Janka, A. G. Ziegler: No association of antibodies of glutamic acid decarboxylase (GAD) and diabetic complications in patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetes Care* 18: 210–215 (1995)
- Sundkvist, G., L. A. Velloso, O. Kämppe, S. L. Rabinow, S. A. Ivarsson, B. Lija, F. A. Karlsson: Glutamic acid decarboxylase antibodies, autonomic nerve antibodies and autonomic neuropathy in diabetic patients. *Diabetologia* 37: 293–299 (1994)
- Cudworth, A. G., G. F. Bottazzo, D. Doniach: Genetic and immunological factors in type 1 diabetes. In: Irvine W. J., (ed.): *Immunology of Diabetes*. Teviot, Edinburgh (1981) 67–101
- Delamare, M., J. Timsit, S. Caillaud-Zucman, D. Maugendre, H. Roussety, G. Semana, A. M. Yamamoto, P. van Endert, C. Boitard, B. Genetet, J. F. Bach: HLA-associated heterogeneity of the humoral response to islet antigens in insulin-dependent diabetes. *J. Autoimmun.* 8: 645–657 (1995)

²⁵ *Serjeantson, S. W., M. R. J. Kohonen-Corish, M. J. Rowley, I. R. Mackay, W. Knowles, P. Zimmet*: Antibodies to glutamic acid decarboxylase are associated with HLA-DR genotypes in both Australians and Asians with type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 35: 996–1001 (1992)

Requests for reprints should be addressed to:

Clemens Jaeger, MD
Third Medical Department and Policlinic
Justus Liebig University
Rodthohl 6
D-35385 Giessen
Germany

C. Jaeger · B.J. Hering · E. Hatzigelaki · K. Federlin
R.G. Bretzel

Glutamic acid decarboxylase antibodies are more frequent than islet cell antibodies in islet transplanted IDDM patients and persist or occur despite immunosuppression

Abstract Pancreatic islet grafts transplanted into patients with autoimmune diabetes are potentially threatened by two immune responses, allograft rejection and the recurrence of autoimmune insulinitis. In the present study we investigated the humoral autoimmune response directed to islet autoantigens by studying islet cell antibodies and glutamic acid decarboxylase (GAD 65) antibodies in twenty-one insulin-dependent diabetes-mellitus (IDDM) patients undergoing intraportal islet allotransplantation. Islet transplantation was performed according to the following recipient categories: Islet after kidney transplantation ($n=10$), simultaneous islet and kidney transplantation ($n=6$) and islet transplant alone ($n=5$). GAD 65 antibodies were detected in a radioligand GAD 65 antibody assay using recombinant, in vitro translated, human ^{35}S -methionin labelled GAD 65 as tracer. Islet cell antibodies were determined by indirect immunofluorescence technique on human pancreas. In six out of twenty-one patients we observed GAD 65 antibodies before islet transplantation and the GAD 65 antibodies persisted despite immunosuppression. In contrast only two subjects were concordantly islet cell antibody positive and the titre decreased post transplantation. In addition we observed occurrence of GAD 65 antibodies in five subjects that were shown to be antibody negative before islet transplantation with three of them subsequently becoming positive for islet cell antibodies. The remaining ten patients were GAD 65 antibody and islet cell antibody negative before islet transplantation and remained negative thereafter. Interestingly none of the patients was exclusively positive for islet cell antibodies without being positive for GAD 65 antibodies. In summary we have demonstrated in twenty-one islet grafted individuals that humoral autoimmunity to islet antigens can persist or occur despite immunosuppression. Islet cell antibodies appear to be less frequent (5 out of 21, 23%) compared to GAD 65 antibodies (11 out of 21, 52%) suggesting that they are more affected by immunosuppressive therapy. We conclude that GAD 65 antibodies are a useful tool to further evaluate a possible link between persistent

autoimmunity and early or late graft failure after islet transplantation.

Key words Islet transplantation · Disease recurrence · GAD 65 antibodies · Islet cell antibodies · Autoimmunity

Abbreviations IDDM Insulin dependent diabetes mellitus · ICA Islet cell antibodies · GAD 65 Ab Glutamic acid decarboxylase antibodies · ITX Islet transplantation · ITA Islet transplant alone · SIK Simultaneous islet and kidney transplantation · IAK Islet after kidney transplantation

Introduction

Beside allograft rejection transplanted islets can be destroyed by the recurrence of beta cell autoimmunity present in IDDM patients and turning towards the islet graft after transplantation. The potential threat of recurrent autoimmune insulinitis to the islet graft has first been shown in spontaneously diabetic animals under conditions that apparently exclude allograft rejection [1–4].

In the clinical situation it has also been demonstrated that recurrent autoimmunity is a risk in twin to twin human pancreatic grafts unless immunosuppressive therapy is used [5]. Recent observations have created several lines of evidence that both in pancreatic transplantation and islet transplantation recurrent autoimmunity must be considered as a relevant factor in graft failure [6, 7].

In our own series of clinical islet transplantations we were able to demonstrate persistence and occurrence of humoral autoimmunity in kidney and islet after kidney transplanted longterm IDDM patients receiving sustained immunosuppressive therapy. Furthermore these data suggested that the presence of GAD 65 antibodies may adversely affect islet graft function [8].

At present no markers are available to either identify individuals at risk for developing recurrent autoimmune insulinitis or monitor after clinical islet transplantation. Since autoantibodies are well established in the prediabetic period to identify beta-cell directed autoimmunity at an early stage [9] we investigated in the present study the frequency, levels and time course of islet cell antibodies and

C. Jaeger (✉) · B.J. Hering · E. Hatzigelaki · K. Federlin · R.G. Bretzel
Third Medical Department and Policlinic,
Rodthohl 6, D-35385 Giessen, Germany

GAD 65 antibodies in 21 immunosuppressed IDDM patients before and after intraportal islet transplantation. The influence of different combinations of immunosuppressive agents on the humoral autoimmune response due to three different recipient categories was assessed.

Materials and methods

Subjects in this study were IDDM patients participating in the Giessen islet transplantation project. All of the protocols were approved by the Justus-Liebig-University ethical committee, all subjects gave written informed consent before participation. A total of twenty-one patients were included from three different recipient categories: Islet after kidney transplantation (IAK, $n=10$); simultaneous islet and kidney transplantation (SIK, $n=6$) and IDDM patients receiving an islet transplant alone (ITA, $n=5$).

Intraportal islet allografts were transplanted according to the Giessen protocol as described elsewhere [10]. In the group of patients receiving combined kidney and islet transplants immunosuppression was maintained by triple therapy (cyclosporine-A, steroids and azathioprine) in combination with an induction immunosuppression using anti-lymphocyte serum. The same regime was followed in islet transplant patients with a previously established kidney graft, but in some cases without administering azathioprine. Patients of the ITA group received no posttransplant steroids but combined immunosuppression with cyclosporine-A and a monoclonal anti-CD4 antibody.

In all cases at least one pretransplant serum sample was available for detection of islet cell antibodies (ICA) and glutamic acid decarboxylase antibodies (GAD 65 Ab) before islet transplantation. We then analyzed follow-up sera of the twenty-one recipients of intraportal islet allografts to investigate the time course of ICA and GAD 65 antibodies after islet transplantation. The median follow up time was 13 months (1–36) in the IAK group, 6.5 months (2–12) in the SIK group and 4.5 weeks (1.5–7.5) in the ITA group. The median duration of diabetes before islet transplantation was 25 years (12–38) in the IAK group, 22 years (15–38) in the SIK group and 22 years (14–33) in the patients of the ITA group.

GAD 65 antibodies were detected in a radioligand GAD 65 Ab assay, using as tracer recombinant, in vitro translated, human islet (^{35}S)-methionin-labelled GAD 65 according to the protocol developed by Petersen et al. [11]. Antibody levels are expressed as index values: GAD 65 antibody index = $\text{cpm}[\text{unknown sample}] - \text{cpm}[\text{neg. standard serum}] / \text{cpm}[\text{pos. standard serum}] - \text{cpm}[\text{neg. standard serum}]$. The cDNA encoding for human GAD 65 was generously donated by Novo Nordisk A/S, Denmark. The intra-assay variation of one medium-binding GAD 65 antibody-positive serum was 5.0% ($n=10$) and the inter-assay variation was 10.1% ($n=9$). The cut-off index level for GAD 65 antibody positivity was determined from 100 healthy control subjects. Sera with GAD 65 antibody index values above the mean index plus two times the standard deviation were regarded as positive. All samples were tested in triplicate and all samples of one patient were included in one GAD 65 antibody assay to avoid interassay variation.

Islet cell antibodies (ICA) were determined by indirect immunofluorescence technique using cryostat sections of human pancreas as substrate. This assay is regularly tested in the IDW proficiency workshop series on standardization of the ICA assay, performing with 100% sensitivity and 100% specificity. Titres have been converted to Juvenile Diabetes Foundation (JDF) units using a JDF standard reference serum. The detection limit of the assay is 5 JDF units. We considered 10 JDF as indicative of ICA positivity in this study. As for GAD 65 antibodies all samples were tested in triplicate and for avoidance of interassay variation the serum samples belonging to one patient were included in one ICA-assay.

Results

The time course of frequency and levels of GAD 65 antibodies are shown in the following figures. In the group of IDDM patients receiving an islet transplant alone (ITA) all 5 individuals were negative both for GAD 65 antibodies and ICAs before islet transplantation (Fig. 1). One patient became transiently positive for GAD 65 antibodies after islet transplantation (ITA 1), whereas, two individuals converted to permanent GAD 65 antibody positivity and one of them additionally became positive for ICAs with a maximum titre of 40 JDF units (ITA 3).

In the group of SIK patients 4 subjects were negative for ICAs and GAD 65 Abs before islet transplantation and remained negative thereafter (Fig. 2). Two individuals from the SIK group were highly positive for GAD 65 Abs and concordantly islet cell antibody positive before islet transplantation. In the one case (SIK 1) the maximum ICA titre was 10 JDF units, the other patient presented with 40 JDF units (SIK 2). In both cases the posttransplant follow

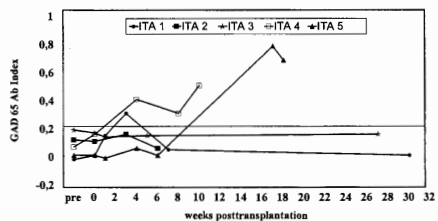


Fig. 1 GAD 65 antibody index levels in follow up sera of five IDDM patients receiving an islet transplant alone (ITA, $n=5$). Patients in this group received no posttransplant steroids but combined immunosuppression with cyclosporine-A and a monoclonal anti-CD4 antibody. The solid line indicates upper limit of normal range of 100 healthy controls (mean plus three times the standard deviation)

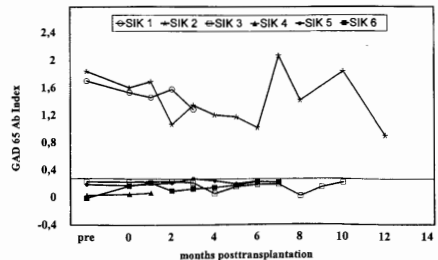


Fig. 2 GAD 65 antibody index levels in simultaneously islet and kidney transplanted IDDM patients (SIK, $n=6$). In this group of patients immunosuppression was maintained by triple therapy (cyclosporine-A, steroids and azathioprine) in combination with an induction immunosuppression using anti-lymphocyte serum. The solid line represents 3 SD above mean of 100 healthy individuals

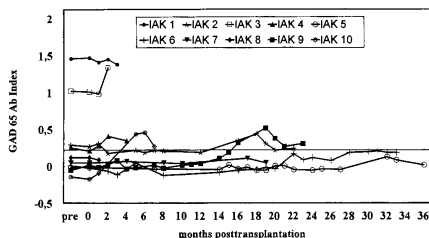


Fig. 3 Time course and levels of GAD 65 antibody index levels in islet after kidney transplanted IDDM patients (IAK, $n=10$). All patients in the IAK group received cyclosporine-A and steroids in combination with an induction immunosuppression by anti-lymphocyte serum, in some cases azathioprine was used in addition. The horizontal bar represents the upper limit of normal range (mean plus three times the standard deviation of 100 healthy controls)

up showed persistent GAD 65 Abs, whereas, the ICA titre decreased and finally the ICAs disappeared.

In the largest group we studied IDDM patients with a previously established kidney graft receiving islet after kidney transplantation (IAK). Four patients remained negative for both GAD 65 antibodies and ICAs throughout the whole observation period (Fig. 3). In contrast two individuals converted to posttransplant GAD 65 antibody positivity, both subsequently becoming positive for ICAs (IAK 9 & IAK 10). In the case of IAK 9 the maximum ICA titre was 20 JDF units and in the case of IAK 10 the ICA titre reached 10 JDF units. The remaining 4 individuals were GAD 65 antibody positive before islet transplantation and showed persistent GAD 65 antibodies, all being negative for ICAs.

Taken together glutamic acid decarboxylase (GAD 65) antibodies were observed in 6 out of 21 patients before islet transplantation and the GAD 65 antibodies persisted despite immunosuppression. In contrast, only two subjects were islet cell antibody positive before islet transplantation and the titre decreased post transplantation. Both subjects were from the latter group of GAD 65 antibody positive patients. In addition posttransplant seroconversion to GAD 65 antibody positivity was observed in five subjects that were shown to be GAD 65 antibody negative before islet transplantation. Three of them subsequently became also positive for islet cell antibodies. The remaining ten patients were GAD 65 antibody and islet cell antibody negative before islet transplantation and remained negative thereafter. None of the patients was exclusively positive for ICAs without being positive for GAD 65 antibodies.

Discussion

In patients with diseases that are believed to have an autoimmune origin successful transplantation of the target organ is hampered theoretically by the barriers of recurrent autoimmunity beside allojection of transplanted tissue

from a genetically different individual. The impact of recurrent autoimmunity for IDDM patients treated either by pancreatic transplantation or islet transplantation has not yet been fully elucidated.

Since the report of Sibley et al. in 1985 it has been accepted in the case of identical twin pancreatic transplants that recurrent autoimmune beta-cell destruction may occur in patients with insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) unless cyclosporine and azathioprine immunosuppression are used [5]. The dogma that immunosuppressive therapy required to prevent rejection is sufficient to prevent autoimmunity has been disputed for pancreatic transplants by the recent work of Tyden et al. demonstrating selective destruction of beta cells in two IDDM patients after pancreatic transplantation despite immunosuppression [6]. Interestingly one of these patients was islet cell antibody and GAD 65 antibody positive.

In human islet transplantation similar data had been shown for islets transplanted into the subcapsular compartment of the forearm muscle. The islets were lost presenting with the stigmata of autoimmune insulinitis while immunosuppressive therapy was maintained [7].

Taking into account the knowledge that comes from studies in prediabetic individuals it is not surprising that standard immunosuppressive therapy used to prevent alloimmunity is not sufficient to downregulate autoimmunity. Only a moderate effect is achievable by cyclosporine in prediabetic or recent onset IDDM patients [12, 13].

At present one major problem in islet transplantation is the inability to diagnose islet rejection or recurrent autoimmune destruction. As suggested by Eisenbarth both processes, i.e. alloimmunity plus autoimmunity, may contribute to islet graft failure [14]. Humoral markers, such as islet cell antibodies or GAD 65 antibodies may help to identify individuals with a high risk for recurrent autoimmunity prior to islet transplantation. Furthermore autoantibodies may be useful in posttransplant monitoring of the immune attack directed to the islet graft.

For humoral autoimmunity studies in recent onset type I diabetic individuals have shown that cyclosporine did not decrease the prevalence of GAD 65 antibodies or the GAD 65 antibody index level when administered in newly diagnosed IDDM patients [15]. By contrast, islet cell antibodies and insulin autoantibodies are reduced by cyclosporine [16–18]. We were able to confirm these findings in immunosuppressed kidney grafted and islet after kidney transplanted longterm IDDM patients. In a cross-sectional study of 30 kidney-grafted, long-term IDDM patients and 30 matched, nontransplanted IDDM controls, we observed a significant decrease in ICA positivity by standard immunosuppressive therapy, but not in frequency of index levels of GAD 65 antibodies. Furthermore the preliminary data from the islet after kidney transplanted patients ($n=7$) suggested that the presence of GAD 65 antibodies may adversely affect islet graft function [8].

The present longitudinal study was based on twenty-one islet transplanted individuals thus substantially extending our previous findings. Here we clearly demonstrate persistent GAD 65 antibodies in 6 out of 21 islet

transplanted patients (2/7 from the SIK and 4/10 from the IAK-group). GAD 65 antibodies were positive before islet transplantation and remained positive thereafter regardless of the immunosuppressive agents used. In addition we observed recurrent GAD 65 antibodies in 4 subjects that were shown to be antibody negative before transplantation despite maintenance of immunosuppression (3/5 from the ITA and 2/10 from the IAK-group).

The highest percentage of recurrent GAD 65 antibodies were found in the ITA-group of IDDM patients, who received a monoclonal anti-CD4 antibody in combination with cyclosporine. Cyclosporine predominantly inhibits T-cell-dependent immune responses [19, 20], together with a monoclonal anti-CD4 antibody one would predict that only minor T-cell reactivity is present in these patients. The high percentage of autoantibody formation might be the result of a predominant B-cell reactivity in this group.

It is unclear why there is a difference between islet cell antibody- and GAD 65 antibody formation depending on immunosuppressive therapy. In support of our previous data ICA were less frequent than GAD 65 antibodies. This finding is consistent with the observations in recent onset IDDM patients where ICA but not GAD 65 antibodies are downregulated by cyclosporine [15–17]. Nevertheless, in the present investigation the study population is heterogeneous with regard to the ITA individuals who are non-uremics and did not carry a kidney graft. We can not rule out the possibility that this might influence antibody formation.

In summary our findings clearly demonstrate that humoral autoimmunity directed to beta-cell antigens can persist or occur despite sustained immunosuppressive therapy in islet transplanted IDDM patients. Interestingly, none of the patients was exclusively positive for ICA without being also positive for GAD 65 antibodies. We conclude that GAD 65 antibodies are a useful tool to further evaluate a possible link between persistent autoimmunity and early or late graft failure after islet transplantation.

References

- Naji A, Silvers WK, Bellgrau D, Barker CF (1981) Spontaneous diabetes in rats: destruction of islets is prevented by immunologic tolerance. *Science* 213: 1390–1391
- Wöhrle M, Pullmann J, Bretzel RG, Federlin K (1992) Prevention of recurrent autoimmune diabetes in the BB rat by islet transplantation under the renal capsule. *Transplantation*: 1099–1102
- Bartlett ST, Hadley GA, Dirden B, Schweitzer EJ, Eans S, Pham D, Sheffield C (1993) Composite kidney-islet transplantation prevents recurrent autoimmune beta-cell destruction. *Surgery* 114: 211–217
- Bartlett ST, Chin T, Dirden B, Quereshi A, Hadley G (1995) Inclusion of peripancreatic lymph node cells prevents recurrent auto-immune destruction of islet transplants: evidence of donor chimerism. *Surgery* 118: 392–397
- Sibley RK, Sutherland DER, Goetz F, Michael AF (1985) Recurrent diabetes mellitus in the pancreas iso- and allograft; a light and electron microscopic and immunohistochemical analysis of four cases. *Lab Invest* 53: 132–144
- Tyden G, Reinhold FP, Sundkvist G, Bolinder J (1996) Recurrence of autoimmune diabetes mellitus in recipients of cadaveric pancreatic grafts. *N Engl J Med* 335: 860–863
- Stegall MD, Lafferty KJ, Kam I, Gill RG (1996) Evidence of recurrent autoimmunity in human allogenic islet transplantation. *Transplantation* 63: 1272–1274
- Jaeger C, Hering BJ, Dyrberg T, Federlin K, Bretzel RG (1996) Islet cell antibodies and glutamic acid decarboxylase antibodies in patients with insulin-dependent diabetes mellitus undergoing kidney and islet-after-kidney transplantation. *Transplantation* 62: 424–426
- Atkinson MA, MacLaren NK (1994) The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 331: 1428–1436
- Bretzel RG, Browatzki CC, Schultz A, Brandhorst H, Klitscher D, Bollen CC, Raptis G, Friemann S, Ernst W, Rau WS, Hering BJ (1993) Clinical islet transplantation – report of the islet transplant registry and the Giessen center experience. *Diab Stoffw* 2: 378–390
- Peterson JC, Hejnas KR, Moody A, Karlsen AE, Marshall MO, Hoier-Madsen M, Boel E, Michelsen B, Dyrberg T (1994) Detection of GAD 65 antibodies in diabetes and other autoimmune diseases using a simple radioligand assay. *Diabetes* 43: 459–467
- Bougeres PF, Landais P, Boisson C et al (1990) Limited duration of remission of insulin dependency in children with recent overt type1 diabetes treated with low-dose cyclosporine. *Diabetes* 39: 1264–1472
- Rakotoambinina B, Timsit J, Deschamps I et al (1995) Cyclosporine A does not delay insulin dependency in asymptomatic IDDM patients. *Diabetes Care* 18: 1487–1490
- Eisenbarth GS, Stegall M (1996) Islet and pancreatic transplantation – autoimmunity and alloimmunity. *N Engl J Med* 335: 888–889
- Peterson JS, Dyrberg T, Karlsen AE, Molvig J, Michelsen B, Nerup J, Mandrup-Poulsen T, and the Canadian-European Randomized Control Trial Group (1994) Glutamic acid decarboxylase (GAD 65) autoantibodies in prediction of b-cell function and remission in recent-onset IDDM after cyclosporin treatment. *Diabetes* 43: 1291–1296
- Mandrup-Poulsen T, Nerup J, Stiller CR, Marnar B, Bille G, Heinrichs D, Martell R, Dupre J, Keown PA, Jenner MR, Rodger NW, Wolfe B, Graffenried BV, Binder C (1985) Disappearance and reappearance of islet cell cytoplasmic antibodies in cyclosporin-treated insulin-dependent diabetics. *Lancet* 2: 599–602
- Mandrup-Poulsen T, Molvig J, Andersen HU, Helqvist S, Spinas GA, Munck M, the Canadian-European Randomized Control Trial Group (1990) Lack of predictive value of islet cell antibodies, insulin antibodies and HLA-DR phenotype for remission in cyclosporin-treated IDDM patients. *Diabetes* 39: 204–210
- Castano L, Boitard C, Bougeres PF (1988) Cyclosporine A suppresses insulin autoantibodies and heterologous insulin antibodies in type I diabetic children. *Diabetes* 37: 1049–1052
- Erlanger BE (1992) Do we know the site of action of cyclosporine? *Immunol Today* 13: 487–491
- Kang SO, Tsang W, Doll S, Scherle P, Ko HS, Tran AC, Lenardo MJ, Straudt LM (1992) Induction of the POU domain transcription factor Oct-2 during T-cell activation by cognate antigen. *Mol Cell Biol* 12: 3149–3154

ISLET CELL ANTIBODIES AND GLUTAMIC ACID DECARBOXYLASE ANTIBODIES IN PATIENTS WITH INSULIN-DEPENDENT DIABETES MELLITUS UNDERGOING KIDNEY AND ISLET-AFTER-KIDNEY TRANSPLANTATION¹

CLEMENS JAEGER,^{2,3} BERNHARD J. HERING,² THOMAS DYRBERG,⁴ KONRAD FEDERLIN,² AND REINHARD G. BRETZEL²

Third Medical Department and Policlinic, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany, and Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark

The humoral immune response to islet autoantigens, here defined by the presence of islet cell antibodies (ICA) and glutamic acid decarboxylase (GAD 65) antibodies, was studied in patients with long-term insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) receiving immunosuppressive therapy following kidney and islet-after-kidney transplantation. In a cross-sectional study of 30 kidney-grafted, long-term IDDM patients and 30 matched, nontransplanted IDDM controls, we observed a significant ($P < 0.05$) decrease in ICA positivity by standard immunosuppressive therapy, but not in frequency or index levels of GAD 65 antibodies. Because of this intriguing finding, we investigated, in a pilot study on seven islet-after-kidney transplant recipients, the time course of frequency and levels of ICAs and GAD 65 antibodies relative to islet graft function. Stable islet graft function was seen in the patients with low GAD 65 antibody index levels, whereas rapid islet graft failure occurred in a patient with high GAD 65 antibody index levels prior to transplantation. In addition, GAD 65 autoimmunity reoccurred in one pretransplant antibody-negative patient 2 months after graft failure was noted. In conclusion, these observations suggest that β -cell autoimmunity directed to GAD 65 can persist despite immunosuppressive therapy and may adversely affect islet graft function, possibly indicating disease recurrence as a major threat to successful clinical islet transplantation.

Recurrent autoimmune insulinitis may contribute to graft failure after islet transplantation. Recurrence of β -cell autoimmunity directed to transplanted β -cells was first identified and characterized in spontaneously diabetic BB rats by Naji and co-workers (1) and subsequently demonstrated in non-immunosuppressed patients with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM*) who had received pancreas grafts from identical twins (2). In autoimmune diabetic BB rats, it has been shown that recurrent autoimmune destruction occurs in transplanted isolated islets even in the presence of cyclosporine, in contrast to uniformly successful vascularized whole-

pancreas transplants (3). A more recent correspondence showed that inclusion of peripancreatic lymph node cells with the islet graft protects the islets from recurrent auto-immune destruction, which leads to the conclusion that auto-immune diabetic BB rat recipients of whole-pancreas or islets plus lymph node cell transplants become chimeric for a donor T-cell population that prevents recurrent autoimmune diabetes (4). In the last few years, the majority of islet transplantations in humans has been performed simultaneously with the transplantation of other organs or as islet-after-kidney (IAK) transplantation in long-term IDDM patients where immunosuppressive therapy was already present (5). The aim of this study was to address the question of whether disease recurrence plays a role in graft failure after clinical islet transplantation in the presence of immunosuppressive therapy (IAK). We first looked for evidence of diabetes-associated autoimmunity, here defined by the presence of islet cell antibodies (ICA) and glutamic acid decarboxylase (GAD 65) antibodies, in a cross-sectional study of 30 long-term IDDM patients receiving immunosuppressive therapy compared with 30 nontransplanted IDDM controls without immunosuppression, matched for age, sex, and duration of diabetes. The clinical characteristics of both groups are shown in Table 1. We then examined, in a longitudinal pilot study, the time course of frequency and levels of ICAs and GAD 65 antibodies using serum follow-up samples of seven individuals undergoing IAK transplantation.

Subjects in this study were long-term IDDM patients who had participated in the Giessen islet transplantation project. All of the protocols were approved by the Justus Liebig University ethical committee, and all subjects gave written informed consent before participation. Serum samples of 100 healthy controls were included to determine the cutoff index level for our GAD 65 antibody assay. GAD 65 antibodies were detected in a

TABLE 1. Clinical characteristics of 30 IDDM patients undergoing immunosuppression after kidney transplantation and 30 matched control IDDM subjects

	IDDM patients on immunosuppressive therapy (n=30)	Matched, nontransplanted controls (n=30)
Age (yr)	43 ± 8.8	41 ± 8.6
Sex (M/F)	22/18	19/11
Duration of diabetes (yr)	29 ± 7.6	28 ± 7.5
Immunosuppressive therapy	30/30 CsA and steroids, 12/30 azathioprine in addition	None

¹ This work was presented in part at the 31st annual meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD), September 12–16, 1995, Stockholm, Sweden.

² Third Medical Department and Policlinic, Justus-Liebig-University.

³ Address correspondence to: Clemens Jaeger, MD, Third Medical Department and Policlinic, Justus-Liebig-University, Rodthohl 6, 35385 Giessen, Germany.

⁴ Novo Nordisk A/S.

* Abbreviations: GAD 65, glutamic acid decarboxylase; IAK, islet after kidney; ICA, islet cell antibody; IDDM, insulin-dependent diabetes mellitus; JDF, Juvenile Diabetes Foundation units.

radioligand GAD 65 antibody assay, using as tracer recombinant, in-vitro-translated, human islet (35 S)-methionine-labeled GAD 65 according to the protocol developed by Petersen et al. (6). Antibody levels are expressed as index values:

$$\text{GAD 65 antibody index} = \frac{\text{cpm}[\text{unknown sample}] - \text{cpm}[\text{negative standard serum}]}{\text{cpm}[\text{positive standard serum}] - \text{cpm}[\text{negative standard serum}]}$$

The cDNA encoding for human GAD 65 was generously donated by Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark. The intrasay variation of one medium-binding GAD 65 antibody-positive serum sample was 5.0% ($n=10$) and the interassay variation was 10.1% ($n=9$). The cutoff index level for GAD 65 antibody positivity was determined from 100 healthy control subjects. Sera with GAD 65 antibody index values above the mean index plus two times the standard deviation were regarded as positive. ICAs were determined by an indirect immunofluorescence technique using cryostat sections of human pancreas as substrate. This assay is tested regularly in the IDW proficiency workshop series on standardization of the ICA assay, performing with 100% sensitivity and 100% specificity. The detection limit of the assay is 5 Juvenile Diabetes Foundation units (JDF). We considered 10 JDF as indicative of ICA positivity in this study. All samples were tested in triplicate. The serum samples of the cross-sectional study and the samples of the longitudinal study were included in one antibody assay to avoid interassay variation. Statistical analysis was performed using Student's *t* test. Fisher's exact test was applied to determine statistical significance of differences between group frequencies, and the Mann-Whitney *U* test was used for comparison of GAD 65 antibody index levels using Systat computer software. $P < 0.05$ was considered significant.

The results of the cross-sectional study are shown in Figure 1. In the matched, nontransplanted IDDM patients, 6 out of 30 (20%) patients were positive for ICAs, whereas, in the group of patients undergoing immunosuppression, no ICA-positive individual could be identified, demonstrating a significant ($P < 0.05$) decrease in ICA positivity. In contrast, the frequency of GAD 65 antibodies was not affected by standard immunosuppression

(30/30 cyclosporine and steroids, 12/30 azathioprine in addition). Thus, 7 out of 30 (23%) patients were GAD 65 antibody positive in the group of patients on immunosuppressive therapy and 6 out of 30 (20%) patients were positive for GAD 65 antibodies among the matched IDDM subjects. The GAD 65 antibody index levels were also not significantly different between the two groups (data not shown). It is known from studies in patients with recent-onset type I diabetes that cyclosporine reduces the prevalence and mean titers of ICAs and insulin autoantibodies (7-9). Our findings are in accordance with this observation, demonstrating a significant decrease in ICA positivity by standard immunosuppressive therapy following kidney transplantation in long-term IDDM patients. In this situation, IAK transplantation is performed. ICAs, therefore, may not be useful for predicting or monitoring islet graft function in this recipient category. In contrast, recent observations demonstrated that cyclosporine did not decrease the prevalence of GAD 65 antibodies or the GAD 65 antibody index level when administered in newly diagnosed IDDM patients (10). We were able to confirm this surprising finding in long-term diabetic patients: we found no significant decrease in the prevalence or GAD 65 antibody index levels between the two groups of long-term IDDM patients with or without immunosuppressive therapy. We speculate that some IDDM-specific autoimmunity can persist despite immunosuppressive therapy, as indicated by GAD 65 antibodies.

This raises the question of whether GAD 65 antibody positivity before and after islet transplantation is more useful in predicting and monitoring, respectively, islet graft function than ICAs. To address this question, we investigated the time course of ICAs and GAD 65 antibodies in seven kidney graft recipients before and after intraportal IAK transplantation relative to islet graft function. We analyzed follow-up sera of seven recipients of intraportal islet allografts transplanted according to the Giessen protocol and islet transplantation project, as described elsewhere (11). All patients were pretransplant C-peptide negative and only individuals with stable graft function at 1 month after transplantation were included in the study. Graft loss was defined as the first day of permanent C-peptide negativity (C-peptide < 0.2 ng/ml). The median follow-up was 14.5 months (range, 2-28 months), with a cumulative follow-up period of 101 months.

ICAs were negative (< 10 JDF) in 6 of 7 individuals before IAK transplantation. The pretransplant serum of only one patient (IAK 5) reached exactly the cutoff level of 10 JDF. During the follow-up period, in only this patient did the ICA titer exceed the cutoff level of 10 JDF with a maximum of 20 JDF. In all other patients, the ICA titer remained below 10 JDF (data not shown).

GAD 65 antibodies were present in 2 of 7 individuals (25%) before IAK transplantation. The time course of the GAD 65 antibody index levels before and after IAK transplantation is shown in Figure 2. In one individual (IAK 3), the GAD 65 antibody index level was higher than in our positive control (serum derived from a patient with recent-onset type I diabetes). In this patient, in whom good graft function was noted at 1 month after transplantation (basal/Sustacal stimulated serum C-peptide, 1.1 and 3.3 ng/ml), graft loss occurred during the subsequent month. Patient IAK 1 remains GAD 65 antibody negative with good graft function, and has not required insulin therapy for more than 2 years. Three more individuals (IAK 2, IAK 4, and IAK 7) were also GAD 65

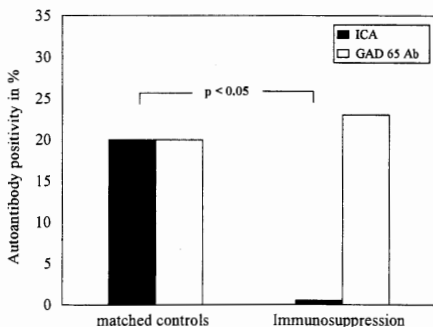


FIGURE 1. Prevalence of ICAs and GAD 65 antibodies relative to immunosuppressive therapy following kidney transplantation in long-term IDDM patients ($n=30$ for both groups of patients).

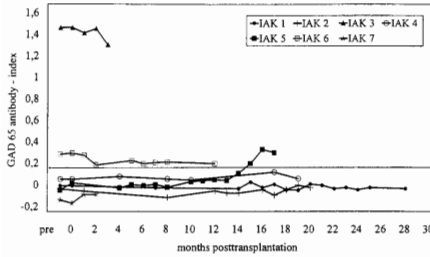


FIGURE 2. GAD 65 antibody index level in follow-up sera of seven IAk transplant recipients receiving immunosuppressive therapy. The solid line (→) indicates the upper limit of normal range of 100 healthy controls (mean plus two times the standard deviation).

antibody negative and showed stable graft function throughout the investigation period. IAk transplant patient 6 remained C-peptide positive, being GAD 65 antibody positive but at a very low index level. In this patient, the GAD 65 antibody index levels of the follow-up sera did not go beyond the third standard deviation of our healthy control population. IAk patient 5 was GAD 65 antibody negative before IAk transplantation and converted to GAD 65 antibody positivity with an index level of 0.32 after a follow-up period of 15 months, 2 months after graft loss had occurred. Immunosuppression was maintained and the kidney continued to function with unchanged serum creatinine and creatinine clearance. In all patients, donor-specific cross-match was negative before IAk transplantation. Donor-specific cross-match was not performed after transplantation; however, the panel reactive activity (sample size = 60) remained negative in both patients who lost islet graft function (IAk 3 and IAk 5).

Our data give the first evidence for a possible association of GAD 65 antibody negativity before transplantation and islet graft survival. GAD 65 antibody negativity appeared to be associated with prolonged islet graft function (IAk 1, IAk 2, IAk 4, and IAk 7). However, in the individual with a high index level of GAD 65 antibodies (IAk 3), rapid graft failure was observed. The intriguing finding of seroconversion from GAD 65 antibody negativity to positivity (IAk 5) is unexpected and may indicate reenactment of the β -cell autoimmunity by reimplantation of the antigen in patients undergoing IAk transplantation. Clinical islet transplantation has been performed in the Giessen center for several years, but no whole-pancreas transplantation has been done in this center. It would be interesting to investigate further the proposed link between the presence or reappearance of autoantibodies and graft failure possibly due to recurrent autoimmunity in larger numbers, both in clinical pancreas and islet transplantation.

In conclusion, we have demonstrated persistent β -cell au-

toimmunity directed to GAD 65 despite immunosuppressive therapy in kidney and IAk transplant recipients with long-term IDDM. In addition, the results of the follow-up study provide the first evidence of GAD 65 antibodies as possible indicators of ongoing β -cell autoimmunity directed to grafted islets in IAk transplantation. Our recent data may suggest susceptibility of transplanted isolated islets to the immunologic effects of recurrent autoimmunity as a relevant factor in islet graft failure.

Acknowledgments. The authors thank all co-workers of the Giessen islet transplantation project for their enthusiastic and excellent work in the areas of immunology, islet isolation, and clinical transplantation. We are particularly grateful to J. Allendorfer, Heide Brandhorst, D. Brandhorst, Christina C. Bollen, R. Grossmann, and F. Helf.

REFERENCES

- Naji A, Silvers WK, Bellgrau D, Barker CF. Spontaneous diabetes in rats: destruction of islets is prevented by immunologic tolerance. *Science* 1981; 213: 1390.
- Sibley RK, Sutherland DER, Goetz F, Michael AF. Recurrent diabetes mellitus in the pancreas iso- and allograft: a light and electron microscopic and immunohistochemical analysis of four cases. *Lab Invest* 1985; 53: 132.
- Bartlett ST, Hadley GA, Dirden B, et al. Composite kidney-islet transplantation prevents recurrent autoimmune beta-cell destruction. *Surgery* 1993; 114: 211.
- Bartlett ST, Chin T, Dirden B, Quereshi A, Hadley G. Inclusion of peripancreatic lymph node cells prevents recurrent autoimmune destruction of islet transplants: evidence of donor chimerism. *Surgery* 1995; 118: 392.
- Hering BJ, Browatzki CC, Schultz A, Bretzel RG, Federlin K. Clinical islet transplantation registry report: accomplishments in the past and future research needs. *Cell Transplant* 1993; 2: 269.
- Petersen JC, Hejnaes KR, Moody A, et al. Detection of GAD 65 antibodies in diabetes and other autoimmune diseases using a simple radioligand assay. *Diabetes* 1994; 43: 459.
- Mandrup-Poulson T, Nerup J, Stiller CR, et al. Disappearance and reappearance of islet cell cytoplasmic antibodies in cyclosporin-treated insulin-dependent diabetics. *Lancet* 1985; 2: 599.
- Mandrup-Poulson T, Molvig J, Andersen HU, et al. Lack of predictive value of islet cell antibodies, insulin antibodies and HLA-DR phenotype for remission in cyclosporin-treated IDDM patients. *Diabetes* 1990; 39: 204.
- Castano L, Boitard C, Bougneres PF. Cyclosporine A suppresses insulin autoantibodies and heterologous insulin antibodies in type 1 diabetic children. *Diabetes* 1988; 37: 1049.
- Petersen JS, Dyrberg T, Karlens AE, et al. Glutamic acid decarboxylase (GAD 65) autoantibodies in prediction of β -cell function and remission in recent-onset IDDM after cyclosporin treatment. *Diabetes* 1994; 43: 1291.
- Bretzel RG, Browatzki CC, Schultz A, et al. Clinical islet transplantation—report of the islet transplant registry and the Giessen center experience. *Diab Stoffw* 1993; 2: 378.

Received 20 December 1995.

Accepted 6 March 1996.



IA-2 Antibodies Are Only Positive in Association With GAD 65 and Islet Cell Antibodies in Islet Transplanted Insulin-Dependent Diabetes Mellitus Patients

C. Jaeger, M.D. Brendel, B.J. Hering, M. Eckhard, K. Federlin, and R.G. Bretzel

WE have recently demonstrated that progressive islet graft failure occurs significantly earlier in GAD 65 antibody and/or islet cell antibody (ICA) positive insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) recipients of intrahepatic islet grafts.¹ Together with previous, histologically based studies by Tyden et al.² and Stegall et al.³ there is growing evidence for recurrent autoimmunity directed to transplanted beta cells despite standard immunosuppressive therapy both in clinical pancreas and islet transplantation.

To identify recurrent autoimmunity the histologic approach is not widely applicable in the clinical situation, at least for intrahepatic islet allografts. Therefore, we were aiming for alternative tools to identify recipients with IDDM at risk for recurrent autoimmunity. The purpose of the present study was to investigate the new antibody specificity IA-2 in 23 islet transplanted IDDM recipients and address the question of frequency, time course, and levels of coexistence of the IA-2 antibodies compared to ICA and GAD 65 antibodies.

PATIENTS AND METHODS

Patients

Subjects in this study were patients with IDDM participating in the Giessen islet transplantation project. All of the protocols were approved by the Justus-Liebig University ethical committee, and all subjects gave written informed consent before participation. A total of 23 individuals were included from two different recipient categories: islet after kidney transplantation (IAK; $n = 12$) and simultaneous islet and kidney transplantation (SIK; $n = 11$). The clinical characteristics are shown in Table 1.

Islet Transplantation

Intraportal infusion of allogeneic islets was performed in 23 C-peptide negative IDDM patients as described elsewhere.⁴ In the group of patients receiving combined kidney and islet transplants immunosuppression was maintained by triple therapy (cyclosporine A, steroids and azathioprine) in combination with an induction immunosuppression using anti-lymphocyte serum. The same regimen was followed in islet transplanted patients with a previously established kidney graft, but in some cases without azathioprine.

Table 1. Clinical Characteristics of the Study Population ($n = 23$ islet-grafted IDDM patients) and Autoantibody Frequency

	IAK ($n = 12$)	SIK ($n = 11$)
Age		
Median (y)	40.5	35
Range	29–54	32–57
Sex		
Male/Female	3/8	9/3
DD before ITX		
Median (y)	25	23
Range	12–38	15–38
Follow-up post ITX		
Median (months)	12	11
Range	1–50	4–27
Autoantibodies		
GAD 65 antibodies	6	5
Islet cell antibodies	2	3
IA-2 antibodies	2	2

Abbreviations: IAK, islet after kidney transplantation; SIK, simultaneous islet and kidney transplantation; ITX, islet transplantation.

Autoantibodies and Statistics

In all cases at least one pretransplant serum sample was available for detection of autoantibodies before islet transplantation. All patients regularly attended the follow-up visits for further monitoring of the autoantibodies. ICA were detected by indirect immunofluorescence on human pancreas, titres have been converted to standard JDF units with a detection limit of 5 JDF. GAD 65 antibodies were measured by a radioligand GAD 65 antibody binding assay⁵ and IA-2 antibodies were detected in a new ELISA format by Boehringer Mannheim. Sera with antibody levels above the mean plus two times the standard deviation of a healthy control population were regarded as positive. Fisher's exact test was used to compare group frequencies on a significance level of $P < .05$.

From the Third Medical Department of Policlinic, (C.J., M.D.B., B.J.H., M.E., K.F., R.G.B.), Justus-Liebig University, Giessen, Germany.

Address reprint requests to Clemens Jaeger, MD, Third Medical Department and Policlinic, Justus-Liebig University, Rodthohl 6, 35385 Giessen, Germany.

RESULTS

Frequency

IA-2 antibodies were found significantly ($P < .05$) less frequently (4 out of 23, 17%) compared to GAD 65 antibodies, which were positive in 11 out of 23 individuals (47%). Islet cell antibodies were positive in 5 out of 23 (21%) patients (Table 1).

Coexistence

Interestingly, none of the patients was exclusively positive only for IA-2 antibodies. In 3 out of 4 IA-2 antibody positive patients (75%), we also observed islet cell antibodies and all IA-2 positive individuals were additionally GAD 65 antibody positive giving a frequency of 3 out of 23 patients (13%) who were triple positive. Thus, in our study population of 23 islet transplanted IDDM patients, IA-2 antibody positive patients form a subgroup of GAD 65 antibody positive individuals.

Time Course

Only one patient from the SIK group was IA-2 positive prior to islet transplantation and remained positive thereafter; the other three were IA-2 Ab negative before islet transplantation but became positive 7, 8, and 16 months after transplantation.

DISCUSSION

Beside allograft rejection, transplanted islets can be destroyed by the recurrence of beta cell autoimmunity present in IDDM patients and turning towards the islet graft after transplantation. The potential threat of recurrent autoimmune insulinitis to islet grafts has first been shown in spontaneously diabetic animals.⁶⁻⁸ Subsequently, recurrent autoimmunity despite sustained immunosuppression has been suggested both in clinical pancreatic and islet transplanta-

tion.^{2,3} Searching for non-invasive tools to potentially identify individuals at risk for recurrent autoimmunity, we have previously shown that ICA and GAD 65 antibodies can persist or occur in immunosuppressed islet transplanted IDDM patients.^{1,9} In the present study we were able to demonstrate occurrence and persistence of IA-2 antibodies in islet transplanted IDDM patients despite immunosuppression which is similar to our previous findings for GAD 65 antibodies and ICA. Nevertheless, the frequency of IA-2 antibodies was significantly ($P < .05$) lower compared to GAD 65 antibodies. Interestingly, IA-2 antibodies did not identify additional individuals being negative for the other antibody specificities. In our study population of 23 islet grafted IDDM patients IA-2 antibody positive subjects form a subgroup of also GAD 65 antibody positive individuals with a 75% overlap for additional islet cell antibody positivity. Further studies are underway to evaluate the clinical relevance of these antibodies and antibody combinations relative to islet graft function.

REFERENCES

1. Jaeger C, Brendel MD, Hering BJ, et al: Diabetes (in press)
2. Tyden G, Reinhold FP, Sundkvist G, et al: *N Engl J Med* 335:860, 1996
3. Stegall MD, Lafferty KJ, Kam I, et al: *Transplantation* 63:1272, 1996
4. Bretzel RG, Browatzki CC, Schultz A, et al: *Diab Stoffw* 2:378, 1993
5. Peterson JS, Hejnaes KR, Moody A, et al: *Diabetes* 43:459, 1994
6. Naji A, Silvers WK, Bellgrau D, et al: *Science* 213:1390, 1981
7. Wöhrle M, Pullmann J, Bretzel RG, et al: *Transplantation* XX:1099, 1992
8. Bartlett ST, Hadley GA, Dirken B, et al: *Surgery* 114:211, 1993
9. Jaeger C, Hering BJ, Dyrberg T, et al: *Transplantation* 62:424, 1996

Rapid Publications

Progressive Islet Graft Failure Occurs Significantly Earlier in Autoantibody-Positive Than in Autoantibody-Negative IDDM Recipients of Intrahepatic Islet Allografts

Clemens Jaeger, Mathias D. Brendel, Bernhard J. Hering, Michael Eckhard, and Reinhard G. Bretzel

Alloimmunity has been uncovered to be a cause of graft loss representing a major barrier for clinical islet transplantation, and several studies are designed to evaluate new strategies for immunosuppression to prevent alloimmunity. In contrast, the significance for autoimmune destruction of transplanted β -cells has remained somewhat controversial. Recently, two case reports based on histological findings have suggested recurrent autoimmune insulinitis despite immunosuppressive therapy both in clinical pancreas and in islet transplantation. In the present study, in 23 islet-grafted patients with IDDM receiving standard immunosuppressive therapy, we demonstrate that progressive impairment of islet graft function occurs significantly earlier in those individuals positive for autoantibodies as a typical stigma of diabetes-associated autoimmunity that is well established in the prediabetic periods of IDDM. Intraportal infusion of allogeneic islets was performed in 23 C-peptide-negative IDDM patients, according to the clinical transplantation categories defined as islet after kidney (IAK) or simultaneous islet and kidney (SIK). Complete islet graft failure was defined as the 1st day of permanent C-peptide negativity in the serum (<0.2 ng/ml) and C-peptide negativity in the urine (<2 μ g/dl). The median observation period following islet transplantation was 12 months (range 1–50) with a cumulative follow-up of 336 months. Islet cell antibodies (ICAs) and GAD65 antibodies were monitored before and regularly after islet transplantation. Kaplan-Meier survival analysis and log-rank statistics revealed a significant ($P < 0.05$) difference in cumulative islet graft survival depending on the presence of islet cell and/or GAD65 antibodies. These results strongly suggest that recurrent autoimmunity directed to transplanted β -cells contributes to islet graft failure despite sustained immunosuppression. For successful clinical islet transplantation in the future, new immunosuppressive therapies are needed to

prevent both alloimmunity and autoimmunity. *Diabetes* 46:1907–1910, 1997

Recently, it has been hypothesized that alloimmunity plus autoimmunity represent principle barriers to successful islet transplantation (1). Two case reports have suggested recurrent autoimmune insulinitis in both pancreatic and islet allografts. Tyden et al. (2) found selective β -cell destruction in two patients who had rejected their pancreatic grafts despite immunosuppression, with one of them generating islet cell antibodies (ICAs) and GAD65 antibodies after the transplantation. In accordance, Stegall et al. (3) also demonstrated selective β -cell destruction with lymphocytic infiltration in immunosuppressed islet-transplanted individuals, introducing the forearm subfascial site that gives the opportunity for repeated biopsies.

These case reports, based on histological findings, provide clear evidence of recurrent autoimmune insulinitis despite sustained immunosuppression, and the results are consistent with our own observations of persistence and occurrence of autoantibodies in immunosuppressed IDDM patients who underwent islet transplantation (4). Autoantibodies such as ICAs or GAD65 antibodies are a hallmark of autoimmune diabetes and early markers for prediction in the prediabetic period (5). In clinical islet transplantation, multiple biopsies are not a suitable tool for morphological monitoring of intrahepatic islet grafts. We and others have shown that islet cell antibodies, and especially GAD65 antibodies, can persist or occur in pretransplant negative individuals despite sustained immunosuppression (4). Thus autoantibodies are obvious candidates for linking possible recurrent autoimmunity with islet graft function. The aim of the present study was to investigate the islet graft function in relation to the autoantibody status in 23 islet-transplanted patients with IDDM over a cumulative observation period of more than 28 patient-years post-islet transplantation.

From the Third Medical Department and Policlinic, Justus-Liebig University, Giessen, Germany.

Address correspondence and reprint requests to Clemens Jaeger, MD, Third Medical Department and Policlinic, Justus-Liebig University, Roththohl 6, 35385 Giessen, Germany.

Received for publication 3 June 1997 and accepted in revised form 14 August 1997.

IAK, islet after kidney; ICA, islet cell antibody; ITX, islet transplantation; JDF, Juvenile Diabetes Foundation; SIK, simultaneous islet and kidney.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Subjects. Participants in this study were patients with IDDM taking part in the Giessen islet transplantation project. All of the protocols were approved by the Justus-Liebig University ethics committee, and all subjects gave written informed consent before participation. A total of 23 patients were included from two recip-

ient categories: islet after kidney transplantation (IAK, $n = 12$) and simultaneous islet and kidney transplantation (SIK, $n = 11$). The median age at the time of islet transplantation was 38 years (range 29–58) and the median duration of diabetes before islet transplantation was 24 years (range 12–38). A total of 12 males and 11 females were transplanted, and the median follow-up period posttransplantation was 12 months (range 1–50) with a cumulative follow-up of 336 months.

Islet transplantation. Islet allografts were transplanted intraportally according to the Giessen protocol as described elsewhere (6). All patients were pretransplant C-peptide negative. In the group of patients receiving combined kidney and islet transplants, immunosuppression was maintained by triple therapy (cyclosporine-A, steroids, azathioprine) in combination with an induction immunosuppression using antilymphocyte serum. The same regimen was followed in islet-transplanted patients with a previously established kidney graft, but in some cases, without administering azathioprine. Complete islet graft failure was defined as the 1st day of permanent C-peptide negativity in the serum (<0.2 ng/ml) and C-peptide negativity in a 24-h urine collection (<2 μ g/dl). The median follow-up period posttransplantation was 12 months (range 1–50), with a cumulative follow-up of 336 months, giving an observation period post-islet transplantation of 28 patient-years.

Serum and autoantibodies. In all cases, at least one pretransplant serum sample was available for assessment of ICAs and GAD65 antibodies before islet transplantation. All patients regularly attended the follow-up visits after the islet transplantation for further monitoring of autoantibodies and evaluation of islet graft function. GAD65 antibodies were detected in a radioligand GAD65 Ab assay, using recombinant, in vitro translated, human islet [35 S]methionin-labeled GAD65 as tracer according to the protocol developed by Peterson et al. (7). Antibody levels were expressed as index values: GAD65 antibody index = (cpm unknown sample - cpm negative standard serum)/(cpm positive standard serum - cpm negative standard serum). The cDNA encoding for human GAD65 was generously donated by Novo Nordisk A/S, Denmark. The cutoff index level for GAD65 antibody positivity was determined from 100 healthy control subjects. Sera with GAD65 antibody index values above the mean index plus two times SD were regarded as positive. This assay has been evaluated in the International Diabetes Workshop (IDW) proficiency workshop series on standardization of GADA, performing with 91% specificity and 86% sensitivity. ICAs were determined by indirect immunofluorescence technique using cryostat sections of human pancreas as substrate. This assay is regularly tested in the ENDIT quality control workshops and in the IDW proficiency workshop series on standardization of the islet cell antibody assay, performing with 100% sensitivity and 100% specificity. Titers have been converted to Juvenile Diabetes Foundation (JDF) units using a JDF standard reference serum. The detection limit of the assay is 5 JDF units.

Statistical analysis. The islet graft survival was analyzed by Kaplan-Meier survival analysis for data containing censored observations. Because of the high percentage of censored observations, we used log-rank statistics to determine statistically significant differences of islet graft survival relative to the autoantibody status, and a P value of <0.05 was considered significant. The calculations were carried out using SPSS 6.1.3 software.

RESULTS

Autoantibodies. Focusing on GAD65 antibodies, we observed positivity in 11 out of 23 (48%) individuals. Eight patients were positive for GAD65 antibodies before islet transplantation, and three subjects seroconverted subsequently to transplantation from GAD65 antibody negativity to positivity. For islet cell antibodies, the prevalence was lower with 5 out of 23 (21%) patients generating ICAs. Three subjects were pretransplant positive for ICAs, and only in two cases did we observe seroconversion afterward.

Looking at both autoantibodies together in our study population, two individuals were double-positive before islet transplantation, and one patient showed seroconversion for both antibody specificities after islet transplantation. In two other cases, we observed pretransplant positivity for one type of autoantibody with seroconversion of the other specificity following the islet transplantation. Thus, each of the five ICA positive individuals was additionally double-positive also for GAD65 antibodies either before or subsequent to islet transplantation, with none of the patients being exclusively positive for ICAs without GAD65 antibodies.

Taken together, we observed generations of autoantibodies either pretransplantation and/or posttransplantation in 11

out of 23 (48%) IDDM recipients of intrahepatic islet allografts. The clinical characteristics of the autoantibody positive versus autoantibody negative individuals did not differ regarding age at the time of islet transplantation (ITX), diabetes duration before ITX, or the sex distribution (Table 1).

Islet graft survival. According to our definition of complete islet graft failure, we observed ongoing graft function in 17 out of 23 (74%) islet-transplanted individuals during the observation period. Complete islet graft failure was found in 6 out of 23 (26%) patients after 1, 2, 3, 4, 7 and 10 months, respectively. Interestingly, 5 out of 6 (83%) patients with complete graft failure belonged to the group of autoantibody-positive individuals (Table 1).

Kaplan-Meier estimate. Figure 1 shows the cumulative islet graft survival of the autoantibody positive patients ($n = 11$) who developed either GAD65 antibodies or both antibodies (GAD65 and ICA) during the observation period, compared with those individuals ($n = 12$) who did not generate GAD65 antibodies or ICAs at any time pre- and/or post-islet transplantation. Log-rank statistics revealed a significant ($P < 0.05$) difference of islet graft survival in regard to the autoantibody status, demonstrating a significantly lower graft survival in the group of autoantibody-positive IDDM recipients of intrahepatic islet allografts.

DISCUSSION

Since the landmark paper of Sibley et al. (8) from the Sutherland group in 1985, it has been accepted that in the case of identical twin pancreatic transplants, recurrent autoimmune β -cell destruction may occur in patients with IDDM, unless cyclosporine and azathioprine immunosuppression are used. Recently, the dogma that immunosuppressive therapy required to prevent alloimmunity is sufficient for the prevention of autoimmunity has been disputed for both pancreatic and islet transplantation. Two case reports based on histological analysis provided evidence of recurrent autoimmunity in human allogeneic islet transplantation (3), and a few months later another report suggested recurrence of autoimmune diabetes in recipients of cadaveric pancreatic grafts (2). In both studies, typical histological signs of autoimmune insulinitis with selective destruction of β -cells and a relative sparing of α - and δ -cells had occurred despite sustained immunosuppression.

TABLE 1
Clinical characteristics of 23 IDDM recipients of intrahepatic islet allografts grouped by islet cell and/or GAD65 antibody positivity versus autoantibody negativity

	Autoantibody-positive patients	Autoantibody-negative patients
<i>n</i>	11	12
Age at the time of ITX		
Median (years)	39	36
Range	29–58	32–54
Sex (M/F)	7/4	5/7
DD before ITX	24 (15–38)	23 (12–38)
Cases of complete islet graft failure	5	1

Data are median years (range) or *n*. DD, diabetes duration; ITX, islet transplantation.

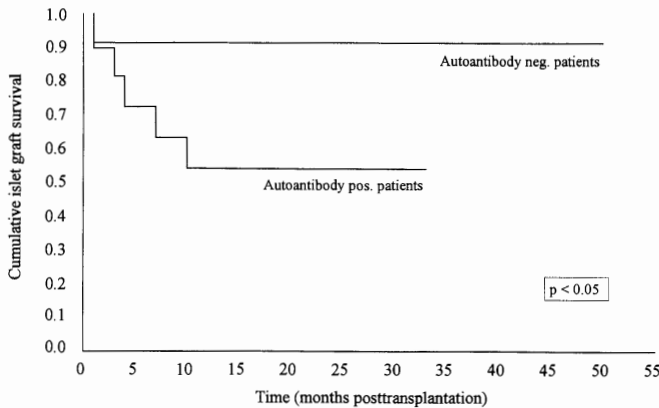


FIG. 1. Kaplan-Meier estimate of the cumulative islet graft survival depending on the presence of GAD65 and/or islet cell antibodies. $P < 0.05$ for the group of autoantibody positive ($n = 11$) versus autoantibody negative ($n = 12$) patients with IDDM receiving an intrahepatic islet allograft.

The histological approach provides strong evidence for the underlying pathophysiological process but is not widely applicable in the clinical situation, at least for intrahepatic islet allografts. Therefore, we aimed for alternative tools to identify recipients with IDDM at risk for recurrent autoimmunity. Keeping in mind what has been learned from prediabetic periods of IDDM, the presence of humoral autoimmunity with generation of different autoantibodies such as ICAs, GAD65 antibodies, or IA-2 antibodies offers the opportunity to identify individuals with a high risk for developing IDDM at a very early stage several years before clinically overt disease (5). Interestingly, it has been shown in clinical trials of recent onset of IDDM that GAD65 antibodies are not affected by immunosuppressive therapy with cyclosporine-A, in contrast to significantly reduced ICAs and insulin autoantibodies (9,10). Recently, we transferred these observations to the situation of clinical islet transplantation, demonstrating that GAD65 antibodies and, to a lesser degree, ICAs can persist despite sustained immunosuppression or occur in pretransplant autoantibody-negative islet-transplanted IDDM patients. In addition, we performed a pilot study on seven IAK-transplanted IDDM patients suggesting that the presence of GAD65 antibodies may adversely affect islet graft function (4).

The worldwide experience of sustained functional survival of islet allografts is based on a relatively small, albeit an increasing, number of cases. The present study included 23 IDDM recipients of intrahepatic islet allografts with a cumulative observation period of 336 months posttransplantation, thus substantially expanding our previous findings. We have now been able to confirm our previous observations of persistence and occurrence of autoantibodies despite immunosuppression, obtained from seven islet transplanted individuals (4) in the larger cohort of 23 IDDM recipients of intrahepatic islet allografts. Furthermore, the present study indicates that detection of autoantibodies might become a useful tool to identify individuals in whom progressive islet

graft failure occurs significantly earlier, compared with autoantibody-negative subjects. In this study five out of six patients who had suffered complete islet graft failure generated autoantibodies either before or after islet transplantation. The individual transplant survival times of our recipient cohort to date by means of lifetable procedure and log-rank statistics demonstrate for the first time a statistically significant difference ($P < 0.05$) in islet allograft survival depending on the presence of autoimmune phenomena, such as GAD65 antibodies and ICAs.

We conclude that the work of Tyden et al. (2) and Stegall et al. (3), together with the results of our present study, has created several lines of evidence for recurrent autoimmunity directed to transplanted β -cells despite standard immunosuppressive therapy. Detection of autoantibodies may help to identify the individuals at high risk for recurrent autoimmunity. Finally, new immunosuppressive strategies that prevent both alloimmunity and autoimmunity are needed to ensure successful clinical islet transplantation in the future.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Bundesministerium für Forschung und Technologie, FKZ 07024806 (R.G.B.).

The authors gratefully acknowledge Thomas Dyrberg, Novo Nordisk, for the donation of cDNA encoding for human GAD65 and Michael Stein and Sabine Scherer for expert technical assistance.

REFERENCES

1. Eisenbarth GS, Stegall M: Islet and pancreatic transplantation: autoimmunity and alloimmunity. *N Engl J Med* 335:888-889, 1996
2. Tyden G, Reinholdt FP, Sundkvist G, Bolinder J: Recurrence of autoimmune diabetes mellitus in recipients of cadaveric pancreatic grafts. *N Engl J Med* 335:860-863, 1996
3. Stegall MD, Lafferty KJ, Kam I, Gill RG: Evidence of recurrent autoimmunity in human allogeneic islet transplantation. *Transplantation* 63:1272-1274, 1996

4. Jaeger C, Hering BJ, Dyrberg T, Federlin K, Bretzel RG: Islet cell antibodies and glutamic acid decarboxylase antibodies in patients with insulin-dependent diabetes mellitus undergoing kidney and islet-after-kidney transplantation. *Transplantation* 62:424-426, 1996
5. Bonifacio E, Genovese S, Braghi S, Bazzigaluppi E, Lampasona V, Bingley PJ, Rogge L, Pastore MR, Bognetti E, Bottazzo GF, Gale EAM, Bosi E: Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity. *Diabetologia* 38:816-822, 1995
6. Bretzel RG, Browatzki CC, Schultz A, Brandhorst H, Klitscher D, Bollen CC, Raptis G, Friemann S, Ernst W, Rau WS, Hering BJ: Clinical islet transplantation: report of the islet transplant registry and the Giessen center experience. *Diab Stoffw* 2:378-390, 1993
7. Peterson JS, Hejnaes KR, Moody A, Karlisen AE, Marshall MO, Hoter-Madsen M, Boel E, Michelsen B, Dyrberg T: Detection of GAD 65 antibodies in diabetes and other autoimmune diseases using a simple radioligand assay. *Diabetes* 43:459-467, 1994
8. Sibley RK, Sutherland DER, Goetz F, Michael AF: Recurrent diabetes mellitus in the pancreas iso and allograft; a light and electron microscopic and immunohisto-chemical analysis of four cases. *Lab Invest* 53:132-144, 1985
9. Peterson JS, Dyrberg T, Karlisen AE, Molvig J, Michelsen B, Nerup J, Mandrup-Poulsen T, and the Canadian-European Randomized Control Trial Group: Glutamic acid decarboxylase (GAD 65) autoantibodies in prediction of β -cell function and remission in recent-onset IDDM after cyclosporin treatment. *Diabetes* 43:1291-1296, 1994
10. Mandrup-Poulsen T, Molvig J, Andersen HU, Helqvist S, Spinus GA, Munck M, the Canadian-European Randomized Control Trial Group: Lack of predictive value of islet cell antibodies, insulin antibodies and HLA-DR phenotype for remission in cyclosporin-treated IDDM patients. *Diabetes* 39:204-210, 1990

Anlage 5 Ausgewählte Publikationen ad 3.5

Jaeger C, Eckhard M, Brendel MD, Bretzel RG (2004) Diagnostic algorithm and management of immune mediated complications associated with subcutaneous insulin therapy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 112: 416-421

Diagnostic Algorithm and Management of Immune-Mediated Complications Associated with Subcutaneous Insulin Therapy

C. Jaeger
M. Eckhard
M. D. Brendel
R. G. Bretzel

Article

Abstract

Immune mediated complications associated with subcutaneous insulin therapy such as insulin neutralizing antibodies and/or skin reactions are rare conditions since human insulin is in general use. Nevertheless, if it occurs, a stepwise diagnostic approach is essential for differential diagnosis and consecutive treatment of these complications. Here we suggest a diagnostic algorithm to deal with e.g. insulin antibody formation of the IgG and/or IgE type and/or severe skin reactions resulting in poor metabolic control and often "brittle diabetes" in affected patients. This diagnostic algorithm includes step 1: Intradermal skin testing with positive and negative controls, additives and different insulin preparations; step 2: Quantification of insulin

specific IgG and IgE in the serum, and step 3: Analysis of the time dependent binding/dissociation curves of the insulin neutralizing antibodies in an *ex vivo/in vitro* assay to assess the clinical significance of these antibodies. Based on 158 insulin treated control subjects and four patients with typical symptoms and signs representing the spectrum of immune-mediated complications subsequent to subcutaneous insulin therapy we demonstrate that the proposed stepwise approach leads to a definite diagnosis as a prerequisite for individual and successful therapy.

Key words

Insulin antibodies · insulin allergy · insulin resistance · brittle diabetes · insulin therapy

Introduction

Refinements of manufacturing technology and finally the introduction of recombinant human insulin for the treatment of diabetes has significantly decreased the rate of immunological complications of insulin therapy (Federlin, 1985; Francis et al., 1985; Scherthaner, 1993). At present the use of insulin entails approx. 88% human recombinant insulin, 10% insulin analogues, and only 2% bovine and porcine insulin (von Kriegstein and Schatz, 2002). While this is of clear advantage to insulin-treated patients in general, the remaining low percentage of immune-mediated complications associated with subcutaneous insulin therapy

should not be underrated and therefore be "underdiagnosed". In affected individuals these complications are of great importance for diabetes management and prognosis. Naturally, such problems cluster at diabetes centres. At Giessen centre we observed in several diabetic patients on s.c. insulin therapy and regardless of the type of diabetes local skin reactions at the injection site and/or otherwise unexplained poor metabolic control both associated with extremely high titres of insulin antibodies. These clinical observations prompted us to develop a standardized and rational diagnostic approach to differentiate these immune-mediated complications (Fig. 1). Based on four typical cases representing the broad spectrum of immunological complications

416

Affiliation

Third Medical Department and Policlinic, Justus-Liebig University of Giessen, Germany

In honour of Prof. Dr. Drs. h.c. K. Federlin on the occasion of his 75th birthday

Correspondence

Dr. med. C. Jaeger · Third Medical Department and Policlinic · Justus-Liebig University of Giessen · Rodthohl 6 · 35392 Giessen · Germany · T + 49 0 64 19 94 28 23 · F + 49 0 64 19 94 27 59 · E-mail: clemens.jaeger@innere.med.uni-giessen.de

Received: August 29, 2003 · First decision: November 27, 2003 · Accepted: February 26, 2004

Bibliography

Exp Clin Endocrinol Diabetes 2004; 112: 416–421 © J. A. Barth Verlag in Georg Thieme Verlag KG · Stuttgart · New York · DOI 10.1055/s-2004-821186 · ISSN 0947-7349

associated with subcutaneous insulin therapy and 158 insulin-treated control subjects exclusively treated with human insulin we demonstrate a stepwise diagnostic approach for the differentiation and individual management of these complications.

Subjects and Methods

Subjects

Participants in this study were four consecutive patients with different types of diabetes mellitus, who were presented to the Diabetes Outpatient Department at Giessen Centre for routine clinical evaluation and blood sampling because of unexplained complications associated with subcutaneous insulin regimens: Two female patients, 24 and 21 years old, respectively, with type 1 diabetes, a 78-year-old female patient with type 2 diabetes and a 57-year-old male patient with type 3c diabetes due to partial pancreatectomy. For establishing normal ranges of our assay systems we included sera of 158 diabetic patients on subcutaneous insulin therapy (human insulin) and without a history of any treatment related complications or allergic reactions.

Methods

The patients were subjected to extensive clinical evaluation and routine laboratory testing including fasting/post prandial c-peptide analysis, HbA1c etc. In addition we performed a detailed immunological evaluation. All immunological tests were performed in our immune-Laboratory at Third Medical Department and Policlinic. The Laboratory was designated a DASP laboratory by Centers for Disease Control (CDC) and Immunology of Diabetes Society (IDS) on April 17, 2002 (Dr. C. Jaeger: CDC-0136). The immunological evaluation included:

- Intradermal skin testing** to assess allergic reactions of the immediate and/or late type. The test panel includes histamine (1: 0.01%, positive control), sodium chloride (2: 0.9%, negative control), the Aventis test kit (Insuman® Testlösungen) with additives of insulin preparations and galenic components (3: NaH₂PO₄, Glycerol, Phenol, m-Cresol; 4: Glycerol, Phenol, m-Cresol; 5: Phenol, m-Cresol; 6: Phenol; 7: m-Cresol; 8: Protaminsulfat, Phenol, m-Cresol, Glycerol; 9: Protaminsulfat). In addition we included different insulins (5 U/ml) depending on the individual patient. The test results were recorded separately after 15 minutes for immediate type of reaction (type 1 allergy) and after 12 hrs and 48 hrs for assessing type 3 vs. type 4 reactions, respectively. This procedure allows to differentiate insulin specific allergy from an allergy directed to additives or galenic components e.g. protamine, phenol, cresol, etc.
- Quantification of insulin specific IgG/E:** Insulin specific IgG-levels were determined using radioimmuno-electrophoresis according to the Christiansen method (Christiansen, 1973). The detection limit of this assay is 0.01 mU/ml. The "normal range" of insulin treated patients was established using sera of n = 158 diabetic patients, exclusively treated with s.c. human insulin. The mean titre was 0.038 mU/ml (95%-CI: 0.025–0.052 mU/ml). Data were cross-checked for plausibility with the commercially available CentAK®-IAA-assay (Medipan, Selchow, Germany), approved in the first DASP workshop (Lab # 0136). Insulin specific IgE-levels were determined us-

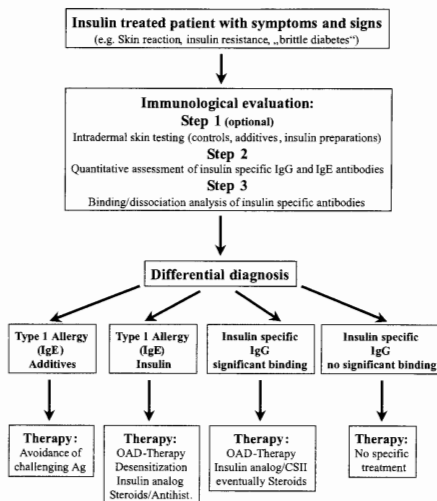


Fig.1 Proposed stepwise algorithm for differential diagnosis and management of different immune-mediated complications associated with subcutaneous insulin therapy.

ing the CAP-SYSTEM, Pharmacia, Uppsala, Sweden (normal: <0.35 KU/l).

- Time dependent binding/dissociation analysis:** In case of evidence for insulin specific antibodies during step 2 the insulin binding capacity of these antibodies should be analyzed in order to assess the clinical relevance of this phenomenon. To differentiate this, we used a modified method according to Kerp et al. (1966); Dixon (1974) and Kuzuya et al. (1977) in order to detect the insulin binding capacity of these specific antibodies and the time dependent dissociation of the insulin/antibody complexes. Briefly, endogenous insulin was extracted by preincubation with acid charcoal. Aliquots are then incubated with J¹²⁵-labeled recombinant human insulin. Methyl-cellulose is added serving as free insulin adsorbent after acidification. Bound/free separation is performed at different time points (0, 30, 60, 90, 120, 240 minutes) by centrifugation (pellet/free insulin adsorbed to methyl-cellulose vs. supernatant/antibody bound insulin) followed by separate quantification in a gamma well counter. This procedure allows to determine the initial percentage antibody-bound/neutralized insulin (normal range of initial binding: 4.3%, CI: 2.9–5.7%; n = 158 diabetic patients exclusively treated with s.c. human insulin). Subsequent analysis of the other aliquots at later time points provide an indication of the time dependent dissociation of the insulin/antibody complexes. Thus, it is possible to characterize the individual insulin binding capacity of the antibodies over time in order to qualify the clinical relevance of these antibodies and to monitor the success of therapeutic strategies.

Table 1 Immunological key findings using a stepwise diagnostic approach

	Type of diabetes	Skin testing positive reaction	Insulin specific antibodies		Binding/dissociation analysis	
			IgG (mU/ml)	IgE (KU/l)	initial (%)	dissociation
Pat. # 1	Type 1	-	0.37	-	68	delayed
Pat. # 2	Type 1	-	0.32	-	24	rapid
Pat. # 3	Type 2	protamine	-	-	-	-
Pat. # 4	Type 3 c	insulin	0.43	86	70	delayed

Normal values (n = 158 diabetic patients exclusively treated with human insulin): insulin specific IgG: 0.038 mU/ml (95%-CI: 0.025 – 0.052 mU/ml); IgE < 0.35 KU/l; initial binding: 4.3% (95%-CI: 2.9 – 5.7%)

Results

Patients were evaluated according to the proposed stepwise approach. For summary of the key findings we refer to Table 1.

Patient #1

A 24-year-old female patient with type 1 diabetes for 7 years. No diabetic secondary complications, mild hypertension, normal body weight (169 cm, 60 kg, BMI: 21), no residual insulin secretion (c-peptide fasting/post prandial < 0.1 ng/ml), no skin reactions at the injection sites. Intensified insulin therapy with Protaphane®, Semilente®, and Actrapid® since the time of diabetes onset. Presently, the leading problem is poor metabolic control (HbA1c 8.9%) due to hyperglycemia, several hospitalizations with diabetic ketoacidosis, and frequent episodes of predominantly nocturnal hypoglycemia despite repeated and extensive patient education. The insulin requirements temporarily reached more than 150 units a day. The immunological evaluation revealed: 1. Negative skin testing for additives and several insulin preparations. 2. High titres of insulin specific IgG (0.37 mU/ml) but no elevated insulin specific IgE which is in accordance with the absence of skin reactions. 3. The binding/dissociation analysis showed a significant initial insulin binding of 68% with delayed dissociation over time. Even after 2 hours 40% of the insulin is bound/neutralized (Fig. 2). In summary, the diagnosis in this patient is best described as "brittle diabetes" caused by neutralizing insulin specific IgG antibodies with delayed dissociation.

Patient #2

A 21-year-old female patient with type 1 diabetes for 12 years on intensified insulin therapy (Insuman basal® and Insuman rapid® at present). During antibody screening programs for potential diabetes associated autoimmune disorders this patient was incidentally diagnosed as being insulin antibody positive with significant titres but presented with good metabolic control (HbA1c 6.9%) and without any treatment related complications, especially no dermal reactions or increased rate of hypoglycemia. The immunological evaluation revealed: 1. Negative skin testing for additives and different insulin preparations. 2. High titres of insulin specific IgG (0.32 mU/ml) in the absence of insulin specific IgE. 3. By contrast, the binding/dissociation analysis showed an initial insulin binding of only 24% with rapid dissociation over time. After 2 hours only 4% of the insulin is bound/neutralized (Fig. 2). In this case, the insulin antibodies are clinically not rele-

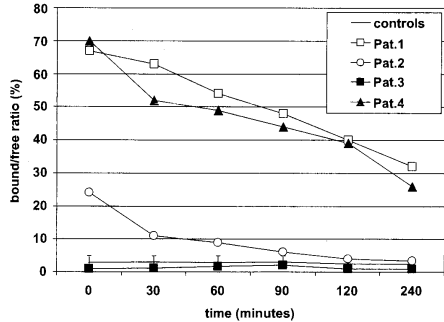


Fig. 2 Bound/free ratio in percent (%) of insulin binding IgG antibodies and dissociation over time assessed in sera of patients with immune-mediated complications associated with s.c. insulin therapy. Patient #1 and #4 exhibit very high initial insulin binding and subsequently delayed dissociation (normal value: 4.3%; 95%-CI: 2.9–5.7%; n = 158 control sera of diabetic patients exclusively treated with s.c. human insulin). After 2 hours approximately 40% of insulin is still antibody bound/neutralized. By contrast, patient #2 presents with only moderate initial insulin binding and rapid dissociation. Patient #3 shows no significant insulin binding.

vant and were classified as epiphenomenon. As a consequence, so far the insulin therapeutic regimen was not changed.

Patient #3

A 78-year-old female patient with type 2 diabetes for 18 years (172 cm, 69 kg, BMI: 23), oral antidiabetic drug treatment (OAD) for 16 years, subsequently insulin therapy with Insuman comb 25® twice daily. Hypertension, mild nephropathy, no signs for neuropathy or retinopathy. Interestingly, she presented with a preserved residual insulin secretory capacity (c-peptide fasting/post prandial 1.8 vs. 3.7 ng/ml). The leading problems were severe local reactions at the injection site, 10–15 min. after the insulin injection (itching, erythema, and swelling) and consecutively poor metabolic control with HbA1c of 8.6%. The immunological evaluations revealed: 1. Positive intradermal skin testing for protamine, negative skin testing for other additives or protamine free insulin preparations (Fig. 3). 2. No elevation of insulin specific IgG or IgE. 3. No significant insulin binding in the binding/dissociation analysis (Fig. 2). In this patient, an allergy



Fig. 3 Intra-dermal skin testing in patient #3: Negative control (1), positive control (2), positive reaction directed to protamine (8,9), whereas other additives tested negative (3–7). On the other forearm positive reactions against all protamine based formulations were present with negative reactions at all sites with protamine free insulin preparations (not shown).

Discussion

The immune response to insulin can elicit various reactions. Two types of antibodies to insulin are well defined. Insulin *auto*antibodies that appear in insulin-naïve subjects through prediabetic stages of type 1 diabetes. These insulin *auto*antibodies can be observed very early in life (Ziegler et al., 1999) and are used in algorithms for the prediction of type 1 diabetes (Jaeger et al., 1999). In the world literature few cases are reported of the “insulin autoimmune syndrome” caused by insulin *auto*antibodies in the absence of prior exposure to exogenous insulin and presenting with recurrent and severe hypoglycemia, hyperinsulinemia, and impaired glucose tolerance (Discher et al., 1990; Lohmann et al., 2001).

Conversely, insulin antibodies occur in patients who have been exposed to exogenous insulin treatment. Stimulation of the T- and B-cells can lead to the production of anti-insulin antibodies of the IgE and IgG class, and less frequently of the IgA, IgM, and IgD class (Velcovsky and Federlin, 1982; Federlin, 1985; Hobler et al., 1991; Scherthner, 1993).

against protamine was diagnosed as the cause of the local skin reaction with presumably affected insulin absorption. This complications resolved completely by avoidance of the challenging antigen, i.e. protamine in NPH-insulins.

Patient #4

A 57-year-old male patient with presumed “type 3 c diabetes” due to partial pancreatectomy because of a pancreatic mass suspicious for malignancy (not confirmed on histopathology). He was presented to our outpatient department with significant loss of pancreatic exocrine function and weight loss (82 → 64 kg, 170 cm, BMI: 22) despite enzyme substitution. Interestingly, c-peptide analysis revealed high plateau levels of fasting c-peptide (4.1 ng/ml) with no significant post prandial stimulation (4.5 ng/ml) indicating residual beta cell function but a high “peripheral insulin demand” even in the fasting situation (here caused by insulin neutralizing IgG antibodies, see below). The insulin regimen had been changed several times, finally Berlinsulin® 30/70 twice daily. At the time of presentation, his leading problem was a very severe local reaction 10–15 min. at all injection sites in use with itching, erythema, and swelling. In addition, he presented with very poor metabolic control (HbA1c 9.3%) due to frequent hyperglycemia. Since the surgery he had already suffered two hospitalizations because of diabetic ketoacidosis and several, again predominantly nocturnal, hypoglycemic episodes. The immunological evaluations revealed: 1. Positive skin testing for all types of insulin while intra-dermal testing for additives was negative. 2. Quantification of insulin specific antibodies showed very high titres of insulin specific IgG (0.43 mU/ml). Additionally, insulin specific IgE were extremely high (86 KU/ml), which is well in accordance with the positive dermal reaction. 3. The binding analysis demonstrated a significant initial binding of appr. 70% with delayed dissociation over time (Fig. 2). In this patient the diagnosis therefore comprises a combination of immunological complications: IgE mediated classical “insulin allergy” and additionally insulin neutralizing IgG antibodies both contributing to the significant problems in the daily management of the diabetes.

Two different mechanisms are considered to be the cause of immune-mediated complications in insulin treated individuals. Classically, insulin allergy presenting as type 1 allergy being mediated by insulin specific IgE antibodies and histamine release typically associated with severe dermal reactions at the injection site and consecutively deterioration of insulin absorption and metabolic control. The incidence of classical insulin allergy has decreased with the use of human recombinant insulin and is now reported in less than 1% of diabetic patients treated with insulin (Nagai et al., 1997; Eapen et al., 2000). Classical insulin allergy has to be separated from an allergy directed to additives, e.g. protamine. This was the case in our patient #3 but the diagnosis could be easily established through skin testing being only positive for protamine and confirmed by the negative results with regard to insulin specific IgE and IgG antibodies. This complication could be controlled simply by avoidance of NPH insulins. In view of the sufficient residual insulin secretion in this patient (c-peptide fast/pp 1.8 vs. 3.7 ng/ml) we restarted her on a combination of OAD therapy resulting in a good metabolic state (HbA1c 7.6%). Optionally, it would be possible to set her on prandial insulin therapy with regular insulin or analog if necessary in the future.

In contrast, generation of IgG antibodies to exogenous insulin is more frequent compared to insulin allergy even in the era of human recombinant insulins. The presence of insulin specific IgG antibodies is not necessarily associated with classical immunological insulin resistance of that type, that was observed in the last century while using impure insulin preparations or bovine/porcine insulins resulting in insulin requirements of several thousand units a day (Scherthner, 1993; Van Haeften et al., 1987). Even lower levels of insulin specific IgG antibodies against human recombinant insulin can influence insulin profiles by temporarily neutralizing insulin causing significant metabolic consequences e.g. poor metabolic control and severe hypoglycemia (Van Haeften, 1989). This was the case in our patient #1. The diagnostic approach revealed high titres of insulin specific IgG antibodies (0.37 mU/ml) with very high initial insulin binding

(68%) and delayed dissociation in the absence of dermal reactions or insulin specific IgE. Pharmacokinetics of insulin is unpredictable in the presence of such antibodies potentially causing delayed insulin peaks, prolonged duration of activity, increased risk for hypoglycemia, and varying bioavailability (Van Haeften, 1989). In order to adjust the insulin delivery to near optimal steady state conditions, we changed the therapeutic regimen in this patient and started her on continuous subcutaneous insulin infusion (CSII) using insulin aspart. Potentially, the immune reactivity against human insulin can be bypassed, at least partially, by using an analog. This has been shown for generalized insulin allergy by the use of lispro, insulin aspart, and glargine (Näf et al., 2002; Kumar, 1997; Eapen et al., 2000; Airaghi et al., 2001; Moriyama et al., 2001). Although the main immunogenic insulin epitopes remain unchanged in the lispro or insulin aspart molecule, it has been suggested that these analogs have reduced immunogenicity because of the rapid dissociation in monomers (Airaghi et al., 2001; Kumar, 1997). In our patient the combination of the beneficial effects of insulin pump therapy together with the use of an insulin analog (insulin aspart) improved metabolic control significantly (HbA1c 6.1%) and decreased the rate of hypoglycemic episodes. In the world literature there is only one case report using lispro in an insulin pump for treatment of immunological insulin resistance (Lahtela et al., 1997). To our knowledge we report here for the first time successful treatment of metabolic complications caused by insulin neutralizing IgG-antibodies by using insulin aspart in combination with continuous subcutaneous insulin infusion (CSII). Meanwhile, we have confirmed the beneficial effects of this regimen in six other type 1 diabetic patients presenting with the same phenotype of immunological complication.

However, an increased titre of insulin specific IgG does not mean automatically, that these immunoglobulins significantly neutralize insulin. Even significantly elevated antibody titres can be clinically irrelevant and staged as epiphenomenon in case of low-avid insulin antibodies and consecutively low insulin binding capacity. IgG-insulin antibodies of low levels have been reported in approximately half of diabetic patients (n = 578) after exclusive treatment with human insulin for 2 years (Scherthner, 1993). We confirmed these findings of low level insulin specific IgG in our control population of n = 158 diabetic patients who were treated exclusively with s.c. human insulin demonstrating a mean IgG-level of 0.038 mU/ml (CI: 0.025–0.052 mU/ml). To differentiate significant from non significant insulin binding, the binding/dissociation analysis (step 3 in our diagnostic approach) is essential. Patient #2 represents an example of significantly increased insulin specific IgG (0.32 mU/ml) that contribute only to a very low level of insulin binding (24%) with rapid dissociation (Fig. 2, patient #2). In view of the stable metabolic control in this patient these antibodies can be staged as clinically not relevant and are therefore without therapeutic consequence.

The findings in patient #4 represent a very rare case. The diagnostic algorithm had confirmed both mechanisms of immunological complications being present. Classical insulin allergy with dermal reactions and high titres of insulin specific IgE and additionally significant titres of insulin binding and neutralizing IgG antibodies. First, we tried a desensitization protocol accord-

ing to Galloway (Galloway and deShazo, 1990) but the patient did not respond. Despite partial pancreatectomy there was initially a residual endogenous insulin secretion. We therefore decided to try a maximum of OAD therapy (Biguanide, Sensitizer, Glinide) in order to avoid exogenous insulin therapy. This attempt was successful for four months only, then followed by complete deterioration of the residual insulin secretion (c-peptide decrease from 4.1 ng/ml to <0.6 ng/ml) and hospitalization because of ketoacidosis. The patient was now ultimately dependent on exogenous insulin supply. In the literature there is evidence for a combined therapy using corticosteroids and antihistamines in such situations (Ganz et al., 1990). We introduced corticosteroids (1 mg/kg) in combination with antihistamines (H1/2-antagonists) and started the patient on prandial therapy with lispro insulin. The steroid dosage was tapered according to the level of dermal reaction which was monitored carefully. This regimen was successful, his present medication comprises 12.5 mg Decortin-H in combination with antihistamines and prandial lispro therapy only. The metabolic situation is stabilized (HbA1c 7.4%) with a decreased rate of hypoglycemic episodes in the absence of dermal reactions. During follow-up we observed a significant decrease of insulin specific IgG and IgE levels.

In summary, we have demonstrated a diagnostic algorithm for the differential diagnosis as prerequisite for individual management of different forms of immune-mediated complications associated with subcutaneous insulin therapy (Fig. 1). An essential part of this diagnostic approach is the binding/dissociation analysis (step 3) in case of positive insulin specific IgG (step 2) giving information about the clinical significance of these antibodies. As shown, the proposed stepwise approach leads to a definite diagnosis providing a basis for differential and adjusted therapy.

Acknowledgements

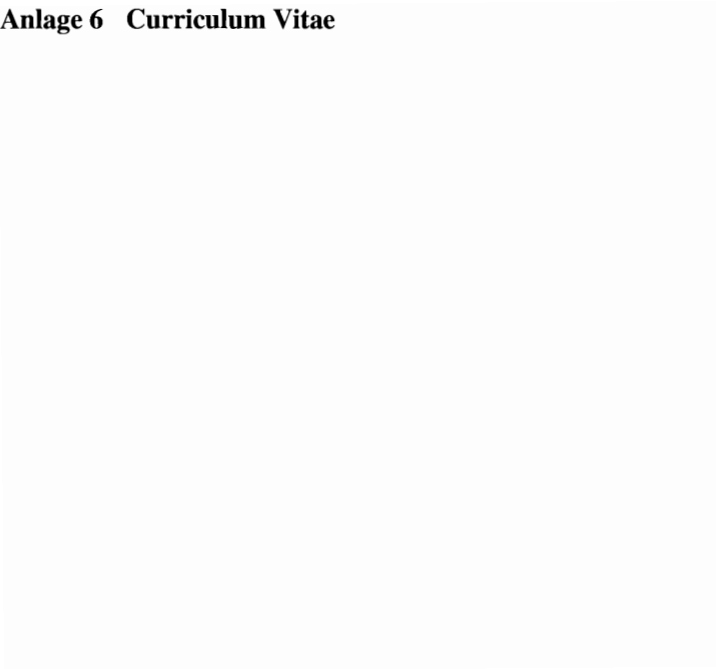
This paper is to acknowledge and honour the pioneering work of Professor emeritus Konrad Federlin diagnosing and treating insulin allergy. He was chairman and head of our department from 1976 to 1996 when he retired. He has celebrated his 75th birthday on August 15, 2003. The authors would like to express their gratitude to the local predecessors in this research and clinical field, Hans-Georg Velcovsky, Hubert Hobler, and Thomas Discher. We would like to thank Jutta Schmidt and Michael Stein, technicians, for expert technical assistance. We are grateful to Dr. D. Leihener, Aventis Pharma, for providing us with radiolabelled human recombinant insulin.

References

- 1 Airaghi L, Lorini M, Tedeschi A. The insulin analog aspart: a safe alternative in insulin allergy. *Diabetes Care* 2001; 24: 2000
- 2 Christiansen AH. Radioimmuno-electrophoresis in the determination of insulin binding to IgG. *Methodological studies. Horm Metabol Res* 1973; 5: 147–154
- 3 Discher T, Seipke G, Friedmann E, Velcovsky HG, Federlin K. Recurrent hypoglycemia in the insulin autoimmune syndrome. *Dtsch Med Wochenschr* 1990; 115: 1950–1955

- ⁴ Dixon K. Measurement of antibodies to insulin in serum. *Clin Chem* 1974; 20: 1275–1281
- ⁵ Eapen SS, Connor EL, Gern JE. Insulin desensitization with insulin lispro and an insulin pump in a 5-year-old child. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 18: 395–397
- ⁶ Federlin K. Diabetes mellitus and immunology – a manifold interrelation. *Immun Infekt* 1985; 13: 1893–1899
- ⁷ Francis AJ, Hanning I, Alberti KGGM. The influence of insulin antibody levels on the plasma profiles and action of subcutaneously injected human and bovine short acting insulins. *Diabetologia* 1985; 28: 330–334
- ⁸ Galloway JA, deShazo RD. Complications of insulin treatment. In: Ellenberg M, Rifkin H (Eds). *Diabetes Mellitus: Theory and Practice*. New Hyde Park: NY Med Exam, 1990: 506–508
- ⁹ Ganz MG, Untermann T, Roberts M, Uy R, Sahgal S, Samter M, Grammer LC. Resistance and allergy to recombinant human insulin. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 45–52
- ¹⁰ Hobler H, Zoltbrocki M, Scherthaner G, Schnack C, Federlin K. Formation of protamine, insulin, and native NPH-human insulin antibodies in diabetic patients treated with NPH-human insulin. One year observation study. *Diab Nutr Metab* 1991; 4: 275–281
- ¹¹ Jaeger C, Hatzigelaki E, Stroedter A, Becker F, Scherer S, Petzoldt R, Federlin K, Bretzel RG. The Giessen-Bad Oeynhausen family study: improved prediction of type 1 diabetes in a low incidence population of relatives using combinations of islet autoantibodies in a dual step model. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999; 107: 496–505
- ¹² Kerp L, Steinhilber S, Kasemir H. Ein Verfahren zum Nachweis insulinbindender Antikörper durch Differentialadsorption. *Klin Wschr* 1966; 90: 806–814
- ¹³ Kumar D. Lispro analog for the treatment of generalized allergy to human insulin. *Diabetes Care* 1997; 20: 1337–1359
- ¹⁴ Kuzuya H, Blix PM, Horwitz DL, Steiner DF, Rubenstein AH. Determination of free and total insulin and c-peptide in insulin treated diabetics. *Diabetes* 1977; 26: 22–29
- ¹⁵ Lahtela JT, Knip M, Paul R, Antonen J, Salmi J. Severe antibody-mediated human insulin resistance: successful treatment with the insulin analog lispro. A case report. *Diabetes Care* 1997; 20: 71–73
- ¹⁶ Lohmann T, Kratzsch J, Kellner K, Witzigmann H, Hauss J, Paschke R. Severe hypoglycemia due to insulin autoimmune syndrome with insulin autoantibodies crossreactive to proinsulin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001; 109: 245–248
- ¹⁷ Moriyama H, Nagata M, Fujihira K, Yamada K, Chowdhury SA, Chakrabarty S, Zhenzi J, Yasuda H, Ueda H, Yokono K. Treatment with human analog insulin glargine resolves a generalized allergy to human insulin in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24: 411–412
- ¹⁸ Näf S, Esmatjes E, Recasens M, Valero A, Halperin I, Levy I, Gomis R. Continuous subcutaneous insulin infusion to resolve an allergy to human insulin. *Diabetes Care* 2002; 25: 634–635
- ¹⁹ Nagai T, Nagai Y, Tomizawa T, Mori M. Immediate-type human insulin allergy successfully treated by continuous subcutaneous insulin infusion. *Intern Med* 1997; 36: 575–578
- ²⁰ Scherthaner. Immunogenicity and allergic potential of animal and human insulins. *Diabetes Care* 1993; 16: 155–165
- ²¹ Van Haeften TW, Heiling VJ, Gerich JE. Adverse effects of insulin antibodies on postprandial plasma glucose and insulin profiles in diabetic patients without immune insulin resistance. Implications for intensive insulin regimens. *Diabetes* 1987; 36: 305–309
- ²² Van Haeften TW. Clinical significance of insulin antibodies in insulin-treated diabetic patients. *Diabetes Care* 1989; 12: 641–648
- ²³ Velcovsky HG, Federlin K. Insulin-specific IgG and IgE antibody response in type 1 diabetic subjects exclusively treated with human insulin (recombinant DNA). *Diabetes Care* 1982; 5: 126–128
- ²⁴ Von Kriegstein E, Schatz H. Insulin. In: Schatz H (ed). *Diabetologie kompakt, Grundlagen und Praxis*. 2nd ed. Berlin, Wien: Blackwell, 2002: 86–101
- ²⁵ 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* 1999; 48: 460–468

Anlage 6 Curriculum Vitae



PD DR. MED. CLEMENS JAEGER

geb. am 06.10.1966 in Wesel am Niederrhein als drittes Kind der Eheleute Dipl. Ing. Theo Jaeger, Architekt und Helene Jaeger, geb. Baumanns; verheiratet mit Dr. med. Rosa-Maria Kreisz-Jaeger, Fachärztin für Allgemeinmedizin; zwei Kinder, Alena und Dominik.

AUSBILDUNG:

- 1972 - 1985** Schulbesuch mit Abitur am Konrad-Duden Gymnasium in Wesel
- 1985 - 1987** Ausbildung zum Organisten und Chorleiter mit C-Examen für Kirchenmusik im Bistum Münster
- 1986 - 1992** Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig Universität in Gießen
- Elective student in Immunology/Rheumatology, Medical University of South Carolina, Charleston, S.C., USA (7/89 - 9/89)
- PJ, Innere Medizin, United Medical and Dental School of Guy's and St. Thomas's Hospitals, University of London, GB (2/92 - 5/92)
- 02/93 - 07/94** Arzt im Praktikum und Zivildienst an der Med. Klinik und Poliklinik III, Justus-Liebig Universität, Gießen, Ärztliche Approbation: 10/08/1994
- seit 08/94**
- Wissenschaftlicher Assistent an vorgenannter Klinik. Leitung: Prof. Dr. med. Drs.h.c. K. Federlin, seit 11/96 Prof. Dr. med. R.G. Bretzel
 - Institut für Diagnostische Radiologie der Justus-Liebig Universität, Gießen (Prof. Dr. W. Rau): Nativradiologie und Sonografie (4/95 - 10/95)
 - Med. Klinik und Poliklinik I der Justus-Liebig Universität, Gießen (Prof. Dr. H. Tillmanns): Kardiopulmonale Diagnostik, Ambulanz (9/96 - 8/97)
 - Med. Klinik und Poliklinik II der Justus-Liebig Universität, Gießen (Prof. Dr. W. Seeger): Intensivmedizin (9/97 - 6/98)
 - Schwerpunkt Endokrinologie und Diabetologie der Med. Klinik und Poliklinik III der Justus-Liebig Universität, Gießen (Prof. Dr. R.G. Bretzel): Station, Ambulanz, Labor (7/98 - 06/01)
 - Bereich Gastroenterologie und Stoffwechsel der Med. Klinik und Poliklinik III (Prof. Dr. H. Klör): Endoskopie, Ambulanz (seit 7/01)
 - Weiterbildungsassistent im Schwerpunkt Gastroenterologie und Stoffwechsel an der Klinik Innere Medizin II der HSK Wiesbaden (Prof. Dr. C. Ell): Endoskopie und Sonografie (04/04 - 12/04)
- 15.08.2001** Facharzt für Innere Medizin
- 12.11.2002** Diabetologe DDG
- 03.06.2003** FK Strahlenschutz: Röntgendiagnostik des Abdomen
- 27.04.2005** Facharzt für Gastroenterologie und Stoffwechsel
- 12.05.2005** Habilitation für das Fach Innere Medizin am Fachbereich der Justus-Liebig Universität Gießen (01.07.2005: Venia legendi, Privatdozent)
- seit 03/05** Oberarzt am Zentrum für Innere Medizin, Med. Klinik und Poliklinik III, Universitätsklinikum, Justus-Liebig Universität, Gießen

WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG:

1994	Abschluß der Dissertationsarbeit „Xenogene Transplantation Langerhanscher Inseln der Ratte ohne Immunsuppression des Empfängers am Modell des experimentellen Diabetes mellitus der Maus“. Promotion: 12/12/1994 (Magna cum laude). Doktorvater: Prof. Dr. med. R.G. Bretzel
10/94 - 12/94	Research fellow am Hagedorn Research Institute in Gentofte, Dänemark. Assayentwicklung zum Nachweis von GAD 65 Antikörpern
seit 1994	Leiter der Giessen-Bad Oeynhausen Familienstudie zur Prädiktion des Typ 1 Diabetes
seit 1995	Nationaler Studienkoordinator der deutschen Beteiligung am „European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial-ENDIT“ zur Diabetesprävention
seit 1996	Leiter der Arbeitsgruppe Immunendokrinologie und Leitung des Immunologischen Labors an der Med. Klinik und Poliklinik III der Justus-Liebig Universität, Gießen
17.04.2002	Akreditierung des vorgenannten Labors als DASP-Referenzlabor für die Bestimmung von GAD 65 Ak, IA-2-Ak und IAA unter Kontrolle der Centers for Disease Control and Prevention (CDC-0136-Jaeger)
seit 2004	„Core Laboratory“ für die Deutschlandweite multizentrische Studie zur Charakterisierung von Insulin-Ak bei Kindern mit Typ 1 Diabetes (Finanzierung durch die Stiftung „Das zuckerkranke Kind“)
seit 2004	Projektleiter (B4) im Rahmen des Forschungsschwerpunktes "Mensch-Ernährung-Umwelt" an der Justus-Liebig Universität. Thema: Charakterisierung des klinischen und immunologischen Phänotyps bei MAP-infizierten Patienten mit M. Crohn

PREISE UND AUSZEICHNUNGEN:

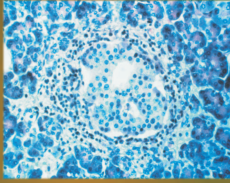
1998	Posterpreis der DDG anlässlich der 33. Jahrestagung in Leipzig für die beste Posterpräsentation der Jahrestagung
1998	Publikationspreis der III. Med. Klinik und Poliklinik, JLU Gießen für Autoantikörperuntersuchungen bei Inselzelltransplantierten Patienten
2001	Silvia-King Preis der Deutschen Diabetes Gesellschaft für vergleichende Analyse organspezifischer Autoantikörper und Zöliakie assoziierter Antikörper bei Typ 1 Diabetikern, Verwandten 1. Grades und Kontrollen

ARBEITSSCHWERPUNKTE:

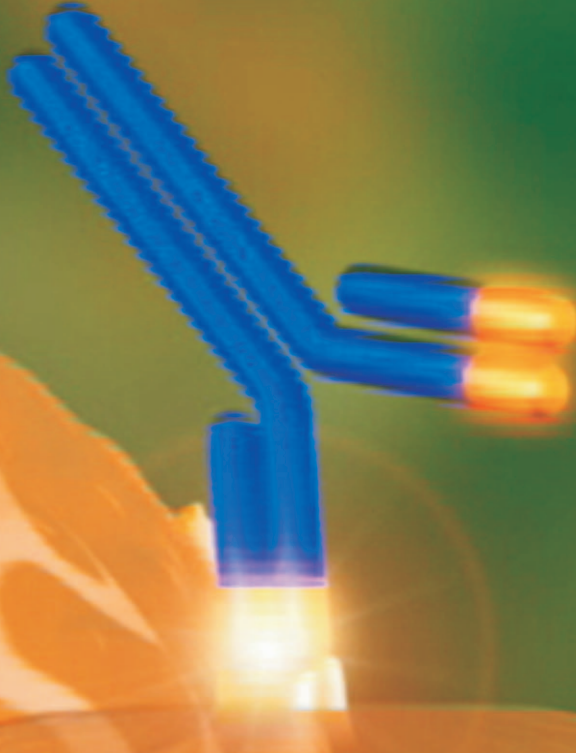
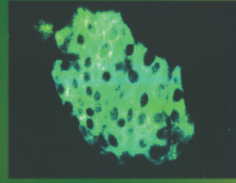
1. Immunologie und Diabetes mellitus
2. Zöliakie im Erwachsenenalter
3. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
4. Interventionelle Endoskopie

MITGLIEDSCHAFTEN:

Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM), Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG), European Association for the Study of Diabetes (EASD), Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGI), Immunology of Diabetes Society (IDS), Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS)



D
iabetes
A
utoantibody
S
tandardization
P
rogram



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
Email: vvb-ips@t-online.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-082-3



9 783896 870827