Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Thomas Seufferlein

Antikörperprofile beim spät-manifestierten Typ 1 Diabetes

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Dorothee Elisabeth Quack
Wuppertal

2014

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Bernhard Böhm
2. Berichterstatter:	Prof. Martin Wabitsch
Tag der Promotion:	18.12.2014

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN III

1. EINLEITUNG 1

1.1 Klassifikation des Diabetes 1

1.2 Spät-manifestierter autoimmuner Diabetes 1

1.3 Pathophysiologie des autoimmunen Diabetes 2

1.4 Immunologische Marker beim autoimmunen Diabetes 6

1.5 Metabolische Veränderungen 13

1.6 Diagnosekriterien LADA 14

1.7 Fragestellung 15

2. MATERIAL UND METHODEN 16

2.1 Patientenseren 16

2.2 Antikörperanalysen 17

2.3 Statistik 30

3. ERGEBNISSE 31

3.1 Bedeutung von ZnT8 bei spät-manifestiertem autoimmunem Diabetes 31

3.2 Bedeutung von Schilddrüsenautoimmunität bei spät-manifestiertem autoimmunem Diabetes 39

3.3 Bedeutung von Darm-assoziierter Autoimmunität bei spät-manifestiertem autoimmunem Diabetes 46

3.4 Prävalenz verschiedener Antikörper in Abhängigkeit vom GAD-Titer 58

3.5 Häufigkeitsverteilung verschiedener Antikörper in Abhängigkeit von der Höhe des Antikörpertiters 60

4. DISKUSSION 64

4.1 Bedeutung des GAD-Titers in Bezug auf die Prävalenz weiterer Antikörper 64

4.2 Bedeutung der Anzahl positiv getesteter Diabetes-spezifischer Antikörper in Bezug auf die Prävalenz weiterer Antikörper 67

4.3 Weitere Analysen von ZnT8 und TPO bei spät-manifestiertem autoimmunem Diabetes 69

4.4 Häufigkeitsverteilungen verschiedener Antikörper in Abhängigkeit von der Höhe des Antikörpertiters 72

4.5 Bewertung der Ergebnisse 73

5. ZUSAMMENFASSUNG 79

6. LITERATURVERZEICHNIS 81

ANHANG 91

DANKSAGUNG 91

LEBENSLAUF 96

ABKÜRZUNGEN

AIRE	Autoimmun-Regulator-Gen
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS-1/ APS-2	Autoimmunes polyendokrines Syndrom Typ 1/ Typ 2
CML	N(ε)-Carboxymethyl-Lysin
CTLA4	mit zytotoxischen T-Lymphozyten assoziiertes Protein 4
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, (Antikörper basiertes Nachweisverfahren)
FOXP3	Transkriptionsfaktor für regulatorische T-Zellen
GAD	Glutamat-Decarboxylase
HDL	Lipoprotein mit hoher Dichte
HLA	humanes Leukozytenantigen
IA-2/ICA-512	Antikörper gegen Tyrosinphosphatase 2
ICA	Inselzellantikörper
IFIH1	Intrazellulärer mustererkennender Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPEX	Immundysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-assoziiert
ITPR3	Inositol 1,4,5 Triphosphat-Rezeptor 3
LADA	Latenter Autoimmundiabetes des Erwachsenen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
NOD Mouse	nicht-adipöse diabetische Maus
nsSNP	nicht-synonymer Einzelnukleotidpolymorphismus
PTPN22	Protein Tyrosinphosphatase, Nicht-Rezeptor Typ 22
SLC30A8	Zink Transporter 8
TCF7L2	Transkriptionsfaktorgen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TG	Thyreoglobulin
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β
TPO	Schilddrüsenperoxidase
ZnT8	Zinktransporter 8 (siehe SLC30A4)

1. EINLEITUNG

1.1 Klassifikation des Diabetes

Diabetes mellitus ist der Überbegriff für eine Reihe von Stoffwechselstörungen, die alle durch eine chronische Hyperglykämie gekennzeichnet sind. Vom Typ 2 Diabetes, der sich von einer vorwiegenden Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz erstrecken kann und häufig mit anderen Problemen eines sogenannten metabolischen Syndroms assoziiert ist, wird der meist immunologisch vermittelte Typ 1 Diabetes unterschieden. Dieser geht mit einer immun-vermittelten Zerstörung der β-Zellen im endokrinen Pankreas einher und führt dadurch zu einem absoluten Insulinmangel (Kerner et al., 2010). Diagnostiziert wird der autoimmune Diabetes Typ 1a durch den Nachweis Diabetes-assoziierter Antikörper im peripheren Blut wie GADA, ICA, IA-2 und IAA.

1.2 Spät-manifestierter autoimmuner Diabetes

Typischerweise manifestiert sich autoimmuner Diabetes im Kindes- und Jugendalter. Die Gruppe der im Erwachsenenalter manifestierten Diabetiker ist weitaus heterogener: Immer häufiger werden auch hier autoimmune Formen identifiziert, die zuvor dem nicht immunologisch bedingten Typ 2 Diabetes zugeordnet waren (United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS), 1995). Den Grundstein für diese Erkenntnis legten 1974 Irvine und Mitarbeiter, die bei 11% der Typ 2 Diabetiker ICA-Antikörper nachweisen (Irvine et al., 1977). Im Gegensatz zu den ICA-negativen Typ 2 Diabetikern versagte bei diesen Patienten die medikamentöse Therapie mit Sulfonylharnstoffen häufiger, und schon früh wurde eine Behandlung mit Insulin erforderlich. Zimmet führte 1995 den Begriff „latent autoimmune diabetes of adults“ (LADA) ein (Zimmet, 1995) und beschrieb damit eine Gruppe erwachsener Patienten, die sich klinisch wie Typ 2 Diabetiker präsentierten, aber bei denen Antikörper gegen das Inselzellantigen nachgewiesen werden konnten und damit per definitionem eine humorale Autoimmunität vorlag. Diese Patienten wurden schneller insulinabhängig als die ICA-negativen Patienten, waren nicht übergewichtig, die typischen Symptome Ketoazidose und Gewichtsverlust jedoch fehlten.

Heute werden innerhalb dieser Gruppe spät-manifestierter Diabetespatienten als autoimmun bedingte Typen

- im Erwachsenenalter manifestierter Typ 1 Diabetes mellitus („adult onset type 1 diabetes“),
- latententer autoimmuner Diabetes des Erwachsenen („latent autoimmune diabetes of adults“, LADA), sowie
- langsam progredienter insulinabhängiger Diabetes mellitus („slowly progressive insulin-dependent diabetes mellitus“)

unterschieden, wobei letztere wegen mangelnder therapeutischer Konsequenzen meist zusammengefasst werden (Merger et al., 2013). Die größte und am meisten diskutierte Gruppe ist der sog. LADA-Typ.

1.2.1 Epidemiologie

Zwei deutschen Untersuchungen zufolge konnten bei 21-25% der klinisch als Typ 2 Diabetes diagnostizierten Patienten Antikörper gegen GAD nachgewiesen werden (Reinsch et al., 2003; Schiel et al., 2000). International lag die Prävalenz für eine GADA-Positivität bei erwachsenen Typ 2 Diabetikern abhängig von Patientencharakteristika zwischen 3 und 50% (Giani et al., 2004).
Giani und Mitarbeiter schätzen, dass deutschlandweit im Erwachsenenalter etwa 500.000 Patienten an einem verzögert auftretenden Typ 1 Diabetes (LADA) leiden (Giani et al., 2004).

1.3 Pathophysiologie des autoimmunen Diabetes

1.3.1 genetische Faktoren

Polygenetische Vererbung

Bei der Veranlagung zur Entwicklung eines Typ 1 Diabetes spielen zahlreiche Gene eine Rolle (Holl et al., 1999).
Das wichtigste Suszeptibilitätsgen ist in der HLA-Region auf Chromosom 6 lokalisiert (Steck et al., 2010). Dieses Gen kodiert MHC-II-Proteinkomplexe, die an der Auslösung einer Immunantwort beteiligt sind, indem sie den T-Zellen Antigene präsentieren. Polymorphismen im Bereich der HLA-Region sind bis zu 40% am

genetischen Risiko für die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes beteiligt (Aly et al., 2006).

Die Mehrzahl der kaukasischen Diabetespatienten haben HLA-DR3 oder HLA-DR4 Klasse-II-Allele und 30-50% der Patienten sind DR3/DR4 heterozygot. Der DR3/4 Genotyp ist assoziiert mit dem höchsten Diabetesrisiko, gefolgt von DR4 und DR3 homozygoten Patienten (Steck et al., 2010; Thomson et al., 2007). Awa und Mitarbeiter stellten einen Zusammenhang zwischen dem HLA-DR-Genotyp und dem Alter bei Erstmanifestation des Diabetes fest: 25,2% der im Alter unter 6 Jahren an Diabetes erkrankten Kinder trugen den HLA-DR3/4-Genotyp, während ältere Kinder im Alter über 12 Jahren vor allem den Genotyp HLA-DR X/X trugen (18,1%) (Awa et al., 2010).

Der HLA DQ-Lokus ist am stärksten mit Diabetes assoziiert. Das HLA-DQ-Molekül ist ein Heterodimer aus zwei Ketten (α- (DQA1) und β-(DQB1) Kette). Dabei haben die Heterodimere, die durch DQA1*0301, DQB1*0302 und DQA1*0501, DQB1*0201 kodiert sind, die stärkste Assoziation mit Diabetes (Steck et al., 2010). Diese Haplotypen kommen bei 40% der Kinder mit Typ 1 Diabetes vor, im Gegensatz zu nur 2% bei der restlichen US-Bevölkerung (Powers, 2009).

HLA DQ-Allele sind genetisch eng mit HLA-DR3- und HLA-DR4-Allelen verknüpft. Zu den Hochrisiko-Klasse-II-Haplotypen zählen mit DR4 assoziierte DQB1*0302-Allele. Dabei konnte eine abnehmende Prädisposition der DR4-Allele DRB1*0405, *0401, *0402 im Vergleich zu *0404 und weiterhin eine Abnahme im Vergleich zu *0403 nachgewiesen werden (Thomson et al., 2007).

Neben prädisponierenden HLA-Genloki gibt es auch protektive Haplotypen wie DQB1*0602 (Eisenbarth, 2007; Pugliese et al., 1995).

Außer dem HLA-Genlokus sind noch weitere prädisponierende Genloki bekannt. Dazu zählen die Gene von Insulin, PTPN22 (proteintyrosinephosphatase, nonreceptor type 22), CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associatedprotein 4), IFIH1 (interferon induced with helicase C domain 1), ITPR3 (inositol 1,4,5-triphosphate receptor 3) und IL-2 Rezeptor (Aly et al., 2006; Eisenbarth, 2007). Viele der Proteine, die durch diese Gene kodiert werden, sind bedeutsam für die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts des Immunsystems und beeinflussen dadurch die Entstehung einer Autoimmunität (Bluestone et al., 2010).

Obwohl viele prädisponierende Gene identifiziert wurden, liegt die Konkordanz bei eineiigen Zwillingen bei Querschnittsstudien nur bei 30-40%. In einer Langzeit-

Follow-up Studie konnte jedoch im Alter von 60 Jahren eine Konkordanz von 65% festgestellt werden (Redondo et al., 2008). Das lässt darauf schließen, dass noch weitere Faktoren bei der Entwicklung eines Typ 1 Diabetes eine Rolle spielen. (Lafferty, 2011).

Monogenetische Vererbung

Es sind drei seltene, genetisch bedingte Syndrome bekannt, die zu autoimmunem Diabetes führen. Hierzu zählen APS-1 und -2, (autoimmune polyendocrine syndrome type 1, type 2) und IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) (vgl. unten).

Genetische Faktoren bei LADA

Ähnlich wie beim Typ 1 Diabetes ist auch beim LADA die Häufigkeit für DRB1*03/DRB1*04-DQB1*0302 erhöht. Dabei zeigt sich ein deutlicher Unterschied im Vorkommen dieser Risikoallele in den verschiedenen Altersgruppen: In der Altersgruppe der 25- bis 34-Jährigen beträgt die Prävalenz für diese Genotypen 32%, in der Altersgruppe der 55- bis 65-Jährigen nur 10% (Horton et al., 1999). Auch Hosszúfalusi und Mitarbeiter zeigten, dass die Prävalenz der prädisponierenden HLA-DQB1*0302, -DR4, -DR3 und –DR3/DR4 Genotypen und des DR4-DQB1*0302 Haplotyps bei LADA im Vergleich zur Gesamtbevölkerung erhöht ist (Hosszufalusi et al., 2003).

In einer Studie von Howson und Mitarbeitern wurden Antikörper-positive erwachsene Diabetespatienten in Bezug auf 20 Genloki untersucht, die typischerweise mit im Kindesalter manifestiertem Typ 1 Diabetes in Zusammenhang stehen. Hier zeigte sich, dass 9 der untersuchen Genloki ebenfalls eine starke Assoziation mit im Erwachsenenalter manifestiertem Diabetes haben. Das spricht dafür, dass es nur eine begrenzte Anzahl altersabhängiger genetischer Effekte beim Typ 1 Diabetes gibt und die langsamere Progression zur manifesten Erkrankung beim erwachsenen Patienten möglicherweise einer insgesamt geringeren genetischen Last geschuldet ist (Howson et al., 2011).

Auch die Ergebnisse einiger Zwillingsstudien weisen darauf hin, dass die genetische Prädisposition bei autoimmunem Diabetes mit höherem Manifestationsalter abnimmt. In einer Zwillingsstudie wurden monozygote

Zwillinge diabetischer Eltern untersucht. Bei früher Diabetesmanifestation der Eltern (Manifestation im Alter von 24 Jahren und jünger) war das Risiko der Zwillinge, ebenfalls zu erkranken, deutlich höher (38%), als bei späterer Manifestation (im Alter von 25 Jahren und älter) bei den Eltern (6%) (Redondo et al., 2001). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in einer finnischen Zwillingsstudie. Hier war das Risiko für einen autoimmunen Diabetes am höchsten bei den Zwillingspärchen, bei denen ein Zwilling schon sehr früh an Diabetes erkrankte (Hyttinen et al., 2003).
Diese geringe Übereinstimmungsrate bei Zwillingen bei spät-manifestiertem autoimmunem Diabetes kann darauf schließen lassen, dass genetische Einflüsse bei LADA geringer ausgeprägt sind als bei juvenilem Typ 1 Diabetes und dass möglicherweise Umweltfaktoren hier eine größere Rolle spielen (Teng et al., 2006).

1.3.2 Umweltfaktoren beim autoimmunen Diabetes

In den letzten Jahren war ein kontinuierlicher Anstieg der Inzidenz von Typ 1 Diabetes vor allem in den Industrienationen zu verzeichnen (Giani et al., 2004). Daher liegt die Vermutung nahe, dass Umweltfaktoren einen Einfluss auf die Krankheitsentwicklung haben.
Hierauf begründet sich die „hygiene hypothesis“, derzufolge eine geringere Exposition gegenüber mikrobiellen Stimuli, sowie eine geringe Anzahl von Infektionen im Kindesalter das Auftreten von Typ 1 Diabetes begünstigt, möglicherweise durch geringere Stimulation regulatorischer T-Zellen (Eisenbarth et al., 2004; Bluestone et al., 2010; Eisenbarth, 2007).
In einer Zwillingsstudie bildete sich das im Serum bestimmte Glykotoxin CML (N(ε)-Carboxymethyl-Lysin) als Endprodukt der Glykolysierung als weiterer durch die Umwelt beeinflusster Risikofaktor für Diabetes heraus. Hier zeigte sich, dass die familiäre Umgebung 75% der CML-Varianz bei Zwillingen erklärt (Beyan et al., 2012).
Weitere Umweltfaktoren, bei denen ein Zusammenhang mit der Auslösung eines Typ 1 Diabetes diskutiert wird, sind Ernährung (Kuhmilch (Knip et al., 2010), Getreideprodukte, Insulin in Milch, Mangel an Vitamin D oder ω-3-Fettsäuren) und Viren, vor allem Enteroviren (Yeung, 2011; Eisenbarth, 2007).

Da der Selektionsdruck gering und die Rate der HLA-Polymorphismen relativ konstant ist, kann die steigende Inzidenz des autoimmunen Diabetes nicht allein durch genetischen Selektionsdruck und HLA-Gene bestimmt sein, und es ist sehr wahrscheinlich, dass auch nicht-genetische Faktoren eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung eines autoimmunem Diabetes haben (Teng et al., 2006; Beyan et al., 2012).

1.4 Immunologische Marker beim autoimmunen Diabetes

Kennzeichen der autoimmunbedingten β-Zell-Schädigung sind diabetesspezifische Antikörper wie Inselzellantikörper und GAD-Antikörper. Sie sind schon vor dem Auftreten klinischer Symptome nachweisbar und bei 70-80% der Typ 1 Diabetiker vorhanden (Turner et al., 1997).

1.4.1 Diabetesspezifische Antikörper bei autoimmunem Diabetes

Inselzellantikörper

Vor über 30 Jahren wurden durch einen morphologischen immunhistochemischen Test das erste Mal Autoantikörper nachgewiesen, die an gefrorenen Pankreaspräparaten bestimmte Proteine binden (islet cell antibodies, ICA) (Bottazzo, 1974). Später konnte ein Großteil der β-Zell-Antigene durch biochemische Analysen identifziert werden (Yu et al., 2010; Pihoker et al., 2005). Dabei handelt es sich um die Enzyme Glutamatdecarboxylase (GAD) und Tyrosinphosphatase (IA-2), den Zinktransporter ZnT8 und Insulin selbst (Pihoker et al., 2005). Heute sind diese vier Antigene als rekombinante Proteine verfügbar, die radioaktiv markiert werden können, sodass Antikörper in RIA-Analysen bestimmt werden können (Pihoker et al., 2005). Dass die ICA-Reaktivität nicht immer mit der Reaktivität gegenüber den identifizierten Autoantigenen korreliert, lässt vermuten, dass noch weitere, bisher nicht identifizierte Autoantigene existieren (Mansson et al., 2001).

GAD-Antikörper

Das Enzym GAD katalysiert die Synthese des Neurotransmitters GABA (γ-Aminobuttersäure) in Nervensystem und Inselzellen. Außerhalb der Inseln, wo es in α-, β- und δ-Zellen exprimiert wird, kommt es auch in Hoden, Eierstöcken und

Neuronen vor. Es gibt zwei Isoformen dieses Enzyms, GAD65 und GAD67, die eine identische Exon-Intron-Struktur haben und zu 76% in ihrer Aminosäuresequenz übereinstimmen. Antikörper gegen GAD65 können bei 80% der Patienten mit autoimmunem Typ 1 Diabetes gefunden werden, während GAD67 nur bei 11-18% nachweisbar ist (Yu et al., 2010).

IA-2-Antikörper

Die Tyrosinphosphatase IA-2 (ICA512) bzw. IA-2β (Phogrin = phosphatase of granules of rat insulinoma) sind bezüglich ihrer C-terminalen intrazytoplasmatischen Domänen, gegen die die meisten Antikörper gerichtet sind, überwiegend homolog. Fast alle Antikörper, die mit IA-2β reagieren, reagieren auch mit IA-2, während etwa 10% der Patienten, die einen Typ 1 Diabetes entwickeln, Antikörper gegen IA-2 haben, die nicht gegen IA-2β gerichtet sind. Daher werden IA-2β routinemäßig nicht bestimmt. Zwei Epitope sind besonders interessant: ein Mini-Epitop, das nur 51 Aminosäuren des ICA512-Moleküls umfasst, mit dem aber 56% der Patienten mit ICA512-Antikörpern reagieren. Das zweite Epitop befindet sich in der juxtamembranen Region. Antikörper gegen dieses Epitop gehören zu den ersten Antikörpern, die bei prädiabetischen Patienten nachgewiesen werden können (Yu et al., 2010).

Insulin-Antikörper

Insulin ist ein 51 Aminosäuren langes, mit einer Disulfidbrücke verbundenes Heterodimer, das in den β-Zellen der Insel produziert wird. Insulin wird als Präprohormon gebildet, das in den Granula der β-Zellen zu Proinsulin prozessiert wird und nach Entfernung des verbindenden Peptids (C-Peptid) zu reifem Insulin wird. Die Speicherung von Insulin erfolgt in kristalliner Form innerhalb der Sekretgranula. Bei Freisetzung werden äquimolare Mengen von Insulin und C-Peptid sezerniert.

Insulin und Proinsulin sind β-Zell-spezifische Autoantigene. Außerhalb des Pankreas kommen Proinsulin-mRNA und Proinsulin nur im Thymus vor und spielen dort vermutlich eine Rolle bei der Negativselektion autoreaktiver T-Zellen (Yu et al., 2010).

ZnT8-Antikörper

ZnT8 ist ebenfalls stark β-Zell-spezifisch und gehört zu einer großen Kation-Efflux-Transporter-Familie, von denen mindestens 7 in den pankreatischen Inseln exprimiert werden. Kodiert wird ZnT8 durch das Gen SLC30A8 (Solute carrier family 30, member 8). ZnT8 ist ein Transmembranprotein der sekretorischen Vesikel der β-Zellen, wobei die sechs transmembranen Regionen etwa die Hälfte des Moleküls ausmachen. Man geht davon aus, dass ZnT8 die Konzentration von Zn^{2+} im Lumen der Granula reguliert (Pihoker et al., 2005; Wenzlau et al., 2007). Damit wäre ZnT8 an der Regulation der Insulinsekretion beteiligt, was für viele β-Zell- und Schilddrüsenantigene zutrifft.

Es besteht auch ein Zusammenhang zwischen ZnT8-Polymorphismen und Typ 2 Diabetes. Die beim Typ 2 Diabetes beobachteten, nicht-synonymen Einzelnukleotid-Polymorphismen (nsSNP) kodieren Arginin oder Tryptophan bei aa325. Das bedeutendere, Arg325 enthaltende C-Allel überträgt ein geringes Risiko für die Erkrankung. Bei nichtdiabetischen Testpersonen mit familiärer Typ 2 Diabetes-Belastung war das C-Allel mit erhöhter Insulinsensitivität, erhöhtem Proinsulin/Insulin-Quotienten und verminderter Insulinantwort beim intravenösen Glukosetoleranztest verbunden. Das lässt darauf schließen, dass das C-Allel eine wichtige Funktion bei Insulinsekretion, β-Zell-Verlust oder beidem hat (Wenzlau et al., 2008a).

Interessanterweise liegt aa325 innerhalb der Region mit der stärksten ZnT8-Antikörperbindung beim Typ 1 Diabetes, da zwei der Schlüsselepitope von ZnT8 durch die polymorphe Aminosäure 325 beeinflusst werden (Wenzlau et al., 2008a).

Wenzlau und Mitarbeiter wiesen ZnT8-Antikörper bei 80% der neumanifestierten Typ 1 Diabetiker nach, während Kontrollen 2%, Typ 2 Diabetiker <3% und Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen bis zu 20% ZnT8-Antikörper aufwiesen. Außerdem gelang der Nachweis, dass bei 4% der bisher als Antikörper-negativ klassifizierten Patienten ZnT8-Antikörper vorlagen (Wenzlau et al., 2008b; Umpierrez et al., 2003).

1.4.2 Diabetesspezifische Antikörper bei LADA

Ähnlich wie bei Typ 1 Diabetes können auch bei LADA bestimmte Serumantikörper nachgewiesen werden. Prinzipiell kommen die gleichen Antikörper vor, wobei die Häufigkeit der einzelnen Antikörper etwas anders verteilt ist.

GAD-Antikörper und Inselzellantikörper

In der britischen UKPD-Studie wurden 3672 klinische Typ 2 Diabetiker auf GADA und ICA getestet. In der gesamten Studienpopulation betrug der Anteil der GADA-positiven Patienten 10% und der der ICA-positiven 6%; bei 4% konnten beide Antikörper nachgewiesen werden.

Außerdem zeigte sich, dass die Prävalenz dieser Antikörper stark vom Alter der Patienten abhing. So waren in der Gruppe der 25- bis 34-Jährigen 34% GADA-positiv, in der Gruppe der 35- bis 44-Jährigen 14%, in der Gruppe der 45- bis 54-Jährigen 9% und in der Gruppe der 55- bis 65-Jährigen 7%. Für ICA betrug die Prävalenz in der Gruppe der 25- bis 34-Jährigen 21%, in der Gruppe der 35- bis 44-Jährigen 9%, in der Gruppe der 45- bis 54-Jährigen 6% und in der Gruppe der 55- bis 65-Jährigen 4% (Turner et al., 1997).

Die Zugabe von GAD und IA-2 in Seren von Typ 1 Diabetes-Patienten konnte einen Großteil des ICA-Signals unterdrücken; bei Seren von LADA-Patienten war dieser Anteil sehr viel geringer. Das lässt vermuten, dass bei LADA andere Antikörper eine größere Rolle spielen (Naik et al., 2009).

IA-2-Antikörper

In der UKPDS71-Studie betrug die Prävalenz von IA-2A und IA-2βA in einem Patientenkollektiv mit Symptomen eines Typ 2 Diabetes 2,2% bzw. 1,4% und ist damit relativ gering.

IA-2A konnte häufiger bei jüngeren Patienten nachgewiesen werden, war häufiger mit dem HLA-DR4-Allel assoziiert, und sein Nachweis erhöhte die Wahrscheinlichkeit der Notwendigkeit einer Insulintherapie innerhalb 6 Jahren nach Diagnosestellung (relatives Risiko (95% CI) 12%). Eine gleichzeitige Positivität von IA-2A und GADA zusammen steigerte das relative Risiko einer notwendigen Insulintherapie von 5,4% bei GADA allein auf 8,3% (Bottazzo et al., 2005).

Unter Berücksichtigung aller drei Antikörper ICA, GADA und IA-2A gelang in einem Patientenkollektiv klinisch diagnostizierter Typ 2 Diabetiker in 11,6% der Nachweis mindestens eines der drei Antikörper (Davis et al., 2005). Allerdings konnten durch die zusätzliche Bestimmung von IA-2A oder ICA nur wenig mehr Antikörper-positive Fälle identifiziert werden, als durch die Bestimmung von GADA alleine.

Insulin-Antikörper

Insulin-Antikörper sind häufig bei juvenilem Typ 1 Diabetes nachweisbar. Da ihre Häufigkeit umgekehrt proportional zum Alter abnimmt, ist ihre Bedeutung für das Screening eines LADA als gering anzusehen (Ola et al., 2006; Bottazzo et al., 2005).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Gegensatz zu Typ 1 Diabetikern, bei denen häufig mehrere Autoantikörper nachgewiesen werden können (ICA, IA-2, IAA; GAD, ZnT8; Wenzlau et al., 2008b), bei LADA-Patienten Antikörper gegen GAD und ICA dominieren, während IA-2-Antikörper, IAA und ZnT8-Antikörper seltener vorkommen (Naik et al., 2009).
Der für die Diagnose eines LADA bedeutendste Antikörper ist GAD. Er ist der sensitivste Autoantikörper für die Vorhersage einer Insulinabhängigkeit bei primär als Typ 2 Diabetes diagnostizierten Patienten (Bottazzo et al., 2005).

1.4.3 Weitere Antikörper

Patienten mit Typ 1 Diabetes und ihre Verwandten haben ein erhöhtes Risiko, an weiteren Autoimmunerkrankungen wie Hashimoto-Thyreoiditis, Zöliakie, Morbus Addison und perniziöser Anämie zu erkranken (Eisenbarth, 2007; Eisenbarth et al., 2004).
Die Erkrankungen können zusammen in Form von definierten Syndromen mit unterschiedlicher Pathophysiologie auftreten: autoimmune polyendocrine syndrome I (APS-1), autoimmune polyendocrine syndrome II (APS-2), und immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) (Barker et al., 2010, vgl. oben).

Beim APS liegt eine Mutation im AIRE-Gen (autoimmune regulator) vor. Der durch dieses Gen kodierte Transkriptionsfaktor spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung zentraler Toleranz gegenüber peripheren Antigenen im Thymus (Steck et al., 2010).
APS-1-Patienten haben ein erhöhtes Risiko, im Verlauf verschiedene autoimmune Erkrankungen zu entwickeln wie Hypothyreose, Morbus Addison und perniziöse Anämie. In 18% der Fälle ist diese Erkrankung mit Typ 1 Diabetes assoziiert. APS-2 kommt häufiger als APS-1 vor, und seine Erscheinungsformen sind vielgestaltiger. Auch hier ist eine Assoziation mit Typ 1 Diabetes in 20% der Fälle beschrieben (Eisenbarth et al., 2004).
Das IPEX-Syndrom ist eine extrem seltene Erkrankung, dem eine Mutation des FOXP3-Gens (forkhead box P3) zugrunde liegt. Auch dieses Gen kodiert einen Transkriptionsfaktor und kontrolliert die Entwicklung regulatorischer T-Zellen, die für die Aufrechterhaltung von Selbsttoleranz essentiell sind. Bei Mutationen in FOXP3 entwickelt sich meist schon bei Neugeborenen eine überschießende, viele Organe betreffende Autoimmunität, die in der Mehrzahl der Fälle mit Typ 1 Diabetes assoziiert ist und häufig letal endet (Eisenbarth et al., 2004; Eisenbarth, 2007).

In meiner Arbeit gehe ich auf das zusätzliche Auftreten von Schilddrüsenautoimmunität und Zöliakie bei Diabetespatienten ein. Hierbei können als immunserologische Marker für Schilddrüsenautoimmunität Antikörper gegen Thyreoperoxidase (TPO), als Marker für Zöliakie Antikörper gegen Transglutaminase (tTG) und Gliadin bestimmt werden.

TPO-Antikörper als Marker für Hashimoto-Thyreoiditis
Die Hashimoto-Thyreoiditis ist eine lymphozytäre, destruierend verlaufende Entzündung der Schilddrüse, aus der meist eine Hypothyreose resultiert. Mögliche Symptome sind Leistungsminderung, Müdigkeit, Kälteempfindlichkeit oder Obstipation. Da die Beschwerden unspezifisch sind, fällt die Erkrankung häufig erst durch niedrige Schilddrüsenhormonspiegel auf. Die Diagnose wird durch den Nachweis von Antikörpern gegen Thyreoperoxidase (TPO) gestellt (Barker, 2006; Sinclair, 2006).

Etwa 15-30% der Patienten mit Typ 1 Diabetes sind an autoimmuner Hashimoto-Thyreoiditis erkrankt (Barker, 2006). Die Prävalenz thyreoidaler Antikörpertiter (TPO und TG) steigt mit zunehmendem Alter deutlich an: 3,7% der an Typ 1 Diabetes erkrankten Kinder im Alter unter 5 Jahren weisen Antikörper auf, während in der Gruppe der 15-20 Jährigen schon 25,3% betroffen sind (Holl et al., 1999). Insgesamt ist die Hashimoto-Thyreoiditis die häufigste weitere Autoimmunerkrankung bei Patienten mit Typ 1 Diabetes (Umpierrez et al., 2003). Jin und Mitarbeiter konnten zeigen, dass LADA-Patienten ein hohes Risiko für eine Schilddrüsenautoimmunität haben (Jin et al., 2004). Es konnten bei 16,7% der LADA-Patienten TPO-Antikörper nachgewiesen werden im Vergleich zu nur 7,0% bei Typ 2 Diabetikern. Die Häufigkeit eines Schilddrüsenantikörpers (TPO oder anti-TG) betrug bei LADA-Patienten 18,9% und bei Typ 1 Diabetikern 25% und war damit höher als in der Kontrollgruppe (8%). Außerdem fiel auf, dass Schilddrüsenantikörper häufiger bei LADA-Patienten mit höherem GAD-Titer auftraten, als bei solchen mit niedrigerem GAD-Titer (Jin et al., 2004).
Andere Autoren erzielten ähnliche Ergebnisse (24% der LADA-Patienten TPO-positiv, 5% der Typ 2 Diabetes-Patienten; Falorni et al., 2002).

Gliadin-Antikörper und t-TG-Antikörper als Marker für glutensensitive Enteropathie
Glutensensitive Enteropathie oder Zöliakie ist eine Autoimmunerkrankung, die durch die Unverträglichkeit bestimmter Getreidesorten gekennzeichnet ist und sich durch Malabsorption, Durchfall, Gewichtsverlust und Wachstumsstörungen manifestiert (Sanchez et al., 2007; Abadie et al., 2011).
Die Unverträglichkeit richtet sich hauptsächlich gegen Gliadin, den im Alkohol löslichen Anteil des Glutens (Klebereiweiß). Die Bezeichnung „Gluten“ bezieht sich auf die ganze Proteinkomponente des Weizens (Green et al., 2007; Kagnoff, 2007).
Beim ersten serologischen Test zur Diagnose einer Zöliakie wurden zirkulierende IgG- und IgA-anti-Gliadin Antikörper bestimmt (Leffler et al., 2010). Antikörper gegen Gliadin sind weniger sensitiv und spezifisch als Antikörper gegen Gewebstransglutaminase (Barker, 2006).
Gewebstransglutaminase (tTG) gehört zu einer Gruppe calciumbindender Enzyme, die an der Proteinquervernetzung beteiligt sind, indem sie Glutamin- und Lysinreste in Polypeptidketten miteinander verbinden (Caputo et al., 2009).

tTG konnte als Hauptantigen im Endomysium identifiziert werden. Antikörper gegen tTG können bei mehr als 95% der Patienten mit Biopsie-gesicherter Zöliakie nachgewiesen werden und sind ein spezifischer und sensitiver Marker für den ablaufenden Autoimmunprozess (Barker, 2006).
Zöliakie liegt bei 4-9% der Patienten mit Typ 1 Diabetes vor (Barker, 2006), bei bis zu 75% der Typ 1 Diabetiker fallen pathologische Befunde in Dünndarmbiopsien auf (Barker, 2006). Im Vergleich dazu sind etwa 1% der Allgemeinbevölkerung von der Erkrankung betroffen (Green et al., 2007).
Im Vergleich von LADA-Patienten und Typ 2 Diabetes-Patienten scheint es keinen Unterschied in der Häufigkeit Zöliakie-spezifischer Antikörper zu geben. Sanchez und Mitarbeiter bezogen Gewebstransglutaminase-Antikörper und Gliadin-Antikörper in ihre Analyse ein und wiesen bei 11,6% der LADA-Patienten Gewebstransglutaminase-Antikörper und/ oder Gliadin-Antikörper im Vergleich zu nur 10,1% bei Typ 2 Diabetikern nach (Sanchez et al., 2007). Ähnliche Ergebnisse erzielten Falorni und Mitarbeiter, die sich auf den Nachweis von Gewebstransglutaminase-Antikörpern vom Typ IgG beschränkten. Hier betrug der Anteil der tTG-AK-positiven Patienten 3,5% in der LADA-Gruppe und 3% in der Typ 2 Diabetes-Gruppe (Falorni et al., 2002).
Smyth und Mitarbeiter untersuchten die Koinzidenz von Typ 1 Diabetes und Zöliakie auf genetischer Ebene und konnten außerhalb der HLA-Region 7 Genloki identifizieren, die mit beiden Erkrankungen assoziiert waren. Das lässt vermuten, dass beiden Erkrankungen gemeinsame ätiologische Mechanismen wie durch Autoimmunität vermittelter Gewebeschaden und Intoleranz gegenüber Nahrungsantigenen zugrunde liegen (Smyth et al., 2008).

1.5 Metabolische Veränderungen

Charakteristisch für die LADA-Form des Diabetes ist die sich erst im Verlauf der Erkrankung entwickelnde Notwendigkeit einer Insulintherapie. Definitionsgemäß (siehe unten, Diagnosekriterien) durchlaufen diese Antikörper-positiven Patienten eine mindestens 6-monatige Phase, in der keine Insulintherapie notwendig ist. Im weiteren Verlauf wird die Insulintherapie dann aber bei 94% innerhalb von 6 Jahren erforderlich. Im Vergleich dazu werden nur 14% der Patienten, bei denen keine Antikörper (GADA und ICA) nachgewiesen werden können, innerhalb dieses

Zeitraums insulinabhängig. Daraus lässt sich ableiten, dass die Erkrankung bis zum Erreichen einer Insulinabhängigkeit langsamer fortschreitet (Ola et al., 2006). Hosszúfalusi und Mitarbeiter haben im Vergleich von Patienten mit LADA und Patienten mit in höherem Lebensalter manifestiertem klassischem Typ 1 Diabetes beobachtet, dass es bezüglich klinischer Parameter (BMI, Taille-Hüfte-Quotient, Gesamtcholesterin, Triglyzeride, HDL und Häufigkeit eines Bluthochdrucks) keine Unterschiede in beiden Gruppen gibt. Während sich bei Ausbruch der Erkrankung in beiden Gruppen die C-Peptid-Level nicht unterschieden, war bei den LADA-Patienten ein langsamerer Abfall zu verzeichnen (Hosszufalusi et al., 2003).

1.6 Diagnosekriterien LADA

Es bleibt unklar, ob autoimmunen Diabetesformen im Erwachsenenalter der gleiche pathogenetische Mechanismus zugrunde liegt, wie bei juvenilem Typ 1 Diabetes (Palmer et al., 2003). Nicht immer sind zwischen dem juvenilen Typ 1 Diabetes, dem sich im Erwachsenenalter manifestierenden Typ 1 Diabetes und LADA klare Grenzen definierbar, doch bezüglich einiger Merkmale gibt es charakteristische Unterschiede:

Tab. 1: Vergleich Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes und LADA, nach Ola et al., 2006

	Typ 1 Diabetes	**Typ 2 Diabetes**	**LADA**
Alter bei Diagnosestellung	Kindheit	Erwachsenenalter	Erwachsenenalter
Konkordanz bei eineiigen Zwillingen	38%	6%	?
HLA DR3/DR4	37%	13%	22%
Autoantikörper	IAA, GAD, IA-2	GAD, IA-2	GAD, IA-2
Insulinspiegel im Serum	sehr niedrig	Niedrig	niedrig

Um eine eindeutige Nomenklatur zugrunde zu legen, hat die „Immunology of Diabetes Society“ folgende Kriterien zur Diagnose eines LADA festgelegt:

(1) Manifestation im Erwachsenenalter (> 30 Jahre);
(2) Positivität für mindestens einen der zirkulierenden AK (GADA/ICA/IAA/IA-2); und
(3) zu Beginn der Erkrankung keine Notwendigkeit der Insulintherapie (innerhalb der ersten 6 Monate).

1.7 Fragestellung

Wie oben dargestellt präsentiert sich die Gruppe „spät-manifestierter Diabetes“ sehr heterogen und in Deutschland existieren bisher kaum Daten zu dieser Gruppe von Patienten.
Ich untersuche in dieser Arbeit spät-manifestierte Diabetiker in Bezug auf die Prävalenz Diabetes-assoziierter Antikörper, sowie mit Schilddrüsenautoimmunität und Zöliakie assoziierter Antikörper als Marker für weitere Störungen der immunologischen Homöostase. Dabei soll überprüft werden, ob es innerhalb dieses Kollektivs verschiedene (Sub-) Gruppen gibt, die sich durch unterschiedliche Antikörperprofile unterscheiden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patientenseren

Das untersuchte Probandenkollektiv besteht aus Patienten mit einem neu-manifesten Diabetes mellitus. Es wurden Seren aus Baden-Württemberg untersucht. Die Rekrutierung der Patienten erfolgte an der Universität Ulm und in Praxen im Raum. Einschlusskriterium war die Diagnose eines manifesten Diabetes gemäß den WHO-Kriterien.
Zum Zeitpunkt des Beginns meiner Untersuchungen waren in die Studie 1476 Patienten eingeschlossen.

Tab. 2: Demographische Daten Probanden

	Proben (n)	Manifestationsalter (Jahre)		
		Mittelwert	Minimum	Maximum
insgesamt	1450	39	4	89
weiblich	467	38	4	89
männlich	901	39	8	84

Die meisten Seren (1150) sind bereits voruntersucht bezüglich des GAD-Antikörper-, IA-2-Antikörper- und ICA-Antikörper-Titers. Die Ergebnisse dieser Antikörpertestungen liegen vor (siehe Diagramm) und wurden zur Bildung von Subgruppen der Proben für weitere Antikörperanalysen herangezogen.

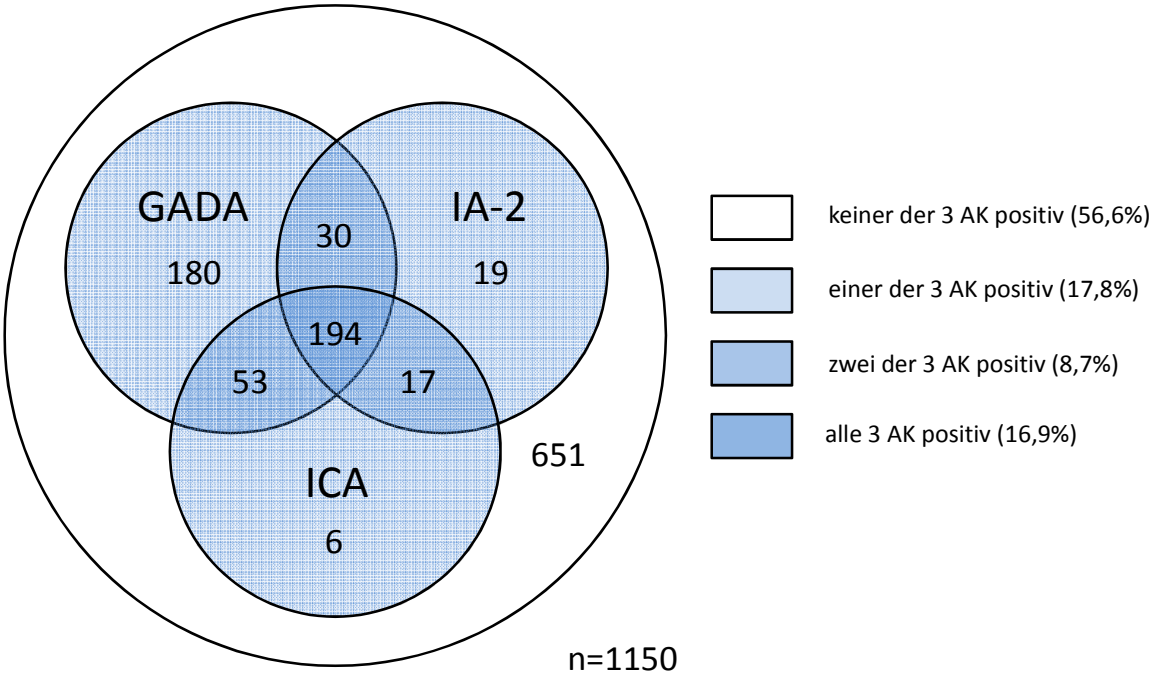


Abb. 1: Verteilung der Antikörper gegen Tyrosin-Phosphatase-2 [IA-2], Glutamat-Decarboxylase [GADA] und Inselzellantikörper [ICA] im untersuchten Patientenkollektiv. Dargestellt ist in den 3 großen Kreisen jeweils die Anzahl der auf den jeweiligen Antikörper (IA-2, GADA, ICA) positiven Proben; in den jeweils überlappenden Teilen die Anzahl der Proben, die für mehrere der Antikörper positiv getestet wurden. Im außen liegenden weiß gefüllten Kreis ist die Anzahl der Proben dargestellt, die für keinen der o. g. Antikörper (AK) positiv getestet wurden.

2.2 Antikörperanalysen

2.2.1 Testverfahren

Radiobindungstest

Der Radiobindungstest ermöglicht es, Antikörper zu bestimmen. Dazu wird das dem gesuchten Antikörper entsprechende Antigen radioaktiv markiert und mit der Patientenprobe, in der der Antikörper detektiert werden soll, inkubiert. Bei Vorhandensein der Antikörper in der Patientenprobe bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe. Ungebundenes radioaktiv markiertes Antigen wird abgetrennt, und die Radioaktivität der Antigen-Antikörper-Komplexe wird im β-Counter detektiert. Die gemessene Radioaktivität ist proportional zur Antikörpermenge.

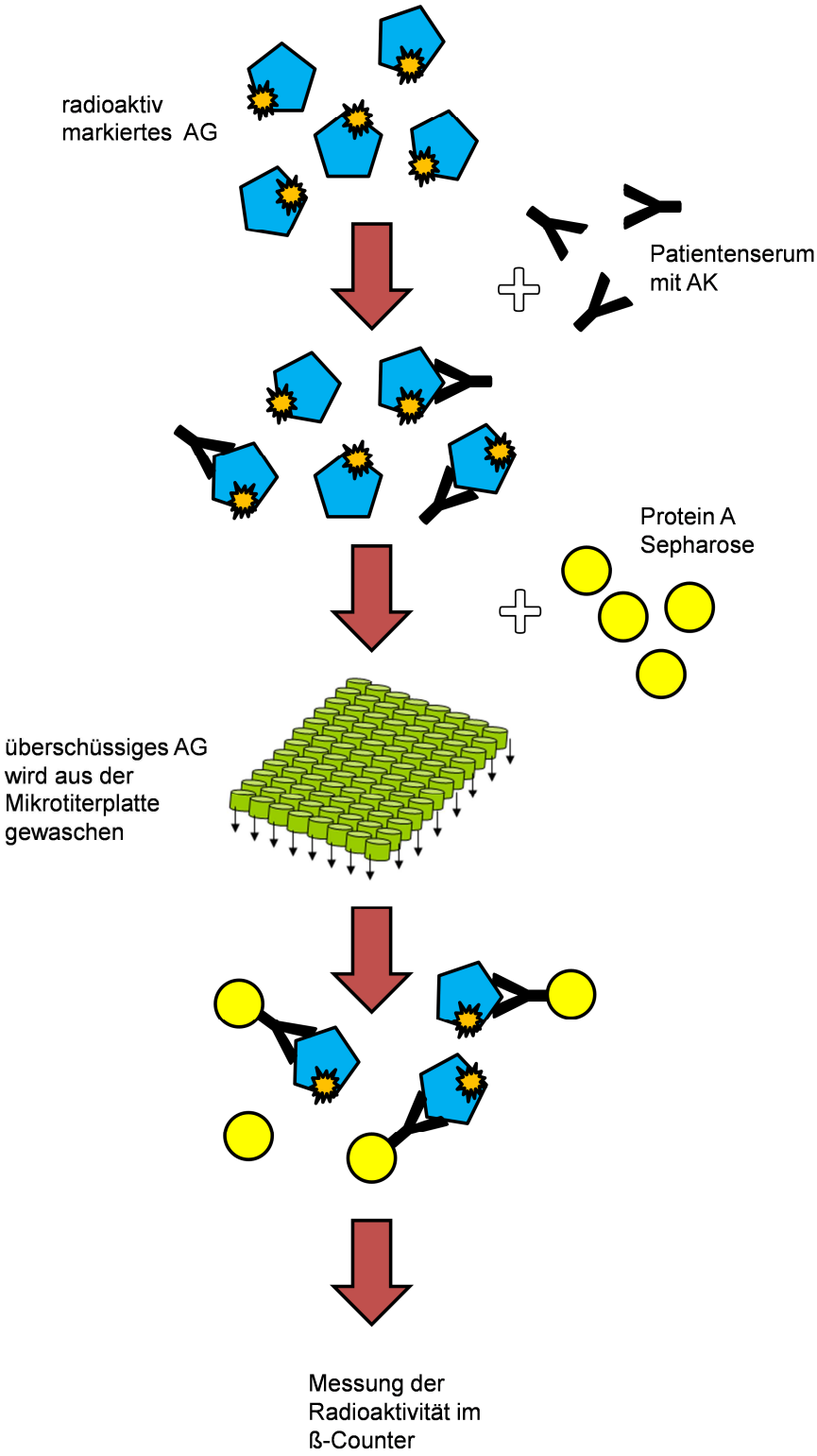


Abb. 2: Schematischer Ablauf Radiobindungstest. Im ersten Schritt wird radioaktiv markiertes Antigen (AG) mit dem Patientenserum und den darin enthaltenen Antikörpern (AK) inkubiert. Nach Zugabe von Protein A Sepharose bindet dieses an die Fc-Region der Antikörper. Nach Anbringen eines Vakuums in der Mikrotiterplatte werden überschüssige radioaktiv markierte Antigene herausgewaschen und es verbleiben nur die radioaktiv markierten Antigen-Antikörperkomplexe und Protein A Sepharose in der Mikrotiterplatte. Die im ß-Counter gemessenen Radioaktivität ist proportional zur Antikörper-Menge.

ELISA

Beim indirekten nicht kompetitiven Enzym-Immunoassay (ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay) können Antikörper im Serum qualitativ und quantitativ bestimmt werden.

Dabei ist an einer Festphase das für den zu untersuchenden Antikörper spezifische Antigen gebunden. Im ersten Schritt findet eine Reaktion statt zwischen den im Patientenserum vorhandenen spezifischen Antikörpern mit dem Antigen.

In einem zweiten Schritt bindet ein enzymmarkierter zweiter Antikörper (Konjugat) an den zuvor gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex. Die enzymmarkierten Konjugat-Antikörper-Antigen-Komplexe setzen ein zugefügtes Substrat im Rahmen einer Farbreaktion um.

Die Farbentwicklung des Chromogens ist abhängig von der im Komplex gebundenen Konjugatmenge und ist damit zu der gesuchten Antikörperkonzentration proportional.

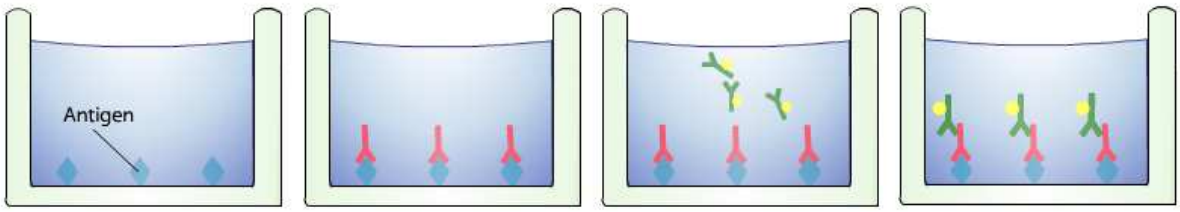


Abb. 3: Funktionsprinzip ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay): An einer Festphase ist das für den zu untersuchenden Antikörper spezifische Antigen gebunden (erstes Bild, blaue Raute). Nach Zugabe des Patientenserums binden die darin enthaltenen Antikörper(rot) an das Antigen der Festphase (zweites Bild). Nach Zugabe von Enzym-markierten zweiten Antikörpern (grün-gelb, drittes Bild) binden diese an die Antigen-Antikörper-Komplexe (viertes Bild) und setzen im nächsten Schritt ein zugegebenes Substrat im Rahmen einer messbaren Farbreaktion um (nicht dargestellt).
(modifiziert nach Perry et al., www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/ELISA.html)

2.2.2 ZnT8 Antikörper-Analyse

Probenselektion

Aus dem unter 2.1 beschriebenen Patientenkollektiv wurde für die ZnT8-Analyse eine Vorauswahl getroffen. Es wurden diejenigen Proben auf ZnT8-Antikörper untersucht, bei denen

- Positivität für alle drei bereits vorbestimmten Antikörper (GAD, IA-2, ICA) vorlag (n=176),

- oder: Positivität für zwei der drei bereits vorbestimmten Antikörper (s. o.) vorlag (n=93),
- oder: Positivität für einen der drei bereits vorbestimmten Antikörper (s. o.) vorlag (n=180),

Weiterhin wurden als Kontrollgruppe bei 34 Patientenseren, bei denen keiner der drei bereits vorbestimmten Antikörper nachgewiesen werden konnte, ebenfalls ZnT8-Bestimmungen durchgeführt.

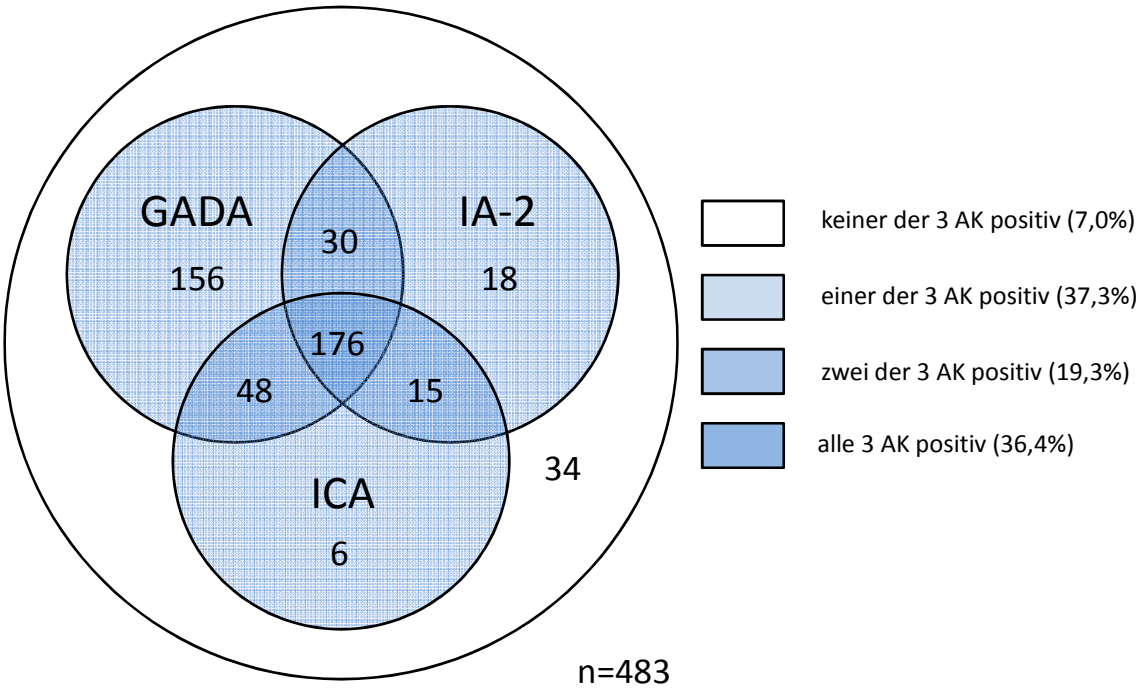


Abb. 4: Anzahl der auf Antikörper gegen den Zinktransporter 8 (ZnT8) getesteten Seren pro Gruppe. Dargestellt ist in den 3 großen Kreisen jeweils die Anzahl der Proben mit der Eigenschaft Glutamat-Decarboxylase (GADA) positiv, Tyrosin-Phosphatase 2 (IA-2) positiv bzw. Inselzellantikörper (ICA) positiv, die auf den Antikörper gegen Zinktransporter 8 (ZnT8) getestet wurden. In den überlappenden Anteilen sind die Proben dargestellt, die für mehrere der o. g. Antikörper (AK) positiv getestet worden waren. Im großen weiß gefüllten Kreis ist die Anzahl der auf ZnT8 untersuchten Proben angegeben, die für keinen der o. g. Antikörper positiv getestet worden waren.

Damit ergibt sich folgende prozentuale Verteilung (siehe auch Abb. 3):

- In der Gruppe, die vorab auf alle drei Antikörper positiv getestet war, wurden 176 der 194 Proben, die diese Voraussetzungen erfüllten, untersucht (90,7%).
- In der Gruppe, die vorab auf 2 der o. g. Antikörper positiv getestet war, wurden 93 von 100 Proben, die diese Voraussetzungen erfüllten, untersucht (93%).

- In der Gruppe, die vorab auf 1 der o. g. Antikörper positiv getestet war, wurden 180 von 205 Proben, die diese Voraussetzungen erfüllten, untersucht (87,8%).
- In der Kontrollgruppe, die auf keinen der o. g. Antikörper positiv getestet war, wurden 34 von 651 Proben, die diese Voraussetzungen erfüllten, untersucht (5,2%).

Materialien und Reagenzien:
Protein A Sepharose™ CL-4B von GE Healthcare
Illustra™ NAP™-5 Columns von GE Healthcare
MultiScreen$_{HTS}$ 96-well filtrationplates von Millipore
Durchführung:

- *ZnT8-Proteinsynthese*

Für den ZnT8-Assay wird zunächst radioaktiv markiertes ZnT8-Antigen durch eine in vitro Translation synthetisiert. Hierfür werden 2µl ZnT8-Plasmid-DNA in einem 50µl Assay-Ansatz transkribiert und translatiert. Die Plasmid-DNA enthält den für die T7 Polymerase spezifischen Promotor. Im Ansatz enthalten sind die folgenden Substanzen:

25µl Retikulozytenlysat
2µl TNT Reaktionspuffer
1µl T7 Polymerase
1µl einer Aminosäuremischung, in der kein Methionin enthalten ist
1µl RNAse Inhibitor
2µl ZnT8-DANN
4µl [35S]-markiertes Methionin
15µl destilliertes Wasser

50µl

Der Ansatz wird gut gemischt und bei 30°C für 2 Stunden in einem Wasserbad inkubiert.

- *Aufreinigung des translatierten Proteins*

Das translatierte ZnT8-Molekül enthält jetzt [35S]-markiertes Methionin. In einer NAP-5 Säule wird das ZnT8-Antigen durch Größenausschluss-Chromatographie aufgereinigt. Durch dieses Verfahren werden kleine Moleküle wie ungebundene Aminosäuren zurückgehalten, während große Moleküle wie das synthetisierte Protein und Hämoglobin durch ihr höheres Molekulargewicht schnell eluieren. Hämoglobin stammt aus dem Retikulozytenlysat und dient als Indikator, um abschätzen zu können, wann das Eluat Antigen enthält und somit aufgefangen werden sollte.

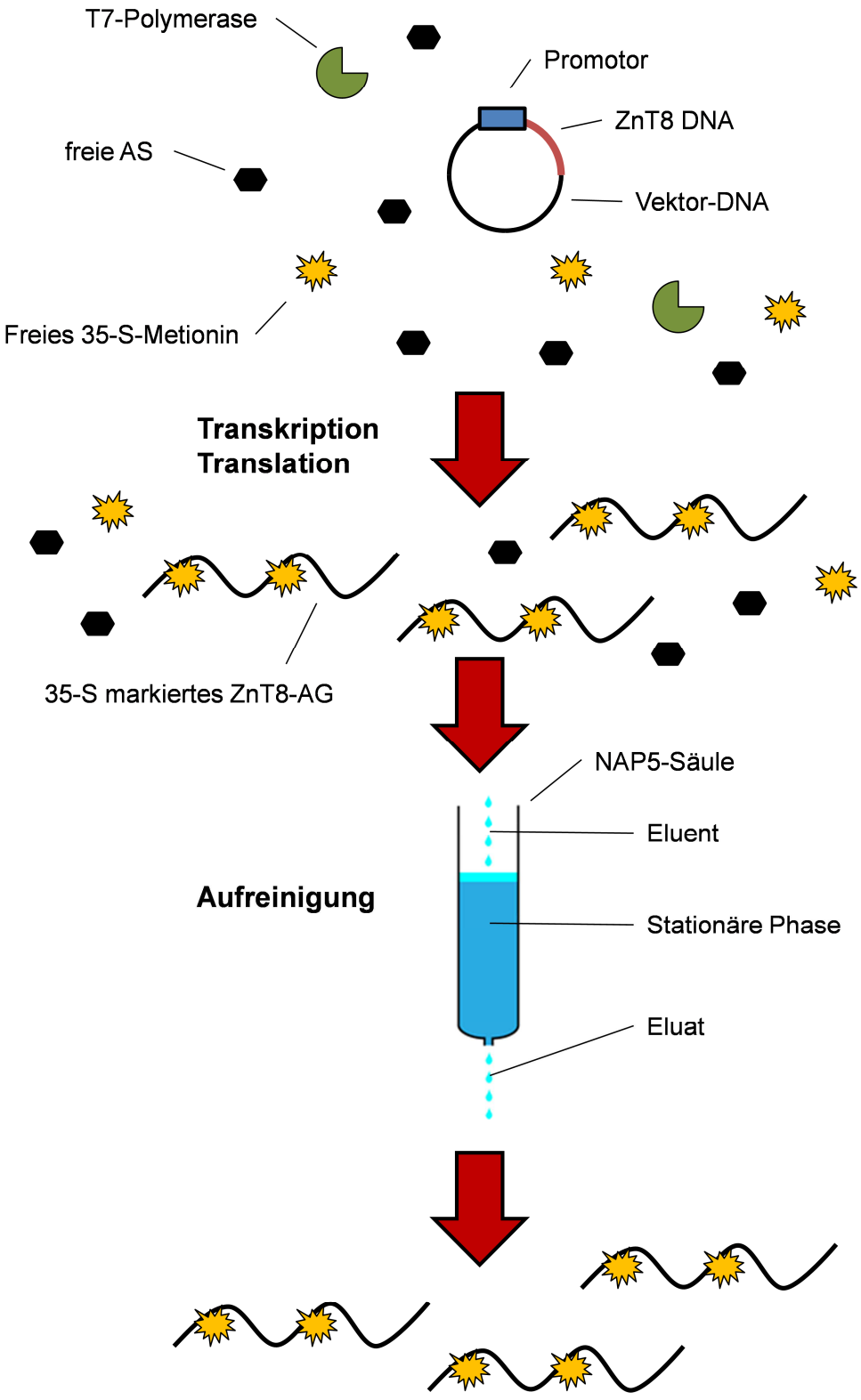


Abb. 5: Synthese der Antikörper gegen Zinktransporter 8 (ZnT8): Im Ansatz enthalten sind Vector-DNA, in die die ZnT8-DNA eingebracht wurde, freie Aminosäuren (AS), freies radioaktiv markiertes Methionin (35-S-Methionin), sowie eine Polymerase (T7-Polymerase). Nach Transkription und Translation entsteht radioaktiv markiertes ZnT8-Antigen (AG). Überschüssige freie Aminosäuren und freies radioaktiv markiertes Methionin werden durch Aufreinigung in einer NAP-5 Säule abgetrennt, sodass nur radioaktiv markiertes ZnT8-Antigen verbleibt.

- *Bestimmung der Radioaktivität*

Das markierte ZnT8-Molekül wird mit TBST-Pufferlösung verdünnt, bis die Radioaktivität mindestens 20.000 cpm/50µl beträgt.

- *Ansatz des Assays*

In einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten werden zu jeweils 2µl Patientenserum 50µl des verdünnten Antigens zugefügt. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag werden 50µl Protein A Sepharose/Kavität hinzugefügt (entspricht etwa 1mg/Kavität). Dieses Protein bindet an die Fc-Region von Immunglobulinen durch Interaktion mit der schweren Kette. Erneut wird der Ansatz bei 4°C 1,5 Stunden inkubiert.

- *Waschen*

Mithilfe eines Vakuumsystems wird die Mikrotiterplatte achtmal mit TBST-Puffer gewaschen. Dabei werden alle Komponenten, die Protein A Sepharose nicht gebunden haben, entfernt. Da das Antigen im Überschuss vorhanden ist und keine freien Antikörper verbleiben, sind im Eluat nur der Komplex aus radioaktiv markiertem Antigen, dem detektierten Antikörper, sowie Protein A Sepharose enthalten.

- *Messung im β-Counter*

Nach der Zugabe vor Szintillationsflüssigkeit, durch die die Detektion im β-Counter ermöglicht wird, erfolgt die Messung der Radioaktivität. Dabei korreliert die Höhe der Radioaktivität mit der Menge an Antikörpern im Serum der Patienten.

2.2.3 TPO-Antikörper-Analyse

Probenselektion:

Von den 1476 in die Studie eingeschlossenen Patienten war bei 26 nicht ausreichend Serum vorhanden, um die Untersuchungen durchzuführen. Bei den verbleibenden 1450 Patientenseren wurden die TPO-Antikörper-Titer mittels ELISA bestimmt.

Materialien und Reagenzien:

Test-Kit VeliSa zur Bestimmung von Autoantikörpern gegen Schilddrüsen-Peroxidase der Firma Vita Diagnostika GmbH

1 VeliSaPinplatte im Mikrotiter-Format, beschichtet mit TPO

2 Rundboden-Mikrotiterplatten

6 Standards mit 0 – 30 – 100 – 300 – 1000 und 3000 IU TPO-Antikörper/ml, Milieu: endverdünnter Probenpuffer

Negative Kontrolle und positive Kontrolle (= Kalibrator), Milieu: endverdünnter Probenpuffer

Waschpuffer-15x-Konzentrat, enthält Tris-gepufferte Saline (Tris-buffered saline, TBS), Tween und Bromonitrodioxan

Probenpuffer-10x-Konzentrat, enthält TBS, Rinderserum-Albumin (bovine serumalbumin, BSA), Tween und Na-Azid

Anti-human-IgG Peroxidasekonjugat, gepufferte Lösung mit Stabilisator-Protein, Methylisothiazolon und Bromonitrodioxan.

Substratlösung, gepufferte Lösung, enthält TMB und H_20_2

Stopplösung, 0,5 M H_2SO_4

Durchführung:

Das Test-Kit besteht aus einer Pinplatte, deren Pins mit rekombinanter humaner TPO beschichtet sind, und einer Mikrotiterplatte. Die immunologischen Reaktionen laufen wie oben beschrieben an der Pinplatte ab.

In die Kavitäten der Mikrotiterplatte werden die Standards, Kontrollen und verdünnten Proben vorgelegt. Durch Inkubation mit der Pinplatte binden die TPO-Antikörper an die TPO der Pinplatte und bilden Antigen-Antikörper-Komplexe. Durch Waschen werden nichtgebundene Probenbestandteile von der Pinplatte entfernt.

Im nächsten Schritt werden die Pins in ein Enzym-markiertes Antikörper-Präparat gegen humanes IgG getaucht. Dieses Konjugat bindet seinerseits den Antigen-Antikörper-Komplex. Erneut wird nichtgebundenes Konjugat durch Waschen entfernt.

Im letzten Inkubationsschritt wird Substrat für das Enzym in den Kavitäten vorgelegt. Durch den gebundenen Enzym-markierten Antigen-Antikörper-Komplex

wird das farblose Substrat in ein farbiges Produkt umgesetzt. Das Ausmaß der Farbentwicklung spiegelt die Menge an TPO-Antikörpern in der Probe wider.

2.2.4 Gliadin-Antikörper-Analyse (IgA und IgG)

Probenselektion:

Vor der Bestimmung der oben genannten Antikörper wurde eine Vorauswahl getroffen. Es wurden Seren untersucht, bei denen ein hochpositiver GADA-Titer (> 50IU/ml; n=138) oder ein niedrigpositiver GADA-Titer (3-10 IU/ml; n=93) vorbeschrieben waren.

Materialien und Reagenzien:

Test-Kit ELISA zur Bestimmung von Antikörpern (IgA) gegen Gliadin der Firma Vita Diagnostika GmbH

- Kavitätenplatte im Mikrotiter-Format, beschichtet mit Gliadin
- 6 Standards mit 0 – 3 – 8 – 18 – 45 und 100 U Gliadin-Antikörper (IgA)/ml, Milieu: endverdünnter Probenpuffer
- Negative Kontrolle und positive Kontrolle (= Kalibrator), Milieu: endverdünnter Probenpuffer
- Waschpuffer-15x-Konzentrat, enthält Tris-gepufferte Saline (Tris-buffered saline, TBS), Tween und Bromonitrodioxan
- Probenpuffer-10x-Konzentrat, enthält TBS, Rinderserum-Albumin (bovine serumalbumin, BSA), Tween und Na-Azid
- Anti-human-IgA HRP-Konjugat, gepufferte Lösung mit Stabilisator-Protein, Methylisothiazolon und Bromonitrodioxan
- Substratlösung, gepufferte Lösung, enthält TMB und H_20_2
- Stopplösung, 0,5 M H_2SO_4

Test-Kit ELISA zur Bestimmung von Antikörpern (IgG) gegen Gliadin der Firma Vita Diagnostika GmbH

- Kavitätenplatte im Mikrotiter-Format, beschichtet mit Gliadin
- 6 Standards mit 0 – 3 – 8 – 18 – 45 und 100 U Gliadin-Antikörper (IgG)/ml, Milieu: endverdünnter Probenpuffer

Negative Kontrolle und positive Kontrolle (= Kalibrator), Milieu: endverdünnter Probenpuffer

Waschpuffer-15x-Konzentrat, enthält Tris-gepufferte Saline (Tris-buffered saline, TBS), Tween und Bromonitrodioxan

Probenpuffer-10x-Konzentrat, enthält TBS, Rinderserum-Albumin (bovine serumalbumin, BSA), Tween und Na-Azid

Anti-human-IgG HRP-Konjugat, gepufferte Lösung mit Stabilisator-Protein, Methylisothiazolon und Bromonitrodioxan

Substratlösung, gepufferte Lösung, enthält TMB und H_20_2

Stopplösung, 0,5 M H_2SO_4

Durchführung:

Das Test-Kit besteht aus einer Mikrotiterplatte, wobei die immunologischen Reaktionen in den Kavitäten der Platte stattfinden, die mit Gliadin beschichtet sind. Die Durchführung erfolgt wie oben beschrieben.

2.2.5 Gewebstransglutaminase-Antikörper-Analyse (IgA und IgG)

Probenselektion:

Auch hier wurde vor der Bestimmung oben genannter Antikörper eine Vorauswahl getroffen. Es wurden Seren untersucht, bei denen ein hochpositiver GADA-Titer (> 50IU/ml; n=138) oder ein niedrigpositiver GADA-Titer (3-10 IU/ml; n=93) vorbeschrieben waren.

Materialien und Reagenzien:

Test-Kit EliA® Celikey® der Firma Phadia GmbH

Tissue Transglutaminase (human, recombinant) IgA Antibody Assay

Mikrotiterstreifen (18196) beschichtet mit humanem, rekombinantem tTG Antigen

6 tTG (IgG)-Antikörper-Stardardlösungen in den Konzentrationen 0-3-7-16-40-100 U/ml in PBS mit PSA, 0,095% (w/v) Natriumazid, Detergens und Humanserum

1 Positiv-Kontrolle mit BSA, 0,095% (w/v) Natriumazid, Detergens und Humanserum in PBS

1 Negativ-Kontrolle mit BSA, 0,095% (w/v) Natriumazid, Detergens und Humanserum in PBS
Waschpuffer-Konzentrat 20x PBS-Konzentrat mit 0,095% (w/v) Natriumazid und Detergens
Probenpuffer mit BSA, 0,095% (w/v) Natriumazid und Detergens
IgA-Konjugat, Anti-human-IgA-Peroxidase
Enzymsubstrat TMB (3, 3`, 5, 5` Tetramethylbenzidin)
Stopplösung 0,5 M H_2SO_4

Test-Kit EliA® Celikey® IgG der Firma Phadia GmbH
Tissue Transglutaminase (human, recombinant) IgG Antibody Assay
Mikrotiterstreifen (17996) beschichtet mit humanem, rekombinantem tTG Antigen
6 tTG (IgA)-Antikörper-Stardardlösungen in den Konzentrationen 0-3-7-16-40-100 U/ml in PBS mit PSA, 0,095% (w/v) Natriumazid, Detergens und Humanserum
1 Positiv-Kontrolle mit BSA, 0,095% (w/v) Natriumazid, Detergens und Humanserum in PBS
1 Negativ-Kontrolle mit BSA, 0,095% (w/v) Natriumazid, Detergens und Humanserum in PBS
Waschpuffer-Konzentrat 20x PBS-Konzentrat mit 0,095% (w/v) Natriumazid und Detergens
Probenpuffer mit BSA, 0,095% (w/v) Natriumazid und Detergens
IgG-Konjugat, Anti-human-IgG-Peroxidase
Enzymsubstrat TMB (3, 3`, 5, 5` Tetramethylbenzidin)
Stopplösung 0,5 M H_2SO_4

Durchführung:
Auch hier laufen die immunologischen Reaktionen in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte statt, die mit Gewebstransglutaminase beschichtet sind.

2.2.6 Übersicht über die durchgeführten Antikörper-Bestimmungen

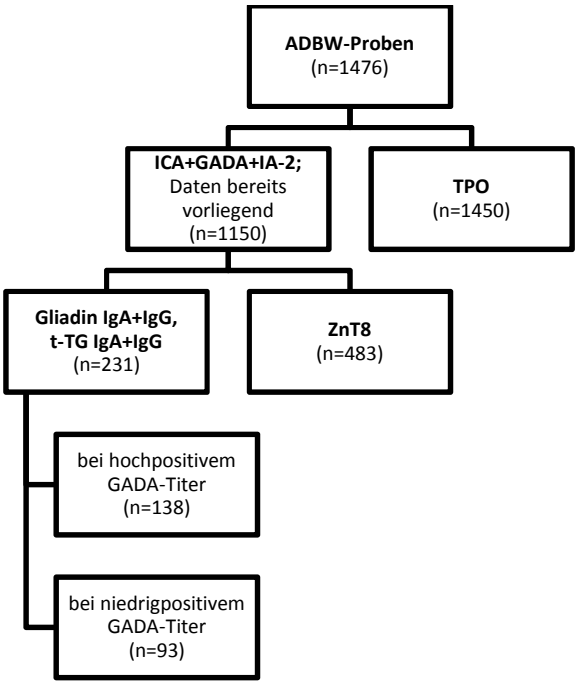


Abb. 6: Übersicht über die verschiedenen Antikörper-Bestimmungen

2.3 Statistik

2.3.1 Chi-Quadrat-Test

Zum Vergleich der Prävalenz unterschiedlicher Antikörper in verschiedenen Gruppen (GADA hochtitrig positiv / GADA niedrigtitrig positiv; 0 Diabetes-spezifische Antikörper positiv – 3 Diabetes-spezifische Antikörper positiv) wurde der Chi-Quadrat-Test angewendet. Hierdurch konnte die stochastische Unabhängigkeit der Antikörper-Prävalenzen in den angegebenen Gruppen nachgewiesen werden.
Da der Chi-Quadrat-Test als asymptotischer Test erst ab einer Stichprobengröße von n=5 pro Feld einer Kontingenztafel zulässig ist, wurde im Fall einer geringen Anzahl erhobener Messwerte der Exakte Fisher Test angewendet.

2.3.2 Exakter Fisher-Test

Der Exakte Fisher Test wurde für die Analysen angewendet, bei denen nur eine geringe Anzahl erhobener Messwerte vorlag (s. o.). Dieser Test bietet auch in diesen Fällen zuverlässige Resultate und untersucht ebenso wie der Chi-Quadrat-Test die stochastische Unabhängigkeit in zwei Gruppen.
Weiterhin liefert der Exakte Fisher Test eine Aussage über die Wertigkeit der Abhängigkeit zweier Gruppen (positive / negative Abhängigkeit).

2.3.3 Signifikanzniveaus

Es wurde jeweils die zweizeitige Signifikanz bestimmt. Als Signifikanzniveaus wurden zwei Stufen festgelegt:

- p-Werte < 0,05 niedrig signifikant
- p-Werte < 0,01 signifikant

2.3.4 Excel

Die Bestimmung der Prävalenz einzelner Antikörper in den zu untersuchenden Gruppen, die deskriptive Statistik, sowie die graphische Darstellung der Daten wurde mit MS Excel XP (Microsoft, Berlin, Deutschland) vorgenommen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Bedeutung von ZnT8 bei spät-manifestiertem autoimmunem Diabetes

3.1.1 Zusammenhang zwischen ZnT8 und anderen Diabetes-spezifischen Antikörpern

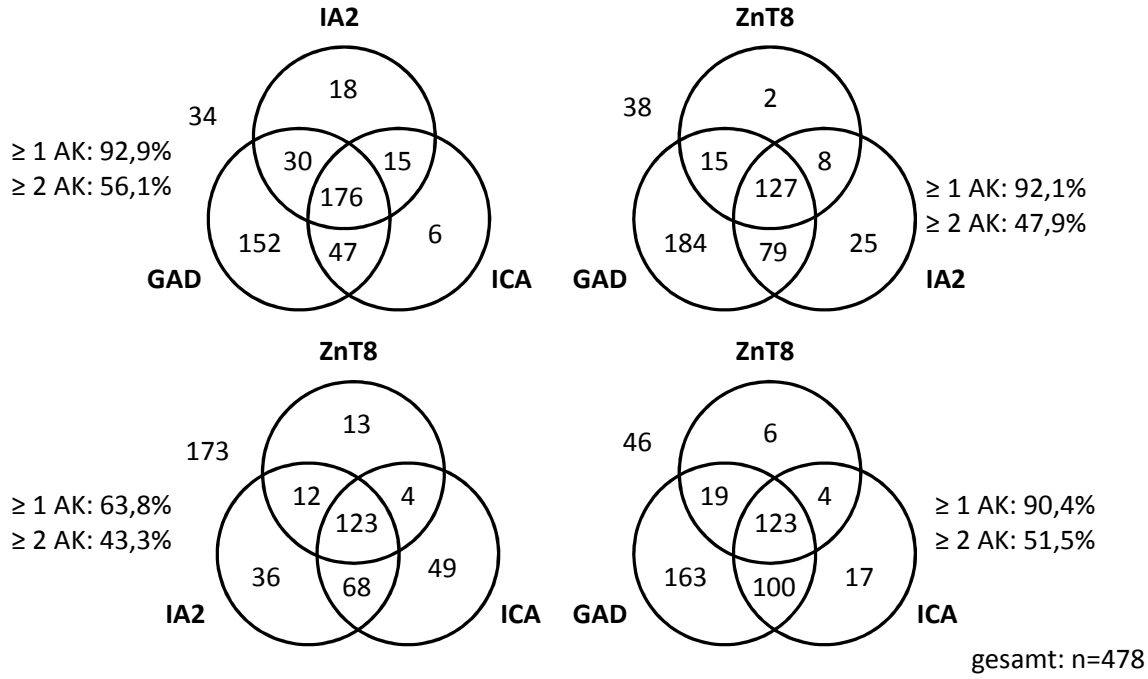


Abb. 7: Überschneidungen im Auftreten der Antikörper (AK) gegen den Zinktransporter 8 (ZnT8), Glutamat-Decarboxylase (GADA), Tyrosin-Phosphatase 2 (IA-2) und Inselzellantikörper (ICA) unter Einbeziehung von drei der Antikörper (ZnT8, ICA, GAD und IA-2)

In diesen Venn-Diagrammen ist die Anzahl der positiven Antikörper für IA-2, GAD, ICA und ZnT8 dargestellt. Pro Diagramm wurden jeweils drei der vier genannten Antikörper graphisch abgebildet. In den sich überlappenden Anteilen finden sich die Proben wieder, die für mehrere der Antikörper positiv waren. Die Gesamtzahl der untersuchten Proben beträgt n=351.
Die Angaben am Rand beziehen sich auf den prozentualen Anteil der Proben, die für mindestens einen (mindestens zwei) der jeweils betrachteten Antikörper eines Diagramms positiv waren.
Das erste Diagramm oben links stellt die überlappenden Anzahlen der drei Antikörper IA-2, GAD und ICA dar. Hier ergibt sich eine Nachweisrate für Autoimmunität von 92,9% (≥ 1 Antikörper positiv).

Indem nun einer dieser drei Antikörper durch ZnT8 ersetzt wird, ergeben sich beim Ersetzen von ICA und IA-2 ähnliche Werte (92,1%, 90,4%; Venn-Diagramm rechts oben und rechts unten), aber beim Ersetzen von GAD fällt eine deutlich geringere Nachweisrate für Autoimmunität auf (63,8%, Venn-Diagramm links unten).
Bei Betrachtung aller vier Diagramme zeigt sich, dass ZnT8 auch bei Individuen nachgewiesen werden kann, bei denen keiner der anderen Diabetes-spezifischen Antikörper (GADA, ICA, IA2) positiv getestet war.

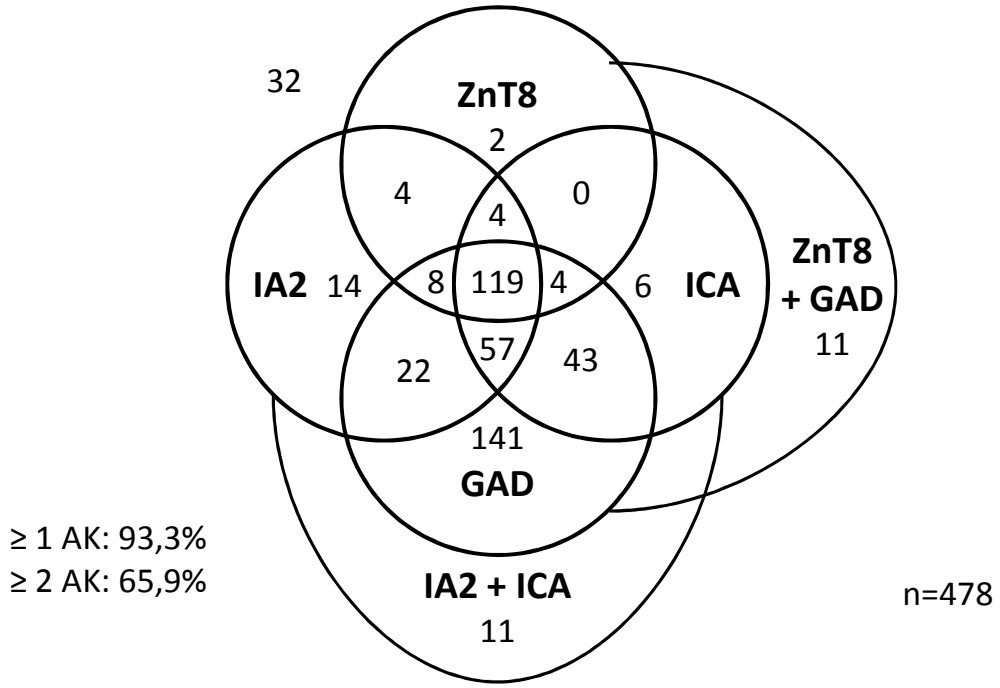


Abb. 8: Überschneidungen im Auftreten der Antikörper (AK) gegen Zinktransporter 8 (ZnT8), Glutamat-Decarboxylase (GADA), Tyrosin-Phosphatase 2 (IA-2) und Inselzellantikörper (ICA) unter Einbeziehung aller vier Antikörper (ZnT8, ICA, GAD und IA-2)

Stellt man alle vier Antikörper (GAD, ICA, IA-2 und ZnT8) zusammen graphisch dar, kann durch Einschluss von ZnT8 die Nachweisrate von Autoimmunität von 92,9% (siehe Abb. 9, im Vergleich zu Abb. 8, Venn-Diagramm links oben) auf 93,3% leicht erhöht werden.

Einschränkend ist bei der Interpretation dieser Daten zu erwähnen, dass bezüglich der Untersuchung von ZnT8 eine Vorauswahl getroffen wurde (siehe auch Material und Methoden Abb. 3 und Abb. 5 und begleitender Text).

3.1.2 Einfluss des Alters auf die ZnT8-Positivität bei Diabetesmanifestation

Tab. 3: Zusammenhang zwischen Positivität in Bezug auf Antikörper gegen Zinktransporter 8 (ZnT8) und Alter bei Diabetesmanifestation

Alter*) (Jahre)	getestete Proben (n=)	ZnT8 positiv (n=)	ZnT8 positiv (%)
0-20	50	22	44
20-25	54	24	44
25-30	62	17	27
30-35	62	19	31
35-40	58	17	29
40-45	54	12	22
45-50	41	13	32
50-55	25	8	32
55-60	16	6	38
60-80	24	8	33
insgesamt	446	146	33

*) Alter bei Erstmanifestation des Diabetes

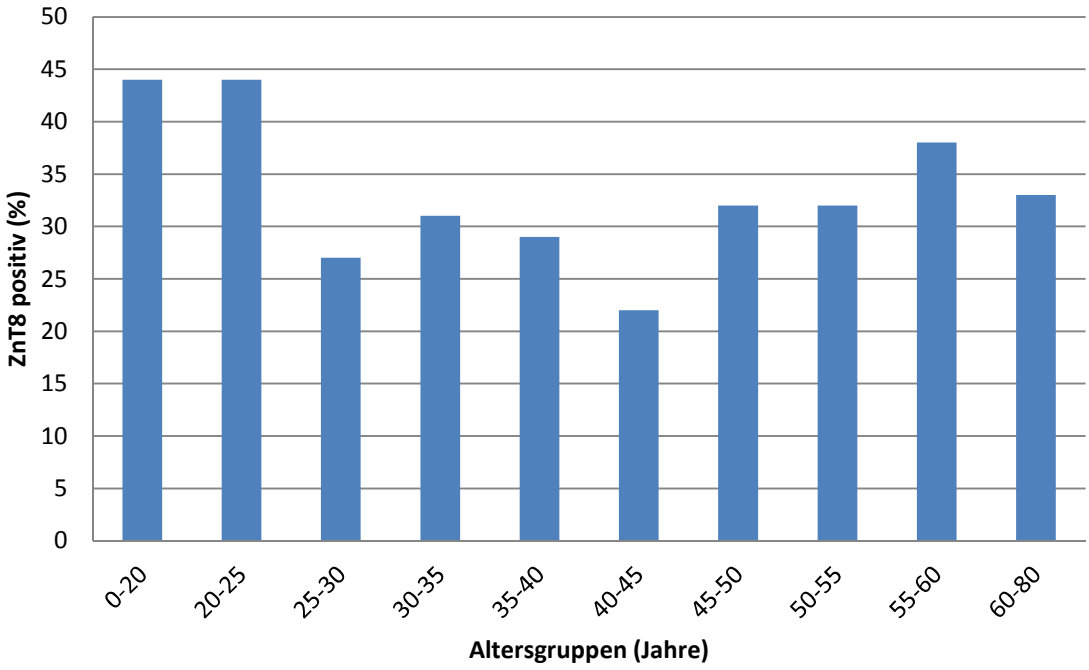


Abb. 9: Anteil der auf Antikörper gegen Zinktransporter 8 (ZnT8) positiv getesteten Seren pro Altersgruppe

In Analysen, die die ZnT8-Prävalenz in Abhängigkeit vom Alter bei Diabetesmanifestation darstellen, zeigt sich in der Altersgruppe der 0-20-Jährigen sowie der 20-25-Jährigen die höchste Prävalenz von ZnT8 mit jeweils 44%. Mit steigendem Manifestationsalter lässt sich dann eine tendenziell abnehmende Prävalenz verzeichnen, die in der Gruppe der 40-45-Jährigen ihr Minimum erreicht. Mit weiter zunehmendem Alter lässt sich wieder eine Zunahme der Prävalenz von ZnT8 beschreiben (Maximum in der Altersgruppe der 55-60-Jährigen).
Statistisch liegt damit die Prävalenz von ZnT8 in den Altersgruppen der Kinder und jungen Erwachsenen bis 25 Jahre signifikant höher ($p < 0,05$) als in den darauffolgenden Altersgruppen.

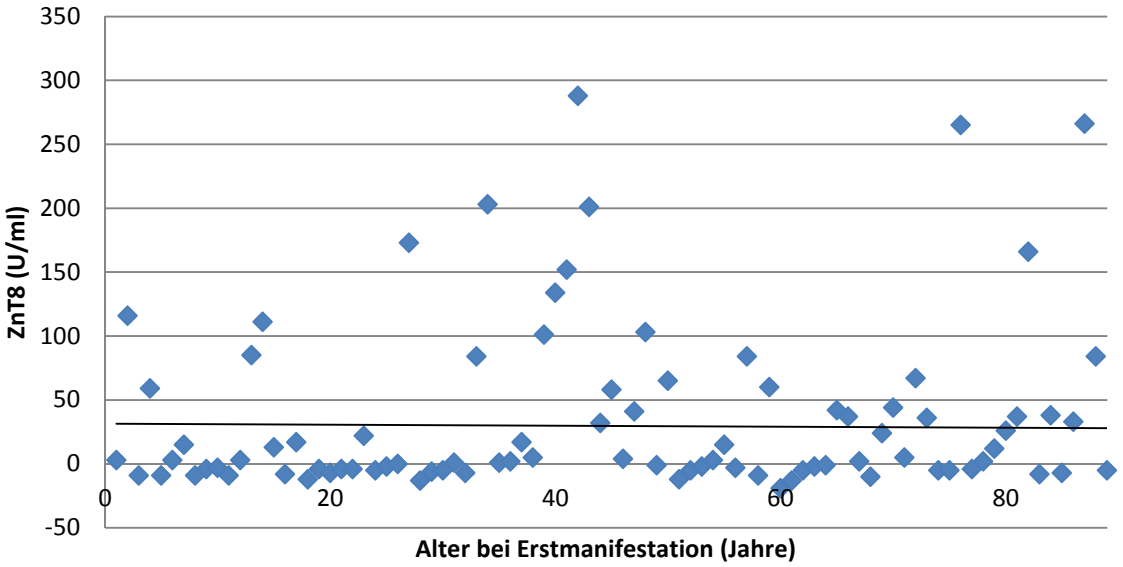


Abb. 10: Abhängigkeit der Höhe des Zinktransporter 8 (ZnT8) Antikörper-Titers vom Alter bei Erstmanifestation

Eine Abhängigkeit der Höhe des ZnT8-Titers vom Alter bei Erstmanifestation kann nicht nachgewiesen werden. Im Gegenteil, es fällt eine durchschnittlich konstante Verteilung der Höhe der ZnT8-Titer im Bereich aller Altersgruppen auf.

3.1.3 Wechselseitige Beeinflussung von GAD und ZnT8

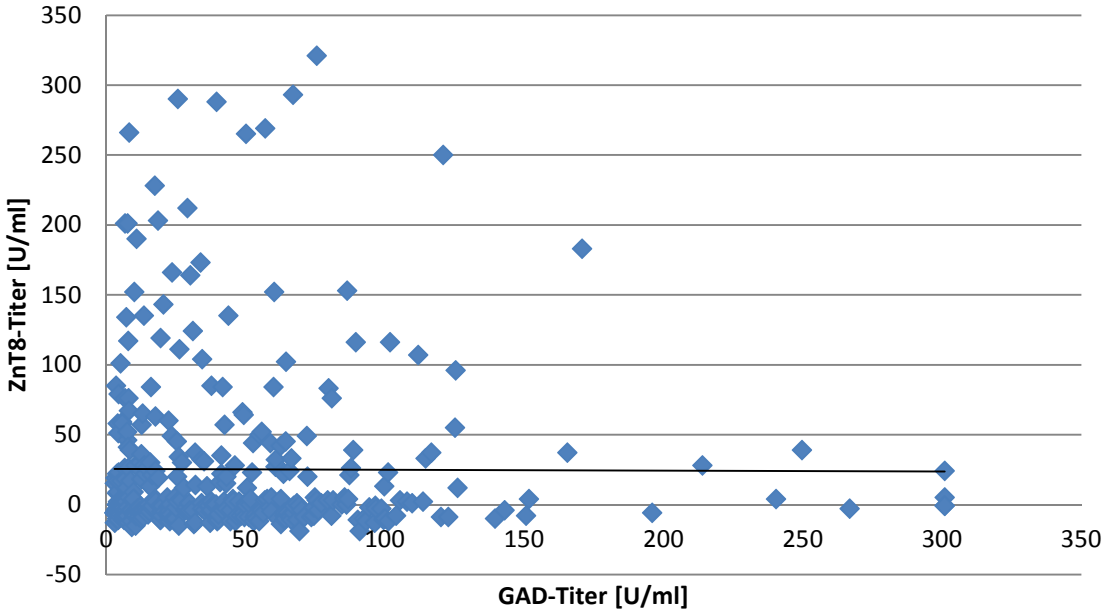


Abb. 11: Abhängigkeit des Zinktransporter 8 (ZnT8) Antikörper-Titers vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titers

Tab. 4: Mittelwert und Mittelabweichung des Zinktransporter 8 (ZnT8) Antikörper-Titers für niedrig- und hochtitrig positive Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper

	Mittelwert ZnT8-Titer	Mittelabweichung
GAD niedrigtitrig positiv (3-10 U/ml)	21,8	32,6
GAD hochtitrig positiv (>=50 U/ml)	25,7	39,7

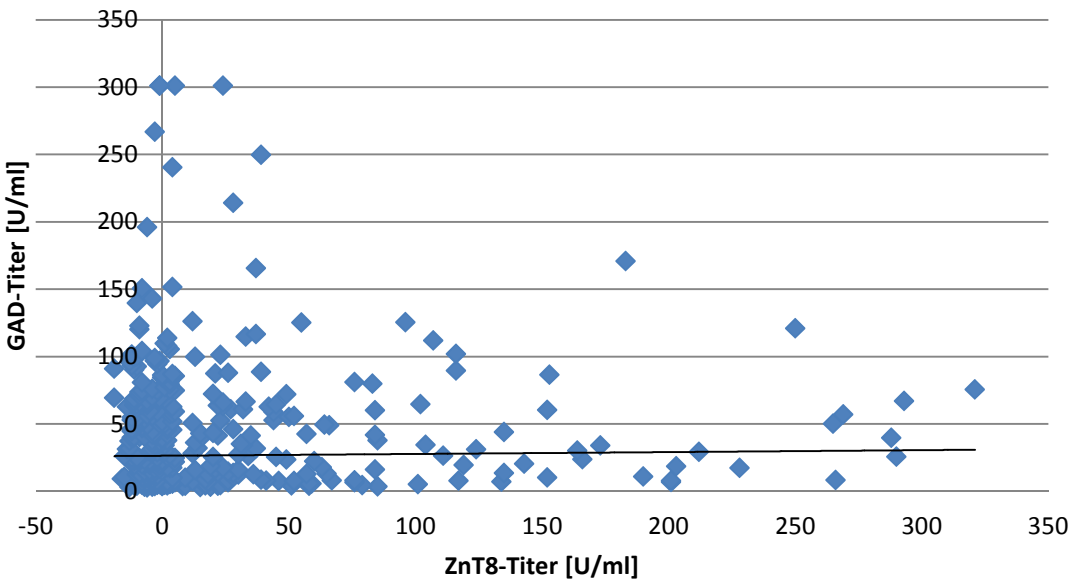


Abb. 12: Abhängigkeit des Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titers vom Zinktransporter 8 (ZnT8) Antikörper-Titer

Eine wechselseitige Beeinflussung von GAD und ZnT8 kann durch die Analyse der mir vorliegenden Daten nicht nachgewiesen werden: Es besteht weder eine Abhängigkeit des ZnT8-Titers vom GAD-Titer, noch eine Abhängigkeit des GAD-Titers vom ZnT8-Titer.

3.1.4 Einfluss der Anzahl positiver Diabetes-spezifischer Antikörper auf ZnT8

Um einen möglichen Einfluss der Diabetes-spezifischen Antikörper GAD, IA-2 und ICA auf die Prävalenz von ZnT8 zu untersuchen, wurden zunächst Gruppen gebildet, in denen

- keiner der o .g. Antikörper,
- einer der o. g. Antikörper,
- zwei der o. g. Antikörper oder
- alle drei o. g. Antikörper positiv waren.

Zi

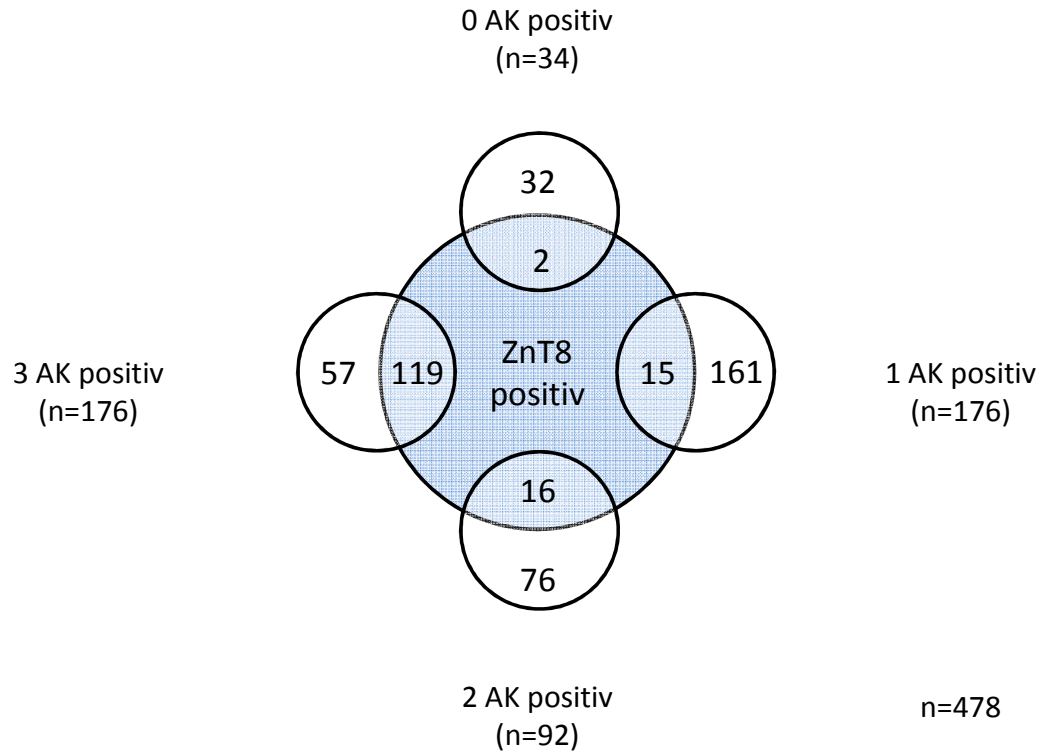


Abb. 13: Zusammenhang zwischen Zinktransporter 8 (ZnT8) Antikörper Positivität und dem Nachweis anderer Diabetes-spezifischer Antikörper (AK)

3 AK positiv:	Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper, Inselzellantikörper (ICA) und Tyrosin-Phosphatase 2 (IA-2) Antikörper positiv
2 AK positiv:	2 der 3 o. g. AK positiv,
1 AK positiv:	GAD, ICA oder IA2 positiv,
0 AK positiv:	keiner der 3 o. g. AK positiv)

In diesem Venn-Diagramm ist die Anzahl der ZnT8-positiven Proben in den einzelnen Gruppen dargestellt. In den außen liegenden weiß hinterlegten Anteilen der Kreise finden sich ZnT8 negative Proben in den einzelnen Gruppen, innen

liegend (hellblau hinterlegt) die ZnT8 positiven Proben. Stellt man diese Werte prozentual dar, ergibt sich folgende Tabelle:

Tab. 5: Prävalenz von Zinktransporter 8 (ZnT8) Antikörpern in den Gruppen 0-3 Antikörper (AK) positiv

Vorauswahl	Anteil der ZnT8-positiven Proben
0 AK positiv	5,9%
1 AK positiv	8,5%
2 AK positiv	17,4%
3 AK positiv	67,6%

Hier zeigt sich eine Zunahme der Prävalenz von ZnT8 mit steigender Anzahl positiv getesteter Diabetes-spezifischer Antikörper. Dieses Phänomen ließ sich in zunehmendem Maße bei allen vier oben beschriebenen Gruppen nachweisen. Die niedrigste ZnT8-Prävalenz zeigte sich mit 5,9% in der Gruppe der Patienten, bei denen keine Diabetes-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnten, die höchste ZnT8-Prävalenz wurde mit 67,6% in der Gruppe derer, bei denen alle drei vorbestimmten Antikörper positiv waren, bestimmt.

Diese Unterschiede zeigten sich dabei zwischen fast allen Gruppen signifikant:

- 0 AK positiv - ≥ 1 AK positiv ($p < 0,001$)
- 1 AK positiv - ≥ 2 AK positiv ($p < 0,001$)
- 1 AK positiv – 2 AK positiv ($p < 0,05$)
- 2 AK positiv – 3 AK positiv ($p < 0,001$)
- 2 AK positiv - ≤ 1 AK positiv ($p < 0,025$)
- 3 AK positiv - ≤ 2 AK positiv ($p < 0,001$)

Auch im Chi-Quadrat-Test mit 3 Freiheitsgraden für 2 x 4 Felder konnte ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) festgestellt werden.

3.2 Bedeutung von Schilddrüsenautoimmunität bei spät-manifestiertem autoimmunem Diabetes

3.2.1 Prävalenz von TPO im gesamten untersuchten Kollektiv

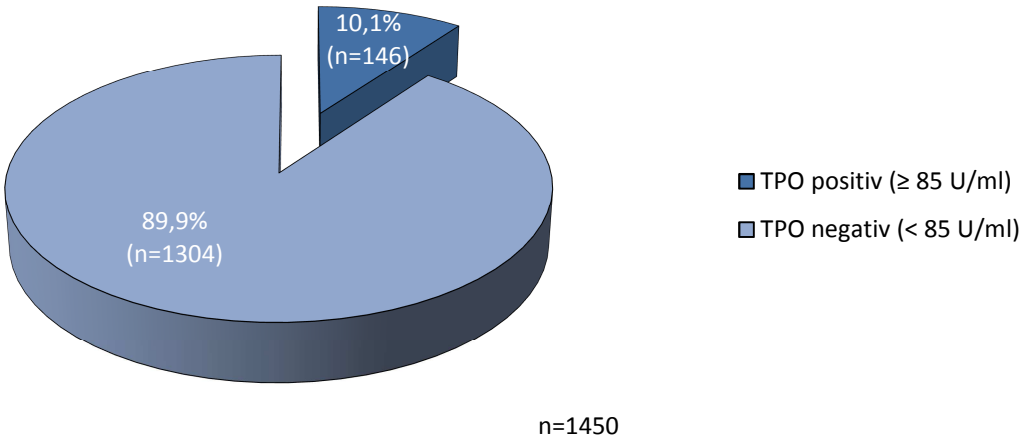


Abb. 14: Prävalenz von Antikörpern gegen Thyreoperoxidase (TPO) im gesamten untersuchten Kollektiv

Im gesamten untersuchten Kollektiv spät-manifestierter Diabetespatienten betrug die Prävalenz von TPO ~10%. Als positiv eingestuft wurden Proben mit einem Titer ≥ 85 U/ml. Insgesamt wurden 1450 Proben analysiert.

3.2.2 Einfluss des Geschlechts auf die Prävalenz von TPO

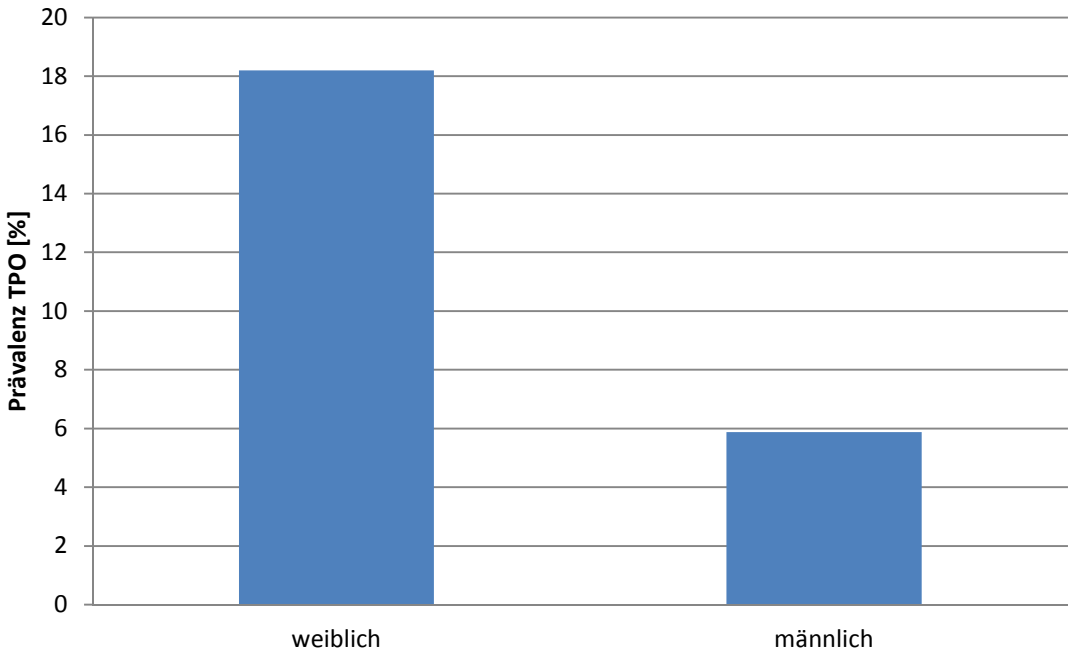


Abb. 15: Prävalenz von Antikörpern gegen Thyreoperoxidase (TPO) im Geschlechtsvergleich

Im hier vorliegenden Patientenkollektiv spät-manifestierter Diabetespatienten lässt sich eine deutlich erhöhte Prävalenz von TPO bei Frauen im Vergleich zu Männern nachweisen (3-fach erhöht; 18,2% vs. 5,88%, $p < 0,001$).

3.2.3 Einfluss des Alters auf die Prävalenz von TPO

Tab. 6: Prävalenz von Antikörpern gegen Thyreoperoxidase (TPO) in verschiedenen Altersgruppen (in Klammern jeweils die Daten für weiblich [w], männlich [m] und unbekannt)

Alter	**Anzahl getestet (w/m/unbekannt)**	**Anzahl TPO positiv (w/m/unbekannt)**	**Anteil TPO positiv (w/m)**
0 Jahre – <20 Jahre	**74** (29/42/3)	**3** (2/1/0)	**4,1%** (6,9%/2,4%)
20 Jahre – <25 Jahre	**82** (33/46/3)	**11** (8/3/0)	**13,4%** (24,2%/6,5%)
25 Jahre - <30 Jahre	**121** (44/70/7)	**12** (5/7/0)	**9,9%** (11,4%/10,0%)
30 Jahre – <35 Jahre	**140** (45/89/6)	**17** (5/9/3)	**12,1%** (11,1%/10,1%)
35 Jahre – <40 Jahre	**157** (39/107/11)	**7** (0/7/0)	**4,5%** (0%/6,5%)
40 Jahre – <45 Jahre	**132** (32/93/7)	**17** (4/11/2)	**12,9%** (4,9%/11,8%)
45 Jahre – <50 Jahre	**132** (32/91/9)	**17** (4/10/3)	**12,9%** (4,9%/11,0%)
50 Jahre – <55 Jahre	**83** (21/55/7)	**8** (3/4/1)	**9,6%** (14,3%/7,3%)
55 Jahre – <60 Jahre	**54** (21/28/5)	**6** (4/1/1)	**11,1%** (19,1%/3,6%)
≥ 60 Jahre	**72** (29/35/8)	**8** (7/1/0)	**11,1%** (25,9%/2,9%)
unbekannt	**403**		

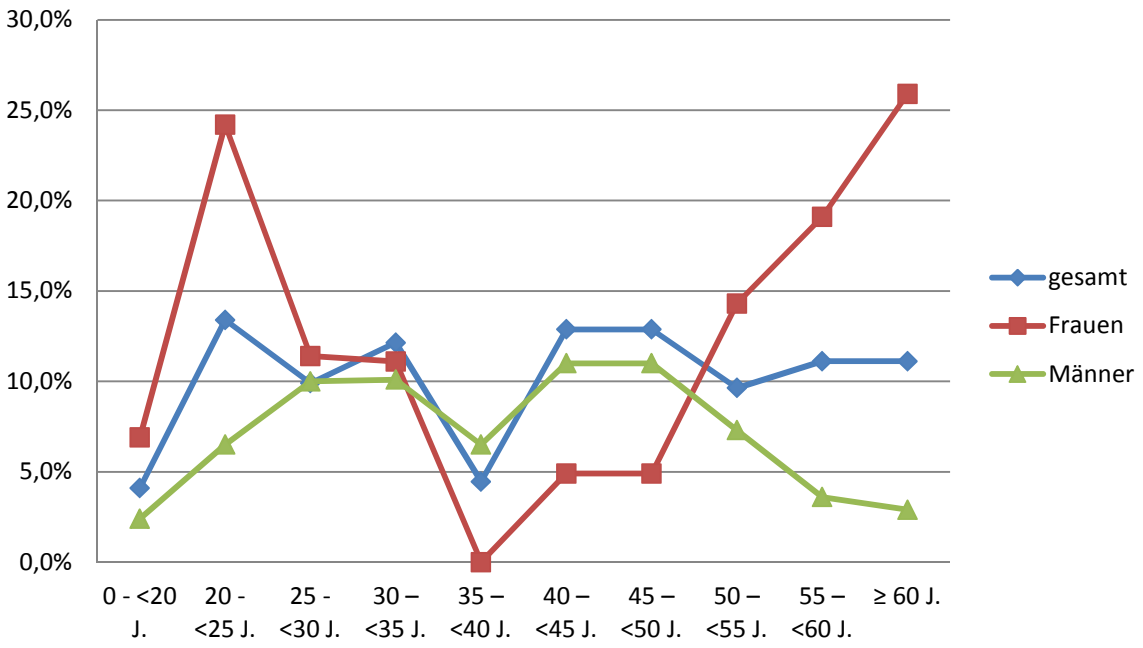


Abb. 16: Graphische Darstellung der Prävalenz von Antikörpern gegen Thyreoperoxidase (TPO) in verschiedenen Altersgruppen

Unabhängig vom Geschlecht und in allen untersuchten Gruppen (Männer, Frauen, gesamt) zeigt sich in der Gruppe der 0-20-Jährigen eine niedrige Prävalenz (4,1% gesamt). Außerdem lässt sich ebenfalls unabhängig vom Geschlecht in allen untersuchten Gruppen in der Altersgruppe der 35-40-Jährigen jeweils eine Abnahme der Prävalenz von Schilddrüsenautoimmunität nachweisen. Diese Abnahme beträgt im Vergleich zu den jüngeren Altersgruppen durchschnittlich 5,4% (Gesamtprävalenz, jedoch nicht signifikant) und im Vergleich zu den älteren Altersgruppen durchschnittlich 11,9% (Gesamtprävalenz, $p < 0,05$). Auch im Vergleich zu der gleichaltrigen männlichen Gruppe der 35-40-Jährigen liegen die weiblichen Vergleichswerte 5,6% niedriger (ebenfalls nicht signifikant). Dies ändert sich dann mit steigendem Alter: Dort steigt der Anteil nachgewiesener Schilddrüsenautoimmunität bei Frauen deutlich an, während bei Männern ein Abfall zu registrieren ist.

3.2.4 Einfluss von GAD auf den TPO-Titer

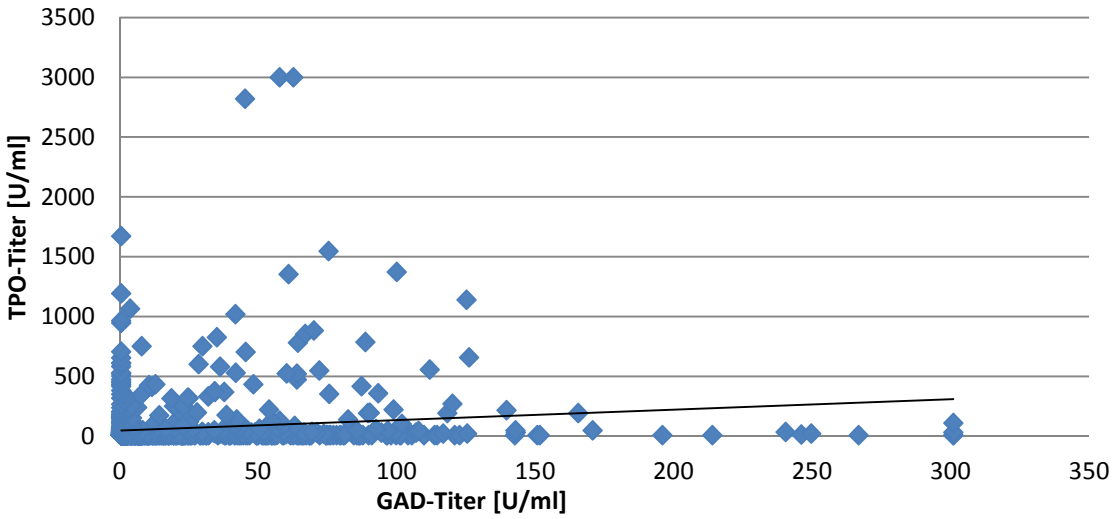


Abb. 17: Abhängigkeit des Titers von Antikörpern gegen Thyreoperoxidase (TPO) vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titer

Tab. 7: Mittelwert und Mittelabweichung des Thyreoperoxidase (TPO) Antikörper-Titers

	Mittelwert	Mittelabweichung
TPO-Titer	62,2	86,1

Graphisch ist hier die Abhängigkeit des TPO-Titers vom GAD-Titer dargestellt. Bei einem mittleren TPO-Titer von 62,2 und einer Mittelabweichung von 86,1 kann in dieser Analyse eine (wenn auch geringe) positive Korrelation festgestellt werden.

3.2.5 Einfluss der Anzahl positiver Diabetes-spezifischer Antikörper auf TPO

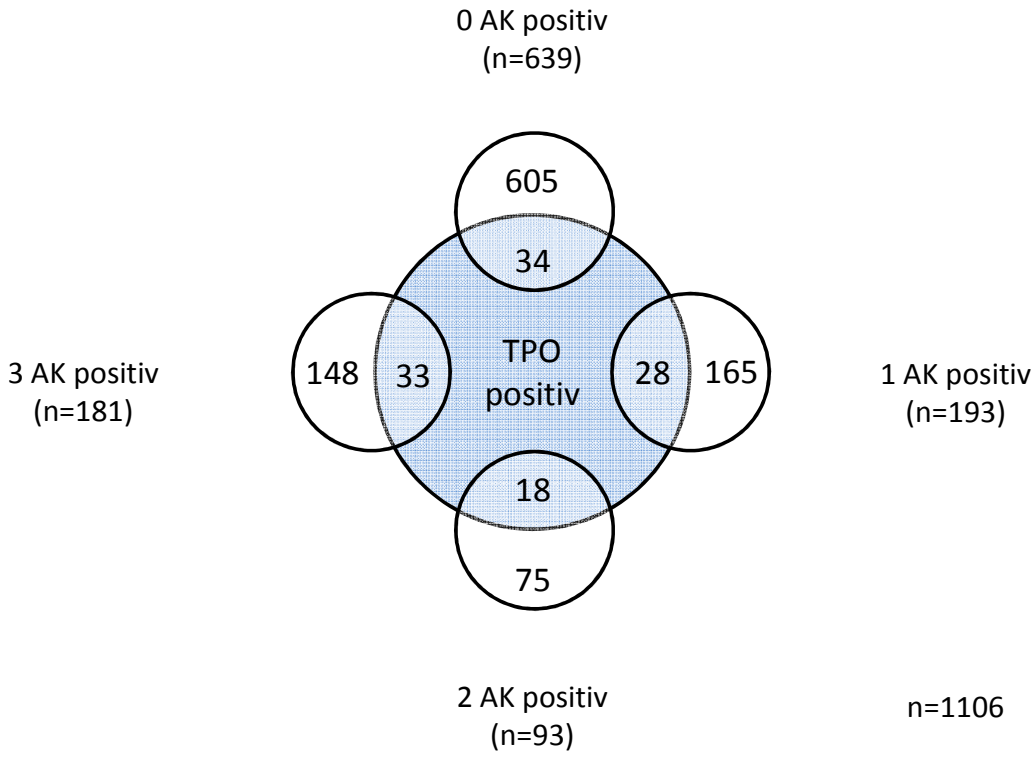


Abb. 18: Zusammenhang zwischen Thyreoperoxidase (TPO) Antikörper-Positivität und anderen Diabetes-spezifischen Antikörpern (AK)

In diesem Venn-Diagramm ist die Anzahl der TPO-positiven Proben in den einzelnen Gruppen (0-3 Antikörper positiv) dargestellt (zur Einteilung der einzelnen Gruppen siehe Abschnitt 3.1.4).
Bei der prozentualen Darstellung der Werte ergibt sich folgende Tabelle:

Tab. 8: Prävalenz von Antikörpern gegen Thyreoperoxidase (TPO) in den Gruppen 0-3 Antikörper (AK) positiv

Vorauswahl	Anteil der TPO-positiven Proben
0 AK positiv	5,3%
1 AK positiv	14,5%
2 AK positiv	19,4%
3 AK positiv	18,2%

Die Analyse zeigt, dass mit steigender Anzahl positiver Diabetes-spezifischer Antikörper auch die Prävalenz von TPO zunimmt. Diese steigt von 5,3% in der Gruppe der Patienten, bei denen keine Diabetes-spezifischen Antikörper

nachgewiesen werden konnten, auf 18,2% in der Gruppe derer, bei denen alle drei vorbestimmten Antikörper positiv waren.

Signifikante Unterschiede konnten dabei in folgenden Gruppen nachgewiesen werden:

- 0 AK positiv – ≥ 1 AK positiv ($p < 0,001$)
- 0 AK positiv – 1 AK positiv ($p < 0,001$)
- 2 AK positiv – ≤ 1 AK positiv ($p < 0,001$)

Auch im Chi-Quadrat-Test mit 3 Freiheitsgraden für 2 x 4 Felder konnte ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) festgestellt werden.

3.3 Bedeutung von Darm-assoziierter Autoimmunität bei spät-manifestiertem autoimmunem Diabetes

3.3.1 Gliadin IgA-Antikörper

Einfluss von GAD auf den Gliadin IgA-Titer

- *für alle gemessenen GAD*

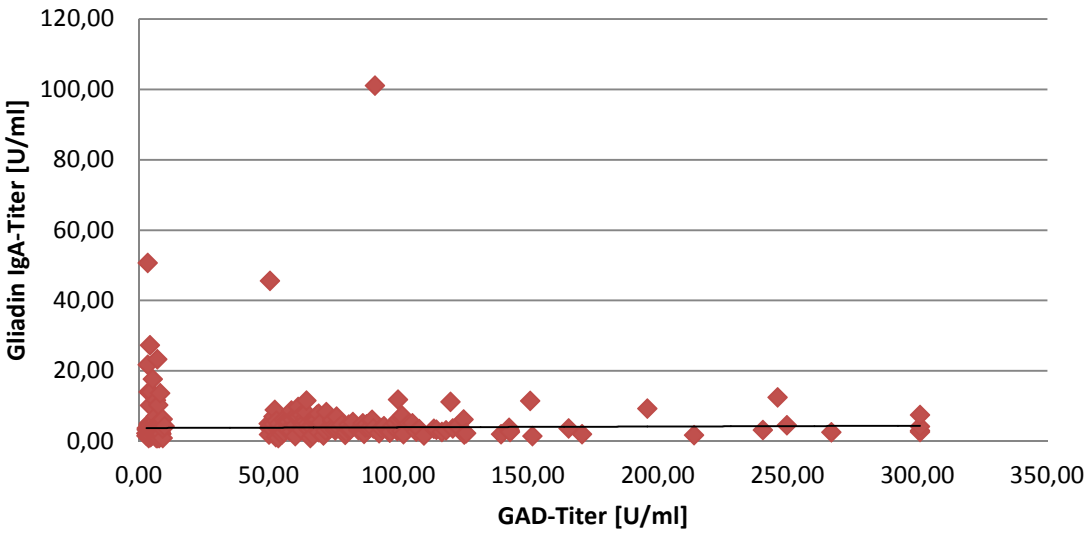


Abb. 19: Abhängigkeit des Gliadin IgA-Titers vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titer (für alle gemessenen GAD)

Dargestellt ist die Höhe des Gliadin IgA-Titers in Abhängigkeit von der Höhe des GAD-Titers. Eine Beeinflussung der Gliadin IgA-Titers durch den GAD-Titer kann nicht nachgewiesen werden.
Das Fehlen aufgetragener Gliadin IgA-Antikörper-Titer im Bereich zwischen GAD-Titern von 10 und 50 U/ml erklärt sich durch die getroffene Vorauswahl, bei der eine Gruppe GAD-niedrigtitrig positiver und eine Gruppe GAD-hochtitrig positiver Proben untersucht wurden und der dazwischen liegende Bereich unberücksichtigt blieb.

Zur genaueren Analyse dieser Subgruppen sind diese beiden Bereiche im Folgenden gesondert aufgeführt:

- *für niedrigtitrig positive GAD*

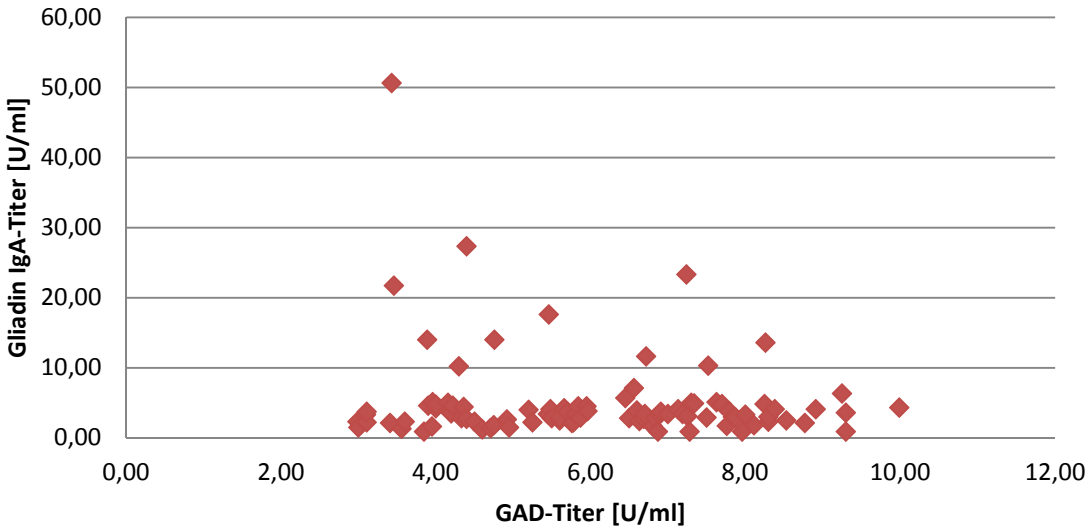


Abb. 20: Abhängigkeit des Gliadin IgA-Titers vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titer (für niedrigtitrig positive GAD)

- *für hochtitrig positive GAD*

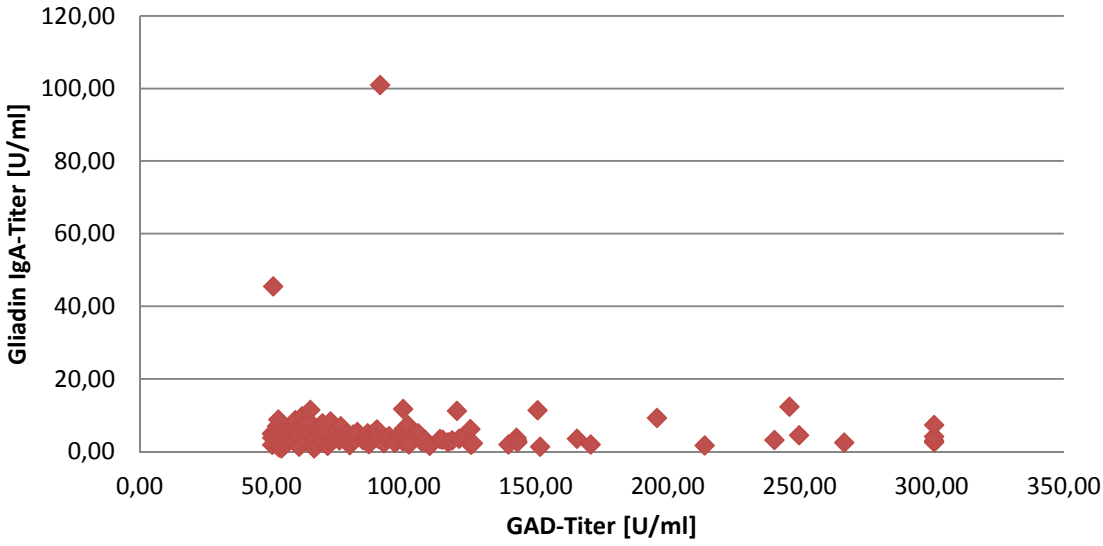


Abb. 21: Abhängigkeit des Gliadin IgA-Titers vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titer (für alle hochtitrig positiven GAD)

Tab. 9: Mittelwert und Mittelabweichung des Gliadin IgA-Titers für niedrig- und hochtitrig positive Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper

	Mittelwert Gliadin IgA-Titer	Mittelabweichung
GAD niedrigtitrig positiv (3-10 U/ml)	5,1	3,5
GAD hochtitrig positiv (≥ 50 U/ml)	5,5	3,1

Auch in der fokussierten Darstellung für die Gruppen der hoch- und niedrigtitrig positiven GAD kann keine Korrelation zur Höhe des Gliadin IgA-Titers festgestellt werden. Der Mittelwert in der Gruppe der niedrigtitrig positiven GAD beträgt 5,1 bei einer Mittelabweichung von 3,5; der Mittelwert in der Gruppe der hochtitrig positiven GAD liegt bei 5,5 und einer Mittelabweichung von 3,1.

Einfluss der Anzahl positiver Diabetes-spezifischer Antikörper auf Gliadin IgA

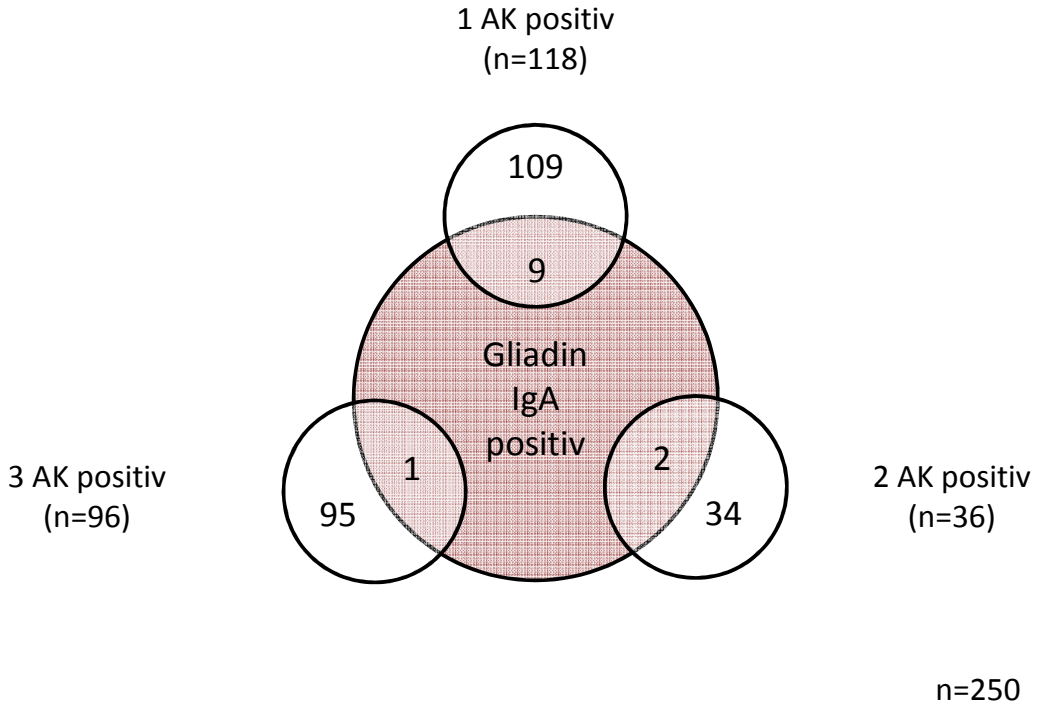


Abb. 22: Zusammenhang zwischen Gliadin IgA-Positivität und anderen Diabetes-spezifischen Antikörpern (AK)

In diesem Venn-Diagramm ist die Anzahl der Gliadin IgA-positiven Proben in den einzelnen Gruppen (0-3 Antikörper positiv) dargestellt (zur Einteilung der einzelnen Gruppen siehe Abschnitt 3.1.4).
Bei der prozentualen Darstellung der Werte ergibt sich folgende Tabelle:

Tab. 10: Prävalenz von Gliadin IgA in den Gruppen 0-3 Antikörper (AK) positiv

Vorauswahl	Anteil der Gliadin IgA-positiven Proben
1 AK positiv	7,6%
2 AK positiv	5,6%
3 AK positiv	1,0%

Für Gliadin IgA sinkt der Anteil der Gliadin IgA-positiven Proben mit steigender Anzahl positiv getesteter Diabetes-spezifischer Antikörper.
Statistisch konnte eine negative Korrelation für die Gruppe „1 AK positiv“ – „≥ 2 AK positiv“ ($p < 0,05$, exakter Fisher Test) nachgewiesen werden. Außerdem bestand

ein signifikanter Unterschied in der Gruppe „3 AK positiv“ – „≤ 2 AK positiv“ ($p < 0,05$).

3.3.2 Gliadin IgG-Antikörper

Einfluss von GAD auf den Gliadin IgG-Titer

- *für alle gemessenen GAD*

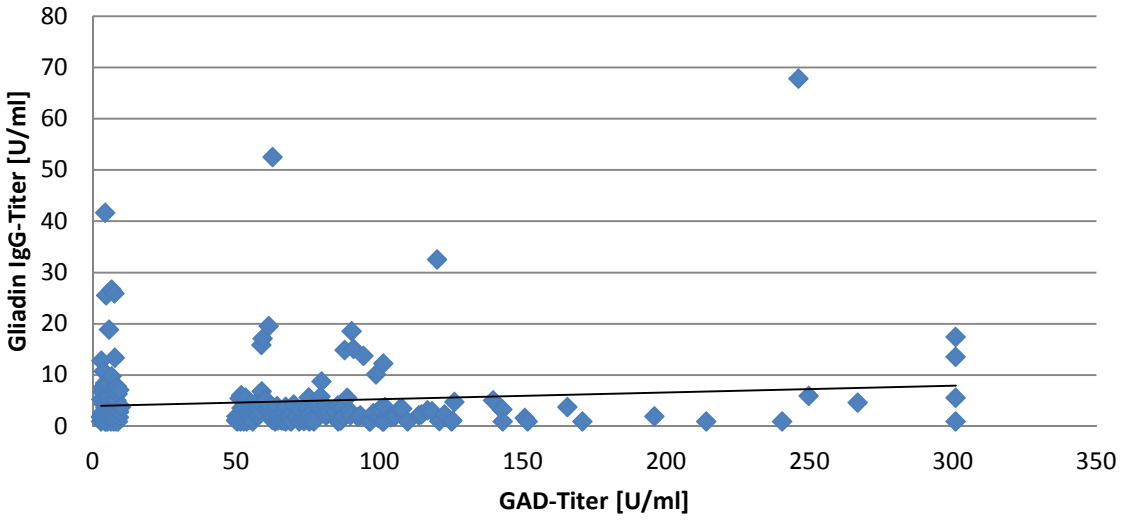


Abb. 23: Abhängigkeit des Gliadin IgG-Titers vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titer (für alle gemessenen GAD)

Untersucht wird hier ein möglicher Einfluss der Höhe des GAD-Titers auf den Gliadin IgG-Titer. Eine Abhängigkeit kann nicht festgestellt werden.
Das Fehlen aufgetragener Gliadin IgG-Antikörper-Titer im Bereich zwischen GAD-Titern von 10 und 50 U/ml erklärt sich durch die getroffene Vorauswahl, bei der eine Gruppe GAD-niedrigtitrig positiver und eine Gruppe GAD-hochtitrig positiver Proben untersucht wurden und der dazwischen liegende Bereich unberücksichtigt blieb.
Zur genaueren Analyse dieser Subgruppen sind diese beiden Bereiche im Folgenden gesondert aufgeführt:

- *für alle niedrigtitrig positiven GAD*

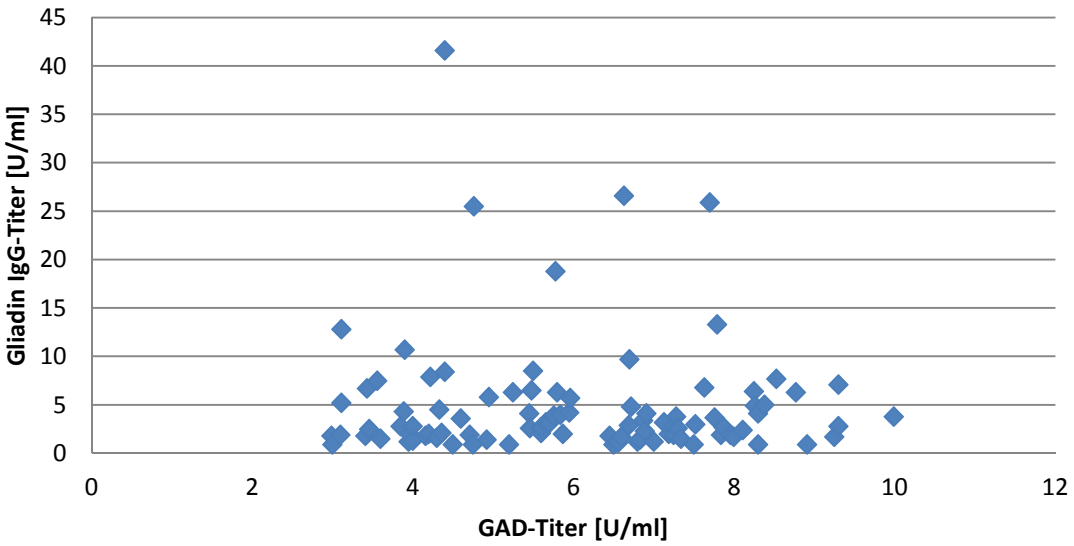


Abb. 24: Abhängigkeit des Gliadin IgG-Titers vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titer (für alle niedrigtitrig positiven GAD)

- *für alle hochtitrig positiven GAD*

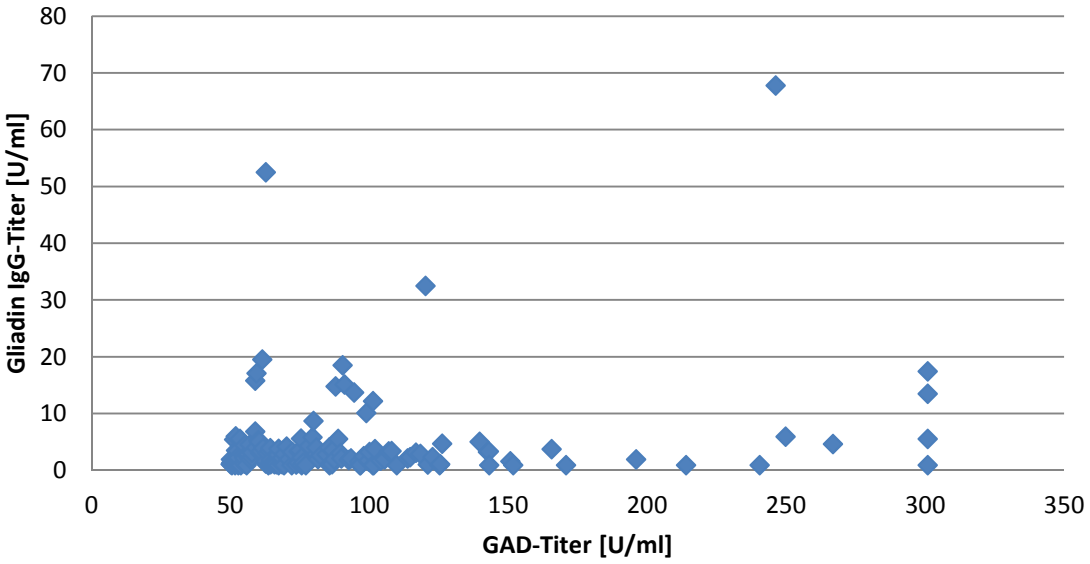


Abb. 25: Abhängigkeit des Gliadin IgG-Titers vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titer (für alle hochtitrig positiven GAD)

Tab. 11: Mittelwert und Mittelabweichung des Gliadin IgG-Titers für niedrig- und hochtitrig positive Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper

	Mittelwert Gliadin IgG-Titer	Mittelabweichung
GAD niedrigtitrig positiv (3-10 U/ml)	4,9	3,7
GAD hochtitrig positiv (≥ 50 U/ml)	4,6	3,9

Auch in der fokussierten Darstellung für die Gruppen der hoch- und niedrigtitrig positiven GAD kann keine Korrelation zur Höhe des Gliadin IgG-Titers festgestellt werden. Der Mittelwert in der Gruppe der niedrigtitrig positiven GAD beträgt 4,9 bei einer Mittelabweichung von 3,7; der Mittelwert in der Gruppe der hochtitrig positiven GAD liegt bei 4,6 und einer Mittelabweichung von 3,9.

Einfluss der Anzahl positiver Diabetes-spezifischer Antikörper auf Gliadin IgG

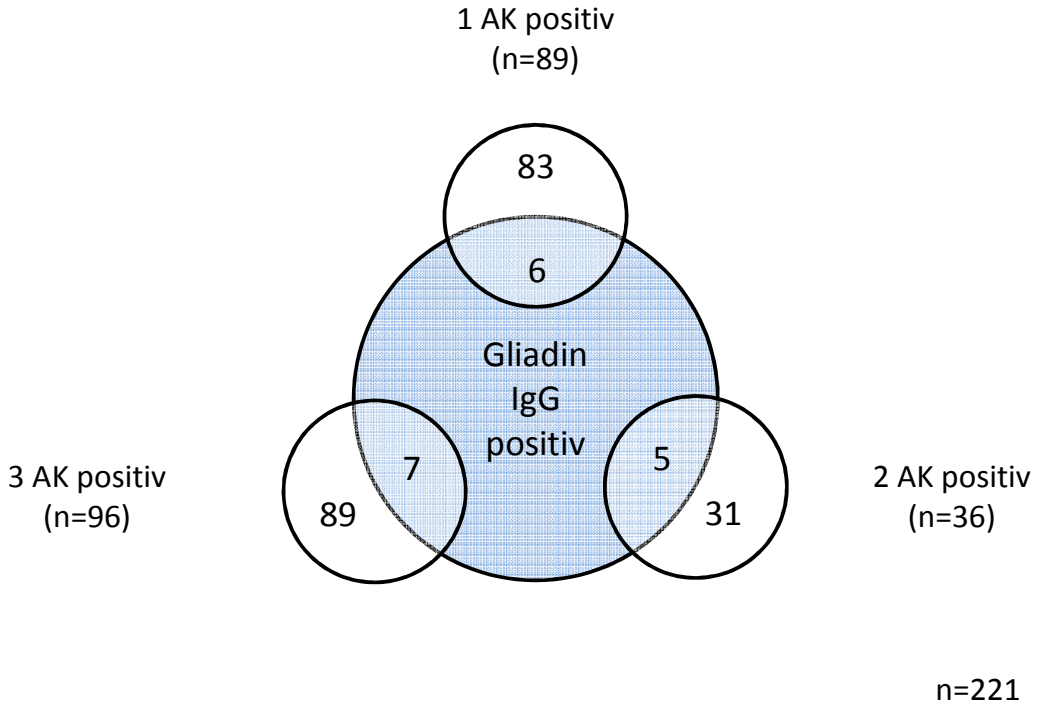


Abb. 26: Zusammenhang zwischen Gliadin IgG-Positivität und anderen Diabetes-spezifischen Antikörpern

Tab. 12: Prävalenz von Gliadin IgG in den Gruppen 0-3 Antikörper (AK) positiv

Vorauswahl	Anteil der Gliadin IgG-positiven Proben
1 AK positiv	6,7%
2 AK positiv	13,9%
3 AK positiv	7,3%

In Bezug auf die Prävalenz von Gliadin IgG in Abhängigkeit von der Anzahl weiterer Diabetes-spezifischer Antikörper konnte in den dargestellten Gruppen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. In den Gruppen „1 Antikörper positiv“ und „3 Antikörper positiv“ fanden sich vergleichbare Werte (6,7%, 7,3%), während in der Gruppe „2 Antikörper positiv“ der Anteil deutlich höher lag (13,9%).

3.3.3 tTG IgA-Antikörper

Einfluss von GAD auf den tTG IgA-Titer

- *für alle gemessenen GAD*

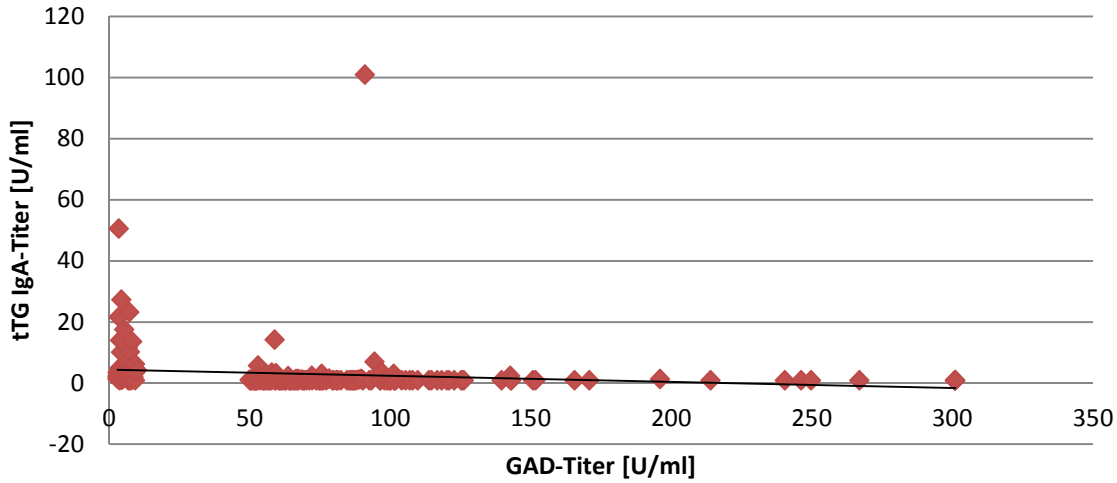


Abb. 27: Abhängigkeit des Transglutaminase (tTG) IgA-Titers vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titer (für alle gemessenen GAD)

Analog zur Darstellung der Abhängigkeit der Gliadin IgA und IgG-Titer vom GAD-Titer zeigte sich auch in der Darstellung der Abhängigkeit des tTG-IgA-Titers vom GAD-Titers keine Korrelation.
Wie oben bei den vorausgegangenen analogen Darstellungen von Gliadin IgA und IgG erfolgte auch hier die Analyse der Subgruppen für GAD niedrig- und GAD hochtitrig positive Werte gesondert:

- *für niedrigtitrig positive GAD*

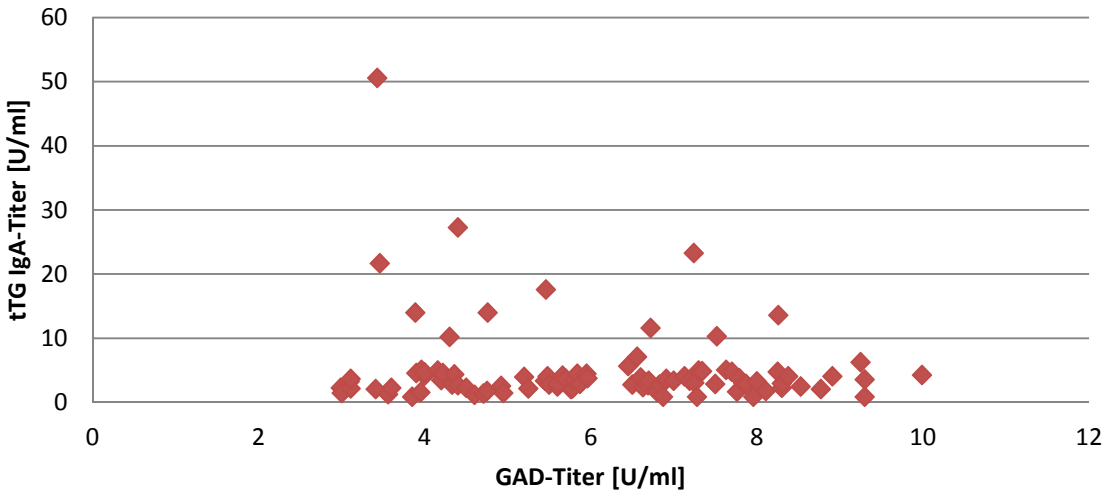


Abb. 28: Abhängigkeit des Transglutaminase (tTG) IgA-Titers vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titer (für niedrigtitrig positive GAD)

- *für hochtitrig positive GAD*

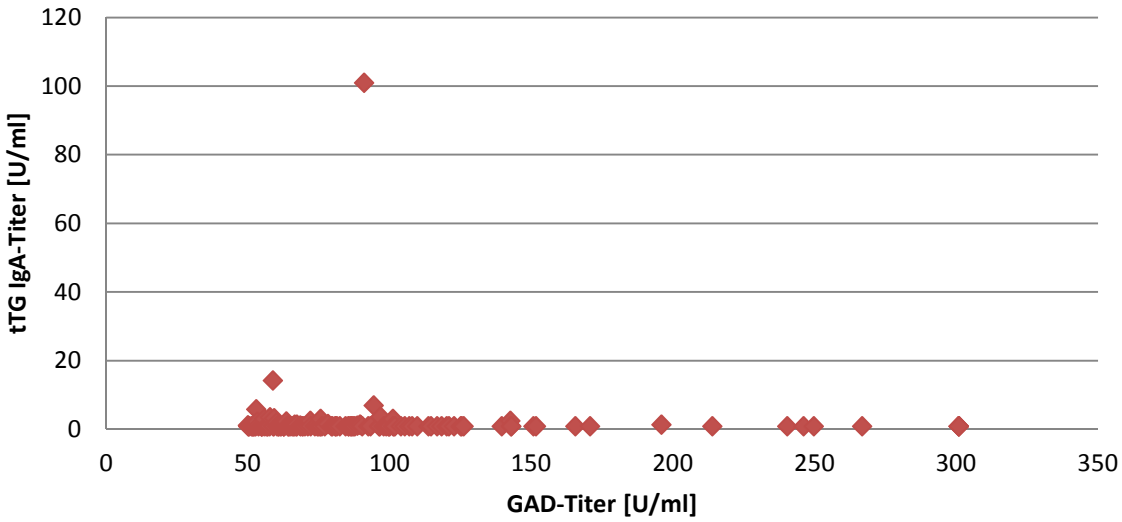


Abb. 29: Abhängigkeit des Transglutaminase (tTG) IgA-Titers vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titer (für hochtitrig positive GAD)

Tab. 13: Mittelwert und Mittelabweichung des Transglutaminase (tTG) IgA-Titers für niedrig- und hochtitrig positive Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper

	Mittelwert tTG IgA-Titer	Mittelabweichung
GAD niedrigtitrig positiv (3-10 U/ml)	5,1	3,5
GAD hochtitrig positiv (≥ 50 U/ml)	2,0	1,9

Auch in der fokussierten Darstellung für die Gruppen der hoch- und niedrigtitrig positiven GAD kann keine Korrelation zur Höhe des tTG IgA-Titers festgestellt werden. Der Mittelwert in der Gruppe der niedrigtitrig positiven GAD beträgt 5,1 bei einer Mittelabweichung von 3,5; der Mittelwert in der Gruppe der hochtitrig positiven GAD liegt bei 2,0 und einer Mittelabweichung von 1,9.

Einfluss der Anzahl positiver Diabetes-spezifischer Antikörper auf tTG IgA

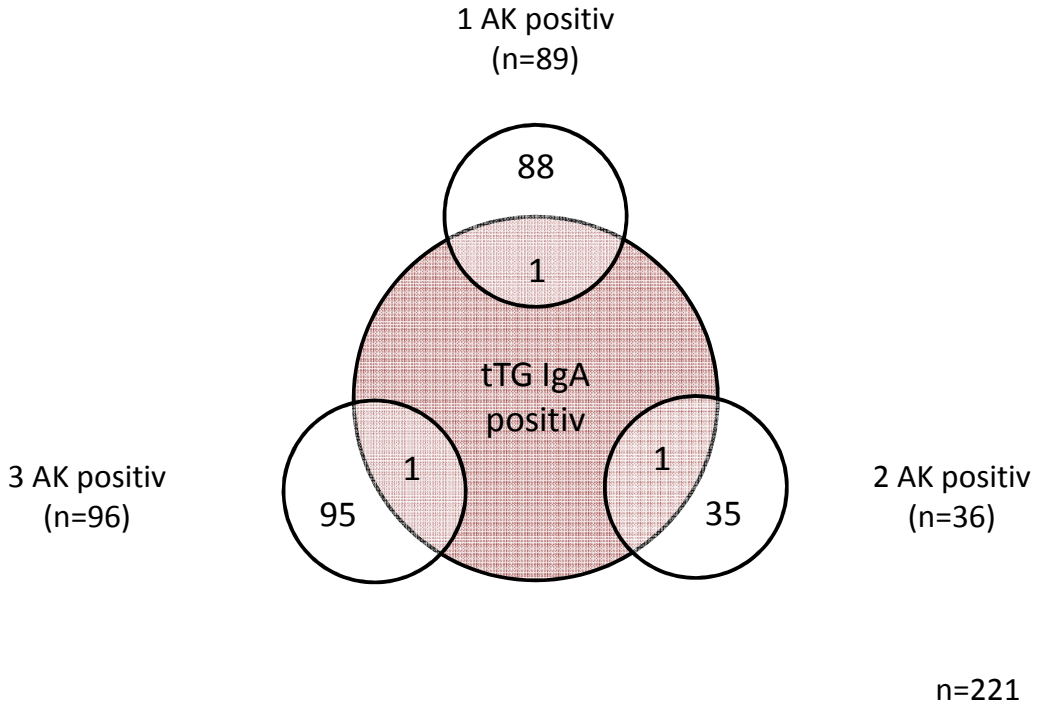


Abb. 30: Zusammenhang zwischen Transglutaminase (tTG) IgA-Positivität und anderen Diabetes-spezifischen Antikörpern

Tab. 14: Prävalenz von Transglutaminase (tTG) Antikörpern in den Gruppen 0-3 Antikörper (AK) positiv

Vorauswahl	Anteil der tTG IgA-positiven Proben
1 AK positiv	1,1%
2 AK positiv	2,8%
3 AK positiv	1,0%

In den 3 Gruppen (1, 2 und 3 Antikörper positiv) lag der Anteil der tTG-positiven Proben zwischen 1,0% und 2,8%. Damit kann in Bezug auf die Abhängigkeit der Prävalenz von tTG IgA von der Anzahl weiterer Diabetes-spezifischer Antikörper in den dargestellten Gruppen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

3.4 Prävalenz verschiedener Antikörper in Abhängigkeit vom GAD-Titer

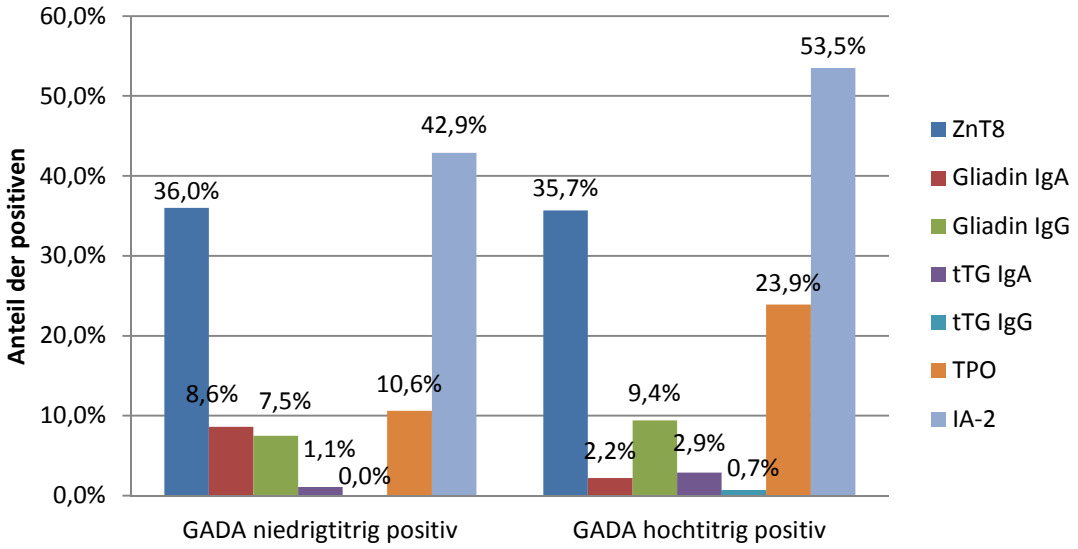


Abb. 31: Prävalenz versch. Antikörper (AK) für hoch- und niedrigtitrig positive Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper (ZnT8: Antikörper gegen Zinktransporter 8, tTG: Antikörper gegen Transglutaminase, TPO: Antikörper gegen Thyreoperoxidase, IA-2: Antikörper gegen Tyrosin-Phosphatase 2 (1)

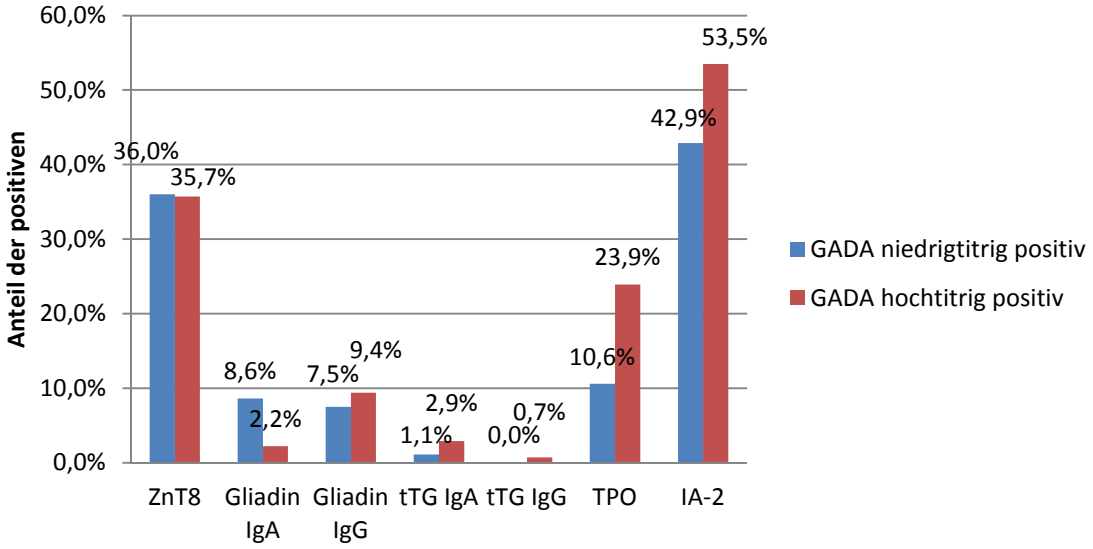


Abb. 32: Prävalenz versch. Antikörper (AK) für hoch- und niedrigtitrig positive Glutamatdecarboxylase-Antikörper (GADA: Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase, ZnT8: Antikörper gegen Zinktransporter 8, tTG: Antikörper gegen Transglutaminase, TPO: Antikörper gegen Thyreoperoxidase, IA-2: Antikörper gegen Tyrosin-Phosphatase 2 (2)

In den Gruppen GAD hochtitrig positiv und GAD niedrigtitrig positiv gab es keine Unterschiede bezüglich der Prävalenz von ZnT8, im Gegenteil war ZnT8 in beiden Gruppen gleich verteilt (36% in der Gruppe niedrigtitrig positiv, 35,7% in der Gruppe hochtitrig positiv, $p = 0,96$).
In Bezug auf Gliadin IgA konnte ein signifikanter Unterscheid zwischen beiden GAD-Gruppen festgestellt werden ($p < 0,05$). Auffällig ist, dass es sich dabei um eine negative Korrelation handelt, d. h. in der Gruppe der hochtitrig positiven GAD liegt die Prävalenz von Gliadin IgA signifikant niedriger ($p = 0,027$, Exakter Fisher Test).
Bei Betrachtung weiterer mit Zöliakie assoziierter Antikörper (Gliadin IgG, tTG IgA, tTG IgG) zeigte sich die oben beschriebene Beobachtung nicht konsistent, und es konnten keine signifikanten Unterschiede in beiden Gruppen (GAD hoch- und niedrigtitrig positiv) nachgewiesen werden.
In der Gruppe der hochtitrig positiven GAD ergab sich ein ~ 2,3mal höherer Anteil TPO-positiver Proben als in der Gruppe der niedrigtitrig positiven (23,9%, 10,6%). Dieser Unterscheid erwies sich als hoch signifikant ($p < 0,01$).
Bezogen auf IA-2 betrug der Unterschied zwischen der Prävalenz in beiden Gruppen ~ 10% (42,9% in der Gruppe GAD hochtitrig positiv, 53,5% in der Gruppe GAD niedrigtitrig positiv) und erwies sich damit als gerade nicht signifikant ($p = 0,064$).

3.5 Häufigkeitsverteilung verschiedener Antikörper in Abhängigkeit von der Höhe des Antikörpertiters

3.5.1 Relative Häufigkeit der ZnT8-positiven Proben

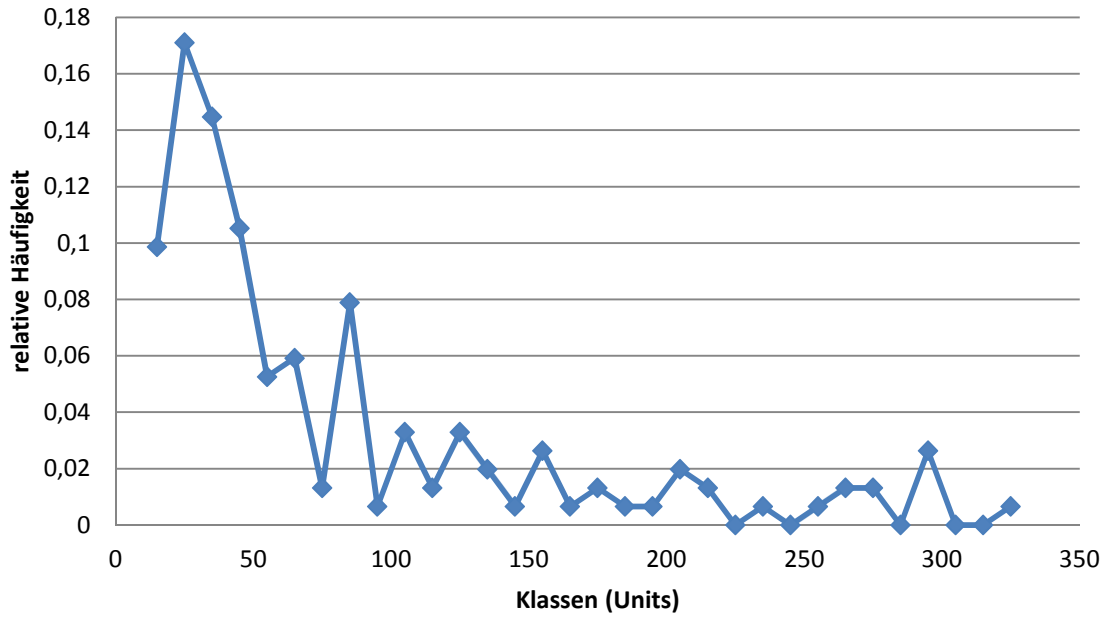


Abb. 33: Relative Häufigkeit der Zinktransporter 8 (ZnT8) Antikörper positiven Proben

Die höchste relative Häufigkeit der ZnT8-positiven Proben zeigt sich im Bereich niedriger (positiver) Titer. Im Verlauf zu höher positiven Titern sinkt die relative Häufigkeit.

3.5.2 Relative Häufigkeit aller IA-2

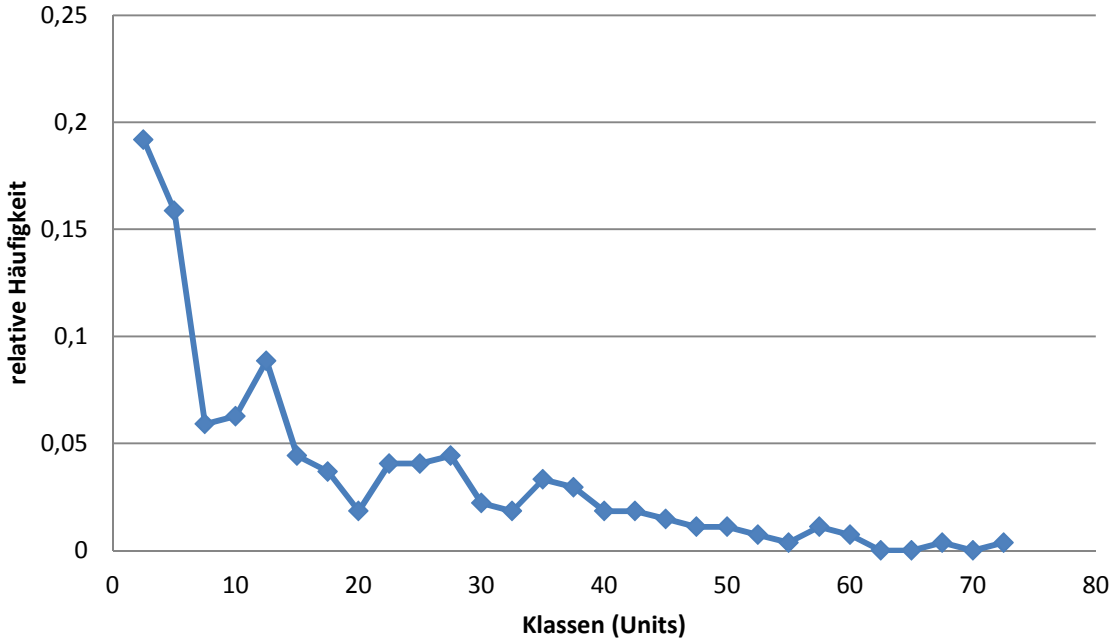


Abb. 34: relative Häufigkeit aller Tyrosin-Phosphatase 2 (IA-2) Antikörper

Es zeigt sich die gleiche Verteilung wie bei ZnT8 mit hohen relativen Häufigkeiten im Bereich niedriger Titer und abnehmenden relativen Häufigkeiten mit steigender Titer-Höhe.

3.5.3 Relative Häufigkeit der GAD-positiven Proben

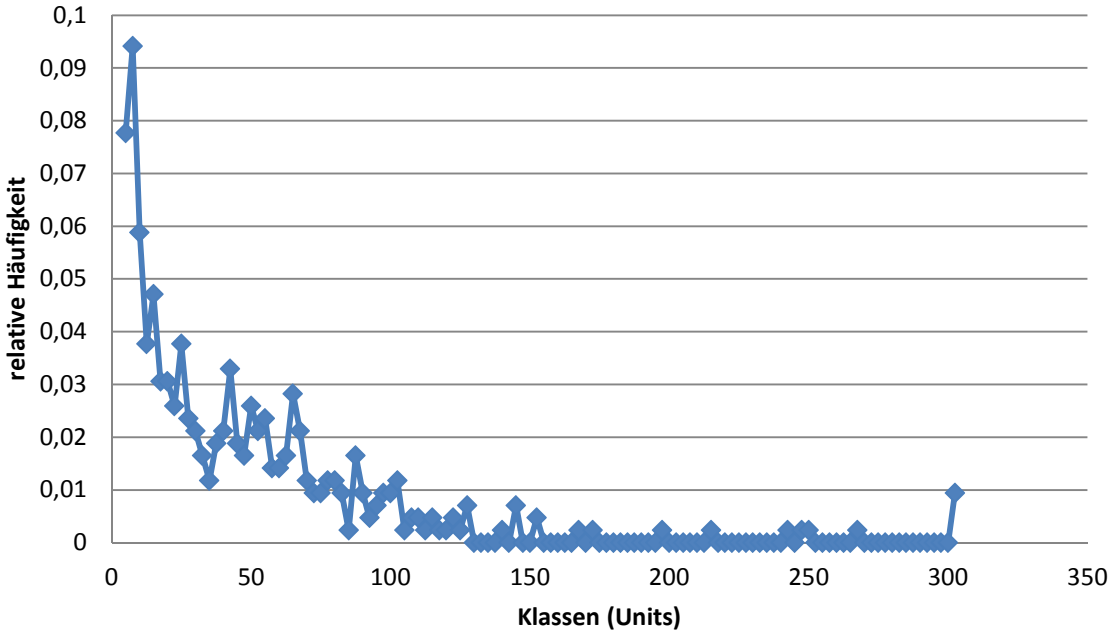


Abb. 35: relative Häufigkeit der Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper positiven Proben

Auch bei Untersuchung der GAD-positiven Proben liegt die höchste relative Häufigkeit im Bereich niedriger (positiver) Titer.

3.5.4 Relative Häufigkeit der TPO-positiven Proben

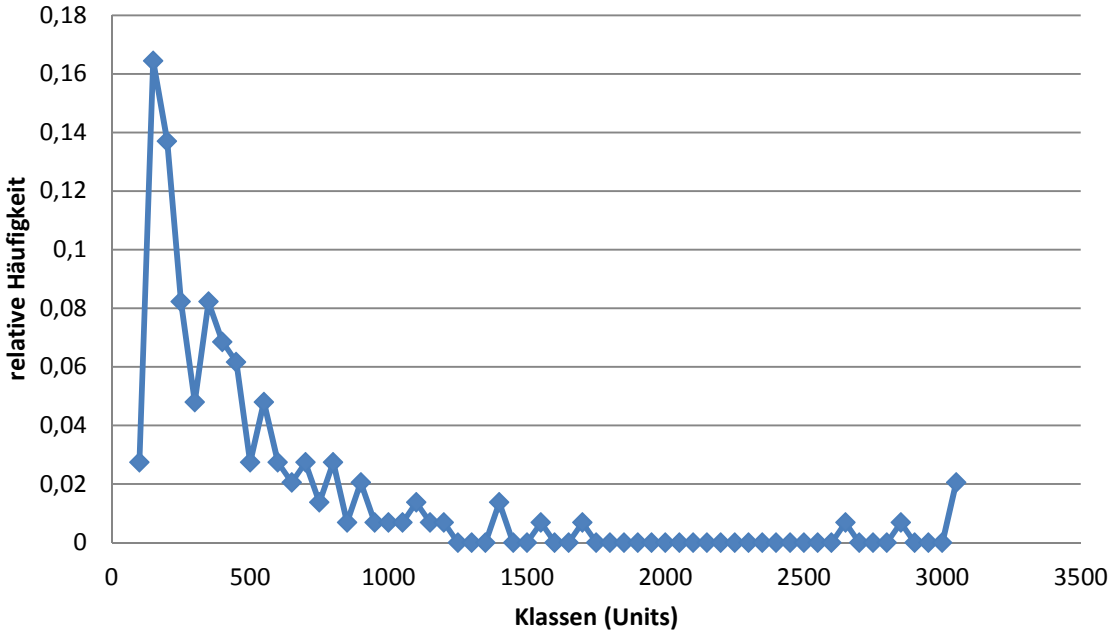


Abb. 36: relative Häufigkeit der Thyreoperoxidase (TPO) Antikörper positiven Proben

Die Verteilung der relativen Häufigkeit der TPO-positiven Proben liegt ebenfalls im Bereich niedriger Titer am höchsten mit im Verlauf zu höheren Titern abnehmender relativer Häufigkeit.

4. DISKUSSION

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen untersucht:

- Kann der spät-manifestierte Diabetes durch ein bestimmtes Antikörperprofil charakterisiert werden?
- Was für eine Rolle spielt der neue Antikörper ZnT8 beim spät-manifestierten Diabetes?
- Wie stellt sich die Prävalenz weiterer Autoimmunphänomene (Hashimoto-Thyreoiditis, Zöliakie) beim spät-manifestierten Diabetes dar?
- Besteht ein Einfluss des GAD-Titers auf die Prävalenz anderer Antikörper (ZnT8, TPO,Transglutaminase [tTG], Gliadin)?
- Beeinflusst die Anzahl positiv getesteter Diabetes-spezifischer Antikörper die Prävalenz weiterer Antikörper?

Nachfolgend werde ich Ergebnisse der durchgeführten Analysen darstellen und diskutieren.

4.1 Bedeutung des GAD-Titers in Bezug auf die Prävalenz weiterer Antikörper

Um einen möglichen Einfluss des GAD-Titers auf die Prävalenz anderer Antikörper zu untersuchen, wurden zunächst Gruppen mit niedrig- und hochtitrig positiven GAD-Titern gebildet und innerhalb dieser Gruppen die Prävalenz der Antikörper ZnT8, TPO, Gliadin und tTG bestimmt. Um nicht nur einen Einfluss auf die Prävalenz, sondern auch auf die Höhe des jeweiligen Antikörpertiters zu untersuchen, wurde in einem zweiten Schritt die Abhängigkeit der o. g. Antikörpertiter von der Höhe des GAD-Titers dargestellt.

4.1.1 Einfluss von GAD auf ZnT8 und IA-2

In den Gruppen GAD hochtitrig positiv und GAD niedrigtitrig positiv gab es keine Unterschiede bezüglich der Prävalenz von ZnT8, im Gegenteil war ZnT8 in beiden Gruppen gleich verteilt (36% in der Gruppe niedrigtitrig positiv, 35,7% in der Gruppe hochtitrig positiv, $p = 0,96$).

Auch eine wechselseitige Beeinflussung von GAD und ZnT8 konnte durch die Analyse der mir vorliegenden Daten nicht nachgewiesen werden: Es bestand weder eine Abhängigkeit des ZnT8-Titers vom GAD-Titer, noch eine Abhängigkeit des GAD-Titers vom ZnT8-Titer.
Andere Autoren berichteten über andere Ergebnisse: So konnten Lampasona und Mitarbeiter eine Assoziation von ZnT8-Antikörpern mit höherem GAD-Titer zeigen (Lampasona et al., 2010).
Bezogen auf IA-2 betrug der Unterschied zwischen der Prävalenz in beiden Gruppen ~ 10% (42,9% in der Gruppe GAD hochtitrig positiv, 53,5% in der Gruppe GAD niedrigtitrig positiv) und erwies sich damit als gerade nicht signifikant ($p = 0,064$).
Als mögliche Interpretation meiner Ergebnisse sehe ich die große Bedeutung der ZnT8-Bestimmung bei spät-manifestiertem Diabetes: Neben GAD kann auch ZnT8 als unabhängiger Marker zum Nachweis einer bestehenden Diabetes-assoziierten Autoimmunität im Erwachsenenalter verwendet werden.
Im Vergleich dazu scheint die Bedeutung von IA-2 in Bezug auf spät-manifestierten Diabetes geringer zu sein. Zu dieser Erkenntnis kamen auch die Autoren der UKPDS71-Studie: Sie wiesen bei nur 2,2% bzw. 1,4% eines Patientenkollektivs mit Symptomen eines Typ 2 Diabetes IA-2A und IA-2βA nach und detektierten diesen Antikörper häufiger bei jüngeren Patienten (Bottazzo et al., 2005).

4.1.2 Einfluss von GAD auf TPO

In der Gruppe der hochtitrig positiven GAD ergab sich ein ~ 2,3mal höherer Anteil TPO-positiver Proben als in der Gruppe der niedrigtitrig positiven (23,9%, 10,6%). Dieser Unterscheid erwies sich als hoch signifikant ($p < 0,01$).
Auch eine (wenn auch geringe) positive Korrelation zwischen der Höhe des GAD-Titers und der Höhe des TPO-Titers konnte festgestellt werden.
Dies spricht dafür, dass die Gruppe der spät-manifestierten Diabetiker sich nicht homogen darstellt, sondern innerhalb dieser Gruppe verschiedene Antikörperkonstellationen zum Tragen kommen, anhand derer möglicherweise eine weitere Subklassifizierung dieser Patienten möglich sein könnte. Es konnte gezeigt werden, dass Schilddrüsenautoimmunität mit höherer humoraler diabetesspezifischer Autoimmunität assoziiert ist.

4.1.3 Einfluss von GAD auf mit Zöliakie assoziierte Antikörper

In Bezug auf Gliadin IgA konnte ein signifikanter Unterschied zwischen beiden GAD-Gruppen festgestellt werden ($p < 0,05$). Auffällig ist, dass es sich dabei um eine negative Korrelation handelt, d. h. in der Gruppe der hochtitrig positiven GAD liegt die Prävalenz von Gliadin IgA signifikant niedriger ($p = 0,027$, Exakter Fisher Test).

Bei der Interpretation sollte bedacht werden, dass gerade in Bezug auf Zöliakie und damit assoziierte Verdauungsprobleme die Patienten ohne ärztliche Diagnose oder Therapieeinleitung von sich aus auf Nahrungsmittel verzichten, die sie nicht vertragen. Ohne Zufuhr der auslösenden Antigene sinken folglich auch die Antikörpertiter, was die hier erhobenen Gliadin IgA-Titer erklären könnte.

Bei Betrachtung weiterer mit Zöliakie assoziierter Antikörper (Gliadin IgG, tTG IgA, tTG IgG) zeigte sich die oben beschriebene Beobachtung nicht konsistent, und es konnten keine signifikanten Unterschiede in beiden Gruppen (GAD hoch- und niedrigtitrig positiv) nachgewiesen werden.

Dabei ist an dieser Stelle festzuhalten, dass die Anzahl der positiv getesteten Proben, insbesondere in Bezug auf die Zöliakie-assoziierten Antikörper, relativ gering war (n=138 in der Gruppe hochtitrig positiv, n=93 in der Gruppe niedrigtitrig positiv). Um aussagekräftige Daten zu erhalten und auch um die hier aufgefallene negative Korrelation zwischen GAD und Gliadin IgA zu verifizieren, sollte daher ein größeres Patientenkollektiv untersucht werden.

4.2 Bedeutung der Anzahl positiv getesteter Diabetes-spezifischer Antikörper in Bezug auf die Prävalenz weiterer Antikörper

4.2.1 Einfluss der Anzahl positiv getesteter Diabetes-spezifischer Antikörper auf ZnT8

Hier zeigte sich eine Zunahme der Prävalenz von ZnT8 mit steigender Anzahl positiv getesteter Diabetes-spezifischer Antikörper (GAD, IA-2, ICA). Dieses Phänomen ließ sich in allen Gruppen (0, 1, 2 oder 3 der o. g. Antikörper positiv) nachweisen. Die niedrigste ZnT8-Prävalenz zeigte sich mit 5,9% in der Gruppe der Patienten, bei denen keine Diabetes-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnten; die höchste ZnT8-Prävalenz wurde mit 67,6% in der Gruppe derer, bei denen alle drei vorbestimmten Antikörper positiv waren, bestimmt. Diese Unterschiede zeigten sich dabei zwischen fast allen Gruppen signifikant.
Dadurch wird deutlich, dass die ZnT8-assoziierte Autoimmunität mit steigender autoimmuner Last zunimmt.

4.2.2 Einfluss der Anzahl positiv getesteter Diabetes-spezifischer Antikörper auf TPO

Diese Analyse zeigte, dass mit steigender Anzahl positiver Diabetes-spezifischer Antikörper auch die Prävalenz von TPO zunimmt. Diese stieg von 5,3% in der Gruppe der Patienten, bei denen keine Diabetes-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnten, auf 18,2% in der Gruppe derer, bei denen alle drei vorbestimmten Antikörper positiv waren. Diese Unterschiede zeigten sich weitestgehend signifikant.
Dadurch wird deutlich, dass Schilddrüsenautoimmunität mit steigender autoimmuner Last zunimmt. Einen Erklärungsversuch stellt das sogenannte „epitope spreading“ dar: Hierbei geht man davon aus, dass durch Autoimmunität ein Gewebeschaden induziert wird, der wiederum eine Entzündung hervorruft. Dabei entstehen autoreaktive B- und T-Zellen, die sich auch gegen primär verborgene oder nicht zugängliche Epitope richten. Dadurch kommt es dann zur Ausweitung von Autoimmunität auch auf primär nicht betroffene Epitope (Vanderlugt et al., 2002).

4.2.3 Einfluss der Anzahl positiv getesteter Diabetes-spezifischer Antikörper auf mit Zöliakie assoziierte Antikörper

Für Gliadin IgA zeigte sich eine negative Korrelation zur Anzahl positiv getesteter Diabetes-spezifischer Antikörper, d. h. mit steigender Anzahl positiv getesteter Diabetes-spezifischer Antikörper nahm die Prävalenz von Gliadin IgA-Antikörpern ab. Diese Beobachtung zeigte sich zum Teil signifikant.
Damit wird der gleiche Trend deutlich, wie bei der Analyse des Einflusses von GAD auf den Gliadin IgA-Titer.
Einerseits könnte man daraus ableiten, dass in Bezug auf Zöliakie das Ausmaß pankreatischer Autoimmunität nicht die Autoimmunität in anderen Organen beeinflusst. Andererseits sollte man auch hier als mögliche Erklärung die vermeintliche „Selbstheilung“ in Erwägung ziehen, wenn bei Patienten durch Vermeidung krankheitsauslösender Nahrungsmittel die Antikörpertiter abfallen. Aufgrund der insgesamt in dieser Gruppe geringen Fallzahlen sollte diese Beobachtung weiter untersucht werden; insbesondere sollte dabei die hier aufgefallene negative Korrelation überprüft werden.

In Bezug auf die Prävalenz von Gliadin IgG und tTG IgA in den verschiedenen Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied.

4.3 Weitere Analysen von ZnT8 und TPO bei spät-manifestiertem autoimmunem Diabetes

Im Gegensatz zum juvenilen Typ 1 Diabetes, der gut erforscht ist in Bezug auf das Vorkommen bestimmter Antikörper, ist die Datenlage in Bezug auf die spät-manifestierten Formen in Deutschland weniger gut und häufig widersprüchlich. Daher habe ich in dieser Arbeit zusätzlich die Bedeutung des neuen Antikörpers ZnT8 bei spät-manifestiertem autoimmunem Diabetes sowie TPO als Marker der häufigsten mit Diabetes assoziierten weiteren Autoimmunerkrankung untersucht.

4.3.1 Bedeutung von ZnT8 bei spät-manifestiertem autoimmunem Diabetes

ZnT8 wurde erst vor kurzer Zeit als weiterer Diabetes-spezifischer Antikörper identifiziert (s. o.). Zu seiner Entdeckung führte die Beobachtung, dass organspezifische Autoimmunität häufig gegen Moleküle gerichtet ist, die in den betroffenen Geweben in mäßiger bis hoher Konzentration vorkommen. In gezielt durchgeführten Microarray-Analysen konnte dann ZnT8 nachgewiesen werden (Wenzlau et al., 2007).

Die Bedeutung von ZnT8 auch bei spät-manifestiertem Diabetes wird bei Betrachtung seiner hohen Prävalenz bei Diabetesmanifestation deutlich. Dabei konnte ich ZnT8 auch bei Individuen nachweisen, bei denen keiner der anderen Diabetes-spezifischen Antikörper (GADA, ICA, IA2) positiv getestet war und stimme damit mit Wenzlau und Mitarbeitern überein. Damit liegt die Vermutung nahe, dass gegen ZnT8 gerichtete Autoimmunität als unabhängiger Marker auch bei spät-manifestiertem autoimmunem Diabetes gewertet werden kann (Wenzlau et al., 2007).

Auch in Untersuchungen bezüglich Überschneidungen in der Prävalenz der Antikörper ZnT8, GADA, IA-2 und ICA stimme ich weitestgehend mit Wenzlau und Mitarbeitern überein. Der bisherige Goldstandard in der Diagnostik des Typ 1 Diabetes umfasst die Messung der Antikörper gegen IA-2, GAD und ICA (Wenzlau et al., 2007). Bei Betrachtung dieser drei Antikörper ergibt sich aus meinen Analysen eine Nachweisrate für Autoimmunität von 92,9%.

Wird nun einer dieser 3 Antikörper durch ZnT8 ersetzt, ergeben sich beim Ersetzen von ICA und IA-2 ähnliche Werte (92,1%, 90,4%), aber beim Ersetzen von GAD eine deutlich geringere Nachweisrate für Autoimmunität. Letzteres zeigt

sich im Vergleich zu den Untersuchungen von Wenzlau und Mitarbeitern (Wenzlau et al., 2007) nicht konsistent. Dies könnte durch die besondere Bedeutung von GAD bei spät-manifestiertem Diabetes erklärt werden (Turner et al., 1997), da GAD als Marker mit der höchsten diagnostischen Sensitivität bei spät-manifestiertem autoimmunem Diabetes angesehen wird und zudem nicht durch das Alter beeinflusst wird (Falorni et al., 2005; Calsolari et al., 2008).
Bei Messung aller 4 o. g. Antikörper konnte durch Einschluss von ZnT8 die Nachweisrate von Autoimmunität von 92,9% auf 93,3% leicht erhöht werden. Dieser Trend ist in den Analysen von Wenzlau und Mitarbeitern deutlicher zu verzeichnen (dort Erhöhung der Nachweisrate um 4%), zeigt aber die gleiche Tendenz. Es bestätigt sich hierdurch der Nutzen einer zusätzlichen Bestimmung von ZnT8 als vierten Diabetes-spezifischen Antikörper auch in der Diagnostik von spät-manifestiertem autoimmunem Diabetes.
In Analysen, die die ZnT8-Prävalenz in Abhängigkeit vom Alter bei Diabetesmanifestation darstellten, konnte in der Altersgruppe der 0-20-Jährigen sowie der 20-25-Jährigen eine konstant hohe ZnT8-Prävalenz von 44% nachgewiesen werden. Andere Autoren fanden bei jüngeren Patienten die höchste Prävalenz für ZnT8 (Wenzlau et al., 2007; Lampasona et al., 2010). Während in der Arbeit von Wenzlau und Mitarbeitern Fokus auf die Prävalenz im Kindes- und Jugendalter gelegt wurde (eine maximale Prävalenz von 80% wird im späten Jugendalter beschrieben), habe ich auch ältere Altersgruppen bis 80 Jahre mit eingeschlossen. Hier ließ sich mit steigendem Manifestationsalter eine tendenziell abnehmende Prävalenz verzeichnen, die in der Gruppe der 40-45-Jährigen ihr Minimum erreicht. Damit liegt die Prävalenz von ZnT8 in der Altersgruppen der Kinder und jungen Erwachsenen bis 25 Jahre signifikant höher ($p < 0,05$) als in den darauffolgenden Altersgruppen.

4.3.2 Bedeutung von TPO bei spät-manifestiertem autoimmunem Diabetes

Eine häufige Assoziation von autoimmunem Diabetes mit Hashimoto-Thyreoiditis ist bekannt und gut untersucht. Allerdings beziehen sich die vorhandenen Daten fast ausschließlich auf junge Diabetespatienten; die Datenlage zu spät-manifestiertem Diabetes ist in Deutschland wenig aussagekräftig.
Daher wurde im hier vorliegenden Kollektiv spät-manifestierter Diabetespatienten die Analyse von TPO mit eingeschlossen.

Im gesamten untersuchten Kollektiv spät-manifestierter Diabetespatienten betrug die Prävalenz von TPO ~10%. Dies schien im Kontrast zu den von Holl und Mitarbeitern erhobenen Daten bei an Diabetes erkrankten Kindern zu stehen: Hier wurden in der Gruppe der 15-20-Jährigen in 25,3% erhöhte Schilddrüsenantikörper gemessen, also mehr als doppelt so hohe Werte als im hier vorliegenden Kollektiv spät-manifestierter Diabetespatienten (Holl et al., 1999).
Zur weiteren Untersuchung der Daten wurde die Prävalenz in den einzelnen Altersgruppen untersucht.
Hierbei bestätigte sich die Vermutung nicht, dass im Vergleich zu den von Holl und Mitarbeitern erhobenen Daten die Prävalenz von Schilddrüsenautoimmunität in höherem Alter deutlich niedriger liegt. Im Gegenteil stieg gerade in der Gruppe der weiblichen Patienten die Prävalenz in höherem Lebensalter deutlich an.
Zudem standen die in der Gruppe der Kinder und Jugendlichen bis 20 Jahre bestimmten Prävalenzen im Gegensatz zu den bei Holl und Mitarbeitern erhobenen Daten: im hier vorliegenden Kollektiv betrug die Prävalenz von TPO nur 4% und lag damit im Vergleich zu den anderen Gruppen am niedrigsten. Eine weitere Unterteilung dieser recht groß gefassten Gruppe der Kinder und jungen Erwachsenen zwischen 0 und 20 Jahren erschien wegen der insgesamt in dieser Gruppe niedrigen Fallzahl nicht sinnvoll, daher sollte eine abschließende Bewertung dieser Beobachtung erst nach weiteren Messungen erfolgen.
Bei der Analyse geschlechtsspezifischer Unterschiede konnte wie auch in früheren Studien (Holl et al., 1999; Kordonouri et al., 2002) im hier vorliegenden Patientenkollektiv spät-manifestierter Diabetespatienten eine deutlich erhöhte Prävalenz von TPO bei Frauen im Vergleich zu Männern nachgewiesen werden (3-fach erhöht; 18,2% vs. 5,88%, $p < 0,001$). Dies passt zum Auftreten von Hashimoto-Thyreoiditis in der Allgemeinbevölkerung: hier sind 10-13% der Frauen betroffen, während nur 3% der Männer erkrankt sind (Holl et al., 1999).
Auffällig ist, dass im Alter der 35-50-jährigen Frauen ein deutlicher Abfall der TPO-Prävalenz auftritt, im Vergleich mit den jüngeren Altersgruppen um durchschnittlich 5,4% (jedoch nicht signifikant) und im Vergleich zu den älteren Altersgruppen um durchschnittlich 11,9% ($p < 0,05$).
Auch im Vergleich zu der gleichaltrigen männlichen Gruppe liegen die weiblichen Vergleichswerte 5,6% niedriger (ebenfalls nicht signifikant).

4.4 Häufigkeitsverteilungen verschiedener Antikörper in Abhängigkeit von der Höhe des Antikörpertiters

Bei der Analyse der relativen Häufigkeiten verschiedener Antikörper (ZnT8, IA-2, GAD, TPO) konnte für alle Antikörper in den Bereichen niedriger (positiver) Titer die größte relative Häufigkeit nachgewiesen werden. Je weiter man sich von diesem Bereich in Richtung extrem hohe Werte entfernt, desto geringer wird die relative Häufigkeit.
Damit wird deutlich, dass sich Autoimmunität graduell entwickelt. Nur unter bestimmten (seltenen) Voraussetzungen werden extrem hohe Antikörperkonzentrationen erreicht.

4.5 Bewertung der Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine mögliche Heterogenität innerhalb des untersuchten Kollektivs spät-manifestierter Diabetespatienten zu untersuchen. Ich habe in dieser Arbeit den GAD-Titer sowie die Prävalenz, Kombination und Höhe weiterer Antikörper (ZnT8, ICA, IA-2, GAD, TPO, Gliadin, tTG) als mögliches Unterscheidungskriterium bei spät-manifestiertem Diabetes untersucht und die These verfolgt, dass es eine Gruppe GAD hochtitrig positiver Patienten gibt, die sich durch hohe Autoimmunität, vermutlich eher endogen verursacht, auszeichnet, sowie eine Gruppe GAD niedrigtitrig positiver Patienten, bei denen die Autoimmunität weniger stark ausgeprägt ist, weniger verschiedene Organsysteme betroffen sind und die Ursache möglicherweise eher exogen begründet ist.

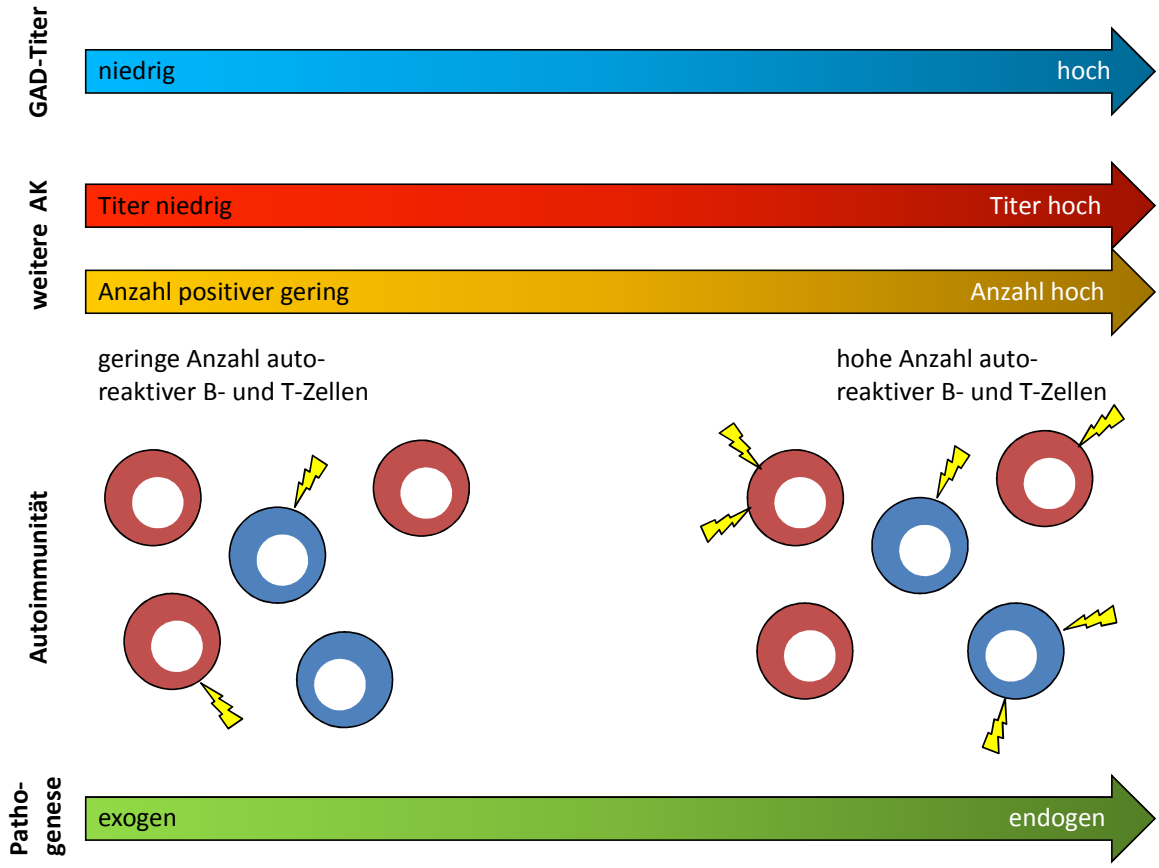


Abb. 37: Krankheitsmodelle (GAD: Antikörper gegen Glutamat-Decarboxylase, AK, Antikörper)

In Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich jetzt folgende Zusammenfassung grafisch darstellen:

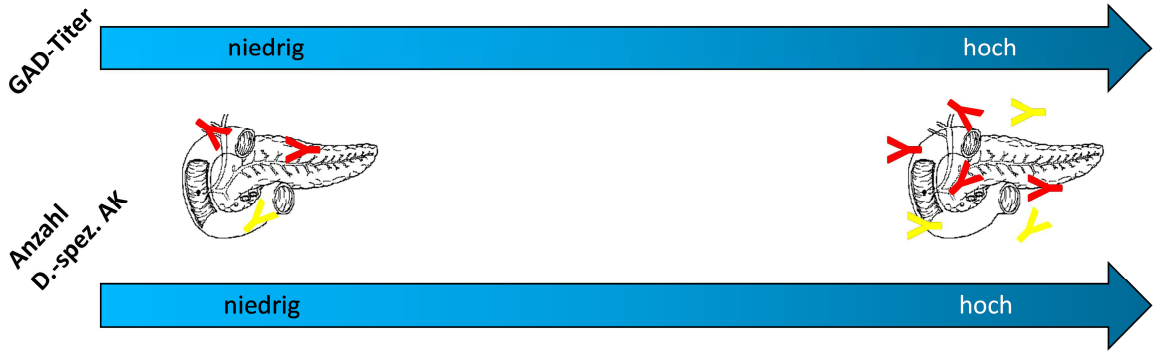


Abb. 38: Abhängigkeit der Anzahl Diabetes-spezifischer Antikörper (AK) von der Höhe des Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titers (D: Diabetes)

Bei Betrachtung der Abhängigkeit der Anzahl Diabetes-spezifischer Antikörper von der Höhe des GAD-Titers ergibt sich eine positive Korrelation, d. h. mit steigendem GAD-Titer steigt auch die Anzahl weiterer Diabetes-spezifischer Antikörper.

Bezogen auf die Schilddrüsenautoimmunität bestätigt sich die These, dass es auf der einen Seite eine Gruppe mit Zeichen ausgeprägter β-Zell-assoziierter Autoimmunität gibt, in der auch die Schilddrüsenautoimmunität stark ausgeprägt ist, und auf der anderen Seite eine Gruppe mit den genau gegensätzlichen Merkmalen:

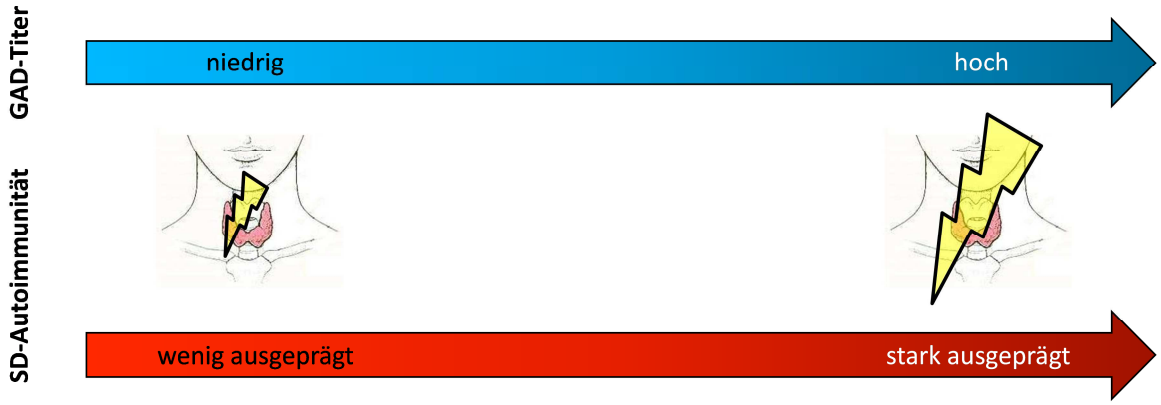


Abb. 39: Abhängigkeit der Ausprägung Schilddrüsen (SD) -assoziierter Autoimmunität von der Höhe des Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titers

Bei Betrachtung der autoimmunen Darmerkrankungen zeigt sich eine umgekehrte Korrelation: Die Gruppe mit ausgeprägter β-Zell-assoziierter Autoimmunität weist nur in geringem Ausmaß Darm-assoziierte Autoimmunität auf, während die Gruppe mit gering ausgeprägter β-Zell-assoziierter Immunität stärker ausgeprägte Darm-assoziierte humorale Autoimmunität zeigt. Hierbei ist allerdings der Einfluss von Ernährungsgewohnheiten auf die Ausprägung von Antikörpern bei Zöliakie und einheimischer Sprue zu beachten (s. o.).

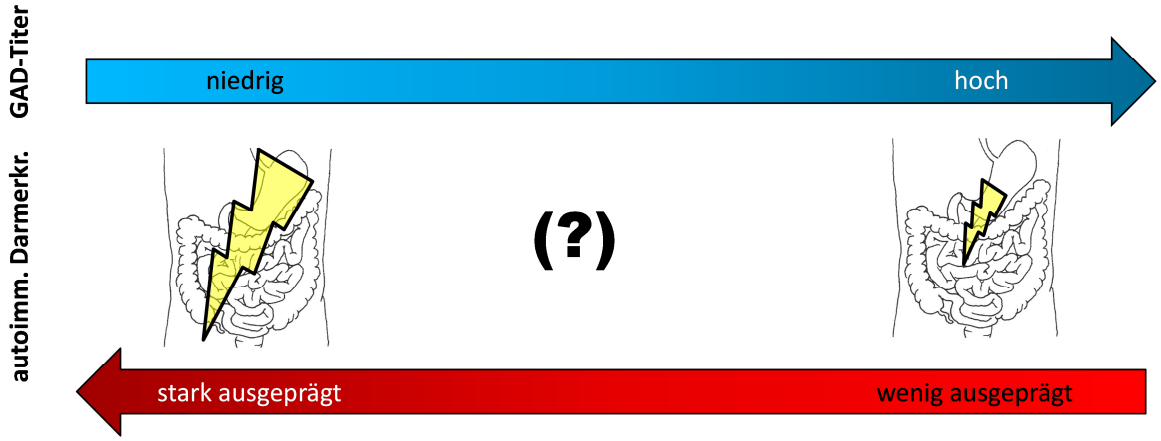


Abb. 40: Abhängigkeit der Ausprägung Darm-assoziierter Autoimmunität von der Höhe des Glutamat-Decarboxylase (GAD) -Titers

Schlussfolgernd bietet sich einerseits an dieser Stelle die Möglichkeit, die zwei Gruppen (ausgeprägte β-Zell-assoziierte Autoimmunität vs. gering ausgeprägte β-Zell-assoziierte Autoimmunität) als zwei Extremvarianten zu sehen, die zwei verschiedene Subgruppen darstellen (Interpretation 1, siehe Abb. 43). Hierfür spricht die Tatsache, dass beide Gruppen in Bezug auf die untersuchten Merkmale signifikante Unterschiede aufweisen und damit voneinander unabhängig sind. Allerdings betont die Betrachtung zweier Extremformen naturgemäß deren unterschiedlichen Charakter (Gale, 2006).
Eine weitere Sichtweise ist daher die Beschreibung als dimensionale Größe, als Kontinuum (Interpretation 2, siehe Abb. 43). Wenn man in diese Betrachtung mit einbezieht, dass das wichtigste Einschlusskriterium für das untersuchte Patientenkollektiv die späte Manifestation eines Diabetes darstellt und damit sowohl als Typ 1 Diabetes, als auch als Typ 2 Diabetes klassifizierte Patienten, sowie zahlreiche Patienten, die keiner der beiden Gruppen eindeutig zugeordnet

werden können, einbezogen sind, erlangt diese zuletzt beschriebene Sichtweise zusätzliches Gewicht.
Möglicherweise kann man diese kontinuierliche Ausprägung verschiedener Symptome und Merkmale nicht nur in Bezug auf spät-manifestierten Diabetes, sondern auch in Bezug auf die im Kindesalter auftretenden Formen postulieren. Immerhin ist das Erscheinungsbild von Diabetes auch im Kindesalter sehr heterogen; auch in dieser Altersgruppe sind zum Beispiel insulinunabhängige Formen bekannt (Leslie et al., 2004).

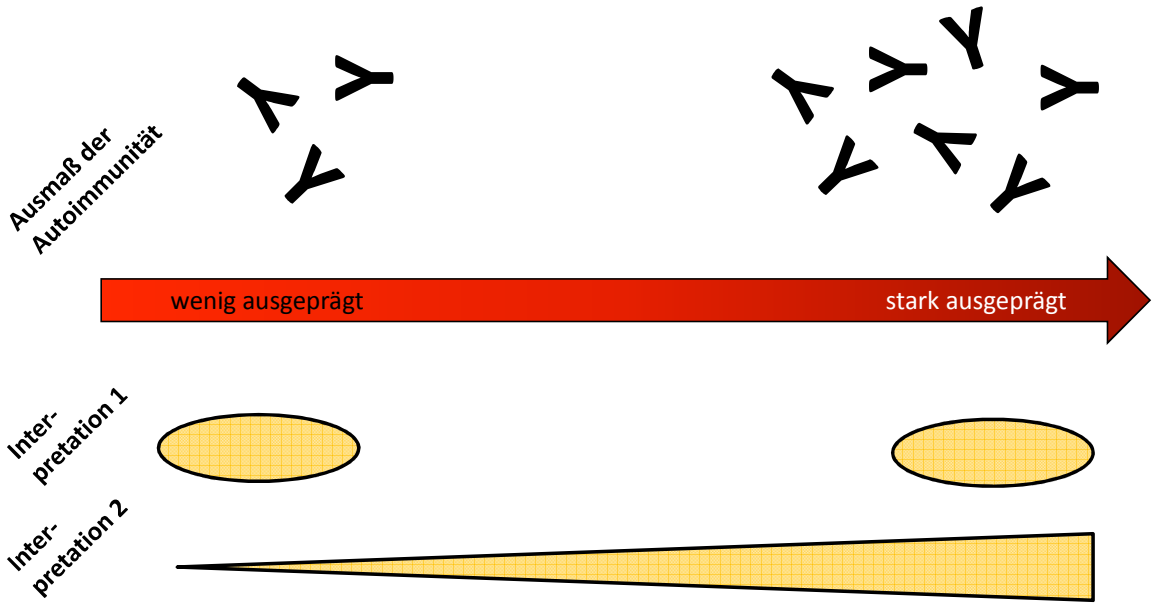


Abb. 41: Mögliche Interpretationsmodelle

In der Literatur gibt es sowohl Arbeiten, die eine mögliche Überschneidung zwischen Typ 1 und Typ 2 Diabetes favorisieren, als auch dem widersprechende Ergebnisse.
Einerseits konnten 2007 verschiedene genomweite Assoziationsstudien einen Zusammenhang von Polymorphismen im ZnT8-Gen (SLC30A4) mit Typ 2 Diabetes nachweisen (Sladek et al., 2007; Scott et al., 2007; Diabetes Genetics Initiative, 2007). Dieser Transporter ist auch mit Typ 1 Diabetes assoziiert (Wenzlau et al., 2007; Wenzlau et al., 2008a); folglich wurde eine Verbindung zwischen beiden Diabetesformen vermutet.
Andererseits konnte für den single nucleotide transcription factor 7-like 2 (TCF7L2), für den ebenfalls eine Assoziation mit Typ 2 Diabetes nachgewiesen werden konnte (Sladek et al., 2007; Scott et al., 2007), kein Zusammenhang mit

Autoantikörper-positiven neumanifestierten jungen Diabetespatienten nachgewiesen werden; eine Assoziation bestand lediglich mit Autoantikörper-negativen Patienten (Yu et al., 2009). Dies lässt wiederum darauf schließen, dass es keine Überschneidungen zwischen beiden Diabetesformen (Typ 1 und Typ 2) gibt.

Eine weitere wichtige Frage ist die der Pathogenese. Kann man der Gruppe mit niedrig ausgeprägter β-Zell-spezifischer Autoimmunität möglicherweise vermehrt exogene Faktoren ursächlich zuordnen, und der Gruppe der Patienten mit ausgeprägter β-Zell-spezifischer Autoimmunität vermehrte genetische Beeinflussung?

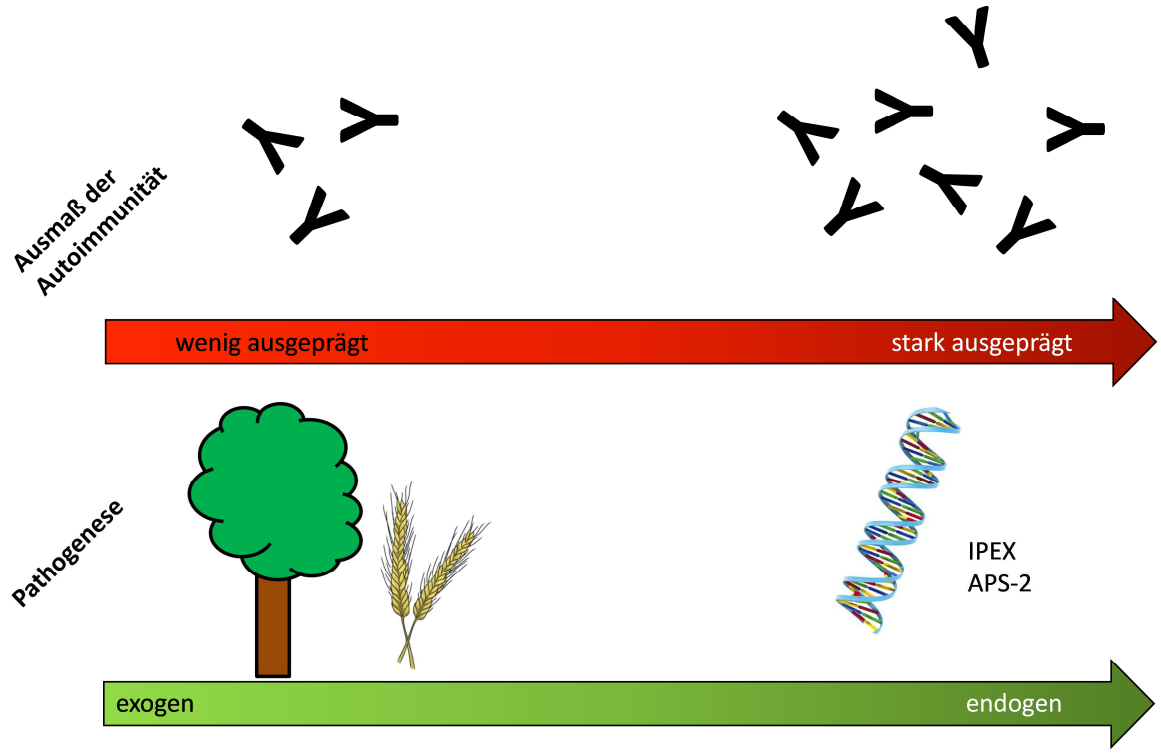


Abb. 42: Pathogenetische Überlegungen zur Autoimmunität (IPEX: Immundysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-assoziiert; APS-2: autoimmunes polyendokrines Syndrom Typ 2)

Howson und Mitarbeiter konnten in genetischen Analysen eine Abhängigkeit der genetischen Last vom Manifestationsalter aufzeigen, indem in höherem Alter genetische Faktoren abnahmen (Howson et al., 2011).
Weiter spricht für diese These, dass mit APS und IPEX mehr oder weniger häufige Autoimmunerkrankungen bekannt sind, die mehrere Organsysteme befallen und die nachgewiesenermaßen genetisch determiniert sind. So liegt APS-1 ein Defekt

von AIRE zugrunde, APS-2 wird polygen (u. a. MHC) beeinflusst, und IPEX wird durch einen Defekt von FOXP3 verursacht. Autoimmuner Diabetes ist mit allen diesen polyendokrinen Syndromen in unterschiedlichem Ausmaß assoziiert (~20% bei APS-1, ~50% bei APS-2, >60% bei IPEX; Husebye et al., 2010). So sind sicherlich in der Gruppe mit hoher β-Zell-spezifischer Autoimmunität und damit assoziierter Schilddrüsenautoimmunität auch Patienten enthalten, die bei näherer Untersuchung auch der Gruppe der polyendokrinen Syndrome zugeordnet werden könnten und deren genetische Last damit hoch ist.

Unbestritten ist eine Unterscheidung zwischen isolierter Autoimmunerkrankung und polyendokrinem Syndrom schwierig (Betterle et al., 2004); genaue Unterscheidungskriterien sind bisher nicht definiert. M. Addison zum Beispiel zeigt sich häufig zu Beginn als isolierte Erkrankung, aber mit zunehmendem Alter entwickeln sich dann zusätzliche endokrine Störungen (Eisenbarth et al., 2004). Die Kenntnis einer solchen Assoziation zwischen verschiedenen Autoimmunerkrankungen kann aber für die korrekte Diagnose und Behandlung für die betroffenen Patienten überlebenswichtig sein.

Wir konnten zeigen, dass sich der immunvermittelte Diabetes sehr heterogen präsentiert und insgesamt ein multidimensionales Krankheitsbild darstellt. Durch intensive Forschung konnten schon viele Aspekte und Assoziationen identifiziert werden. Durch Nachweis dieser Merkmale wurde eine individuell angepasste Therapie ermöglicht (Gale, 2006). Je genauer dabei allerdings verschiedene Subgruppen untersucht werden, desto deutlicher wird, dass immer weitere Klassifizierung und Versuche der Vereinheitlichung nicht zwangsläufig zusätzlichen Nutzen mit sich bringen oder neue Behandlungswege aufzeigen. Um die Individualität jedes einzelnen Phänotyps nicht aus den Augen zu verlieren ist aber eine genaue Kenntnis der möglichen Ausprägungsarten eines jeden beobachteten Merkmals unabdingbar. In diesem Sinne kann auch diese Arbeit dazu beitragen, das komplexe Krankheitsbild Diabetes besser zu verstehen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Diabetes mellitus Typ 1 entwickelt sich aufgrund einer autoimmunen Zerstörung der insulinproduzierenden β-Zellen. Zu den typischen Merkmalen gehören eine Entzündungsreaktion und der Nachweis von Diabetes-spezifischen Autoantikörpern. Bis zu einem Drittel der Patienten entwickelt auch in anderen Organsystemen weitere Autoimmunphänomene, dabei ist die Schilddüse am häufigsten betroffen, aber auch Zöliakie und Morbus Addison sind mit dem autoimmunen Diabetes mellitus stark assoziiert.

Von der Gruppe der jungen Typ 1 Diabetiker, die sich meist mit typischen Symptomen (u. a. Polyurie, Polydipsie, Ketoazidose) präsentieren, unterscheidet sich die weitaus heterogenere Gruppe spät-manifestierter Diabetiker. Hier treten häufig atypische Verläufe und weniger spezifische Symptome auf. Zudem ist die Unterscheidung zwischen Typ 1 und Typ 2 Diabetes in dieser Altersgruppe häufig schwierig, sodass eine klare Zuordnung oft nicht möglich ist.

Ziel dieser Arbeit war es, diese Gruppe spät-manifestierter Diabetiker näher zu untersuchen in Bezug auf verschiedene Antikörper. Dabei wurden Vorkriterien formuliert (niedrig- und hochtitrig positiver Glutamat-Decarboxylase-Antikörper-Titer, Anzahl positiv getesteter Diabetes-spezifischer Antikörper) und innerhalb dieser Gruppen Antikörper gegen Thyreoperoxidase (TPO) als Hinweis auf Schilddrüsenautoimmunität und Gliadin- und Transglutaminase- (tTG-) Antikörper als Hinweis auf Zöliakie/ einheimische Sprue bestimmt. Zusätzlich wurde die Prävalenz von Antikörpern gegen den Zink-Transporter 8 (ZnT8), einem neueren Diabetes-spezifischen Antikörper, in verschiedenen Altersgruppen und im Vergleich zu den schon besser untersuchten Diabetes-spezifischen Antikörpern (Antikörper gegen Glutamat-Decarboxylase [GAD] und Thyrosin-Phosphatase 2 [IA-2], Insellzellantikörper [ICA]) in dieser in Deutschland noch wenig erforschten Gruppe spät-manifestierter Diabetiker analysiert.

Die Ergebnisse zeigten deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen, vor allem in Bezug auf Schilddrüsenautoantikörper: Dort korrelierte starke Diabetes-assoziierte Autoimmunität auch mit einer hohen Prävalenz von TPO-Antikörpern, während in Bezug auf die Antikörper Gliadin und tTG die Unterschiede nicht so ausgeprägt waren und unter Vorbehalt sogar eine negative Korrelation beobachtet werden konnte.

Die große Bedeutung von ZnT8 auch in der Diagnostik spät-manifestierter Diabetiker hat sich durch die durchgeführten Untersuchungen bestätigt. Dieser Antikörper ist von anderen Antikörpern unabhängig, und durch seine zusätzliche Bestimmung kann der Nachweis einer bestehenden Diabetes-assoziierten Autoimmunität verbessert werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Diabetes mellitus ein sehr heterogenes Krankheitsbild ist. Daher sind Klassifizierungen anhand eines bekannten Merkmals, zum Beispiel anhand des Manifestationsalters (Kindheit $\Rightarrow$ Typ 1 Diabetes – Erwachsenenalter $\Rightarrow$ Typ 2 Diabetes) nicht haltbar. Auf der Suche nach weiteren Unterscheidungskriterien vor allem in Bezug auf die Frage nach zusätzlich auftretender Autoimmunität auch in anderen Organen, habe ich durch die Festlegung von Markern für mehr oder weniger stark ausgeprägte Diabetes-spezifische Autoimmunität ein weiteres Unterscheidungsmerkmal identifiziert. Allerdings ist auch dieses in seiner Aussagekraft begrenzt, da ich mich auf ein selektiertes Patientengut konzentriert habe.

Dadurch spiegelt auch diese Arbeit den Facettenreichtum an Merkmalen wider, die diese Erkrankung beschreiben. Dabei sind weiterführende Untersuchungen und wiederholtes Hinterfragen bestehender Lehrmeinungen unerlässlich, um den Betroffenen eine bestmögliche Therapie anbieten zu können.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abadie V, Sollid L M, Barreiro L B, Jabri B: Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. Annu.Rev.Immunol. 29: 493-525 (2011)

2. Aly T A, Ide A, Jahromi M M, Barker J M, Fernando M S, Babu S R, Yu L, Miao D, Erlich H A, Fain P R, Barriga K J, Norris J M, Rewers M J, Eisenbarth G S: Extreme genetic risk for type 1A diabetes. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 103: 14074-14079 (2006)

3. Awa W L, Boehm B O, Kapellen T, Rami B, Rupprath P, Marg W, Becker M, Holl R W, DPV-Wiss Study Group and the German Competence Network Diabetes Mellitus: HLA-DR genotypes influence age at disease onset in children and juveniles with type 1 diabetes mellitus. Eur.J.Endocrinol. 163: 97-104 (2010)

4. Barker J M: Clinical review: Type 1 diabetes-associated autoimmunity: natural history, genetic associations, and screening J.Clin.Endocrinol.Metab. 91: 1210-1217 (2006)

5. Barker J M and Eisenbarth G S: , Type 1 Diabetes: Molecular, Cellular and Clinical Immunology: Chapter 8: Autoimmune polyendocrine Syndromes. http://www.barbaradaviscenter.org (06.10.2013)

6. Betterle C, Lazzarotto F, Presotto F: Autoimmune polyglandular syndrome Type 2: the tip of an iceberg? Clin.Exp.Immunol. 137: 225-233 (2004)

7. Beyan H, Riese H, Hawa M I, Beretta G, Davidson H W, Hutton J C, Burger H, Schlosser M, Snieder H, Boehm B O, Leslie R D: Glycotoxin and Autoantibodies Are Additive Environmentally Determined Predictors of Type 1 Diabetes: A Twin and Population Study. Diabetes 61: 1192-1198 (2012)

8. Bluestone J A, Herold K, Eisenbarth G: Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. Nature 464: 1293-1300 (2010)

9. Bottazzo G F, Florin-Christensen A, Doniach D: Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. Lancet 7892: 1279-83 (1974)

10. Bottazzo G F, Bosi E, Cull C A, Bonifacio E, Locatelli M, Zimmet P, Mackay I R, Holman R R: IA-2 antibody prevalence and risk assessment of early insulin requirement in subjects presenting with type 2 diabetes (UKPDS 71). Diabetologia 48: 703-708 (2005)

11. Calsolari M R, Rosario P W, Reis J S, Silva S C, Purisch S: Latent autoimmune diabetes of adult or slim type 2 diabetes mellitus? Arq.Bras.Endocrinol.Metabol. 52: 315-321 (2008)

12. Caputo I, Barone M V, Martucciello S, Lepretti M, Esposito C: Tissue transglutaminase in celiac disease: role of autoantibodies. Amino Acids 36: 693-699 (2009)

13. Davis T M, Wright A D, Mehta Z M, Cull C A, Stratton I M, Bottazzo G F, Bosi E, Mackay I R, Holman R R: Islet autoantibodies in clinically diagnosed type 2 diabetes: prevalence and relationship with metabolic control (UKPDS 70). Diabetologia 48: 695-702 (2005)

14. Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of Harvard and MIT, Lund University, and Novartis Institutes of BioMedical Research, Saxena R, Voight B F, Lyssenko V, Burtt N P, de Bakker P I, Chen H, Roix J J, Kathiresan S, Hirschhorn J N, Daly M J, Hughes T E, Groop L, Altshuler D, Almgren P, Florez J C, Meyer J, Ardlie K, Bengtsson Bostrom K, Isomaa B, Lettre G, Lindblad U, Lyon H N, Melander O, Newton-Cheh C, Nilsson P, Orho-Melander M, Rastam L, Speliotes E K, Taskinen M R, Tuomi T, Guiducci C, Berglund A, Carlson J, Gianniny L, Hackett R, Hall L, Holmkvist J, Laurila E, Sjogren M, Sterner M, Surti A, Svensson M, Svensson M, Tewhey R, Blumenstiel B, Parkin M, Defelice M, Barry R, Brodeur W, Camarata J, Chia N, Fava M, Gibbons J, Handsaker B, Healy C, Nguyen K, Gates C, Sougnez C, Gage D, Nizzari M, Gabriel S B, Chirn G W, Ma Q, Parikh H, Richardson D, Ricke D, Purcell S: Genome-wide

association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. Science 316: 1331-1336 (2007)

15. Eisenbarth G S: Update in type 1 diabetes. J.Clin.Endocrinol.Metab. 92: 2403-2407 (2007)

16. Eisenbarth G S, Gottlieb P A: Autoimmune polyendocrine syndromes. N.Engl.J.Med. 350: 2068-2079 (2004)

17. Falorni A, Brozzetti A: Diabetes-related antibodies in adult diabetic patients. Best Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab. 19: 119-133 (2005)

18. Falorni A, Calcinaro F: Autoantibody profile and epitope mapping in latent autoimmune diabetes in adults. Ann.N.Y.Acad.Sci. 958: 99-106 (2002)

19. Gale E A: Declassifying diabetes. Diabetologia 49: 1989-1995 (2006)

20. Giani G, Janka H, Hauner H, Standl E, Schiel R, Neu A, Rathmann W, Rosenbauer J: Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland. Evidenzbasierte Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (2004)

21. Green P H, Cellier C: Celiac disease N.Engl.J.Med., 357: 1731-1743 (2007)

22. Holl R W, Bohm B, Loos U, Grabert M, Heinze E, Homoki J: Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. Effect of age, gender and HLA type. Horm.Res. 52: 113-118 (1999)

23. Horton V, Stratton I, Bottazzo G F, Shattock M, Mackay I, Zimmet P, Manley S, Holman R, Turner R: Genetic heterogeneity of autoimmune diabetes: age of presentation in adults is influenced by HLA DRB1 and DQB1 genotypes (UKPDS 43). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group Diabetologia 42: 608-616 (1999)

24. Hosszufalusi N, Vatay A, Rajczy K, Prohaszka Z, Pozsonyi E, Horvath L, Grosz A, Gero L, Madacsy L, Romics L, Karadi I, Fust G, Panczel P:

Similar genetic features and different islet cell autoantibody pattern of latent autoimmune diabetes in adults (LADA) compared with adult-onset type 1 diabetes with rapid progression. Diabetes Care 26: 452-457 (2003)

25. Howson J M, Rosinger S, Smyth D J, Boehm B O, ADBW-END Study Group, Todd J A: Genetic analysis of adult-onset autoimmune diabetes. Diabetes 60: 2645-2653 (2011)

26. Husebye E S, Anderson M S: Autoimmune polyendocrine syndromes: clues to type 1 diabetes pathogenesis. Immunity 32: 479-487 (2010)

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

28. Irvine W J, McCallum C J, Gray R S, Duncan L J: Clinical and pathogenic significance of pancreatic-islet-cell antibodies in diabetics treated with oral hypoglycaemic agents. Lancet 1: 1025-1027 (1977)

29. Jin P, Zhou Z G, Yang L, Yan X, Wang J P, Zhang D M, Huang G: Adult-onset latent autoimmune diabetes and autoimmune thyroid disease. Zhonghua Nei Ke Za Zhi 43: 363-367 (2004)

30. Kagnoff M F: Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. J.Clin.Invest. 117: 41-49 (2007)

31. Kerner W, Brückel J: Praxis Leitlinien der Deutschen Diabetes-Gesellschaft. Diabetologie 7 (Suppl 2): 84-87 (2012)

32. Knip M, Virtanen S M, Seppa K, Ilonen J, Savilahti E, Vaarala O, Reunanen A, Teramo K, Hamalainen A M, Paronen J, Dosch H M, Hakulinen T, Akerblom H K, Finnish TRIGR Study Group: Dietary intervention in infancy and later signs of beta-cell autoimmunity. N.Engl.J.Med. 363: 1900-1908 (2010)

33. Kordonouri O, Deiss D, Danne T, Dorow A, Bassir C, Gruters-Kieslich A: Predictivity of thyroid autoantibodies for the development of thyroid disorders in children and adolescents with Type 1 diabetes. Diabet.Med. 19: 518-521 (2002)

34. Lafferty K J: Theoretical Essay A - The development of Autoimmune Diabetes: Theoretical Aspects. http://www.barbaradaviscenter.org/ (06.10.2013)

35. Lampasona V, Petrone A, Tiberti C, Capizzi M, Spoletini M, di Pietro S, Songini M, Bonicchio S, Giorgino F, Bonifacio E, Bosi E, Buzzetti R, Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) Study Group: Zinc transporter 8 antibodies complement GAD and IA-2 antibodies in the identification and characterization of adult-onset autoimmune diabetes: Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) 4. Diabetes Care 33: 104-108 (2010)

36. Leffler D A, Schuppan D: Update on serologic testing in celiac disease. Am.J.Gastroenterol. 105: 2520-2524 (2010)

37. Leslie R D, Delli Castelli M: Age-dependent influences on the origins of autoimmune diabetes: evidence and implications. Diabetes 53: 3033-3040 (2004)

38. Mansson L, Torn C, Landin-Olsson M: Islet cell antibodies represent autoimmune response against several antigens. Int.J.Exp.Diabetes Res. 2: 85-90 (2001)

39. Merger S R, Leslie R D, Boehm B O: The broad clinical phenotype of Type 1 diabetes at presentation. Diabet.Med. 30: 170-178 (2013)

40. Naik R G, Brooks-Worrell B M, Palmer J P: Latent autoimmune diabetes in adults. J.Clin.Endocrinol.Metab. 94: 4635-4644 (2009)

41. Ola T O, Gigante A, Leslie R D: Latent autoimmune diabetes of adults (LADA). Nutr.Metab.Cardiovasc.Dis. 16: 163-167 (2006)

42. Palmer J P, Hirsch I B: What's in a name: latent autoimmune diabetes of adults, type 1.5, adult-onset, and type 1 diabetes. Diabetes Care 26: 536-538 (2003)

43. Perry et al.: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Microbial Life. http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/ELISA.html (06.10.2013)

44. Pihoker C, Gilliam L K, Hampe C S, Lernmark A: Autoantibodies in diabetes. Diabetes 54 Suppl 2: S52-61 (2005)

45. Powers A C: Diabetes mellitus. In: Dieter M (Hrsg.) Harrisons Innere Medizin: Deutsche Ausgabe, Bd 2, 17. Auflage. ABW Wissenschaftsverlag, S. 2813 (2009)

46. Pugliese A, Gianani R, Moromisato R, Awdeh Z L, Alper C A, Erlich H A, Jackson R A, Eisenbarth G S: HLA-DQB1*0602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody-positive first-degree relatives of patients with IDDM. Diabetes 44: 608-613 (1995)

47. Redondo M J, Jeffrey J, Fain P R, Eisenbarth G S, Orban T: Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. N.Engl.J.Med. 359: 2849-2850 (2008)

48. Redondo M J, Yu L, Hawa M, Mackenzie T, Pyke D A, Eisenbarth G S, Leslie R D: Heterogeneity of type I diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States. Diabetologia 44: 354-362 (2001)

49. Reinsch B, Zimmy S, Schatz H, Pfohl M: Glutamic acid decarboxylase and tyrosine phosphatase-like IA-2 antibodies for diabetes classification in unselected diabetic patients. Med Klin (Munich) 98: 67-71 (2003)

50. Sanchez J C, Cabrera-Rode E, Sorell L, Galvan J A, Hernandez A, Molina G, Perich P A, Licea M E, Dominguez E, Diaz-Horta O: Celiac disease

associated antibodies in persons with latent autoimmune diabetes of adult and type 2 diabetes. Autoimmunity 40: 103-107 (2007)

51. Schiel R and Müller U: GAD autoantibodies in a selection-free population of insulin-treated diebetic patients: indicator of a high prevalence of lada? Diabetes Res Clin Pract. 49(1); 33-40 (2000)

52. Scott L J, Mohlke K L, Bonnycastle L L, Willer C J, Li Y, Duren W L, Erdos M R, Stringham H M, Chines P S, Jackson A U, Prokunina-Olsson L, Ding C J, Swift A J, Narisu N, Hu T, Pruim R, Xiao R, Li X Y, Conneely K N, Riebow N L, Sprau A G, Tong M, White P P, Hetrick K N, Barnhart M W, Bark C W, Goldstein J L, Watkins L, Xiang F, Saramies J, Buchanan T A, Watanabe R M, Valle T T, Kinnunen L, Abecasis G R, Pugh E W, Doheny K F, Bergman R N, Tuomilehto J, Collins F S, Boehnke M: A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. Science 316: 1341-1345 (2007)

53. Sinclair D: Clinical and laboratory aspects of thyroid autoantibodies. Ann.Clin.Biochem. 43: 173-183 (2006)

54. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson T J, Montpetit A, Pshezhetsky A V, Prentki M, Posner B I, Balding D J, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P: A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. Nature 445: 881-885 (2007)

55. Smyth D J, Plagnol V, Walker N M, Cooper J D, Downes K, Yang J H, Howson J M, Stevens H, McManus R, Wijmenga C, Heap G A, Dubois P C, Clayton D G, Hunt K A, van Heel D A, Todd J A: Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease. N.Engl.J.Med. 359: 2767-2777 (2008)

56. Steck A K, Pugliese A, Eisenbarth G S: , Type 1 Diabetes: Cellular, Molecular & Clinical Immunology: Chapter 7 - Type 1 Diabetes Mellitus of Man:

Genetic Susceptibility and Resistance, www.barbaradaviscenter.org. (06.10.2013)

57. Teng J, Leslie R D: Type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 31: 809-813 (2006)

58. Thomson G, Valdes A M, Noble J A, Kockum I, Grote M N, Najman J, Erlich H A, Cucca F, Pugliese A, Steenkiste A, Dorman J S, Caillat-Zucman S, Hermann R, Ilonen J, Lambert A P, Bingley P J, Gillespie K M, Lernmark A, Sanjeevi C B, Ronningen K S, Undlien D E, Thorsby E, Petrone A, Buzzetti R, Koeleman B P, Roep B O, Saruhan-Direskeneli G, Uyar F A, Gunoz H, Gorodezky C, Alaez C, Boehm B O, Mlynarski W, Ikegami H, Berrino M, Fasano M E, Dametto E, Israel S, Brautbar C, Santiago-Cortes A, Frazer de Llado T, She J X, Bugawan T L, Rotter J I, Raffel L, Zeidler A, Leyva-Cobian F, Hawkins B R, Chan S H, Castano L, Pociot F, Nerup J: Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type 1 diabetes: a meta-analysis. Tissue Antigens 70: 110-127 (2007)

59. Turner R, Stratton I, Horton V, Manley S, Zimmet P, Mackay I R, Shattock M, Bottazzo G F, Holman R: 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 350: 1288-1293 (1997)

60. United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS, no authors listet). 13: Relative efficacy of randomly allocated diet, sulphonylurea, insulin, or metformin in patients with newly diagnosed non-insulin dependent diabetes followed for three years. British Medical Journal 310: 83-88 (1995)

61. Umpierrez G E, Latif K A, Murphy M B, Lambeth H C, Stentz F, Bush A, Kitabchi A E: Thyroid dysfunction in patients with type 1 diabetes: a longitudinal study. Diabetes Care 26: 1181-1185 (2003)

62. Vanderlugt C L, Miller S D: Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. Nat.Rev.Immunol. 2: 85-95 (2002)

63. Wenzlau J M, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar S A, Gottlieb P, Rewers M, Eisenbarth G S, Jensen J, Davidson H W, Hutton J C: The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 104: 17040-17045 (2007)

64. Wenzlau J M, Liu Y, Yu L, Moua O, Fowler K T, Rangasamy S, Walters J, Eisenbarth G S, Davidson H W, Hutton J C: A common nonsynonymous single nucleotide polymorphism in the SLC30A8 gene determines ZnT8 autoantibody specificity in type 1 diabetes. Diabetes 57: 2693-2697 (2008a)

65. Wenzlau J M, Moua O, Sarkar S A, Yu L, Rewers M, Eisenbarth G S, Davidson H W, Hutton J C: SlC30A8 is a major target of humoral autoimmunity in type 1 diabetes and a predictive marker in prediabetes. Ann.N.Y.Acad.Sci. 1150: 256-259 (2008b)

66. Wu H H: ZnT8 (Slc30A8) is a new antigenic target in type 1 diabetes. http://www.betacell.org/content/articleview/article_id/234/page/2/glossary/0/ (06.10.2013)

67. Yeung W C, Rawlinson W D, Craig M E: Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. British medical journal 342: d35 (2011)

68. Yu L and Eisenbarth G S: , Type 1 Diabetes: Cellular, Molecular & Clinical Immunology: Chapter 10: Humoral Autoimmunity. http://www.barbaradaviscenter.org (06.10.2013)

69. Yu J, Steck A K, Babu S, Yu L, Miao D, McFann K, Hutton J, Eisenbarth G S, Klingensmith G: Single nucleotide transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene polymorphisms in antiislet autoantibody-negative

patients at onset of diabetes. J.Clin.Endocrinol.Metab. 94: 504-510 (2009)

70. Zimmet P Z: The pathogenesis and prevention of diabetes in adults. Genes, autoimmunity, and demography. Diabetes Care 18: 1050-1064 (1995)

ANHANG

ABBILDUNGEN

Abb. 1: Verteilung der Antikörper gegen Tyrosin-Phosphatase-2 [IA-2], Glutamat-Decarboxylase [GADA] und Inselzellantikörper [ICA] im untersuchten Patientenkollektiv.. 17

Abb. 2: Schematischer Ablauf Radiobindungstest.. 18

Abb. 3: Funktionsprinzip ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 19

Abb. 4: Anzahl der auf Antikörper gegen den Zinktransporter 8 (ZnT8) getesteten Seren pro Gruppe. 20

Abb. 5: Synthese der Antikörper gegen Zinktransporter 8 (ZnT8) 23

Abb. 6: Übersicht über die verschiedenen Antikörper-Bestimmungen 29

Abb. 7: Überschneidungen im Auftreten der Antikörper (AK) gegen den Zinktransporter 8 (ZnT8), Glutamat-Decarboxylase (GADA), Tyrosin-Phosphatase 2 (IA-2) und Inselzellantikörper (ICA) unter Einbeziehung von drei der Antikörper (ZnT8, ICA, GAD und IA-2) 31

Abb. 8: Überschneidungen im Auftreten der Antikörper (AK) gegen Zinktransporter 8 (ZnT8), Glutamat-Decarboxylase (GADA), Tyrosin-Phosphatase 2 (IA-2) und Inselzellantikörper (ICA) unter Einbeziehung aller vier Antikörper (ZnT8, ICA, GAD und IA-2) 32

Abb. 9: Anteil der auf Antikörper gegen Zinktransporter 8 (ZnT8) positiv getesteten Seren pro Altersgruppe 33

Abb. 10: Abhängigkeit der Höhe des Zinktransporter 8 (ZnT8) Antikörper-Titers vom Alter bei Erstmanifestation 34

Abb. 11: Abhängigkeit des Zinktransporter 8 (ZnT8) Antikörper-Titers vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titers 35

Abb. 12: Abhängigkeit des Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titers vom Zinktransporter 8 (ZnT8) Antikörper-Titer 36

Abb. 13: Zusammenhang zwischen Zinktransporter 8 (ZnT8) Antikörper Positivität und dem Nachweis anderer Diabetes-spezifischer Antikörper (AK) 37

Abb. 14: Prävalenz von Antikörpern gegen Thyreoperoxidase (TPO) im gesamten untersuchten Kollektiv 39

Abb. 15: Prävalenz von Antikörpern gegen Thyreoperoxidase (TPO) im Geschlechtsvergleich 40
Abb. 16: Graphische Darstellung der Prävalenz von Antikörpern gegen Thyreoperoxidase (TPO) in verschiedenen Altersgruppen..... 42
Abb. 17: Abhängigkeit des Titers von Antikörpern gegen Thyreoperoxidase (TPO) vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titer..... 43
Abb. 18: Zusammenhang zwischen Thyreoperoxidase (TPO) Antikörper-Positivität und anderen Diabetes-spezifischen Antikörpern (AK)..... 44
Abb. 19: Abhängigkeit des Gliadin IgA-Titers vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titer (für alle gemessenen GAD) 46
Abb. 20: Abhängigkeit des Gliadin IgA-Titers vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titer (für niedrigtitrig positive GAD)..... 47
Abb. 21: Abhängigkeit des Gliadin IgA-Titers vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titer (für alle hochtitrig positiven GAD) 47
Abb. 22: Zusammenhang zwischen Gliadin IgA-Positivität und anderen Diabetes-spezifischen Antikörpern (AK) 49
Abb. 23: Abhängigkeit des Gliadin IgG-Titers vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titer (für alle gemessenen GAD) 50
Abb. 24: Abhängigkeit des Gliadin IgG-Titers vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titer (für alle niedrigtitrig positiven GAD) 51
Abb. 25: Abhängigkeit des Gliadin IgG-Titers vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titer (für alle hochtitrig positiven GAD) 51
Abb. 26: Zusammenhang zwischen Gliadin IgG-Positivität und anderen Diabetes-spezifischen Antikörpern 53
Abb. 27: Abhängigkeit des Transglutaminase (tTG) IgA-Titers vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titer (für alle gemessenen GAD).... 54
Abb. 28: Abhängigkeit des Transglutaminase (tTG) IgA-Titers vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titer (für niedrigtitrig positive GAD) 55
Abb. 29: Abhängigkeit des Transglutaminase (tTG) IgA-Titers vom Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titer (für hochtitrig positive GAD) ... 55
Abb. 30: Zusammenhang zwischen Transglutaminase (tTG) IgA-Positivität und anderen Diabetes-spezifischen Antikörpern 57
Abb. 31: Prävalenz versch. Antikörper (AK) für hoch- und niedrigtitrig positive Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper (1) 58

Abb. 32: Prävalenz versch. Antikörper (AK) für hoch- und niedrigtitrig positive Glutamatdecarboxylase-Antikörper (2) 58
Abb. 33: Relative Häufigkeit der Zinktransporter 8 (ZnT8) Antikörper positiven Proben 60
Abb. 34: relative Häufigkeit aller Tyrosin-Phosphatase 2 (IA-2) Antikörper 61
Abb. 35: relative Häufigkeit der Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper positiven Proben 62
Abb. 36: relative Häufigkeit der Thyreoperoxidase (TPO) Antikörper positiven Proben 63
Abb. 37: Krankheitsmodelle 73
Abb. 38: Abhängigkeit der Anzahl Diabetes-spezifischer Antikörper (AK) von der Höhe des Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titers 74
Abb. 39: Abhängigkeit der Ausprägung Schilddrüsen (SD) -assoziierter Autoimmunität von der Höhe des Glutamat-Decarboxylase (GAD) Antikörper-Titers 74
Abb. 40: Abhängigkeit der Ausprägung Darm-assoziierter Autoimmunität von der Höhe des Glutamat-Decarboxylase (GAD) -Titers 75
Abb. 41: Mögliche Interpretationsmodelle 76
Abb. 42: Pathogenetische Überlegungen zur Autoimmunität 77

TABELLEN

Tab. 1: Vergleich Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes und LADA 14
Tab. 2: Demographische Daten Probanden 16
Tab. 3: Zusammenhang zwischen ZnT8-Positivität und Alter bei Diabetesmanifestation 33
Tab. 4: Mittelwert und Mittelabweichung des ZnT8-Titers für niedrig- und hochtitrig positive GAD 35
Tab. 5: Prävalenz von ZnT8 in den Gruppen 0-3 Antikörper positiv 38
Tab. 6: Prävalenz von TPO in verschiedenen Altersgruppen 41
Tab. 7: Mittelwert und Mittelabweichung des TPO-Titers 43
Tab. 8: Prävalenz von TPO in den Gruppen 0-3 Antikörper positiv 44
Tab. 9: Mittelwert und Mittelabweichung des Gliadin IgA-Titers für niedrig- und hochtitrig positive GAD 48
Tab. 10: Prävalenz von Gliadin IgA in den Gruppen 0-3 Antikörper positiv 49
Tab. 11: Mittelwert und Mittelabweichung des Gliadin IgG-Titers für niedrig- und hochtitrig positive GAD 52
Tab. 12: Prävalenz von Gliadin IgG in den Gruppen 0-3 Antikörper positiv 53
Tab. 13: Mittelwert und Mittelabweichung des tTG IgA-Titers für niedrig- und hochtitrig positive GAD 56
Tab. 14: Prävalenz von tTG in den Gruppen 0-3 Antikörper positiv 57

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard O. Böhm, Universität Ulm, für die Bereitstellung des interessanten Themas und die vielfältige Unterstützung und Expertise während meiner Dissertation.

Ebenfalls einen herzlichen Dank spreche ich Mohammend Hawa, Blizard Institute of Cell an Molecular Science, London, für die Hilfe bei der ZnT8-Analyse aus.

Für die Unterstützung bei den Antikörperbestimmungen danke ich Frau Silvia Höpfer.

Weiterhin gilt mein Dank dem Graduiertenkolleg „Molekulare Diabetologie und Endokrinologie in der Medizin“ für die wissenschaftliche Weiterbildung und finanzielle Förderung.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin und damit diese Arbeit ermöglich haben. Ebenso danke ich meinem Bruder für die geduldige Hilfe beim Auftreten von Softwareproblemen.

LEBENSLAUF

Name:	Dorothee Elisabeth Quack
Geboren am:	4.Juli 1985
Geburtsort:	Wuppertal

Schulausbildung:

1992 – 1996	Grundschule Am Broich in Bergisch Gladbach
1996 – 2005	Dietrich – Bonhoeffer – Gymnasium in Berg. Gladbach
- 06/2005	Abschluss mit dem Abitur

Ausbildung:

2005 – 2006	Ausbildung zur Biomedizinischen Assistentin Rheinisches Bildungszentrum in Köln

Studium:

2006-2008	Studium der Humanmedizin Albert-Szent-György Universität in Szeged/ Ungarn
2008-2012	Studium der Humanmedizin Universität Ulm
- 08/2011-07/2012	Praktisches Jahr Kliniken Oberallgäu/ Kempten, Standort Immenstadt
- 11/ 2012	Abschluss mit dem Staatsexamen

Beruf:

Seit 02/2013:	Assistenzärztin der Inneren Medizin Kliniken Oberallgäu/ Kempten, Standort Immenstadt