



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

IA2 i GAD65: Estudi de la resposta humoral específica en la Diabetis Mellitus tipus I

**Desenvolupament d'eines per a l'estudi d'una possible
relació causal d'ambdós autoantígens
en el desencadenament de la malaltia**

Sandra Piquer i Gibert



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartitqual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartitqual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**IA2 i GAD65: Estudi de la resposta
humoral específica en la Diabetis
Mellitus tipus I.**

**Desenvolupament de eines per a l'estudi
d'una possible relació causal d'ambdós
autoantígens en el desencadenament de
la malaltia.**

Doctorand: Sandra Piquer i Gibert

Director de Tesi/Tutor: Ramon Gomis de Barbará

Programa de Doctorat en Biomedicina

Agraïments

Ara mateix em sembla impossible finalment ho he aconseguit, tot i els entrebancs una fita que he de agrair a molta gent i no voldria deixar-me a ningú, no voldria ser injusta.

El primer agraïment és per Ezio Bonifacio, la persona que em va donar l'oportunitat de créixer a nivell científic i a nivell personal, ell em va oferir poder fer recerca de nivell amb el seu grup a Milà i va estar al meu costat en tot moment durant aquell període. Un record molt especial per tots els membres del grup que van ser la meva família durant aquells tres anys, i sobretot pel Massimo, un gran amic que, tot i la distància i els anys que han passat, tinc la sort de tenir encara aprop. Seria injust no anomenar també a la Francesca, la Cristina i la Luana, les meves companyes de pis que juntament amb els companys de laboratori van aconseguir que recordi aquells anys amb molta tendresa.

Ara ja torno cap a casa, moltes gràcies Ramon, per no haver defallit mai i haver insistit sempre amb paciència, amb bon humor, amb respecte, i quan finalment m'hi he posat seriosament i amb decisió haver-me ajudat en tot moment, no haver-te queixat mai de les presses, haver-me encoratjat i animat en tot moment.

Un agraïment molt especial als meus pares, Jordi i Montse que sempre han cregut en mi, m'han recolzat incondicionalment i m'han donat els valors i l'educació que m'han fet ser el que sóc...sense vosaltres tot això no hagués estat possible...

A la Maria i la Marta, les meves filles, les persones que em donen la força per tirar endavant malgrat totes les dificultats...gràcies pels vostres somriures, les estones de felicitat, els plors,...i sobretot gràcies per deixar-me compartir amb vosaltres tots els petits moments que m'han ajudat i m'encoratgen dia a dia per tirar endavant i no rendir-me mai...Aquesta és també una lliçó de vida per a vosaltres....perseguiu sempre els vostres somnis perquè no hi ha somnis impossibles, només alguns que són una mica més difícils...

A tots aquells que sempre heu estat al meu costat, no vull dir noms perquè encara em deixaria algú...però vosaltres sabeu qui sou...tots aquells que tingueu interès en llegir aquestes línies...tots aquells que sempre teniu una estona per escoltar, per parlar, per compartir,...tots aquells que sempre heu cregut en mi, fins i tot quan ni jo mateixa ho feia...gràcies per estar al meu costat i fer que hagi pogut tornar a ser jo...

Índex

1. Introducció	7
1.1 La Diabetis Mellitus tipus I.....	7
1.1.1 Genètica de la T1D	12
1.1.2 Factors ambientals en la T1D.....	16
1.1.3 Fenòmens d'autoimmunitat cel·lular i humoral a l'illot	20
1.2 Autoantigens en la T1D	26
1.2.1 Autoantigens seqüenciats.....	29
1.2.1.1 Àcid glutàmic decarboxilassa (GAD)	29
1.2.1.2 IA2 (ICA512) i IA2 β (phogrin)	35
1.2.1.3 Glicolípid com a autoantígens	48
1.2.1.4 Insulina.....	49
1.2.1.5 ICA69	54
1.2.1.6 Carboxipeptidassa H	55
1.2.1.7 ICA12	55
1.2.1.8 Transportador de zinc ZnT8(Slc30A8).....	56
1.2.1.9 Tetraspanina 7	59
1.2.2 Autoantígens parcialment caracteritzats	59
1.2.2.1 52 kD.....	59
1.2.2.2 37- 38 kD	60
1.2.2.3 155 kD.....	60
1.2.2.4 GLIMA 38	61
1.2.3 Altres autoantígens	61
1.3 Característiques de l'autoimmunitat en la història natural de la T1D. Predicció del risc a desenvolupar la T1D en base als autoanticossos anti-illot.....	62

2. Objectius	67
3. Metodologia	71
3.1 Generació d'anticossos monoclonals.....	73
3.2 Assaigs de radiobinding	74
3.3 Assaigs d'immunoprecipitació	75
3.4 ELISA	76
3.5 Western blotting	77
3.6 Immunohistoquímica.....	78
3.7 Anàlisi de biosíntesis i degradació	79
3.8 Anàlisis estadístics	80
4. Resultats	83
5. Discussió	135
6. Conclusions	151
7. Bibliografia	157

Abreviacions

Ac - anticòs

Aac - autoanticòs

APS-II - síndrome poliendocrí autoimmune de tipus II

GABA - àcid L-glutàmic a àcid γ -aminobutíric

GAD - Àcid glutàmic decarboxilassa

IAA - autoanticòs contra la insulina

IA2 . proteïna-2 tipus tirosina fosfatassa associada a insulinoma

IA2 β - proteïna-2 tipus tirosina fosfatassa

ICA - autoanticòs contra I α 2

JDFU - Juvenile Diabetes Foundation Unit

mAc . anticòs monoclonal

PTP - proteïna tirosina fosfatassa

T1D - Diabetis Mellitus tipus 1

WR - workshop report

INTRODUCCIÓ

1. Introducció

1.1 La Diabetis Mellitus tipus I

La Diabetis mellitus tipus 1 (T1D) és una malaltia crònica que es produeix com a conseqüència de la destrucció selectiva de la cèl·lula dels illots pancreàtics o de Langerhans, mediada pel sistema immune, i que comporta una absoluta deficiència d'insulina (insulinopènia). La classificació etiològica actual de la Diabetis Mellitus tipus 1 distingeix entre la diabetis tipus 1a (autoimmune-T1D) i la tipus 1b (no mediada pel sistema immune), una forma encara poc definida ¹. A partir d'aquí ens referirem a la diabetis tipus 1a. La prevalença mundial de la Diabetis Mellitus l'any 2011 segons la IDF (International Diabetes Federation) és de 366 milions i s'estima que aquest valor augmentarà fins a 552 milions l'any 2030 amb una prevalença comparativa del 7,7%. De tots els individus amb diabetis, només el 10-15% estan diagnosticats com a T1D. La incidència de la T1D està augmentant a nivell mundial i s'estima que 90000 nens són diagnosticats anualment ². A l'Estat Espanyol un estudi reporta una prevalença (95% CI) ajustada per edat i sexe del 13,8% tot i que cal destacar que aquest mateix estudi senyala que un 30% de la població analitzada té alguna alteració en el metabolisme de la glucosa ³. Aproximadament un 40% de les persones amb T1D desenvolupen la malaltia abans dels 20 anys, i aquest fet la converteix en una de les malalties infantils cròniques més comuns. La prevalença de la T1D en nens menors de 15 anys varia d'un 0.05 fins a un 0.3%, valor observat en la majoria de poblacions europees (0.2% en el cas de l'Estat Espanyol) i nord americanes ⁴.

La T1D, al contrari que la majoria de malalties autoimmunes, afecta per igual homes i dones, tot i que sembla que hi ha un lleuger increment en el grup dels homes respecte les dones en l'incidència dels grups que debuten en edats temperanes. Addicionalment, la incidència de la T1D varia en funció dels canvis estacionals, essent més elevada a l'octubre i l'hivern i inferior en els mesos estivals⁵.

La incidència de la T1D té una gran variabilitat geogràfica. Escandinàvia (60/100000 per any a Finlàndia) i la illa de Sardenya (40/100000 per any) tenen els índexs d'incidència més elevats del món mentre que les poblacions orientals com la Xina, Índia o altres països com Veneçuela, tenen una incidència de només 0.1/100000 per any. Ratis de més de 20 casos per 100000 per any s'han observat en països com Suècia, Noruega, Gran Bretanya, Canadà i Nova Zelanda^{6,8}. Estudis realitzats a l'Estat Espanyol detecten una incidència de la T1D de 10-12/100000 casos per any³. Per altra banda, la incidència de la T1D està augmentant ràpidament a nivell mundial, amb una ràtio del 3-5% anual. Tot i això cal destacar que l'augment en la incidència de la malaltia no és igual en els diferents grups d'edat. La mitjana d'edat al debut ha disminuït en les darreres dues dècades^{7,9}. De fet, sembla que existeixen dos pics de presentació de la malaltia, un entre els 5 i els 7 anys i l'altre proper a la pubertat¹⁰. L'augment anual de casos de T1D entre els anys 1983 i el 2003 ha sigut d'un 5,4% en nens de entre 0 i 4 anys d'edat, i la previsió és que en aquest grup d'edat hi hagi un augment de la incidència que arribi a doblar els casos de T1D fins a l'any 2020⁷. Estudis com l'EURODIAB ACE Study Group (2000) i el DIAMOND Project Group (2006) han demostrat també un augment superior en

la incidència en el grup de nens de 5-7 anys en països amb incidències ja històricament elevades com és el cas de Noruega.

Tot i que la T1D ha estat sempre considerada com una malaltia infantil, hi ha estudis epidemiològics que demostren que en adults, la incidència de aquesta malaltia és comparable ^{6,11}. En concret, l'estudi realitzat per un grup belga demostra com la incidència de T1D és similar en els dos grups de d'edat estudiats (0-14 anys: 11.8/100,000; 15-39 anys: 8.9/100,000). A més a més, aquest estudi detecta una menor prevalença dels símptomes aguts, cetonúria, genotips HLA-DQ de alt risc i autoanticossos (aac) contra la insulina, les cèl·lules de Lillot i IA2 així com una major prevalença dels aacs contra la GAD65 en el individus diagnosticats de T1D que pertanyen al grup de d'edat compresa entre 15 i 39 anys respecte als individus del grup de d'edat compresa entre 0 i 14 anys que desenvolupen la malaltia ⁶.

El model de història natural de la T1D suggereix que els individus genèticament susceptibles amb un nombre fixe de cèl·lules β estan exposats a uns factors ambientals desencadenants que indueixen els processos de autoimmunitat. Aquest model preveu l'existència de diferents estadis que començarien amb un procés de autoimmunitat sense l'existència de la malaltia clínica declarada (prediabetis), període durant el qual es produeix un defecte progressiu de la secreció d'insulina i finalment el debut clínic de la malaltia (Fig.1). Posteriorment, existeix una fase de remissió transitòria i finalment la diabetis establerta, període en el qual es poden detectar diverses complicacions, tant de tipus agut com crònic (hipoglucèmies, cetoacidosis, infeccions, retinopatia, nefropatia,...).

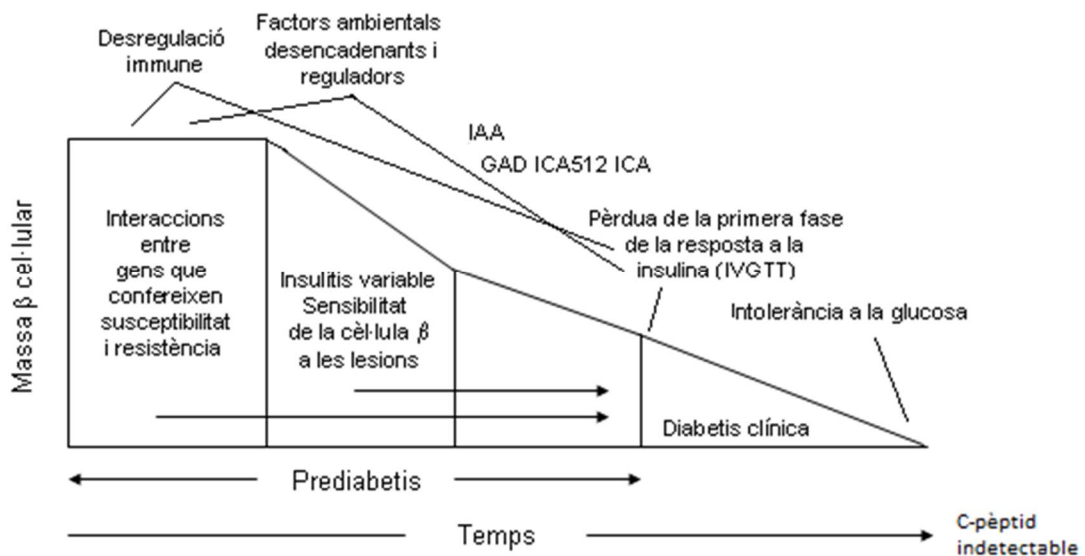


Figura 1. Model actual proposat per explicar el procés de història natural de la diabetis tipus 1A. Aquest model inclou la informació obtinguda gràcies a un millor coneixement de la genètica, immunologia i efectes ambientals en la història natural de la T1D (Adaptat a partir de Atkinson i Eisenbarth 2001).

En la majoria dels pacients, no es coneix l'etiologia del procés autoimmunitari i de la destrucció de la cèl·lula β , però se sap que aquests processos estan mediatos per macròfags i per limfòcits T i que existeixen anticòs detectables contra diversos antígens de la cèl·lula β . De fet, l'autoimmunitat es defineix per la presència d'anticòs ja que la seva detecció és molt més senzilla i es troba molt més estandarditzada que no pas la detecció dels marcadors cel·lulars.

La durada de la fase preclínica autoimmune és variable arribant en alguns casos fins a 13 anys ^{12,13}. En els individus amb aacs persistents es produeix primerament una pèrdua de la secreció pulsàtil espontània d'insulina, una progressiva reducció de la resposta aguda d'insulina als nivells de glucosa intravenosa, seguida d'una reducció de la resposta a altres segretagogs, una intolerància a la glucosa oral i hiperglucèmies en dejú ¹⁴.

Els primers estudis en familiars de primer grau ^{13,15,16} i en nens sense història familiar de diabetis ^{17,19} van detectar una %emissió+ dels aacs contra l'ílot (ICA) entre un 10 i un 78%. Estudis més recents però, suggereixen que mentre els títols dels aacs específics contra l'ílot poden variar, és força infreqüent una %emissió+ d'aquests en individus on han estat detectats dos o més aacs durant, fins i tot, un breu període de temps ²⁰. Per altra banda, hi ha individus on hi pot haver una desaparició de l'autoimmunitat β cel·lular o altres on tot i la presència d'aacs no es produeix una progressió cap a la diabetis degut a una penetrància incompleta de la susceptibilitat genètica o a una insuficient exposició a factors ambientals. L'edat també pot jugar un paper important ja que s'ha observat que els nens menors de 10 anys tenen un risc 3 vegades superior a desenvolupar la malaltia a partir de l'autoimmunitat comparat amb el risc que tenen grups d'edat superiors ²¹. Per altra banda, l'autoimmunitat contra la cèl·lula β pot desaparèixer i reaparèixer degut a infeccions virals o a exposicions a factors de la dieta.

1.1.1 Genètica de la T1D

Existeixen un gran nombre de evidències que indiquen la influència de diversos factors genètics en la susceptibilitat i resistència al desenvolupament de la T1D. Tot i que una proporció considerable de pacients afectes de T1D no tenen una història familiar de diabetis, existeix una relació familiar significativa amb una prevalença mitja del 6% entre germans comparada amb el 0.4% en població general caucàsica. Un altre tipus de susceptibilitat és dependent del grau d'identitat genètica amb l'individu afectat per la malaltia. El risc més elevat de desenvolupar T1D s'observa en bessons monozigòtics (30% aproximadament) tot i que un estudi recent que realitzava un seguiment a llarg termini suggereix que aquest percentatge podria ser superior ² seguit pels familiars de primer grau amb un risc aproximat del 5% ²².

Els primers articles que parlen de susceptibilitat genètica de la T1D daten del 1973 ²³ i la relacionen ja amb la regió HLA (Human leucocyte Antigen). Tot i que des deleshores s'han trobat 40 loci genètics associats a la T1D en diferents estudis realitzats, la regió HLA, amb els seus múltiples gens i alt polimorfisme als seus loci, continua sent la regió que més contribueix en la susceptibilitat genètica de la T1D amb odds ratios (ORs) que van de 0,22 fins a 11 per haplotips DR-DQ específics ²⁴.

El locus de susceptibilitat de més importància per al desenvolupament de la T1D es troba a la regió HLA (Human leucocyte Antigen) de classe II situada al braç curt del cromosoma 6 (IDT1D) ²⁵. El locus determinant de susceptibilitat més important detectat fins a l'actualitat és el HLA-DQ. Els al·lels HLA DR4 i DR3 estan fortament associats a la T1D i aproximadament el 30-50%

(depenent de l'edat i el gènere) dels pacients afectes són heterozigots DR3/DR4. El genotip DR3/DR4 comporta el risc més elevat per al desenvolupament de la T1D seguit pels genotips homozigots DR4 i DR3, respectivament ²⁶. Els al·lels HLA DRB1*0401, *0402 i *0405 amb DQA1*0301-DQB1*0302 (també anomenat DQ8) estan associats a un alt risc per al desenvolupament de T1D, mentre que DRB1*0403 amb els mateixos al·lels DQ confereixen a l'individu un genotip protector. Un altre haplotip d'alt risc força freqüent és l'HLA DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201 també anomenat DQ2 ²⁷. Aproximadament el 90% dels individus afectes de T1D tenen DQ2 o DQ8, comparat amb el 40% en població general. A més a més, el 35% dels pacients dels USA afectes de T1D són DR3/DR4,DQ2/DQ8+heterozigots comparat amb el 2.4% de la població general. El fet que certs haplotips confereixin protecció enfront el desenvolupament de la malaltia és una característica única que diferencia la T1D de la resta de malalties autoimmunes (Taula 1).

HLA-DR	DQA1	DQB1	DRB1	Susceptibilitat
DR2	0102	0602	1501	Protector
DR2	0102	0502	1601	de predisposició
DR2	0103	0601	1502	Neutre
DR3	0501	0201	0301	Alt risc
DR4	0301	0302	0401	Alt risc
DR4	0301	0302	0402	de predisposició
DR4	0301	0302	0403	Neutre
DR4	0301	0302	0404	de predisposició
DR4	0301	0302	0405	Alt Risc
DR4	0301	0301	0401	Neutre
DR4	0301	0303	0401	Neutre
DR7	0201	0303	0701	Protector
DR6	0101	0503	1401	Protector

Taula 1. HLA classe II DR-DQ linkage patterns i susceptibilitat a la T1D.

Els aacs contra la cèl·lula β en el moment del diagnòstic de la T1D són sempre associat amb el haplotips HLA-DR-DQ. L'estudi TEDDY senyala que els nens homozigots per HLA-DR3-DQ2 tenen aacs contra la molècula de GAD com a primer aac, mentre que els nens amb l'haplotip HLA-DR4-DQ8 tenen la tendència a tenir els IAA com a primer aac ²⁸. La possibilitat que altres molècules HLA tipus II contribueixin en l'activació inicial de l'autoimmunitat contra la cèl·lula β no es pot excloure ja que estudis recents de *next generation sequencing* han revelat que HLA-DRB3, HLA-DRB4 i HLA-DRB5 podrien estar associades amb els aacs contra la cèl·lula β i l'augment del risc a desenvolupar la T1D ²⁹.

Altres loci associats ja amb anterioritat amb el risc a desenvolupar T1D són INS, PTPN22, CTLA4 i IL2RA tot i que existeixen altres gens candidats com IL10, IL9, IL20, GLIS3, CD69 i IL27 identificats en estudis recents the genome-wide association ²⁸.

Tot i que la funció d'aquests gens en termes de resposta immune és ben coneguda la seva contribució específica en la patogènesis de la T1D segueix sent una incògnita. La hipòtesi més acceptada actualment és que aquestes molècules a través dels pèptids als quals s'uneixen i presenten als limfòcits T determinen el risc tot i influenciant la selecció tímica dels limfòcits T i/o la presentació antigènica perifèrica. Aquesta hipòtesi ha estat estudiada en models animals que expressen al·lels HLA de classe II humans com per exemple, el model de ratolí transgènic per l'al·lel DQ8 humà amb expressió a cèl·lula β de la molècula coestimulatòria B7-1 ³⁰. El fet que s'hagi detectat expressió ectòpica de la insulina i altres antígens de la cèl·lula β en el timus humà ³¹ dóna suport indirecte a la hipòtesi per la qual la presentació tímica dels

antígens propis així com la deleció o selecció positiva dels limfòcits T implicats en el desenvolupament de la diabetis podrien estar afectats a la T1D.

La T1D és una malaltia heterogènia i poligènica amb un nombre força elevat de locus diferents dels HLA identificats, uns 20 aproximadament, que contribueixen a la susceptibilitat genètica. Tot i així només es coneix la funció de dos d'ells, Iddm2 i Iddm12. Iddm2 es troba format per un nombre variable de repeticions en tàndem (VNTR) localitzades aproximadament 0.5 kb a 5q del gen de la insulina al cromosoma 11p15^{32,34}. Hi ha tres mides principals de VNTR: classe I (26-65 repeticions), classe II (aproximadament 80 repeticions) i classe III (140-200 repeticions). L'homozigosi per a la classe I determina un alt risc per al desenvolupament de la T1D mentre que la classe III té un efecte protector dominant³⁵. Una hipòtesi de com aquests polimorfismes podrien influenciar el desenvolupament de la T1D està basada en el treball de Bennet et al.³⁵ on es va trobar una associació entre l'allel de classe III i un augment de l'expressió del RNA missatger de la insulina al timus. Per altra banda, estudis en models animals han demostrat que una elevada expressió de la insulina al timus comporta una selecció negativa de les cèl·lules T autoreactives específiques per a la insulina³⁶. Iddm12 és un locus associat al desenvolupament de diabetis en algunes poblacions^{37,38} situat al cromosoma 2q33. Aquesta regió cromosòmica conté els gens CTLA-4 (limfòcit T citotòxic associat-4) i CD28 així com el locus putatiu idd5 a ratolins NOD³⁷. Els gens CTLA-4 i CD28 codifiquen per dues molècules íntimament relacionades a l'activació i proliferació de cèl·lules T. CTLA-4 és un receptor coestimulador amb acció negativa o repressora que s'expressa a cèl·lules T activades i que s'uneix a les molècules coestimuladores B7 presents a les

cèl·lules presentadores d'antigen tot i limitant la resposta de les cèl·lula T. El polimorfisme A/G situat al primer exó de la molècula comporta un canvi d'aminoàcid (Thr/Ala) amb una transmissió diferencial en germans afectes de T1D ³⁷.

1.1.2 Factors ambientals en la T1D.

Tot i els nombrosos estudis existents, no s'ha pogut determinar l'existència de cap factor ambiental universal causant de la T1D. Actualment els factors ambientals més estudiats com a possibles candidats es poden classificar en tres grups ^{39, 41}:

- infeccions virals (ex. coxsackievirus i citomegalovirus)
- factors de la dieta
- toxines (ex. nitrats, nitrits o nitrosamines)

De tota manera, existeixen altres factors no genètics que podrien modificar el desenvolupament de la malaltia com són la administració de vacunes, l'estrès psicològic o bé les influències climàtiques.

Existeixen diversos estudis prospectius (BABYDIAB, DAISY, DIPP, PANDA...) en nens que desenvolupen acs anti-illot pancreàtic i eventualment diabetis que tenen com a finalitat, entre d'altres, ajudar a aclarir el possible efecte dels factors ambientals en el desenvolupament de la malaltia en els infants.

Fins ara, només s'ha trobat una associació clara entre una infecció viral i el desenvolupament de la T1D en el cas de nens que han sofert una infecció per rubella congènita ^{42,43}. Alguns estudis han trobat associacions entre infeccions agudes per enterovirus i l'aparició d'acs contra antigens de l'illot ^{44, 46} però

aquests resultats no han pogut ser confirmats per altres autors^{47,48}. L'estudi prospectiu DIPP (Finnish Type I Diabetes Prediction and Prevention project) ha revelat una alta freqüència d'infeccions per enterovirus en nens en el moment de l'aparició dels Aacs anti-illot respecte nens de la mateixa edat sense signes d'autoimmunitat⁴⁹.

Entre els diferents factors candidats de la dieta que podrien influenciar l'aparició de l'autoimmunitat de l'illot i la T1D es troben un curt període d'alimentació matern, la introducció en l'alimentació de proteïnes de la llet de vaca durant els primers mesos de vida així com la introducció primerenca de cereals. Alguns autors han suggerit que l'alimentació matern podria protegir el nadó del desenvolupament de la T1D⁵⁰ mentre que la introducció primerenca de llet suplementària podria promoure el desenvolupament d'aacs contra l'illot pancreàtic i la T1D⁵¹⁻⁵³. Estudis prospectius amb neonats de risc com l'estudi finlandès TRIGR (Trial to reduce IDDM in the genetically at risk) realitzat en 230 nadons no han pogut demostrar un augment del risc a desenvolupar aacs contra l'illot en aquells nadons que van rebre proteïnes de llet de vaca ja des dels primers mesos de vida^{54,56}. Un altre factor candidat és la introducció primerenca de cereals en la dieta dels nadons. Els resultats de dos estudis suggerien que el risc a desenvolupar aacs contra l'illot es trobava augmentat en aquells nadons que havien estat exposats a les proteïnes dels cereals, i particularment al gluten, a una edat molt primerenca^{57,58}. Per tal de confirmar aquests resultats es van iniciar dos estudis anomenats BABYDIAB and BABYDIET que pretenien determinar la influència del retardament en la introducció del gluten en la dieta en el desenvolupament d'aacs contra l'illot en nadons amb un alt risc genètic a desenvolupar T1D, però aquests estudis van

mostrar associació només amb una exposició precoç al gluten ⁵⁶. Una dada que donaria suport al possible efecte del gluten com a factor ambiental en el desenvolupament de la T1D seria l'estudi realitzat per Pastore i col·laboradors entre familiars amb alt risc pel desenvolupament de la T1D on es demostra que una dieta exempta de gluten millora la secreció d'insulina en aquests individus⁵⁹.

La Vitamina D s'ha postulat com un possible factor protector degut al seu paper actiu en la regulació del sistema immune així com en les vies metabòliques rellevants en la diabetis. Malgrat l'interés en estudiar els efectes d'un suplement en Vitamina D com a possible mecanisme de prevenció en el desenvolupament de l'autoimmunitat de l'infant i la T1D, els estudis realitzats en cohorts des del naixement no donen evidències que recolzin aquesta hipòtesis ⁵⁶.

Evidències circumstancials suggereixen una connexió entre la T1D i el consum de menjar i beguda que continguin nitrats, nitrits o nitrosamides ^{60.63}. Per altra banda, els resultats obtinguts en un estudi realitzat a Holanda ⁶⁴ no poden confirmar que els nivells de nitrat habituals a l'aigua de beguda tinguin cap influència en el risc a desenvolupar la T1D tot i que no exclouen un possible efecte del nitrat en el desenvolupament de la T1D quan aquesta toxina es troba a concentracions superiors a 25 mg/l.

Existeixen especulacions per les quals les vacunes podrien ser un agent desencadenant de l'autoimmunitat, però no s'han pogut trobar associacions entre vacunes i l'autoimmunitat contra l'infant o la T1D. Un meta-analysis recent de 23 estudis investigant 16 vacunacions va concloure que les vacunes infantils no augmenten el risc a desenvolupar la T1D ⁵⁶.

Fins a l'actualitat, els factors ambientals han estat considerats factors que podien desencadenar el desenvolupament de la T1D en individus amb una predisposició genètica. Una visió més moderna de la influència dels factors ambientals en el desenvolupament de la T1D seria donar-los una funció com a modificadors de la patogènesi de la malaltia i no pas com a factors desencadenants d'aquesta. Observacions tant en humans com en models animals donen suport a aquesta teoria on la penetrància i l'expressió d'aberracions immunitàries heretables (com la T1D) juntament amb defectes inherents en els òrgans diana, estarien afectades per múltiples factors ambientals com agents infecciosos, factors de la dieta, toxines... així com nous tipus de variables (vacunacions, accés a l'assistència sanitària,...). Un exemple que donaria suport a aquest model són els resultats de diversos estudis on s'observa que el fet d'haver patit diverses infeccions durant els primers anys de vida està associat a un risc reduït pel desenvolupament de la T1D^{65, 67}. Per altra banda, s'ha observat un risc augmentat de desenvolupament de T1D en nadons que han sofert infeccions perinatales. Totes aquestes observacions han portat al desenvolupament d'una teoria per la qual les infeccions influïrien en el desenvolupament del sistema immune depenent del període en el qual es produeixen. D'aquesta manera, més que l'exposició a un agent concret, els factors ambientals podrien actuar promovent o atenuant la malaltia durant els diferents períodes del seu desenvolupament, amb un efecte que dependria de la quantitat i la durada d'aquestes exposicions. Aquest model podria explicar, en part, l'augment de freqüència de la T1D en els últims trenta anys, un augment que ha coincidit amb l'augment de l'assistència sanitària així com de la higiene en la majoria de poblacions desenvolupades.

1.1.3 Fenòmens d'autoimmunitat cel·lular i humoral a l'illot

La T1D és una malaltia que es caracteritza per la destrucció progressiva de la massa cel·lular dels illots pancreàtics. Aquesta destrucció selectiva es pot definir com una malaltia mediada pel sistema immune ja que hi han estudis que demostren l'efecte protector dels immunosupressors en la destrucció de la funció residual de la cèl·lula en debuts recents de T1D ⁶⁸.

En el moment del debut clínic de la T1D entre el 60 i el 80% dels illots són deficients en cèl·lula i poden estar infiltrats per cèl·lules mononuclears ⁶⁹, infiltració inflamatòria que es produeix principalment al voltant de les cèl·lules de l'illot que contenen insulina. Diversos estudis realitzats en altres malalties mediades pel sistema immune com l'esclerosi múltiple o l'artritis reumatoide han demostrat que molts dels components de la resposta inflamatòria com els macròfags, cèl·lules dendrítiques, cèl·lules T CD4+ i CD8+, així com mediadors dels processos d'inflamació en forma de citocines, radicals d'oxigen i d'òxid nítric, prostaglandines, factors del complement,...contribueixen al procés de destrucció del teixit. En el cas de la T1D diversos estudis in vitro i en models animals destaquen la importància dels mediadors inflamatoris en aquest procés ^{70, 72}. Així doncs, combinacions de les diferents citocines proinflamatòries IL-1 β , IFN γ , TNF α i IL-6 són sinèrgicament citotòxiques per a la cèl·lula β ja que provoquen una combinació de necrosi i apoptosi a la massa β cel·lular dels illots de la majoria de rosegadors mentre que l'efecte sobre la cèl·lula β dels illots humans i de ratolins NOD és bàsicament degut a la inducció de processos d'apoptosi. Aquestes citocines pro inflamatòries apareixen ja a l'inici de la formació dels infiltrats inflamatoris en models animals de T1D, i s'ha demostrat

que la presència dels seus antagonistes protegeix contra el desenvolupament de la diabetis en aquests models ⁷⁰. A més a més, existeix amplia informació sobre els efectes dels radicals lliures d'oxigen i d'òxid nítric sobre la cèl·lula β gràcies a estudis realitzats tan en cèl·lules infiltrades com en cèl·lules on la presència de citocines induïx l'expressió específica dels enzims que generen aquests radicals d'òxid nítric sintasa induïble (iNOS).

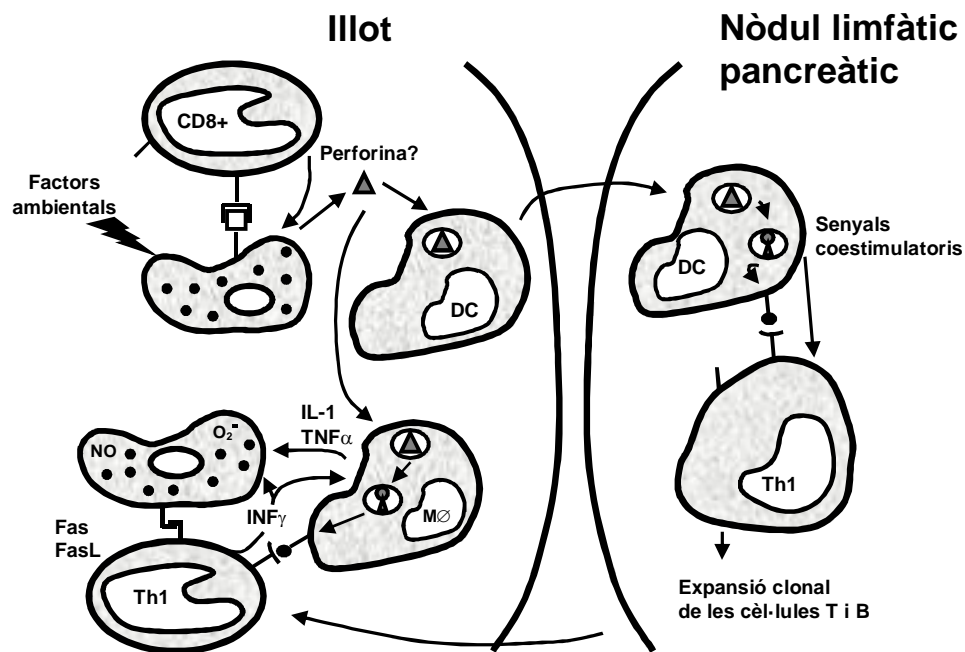


Figura 2. Model d'inflamació en el procés de patogènesis de la T1D.

Un dels models d'inflamació del procés de patogènesi de la T1D és el proposat en la figura 2. El model suggereix que factors ambientals, principalment en forma de virus o apoptosi espontània, induirien la mort β -cel·lular i la posterior presentació d'antígens per molècules MHC (complex major d'histocompatibilitat) de classe I de la cèl·lula β . Aquests antígens presentats en el context de IqMHC de classe I serien reconeguts per les cèl·lules T CD8+ que causarien un dany β cel·lular limitat via citocines citotòxiques com Iq $\text{FN}\gamma$ o $\text{TNF}\alpha$ o bé a través del sistema perforina/granzima.

Alguns dels components de la cèl·lula β alliberats, com la insulina o formes immadures glicosilades de GAD que no haurien estat prèviament detectats pel sistema immune serien capturats per les cèl·lules dendrítiques circulants presents als illots que els transportarien fins als nòduls limfàtics pancreàtics on els antígens serien processats i presentats a les cèl·lules T CD4+. Després de l'expansió clonal de les cèl·lules T CD4+ i la seva polarització vers el fenotip Th1 aquestes es dirigirien cap als illots tot i seguint les traces dels gradients quimotàctics i de molècules d'adhesió endotelials induïts per la resposta inflamatòria primerenca provocada per les cèl·lules T CD8+. Les cèl·lules T CD4+ activades reclutarien i activarien cèl·lules inflamatòries tan específiques com no específiques que contribuirien a la formació de l'infiltrat inflamatori. La destrucció de la cèl·lula β iniciaria per la presència de citocines que actuarien induint els processos de senyalització proapoptòtica a la cèl·lula β i/o induint l'expressió de Fas, de manera que la cèl·lula β quedaria marcada per al seu reconeixement per part de les cèl·lules T CD4+ activades que expressin el lligand de Fas (FasL). La interacció entre el receptor de Fas a la superfície de

la cèl·lula β amb el seu lligand FasL a les cèl·lules T activades, provocaria la mort de les cèl·lules β .

En els anys que precedeixen el debut clínic de la T1D existeixen molts canvis al sistema immune i al metabolisme que poden ser detectats en sang perifèrica⁷³. Els canvis immunològics inclouen respostes cel·lulars i humorals que persisteixen durant un període perllongat de temps després del diagnòstic de la malaltia⁷⁴. La natura, intensitat, extensió i persistència d'aquests canvis immunològics distingeixen els individus que desenvoluparan la T1D d'aquells que no ho faran^{73,74}. Així doncs, els canvis immunològics i metabòlics poden ser predictius de la malaltia.

És àmpliament acceptat el fet que la T1D és deguda a un procés autoimmune⁷³. Malgrat que en humans les evidències són circumstancials, diversos models animals de la malaltia com els ratolins NOD (non-obese diabètic) o les rates BB-DP (Bio-Breeding Diabetes-Prone) i KDP (Komeda Diabetes-Prone, una sublínia de la rata Long-Evans Tokushima Lean) demostren etiologia autoimmune que desencadena la T1D.

El ratolí NOD és el model animal més ben caracteritzat en l'actualitat^{75,76}. En aquest model es pot observar infiltració als illots al voltant de les 6-7 setmanes d'edat, infiltració que comença a les tres setmanes de vida. Aquesta infiltració és el pas previ al desenvolupament espontani de la T1D, que en mascles i femelles presenta una incidència acumulativa del 40% i 70% o més del 90% respectivament a les 30 setmanes d'edat, depenent de la colònia^{77,78}. El ratolí NOD, semblant al cas dels humans, expressa transitòriament acs anti-insulina en el seu sèrum abans del desenvolupament de la hiperglucèmia^{79,80}. Tot i que tots els ratolins NOD desenvolupen insulinitis, no tots desenvolupen diabetis.

La incidència de diabetis en aquest model animal varia segons les diferents colònies establertes i a diferència dels humans, aquesta incidència es veu influenciada pel gènere ⁷⁸. La incidència en aquest model animal també es veu influenciada per les condicions ambientals, ja que augmenta en condicions d'esterilitat ⁸¹ i disminueix amb la presència d'agents infecciosos ^{82,83}.

Estudis en ratolins NOD demostren que la destrucció de la cèl·lula β és dependent dels limfòcits ja que requereix la presència de cèl·lules T CD4 i CD8^{84, 86} així com de limfòcits B per al seu desenvolupament espontani ⁸⁷. Aquest model animal permet els estudis de progressió de la malaltia com són la cronologia d'insulinitis així com la natura d'aquesta. Abans que es produeixi el dany a la cèl·lula β existeix un període d'insulinitis benigna que precedeix a la forma destructiva d'aquesta en la qual dominen les citocines de tipus Th1, IFN γ i TNF α . A En els ratolins NOD, semblant al cas dels humans, s'ha detectat la presència d'anticòs contra la insulina (IAA) abans de l'aparició de la hiperglucèmia⁸⁸. De tota manera, s'ha descrit la presència transitòria d'aquests autoanticòs sense el posterior desenvolupament de T1D en el ratolí NOR, una soca molt relacionada amb la soca NOD amb l'haplotip MHC IA ^{97 89}. A més a més, la quantitat d'IAA s'ha associat més al grau d'insulinitis que no pas a la incidència de la T1D ⁹⁰. D'altra banda, el paper de diverses poblacions cel·lulars en la destrucció de la cèl·lula β s'ha pogut estudiar gràcies als animals knockouts, els clons de cèl·lules T i els models de transferència adoptiva en ratolins NOD/SCID.

Altres models utilitzats en l'estudi de la T1D són les rates BB-DP i KPD. En comparació amb el model de ratolí NOD, el model de rata BB té avantatges com són una penetrància de la malaltia més alta i uniforme, així com una

igualtat entre sexes (un 90% dels animals mantinguts en condicions lliures de patògens desenvolupen diabetis) ^{91,92}. Un altre factor diferencial d'aquest model amb el model de ratolí NOD és el temps entre que es produeix la insulinitis i el desenvolupament de la diabetis, un període molt més curt (de dues a quatre setmanes). El tret més característic d'aquest model és el fet que requereix un únic locus *lymphopenia+(lyp)* per al desenvolupament espontani de la malaltia que no es troba en el model de ratolí NOD (no obstant s'ha descrit l'existència de limfopènia en la soca NOD com a factor de susceptibilitat a la diabetis ⁹³) ni en la gran majoria dels humans afectes de T1D ⁹⁴. Els avantatges del model de rata KDP són el desenvolupament espontani de la malaltia sense diferències entre sexes i sense la necessitat de limfopènia amb una insulinitis del 100% i un 70% de diabetis als 120 dies de vida ⁹⁵ així com una associació amb el MHC de classe II.

La identificació i caracterització dels autoantígens associats a la T1D que actuen com a dianes de la resposta immune, té doble importància ja que els acs contra aquestes molècules poden actuar com a marcadors predictius del desenvolupament de la malaltia i la modulació d'aquesta resposta immune contra un antigen podria alterar el curs de la malaltia.

1.2 Autoantigens en la T1D

Els acs contra antígens de l'ílot pancreàtic en diabetis van ser detectats per primera vegada per immunofluorescència indirecta en seccions congelades de pàncrees humà al sèrum de pacients diabètics amb autoimmunitat contra múltiples òrgans endocrins ⁹⁶. Aquests acs contra l'ílot (ICA) s'uneixen en general a molècules que es troben en totes les cèl·lules de l'ílot pancreàtic ⁹⁷ tot i que existeix una gran heterogeneïtat en els patrons existents. Aquest fet ha suggerit un gran nombre de molècules diana (GAD, IA2 i IA2β) contra les quals podrien reaccionar aquests acs ^{97,99}. Els ICA són principalment de subclasse IgG1 però entre aquells individus amb alts títols es poden detectar altres subclasses ¹⁰⁰. Com gairebé tots els acs IgG1, els ICA poden fixar complement ¹⁰¹.

Ja fa més d'una dècada que l'ecrinatge dels acs associats a la T1D s'ha limitat a la mesura dels ICA i dels acs anti-insulina. Tot i els esforços per estandarditzar els assaigs per mesurar els ICAs, aacs expressats en unitats JDFU (Juvenile Diabetes Foundation Unit), les diferències entre laboratoris fa que les comparacions entre els diferents estudis siguin complicades ^{102, 104} (Bottazzo⁸⁶, Bonifacio⁸⁷ Workshop Reports). Estudis realitzats en familiars de primer grau han detectat prevalències d'aquests aacs de entre 1 i el 10% (Taula 2) mentre que en pacients diabètics o en individus abans del debut clínic aquests valors augmenten fins a un 70-90% ^{105, 108}. El risc per desenvolupar diabetis es correlaciona amb el títol d'ICA, de manera que valors superiors a 80 JDFU tenen una alta especificitat així com un alt valor predictiu en familiars de primer grau ¹². Tot i això cal dir que no tots els familiars de primer grau amb un

alt títol de ICA desenvolupen T1D i molts dels que la desenvolupen tenen valors de ICA inferiors a 80 JDFU ¹⁰⁹. L'edat, per la seva banda, és un factor que s'ha d'anàlitzar amb cura ja que estudis com el CARUS han detectat un risc del 54% per desenvolupar T1D abans de 5 anys en familiars de primer grau de menys de 10 anys mentre que aquest risc disminueix fins al 10% en familiars de 40 anys o més ¹⁰⁹. El risc de desenvolupar la T1D està també influenciat pel patró de fluorescència detectat. Així, el marcatge selectiu de cèl·lula β s'associa a un baix risc per desenvolupar la T1D comparat amb un patró de marcatge homogeni en tot el pàncrees ^{98,99}.

Autoanticossos	Prevalença en la població general	Prevalença en familiars de primer grau
ICA	0.59 . 5.3%	1 . 12%
GAD	0.4 . 2.97%	5 - 13%
IA2	0.1 . 2.4%	1.5 . 5.3%
IAA	1.07 . 3.9%	1.4 . 6.9%

Taula 2. Prevalença dels autoanticossos antiislet en la població general i en familiars de primer grau (les dades es basen en una revisió de la bibliografia).

(*Diabetes Metab Res Rev* 2005;21: 395-415)

El fet que el 90% dels casos de T1D esdevinguin de forma esporàdica sense que els individus tinguin cap tipus de història familiar fa que sigui important el screening de la població general per tal de determinar la prevalença i el valor predictiu dels ICA (Taula 2) però la majoria dels estudis realitzats conclouen que aquests aacs tenen un baix valor predictiu en la població general ¹¹⁰.

El baix valor predictiu dels ICA, sense fer referència a d'altres aacs, en població general i en familiars de primer grau ^{17,110} així com els problemes de standardització de la tècnica utilitzada per detectar-los fa que en l'actualitat ja no s'utilitzin en grans estudis com a mètode ni de diagnòstic ni predictiu.

Actualment existeixen assaigs amb molècules recombinants dels autoantígens seqüenciats ^{111,112} que inclouen la insulina ¹¹³, l'àcid glutàmic decarboxilasa (GAD) ¹¹⁴, IA2 ^{115, 117}, IA2 β ^{118,119} i la carboxipeptidasa H ¹²⁰. A més a més, existeixen un gran nombre d'autoantígens en diversos estadis de caracterització així com proteïnes de les quals només es coneix el seu pes molecular (Taula 3). També hi ha altres molècules descrites la associació de les quals amb la T1D no s'ha estudiat en humans o de les quals no s'han publicat estudis de seguiment. Finalment, existeixen un grup d'aacs anomenats aacs contra la superfície cel·lular de l'illot que rarament es mesuren ja que els estudis més recents no han pogut demostrar la seva especificitat ¹²¹. De tota manera, un estudi publicat per Verdaguer i col·laboradors demostra l'existència d'aacs específics contra la innervació insular en els infiltrats dels illots de ratolins NOD afectes de T1D ¹²².

	Sensitivitat	Comentari
Insulina	49-92%	Alts títols en nens
GAD	84%	Alta sensibilitat en LADA
IA2/ICA512	74%	Molècula tipus tirosina fosfatassa
IA2 β /phogrin	61%	Molècula tipus tirosina fosfatassa
Carboxipeptidassa H	10%	Poc freqüent
GLIMA38	14%	Sense seqüenciar
GM2-1	?	Gangliòsid: assaig cromatogràfic
ICA69	?	Western blot amb baixa especificitat
ICA12	< 20%	La seva relació amb la diabetis està per demostrar.

Taula 3. Autoantigens caracteritzats bioquímicament.

(*Diabetes Metab Res Rev* 2005;21: 395-415)

1.2.1 Autoantigens seqüenciats

1.2.1.1 Àcid glutàmic decarboxilassa (GAD)

L'àcid glutàmic decarboxilassa (GAD) és un enzim localitzat majoritàriament al citoplasma i a les vesícules micro-secretories de les neurones secretories i de les cèl·lules β pancreàtiques^{123,124} que catalitza la conversió de l'àcid L-glutàmic a àcid γ -aminobutíric (GABA), un dels principals neurotransmissors inhibitoris dels sistemes nerviosos central i perifèric¹²⁵. La presència de GAD i GABA a les cèl·lules β de l'ílot així com de receptors per GABA suggereix un possible paper de GABA en la senyalització paracrina de l'ílot. Per altra banda, la molècula de GAD s'expressa també a altres teixits com testicle i epíteli del tub de Falopi^{126,127} on encara no s'ha pogut aclarir la seva funció.

Les espècies de mamífers expressen dues isoformes de GAD que s'anomenen GAD65 i GAD67 d'acord amb el seu pes molecular en kDa ^{123,128,129}, els gens humans de les quals es troben localitzats al cromosoma 3 i 10, respectivament ^{128,130}. Ambdues molècules són altament homòlogues. GAD65 i GAD67 tenen una estructura exó-intró idèntica ¹³¹, són idèntiques en un 76% i comparteixen una similitud del 87% al llarg dels darrers 12 exons (exons 5-16). En la regió NH₂-terminal els 2 isòmers difereixen significativament, amb una estructura idèntica en un 22 i 49% en els exons 1-3 i 4, respectivament (Fig 3)

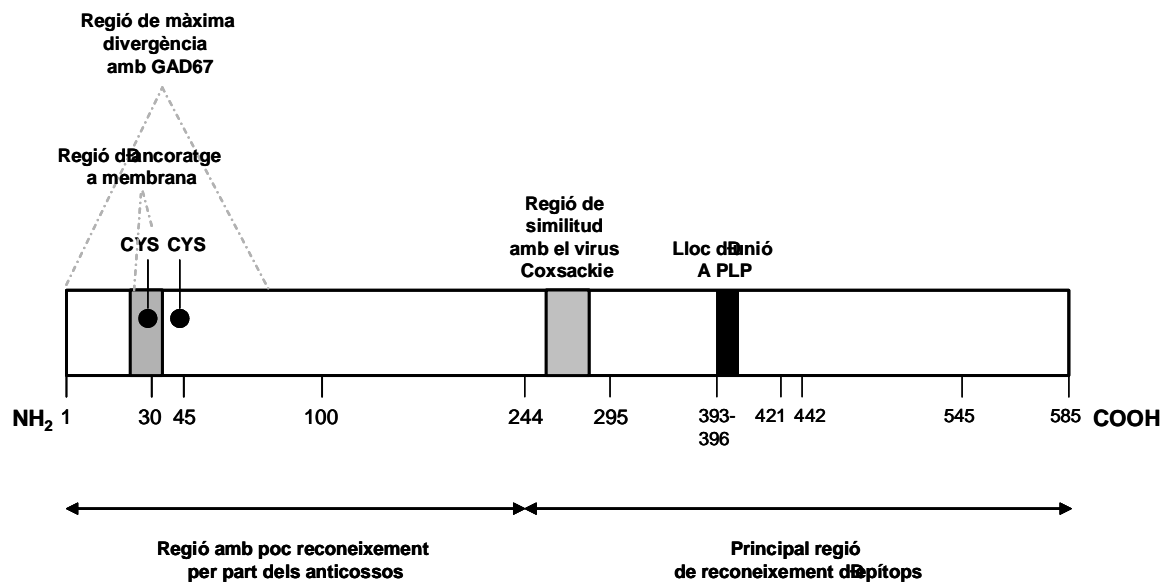


Figura 3. Representació esquemàtica de la proteïna GAD65. Les regions senyalades inclouen regions riques en cysteïnes (CYS); la regió d'unió al piridoxal 5-fosfat (PLP); la regió d'ancoratge a membrana; la regió de màxima divergència amb GAD67; la regió de similitud amb el virus Coxsackie; i les principals regions de reconeixement dels anticossos anti-GAD.

Estudis de la estructura quaternària de la molècula de GAD purificada indiquen que la subunitat bàsica estructural és un dímer ^{123,132}. El domini central de GAD65 i GAD67 és el responsable de la formació de homodímers ¹³³ mentre que la formació de heterodímers s'ha associat al domini NH₂-terminal de la molècula de GAD65 ¹³⁴ constituint aquests darrers el 28% de l'activitat total de GAD a les membranes cerebrals ¹³⁵.

Ambdues molècules són sintetitzades al citosol com a molècules hidròfiles i solubles ¹³⁶. GAD65 pateix tota una sèrie de modificacions post-translacionals al seu extrem NH₂-terminal que la converteixen en una molècula hidrofòbica que s'ancora reversiblement a la membrana de les microvesícules de tipus sinàptic de la cèl·lula β i a les vesícules sinàptiques de les neurones ^{124,137}. Tot i així també s'ha detectat un pool de GAD65 al complex de Golgi de les neurones, la cèl·lula β i les cèl·lules CHO i COS7 transfectades ^{138,139}. La regió NH₂-terminal de GAD65 és necessària per a la unió de la molècula a les membranes i conté dues modificacions hidrofòbiques, una de les quals inclou la palmitoilació de les cisteïnes 30 i 45 ¹³⁷ (Fig 3). La molècula de GAD65 també pateix fosforilació de les serines 3, 6, 10 i 13 ¹⁴⁰. Tot i que aquestes dues modificacions diferencien la forma de la molècula associada a membrana de la soluble cap de les dues es necessita per l'ancoratge a membrana de GAD65 a les cèl·lules COS7 ^{140,141}. La molècula de GAD67 té una localització cel·lular semblant i a la vegada diferent a la de GAD65. A la cèl·lula β de rata així com als fibroblasts de rata transfectats, GAD67 es troba distribuït homogèniament per tot el citoplasma i és detectat només a les fraccions solubles ^{136,138}. A les neurones, GAD67 ha sigut detectat majoritàriament als cossos cel·lulars i a les dendrites proximals però també als terminals nerviosos i al complex de

Golgi^{134,142}. A més a més, una fracció de GAD67 es troba associada a les fraccions de membrana del cervell de rata on es distribueix a la fase detergent de TRITÓ X-114¹³⁴. Donat que la molècula de GAD67 només s'ha detectat en illots de rata i en fibroblasts transfectats amb la molècula de rata en forma soluble, s'ha suggerit que la seva associació a membranes podria ser deguda a la formació d'heterodímers amb GAD65^{134,135}.

GAD65 i GAD67 tenen nivells d'expressió diferents a les diferents regions del cervell així com diferents nivells de saturació amb el co-enzim PLP¹³². A més a més, els ratolins GAD65^{-/-} i GAD67^{-/-} tenen diferents fenotips. La deficiència en GAD67 (molècula que produeix més del 90% del GABA del cervell) provoca la mort neonatal dels animals^{143,144} mentre que els ratolins GAD65^{-/-} són viables i tenen nivells normals de GABA al cervell però pateixen atacs espontanis i tenen problemes en la regulació de la neurotransmissió inhibidòria com a resposta a diversos estímuls^{145, 147}.

GAD65 és una de les principals dianes de la resposta humoral immune dirigida contra les cèl·lules β pancreàtiques en la T1D¹¹⁴, contra les neurones GABA-èrgiques en el síndrome de Stiff man, una malaltia neurològica poc comú que es caracteritza per l'existència de espasmes dolorosos i una progressiva rigidesa simètrica dels múscles proximal i axial¹⁴⁸, i una forma de síndrome poliendocrí autoimmune de tipus II (APS-II) on diverses endocrinopaties autoimmunes (principalment malalties autoimmunes del tiroides, gastritis, la malaltia d'Addison i la T1D) coincideixen en diverses combinacions¹⁴⁹. Tot i que els aacs són predominantment específics contra GAD65, també s'han pogut detectar aacs que tenen cross-reactivitat amb la molècula de GAD67 així com autoanticossos que són específics contra GAD67¹⁵⁰.

La identificació de la molècula de GAD com a un dels autoantígens diana en la T1D data de l'any 1982 en un treball on un antigen de 64,000 Mr va ser immunoprecipitat a partir d'una mostra de plòts humans tot i utilitzant sèrums de nens diabètics neodiagnosticats ¹⁵¹. Posteriors caracteritzacions bioquímiques de la proteïna de 64 kDa així com estudis de altres malalties autoimmunes van portar a la identificació d'aquesta com la isoforma petita de GAD, la molècula de GAD65 ¹¹⁴. Nombrosos treballs han estudiat la freqüència dels aacs contra la molècula de GAD en pacients neodiagnosticats de T1D en diferents poblacions. En aquest grup els Aacs es detecten en un 50-80% dels individus a diferència d'un valor aproximat del 2% detectat en la població general ^{152, 154}. A part de les diferències degudes al mètode de detecció, existeixen factors addicionals com l'edat i el tipus de HLA que contribueixen a aquest ampli rang de positivitat. Tot i existir resultats contradictoris, en general els aacs contra GAD augmenten amb l'edat i la seva freqüència és més elevada en individus de tipus HLA-DR3 ^{152,155, 159}. Els aacs antiGAD tenen la tendència a persistir al sèrum dels pacients durant anys després del diagnòstic de la malaltia ¹⁶⁰, característica que els diferencia de la resta d'aacs detectats en individus afectes de T1D. Molts treballs han analitzat el valor predictiu en la progressió dels individus a la T1D dels aacs antiGAD per si sols però també en combinació amb altres aacs antiillot. La presència d'aacs antiGAD augmenta el risc a desenvolupar T1D en els individus ICA positius, amb l'excepció de aquells individus que tenen un patró d'immunofluorescència selectiu de cèl·lula β ¹⁶¹. Cal dir però que en individus amb títols d'ICA ≥ 80 JDFU la presència addicional d'aacs antiGAD no millora el valor predictiu d'aquests ¹⁶².

La mesura dels acs antiGAD és també útil en la predicció del requeriment d'insulina per part d'individus afectes de la anomenada diabetis autoimmune latent dels adults (LADA), una forma especial de T1D que es desenvolupa a partir dels 30 anys caracteritzada per una lenta progressió autoimmune els individus afectes de la qual són sovint diagnosticats inicialment com a diabètics tipus II ^{163, 165}. Dades de l'estudi UKPDS mostren com el 10% dels individus afectes de diabetis tipus II+ tenen GAD65 aacs ¹⁶⁵ mentre que altres autors troben valors de fins a un 20 % de positivitat ^{166,167}. El 52% dels individus GAD Aacs positius de l'estudi UKPDS van necessitar tractament amb insulina després de 6 anys ¹⁶⁵.

Les dones amb diabetis gestacional són un altre grup d'interès on s'han mesurat els GAD aacs. Els resultats obtinguts són altament variables ja que la positivitat per a aquests autoanticossos va del 0% en un grup procedent del nord d'Itàlia ¹⁶⁸ fins al 10% detectat en un estudi multicèntric alemany ¹⁶⁹ passant pel 2.2% d'un estudi danès ¹⁷⁰ i el 6% obtingut en un estudi nord americà ¹⁷¹. Aquest estudi alemany demostra com la mesura dels aacs conyeta GAD juntament amb la dels altres aacs contra l'islet pancreàtic és una eina molt valuosa per tal de detectar els individus d'aquest grup que posteriorment desenvoluparan la T1D ja que es va trobar una correlació positiva entre el nombre d'aacs contra diferents antígens detectat i el desenvolupament de la T1D.

1.2.1.2 IA2 (ICA512) i IA2 β (phogrin)

L'antigen 2 de l'insulinoma tipus proteïna tirosina fosfatassa (PTP) IA2 també anomenat ICA512 (autoantigen de l'ílot 512), PTPN i PTP35 és una proteïna intrínseca de membrana de 979 aminoàcids localitzada als grànuls secretors de teixit neuroendocrins que inclouen regions del cervell, pituïtària i el pàncrees endocrí ¹⁷². L'expressió d'IA2 ha sigut detectada en tumors neuroendocrins, fet que l'assenyalava com un possible marcador per diferenciar les cèl·lules tumorals neuroendocrines de les no neuroendocrines ¹⁷³. De tota manera també s'ha pogut detectar l'expressió d'aquesta proteïna a cèl·lules de carcinoma de colon ¹⁷⁴, carcinoma de fetge ¹⁷³ i de pulmó, fet que podria implicar IA2 no només en la biogènesis i funció dels grànuls de secreció neuroendocrins sinó també en la regulació de la diferenciació i proliferació cel·lular. Un treball publicat al 2009 per Takeyama i col·laboradors mostra la generació de dos acs monoclonals nous contra la molècula d'IA2 gràcies als quals demostren la presència d'aquesta molècula per tècniques de Western blot i immunohistoquímica a cervell, cerebel, medul·la oblongata, pàncrees, glàndula adrenal i pituïtària, capes musculars de l'estomac, intestí prim, colon ¹⁷⁵.

El gen humà de IA2 es troba localitzat al cromosoma 2q35-36 ¹⁷⁶¹⁷⁷ i té una extensió aproximada de 20 kb formada per 23 exons ¹⁷⁸. Els exons 1-12 codifiquen pel domini extracel·lular, l'exó 13 pel domini transmembrana i els exons 14 a 23 pel domini intracel·lular. La seva seqüència d'aminoàcids codifica per una pro-proteïna d'uns 110 kDa que es converteix mitjançant diferents modificacions post-translacionals en una proteïna de 130 kDa. El tall d'aquesta pro-proteïna en una seqüència consensus per una convertassa tipus

furina genera una proteïna final d'aproximadament 65 kDa ¹⁷² amb unes regions luminal, transmembrana i citoplasmàtica-intracel·lular de 576, 24 i 379 aminoàcids, respectivament ¹¹⁶ (Fig 4). El domini citoplasmàtic de la proteïna es caracteritza per l'existència d'una regió de jxtamembrana (JM) d'uns 100 aminoàcids així com d'un únic domini tipus PTP d'uns 300 aminoàcids aproximadament ^{116,117,179}.

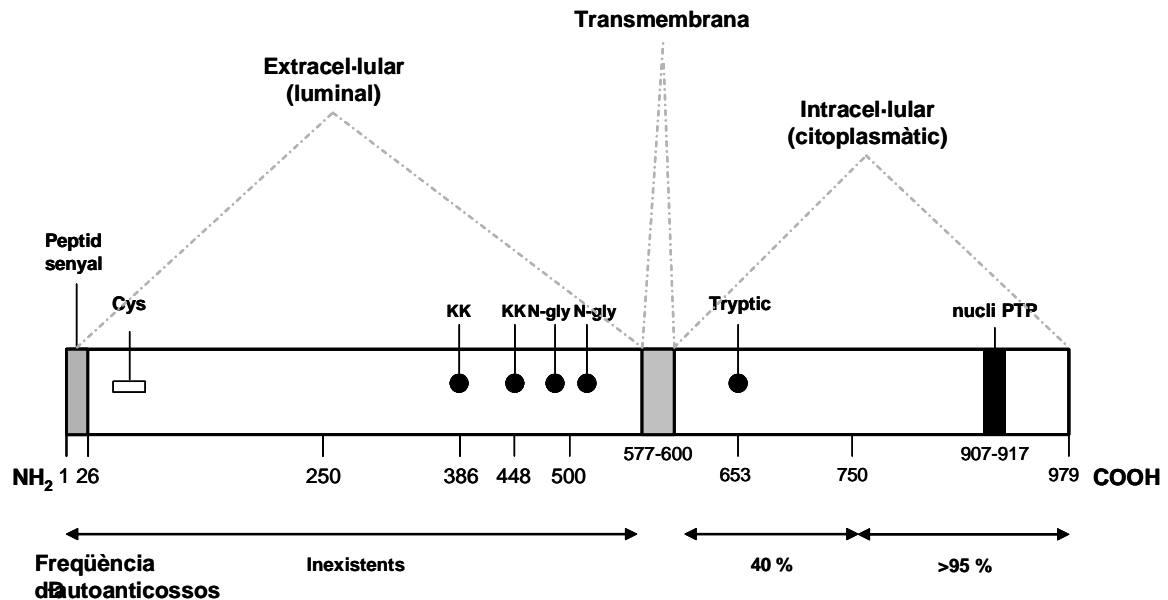


Figura 4. Representació esquemàtica de la proteïna IA2. Les regions senyalades inclouen regions riques en cysteïnes (CYS); regions de pèssió d'aminoàcids dibàsics (KK); regions de N-glicosilació (N-gly); la regió trípica de trencament (tryptic); i la seqüència del nucli PTP. En la figura també s'indica la freqüència d'autoanticossos detectada en individus neodiagnosticats de T1D a les diferents regions de la molècula d'IA2.

S'han trobat homòlegs de IA2 a vaca, rata, ratolí, macaca, zebrafish, *Drosophila* i *Caenorhabditis elegans* amb un grau d'identitat amb la proteïna humana de 99, 98, 97, 73, 82, 58 i 46% respectivament ¹⁸⁰.

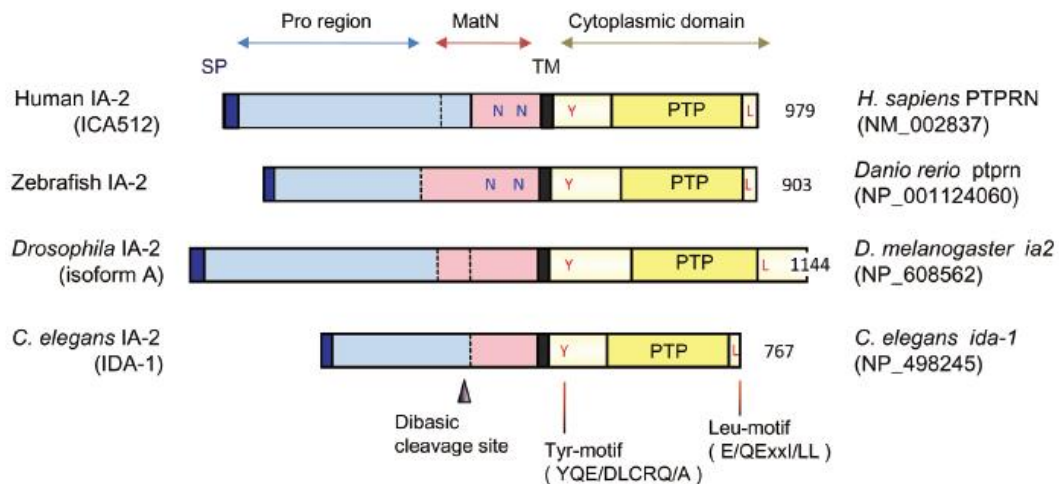


Figura 5. Dominis estructurals de les proteïnes de la família dIA2. Representació esquemàtica dels dominis estructurals de les proteïnes de la família dIA2. SP, pèptid senyal; TM, regió transmembrana; PTP, regió homòloga a la proteïna tirosina fosfatassa; N, regió potencial de N-glicosilació; Y, senyal de tràfic basat en tirosina; L, senyal de tràfic basat en leucina. La línia puntejada indica regions de scissió de aminoàcids dibàsics.

(*Endocrine Journal* 2009;56(5): 639-648)

La funció de IA2 és desconeguda. Estudis basats en l'anàlisi de la seva seqüència situen aquesta proteïna dins un subgrup de la família de les proteïnes PTP transmembrana. Tot i tenir un domini PTP-like, no s'ha detectat activitat enzimàtica amb els substrats utilitzats per aquests tipus d'enzims. Sembla que la substitució de dos aminoàcids en la molècula de IA2

(Ala911 Asp i Asp 877 Ala) en llocs altament crítics per a l'activitat enzimàtica en aquest tipus de proteïnes podrien ser la causa de aquesta manca d'activitat fosfatàsica ¹⁸¹. Degut a tot això inicialment s'havia hipotetitzat que IA2 o bé tenia un substrat molt específic o bé era una molècula inactiva com a fosfatassa i la seva regió PTP actuaria com a un domini de reconeixement de tirosina fosfatassa o bé com a inhibidor competitiu d'altres PTPs. Per altra banda, un estudi cristal·logràfic publicat al gener de l'any 2007, demostra la presència del loop WDP a sobre de la zona activa del domini PTP de la molècula d'IA2, factor que explicaria la manca d'activitat enzimàtica de la molècula nativa ¹⁸². Donat que la fosforil·lació de tirosines pot regular diferents processos com el creixement i la diferenciació cel·lular, l'exocitosi, etc., diversos grups han adaptat diferents estratègies per tal de poder determinar la funció de la molècula d'IA2. L'anàlisi per tècniques d'immunohistoquímica de l'expressió d'IA2 durant el desenvolupament fetal del pàncrees de rata va detectar la presència de aquesta molècula només en les estructures tipus illot positives per insulina i glucagó i negatives per PDX1 en el dotzè dia de gestació ¹⁸³. Un altre estudi va detectar un increment de la reactivitat per IA2 en els illots de rates neonatals des de nivells molt baixos en el dia 1 de vida fins a nivells moderats en el dia 10. Aquests nivells augmenten considerablement en els illots de rates adultes on s'observa una expressió heterogènia en tots els tipus cel·lulars de l'illot. L'augment progressiu de l'expressió de la molècula d'IA2 des del naixement s'esdevé en paral·lel amb la maduració de la resposta secretora d'insulina als secretagogs, fet que donaria consistència a la hipòtesi d'una funció de IA2 en la secreció regulada de l'hormona ¹⁸³. En aquest sentit, un altre estudi que forma part de aquesta tesi demostra un increment del contingut

IA2 de l'illot en els primers 10 dies de vida, moment en que la secreció d'insulina en resposta a la glucosa augmenta fins al nivell detectat en les rates adultes. Es demostra també una regulació d'IA2 a nivell de RNA missatger per part de la glucosa i una concentració elevada d'AMPc així com un efecte de la insulina sobre els nivells proteics d'IA2 mitjançant la estimulació de la biosíntesi de la proteïna ¹⁸⁴. L'anàlisi dels resultats obtinguts per sistemes de doble-híbrid confirmats posteriorment mitjançant experiments de pull-down van demostrar la interacció d'IA2 amb diferents tipus de molècules amb funcions molt diverses com són proteïnes del citoesquelet (β 2-sintrofina ¹⁸⁵ i β IV-spectrina ¹⁸⁶), diverses fosfatases (PTP α , PTP ρ , PTP σ , PTP ϵ , PTP μ ^{187,188}), nNOS ¹⁸⁵, CypA (proteïna implicada en processos de plegament i trànsit), SNX19 (membre de la família de les nexines), MADD (mitogen-activated protein kinase-activating death domain, proteïna implicada en la via de les MAP quinasses així com en l'intercanvi de Rab) i la seva isoforma IG20 (implicada en processos d'apoptosi i intercanvi de Rab3) ¹⁸⁷. L'estudi de l'interacció d'IA2 amb alguna de aquestes molècules ha involucrat directament IA2 en la regulació de l'exocitosi dels grànuls de secreció. Així, IA2 uneix els grànuls de secreció al citoesquelet via la unió al domini PDZ (domini proteic anomenat PSD-95, Disc large i Zo-1) de la β 2-sintrofina ¹⁸⁵ i, a conseqüència de la estimulació de la secreció de la insulina, IA2 s'allibera a través d'un tall en el seu domini citoplasmàtic, de manera que s'afavoreix la mobilització dels grànuls de secreció cap a la superfície cel·lular ¹⁸⁹. Un dels possibles mecanismes es descriu en un estudi publicat al setembre de l'any 2008 on es demostra com aquest fragment de IA2 pot dimeritzar amb la molècula d'IA2 sencera present als grànuls, desplaçant així la seva unió amb la sintrofina i provocant un augment de la

movilitat dels grànuls i de la secreció d'insulina ¹⁹⁰. El fragment de la proteïna alliberat a citoplasma a nivell de membrana també pot translocar-se a nucli on a través de la unió a STAT5 evita la seva defosforil·lació provocant un augment de la transcripció del gen de la insulina així com de diferents gens dels grànuls de secreció, incloent la seva pròpia ^{191,192}.

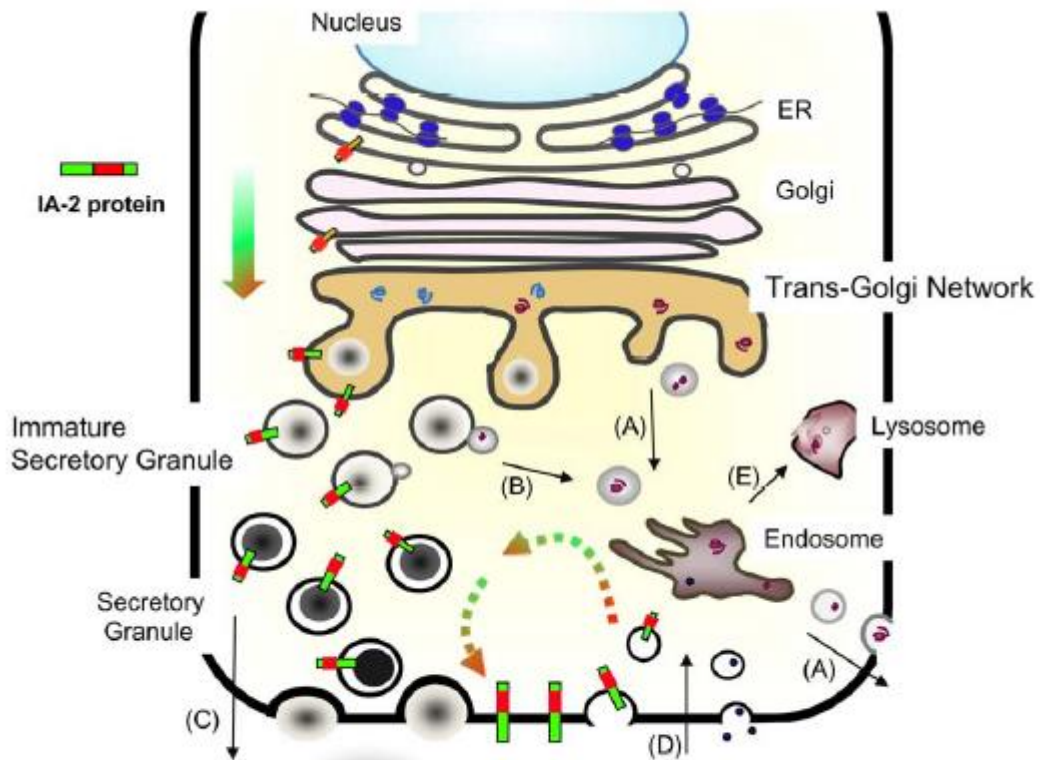


Figura 6. Sortint i transport dels grànuls de secreció en la cèl·lula neuroendocrina.

Esquema il·lustratiu del procés de sortint de les proteïnes secretores així com de la via de tràfic d'IA2. Les vies biosintètiques i endocítiques estan indicades amb fletxes. A, secreció constitutiva; B, via tipus constitutiva; C, secreció regulada; D, endocitosi; E, via lisosomal.

(*Endocrine Journal* 2009;56(5): 639-648)

Altres dades que relacionen la molècula d'IA2 amb els processos de pèrduda de funció de les cèl·lules β són les obtingudes gràcies als ratolins deficientes per la molècula on s'ha observat que la disrupció específica del gen d'IA2 provoca alteracions en els tests de tolerància a la glucosa així com en la secreció d'insulina ¹⁹³. En aquest sentit, i per tal de veure si els resultats observats en aquests animals eren deguts a un efecte específic de la pèrdua de funció d'IA2 a la cèl·lula β, es van realitzar estudis en cèl·lules MIN6 tot i genominvant IA2 mitjançant RNAs d'interferència ¹⁹⁴. Els resultats d'aquest estudi mostren una pèrdua gairebé total de la secreció de la insulina induïda per glucosa així com una disminució del 50% en la secreció basal de la insulina. Aquests mateixos autors van fer estudis de sobreexpressió d'IA2 tot i detectant un augment en la secreció d'insulina induïda per glucosa i K⁺ així com un augment en el nombre de vesícules secretores en el contingut d'insulina de les cèl·lules degut a un augment de la vida mitja de la proteïna. A més a més, un estudi publicat l'any 2008 demostra com la disrupció específica a budell d'*ia2*, l'homòleg d'IA2 en *Drosophila*, provoca defectes en el seu desenvolupament, fenotip que es recupera mitjançant la sobreexpressió d'hexoquinassa ¹⁹⁵. El mateix estudi demostra com *ia2* modula l'expressió tant d'insulina com d'hexoquinassa. Donat que el pàncrees es desenvolupa a partir del budell i que aquests autors demostren com *ia2* s'expressa a la regió del budell i al sistema nerviós central amb un patró d'expressió neuronal molt semblant al d'IA2 detectat en mamífers, els seus resultats suggeririen un possible paper d'IA2 en la regulació de la insulina i l'hexoquinassa. En un altre estudi publicat l'any 2009 on es tracten ratolins IA2 -/- amb streptozotocina s'observa com aquests ratolins pateixen un augment elevat de la glucosa en sang així com una disminució en

la concentració d'insulina present al pàncrees. Estudis de microscòpia electrònica en aquests ratolins demostren una ultraestructura anormal de la cèl·lula beta, on s'observa una disminució del nombre de vesícules que contenen insulina així com una dilatació del reticle endoplasmàtic i del complex de Golgi. Tots aquests resultats suggereixen una possible funció de IA2 no només en els processos de secreció sinó també en els mecanismes involucrats en la producció d'insulina ¹⁹⁶.

Per altra banda, la sobreexpressió de IA2 també s'ha relacionat amb els processos d'apoptosis. Un estudi demostra com la sobreexpressió de la proteïna a través de la interacció amb SNX19 en cèl·lules MIN6 les condueix a un estat preapoptòtic i que la posterior exposició d'aquestes cèl·lules a alta glucosa provoca una aturada de la fase G2/M desencadenant així el procés apoptòtic ¹⁹⁷.

Finalment, estudis realitzats en ratolins en els quals es deleccionaven les molècules de IA2 i de IA2 β ¹⁹⁸ o bé en ratolins μ ull+ per IA2/IA2 β ¹⁹⁹ demostren una implicació de ambdues molècules en els processos de ritmes circadians així com en el comportament i processos d'aprenentatge d'aquests animals, respectivament.

La molècula de IA2 té un homòleg anomenat IA2 (phogrin, PTP-NP, ICAAR o IAR) ¹¹⁹ el gen de la qual es troba localitzat al cromosoma 7q36 en humans ²⁰⁰ amb una extensió aproximada de 1000 kb formada per 23 exons ²⁰¹. Ambdues molècules tenen un 74% d'homologia en la seqüència d'aminoàcids de la seva part citoplasmàtica, mentre que aquesta disminueix fins a un 26% en la regió de les proteïnes localitzada al lumen dels grànuls de secreció ^{118,119} (Fig 5).

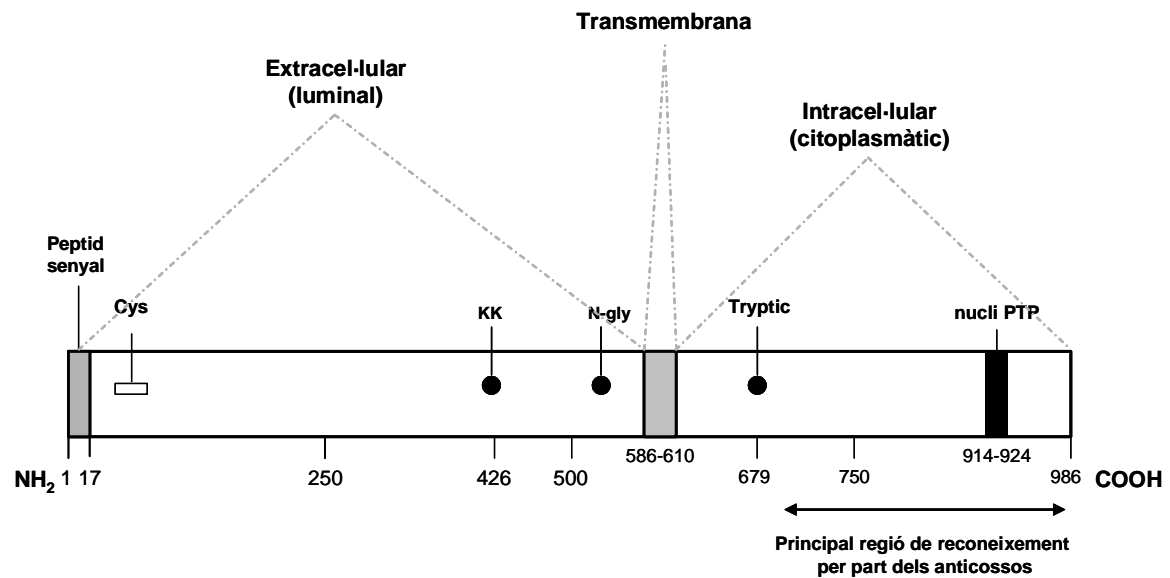


Figura 7. Representació esquemàtica de la proteïna IA2 β . Les regions senyalades inclouen regions riques en cisteïnes (CYS); regions de cisissió d'aminoàcids dibàsics (KK); regions de N-glicosilació (N-gly); la regió trípica de trencament (tryptic); i la seqüència del nucli PTP. En la figura també s'indica la principal regió de reconeixement per part dels anticossos detectats en individus neodiagnosticats de T1D.

Al igual que IA2, la molècula d'IA2 es localitza als grànuls de secreció de les cèl·lules i d'altres cèl·lules neuroendocrines²⁰². L'IA2 és enzimàticament inactiva amb els substrats habitualment utilitzats per valorar l'activitat de les proteïnes tirosina fosfatases fet que podria ser degut a la substitució del mateix àcid aspàrtic que en el cas de la molècula d'IA2 en el seu domini catalític.

La funció d'IA2 és desconeguda tot i els diferents treballs realitzats fins a l'actualitat. L'estudi dels ratolins genoanul·lats per a aquesta molècula demostra que IA2 està implicada, al igual que IA2, en la secreció d'insulina ja que la disrupció específica del gen provoca alteracions en els tests de

tolerància a la glucosa així com en la secreció d'insulina²⁰¹. Aquests resultats indicarien que ambdues molècules tenen funcions similars però que actuen de manera independent, hipòtesi que es veuria reforçada, si més no en part, pel fet que en cap dels dos genoanul·lats es detecten canvis significatius en l'expressió del RNA missatger de l'altra molècula^{193,201}. Una altra possibilitat seria que IA2 i IA2 actuessin de manera complementària. Per tal de estudiar aquesta hipòtesi els mateixos autors van generar el doble genoanul·lat on van observar una intolerància a la glucosa més severa que no pas la detectada en els genoanul·lats individuals així com una total absència de la primera fase de la secreció de la insulina induïda per la glucosa. De tota manera aquests animals mostren un creixement normal i cap evidència de resistència a la insulina²⁰³. L'única diferència clara entre el doble genoanul·lat i el senzill és la infertilitat de les femelles en el primer cas degut a la funció de ambdues molècules en la secreció de l'hormona luteïnizant²⁰⁴. Un estudi recent dona suport a la hipòtesi de la implicació de la molècula d'IA2 β en els processos de secreció d'insulina. En aquest treball es demostra com la seva activitat fosfatidilinositol fosfatasa regula el contingut de fosfatidilinositols de la membrana plasmàtica de les vesícules de secreció, factor implicat en els processos de secreció d'insulina²⁰⁵. Per altra banda, un treball publicat on s'estudia la funció d'IA2 a cèl·lula β mitjançant knockdowns tot i utilitzant un shRNA específic per la molècula, demostra la implicació d'aquesta en el creixement cel·lular via la estabilització d'IRS2 mitjançant la interacció molecular d'IA2 amb el receptor de la insulina²⁰⁶. Així mateix, aquests autors suggereixen la implicació tant d'IA2 com d'IA2 en l'acció autocrina de la insulina en la cèl·lula .

La identificació d'ambdues molècules com a antígens de la T1D es va publicar en un treball realitzat per Christie i col·laboradors ²⁰⁷ on es va demostrar la heterogeneïtat de l'antigen de 64 kDa prèviament detectat mitjançant la immunoprecipitació a partir d'una mostra d'illots humans tot i utilitzant sèrums de nens diabètics neodiagnosticats ¹⁵¹. En aquest estudi, ambdues proteïnes van ser detectades com a fragments tríptics (40 kDa i 37 kDa) dels autoantígens de 64kDa obtinguts per immunoprecipitació amb anticossos presents al sèrum de pacients prediabètics i neodiagnosticats de T1D. Per altra banda, la tripsinització de la molècula de GAD donava un fragment de 50 kDa, el mateix fragment obtingut per aquests autors en la precipitació i posterior tripsinització dels illots humans amb sèrums de pacients no diabètics amb una fallida multiorgànica. El mateix estudi va revelar un valor predictiu per la diabetis molt més elevat pels aacs contra el fragment de 37-38 kDa que no pas obtingut amb els acs anti-GAD. Així doncs, semblava que hi haguessin dos autoantígens de 64 kDa diferents en els illots humans, un era la molècula de GAD i dues altres molècules que després de la tripsinització donaven un fragment de 40-37 kDa. El fragment de 40 kDa es va relacionar amb la proteïna tirosina fosfatasa IA2 ²⁰⁸. Rabin i col·laboradors van aïllar una molècula que van anomenar ICA512bdc a partir de l'ecrinatge d'una biblioteca d'expressió d'illots amb sèrums d'individus afectes de T1D ¹¹⁵. Aquesta molècula també ha estat anomenada IA2. De tota manera, la seqüència de la molècula ICA512bdc dipositada al GeneBank representa una proteïna de 525 aminoàcids, una versió truncada d'IA2 a la qual li manquen 388 i 65 aminoàcids als extrems NH₂ i COOH-terminal, respectivament ¹¹⁷. El fragment de 37 kDa es va relacionar amb una proteïna amb un alt grau d'homologia a la molècula d'IA2 en la regió

tirosina fosfatasa que va ser anomenada IA2 β per Notkins i col·laboradors ¹¹⁹ mentre que el grup del Dr. Hutton la va anomenar phogrin ¹¹⁸.

Nombrosos treballs han estudiat la freqüència dels aacs contra les molècules IA2 i IA2 β en pacients neodiagnosticats de T1D en diferents poblacions. En aquest grup els autoanticossos contra IA2 es detecten en un 50-75% dels individus a diferència d'un valor inferior al 2% detectat en la població general o en pacients afectes de diabetis mellitus tipus II ^{164,209, 211}. Per altra banda, la presència d'aquests aacs en individus ICA positius incrementa el seu risc per desenvolupar la T1D ^{149,162,212}. La prevalença dels aacs contra IA2 en individus afectes de T1D està influenciada per l'edat i el genotip HLA, de manera que és més elevada en grups d'edat jove així com en pacients amb HLA DR4 i haplotip HLA DQA1*0301-DQB1*0302 ^{152,157,213}. La presència d'aquests aacs també es relaciona amb una progressió més ràpida pel desenvolupament de la malaltia en familiars de primer grau de nens afectes de T1D ^{149,214}. En aquest sentit, un estudi realitzat a Bèlgica mostra com germans no diabètics amb múltiples aacs contra IA2, incloent IA2 aac, tenen un risc del 50% per desenvolupar diabetis en un període igual o inferior a 5 anys mentre que el risc en aquells individus que són negatius pels IA2 aac és del 15% ²¹⁵. Tot i el seu alt valor predictiu en el ràpid desenvolupament de la T1D, els IA2 aac apareixen normalment com els darrers o un dels darrers aac en la fase preclínica de la malaltia ¹⁴⁹. El seu alt valor predictiu, malgrat la seva baixa sensibilitat, implica que la mesura d'aquests aacs en els programes de rastreig identificarien només un petit grup d'individus amb alt risc però exclourien la majoria dels individus de risc.

La regió antigènica més important de la molècula dIA2 es troba en el seu domini intracel·lular (Fig 4). Estudis amb mutants que contenen diverses delecions mostren com el 95% dels sèrums d'individus afectes de T1D que immunoprecipiten la molècula dIA2 *full length* ho fan reaccionant amb la regió COOH-terminal (residus 771-979) i el 40% ho fan contra la regió NH₂-terminal (residus 604-776) del domini intracel·lular ²¹⁶. La reactivitat d'aquests aacs contra la molècula dIA2, excepte en el cas dels dos epítops lineals situats a la regió de JM ²¹⁷, és altament depenent de la presència dels ponts disulfur existents en el seu domini intracel·lular, fet que suggereix que els epítops contra els quals reaccionen són conformacionalment dependents ²¹⁸. Aquests resultats també indicarien que els mètodes per mesurar aquests aacs que preserven la conformació antigènica seran molt més efectius que no pas aquells en que aquesta es veu alterada. De fet, el mètode més eficaç utilitzat fins a l'actualitat per mesurar els IA2 aacs és la immunoprecipitació de la molècula recombinant marcada radioactivament preparada mitjançant un sistema de transcripció i traducció *in vitro*. El marcatge radioactiu de l'immunoprecipitat es mesura directament per tal de poder quantificar el nivell d'aacs però també es pot fer córrer l'immunoprecipitat en un gel SDS-PAGE per tal de detectar la banda de 106 kDa ^{118,219}.

Per la seva banda, la prevalença dels aacs contra IA2 β en individus afectes de T1D és del 35-50% i d'entre ells, més del 95% són també positius per IA2 fet que s'explica, en part, pel reconeixement d'epítops compartits per ambdues molècules. És per aquesta raó que no es mesuren ambdós aacs en els programes de cribatge ja que aquesta dada no dona cap informació addicional respecte al cribatge individual dels aacs contra IA2 ^{220,221}.

1.2.1.3 Glicolípidis com a autoantígens

La idea que els acs dirigits contra els glicolípidis de l'illot podien formar part dels ICA prové de estudis on s'avaluava la reactivitat d'acs monoclonals (A2B5, 3G5, R2D6 i la toxina tetànica) contra gangliòsids neuronals així com contra proteïnes de l'illot^{222,223}. Les tres molècules *target* candidates són GT3²²⁴, les sulphatides+ (Buschard93 abstract) i el gangliòsid GM2-1 (monosialo-gangliòsid). Tot i que els estudis en forma de resums sobre la detecció d'anticossos contra les dues primeres molècules en debuts de T1D demostren una alta freqüència d'aquests, els treballs més complets han estat realitzats amb el gangliòsid GM2-1. Estudis cromatogràfics van detectar la presència dels gangliòsids GM3, GD3, GD1a i GM2-1 en pàncreas humà (Dotta89 abstract). Per altra banda, els illots de rata amb baix metabolisme tenen una expressió reduïda de diverses molècules com la insulina, la carboxipeptidasa H i de glicolípidis com la GM2-1 mentre que no afecten l'expressió de GD3 i GM3²²⁵. Aquesta darrera observació concorda amb el fet que l'absència d'expressió de GM2-1 en els illots fa que aquests no tinguin reactivitat contra els ICAs (Appel89 abstract), suggerint així que GM2-1 podria ser un dels autoantígens diana d'aquests anticossos. A més a més, aquest gangliòsid s'ha localitzat a totes les cèl·lules de l'illot i a la cèl·lula s'expressa majoritàriament als grànuls de secreció (Dionisi94 abstract) al igual que altres autoantígens de la T1D (insulina, carboxipeptidassa H, ...). Els anticossos contra la molècula de GM2-1 van ser detectats en el 71% dels debuts de T1D així com en el 64% de familiars ICA+ en els quals la detecció d'aquests anticossos estava significativament associada al desenvolupament de diabetis en un període inferior als 5 anys²²⁶. De tota manera, un estudi realitzat en 50 pacients afectes de T1D i 30 individus

control afectats per altres tipus de malalties autoimmunes determina que la presència de anticòs anti-gangliòsids en els pacients afectes de T1D és el resultat d'una hiperactivació immune característica de moltes malalties autoimmunes i que la tendència a un augment en la presència d'aquests anticòs en els individus diabètics respecte els pacients afectes d'altres malalties autoimmunes reflecteix un patró comú d'antígens entre els nervis perifèrics i les cèl·lules de l'illot pancreàtic ²²⁷.

1.2.1.4 Insulina

La insulina madura és una proteïna globular de 5.8 kDa formada per dues cadenes, A (21 aminoàcids) i B (30 aminoàcids) que formen un heterodímer, processat a partir d'un precursor de cadena única de 110 aminoàcids. La insulina es sintetitza com a pre-prohormona que és processada a proinsulina, a la qual s'elimina el pèptid connector (pèptid C) convertint-la així en la insulina madura (Fig 6). Aquest procés es porta a terme als grànuls secretors de la cèl·lula β , on la insulina s'empaqueta en forma de cristall ²²⁸. La estructura de la molècula d'insulina està altament conservada i la seva homologia entre diferents espècies és considerable. Un exemple d'això és el fet que la posició dels ponts disulfur no varia però també cal destacar l'alt grau de conservació de la regió hidrofòbica carboxi-terminal de la cadena B involucrada en la dimerització de la molècula. Tot i així existeixen diverses substitucions aminoacídiques entre espècies que no afecten la bioactivitat de la molècula i que es troben principalment a les posicions A8-10 i B29-30.

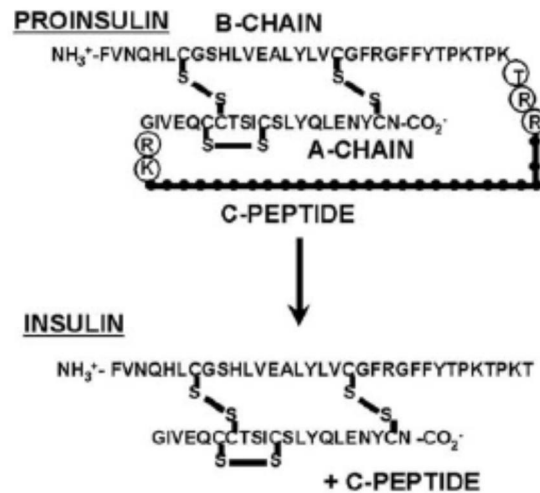


Figura 8. Representació esquemàtica de la conversió de la molècula de pro-insulina a insulina i c-pèptid portada a terme pels enzims tripsina- i carboxipeptidassa-like de les vesícules secretores.

(BioMetals 2005;18: 295-303)

Fins a l'actualitat la insulina i la proinsulina són els únics autoantígens coneguts específics de cèl·lula β dels illots humans ja tots els altres són produïts també pels altres tipus cel·lulars dels illots humans. Tot i així cal dir que tant en ratolins com en humans s'ha detectat el RNA missatger de la insulina i la proinsulina a timus³¹. Per altra banda estudis amb ratolins transgènics utilitzant el promotor de la insulina de rata per promoure l'expressió de diferents gens d'interès indiquen que la transcripció del gen de la insulina a timus és possible²²⁹. Alguns estudis recents senyalen la insulina com la molècula diana causant de la diabetis autoimmune. L'estudi realitzat en humans per Kent i col·laboradors detecta el reconeixement d'un epítip de la insulina (A 1-15) per part de cèl·lules T aïllades i posteriorment expandides a partir dels nòduls

limfàtics pancreàtics d'individus afectes de T1D²³⁰ mentre que Nakayama i els seus col·laboradors demostren que una seqüència de la proinsulina i la insulina és una de les principals dianes inicials de la resposta autoimmune que causa la diabetis en el model de ratolí NOD^{231,232}. Altres treballs però, senyalen la insulina com a l'antigen clau però no essencial en el desenvolupament de la diabetis en aquest mateix model animal²³³.

L'any 1950 es va desenvolupar el primer radioimmunoassaig utilitzant sèrums amb acs antiinsulina provinents d'individus tractats amb insulina bovina²³⁴. Més endavant, l'any 1983 Palmer i col·laboradors²³⁵ van descobrir la presència d'acs antiinsulina en individus neodiagnosticats de T1D abans de l'administració d'insulina exògena. Estudis posteriors van demostrar que aquests acs es troben presents anys abans del debut clínic de la malaltia²³⁶. Els IAA també es detecten en alts nivells en pacients afectes del síndrome de Hirata²³⁷, una malaltia autoimmune poc comú en el qual els individus (gairebé tots amb DRB1*0406) desenvolupen hipoglucèmies acompanyades d'alts títols d'IAA després d'haver estat exposats a medicaments que contenen sulfidrils. La malaltia de Graves, la tiroiditis de Hashimoto, la malaltia d'Addison, l'hepatitis crònica, l'anèmia perniciosa, l'artritis reumatoide i el lupus eritematós sistèmic són altres malalties autoimmunes on es poden detectar aquests aacs²³⁸.

Inicialment es van utilitzar dos tipus d'assaigs per tal de detectar aquests aacs, un ELISA que utilitzava insulina immobilitzada en plaques i un radioimmunoassaig de fase fluïda, no obstant ambdós assaigs donaven resultats molt diferents en relació al valor predictiu de la positivitat d'aquests aacs en el desenvolupament de la T1D. Tot un seguit de tallers internacionals

així com l'intercanvi de les mostres analitzades van demostrar que ambdós assaigs mesuraven dos tipus diferents d'acs i que només aquells acs detectats en el radioimmunoassaig estaven associats amb el risc de desenvolupament de la T1D ¹¹³.

Nombrosos treballs han estudiat la prevalença i el valor predictiu dels IAA per ells mateixos i en combinació amb altres aacs en individus neodiagnosticats de T1D, en familiars de primer grau i en població general (Taula 2). La comparació entre els diferents estudis és difícil degut als diferents assaigs utilitzats, als diferents valors límit per definir la positivitat i les diferents edats dels grups analitzats. La prevalença dels IAA en germans d'individus afectes de T1D varia entre el 1.4 i el 6.9% ²³⁹. Aquesta variació es correlaciona inversament amb l'edat, així, un estudi realitzat en 882 familiars de primer grau va detectar una prevalença del 8.2% en individus menors de 15 anys comparat amb el 3.2% detectat en el grup de majors de 15 anys ²⁴⁰. En la població general la prevalença d'IAA es troba al voltant del 2% (Taula 2). Bingley i col·laboradors van detectar aquest valor en un estudi on es va analitzar un grup de 2855 escolars amb una mitjana d'edat de 11.4 anys ¹¹¹ mentre que un estudi suec realitzat en 415 individus d'edat compreses entre 7 i 14 anys sense història familiar va detectar un valor lleugerament superior del 2.8% ²⁴¹. Aquests i altres estudis realitzats indiquen que la mesura dels IAA té un baix valor predictiu en la població general.

Diversos estudis prospectius realitzats des del naixement han demostrat que els IAA són generalment els primers en aparèixer en nens que posteriorment desenvoluparan T1D ^{242, 244}. Així, la història natural més comú és la aparició dels IAA i posteriorment la dels altres aacs contra l'evolució abans del debut clínic de la

T1D^{242, 246}. Però no tots els nens en els quals es detecten IAA acaben desenvolupant T1D. De fet, els IAA són els acs menys persistents^{242,246,247} i els anticossos transitoris no s'associen amb el desenvolupament de la T1D, una de les raons per les quals els anticossos s'han de mesurar en diferents mostres espaiades en el temps^{246,247}. Els acs antiinsulina transitoris estan més relacionats amb un títol baix d'IAA que no pas amb un d'alt^{246,247} i amb la transferència materna (diversos estudis demostren que els aacs provinents de transferència materna poden ser detectats en els nadons després dels 9 mesos però acostumen a desaparèixer abans dels dos anys de vida i que només són aquells acs de nova producció (detectables per ser d'una subclasse diferent als detectats en el moment del naixement i als 9 mesos) els que s'associarien a un risc superior de desenvolupament de la T1D)^{248,249}. L'estudi alemany BABYDIAB ha demostrat que la afinitat dels IAA és un marcador per identificar els IAA més rellevants en el desenvolupament de la T1D²⁵⁰. Els nens amb IAA amb alta afinitat ($K_d > 10^9$ L/mol) tenen acs que persisteixen en el temps, desenvolupen múltiples acs antiillot, i tenen un risc de desenvolupar T1D abans de 6 anys del 50%. En canvi, els nens amb IAA amb una baixa afinitat no acostumen a desenvolupar altres acs ni la T1D. Els IAA d'alta i baixa afinitat es diferencien pel fet de reconèixer epítops diferents, i al contrari dels IAA de baixa afinitat (que sovint no s'uneixen a la proinsulina) l'epítop associat als IAA d'alta afinitat també es troba a la molècula de proinsulina²⁵⁰.

1.2.1.5 ICA69

Aquesta nova proteïna de l'illot va ser identificada per Pietropaolo i col·laboradors a través de l'ecrinatge d'una biblioteca d'expressió lambda gt11 d'illots humans mitjançant sèrums ICA positius ²⁵¹. La proteïna ICA69 migra amb un pes de 69 kDa en gels SDS tot i així, un cop seqüenciada el seu pes molecular teòric és de 54,6 kDa (així la migració aberrant en gel podria ser deguda a la presència de regions altament carregades a la molècula). L'ICA69 s'expressa, com a mínim a nivell de mRNA, a cervell, fetge, ronyó i cor, i a alts nivells en els illots i altres teixits neuroendocrins. Per altra banda, en rata l'ICA69 és una proteïna específica de cèl·lula β ²⁵² localitzada al complex de Golgi ²⁵³. La seva funció és desconeguda però el genoanul·lat del seu homòleg ric-19 en *Caenorhabditis elegans* desenvolupa un defecte en els processos de neurotransmissió ²⁵⁴.

L'ICA69 és idèntica en seqüència a la proteïna de la llet de vaca p69 descrita per Dosch i col·laboradors ²⁵⁵. Per altra banda, diversos autors han demostrat que els individus diabètics tenen acs dirigits contra l'albumina sèrica bovina (BSA) i altres postulen que la ingestió neonatal de llet de vaca augmenta el risc de desenvolupament de T1D. L'ICA69 i la BSA tenen dues regions de cinc aminoàcids idèntiques i a la regió del pèptid de l'albumina ABBOS quatre dels nou aminoàcids són també idèntics. Aquesta identitat podria ser suficient per estimular la reactivitat creuada entre els clons de cèl·lules T.

Els acs contra l'ICA69 són aacs relacionats amb la T1D però també són detectats en individus afectes d'artritis reumatoide ²⁵⁶. De tota manera caldrien més estudis per tal determinar si existeix una funció d'aquesta molècula en la patogènia de la T1D. Atkinson i col·laboradors qüestionen l'associació de la

T1D amb els acs anti-albúmina i amb la resposta de les cèl·lules T a l'albúmina²⁵⁷ mentre que en un estudi en ratolins s'accelera o inhibeix el desenvolupament de la diabetis tot i utilitzant un pèptid de aquesta molècula²⁵⁸.

1.2.1.6 Carboxipeptidassa H

La carboxipeptidassa H és un altre autoantigen descobert mitjançant l'ecrinatge d'una biblioteca d'expressió d'illots amb sèrums d'individus prediabètics. Aquesta molècula no és específica dels illots ja que la seva expressió s'ha detectat també a ronyó, pituitària i glàndula adrenal²²⁸. A la cèl·lula β es troba localitzada als grànuls de secreció d'insulina en dues formes, la soluble (50 kDa)²⁵⁹ i la unida a membrana (52 kDa)²⁶⁰. La carboxipeptidassa H és un enzim que participa en el procés de formació de proinsulina a insulina i és segurament la proteïna més abundant dels illots després d'aquestes dues. En els assaigs originals en els quals s'utilitzava la reactivitat dels sèrums amb plaques de proteïna d'*Escherichia coli* recombinant, un de cada quatre sèrums d'individus prediabètics analitzats tenien anticossos contra la carboxipeptidassa H¹²⁰.

1.2.1.7 ICA12

SOX13 (ICA12) forma part de la família de factors de transcripció SOX que contenen un motiu amb un grup d'alta mobilitat (HMG) amb similitud estructural a les proteïnes HMG 1 i 2 identificat com a autoantigen en un grup reduït d'individus afectes de T1D^{115,261}. Tot i així, diversos estudis realitzats en pacients afectes de T1D tot i comparant-los amb individus afectes de malalties

autoimmunes no-òrgan específiques conclouen que tot i la existència dels aacs contra IA2 en un subgrup d'individus afectes de T1D aquests aacs formen part d'una resposta menor a autoantígens no específics de IA2 existent en la T1D i que la seva determinació no millora el diagnòstic ni la predicció de la T1D^{262,263}.

1.2.1.8 Transportador de zinc ZnT8(Slc30A8)

ZnT8 forma part de la família de transportadors de zinc identificat per primera vegada l'any 2004²⁶⁴. Aquest transportador conté sis dominis transmembrana i un loop ric en histidines entre els dominis IV i V, al igual que la resta dels membres de la seva família.

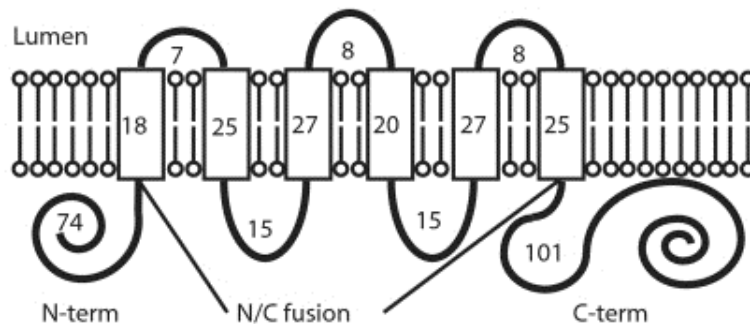


Figura 9. Representació esquemàtica de la molècula del transportador-8 de zinc (ZnT8). Aquesta molècula es situa a la membrana dels grànuls d'insulina i està formada per sis dominis transmembrana. Els nombres indiquen el número d'AAs que formen cada part estructural de la molècula.

(PNAS 2007;104: 17040-17045)

El gen que codifica per a aquesta proteïna es transcriu només a pàncrees i bàsicament en els illots de Langerhans. Estudis de immunofluorescència confocal demostren la colocalització de ZnT8 amb la insulina en la via de secreció de la línia cel·lular INS1E. La sobre expressió de aquesta proteïna en aquestes cèl·lules estimula la acumulació de zinc tot i augmentant la concentració intracel·lular d'aquest metall així com la secreció induïda per glucosa a altes concentracions ²⁶⁵. Un treball publicat l'octubre del 2007 ha identificat ZnT8 com a autoantigen de la T1D ²⁶⁶. Aquest mateix estudi analitza la presència d'acs contra aquesta proteïna en individus neodiagnosticats de T1D tot i detectant-los en un 60-80% respecte a valors inferiors del 2 i 3% detectats en controls i pacients diabètics tipus 2, respectivament. Per altra banda, aquests aacs van ser detectats en un 26% de pacients afectes de T1D prèviament caracteritzats com individus sense aacs en base a les anàlisis realitzades respecte els marcadors utilitzats actualment (IA2, GAD, IAA i ICA). La mesura combinada dels Aacs contra ZnT8, IA2, GAD i IAA augmenta la sensibilitat en el moment del debut de la T1D fins a un 98%, un valor que s'aproxima al necessari per poder detectar la prediabetis en una població control pediàtrica. Un estudi publicat l'any 2009 per Ziegler i col·laboradors demostra com la autoimmunitat dirigida contra la part COOH terminal de la molècula és un factor important en la prognosi de la diabetis tipus I en població pediàtrica, factor de risc que es veu incrementat amb l'anàlisi del gen que codifica per ZnT8, SCL30A8 ²⁶⁷. A més a més, un estudi publicat a l'octubre del 2009 demostra que els anticossos contra ZnT8 són un bon marcador juntament amb els acs contra IA2 i GAD per tal de diferenciar els diferents fenotips clínics en la diabetis d'aparició tardana ²⁶⁸. Més

concretament, un estudi publicat per Kawasaki i col·laboradors demostra com la combinació en la determinació dels acs contra les molècules d'insulina, IA2 i el transportador ZnT8 millora molt la predicció de una futura deficiència insulínica en aquells pacients afectes de diabetis autoimmune adulta respecte la determinació d'acs contra la molècula de GAD i els seus epítops ²⁶⁹.

A més a més, s'ha demostrat la associació entre rs13266634, un dels al·lels majoritaris del *single nucleotide polymorphism* (SNP) d'aquest transportador, amb la diabetis tipus 2 així com amb la secreció reduïda d'insulina en els familiars no diabètics ²⁷⁰. Per altra banda, un estudi publicat al maig del 2008 pel grup de Ziegler i col·laboradors ²⁷¹ que l'existència d'aquest polimorfisme juntament amb la presència d'autoimmunitat podria conferir una susceptibilitat genètica a la disfunció de la cèl·lula beta provocant una acceleració de la progressió i manifestació de la T1D.

Donada la importància d'aquest nou autoantigen i a la seva possible utilització en programes de cribatge un estudi publicat al febrer del 2010 per Eisenbarth i col·laboradors ²⁷² desenvolupa una proteïna quimera entre dos variants polimòrfiques comuns de ZnT8 (arginina i triptòfan en posició 325) i el domini intracitoplasmàtic d'IA2 assaig que permet mesurar en un sol assaig mantenint un 100% de sensibilitat i un 100% d'especificitat respecte els radioassaigs realitzats amb les molècules individuals.

1.2.1.9 Tetraspanina 7

La tetraspanina 7 és una proteïna membre de la superfamília transmembrana 4 formada per 4 dominis hidrofòbics transmembrana (TM1-TM4), múltiples dominis citoplasmàtics (C1-C3) i dos dominis extracel·lulars (E1 i E2). La tetraspanina 7 s'expressa als illots beta pancreàtics i, com en el cas de GAD65 i IA2 també s'expressa al sistema nerviós central. Els aacs contra aquesta proteïna s'han detectat en un 35% dels individus amb TD1 ²⁷³.

1.2.2 Autoantígens parcialment caracteritzats

1.2.2.1 52 kDa

Aquest antigen va ser identificat mitjançant western blot de extractes d'illots humans tot i utilitzant sèrums d'individus diabètics ¹⁵¹. Posteriorment els anticossos contra aquest antigen també s'han detectat en el model de ratolí NOD. La proteïna de 52 kDa sembla ser específica de l'illot pancreàtic i comparteix determinants antigènics amb la proteïna PC2, un component de la càpside del virus de la rubella ²⁷⁴. Aquest fet suggeriria que el virus de la rubella podria sensibilitzar potencialment individus vers una resposta autoimmune contra l'antigen de 52 kDa de l'illot i, de fet, fins al moment, aquest és l'únic virus clarament associat amb el desenvolupament de la T1D.

1.2.2.2 37- 38 kDa

Diversos grups han demostrat la presència d'anticòs contra molècules de 38 kDa en individus afectes de T1D així com en els seus familiars de primer grau. Honeymann i col·laboradors van identificar un dels possibles autoantígens de 38 kDa com a jun-B, un factor de transcripció nuclear ²⁷⁵ però no s'ha pogut aclarir la importància dels anticòs contra aquest antigen en individus prediabètics. També Pak i col·laboradors van descriure una molècula de 38 kDa relacionada amb el virus del citomegalovirus ²⁷⁶ així com Roep et al que van identificar un autoantigen de 38 kDa dels grànuls de l'illot contra el qual reaccionen les cèl·lules T ²⁷⁷.

1.2.2.3 155 kDa

Autoantigen detectat per McEvoy i col·laboradors mitjançant un nou mètode per detectar autoantígens relacionats amb la T1D que consistia en desenvolupar tot un panell d'anticòs monoclonals de ratolí que reaccionaven amb la línia d'insulinoma RIN5F i, tot seguit, intentaven desplaçar aquesta unió mitjançant la utilització de sèrums d'individus diabètics. La unió d'un d'aquests monoclonals, anomenat 1A2, era desplaçada específicament per sèrums de nens afectes de T1D. Aquest monoclonal reconeixia per western blot una proteïna de membrana de 150 kDa que es va anomenar DAP1 (proteïna 1 associada a la diabetis) ²⁷⁸. Tot i la baixa presència d'aquests anticòs en població infantil control (2.9%) respecte nens amb T1D (94%), s'han detectat en més del 60% dels familiars de primer grau anticòs contra aquest antigen.

1.2.2.4 GLIMA 38

GLIMA 38 és una proteïna neuroendocrina de membrana N-glicosilada reconeguda per anticossos en aproximadament el 20% dels individus afectes de T1D ^{279,280}. Un estudi realitzat per Winnock i col·laboradors confirma la associació entre la presència d'acs contra la molècula de glima 38 i el ràpid desenvolupament de la T1D però també demostra la seva baixa capacitat diagnòstica si es compara amb la presència en aquests individus d'acs contra GAD, IA2 o IAA ²⁸¹.

1.2.3 Altres autoantígens

Un treball realitzat per Elias i col·laboradors identifica un pèptid de la heat shock protein (HSP)65 contra el qual reaccionarien uns clons de cèl·lules T que podrien tenir una funció en la patogènia de la diabetis mellitus en el model de ratolí NOD ²⁸². Per altra banda, la administració de cèl·lules T específiques contra HSP65 atenuades per irradiació així com de la proteïna, té un efecte preventiu contra la diabetis en aquest model. Tot i això, sembla que la HSP65 no és un autoantigen que formi part de la autoimmunitat humoral de la T1D en humans ²⁸³.

Un altre possible candidat a autoantigen de la T1D és el GLUT-2, el transportador de glucosa específic de illot ^{284,285}. Tot i que no existeixen proves bioquímiques de la reacció d'acs contra GLUT-2, un parell d'estudis ho suggereixen. Aquests estudis consisteixen en la transfecció del gen del GLUT-2 en línies cel·lulars i posterior detecció d'acs de superfície, i en la inhibició de la unió dels acs de pacients diabètics a una proteïna d'extractes microsomals de fetge de rata mitjançant un sèrum policlonal contra el GLUT-2 de rata ²⁸⁶.

1.3 Característiques de l'Autoimmunitat en la història natural de la T1D. Predicció del risc a desenvolupar la T1D en base als autoanticossos anti-illot.

En la història natural de la T1D la presència d'aacs anti-illot circulants pot precedir durant anys el desenvolupament clínic de la malaltia i per aquesta raó els aacs són marcadors de la prediabetis i s'utilitzen per identificar individus amb alt risc per desenvolupar la T1D ²⁸⁷. El desenvolupament de la T1D s'associa amb alts títols d'ICA, IAA o IA2. Gairebé tota la informació obtinguda fins a l'actualitat és en individus amb una susceptibilitat genètica elevada, com són els familiars d'individus afectes de T1D. La prevalença dels Aacs antiillot en aquest grup és troba al voltant del 5 . 10%, depenent de quin sigui l'ac mesurat ^{215,288. 290}. L'estudi més ampli realitzat en aquest aspecte ha estat part del projecte DPT-1 a Nord Amèrica en el qual s'han mesurat els ICA, IAA, GAD i IA2 d'un total de 17.207 familiars de primer grau ²⁹⁰. Com a mínim un d'aquests aacs va ser detectat en el 8.2% dels individus i més d'un en el 2.3%. En general la magnitud de la resposta autoimmune és un important factor predictiu en el risc de desenvolupar la T1D. Ja fa més de deu anys que el fet de tenir dos o més aacs antiillot s'associa a un risc per desenvolupar T1D molt més elevat ^{162,291}. Mentre el risc per desenvolupar diabetis és inferior al 20% en aquells individus que tenen un ac, aquest augmenta fins al 35% en 5 anys i el 61% en 10 anys en aquells individus que en tenen més d'un ²⁹². Per altra banda, individus sense història familiar de T1D amb més d'un aac tenen també un risc més elevat per desenvolupar la malaltia ^{293,294}. Les dades obtingudes en diversos estudis indiquen que existeix una jerarquia en el risc a desenvolupar la T1D associada als diferents tipus d'aacs. Els individus amb aacs contra IA2

tenen un risc molt més elevat per desenvolupar la malaltia que no pas aquells que són positius per GAD o IAA ^{215,292} i a més a més, dintre aquests, aquells que tenen el risc més elevat són els que també tenen aacs contra IA2 β ²⁹². Tot i això, no tots els individus en els quals es detecten aacs acaben desenvolupant T1D. Per aquesta raó s'ha intentat identificar característiques dels aacs específiques de la malaltia o altres marcadors que puguin ajudar a diferenciar els individus que no desenvoluparan diabetis de aquells que ho faran ràpidament o bé de aquells que ho faran a llarg termini ^{250,292,295,296}. L'amplitud de la resposta per aacs es pot mesurar mitjançant el nombre d'epítops contra els quals estan dirigits i probablement pels diferents tipus de subclasses. Normalment un nombre elevat i variat de subclasses es relaciona amb alts títols d'aacs tot i que aquests dos indicadors de risc per la malaltia també s'han detectat en individus amb un baix títol. En un estudi recent en familiars positius per aacs amb un seguiment de 15 anys el risc per desenvolupar diabetis més elevat es va associar amb alts títols per IAA i IA2 (subclasses IgG2, IgG3 i/o IgG4) així com per IA2 β ²⁹². Tot i utilitzant diverses combinacions d'aquestes característiques es pot classificar el risc per desenvolupar diabetis en 5 anys d'un 10 a un 90%. Pel que fa als epítops, estudis recents han demostrat una aparició progressiva de l'autoimmunitat en el cas dels aacs contra la molècula de GAD65 ¹⁵⁰. La reactivitat dels aacs es dirigeix inicialment contra els epítops de les regions central (residus 235 . 444) i COOH-terminal (residus 440 . 585) de la molècula, indicant així una ràpida progressió de la reactivitat o bé una immunització simultània contra ambdues regions de la molècula de GAD65 ^{150,297}. La reactivitat contra els epítops de la regió NH₂-terminal de la molècula és posterior, més dèbil i poc comú en nens. Pel que fa als aacs contra

la molècula d α A2, la reactivitat inicial és heterogènia contra la regió de jxtamembrana i el domini PTP, però sempre específica contra la molècula d α A2. L'aparició de la reactivitat contra la molècula d α A2 β es produeix juntament amb l'expansió de la resposta contra la molècula d α A2²⁹⁸.

OBJECTIUS

2. Objectius

Diferents estudis han demostrat la presència dels ICA no només en el moment del debut clínic de la malaltia o en pacients afectes de T1D, sinó també en individus que acabaran desenvolupant la malaltia però que no presenten cap tipus de simptomatologia clínica. El descobriment posterior més important pel que fa a l'autoimmunitat en la T1D va ser la presència d'aacs contra la insulina. Fins a l'actualitat s'han trobat una dotzena d'autoantígens que formen part dels ICA però són els aacs contra la GAD¹¹⁴ i IA2^{117,219} els que formen la major part d'aquesta reactivitat. Aquests aacs juntament amb els aacs contra la insulina són els més importants en termes de sensibilitat i especificitat pel que fa a la T1D²⁹⁹.

Diversos estudis han demostrat la presència d'aquests aacs al sèrum d'individus abans del debut de la T1D^{111,292}. La sensibilitat en el moment del debut de la T1D pels ICA és d'un 70-90%, un 70-80% per GAD, 32-75% per IA2 i un 10-60% per IAA, una variabilitat que reflecteix diferències entre les diverses poblacions estudiades³⁰⁰. En termes de prognosi, diversos estudis han validat la utilització d'aquests tres tipus d'aacs com a valor predictiu per al desenvolupament de la T1D. En general la magnitud de la resposta humoral vers els esmentats aacs té valor predictiu sobre el risc de desenvolupar la T1D, i a més a més, el fet de presentar dos o més aacs antiillot s'associa a un risc per desenvolupar T1D molt més elevat que quan només l'autoimmunitat humoral es desenvolupa contra un sol autoantigen^{162,291}. Tot i això, no tots els individus en els quals es detecten aacs acaben desenvolupant T1D. Per aquesta raó s'ha intentat identificar característiques dels aacs específiques de

la malaltia o altres marcadors que puguin ajudar a diferenciar els individus que no desenvoluparan diabetis de aquells que ho faran ràpidament o bé de aquells que ho faran a llarg termini. La amplitud de la resposta per aacs es pot mesurar mitjançant el nombre d'epítops contra els quals estan dirigits i probablement pels diferents tipus de subclasses.

La importància de IA2 com a autoantigen amb alt valor predictiu en la T1D fa pensar en una possible relació causal de aquesta molècula en el desencadenament de la malaltia. La poca informació disponible respecte la funció d'IA2, així com la manca de materials adequats per a la realització d'estudis respecte la seva regulació i funció, ens va portar a desenvolupar l'objectiu I de aquesta tesis :

- Obtenció d'aacs monoclonals vers IA2 així com la seva caracterització.

Un cop obtinguda aquesta important eina de treball vem passar a realitzar l'objectiu II de aquesta tesis que es basa en la utilització de l'aac monoclonal obtingut en estudis de:

- Caracterització funcional i regulació de la molècula IA2.
- Detecció d'aacs en la TD1 epítop específics.

Els acs contra IA2 així com els acs dirigits contra GAD65 són els més importants en quant al seu valor predictiu. Aquest fet ens va portar a l'objectiu

III de aquesta tesis:

- Investigar la resposta humoral específica que desenvolupa aacs contra les molècules de GAD i IA2 (reconeixement de diferents epítops i/o subclasses) en la T1D.

Dins de aquest objectiu es vem plantejar els següents subobjectius:

- Determinar un possible patró diferencial de resposta contra la molècula de GAD (reconeixement de diferents epítops i/o subclasses) en individus afectes de diabetis mellitus tipus I (T1D) respecte altres malalties autoimmunes (síndrome de Stiff man i síndrome poliendocrí autoimmune de tipus II (APS-II)).

Per altra banda, els individus amb aacs contra IA2 tenen un risc molt més elevat per desenvolupar la malaltia que no pas aquells que són positius per GAD o IAA. De tots ells, els dirigits específicament contra la molècula dIA2 són els que es detecten en la resposta humoral més primerenca, així doncs, la seva caracterització podria ser important a l'hora de comprendre l'evolució de la resposta autoimmune humoral contra aquestes proteïnes. Així doncs el darrer subobjectiu d'aquesta tesis va consistir en la:

- Identificació molecular dels epítops més rellevants i immunogènics específics per a la molècula dIA2 en individus afectes de T1D així com el desenvolupament d'un mètode quantitatiu i prou sensible per mesurar la seva prevalença.

METODOLOGIA

3. Metodologia

3.1 Generació d'anticossos monoclonals

Ratolins BALB/c de sis setmanes d'edat van rebre durant 4 setmanes injeccions intraperitoneals amb solució incompleta d'adjuvant plus de Freund de 100µg de la proteïna recombinant IA2 humana (aminoàcids 389-979) produïda en *Escherichia coli* i purificada mitjançant cromatografia d'afinitat per cua d'histidines. La proteïna recombinant utilitzada inclou tots els residus que s'expressen en la proteïna d'IA2 madura. Quatre dies després de l'última injecció els ratolins van ser sacrificats, i els splenòcits aïllats i fusionats. L'ecrinatge dels hibridomes va ser realitzat mitjançant assaigs de *radiobinding* i els que van resultar positius van ser clonats mitjançant assaigs de dilucions limitants. Es van obtenir nou clons reactius per IA2 dels quals cinc s'unien al domini intracel·lular i quatre al domini extracel·lular de la proteïna. Els cinc clons que s'unien al domini intracel·lular competien entre ells per la unió a IA2 indicant que s'unien a un epítol molt semblant. De la mateixa manera, els acs contra el domini extracel·lular competien entre ells per la unió a IA2. El clon que es va caracteritzar posteriorment en l'estudi va ser l'anomenat 76F, un ac que s'unia al domini intracel·lular de la proteïna.

Un segon set d'hibridomes va ser generat mitjançant la injecció intraperitoneal a ratolins NOD de sis setmanes d'edat de solució incompleta d'adjuvant plus de Freund amb 100µg de la proteïna recombinant IA2β (aminoàcids 741-1033) tot i seguint el mateix protocol. La proteïna recombinant IA2β₇₄₁₋₁₀₃₃ incloïa la majoria dels residus trobats a la proteïna intracel·lular IA2β i tots els epítols

coneguts dels anticossos contra IA2 β . Dos dels hibridomes reactius contra IA2 β van ser clonats i el denominat A9 va ser el triat per tal de ser caracteritzat.

3.2 Assaigs de radiobinding

Els plàsmids de DNA dels constructes purificats mitjançant el kit Quantumprep spin column preparation (Biorad, Hercules, CA) van ser in vitro transcrits i traduïts mitjançant el TnT SP-6 coupled rabbit reticulocyte lysate system (Promega, Madison, WI) en presència de ^{35}S -metionina (Amersham Biosciences, Uppsala, Suècia) d'acord amb les instruccions del fabricant. La ^{35}S -metionina no incorporada va ser separada mitjançant cromatografia de gel amb columnes NAP5 (Amersham Biosciences). Per tal de comprovar que el pes molecular de la proteïna traduïda era la esperada a partir de la seqüència d'aminoàcids es va fer córrer un gel i es va realitzar la posterior radiografia. Per els immunoassaigs es van afegir 2 μl de sèrum a 25 μl de 20mM Tris-HCl ph 7,4, 1% Tween 20 (TBST) que contenen 20,000 cpm de la proteïna recombinant marcada en plaques de 96 pous (Beckman, Fullerton, CA) i es van incubar ON en gel. Els immunocomplexes formats es van recuperar mitjançant l'addició de 1mg de proteïna A-Sepharose (Amersham Biosciences) als sèrums humans o 4 μl de proteïna G-Sepharose (Amersham Biosciences) als sèrums de rata resuspesa en 50 μl de TBST incubada durant 1 h en agitació a 4°C. Les perles es renten 5 vegades amb 800 μl de TBST i es centrifuguen a 600g durant 3 min per precipitar les perles entre rentats. Després dels rentats, les perles es transfereixen en 100 μl de TBST a plaques de 96 pous Optitplate (Perkin-Elmer, Waltham, MA), juntament amb 150 μl de Microscint-40 (Perkin-Elmer),

s'incuben en agitació durant 30 minuts i finalment es compten en un TopCount (Perkin-Elmer) per tal de determinar les cpm recuperades.

Competició de la unió del 76F per la unió a IA2 amb sèrums humans: Per als assaigs d'immunoprecipitació, s'afilla el 76F i es cross-linka a la proteïna G d'acord amb les instruccions del fabricant (Seize™ X Protein, G Immunoprecipitation Kit, Pierce, Biotechnology, Rockford, USA). Per realitzar aquesta mesura s'incuben 5 µl de sèrum de pacients o de controls amb 25000 cpm de proteïna recombinant humana d'IA2₆₀₅₋₉₇₉ marcada amb ³⁵S-metionina ON a 4°C. S'afegeix el 76F cross-linkat i s'incuba

En cas d'anàlisi de competició d'unió s'afegeixen diferents quantitats de diferents proteïnes no marcades obtingudes amb el mateix procediment indicat però amb metionina no radioactiva i

Per tal d'anàlitzar les subclasses d'IgG dels Acs s'utilitza també l'anàlisi de radiobinding tot i utilitzant subclasses d'IgGs o Acs monoclonals anti-human de ratolí marcats amb biotina isotip específics (Becton Dickinson, San Diego, CA) units a beads de Sepharose 4B streptavidina (Zymed, San Francisco, CA).

3.3 Assaigs d'Immunoprecipitació

Les diferents proteïnes recombinants van ser marcades radioactivament mitjançant el TnT SP-6 coupled rabbit reticulocyte lysate System (Promega, Madison, WI) en presència de 40µCi de Redivue L-³⁵S-metionina (Amersham Biosciences, Uppsala, Suècia). Un total de 25,000 cpm del producte en 25µl de TBST (50mM Tris, 150mM clorur de sodi, 1% Tween 20 (pH 7,4)) es van incubar ON a 4°C amb 5µl del sobrenedant de l'hibridoma del 76F.

Posteriorment es va afegir proteïna G-Sepharosa durant 1 h, es van rentar els immunocomplexes 5 vegades amb 800µl de TBST fred i finalment es van analitzar directament per SDS-PAGE i autoradiografia.

3.4 ELISA

El contingut d'insulina en extractes de cèl·lules i sobrenedants cel·lulars es va mesurar per ELISA. Plaques d'ELISA (Maxisorb; Nunc, Roskilde, Denmark) van ser recobertes amb Ac anti-guinea pig contra la insulina, bloquejades amb BSA (5mg/ml en Tris-buffered saline-TBS/BSA) i posteriorment incubades durant 2 h amb les mostres i insulina biotinitada en TBS/BSA. La insulina biotinitada capturada a les plaques es detecta amb Streptavidina-phosphatasa alcalina i es revela amb p-nitrofenil fosfatasa. Totes les mostres van ser analitzades per duplicat i la concentració d'insulina es va determinar a partir d'una corba estàndard d'insulina de rata inclosa a cada placa.

ELISA peptídic: Un pèptid corresponent a la regió de jxtamembrana d'AA2 (aminoàcids 609-631) va ser sintetitzada (Primm, Milà, Itàlia) i unida a BSA: el pèptid i la BSA amb una ratio de 1 mg de pèptid cada 3 mg de BSA es van incubar durant 2,5 h en presència de glutaraldehid al 0,1%, posteriorment es va addicionar glicina (200mM) i es va dialitzar ON contra PBS. Les plaques d'ELISA de poliestirè de 96 pous Maxisorp™ (Nunc, A/S, Roskilde, Dinamarca) van ser recobertes amb l'equivalent a 1µg de pèptid per pou ON amb buffer de carbonat pH 9,5 i després bloquejades amb 1% BSA en PBS. Per l'assaig d'ELISA, 100µl del sèrum diluït (1/1000 en 0,1% BSA, 0,05% Tween-20, PBS (PBST)) es va afegir als pous i les plaques van ser incubades

ON a 4°C, rentades 6 vegades amb 200µl de TBST, incubades amb un Ac secundari HRP conjugat diluït 1/2000 en PBST durant 1 h a temperatura ambient, rentades 6 vegades amb 200µl de PBST i revelades amb una solució de o-fenilendiamina en buffer citrat pH 5.

3.5 Western blotting

Els teixits i cultius cel·lulars van ser homogeneïtzats amb lisis buffer (50mM Tris, pH 7,5, 10mM fosfat de sodi, 150mM clorur de sodi, 1% Tritó X-100, 5mM EDTA, 5mM iodoacetat, 1mM benzamidina, 5µg/ml leupeptina, 5µg/ml aprotinina) i incubats 30 min en gel. Els lisats van ser centrifugats a 10,000 x g durant 20 min per tal de separar tot el material insoluble. Alíquotes de 10µg dels lisats de proteïna obtinguts o de proteïnes recombinants van ser separades per SDS-PAGE i transferides a membranes de nitrocel·lulosa. Les membranes van ser bloquejades amb TBS-0,05% Tween-20 i 2% de llet, i posteriorment incubades amb sobrenedants de cultius cel·lulars que contenen IgG monoclonal 76F amb una dilució 1/10. Després de diversos rentats amb TBS-0,05% Tween-20, la unió a l'anticòs va ser visualitzada amb horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG tot i utilitzant un substrat quimioluminiscent.

3.6 Immunohistoquímica

Seccions parafinades de pàncrees de rata van ser desparafinades i rehidratades per tal de poder realitzar la immunohistoquímica. La peroxidasa endògena va ser bloquejada mitjançant un tractament amb 0,3% de peròxid d'hidrogen en metanol i les seccions van ser posteriorment tractades amb sèrum de porc (20% en TBS). Les seccions van ser incubades ON a 4°C amb IAc monoclonal 76F, o Acs policlonals contra la insulina (ICN, Thame, UK) o glucagó (Sigma, Poole, UK). La unió del 76F va ser visualitzada mitjançant la incubació amb IAc secundari adequat i amb el mètode de la streptavidina marcada amb peroxidassa amb el substrat 3,3'-diaminobenzidina tot i utilitzant un kit comercial (LSAB Plus, Dako, Cambridge, UK). Les seccions van ser posteriorment tenyides amb hematoxilina, deshidratades i muntades per poder ser analitzades per microscòpia. Seccions consecutives marcades amb Acs contra insulina o glucagó van ser incubades amb el segon Ac primari (contra insulina o glucagó) durant 1 h a temperatura ambient, rentades, i la unió amb IAc va ser detectada amb la Immunoglobulina FITC-conjugada anti-guinea pig o anti-conill (Stratech, Luton, UK).

La línia cel·lular TC3 va ser plaquejada en cobreobjectes recoberts amb poli-L-lisina i després de dos dies de cultiu les cèl·lules van ser fixades durant 20 min amb 3% paraformaldehid en PBS. Després de la desactivació de l'autofluorescència amb 15mM de glicina, les cèl·lules es van permeabilitzar durant 4 min amb 0,1% (w/v) Tritó X-100 en PBS i posteriorment es van incubar durant 10 min amb 0,2% (w/v) de gelatina en PBS per evitar unions no específiques de IAc. La incubació amb els diferents acs primaris (guinea pig

anti-Insulina 1:600 (DAKO); sobrenedant dels hibridomes del 76F o A9 diluïts 1/2 en 0,2% (w/v) gelatina, 16,5%(v/v) sèrum de cabra, 0,3% (Tritó X-100, 40mM buffer fosfat, 0,45 M NaCl) va ser realitzada amb els temps apropiats per a cada Ac. Després de diversos rentats en PBS-gelatina els cobreobjectes van ser incubats durant 1 h a 37°C amb IAc secundari específic. Després de diversos rentats es va muntar les preparacions amb Gelvatol i es van analitzar les imatges amb un microscopi amb sistema Deltavision™ (Applied Precision).

3.7 Anàlisi de biosíntesis i degradació

La síntesis de I₂A2 va ser analitzada mitjançant la incorporació de ³⁵S-metionina/cisteïna i posterior detecció per immunoprecipitació i autoradiografia. Els illots de rata (200 per condició) van ser incubats durant 2 h a 37°C en 100µl de HEPES buffered Hanks balanced salt solution (HBSS) que contenia 1mg/ml de BSA, 6mmol/l glucosa, 10% metionina, un mix d'aminoàcids deficient en cisteïna (Amersham-Pharmacia Biotech, Amersham, U.K.) i 4MBq de EasyTag Express protein labeling mix (NEN, Hounslow, U.K.) en presència o absència de 10nmol/l d'insulina. Els illots van ser lisats, i immunoprecipitats amb el 76F o amb un Ac control irrellevant. Els complexos formats van ser aïllats amb proteïna A Sepharose i analitzats per SDS-PAGE i autoradiografia.

La degradació de I₂A2 va ser analitzada per experiments de pulse-chase. Les proteïnes dels illots van ser marcades durant 1 h a 37°C en 100µl de HBSS que contenia 1mg/ml de BSA, 20mmol/l glucosa, 10% metionina, el mix d'aminoàcids deficient en cisteïna i 12 MBq de EasyTag Express protein labeling mix. Els illots van ser recollits immediatament o després de 12 h en medi RPMI

que contenia 6mmol/l glucosa amb o sense 10nmI/l insulina. L α 2 dels illots marcats radioactivament va ser detectat per immunoprecipitació i autoradiografia, mètode descrit prèviament.

3.8 Anàlisis estadístics

Depenent dels estudis es van utilitzar diferents tipus d'anàlisis. Les comparacions entre grups es van realitzar amb l'anàlisi de la t de student d'ANOVA, el U-test de Mann-Whitney o amb el Fischer's Exact Test. També es va utilitzar l'anàlisis de supervivència Kaplan-Meier per determinar el risc de desenvolupar la T1D. Tots els anàlisis estadístics es van fer amb el SPSS (Statistical Package for Social Sciences) (SPSS, Inc, Chicago, IL).

RESULTATS

4. Resultats

Í Monoclonal antibody 76F distinguishes IA-2 from IA-2 β and overlaps an autoantibody epitope S. Piquer, L. Valera, V. Lampasona, B. Jardin, S. Roche, C. Granier, M.R. Christie, E. Bonifacio, D. Laune. *Journal of Autoimmunity* 2006; 26:215-222.

L'objectiu d'aquest treball fou l'obtenció i posterior caracterització d'aacs monoclonals (maacs) dirigits contra les molècules d'IA2 i d'IA2 β . Per tal d'assolir aquest objectiu es van injectar intraperitonealment durant 4 setmanes les proteïnes recombinants d'IA2 humana (aminoàcids 389-979) i d'IA2 β (aminoàcids 741-1033) a ratolins BALB/c i NOD, respectivament.

Es van obtenir nou clons reactius per IA2 dels quals cinc són al domini intracel·lular i quatre al domini extracel·lular de la proteïna. Els cinc clons que són al domini intracel·lular competien entre ells per la unió a IA2 indicant que són a un epítip molt semblant.

Es van caracteritzar una de les clones obtingudes de cadascuna de les microinjeccions, l'aac que es va anomenar 76F (IgG2b amb una K_D de $9.2 \times 10^{-8}M$ (afinitat per IA2)) que reconeixia el domini intracel·lular d'IA2 i l'aac anomenat A9 (IgG1 amb una K_D de $9.2 \times 10^{-8}M$) obtingut de la microinjecció dels ratolins NOD amb IA2 β .

Ambdós aacs reconeixien per western blot una proteïna de 65 kDa en lisats d'òl·lols humans i de rata, de la línia cel·lular β TC3 i de la glàndula pituïtària mentre que el senyal era inexistent en lisats de línies cel·lulars de neuroblastoma, de la línia cel·lular 3T3 o de la línia cel·lular d'insulinoma de

rata RIN5mAH, resultat que coincidia amb l'expressió tissular i cel·lular de $\text{A}\beta$ i $\text{IA}\beta$. Els anàlisis de immunohistoquímica van mostrar com el 76F s'unia a la cèl·lula beta dels illots mentre que la microscòpia confocal va co-localitzar parcialment el marcatge obtingut per ambdós aacs amb el marcatge per insulina.

Posteriorment es va passar a la caracterització de ambdós aacs. Els assaigs de immunoprecipitació amb proteïnes recombinants que contenien el domini intracel·lular de $\text{A}\beta$ i $\text{A}\beta$ marcades radioactivament van demostrar que el 76F era un mAc ja que era capaç de reconèixer el domini intracel·lular de $\text{A}\beta$ de diferents espècies (humana, rata i ratolí) però no $\text{IA}\beta$. Les immunoprecipitacions realitzades amb proteïnes quimera de $\text{A}\beta$ / $\text{IA}\beta$ van identificar la regió d'unió del 76F a la regió de jxtamembrana de $\text{A}\beta$, més concretament entre els aminoàcids 605 i 642. L'ac A9, per la seva banda, reconeixia la regió PTP de ambdues proteïnes tant per western blot com per immunoprecipitació.

Per tal de caracteritzar la regió mínima necessària per a la unió de aquests dos aacs es van realitzar anàlisis de mapatge de pèptids. Aquesta tècnica va confirmar que ambdós aacs reconeixien epítops localitzats a la regió intracel·lular de $\text{A}\beta$. L'epítop mínim per al 76F contenia 5 residus (FEYQD), corresponent a la regió de JM de $\text{A}\beta$ que conté els aminoàcids 626-630. La substitució de tots els aminoàcids per alanina va determinar que els residus claus per la unió de l'ac eren tres: ^{626}F , ^{628}Y i ^{629}Q . Aquests resultats van ser confirmats posteriorment per anàlisis mutacionals addicionals de aquests tres residus. Per l'ac A9 l'epítop mínim contenia 7 residus LCAYQAE, domini d'unió corresponent als aminoàcids 716-722 de la regió PTP de $\text{A}\beta$. En aquesta

regió els aminoàcids claus determinats per a la unió de I α C van ser 2: ⁷¹⁹Y i ⁷²⁰Q.

Donat que l'epítop reconegut pel 76F es trobava a la regió reconeguda pels aacs que reconeixien l'epítop JM2 (621-630), prèviament caracteritzat en pacients afectes de T1D, es van realitzar assaigs de competició per veure si el 76F era capaç de desplaçar la unió de aquests aacs. Aquests experiments van mostrar com els sèrums positius per JM2 inhibien la unió del 76F a I α A2 mentre que la inhibició de aquesta unió per part dels sèrums positius per JM1 o per la regió de PTP era pràcticament inexistent.

Aquest treball caracteritza un maac que distingeix entre IA2 i IA2 β , dues proteïnes amb un grau d'homologia elevat caracteritzades com dos dels principals autoantígens en la T1D. El 76F és un maac que reconeix la forma nativa i desnaturalitzada de I α A2 d'origen humà, de rata i de ratolí. L'epítop de reconeixement del 76F està format pels residus FEYQD, seqüència localitzada a la regió de jxtamembrana de la molècula d'I α A2 inexistent a IA2 β , que forma part d'un dels epítops linears reconeguts pels aacs dels pacients afectes de T1D. Aquesta característica la assenyalava com una eina molt valuosa en els assaigs que requereixin un reconeixement epitòpic específic.



Monoclonal antibody 76F distinguishes IA-2 from IA-2 β and overlaps an autoantibody epitope

Sandra Piquer ^{a,c,1}, Lionel Valera ^{b,1}, Vito Lampasona ^c, Bénédicte Jardin-Watelet ^b,
 Stéphanie Roche ^b, Claude Granier ^b, Françoise Roquet ^b, Michael R. Christie ^d,
 Tiziana Giordano ^a, Maria-Luisa Malosio ^a, Ezio Bonifacio ^{a,*}, Daniel Laune ^b

^a Immunology of Diabetes Unit, Department of Medicine I, San Raffaele Scientific Institute, Via Olgettina 60, I-20132 Milan, Italy

^b CNRS UMR 5160, Centre de Pharmacologie et Biotechnologie pour la Santé, Faculté de Pharmacie,
 15 Avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier Cedex 5, France

^c Department of Laboratory Medicine, San Raffaele Scientific Institute, I-20132 Milan, Italy

^d Department of Medicine, Guy's, King's, and St. Thomas' School of Medicine, King's College, London, UK

^e Endocrinology and Diabetes Unit, Hospital Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS),
 University of Barcelona, Barcelona, Spain

Received 23 September 2005; revised 22 December 2005; accepted 23 December 2005

Abstract

IA-2 and IA-2 β are highly related proteins that are autoantigens in type 1 diabetes, and provide a model for developing reagents and assays that distinguish similar proteins with unique autoantibody epitopes.

Monoclonal antibodies (mAb) to IA-2 and IA-2 β were prepared and tested for their ability to bind to the related proteins and their ability to compete for specific autoantibody epitope binding by sera from patients with type 1 diabetes.

Monoclonal antibodies that specifically bound IA-2 (76F) or bound both IA-2 and IA-2 β (A9) were isolated and characterized. 76F mAb recognized IA-2 of human, rat and mouse origin in native and denatured forms and had an epitope specificity for residues 626–630 (FEYQD) which are found in the juxtamembrane (JM) region of human and mouse IA-2, but not IA-2 β . This region overlaps with the autoantibody epitope JM2. Binding to the 76F monoclonal antibody was specifically inhibited by sera with antibodies to the JM2 epitope but not with antibodies to the adjacent JM1 epitope, indicating that unique epitopes can be distinguished by this approach.

76F mAb has the unique property to distinguish between the two closely related autoantigens IA-2 and IA-2 β by targeting an IA-2 specific epitope of the juxtamembrane region. The findings define an approach to develop assays for specific antibody epitope measurements which may be relevant for disease prognosis and monitoring intervention therapies.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: IA-2; Type 1 diabetes mellitus; Monoclonal antibody; Autoantibodies

1. Introduction

The protein tyrosine phosphatase (PTP)-like insulinoma antigen 2 (IA-2), also known as ICA512 (islet cell autoantigen

512), PTPN and PTP35, is a 979 amino acid transmembrane protein expressed within secretory granules of brain and neuroendocrine cells including pancreatic islet β cells [1]. The full length protein is cleaved to yield a 65 kDa mature protein form that contains a luminal domain, and an intracellular cytoplasmic domain characterized by a juxtamembrane (JM) region of around 100 amino acids prior to a single PTP-like domain of around 300 amino acids [2–4]. IA-2 is thought to be involved in the regulation of secretory granule exocytosis. It links secretory granules to the cytoskeleton via the PDZ

Abbreviations: mAb, monoclonal antibody; JM, juxtamembrane; T1DM, type 1 diabetes mellitus; TBS, Tris-buffered saline.

* Corresponding author. Tel.: +39 02 2643 2913; fax: +39 02 2643 3790.

E-mail address: bonifacio.ezio@hsr.it (E. Bonifacio).

¹ These authors contributed equally to this work.

0896-8411/\$ - see front matter © 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.
 doi:10.1016/j.jaut.2005.12.001

(protein domain named for PSD-95, Disc large and Zo-1) domain of β 2-syntrophin [5] and upon stimulation of insulin secretion is released through cleavage of its cytoplasmic domain, thereby allowing the mobilization of secretory granules to the cell surface [6]. Further supporting a role for IA-2 in insulin secretion, IA-2-deficient mice that were generated by targeted disruption of the mouse IA-2 gene showed alterations in glucose tolerance tests and insulin secretion [7].

IA-2 has a homologue known as IA-2 β or phogrin [8]. Targeted disruption of IA-2 β also results in alterations in glucose tolerance [9]. Both IA-2 and IA-2 β are also major targets of autoantibodies in type 1 diabetes mellitus (T1DM) [2, 10–13]. Autoantibodies bind to the intracellular domain of the proteins and predominantly to epitopes that are shared between the two molecules, or unique to IA-2. Autoantibody cross-reactivity between the two molecules is likely to be due to the high degree of homology within their cytoplasmic domains [14–20]. Despite this, it is uncertain whether IA-2 β shares all of the functional characteristics reported for IA-2 [1, 5, 6, 21] and there is a need to distinguish IA-2 from IA-2 β in order to correctly identify their functions and roles in the pathogenesis of T1DM. Here we report the generation of a mouse monoclonal antibody that distinguishes expression of the two proteins. The antibody also has a unique property of binding to amino acids also recognized by IA-2 specific autoantibodies and was therefore used in a proof of principle autoantibody epitope specific assay.

2. Materials and methods

2.1. Generation of monoclonal antibodies

Six-week-old BALB/c mice received four weekly intraperitoneal injections with incomplete Freund's adjuvant plus 100 μ g of recombinant human IA-2_{389–979} produced in *Escherichia coli* and purified by histidine trapping [12]. IA-2_{389–979} includes all residues expressed in the mature IA-2 protein. Four days after the last injection, mice were killed, and splenocytes isolated and fused. Hybridomas were screened with a radiobinding assay [15] and positive hybridomas cloned by limiting dilution. Nine IA-2 reactive clones were obtained. Five of these bound the intracellular domain of IA-2 and 4 bound the extracellular domain of IA-2. The five intracellular domain-binding clones were able to compete with each other for IA-2 binding, indicating that they bound a similar epitope. Similarly, the extracellular domain binding antibodies also competed with each other for IA-2 binding. The intracellular domain binding antibody 76F was used for characterization in this study. A second set of hybridomas were generated by injecting 6-week-old non-obese diabetic mice with incomplete Freund's adjuvant plus recombinant IA-2 β _{741–1033} following the same protocol. IA-2 β _{741–1033} includes most residues found in the intracellular IA-2 β protein and all known epitopes of IA-2 β autoantibodies. Two IA-2 β reactive hybridomas were cloned. A9 was used for characterization in this study.

2.2. Western blotting

Tissues or cultured cells were gently homogenized in lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 10 mM sodium phosphate, 150 mM sodium chloride, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 10 mM sodium chloride, 5 mM iodoacetate, 1 mM benzamide, 5 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml aprotinin) and incubated for 30 min on ice. The lysate was centrifuged at $10,000 \times g$ for 20 min to remove insoluble material and the protein concentration determined. Aliquots of tissue lysates representing 10 μ g of protein or 10 ng of recombinant protein representing the juxtamembrane, cytoplasmic and the PTP-like domain of IA-2 were separated by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis), and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked in Tris-buffered saline (TBS) containing 0.05% Tween-20 and 2% skimmed milk powder, then incubated with tissue culture supernatants containing 76F mAb at 1/10 dilution. After washing in TBS–0.05% Tween-20, antibody binding was visualized with a horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Sigma, Poole, UK) using a chemiluminescent substrate (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, UK).

2.3. Immunohistochemistry

Sensitive detection of IA-2 was achieved by immunoperoxidase labelling with signal amplification using streptavidin-biotin complexes as previously described [22]. Paraffin sections 5–6 μ m thick of rat pancreas were dewaxed and rehydrated for immunohistochemistry. Endogenous peroxidase was blocked by treatment with 0.3% hydrogen peroxide in methanol and sections treated with normal swine serum (20% in TBS). Sections were then incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C with 76F monoclonal (mAb), or polyclonal antibodies to insulin (ICN, Thame, UK) or glucagon (Sigma, Poole, UK). Binding of 76F was visualized by incubation with the appropriate second antibody and the peroxidase-labelled streptavidin method with 3,3'-diaminobenzidine substrate using a commercial kit (LSAB Plus, Dako, Cambridge, UK). Sections were then counterstained with haematoxylin, dehydrated, and mounted for microscopic inspection. Consecutive sections labelled with antibodies to insulin and glucagon were incubated with the second primary antibody (to insulin or glucagon) for 1 h at room temperature, washed, and antibody binding detected with FITC-conjugated anti-guinea pig or anti-rabbit immunoglobulin (Strattech, Luton, UK).

For intracellular staining of cell lines, β TC3 cells were plated on 24-mm poly-L-lysine-coated glass coverslips, grown for 2 days and fixed for 20 min with 3% paraformaldehyde in PBS. After quenching of autofluorescence in 15 mM glycine the cells were permeabilized for 4 min in 0.1% (w/v) Triton X-100 in PBS and then incubated for 10 min in 0.2% (w/v) gelatin in PBS to prevent non-specific antibody binding. Primary antibodies (guinea pig anti-Ins 1:600 (DAKO); 76F or A9 hybridoma supernatant diluted 1/2 in 0.2% (w/v) gelatin, 16.5% (v/v) goat serum, 0.3% Triton X-100, 40 mM phosphate buffer, 0.45 M NaCl) were applied for the appropriate

times. After washing in PBS–gelatin, the coverslips were incubated for 1 h at 37 °C with the specific secondary antibody. Following washes they were mounted in Gelvatol and imaged in a wide field microscopy system Deltavision™ (Applied Precision). Deconvolutions were performed on z-stacks acquired with a 60× objective and processed by the proprietary software softWorx v2.5 (Applied Precision) run on a Silicon Graphics O2 computer. The images were exported as TIFF files and visualized with Adobe Photoshop5 for MacOS.

2.4. Immunoprecipitation assays

Immunoprecipitation of [³⁵S]methionine-labelled, recombinant human, mouse and rat IA-2 and recombinant human IA-2 fragments was carried out as previously described [11]. The recombinant proteins were radiolabelled by in vitro transcription/translation of plasmids [12,14,15] using the TnT SP6-coupled rabbit reticulocyte lysate system (Promega, Madison, WI) in the presence of 40 µCi of Redivue L-[³⁵S]methionine (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). A total of 25,000 cpm of product in TBST (25 µl of 50 mM Tris, 150 mM sodium chloride, 1% Tween-20 (pH 7.4)) was incubated overnight at 4 °C with 5 µl of 76F hybridoma supernatant. Protein G-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) was subsequently added for 1 h, washed five times with 800 µl ice-cold TBST, and immunocomplexes were analysed directly by SDS–PAGE and autoradiography.

2.5. Peptide mapping of antibody epitopes

25mer overlapping peptides frame-shifted by two residues were synthesized on cellulose membranes (Intavis, Bergish Gladbach, Germany) to cover the entire sequence of human IA-2. The procedure for the synthesis on membranes using Fmoc chemistry has been previously described [23]. Fmoc amino acids were obtained from Novabiochem (Laufelfingen, Switzerland). Coupling steps were performed by an ASP222 synthesizer on membranes. The free α-NH₂ terminus of each peptide was acetylated. After the last coupling step, membranes were treated with trifluoroacetic acid to generate unprotected side-chain residues. The same procedure was used to synthesize the sequence of human IA-2 in the form of 12mer peptides and to synthesize a series of mutated epitope recognized by each monoclonal antibody where each amino acid has been replaced by alanine or other amino acids.

For antibody binding studies, cellulose membranes were washed in TBS (3 × 10 min) and then incubated overnight in Blocking Buffer (Sigma Genosys, The Woodlands, USA) at a 1/50 dilution in TBS 0.05% Tween-20, 5% sucrose. The cellulose-bound peptides were subsequently incubated with mAb diluted to 5 µg/ml in Blocking Buffer 1/50, TBS 0.05% Tween-20, 5% sucrose. Binding to peptides was detected by simultaneous incubation with peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1/2000) (Sigma Aldrich, St Louis, USA) for 90 min at 37 °C. After rinsing in TBS 0.05% Tween-20 for 10 min at room temperature, the Amersham enhanced chemiluminescence immunoblotting reagents were used for the

revelation of reactive spots. The membrane was exposed to film for 1 min and scanned in order to quantify the spot intensities with the Scion Image software.

2.6. Competition of autoantibody binding

Competition of the 76F mAb for binding to IA-2 by human sera was performed by immunoprecipitation. For immunoprecipitation, 76F mAb was isolated and cross-linked to protein G (Seize™ X Protein G Immunoprecipitation Kit, Pierce Biotechnology, Rockford, USA). Serum (5 µl) from patients or control subjects was incubated with 25,000 cpm of ³⁵S-labelled recombinant human IA-2_{605–970} overnight at 4 °C prior to the addition of the 76F-Protein G. After a further 60 min incubation at room temperature, the 76F-Protein G was washed five times in TBST, and counted in a TopPlate beta counter (Canberra Packard, Groningen, The Netherlands). Patient sera were selected from a cohort of new onset T1DM that were previously characterized for their IA-2 epitope specificity [15,24]. Sera were selected for having antibodies to the JM1 or JM2 epitopes as determined by chimaeric proteins [24]. Control sera were from previously characterized IA-2 antibody positive/JM1 and JM2 negative sera [24] and IA-2 antibody negative children [15].

3. Results

3.1. Monoclonal antibody 76F binds IA-2 and distinguishes IA-2 from IA-2β

The 76F mAb was IgG2bc and the A9 mAb IgG1κ. Their affinities for IA-2 measured by BiaCore technology were K_D of 9.2×10^{-8} M for 76F and 9.5×10^{-8} M for A9 (data not shown). Consistent with the tissue and cell expression of IA-2 and IA-2β, the 76F and A9 mAbs bound a 65 kDa protein present on Western blots of rat and human islets, the βTC3 cell line and pituitary, but not neuroblastoma cell lines, the 3T3 cell line or the rat insulinoma cell line RIN5mAH (Fig. 1A for 76F; data not shown for A9). The 76F mAb stained islet beta cells in fixed and frozen pancreas sections (Fig. 1B). Confocal microscopy showed that 76F and A9 mAb staining partially co-localized with insulin staining in βTC3 cells (Fig. 1B).

Immunoprecipitation of radiolabelled recombinant IA-2 intracellular domain (IA-2ic) showed that 76F bound human, rat and mouse IA-2ic, but did not bind IA-2β of any species (Fig. 2A). Immunoprecipitation of radio-labelled IA-2 deletion constructs showed that 76F mAb bound to the IA-2 juxtamembrane region, and using IA-2/IA-2β chimaeric proteins this region was identified as IA-2 juxtamembrane amino acids 605–642 (Fig. 2B). The A9 mAb bound both IA-2 and IA-2β PTP domains by western blot and by immunoprecipitation (data not shown).

3.2. Identification of 76F and A9 epitopes

The binding pattern of antibodies 76F and A9 to 25mer overlapping peptides derived from the IA-2 sequence

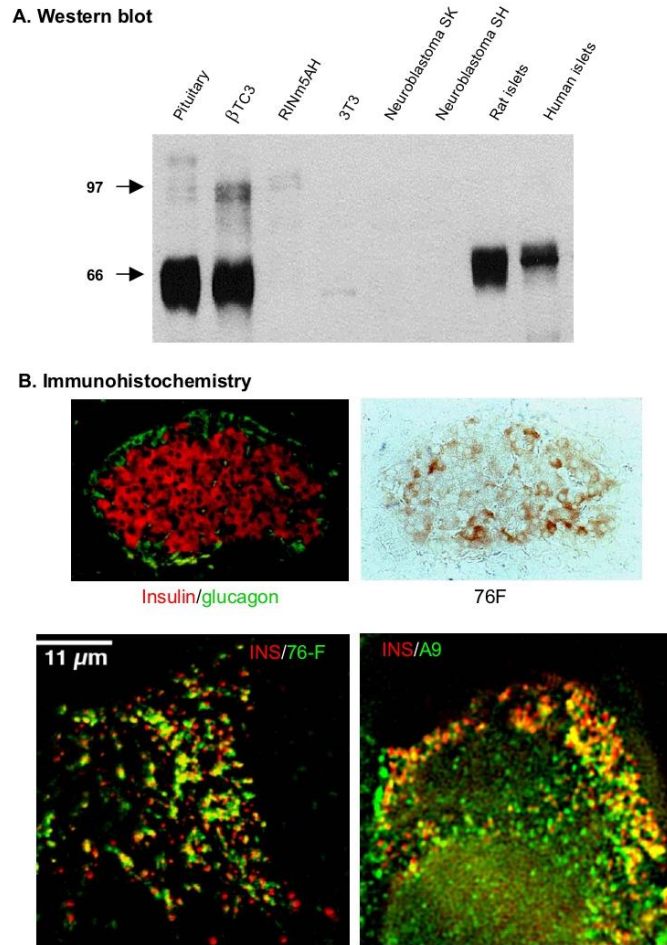


Fig. 1. Immunostaining of IA-2 with 76F mAb. (A) Western blot of cell lysates from rat pituitary gland, rat islets and human islets, and from the βTC3, RINm5AH, 3T3, and neuroblastoma SK and SH cell lines. Mature IA-2 is identified as a broad 65 kDa band. (B) Immunohistochemistry on fixed adult rat pancreas tissue. The upper left panel shows staining for insulin (red) and glucagon (green) in an islet. The upper right panel shows staining with the 76F mAb (brown) in a consecutive section. Staining with 76F is heterogeneous and is confined to the islet. The lower panel shows confocal microscopy of 76F mAb (left) and A9 mAb (right) together with insulin staining in fixed βTC3 cells. Z-stack images were acquired by the Deltavision™ wide-field microscopy system (Applied Precision) and processed for deconvolution by the proprietary software.

confirmed that the regions recognized by both antibodies are localized in the intracellular domain of IA-2 (Fig. 3). For 76F, a stretch of five residues FEYQD found in the juxtamembrane positions 626–630 was shared by all reactive peptides and thus constitutes the minimal epitope. This epitope is conserved in mouse IA-2. The corresponding region of IA-2β is AAYQE. The epitope of A9 is located in the PTP domain of IA-2 and the binding motif is LCAYQAE corresponding to

IA-2 amino acids 716–722. This region is identical in IA-2β and is conserved in mouse IA-2. These data were confirmed by immunoreactivity of both antibodies on 12mer overlapping peptides synthesized on cellulose membrane (data not shown).

Alanine scanning (Fig. 4A) indicated that residues ⁶²⁶F, ⁶²⁸Y and ⁶²⁹Q are crucial for the binding of 76F mAb, and residues ⁷¹⁹Y and ⁷²⁰Q are key residues for A9 mAb binding. Alanine substitution of these residues completely removed

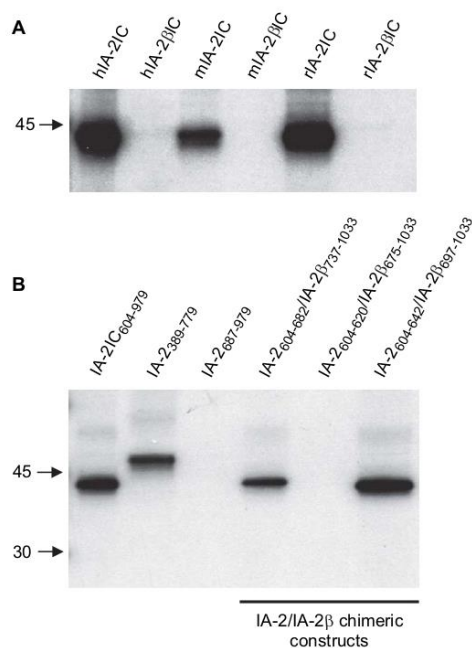


Fig. 2. Immunoprecipitation of in vitro [³⁵S]methionine-labelled recombinant IA-2 with 76 mAb. (A) SDS-PAGE of immunoprecipitates of the cytoplasmic domain of IA-2 and IA-2β from different species. 76F mAb binds to IA-2 but not IA-2β from human (h), rat (r) and mouse (m). (B) Immunoprecipitation of IA-2 deletion constructs and IA-2/IA-2β chimeric constructs. 76F mAb binds to proteins that express the IA-2 juxtamembrane residues 604–642.

binding by cognate antibody. These results show the importance of aromatic residues ⁶²⁶F and ⁶²⁸Y for the recognition by 76F and ⁷¹⁹Y for the recognition by A9 mAb. They also suggest that for 76F, the specificity for IA-2 and lack of binding to IA-2β is predominantly conferred by residue ⁶²⁶F, which is an alanine in IA-2β.

For 76F, the data were confirmed by mutational analysis of the 76F epitope (Fig. 4B). For the aromatic residues ⁶²⁶F, and ⁶²⁸Y, replacement with amino acids other than aromatic residues reduced binding, further demonstrating the requirement of aromatic amino acids at these positions for antibody recognition. For the amidated residue ⁶²⁹Q, replacement by amino acids other than asparagine (amidated amino acid), proline, cysteine, methionine, or histidine markedly reduced antibody binding.

3.3. Monoclonal antibody 76F competes for autoantibody binding to IA-2

The epitope of 76F mAb was in the region of the JM2 autoantibodies found in patients with T1DM [24]. We therefore

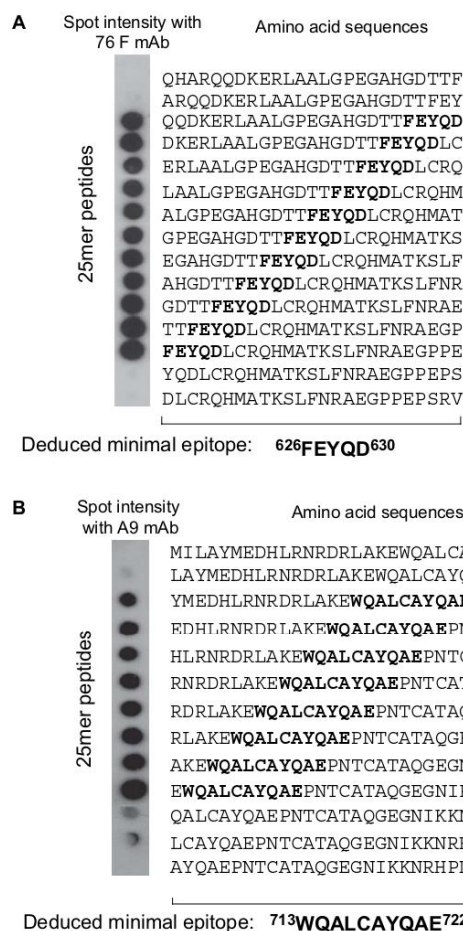


Fig. 3. Peptide mapping of the 76F (A) and A9 (B) mAb reactivity to IA-2. 25mer peptides covering the complete IA-2 protein were prepared. Immunoreactivity of peptides around the relevant region for each mAb are shown. The minimal common residues to each reactive peptide are shown in bold.

examined whether 76F could displace autoantibody binding (Fig. 5). Using purified 76F mAb cross-linked to protein-G Sepharose as the antigen capture reagent, all sera from T1DM patients who had IA-2 autoantibodies to the JM2 epitope could inhibit 76F mAb binding to radiolabelled IA-2. Sera that had antibodies to the JM1 epitope (amino acids 611–621) or to the PTP domain (amino acids 683–979) could not or only weakly displaced 76F mAb binding to IA-2. The specificity of the displacement was further shown by competition of 76F mAb binding with IA-2 peptide 621–631, but not IA-2 peptide 611–621 (Fig. 5).

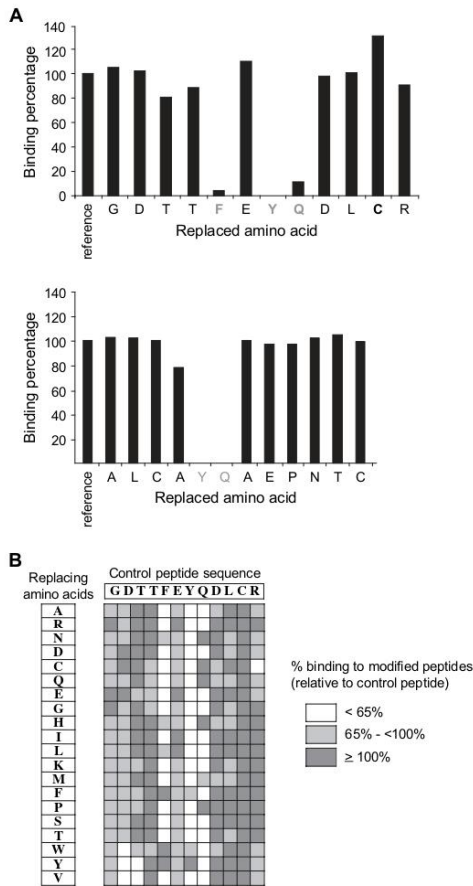


Fig. 4. Mutational peptide mapping of the 76F and A9 mAb reactivity to IA-2. (A) 76F mAb reactivity after alanine substitution of each residue in the IA-2₆₂₂₋₆₃₃ 12mer (upper panel) and A9 mAb reactivity after alanine substitution of each residue in the IA-2₇₁₅₋₇₂₆ 12mer (lower panel). (B) 76F mAb reactivity after comprehensive amino acid substitution of the IA-2₆₂₂₋₆₃₃ 12mer. The intensity of binding is indicated as relative intensity to the reference IA-2₆₂₂₋₆₃₃ peptide (dark box, >100%; grey box, 65 to <100%; white box, <65%).

4. Discussion

We describe a monoclonal antibody that distinguishes two highly related proteins co-expressed in the secretory granule membranes of islet beta cells and which are autoantigens in T1DM. The 76F mAb recognized IA-2 of human, rat and mouse origin in native and denatured forms and had an epitope specificity for residues 626–630 (FEYQD) which are found in the juxtamembrane region of human and mouse IA-2, but not IA-2β. This region corresponds to a major linear epitope of

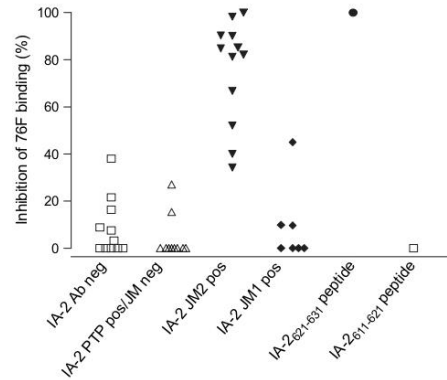


Fig. 5. Inhibition of 76F mAb binding to IA-2 cytoplasmic domain by patient sera. Sera are classified on the basis of their IA-2 and IA-2 epitope reactivity as IA-2 antibody negative (open squares, *n* = 11), IA-2 PTP domain antibody positive, but negative for antibodies to IA-2 juxtamembrane epitopes (open triangles, *n* = 10), IA-2 JM2 (621–630) antibody positive (filled triangles, *n* = 12), and IA-2 JM1 (611–620) antibody positive (filled diamonds, *n* = 7). Inhibition with peptides corresponding to the JM2 epitope (IA-2₆₂₁₋₆₃₁, filled circle) and the JM1 epitope (IA-2₆₁₁₋₆₂₁, filled square) is also shown. Sera were tested in two replicate experiments that had similar counts per minute. Results are shown for one of the experiments.

autoantibodies found in T1DM patients, and consistent with this, 76F mAb inhibits binding of patient serum to IA-2 antigen.

IA-2 is involved in insulin secretion [6,7,25]. During exocytosis of secretory granules, it undergoes μcalpain cleavage of the cytoplasmic domain between residues 658–659 to yield a bioactive fragment that targets the nucleus and up-regulates insulin expression. The function of IA-2β, which is highly homologous to IA-2 in its cytoplasmic domain, is less well understood. Hence, reagents that can distinguish IA-2 and IA-2β, and different regions of IA-2 are potentially useful for studying IA-2 function. Few reagents are available for the detection of IA-2 and IA-2β. Most are polyclonal antibodies that bind both proteins or are peptide-specific antibodies. One stable human mAb (96/3) has been isolated using EBV transformed B-cell lines from a patient with T1DM [26]. The 96/3 mAb binds a conformational frequent autoantibody epitope shared between IA-2 and IA-2β PTP-like domains represented by the NXEXX(aromatic amino acid)XXG motif, and involving residues N⁸⁵⁸, E⁸³⁶, and F⁷⁹⁹ [27]. The 76F mouse mAb we describe has the (aromatic amino acid)X(aromatic amino acid)(Q/N/C/M/H/P) minimal epitope requirement. This sequence is conserved in the mouse, rat and human IA-2 juxtamembrane region proximal to the μcalpain cleavage site. The IA-2β protein lacks a crucial aromatic amino acid at the start of the motif and is not bound by the 76F mAb. Thus, 76F can distinguish IA-2 from IA-2β and potentially distinguish intact mature IA-2 from IA-2 that has been cleaved of its cytoplasmic domain.

Of interest to autoimmunity, the 76F epitope overlapped with an autoantibody epitope seen in patients with T1DM [24]. Indeed, one of the 76F contact residues (IA-2 residue 626) is critical for binding of the JM2 autoantibodies (V.L., unpublished findings). The overlap of 76F antibody and diabetes-autoantibody epitopes allowed a proof of concept assay for the detection of epitope specific autoantibodies by displacement of monoclonal antibody to be established. Proof of concept with the JM2 epitope was considered valuable because (1) results can be validated against existing methods, (2) the JM epitopes are recognized by more than 50% of IA-2 antibody positive T1DM patients, and (3) the close proximity of the adjacent JM1 epitope would allow us to determine how specific a displacement assay could be. Inhibition of 76F mAb binding to IA-2 was remarkably specific for sera that contained autoantibodies to an epitope within IA-2_{621–631} and distinguished sera with antibodies to an adjacent epitope (IA-2_{611–621}). Sera with autoantibodies to relatively distant epitopes also did not inhibit 76F mAb binding to IA-2. Differences in the ability of sera with JM2 antibodies to inhibit 76F mAb binding to IA-2 was related to antibody titre (not shown) and to differences in the JM2 residues needed for antibody binding between patient sera (V.L., unpublished findings). Thus, although other assays exist for distinguishing some of the antibodies to IA-2 specific epitopes, the current findings demonstrate that it is possible to develop assays using mAbs targeted to autoepitope regions in order to distinguish autoantibodies to relatively close epitopes. This is of potential relevance for monitoring autoimmunity since disease progression or severity is often associated with the development of autoantibodies to new [17] or to specific epitopes [28]. It is also useful for monitoring intervention therapies which could be associated with the development of new autoimmunity. For example, in T1DM, where IA-2 antibodies are prevalent, the availability of a “serotyping” set of epitope specific assays would enable new autoantibodies to be identified and used as a marker of sensitization.

Finally, the availability of monoclonal antibodies with distinct IgG subclass and epitope specificities, one of which is specific to the IA-2 protein, allows assays for the purpose of IA-2 quantification to be developed. IA-2 and IA-2 β have been observed in pancreatic islets, adrenal cells, and certain brain cells [1,8]. In pathology, they have been detected in lung and breast tumours [29,30], and therefore protein detection by histology or by quantitative immunoassay may be useful for disease classification.

Acknowledgements

S.P. was supported by an EU training and Mobility fellowship (ERBFMRXCT 970142). This work is part of the dissertation of S.P. and L.V. We wish to thank Martine Pugnère for her help and Françoise Roquet for their help in the kinetic measurements of IA-2–monoclonal antibody interactions.

References

- [1] Solimena M, Dirix R, Hermel J-M, Pleasic-Williams S, Shapiro JA, Caron L, et al. ICA512, an autoantigen of type I diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules. *EMBO J* 1996;15:2102–14.
- [2] Rabin DU, Pleasic SM, Shapiro JA, Yoo-Warren H, Oles J, Hicks JM, et al. Islet antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. *J Immunol* 1994;152:3183–8.
- [3] Lan MS, Lu J, Goto Y, Notkins AL. Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma. *DNA Cell Biol* 1994;13:505–14.
- [4] Lu J, Notkins AL, Lan MS. Isolation, sequence and expression of a novel mouse brain cDNA, m-IA2, and its relatedness to members of the protein tyrosine phosphatase family. *Biochim Biophys Acta* 1994;204:930–6.
- [5] Ort T, Maksimova E, Dirix R, Kachinsky AM, Berghs S, Froehner CF, et al. The receptor tyrosine phosphatase-like protein ICA512 binds the PDZ domains of β 2-syntrophin and nNOS in pancreatic β -cells. *Eur J Cell Biol* 2000;79:621–30.
- [6] Ort T, Voronov S, Guo J, Zawalich K, Froehner SC, Zawalich W, et al. Dephosphorylation of beta2-syntrophin and Ca²⁺/mu-calpain-mediated cleavage of ICA512 upon stimulation of insulin secretion. *EMBO J* 2001;20:4013–23.
- [7] Saeki K, Zhu M, Kubosaki A, Xie J, Lan MS, Notkins AL. Targeted disruption of the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 results in alterations in glucose tolerance tests and insulin secretion. *Diabetes* 2002;51:1842–50.
- [8] Wasmeier C, Hutton JC. Molecular cloning of phogrin, a protein-tyrosine phosphatase homologue localized to insulin secretory granule membranes. *J Biol Chem* 1996;271:18161–70.
- [9] Kubosaki A, Gross S, Miura J, Saeki K, Zhu M, Nakamura S, et al. Targeted disruption of the IA-2beta gene causes glucose intolerance and impairs insulin secretion but does not prevent the development of diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2004;53:1684–91.
- [10] Cui L, Yu WP, DeAizpurua HJ, Schmidli RS, Pallen CJ. Cloning and characterization of islet cell antigen-related protein-tyrosine phosphatase (PTP), a novel receptor-like PTP and autoantigen in insulin-dependent diabetes. *J Biol Chem* 1996;271:24817–23.
- [11] Payton MA, Hawkes CJ, Christie MR. Relationship of the 37,000- and 40,000-M_r tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 (ICA512). *J Clin Invest* 1995;96:1506–11.
- [12] Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E. Identification of the protein tyrosine phosphatase-like IA-2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40K autoantigen and as a target of islet cell Abs. *J Immunol* 1995;155:5419–26.
- [13] Lu J, Li Q, Xie H, Chen ZJ, Borovitskaya AE, Maclaren NK, et al. Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase, IA-2beta, as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37-kDa tryptic fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:2307–11.
- [14] Lampasona V, Bearzatto M, Genovese S, Bosi E, Ferrari M, Bonifacio E. Autoantibodies in insulin-dependent diabetes recognized distinct cytoplasmic domains of the protein tyrosine phosphatase-like IA-2 autoantigen. *J Immunol* 1996;157:2707–11.
- [15] Bonifacio E, Lampasona V, Bingley PJ. IA-2 (islet cell antigen 512) is the primary target of humoral autoimmunity against type 1 diabetes-associated tyrosine phosphatase autoantigens. *J Immunol* 1998;161:2648–54.
- [16] Hatfield EC, Hawkes CJ, Payton MA, Christie MR. Cross reactivity between IA-2 and phogrin/IA-2beta in binding of autoantibodies in IDDM. *Diabetologia* 1997;40:1327–33.
- [17] Kawasaki E, Yu L, Rewers MJ, Hutton JC, Eisenbarth GS. Definition of multiple ICA512/phogrin autoantibody epitopes and detection of intramolecular epitope spreading in relatives of patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 1998;47:733–42.

- [18] Seissler J, Schott M, Morgenthaler NG, Scherbaum WA. Mapping of novel autoreactive epitopes of the diabetes-associated autoantigen IA-2. *Clin Exp Immunol* 2000;122:157–63.
- [19] Notkins AL, Zhang B, Matsumoto Y, Lan MS. Comparison of IA-2 with IA-2beta and with six other members of the protein tyrosine phosphatase family: recognition of antigenic determinants by IDDM sera. *J Autoimmun* 1997;10:245–50.
- [20] Bearzatto M, Lampasona V, Belloni C, Bonifacio E. Fine mapping of diabetes-associated IA-2 specific autoantibodies. *J Autoimmun* 2003; 21:377–82.
- [21] Löbner K, Steinbrenner H, Roberts GA, Ling Z, Huang GC, Piquer S, et al. Different regulated expression of the tyrosine phosphatase-like proteins IA-2 and phogrin by glucose and insulin in pancreatic islets: relationship to development of insulin secretory responses in early life. *Diabetes* 2002;51:2982–8.
- [22] Roberts C, Roberts GA, Löbner K, Bearzatto M, Clark A, Bonifacio E, et al. Expression of the protein tyrosine phosphatase-like protein IA-2 during pancreatic islet development. *J Histochem Cytochem* 2001;49: 767–75.
- [23] Laune D, Molina F, Ferrieres G, Villard S, Bes C, Rieunier F, et al. Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *J Immunol Methods* 2002;267:53–70.
- [24] Bearzatto M, Naserke H, Piquer S, Koczwara K, Lampasona V, Williams A, et al. Two distinctly HLA-associated contiguous linear epitopes uniquely expressed within the islet antigen 2 molecule are major autoantibody epitopes of the diabetes-specific tyrosine phosphatase-like protein autoantigens. *J Immunol* 2002;168:4202–8.
- [25] Trajkovski M, Mziaut H, Altkruger A, Ouwendijk J, Knoch KP, Muller S, et al. Nuclear translocation of an ICAS12 cytosolic fragment couples granule exocytosis and insulin expression in (beta)-cells. *J Cell Biol* 2004;167:1063–74.
- [26] Kolm-Litty V, Berlo S, Bonifacio E, Bearzatto M, Engel AM, Christie M, et al. Human monoclonal antibodies isolated from type 1 diabetes patients define multiple epitopes in the protein tyrosine phosphatase-like IA-2 antigen. *J Immunol* 2000;165:4676–84.
- [27] Dromey JA, Weenink SM, Peters GH, Endl J, Tighe PJ, Todd I, et al. Mapping of epitopes for autoantibodies to the type 1 diabetes autoantigen IA-2 by peptide phage display and molecular modeling: overlap of antibody and T cell determinants. *J Immunol* 2004;172:4084–90.
- [28] Salomonsson S, Sonesson S-E, Ottosson L, Muhallab S, Olsson T, Sunnerhagen M, et al. Ro/SSA autoantibodies directly bind cardiomyocytes, disturb calcium homeostasis, and mediate congenital heart block. *J Exp Med* 2005;201:7–11.
- [29] Galaktionov K, Lee AK, Eckstein J, Draetta G, Meckler J, Loda M, et al. CDC25 phosphatases as potential human oncogenes. *Science* 1995;269: 1575–7.
- [30] Xie H, Notkins AL, Lan MS. IA-2, a transmembrane protein tyrosine phosphatase, is expressed in human lung cancer cell lines with neuroendocrine phenotype. *Cancer Res* 1996;56:2742–4.

Í Different regulated expression of the tyrosine phosphatase-like proteins IA-2 and phogrin by glucose and insulin in pancreatic islets K. Löbner, H. Steinbrenner, G. A. Roberts, Z. Ling, GC. Huang, S. Piquer, D. G. Pipeleers, J. Seissler, M.R. Christie. *Diabetes* 2002; 51:2982-2988.

L'objectiu d'aquest treball va ser l'estudi de la regulació de l'expressió de les molècules d'IA2 i IA2 β així com la relació d'aquesta amb la maduració de la resposta secretora d'insulina en els illots pancreàtics després del naixement. Aquests estudis es van realitzar en:

- illots de rata Wistar de diferents edats (1,5 i 10 dies així com rates adultes de 5 setmanes) aïllats mitjançant digestió per col·lagenassa
- cèl·lules pancreàtiques β i no- β aïllades purificades per sorting a partir d'illots pancreàtics de rates adultes tractats amb tripsina.
- illots humans aïllats mitjançant un protocol modificat basat en el mètode de Ricordi.

L'anàlisi de l'expressió d'ambdues proteïnes en els illots de rata a diferents temps (1, 5, 10 dies i rates adultes) va indicar un augment progressiu de l'expressió de la molècula d'IA2 durant les dues primeres setmanes de vida però no d'IA2 β , on els nivells detectats eren ja elevats en rates d'un dia. Els estudis de secreció d'insulina en resposta a la glucosa (20mM) en els mateixos illots van demostrar un augment progressiu de la secreció d'insulina en resposta a la glucosa durant els primers 10 dies de vida, augment que es correlaciona amb l'augment de l'expressió de la molècula d'IA2. En illots de rata de cinc dies en cultiu es va detectar un augment dels nivells proteics i de

mRNA d α 2 en resposta a la glucosa i a agents que potencien la secreció d'insulina via un augment de l'AMPcíclic (IBMX i forskolina). Per altra banda, els nivells proteics d α 2 així com la seva biosíntesis es van veure incrementats pel tractament dels illots amb insulina, un tractament que no va afectar els nivells de RNA missatger de la molècula. El bloqueig de la secreció de la insulina mitjançant la diazoxida (fàrmac que provoca l'obertura dels canals de potassi), o de l'acció de la insulina amb anticossos contra el receptor de la molècula va inhibir l'augment dels nivells proteics d α 2 induïts per la glucosa mentre que no va tenir cap efecte sobre els nivells de RNA missatger de la molècula. L'expressió d α 2 β no es va veure modificada per cap dels tractaments realitzats.

Els resultats d'aquest estudi indiquen la regulació de la molècula d α 2 a nivell de RNA missatger per part de la glucosa i nivells elevats d'AMPc. Per la seva banda, els nivells proteics de la molècula es troben modulats per la insulina secretada localment a través de l'estimulació de la seva biosíntesis. L'expressió d α 2 β no es veu modificada per cap dels factors modificadors de la funció β cel·lular utilitzats en aquest treball. Així doncs, aquest estudi demostra una regulació diferencial d α 2 i α 2 β , dues proteïnes altament homòlogues que formen part dels grànuls de secreció i identifica l α 2 com una proteïna sota la regulació autocrina de la insulina.

Different Regulated Expression of the Tyrosine Phosphatase-Like Proteins IA-2 and Phogrin by Glucose and Insulin in Pancreatic Islets

Relationship to Development of Insulin Secretory Responses in Early Life

Kristian Löbner,¹ Holger Steinbrenner,² Graham A. Roberts,¹ Zhidong Ling,³ Guo-Cai Huang,¹ Sandra Piquer,⁴ Daniel G. Pipeleers,³ Jochen Seissler,² and Michael R. Christie¹

IA-2 and phogrin are tyrosine phosphatase-like proteins that may mediate interactions between secretory granules and cytoskeleton in islets and neuroendocrine tissues. We investigated factors that regulate IA-2 and phogrin expression and their relationship to maturation of insulin secretory responses that occur after birth. Islet content of IA-2, but not phogrin, increased during the first 10 days of life in rats, when insulin secretion in response to glucose increased to adult levels. In cultured 5-day-old rat islets, IA-2 protein and mRNA was increased by glucose and agents that potentiate insulin secretion by the cAMP pathway. Addition of insulin increased IA-2 protein levels and insulin biosynthesis without affecting IA-2 mRNA. Blocking insulin secretion with diazoxide or insulin action with insulin receptor antibodies inhibited glucose-induced increases in IA-2 protein, but not those of mRNA. Phogrin expression was unchanged by all agents. Thus, IA-2 is regulated at the mRNA level by glucose and elevated cAMP, whereas locally secreted insulin modulates IA-2 protein levels by stimulating biosynthesis. In contrast, phogrin expression is insensitive to factors that modify β -cell function. These results demonstrate differential regulation of two closely related secretory granule components and identify IA-2 as a granule membrane protein subject to autocrine regulation by insulin. *Diabetes* 51:2982–2988, 2002

From the ¹Department of Medicine, Guy's, King's and St. Thomas's School of Medicine, King's College London, London, U.K.; the ²German Diabetes Research Centre, University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; the ³Diabetes Research Center, Free University of Brussels (VUB), Brussels, Belgium; and the ⁴Department of Medicine, San Raffaele Institute, Milan, Italy.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Michael R. Christie, Department of Medicine, Guy's, King's and St. Thomas's School of Medicine, King's College London, Bessemer Road, London SE5 9PJ, U.K. E-mail: michael.christie@kcl.ac.uk

Received for publication 9 April 2002 and accepted in revised form 26 June 2002.

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HBSS, Hanks' balanced salt solution; PMA, phorbol myristic acid; PTP, protein tyrosine phosphatase; TBS, Tris-buffered saline.

2982

Glucose is the major regulator of β -cell function, stimulating the transcription, translation, and secretion of insulin (1,2). Recent studies have demonstrated that insulin secreted in response to glucose can stimulate insulin gene transcription, thereby contributing to increased hormone biosynthesis by an autocrine positive-feedback mechanism. Evidence is emerging that glucose-regulated transcription of other β -cell proteins, such as glucokinase, may also be mediated in part by insulin signaling (3). Defective insulin action on pancreatic β -cells has been suggested to contribute to impaired insulin secretion and may have relevance to insulin deficiency in type 2 diabetes (4). Understanding the influence of insulin on pancreatic β -cell function requires identification of proteins relevant to the secretory process whose expression or activity is regulated by insulin. Glucose stimulates biosynthesis of a number of β -cell proteins, many of which localize to insulin secretory granules and are therefore likely to participate in insulin storage or secretion (5). The identities of these glucose-response proteins and the contribution of insulin signaling to their increased synthesis are largely unknown.

IA-2 (ICA512 and PTP35) and phogrin (IA-2 β and PTP-NP) are closely related protein tyrosine phosphatase (PTP)-like proteins localized to secretory granules in islets and other neuroendocrine tissues. Despite having PTP-like structure, both IA-2 and phogrin fail to dephosphorylate artificial substrates as a result of substitution of key amino acid residues in the catalytic center (6). Homologues of IA-2 and phogrin with catalytically inactive PTP domains have been described in species as distinct as *C. elegans* and zebrafish (7), indicating a high degree of conservation of the proteins. IA-2 and phogrin are synthesized as precursors of >100 kDa that are cleaved within the granule lumenal domain to generate mature proteins of ~66 kDa. The proteins are subject to further post-translational modifications, including glycosylation and phosphorylation. Phogrin is phosphorylated in intact β -cells on stimulation of insulin secretion, suggesting that the protein is a target for secretagogue-activated protein kinases (8,9). Both IA-2 and phogrin associate with the cytoskele-

DIABETES, VOL. 51, OCTOBER 2002

ton, and direct interaction with the cytoskeletal-associated proteins β IV spectrin and β 2-syntrophin has been demonstrated for IA-2 (10,11). Furthermore, stimulation of insulin secretion is associated with calpain-mediated cleavage of IA-2, which is proposed to result in mobilization of secretory granules from the cytoskeleton, facilitating exocytosis (12).

In situ hybridization studies have shown that phogrin is expressed very early in fetal pancreas development, before the appearance of islet hormones, and expression persists throughout fetal life (13). In contrast, IA-2 is only transiently expressed in a population of immature endocrine cells early in rat fetal islet development, but a progressive increase in IA-2 expression occurs during the first 2 weeks after birth (14). Factors that regulate IA-2 gene transcription may include glucose and other agents that increase intracellular cAMP (15); regulation of phogrin expression is rarely studied. The aim of this study is to further define the relative roles of glucose and insulin in the regulation of IA-2 and phogrin expression in pancreatic islets and to investigate the relationship of these to insulin secretory responses.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Antibodies. Mouse monoclonal antibodies 76F and 3C12 against the cytoplasmic domain of IA-2 were generated as previously described (14). Rabbit antibody to the α subunit of the insulin receptor (type A and B) was from Biogenesis (Poole, U.K.). Polyclonal guinea pig anti-serum to phogrin (16) was a kind gift of J. Hutton (Barbara Davis Center, Denver, CO), and guinea pig anti-insulin antiserum was kindly provided by P. Jones (King's College, London).

Islet isolation and culture. Rat islets were isolated from Wistar rats of different ages (aged 1, 5, and 10 days and 5-week-old adults). Animals were kept according to the guidelines of the U.K. home office and killed by cervical dislocation. Islets from juvenile rats (aged 1, 5, or 10 days) were isolated by collagenase digestion (Roche Diagnostics, Lewes, U.K.) and enrichment on a discontinuous Percoll gradient (17). Adult rat islets were isolated by collagenase digestion after intraductal perfusion of the pancreas with collagenase P and DNase and enriched on a three-step discontinuous BSA gradient (18). Single pancreatic β -cells (>95% pure) and non- β -cells were purified from trypsin-dissociated adult rat islet cells by autofluorescence-activated cell sorting (19).

Human islets were isolated from pancreata of cadaveric organ donors by modifications of the automated method of Ricordi (20,21). Approved informed consent was obtained from the relatives of organ donors. Isolated human islet preparations (60–80% purity) were stained with dithizone before selection under the dissection microscope to >95% purity. Human islets were exposed to dithizone for <5 min, conditions that have no effect on β -cell function (22).

After enrichment, islets (200 islets per condition) were cultured in 60-mm culture dishes in RPMI medium. Isolated pancreatic β -cells and non- β -cells were reaggregated (19) and incubated at $1-3 \times 10^5$ cells per dish in HAM's F10 medium for 9 days. The medium contained 3, 6, 10, or 20 mmol/l glucose in combination with agents indicated in the text or figures. In some experiments, insulin signaling was blocked with an antibody to the insulin receptor. At the concentration used, the antibody inhibited insulin-stimulated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in Hep-G2 cells but was without effect on IGF-1-stimulated phosphorylation (data not shown). After culture, islets were analyzed for IA-2, phogrin, and insulin protein and mRNA and for insulin secretion in response to secretagogues. Accumulated insulin in the culture medium was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

IA-2 and phogrin protein levels. Isolated islets were washed in HEPES-buffered saline and prepared for Western blotting with monoclonal antibodies to IA-2 as previously described (14). The integrated optical density of bands representing IA-2 was measured by densitometry and compared with a standard curve of purified recombinant IA-2 (23) run on each blot. The interassay variability of IA-2 protein measurements in 10 independent blots was <20%, and the intra-assay variation was <8%.

IA-2 biosynthesis was assessed by 35 S-methionine/cysteine incorporation and detection by immunoprecipitation and autoradiography. Isolated adult rat islets (200 per condition) were incubated for 2 h at 37°C in 100 μ l HEPES-buffered Hanks' balanced salt solution (HBSS) containing 1 mg/ml BSA, 6 mmol/l glucose, 10% methionine, cysteine-deficient amino acid mix (Amer-

sham-Pharmacia Biotech, Amersham, U.K.), and 4 MBq EasyTag Express protein labeling mix (NEN, Hounslow, U.K.) in the presence or absence of 10 nmol/l insulin. Islets were lysed (14) and immunoprecipitated with monoclonal IA-2 antibody 76F or an irrelevant control antibody. Immune complexes were isolated on protein A Sepharose and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography.

IA-2 degradation was studied in pulse-chase experiments. Islet proteins were labeled for 1 h at 37°C in 100 μ l HEPES-buffered HBSS containing 1 mg/ml BSA, 20 mmol/l glucose, 10% methionine, cysteine-deficient amino acid mix, and 12 MBq EasyTag Express protein labeling mix. Islets were either collected immediately or after a 12-h chase period in RPMI medium containing 6 mmol/l glucose with or without 10 nmol/l insulin. Radiolabeled islet IA-2 was detected by immunoprecipitation and autoradiography as described above.

Quantitative RT-PCR of IA-2, phogrin, and insulin mRNA. RNA from 20 islets per condition was isolated using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. A sample of 500 ng total RNA was transcribed with poly d(T)₁₈-primers to cDNA using Expand Reverse Transcriptase (Roche Diagnostics). The cDNA was purified using the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics).

Expression of IA-2, phogrin, and insulin mRNA was analyzed by quantitative real-time RT-PCR using the FastStart DNA Master SybrGreen I Kit in the LightCycler system (Roche Diagnostics). To generate control templates for the quantification, we cloned rat β -actin (478–819 bp), IA-2 (1642–2463), phogrin (1923–2048), and insulin (4243–4538) cDNA fragments from INS-1 rat insulinoma cells by RT-PCR into the pGEM-T Easy vector (Promega, Mannheim, Germany) (15). Sequencing confirmed 100% identity to published sequences. Control plasmids were linearized by restriction digestion with *Apa*I, *Pst*I, or *Eco*RI and purified using the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics).

PCRs were run in glass capillaries (Roche Diagnostics) in a 20- μ l volume containing 2 μ l FastStart DNA SybrGreen I mix, 3 mmol/l MgCl₂, 0.5 μ mol/l of each primer, and 2 μ l control template (standard) or cDNA. PCR conditions were 10 min denaturing at 95°C followed by 40 cycles of 15 s at 95°C, 5 s annealing, and 10 s at 72°C. To exclude amplification of traces of genomic DNA, intron-spanning primers were chosen. Primer pairs and annealing temperatures for each mRNA species were as follows: β -actin 342-bp fragment: 5'-ACCCACACTGTGCCATCTA-3' and 5'-GCCACAGGATTCATAC CCA-3' (58°C); IA-2 114-bp fragment: 5'-TGCCTCATGTCTTACTCTG-3' and 5'-GGCGCTCCTTATCCGTTGTTT-3' (63°C); phogrin 149-bp fragment: 5'-CCTGCATCTGGCGTTCTCTG-3' and 3'-ACGTTGGCGGATAGCTC CTGTA-5' (68°C); insulin-1 164-bp fragment: 5'-ACCCAAGTCCCGTGT GAAGT-3' and 5'-CCAGTTGGTAGAGGAGCAGATG-3' (61°C).

Amplification products were detected after each run by measurement of fluorescence intensity at 530 nm. A melting curve analysis was performed to confirm the specificity of the amplified PCR product. A set of four standards was used for quantification of each gene product run in parallel with the cDNA samples under identical PCR conditions. Standard curves were generated by serial dilutions of the control templates ranging from 10^7 to 10^4 copies (β -actin), 10^6 to 10^3 copies (IA-2 and phogrin), and 10^8 to 10^5 copies (insulin). The crossing cycle numbers of the logarithmic linear PCR phase of the standards were plotted against the logarithm of their concentrations. From the standard curves, cDNA copy numbers were interpolated by the LightCycler data analysis software using the Fit Points method as described in the manufacturer's instructions. β -actin was used to normalize the probes to equal mRNA/cDNA levels. Data were calculated as copy number IA-2, phogrin, or insulin mRNA relative to β -actin.

Insulin secretion assays. The ability of freshly isolated or cultured islets to secrete insulin was assessed over a 2-h period in a static assay. Cultured islets of average size were selected under the stereomicroscope, washed, transferred into 96-well plates, and incubated for 2 h at 37°C in Krebs-balanced salt solution containing BSA (1 mg/ml) and 2 or 20 mmol/l glucose. Ten samples of one islet each were run in parallel for every condition. After 2 h, the insulin content of the supernatant was quantified by ELISA.

Insulin secretion was expressed relative to the DNA content of islets in each sample. After incubation, islets were sonicated in 100 μ l PBS containing 2 mmol/l EDTA. After the addition of Hoechst 33258 solution, fluorescence of the samples was determined (excitation 360 nm, emission 460 nm) and compared with a standard curve of DNA.

Insulin ELISA. Insulin in islet extracts and cell supernatants was measured by competitive ELISA. Elisa plates (Maxisorb; Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with guinea pig anti-insulin antibody, blocked with BSA (5 mg/ml in Tris-buffered saline [TBS]/BSA), and subsequently incubated for 2 h with the insulin-containing sample and biotinylated insulin in TBS/BSA. Biotinylated insulin captured on the plate was detected with Streptavidin-alkaline phosphatase and developed with *p*-nitrophenyl phosphate. All samples were

REGULATION OF ISLET IA-2 EXPRESSION

analyzed in duplicate and insulin concentration determined from a standard curve of rat insulin included on each plate. The detection range of the assay, defined as the limits within which the coefficient of variation between 10 independent assays was <20%, was 20–3,500 pg.

Statistical analysis. The significance of differences between groups was analyzed by Student's *t* test or ANOVA, as appropriate.

RESULTS

Islet expression of IA-2 and phogrin after birth. We previously described a progressive increase with age in the islet IA-2 detected by immunohistochemistry on pancreas tissue sections of rats during the first 2 weeks of life (5). We set out to confirm these findings at the molecular level and to extend our observations to the closely related protein, phogrin (IA-2 β). IA-2 and phogrin contents of extracts of isolated islets from rats of different ages (1, 5, 10 days and adult) were analyzed by Western blotting (Fig. 1A). Both IA-2 and phogrin resolved as two to three major bands of ~66,000 Mr (Fig. 1A), which represent different post-translationally modified forms of the proteins (8,24). IA-2 was detected at very low levels in islets from 1-day-old rats, but increased progressively with age during the first 10 days of life. In contrast, phogrin levels were already high at 1 day of age and showed little variation in the older animals (Fig. 1B). These results extend the previous *in situ* hybridization studies indicating that phogrin is already expressed at the protein level in islets at birth and confirm that stable high expression of IA-2 is not detected until days or weeks after birth.

Islet IA-2 content was compared with acute insulin secretory responses to 20 mmol/l glucose of islets from rats of different ages to determine to what extent increases in IA-2 content are associated with changes in islet function. IA-2 levels within the islet were quantified by densitometry of Western blots and comparison with known amounts of recombinant protein. Both IA-2 content (Fig. 1C) and insulin secretion in response to 20 mmol/l glucose (Fig. 1D) progressively increased during the first 10 days of life ($P < 0.0001$). In contrast to changes in IA-2 content and insulin secretory responses, the islet insulin content was not influenced by age (Fig. 1C).

Regulation of IA-2 protein expression in isolated islets *in vitro*. To understand causes of increased islet IA-2 after birth, we investigated factors that regulate IA-2 protein expression in neonatal rat islets *in vitro*. Glucose is a major stimulator of β -cell function and has been shown to upregulate a number of secretory granule proteins in isolated pancreatic islets (5). We therefore studied the influence of glucose on IA-2 content of islets from 5-day-old and adult rats cultured between 4 h and 10 days. Glucose stimulated IA-2 protein levels of islets from 5-day-old rats, with maximal effect after 48 h incubation at 10 mmol/l glucose (Fig. 2). Stimulatory effects of glucose were also observed in adult rat islets, although IA-2 content of freshly isolated islets was higher and stimulation less marked than in neonatal islets (Fig. 2). After sorting of dissociated islets into pancreatic β -cells and non- β -cells, there was no significant difference in IA-2 levels between the freshly sorted cell populations, but after culture, IA-2 levels were increased in the β -cells at 20 mmol/l glucose ($P < 0.05$) (Fig. 2).

Glucose-mediated increases in islet IA-2 content could represent direct effects of glucose or be secondary to autocrine action of secreted insulin. Stimulators and po-

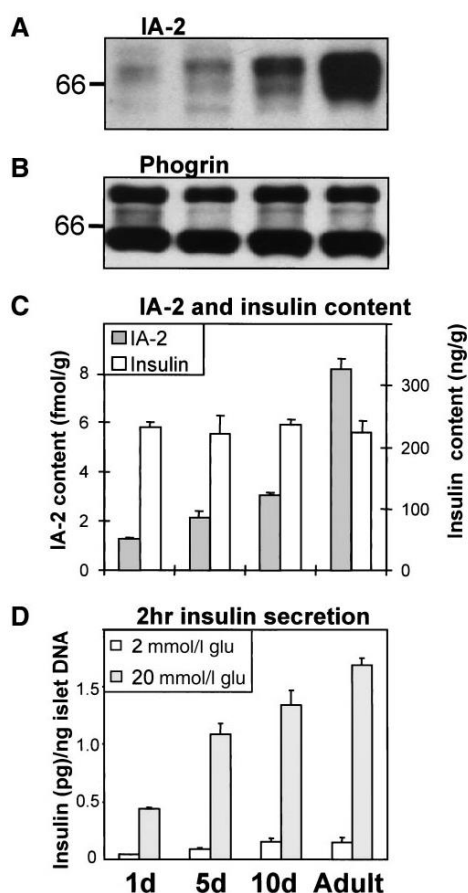


FIG. 1. Effect of age on islet IA-2 and phogrin expression and insulin secretion. Islets were isolated from juvenile rats of 1, 5, and 10 days of age or adult rats. Islet extracts containing 10 μ g protein from rats of different ages were subjected to Western blotting for IA-2 (A) and phogrin (B). Both proteins resolve predominantly as two to three bands with Mr between 60 and 70 kDa. The mobility of the 66,000-Mr marker on SDS-PAGE is indicated (66). C: IA-2 content of islets of rats of different ages was measured by quantitative Western blotting (gray columns) and compared with the insulin content of the islets measured by ELISA (open columns). D: Insulin secretion by islets over 2 h in response to 2 or 20 mmol/l glucose (glu). Results of protein content and insulin secretion are presented as the means \pm SE of three independent experiments.

tentiators of secretion, such as tolbutamide or agents that increase cAMP (IBMX and forskolin) or activate protein kinase C (phorbol myristic acid [PMA]), all increased islet IA-2 content at 6 mmol/l glucose ($P < 0.0001$) (Fig. 3). This stimulation was accompanied by an increase in insulin secretion into the medium (Fig. 3). Exogenous insulin (3–16 nmol/l) increased IA-2 protein expression when added to medium containing 6 mmol/l glucose ($P <$

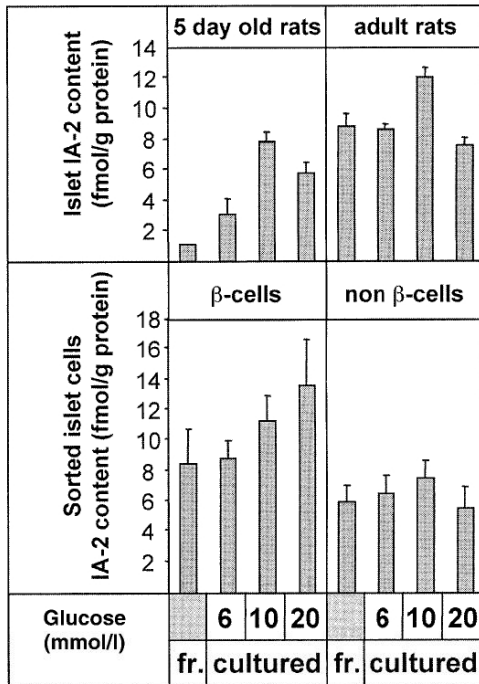


FIG. 2. Effect of glucose on islet IA-2 content. Islets isolated from 5-day-old or adult rats or dissociated islet cells, sorted into β -cell and non- β -cell populations, were cultured for 2 days in medium containing 6, 10, or 20 mmol/l glucose. Levels of IA-2 in freshly isolated (fr) or cultured islets were measured by quantitative Western blotting. Results are expressed as means \pm SE of three independent experiments with different batches of islets.

0.0001) (Fig. 3). IGF-1 also increased IA-2 content, an effect that was not inhibited by addition of an insulin receptor antibody. Glucose (10 mmol/l)-induced increases in islet IA-2 levels were abolished by blocking insulin binding to its receptor with an insulin receptor antibody. Diazoxide-mediated inhibition of glucose-induced insulin secretion blocked glucose-induced increases in IA-2 expression, an effect that could be partially reversed by exogenous insulin (Fig. 3).

In contrast to the results for IA-2, levels of phogrin protein in islets from 5-day-old rats were not altered by glucose, diazoxide, or tolbutamide (Fig. 4A). In adult human islets, similar effects of glucose, insulin, and insulin receptor antibodies on IA-2 protein levels could be observed ($P < 0.05$) (Fig. 4B), confirming that the observations in rat islets are relevant to human physiology.

Regulation of islet IA-2 and phogrin mRNA content. Insulin-regulated expression of two islet proteins, glucokinase and insulin, occurs at the level of gene transcription (3,25,26), and evidence for transcriptional regulation of IA-2 by agents that increase cAMP in β -cell lines has been presented (15). To understand the contribution of tran-

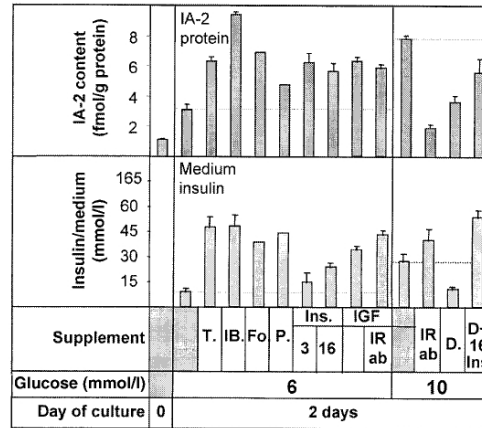


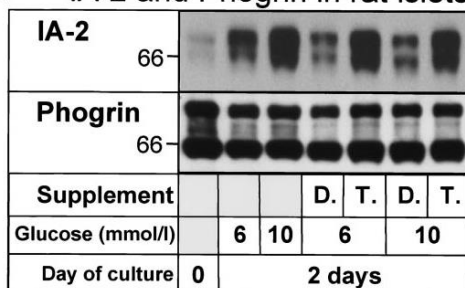
FIG. 3. Effect of agents on islet IA-2 content and insulin secretion. Islets isolated from 5-day-old rats were cultured for 2 days in 6 or 10 mmol/l glucose, either alone or supplemented with 1 mmol/l tolbutamide (T), 0.1 mmol/l IBMX (IB), 10 μ mol/l forskolin (Fo), 100 nmol/l PMA (P), 3 or 16 nmol/l insulin (Ins), 10 nmol/l IGF, 1 μ g/ml insulin receptor antibody (IR ab), or 0.4 mmol/l diazoxide (D) as indicated. IA-2 protein levels of freshly isolated or cultured islets were measured by quantitative Western blotting, and insulin secreted into the culture medium was determined by ELISA. Results are presented as the means \pm SE of three to four independent experiments, except for forskolin and PMA ($n = 2$).

scriptional regulation of IA-2 by glucose, insulin, and other agents, we compared IA-2 protein and mRNA levels in islets from 5-day-old rats using similar conditions as described above. Glucose (10 mmol/l) and IBMX both stimulated IA-2 protein and mRNA by two- to threefold ($P < 0.005$) (Fig. 5), and similar effects were seen with forskolin and PMA (data not shown). In contrast, tolbutamide and exogenous insulin increased IA-2 protein levels in the absence of equivalent increases in mRNA (Fig. 5). Anti-insulin receptor antibodies and diazoxide blocked glucose-stimulated increases in IA-2 protein levels without diminishing the IA-2 mRNA. These data show that insulin exerts a strong influence on the regulation of IA-2 protein levels but not of IA-2 mRNA. IA-2 mRNA levels are regulated by glucose and substances that increase intracellular cAMP. The phogrin mRNA copy number was 10-fold lower than for IA-2 but was not significantly influenced by glucose, forskolin, or IBMX (Fig. 6).

Post-transcriptional regulation of IA-2. Metabolic labeling experiments were performed to determine whether post-transcriptional regulation of IA-2 levels by insulin occurs at the level of protein biosynthesis or degradation. Islets were incubated for 2 h in the presence of 35 S-methionine and radiolabeled IA-2 immunoprecipitated with a specific antibody and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. Newly synthesized radiolabeled IA-2 was almost undetectable on incubation of islets at 6 mmol/l glucose, but synthesis was stimulated in the presence of insulin (Fig. 7A). Pulse-chase experiments indicated that degradation of IA-2 was slow, and insulin did not alter the intensity of 66,000-Mr IA-2 bands after a 12-h chase (Fig. 7B).

REGULATION OF ISLET IA-2 EXPRESSION

A IA-2 and Phogrin in rat islets



B IA-2 in human islets

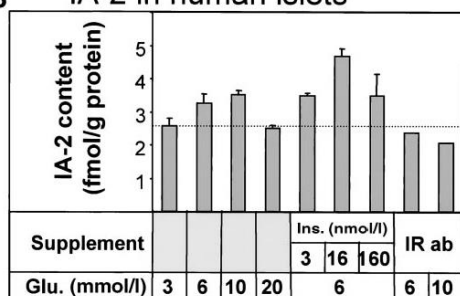


FIG. 4. Influence of agents on IA-2 and phogrin protein levels in rat and human islets. *A:* Islets isolated from 5-day-old rats were cultured for 2 days in the presence of 6 or 10 mmol/l glucose alone or supplemented with 0.4 mmol/l diazoxide (D) or 1 mmol/l tolbutamide (T). Islet IA-2 and phogrin in freshly isolated or cultured islets were detected by Western blotting. *B:* Isolated human islets were cultured for 2 days in medium containing 3, 6, 10, or 20 mmol/l glucose (Glu) alone or in combination with exogenous insulin (Ins) or blocking antibodies to the insulin receptor (IR ab). After culture, the IA-2 protein levels were determined by quantitative Western blotting. Results are presented as the means \pm SE of three to four independent experiments, except for insulin receptor antibody ($n = 2$).

DISCUSSION

Insulin secretion in response to glucose and other secretagogues is low throughout fetal life in humans and rodents and these responses increase after birth (27–30). Poor secretory responses appear not to be a consequence of inadequate insulin content of β -cells. Low levels of expression or activity of glucose transporters and metabolic enzymes may contribute (31,32), but other components of the secretory machinery may also be deficient in fetal and early neonatal life. The present study demonstrates that development of regulated insulin secretion after birth is accompanied by an increase in islet levels of IA-2, a tyrosine phosphatase-like protein that is proposed to mediate interactions of secretory granules with the islet cytoskeleton (12). The age-dependent increase in IA-2 levels is specific; similar increases were not detected for the closely related granule protein phogrin or for insulin. Islets from neonatal rats could be stimulated to express

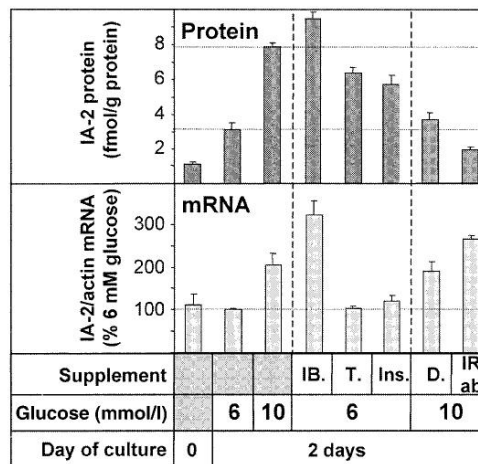


FIG. 5. Comparison of IA-2 protein and mRNA levels. Islets isolated from 5-day-old rats were cultured and IA-2 protein levels (dark columns) determined as described in Fig. 3. Culture media were supplemented with 0.1 mmol/l IBMX (IB), 1 mmol/l tolbutamide (T), 16 nmol/l insulin (Ins), 0.4 mmol/l diazoxide (D), or 1 μ g/ml insulin receptor antibody (IR ab) where indicated. IA-2 mRNA levels (light columns) in the same samples were analyzed by LightCycler PCR (Roche Diagnostics), normalized to actin levels in the samples, and expressed as a percentage of values at 6 mmol/l glucose. Results are presented as the means \pm SE of three independent experiments.

adult levels of IA-2 by culture with stimulatory concentrations of glucose. Islets from adult rats also show glucose-stimulated increases in IA-2, although these were less marked than in immature rats. Glucose effects are seen in isolated β -cells from adult rats, whereas IA-2 content did not change on glucose treatment of non- β -cells. IA-2 is thus a “glucose response protein” in β -cells (33) and may represent one of the components of islet secretory gran-

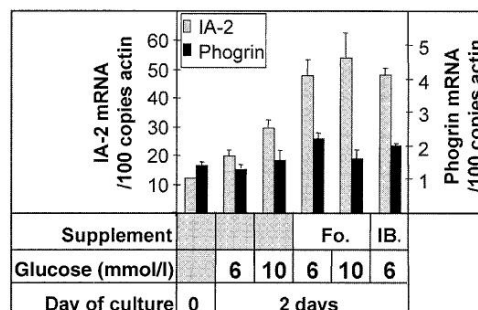


FIG. 6. Influence of agents on IA-2 and phogrin mRNA levels. Islets isolated from 5-day-old rats were cultured as described in Fig. 3. Culture media were supplemented with 10 mmol/l forskolin (Fo) or 0.1 mmol/l IBMX (IB) where indicated. After culture, islet IA-2 (light columns) and phogrin (dark columns) mRNA levels were determined by LightCycler PCR (Roche Diagnostics) and normalized to actin copy number. Scales for vertical axes differ for IA-2 and phogrin. Results are presented as the means \pm SE of three independent experiments.

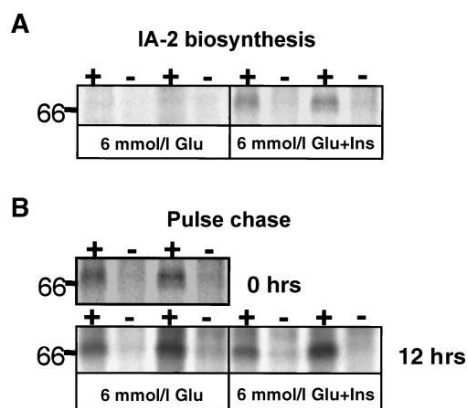


FIG. 7. Effect of insulin on IA-2 biosynthesis and degradation. **A:** IA-2 biosynthesis in adult rat islets was determined by ³⁵S-methionine and cysteine incorporation for 2 h at 6 mmol/l glucose (Glu) in the absence or presence of 10 nmol/l insulin (Ins) followed by immunoprecipitation with monoclonal antibody to IA-2 (+) or control antibody (-). Radiolabel incorporation into 66 kDa IA-2 was visualized by SDS-PAGE and autoradiography. **B:** Pulse-chase experiments were performed to assess IA-2 degradation. Adult rat islets were labeled with ³⁵S-methionine and cysteine during a 1-h pulse at 20 mmol/l glucose and chased for 12 h at 6 mmol/l glucose (Glu) in the absence or presence of 10 nmol/l insulin (Ins). Radiolabelled IA-2 was detected by immunoprecipitation as in **A**.

ules previously shown to be increased by glucose (8). However, the major effect of glucose appears to be indirect and mediated by local effects of secreted insulin. Thus, blocking insulin secretion with diazoxide, or inhibiting insulin action on the islet insulin receptor antibodies, can abolish the stimulation of islet IA-2 levels by glucose. Other stimulators of insulin secretion, such as IBMX, PMA, or tolbutamide, upregulate IA-2 protein. Insulin itself increases islet IA-2 levels and reverses the inhibitory effects of diazoxide. These results identify insulin as a major regulator of IA-2 expression and the dominant mediator of the stimulatory effects of glucose on islet IA-2 levels in vitro.

Tyrosine phosphorylation of the insulin receptor and its substrates IRS-1 and IRS-2 are early events in insulin signaling, and phosphorylation of all three signaling molecules has been demonstrated in β -cells in response to both insulin and glucose (34,35). The IRS family of proteins are also substrates for the IGF-1 receptor. IGF-1 was also found to stimulate IA-2 expression, an effect that was not inhibited by insulin receptor antibodies, and is therefore likely to be mediated by its own receptor. These observations are consistent with IA-2 expression being regulated via signaling pathways common to both insulin and IGF receptors and raise the possibility that both hormones could influence islet IA-2 expression in vivo. A predominant effect of autocrine regulation of IA-2 by secreted insulin is suggested by the strong inhibitory effects on IA-2 expression of insulin receptor antibodies in vitro and the observation that IA-2 expression within islets is induced during the period in early life when insulin secretory responses develop.

Glucose has been shown to stimulate the biosynthesis of a number of proteins in the pancreatic β -cell (5,33), and,

like IA-2, the regulation of these is in part dependent on the local action of secreted insulin. Thus, insulin stimulates the expression of both insulin and glucokinase, with regulation occurring at the level of transcription (3). To determine whether the increases in IA-2 protein observed in this study were also the result of transcriptional control, the influence of glucose, insulin, and insulin secretagogues on IA-2 mRNA was determined by quantitative RT-PCR. Glucose, agents that elevate cellular cAMP levels, or agents that activate protein kinase C each increased islet IA-2 mRNA levels. Increased IA-2 expression in response to elevated cAMP is consistent with the presence of a cAMP response element in the 5'-untranslated region of the IA-2 gene (36). These results confirm and extend previous observations in the Ins-1 cell line (15). However, insulin- and tolbutamide-stimulated IA-2 protein levels were not accompanied by an increase in IA-2 mRNA over the time course studied. Furthermore, antibodies to the insulin receptor did not inhibit glucose-induced increases in IA-2 mRNA. The study therefore identifies two levels of regulation of IA-2 expression: the transcriptional regulation already identified (15), which is mediated by cAMP and protein kinase C, and post-transcriptional regulation through insulin receptor signaling pathways. Because mRNA levels were determined at a single relatively late time point, we cannot exclude that insulin also exerts earlier transient effects on IA-2 gene transcription.

Insulin may stimulate islet IA-2 protein levels by increasing protein translation or by inhibiting protein degradation. Glucose has been shown to stimulate the biosynthesis of a number of islet secretory granule proteins by activating translation (5), an effect that may be dependent on regulation of the initiation phase of mRNA translation by secreted insulin (37). Regulation of IA-2 expression has been studied in rat pituitary cells (38), and increased transcription and translation could only partially account for the accumulation of IA-2 seen by treatment of cells with a combination of estradiol, insulin, and epidermal growth factor. Our own metabolic labeling studies with isolated rat islets indicated that regulation of IA-2 expression by insulin was largely at the level of protein biosynthesis. Pulse-chase experiments indicated that IA-2 degradation is slow at low glucose concentrations and not affected by insulin. Degradation or processing of IA-2 may therefore represent a level of control only under conditions in which exocytosis is stimulated (12).

Phogrin is closely related to IA-2, having a similar structure, tissue distribution, and subcellular localization. However, we found that phogrin levels were not increased by agents that modify β -cell function, indicating that secretory granule membrane components are subject to different modes of regulation. Similarly, there was no age dependence of islet levels of phogrin. Mature levels of phogrin were already detected in the neonate, consistent with in situ hybridization studies on phogrin (described as PTP-NP) in which phogrin mRNA was detected throughout fetal pancreas development (13). Differences in timing of expression of these proteins may have significance in type 1 diabetes, a disease in which both IA-2 and phogrin are targets of autoimmunity. Autoantibody reactivity to phogrin largely occurs as a result of cross-reactivity with the homologous regions on IA-2 (39), and different levels

REGULATION OF ISLET IA-2 EXPRESSION

of expression and mechanisms of regulation, particularly in fetal and neonatal periods important for induction of immunological self-tolerance, may contribute to the higher susceptibility of IA-2 to autoimmunity. Understanding differences in regulation of IA-2 and phogrin is important to elucidate the roles of these PTP-like molecules in islet function and to determine whether disrupted insulin regulation of IA-2 can contribute to β -cell defects in type 2 diabetes.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the European Union (TMR network CT 970142) and a Medical Research Council Training Fellowship to G.A.R.

The authors thank Drs. Peter Jones, Shanta Persaud, and John Hutton for gifts of antibodies.

REFERENCES

- Docherty K, Clark AR: Nutrient regulation of insulin gene expression. *FASEB J* 8:20–27, 1994
- Ashcroft SJH: Glucocorticoid mechanisms and the control of insulin release and biosynthesis. *Diabetologia* 18:5–15, 1980
- Leibiger B, Leibiger IB, Moede T, Kemper S, Kulkarni RN, Kahn CR, de Vargas LM, Berggren PO: Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells. *Mol Cell* 7:559–570, 2001
- Kahn CR, Bruning JC, Michael MD, Kulkarni RN: Knockout mice challenge our concepts of glucose homeostasis and the pathogenesis of diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13:1377–1384, 2000
- Guest PC, Bailyes EM, Rutherford NG, Hutton JC: Insulin secretory granule biogenesis: co-ordinate regulation of the biosynthesis of the majority of constituent proteins. *Biochem J* 274: 73–78, 1991
- Magistrelli G, Toma S, Isacchi A: Substitution of two variant residues in the protein tyrosine phosphatase-like PTP35/IA-2 sequence reconstitutes catalytic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 227:581–588, 1996
- Cai TM, Krause W, Odenwald WF, Toyama R, Notkins AL: The IA-2 gene family: homologs in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and zebrafish. *Diabetologia* 44:81–88, 2001
- Wasmeier C, Hutton JC: Secretagogue-dependent phosphorylation of phogrin, an insulin granule membrane protein tyrosine phosphatase homologue. *Biochem J* 341:563–569, 1999
- Wasmeier C, Hutton JC: Secretagogue-dependent phosphorylation of the insulin granule membrane protein phogrin is mediated by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 276:31919–1928, 2001
- Cui L, Yu WP, DeAzpurua HJ, Schmidl RS, Pallen CJ: Cloning and characterization of islet cell antigen-related protein-tyrosine phosphatase (PTP), a novel receptor-like PTP and autoantigen in insulin-dependent diabetes. *J Biol Chem* 271:24817–24823, 1996
- Ort T, Maksimova E, Dirx R, Kachinsky AM, Berghs S, Froehner SC, Solimena M: The receptor tyrosine phosphatase-like protein ICA512 binds the PDZ domains of beta2-syntrophin and nNOS in pancreatic beta-cells. *Eur J Cell Biol* 79:621–630, 2000
- Ort T, Voronov S, Guo J, Zawalich K, Froehner SC, Zawalich W, Solimena M: Dephosphorylation of beta2-syntrophin and Ca²⁺/mu-calpain-mediated cleavage of ICA512 upon stimulation of insulin secretion. *Embo J* 20:4013–4023, 2001
- Chiang MK, Flanagan JG: PTP-NP, a new member of the receptor protein tyrosine phosphatase family, implicated in development of nervous system and pancreatic endocrine cells. *Development* 122:2239–2250, 1996
- Roberts C, Roberts GA, Löbner K, Bearzatto M, Clark A, Bonifacio E, Christie MR: Expression of the protein tyrosine phosphatase-like protein IA-2 during pancreatic islet development. *J Histochem Cytochem* 49:767–776, 2001
- Seissler J, Nguyen TB, Aust G, Steinbrener H, Scherbaum WA: Regulation of the diabetes-associated autoantigen IA-2 in INS-1 pancreatic β -cells. *Diabetes* 49:1137–1141, 2000
- Wasmeier C, Hutton JC: Molecular cloning of phogrin, a protein-tyrosine phosphatase homologue localized to insulin secretory granule membranes. *J Biol Chem* 271:18161–18170, 1996
- Brunstedt J: Rapid isolation of functionally intact pancreatic islets from mice and rats by percollTM gradient centrifugation. *Diabetes Metab* 6:87–89, 1980
- Lake SP, Anderson J, Chamberlain J, Gardner SJ, Bell PR, James RF: Bovine serum albumin density gradient isolation of rat pancreatic islets. *Transplantation* 43:805–808, 1987
- Pipeleers DG, in't Veld PA, Van de Winkel M, Maes E, Schuit FC, Gepts W: A new in vitro model for the study of pancreatic A and B cells. *Endocrinology* 117:806–816, 1985
- Ricordi C, Lacy PE, Scharp DW: Automated islet isolation from human pancreas. *Diabetes* 38 (Suppl 1):140–142, 1989
- Branthorst D, Brandhorst H, Hering BJ, Federlin K, Bretzel RG: Islet isolation from the pancreas of large mammals and humans: 10 years of experience. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 103:3–14, 1995
- Hansen WA, Christie MR, Kahn R, Norgaard A, Abel I, Petersen AM, Jorgensen DW, Baekkeskov S, Nielsen JH, Lemmark A: Supravital diathesis staining in the isolation of human and rat pancreatic islets. *Diabetes Res* 10:53–57, 1989
- Löbner K, Khoo-Morgenthaler UY, Seissler J, Morgenthaler NG, Scherbaum WA: Detection of autoantibodies to the diabetes-associated antigen IA-2 by a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Horm Metab Res* 31:686–691, 1999
- Hermel JM, Dirx R, Solimena M: Post-translational modifications of ICA512, a receptor tyrosine phosphatase-like protein of secretory granules. *Eur J Neurosci* 11:2609–2620, 1999
- da Silva Xavier G, Varadi A, Ainscow EK, Rutter GA: Regulation of gene expression by glucose in pancreatic beta-cells (MIN6) via insulin secretion and activation of phosphatidylinositol 3'-kinase. *J Biol Chem* 275:36269–36277, 2000
- Leibiger B, Moede T, Schwarz T, GR Brown, Kohler M, Leibiger IB, Berggren PO: Short-term regulation of insulin gene transcription by glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9307–9312, 1998
- Asplund K: Dynamics of insulin release from the foetal and neonatal rat pancreas. *Eur J Clin Invest* 3:338–344, 1973
- Obenshain SS, Adam PA, King KC, Teramo K, Raivio KO, Raiha N, Schwartz R: Human fetal insulin response to sustained maternal hyperglycemia. *N Engl J Med* 283:566–570, 1970
- Phelps RL, Freinkel N, Rubenstein AH, Kuzuya H, Metzger BE, Boehm JJ, Molsted-Pedersen L: Carbohydrate metabolism in pregnancy. XV. Plasma C-peptide during intravenous glucose tolerance in neonates from normal and insulin-treated diabetic mothers. *J Clin Endocrinol Metab* 46:61–68, 1978
- Grill V, Lake W, Freinkel N: Generalized diminution in the response to nutrients as insulin-releasing agents during the early neonatal period in the rat. *Diabetes* 30:56–63, 1981
- Hughes SJ: The role of reduced glucose transporter content and glucose metabolism in the immature secretory responses of fetal rat pancreatic islets. *Diabetologia* 37:134–140, 1994
- Rorsman P, Arkhammar P, Bokvist K, Hellerstrom C, Nilsson T, Welsh M, Welsh N, Berggren PO: Failure of glucose to elicit a normal secretory response in fetal pancreatic beta cells results from glucose insensitivity of the ATP-regulated K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:4505–4509, 1989
- Collins HW, Buettger C, Matschinsky F: High-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis reveals a glucose-response protein of 65 kDa in pancreatic islet cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5494–5498, 1990
- Rothenberg PL, Willison LD, Simon J, Wolf BA: Glucose-induced insulin receptor tyrosine phosphorylation in insulin-secreting beta-cells. *Diabetes* 44:802–809, 1995
- Velloso LA, Carneiro EM, Crepaldi SC, Boschero AC, Saad MJA: Glucose- and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and its primary substrates IRS-1 and IRS-2 in rat pancreatic islets. *FEBS Lett* 377:353–357, 1995
- Xie J, Zhang B, Lan MS, Notkins AL: Genomic structure and promoter sequence of the insulin-dependent diabetes mellitus autoantigen, IA-2 (PTPRN). *Genomics* 54:338–343, 1998
- Xu G, Marshall CA, Lin T-A, Kwon G, Munivenkatappa RB, Hill JR, Lawrence JC, McDaniel ML: Insulin mediates glucose-stimulated phosphorylation of PHAS-I by pancreatic beta cells: an insulin-receptor mechanism for autoregulation of protein synthesis by translation. *J Biol Chem* 273:4485–4491, 1998
- Lee MS, Dirx R Jr, Solimena M, Dannies PS: Stabilization of the receptor protein tyrosine phosphatase-like protein ICA512 in GH4C1 cells upon treatment with estradiol, insulin, and epidermal growth factor. *Endocrinology* 139:2727–2733, 1998
- Hatfield EC, Hawkes CJ, Payton MA, Christie MR: Cross reactivity between IA-2 and phogrin/IA-2beta in binding of autoantibodies in IDDM. *Diabetologia* 40:1327–1333, 1997

ÍTwo distinctly HLA associated contiguous linear epitopes uniquely expressed within the IA-2 molecule are major autoantibody epitopes of the diabetes-specific tyrosine phosphatase like protein autoantigens¹. M. Bearzatto, H. Naserke, S. Piquer, K. Koczwara, V. Lampasona, A. Williams, MR. Christie, P.J. Bingley, A-G. Ziegler, E. Bonifacio. Journal of Immunology 2002; 168:4202-4208.

Els objectius d'aquest treball eren la identificació dels epítops específics existents en la regió de JM de la molècula d'IA2, on un treball previ del mateix grup va determinar-ne l'existència dins la regió formada pels primers 82 aminoàcids, així com l'estudi de la seva prevalença en familiars de primer grau positius per IA2. Per tal d'assolir el primer objectiu es van utilitzar els sèrums de 19 pacients amb aacs contra la regió JM d'IA2, seleccionats a partir d'una cohort de 217 pacients neodiagnosticats per T1D. El segon objectiu es va aconseguir tot i analitzant 106 sèrums de familiars de primer grau positius per IA2.

La utilització de diferents constructes quimera de les molècules d'IA2 i IA2 β així com mutants delecionats de la molècula d'IA2 en l'anàlisi dels aacs contra IA2 va determinar l'existència de dos epítops a la regió de JM d'IA2, JM1 (aminoàcids 601-620) i JM2 (aminoàcids 621-642). Per tal de poder caracteritzar l'epítop mínim per a la unió dels aacs es van realitzar experiments de competició amb diferents pèptids (20-mer) de la regió de JM. Els resultats d'aquesta part de l'estudi van ser la identificació de dos epítops linears contigus d'aquesta regió, JM1(611-620) i JM2 (621-630). L'estudi de la prevalença dels aacs contra aquests dos epítops en familiars de primer grau va detectar la presència d'aacs contra JM1 i/o JM2 en el 68% (72/104) dels sèrums analitzats. Els aacs contra JM1 es van detectar en 34 i els aacs contra JM2 en 40 dels

sèrums dels familiars de primer grau analitzats. Els aacs contra ambdós epítops només es van detectar en 2 dels sèrums ($p < 0.0001$).

L'anàlisi del genotip HLA dels familiars de primer grau positius per IA2 tot i relacionant-lo amb la reactivitat dels sèrums pels diferents epítops va donar els següents resultats:

Genotip HLA DR	Reactivitat dels anticossos contra IA2 JM			
	JM1 (n=23)	JM2 (n=31)	JM1 i JM2 (n=1)	JM negatiu (n=28)
DR3/4	1(4) ^a	12(39)	0	11(39)
DR13/4	1(4)	6(19)	0	0
DR1/4	0	5(19)	0	1(4)
DR4/y ^b	9(39)	8(26)	1	12(43)
DRx/x ^c	12(52)	1(3)	0	4(14)

^a percentatges en parèntesis.

^b al·lels diferents a DR1, DR3 i DR13.

^c al·lels diferents a DR4.

Es va detectar la mateixa associació entre el genotip HLA DR i els aacs contra JM1 i JM2 quan es van analitzar les mostres de 19 dels pacients neodiagnosticats de T1D utilitzats prèviament en la caracterització de ambdós epítops. En aquesta població, cap dels 8 pacients positius per JM1 i 5 (84%) dels 6 positius per JM2 tenia el genotip HLA DR3/4 ($p < 0.005$), mentre que 5 (62%) dels individus positius per JM1 tenien un genotip HLA sense la presència de l'al·lel DR4.

Els resultats d'aquest estudi identifiquen l'existència de dos epítops linears contigus a la regió de JM de I_A2, específics per a aquesta molècula, JM1 (aminoàcids 611-620) i JM2 (aminoàcids 621-630), contra els quals va dirigida la majoria de la reactivitat dels aacs contra aquesta regió i que són reconeguts per una gran part dels sèrums dels familiars de primer grau positius per IA2. Per altra banda, la presència d'aacs contra un d'aquests epítops és pràcticament mútuament excloent i s'associa a diferents genotips HLA de classe II.

Two Distinctly HLA-Associated Contiguous Linear Epitopes Uniquely Expressed Within the Islet Antigen 2 Molecule Are Major Autoantibody Epitopes of the Diabetes-Specific Tyrosine Phosphatase-Like Protein Autoantigens¹

Massimo Bearzatto,* Heike Naserke,‡ Sandra Piquer,* Kerstin Koczwara,‡ Vito Lampasona,† Alistair Williams,§ Michael R. Christie,¶ Polly J. Bingley,§ Anette-G. Ziegler,‡ and Ezio Bonifacio^{2*}

The related tyrosine phosphatase-like proteins islet Ag (IA)-2 and IA-2 β are autoantigens of type 1 diabetes in humans. Autoantibodies are predominantly against IA-2, and IA-2-specific epitopes are major autoantibody targets. We used the close homology of IA-2 and IA-2 β to design chimeras and mutants to identify humoral IA-2-specific epitopes. Two major IA-2 epitopes that are absent from the related autoantigens IA-2 β and IA-2 Δ 13 splice variant ICA512.bdc were found contiguous to each other within IA-2 juxtamembrane amino acids 611–620 (epitope JM1) and 621–630 (epitope JM2). JM1 and JM2 are recognized by sera from 67% of patients with IA-2 Abs, and relatives of patients with type 1 diabetes having Abs to either JM epitope had a >50% risk for developing type 1 diabetes within 6 years, even in the absence of diabetes-associated HLA genotypes. Remarkably, the presence of Abs to one of these two epitopes was mutually exclusive of the other; JM2 Abs and not JM1 Abs were found in relatives with HLA DR3/4, DR4/13, or DR1/4 genotypes; and the binding of autoantibodies to the JM2 epitope, but not the JM1 epitope, markedly affected proteolysis of IA-2. This is a unique demonstration of HLA-associated B cell responses to epitopes within a single autoantigen in humans and is consistent with modification of Ag processing by specific Ab-influencing peptide presentation by HLA molecules. *The Journal of Immunology*, 2002, 168: 4202–4208.

Islet cell Ag 512 (islet Ag (IA)³-2) and IA-2 β are novel proteins of the protein tyrosine phosphatase (PTP) family (1–4). Both are transmembrane proteins expressed within secretory granules in brain and neuroendocrine cells including the pancreatic islet β cells (4, 5). The amino-terminal intraluminal domains show only modest homology to each other (20%), whereas their cytoplasmic domains are closely related (80%), being characterized by a single PTP-like domain of ~300 amino acids and a short juxtamembrane (JM) portion of 100 amino acids which links the PTP domain to the transmembrane region (1–4). These PTP-like proteins have no or only weak phosphatase activity against common PTP substrates (2, 6) and are postulated to have a regulatory role in secretory granule exocytosis (7–9).

IA-2 and IA-2 β are also major autoantigens of type 1 diabetes (1, 6, 10–12). Autoantibodies to these proteins can be detected in

sera of 60–80% of patients with recent onset type 1 diabetes and their detection in sera of nondiabetic individuals together with other islet autoantibodies such as GADA and IAA is highly predictive for a future development of the disease (13, 14). Humoral autoimmunity is directed to the cytoplasmic portion of the two proteins (15). Autoantibodies specific to the IA-2 JM region and PTP-like domain, specific to the IA-2 β PTP-like domain, and cross-reactive between the IA-2 and IA-2 β PTP-like domains have been identified (15–20). Those directed against IA-2-specific epitopes are frequently detected in the early humoral response, while IA-2 β -specific Abs are relatively infrequent, suggesting that humoral autoimmunity to IA-2 β is secondary to that of IA-2 and arises via epitope spreading (21). Therefore, characterization of the IA-2-specific epitopes may be an important step toward the understanding of the maturation of the autoimmune response against these PTPs.

We previously reported the presence of IA-2-specific epitopes within the first 82 JM IA-2 intracellular amino acids (15). Part of this region is encoded by exon 13 of the *IA-2* gene and is deleted in an alternatively spliced form of IA-2, ICA512.bdc (22). In this study we have used chimeric IA-2/IA-2 β constructs and IA-2 peptides to identify minimal epitopes involved in Ab binding and show that most of the IA-2 JM Ab reactivity is directed against two potentially linear contiguous epitopes with distinct HLA-DR allele associations that are absent in the alternatively spliced ICA512.bdc.

Materials and Methods

Sera

First, to define the minimal epitopes of the IA-2 JM Abs, sera from 19 patients with IA-2 JM Abs were used. These were selected from a cohort of 217 patients with new onset type 1 diabetes previously assayed for IA-2 and IA-2 β Ab epitope reactivity (16). Next, to determine the prevalence of

Departments of *Medicine 1 and †Medicine Laboratory, Istituto Scientifico San Raffaele, Milan, Italy; ‡Institut für Diabetesforschung, Munich, Germany; †Division of Medicine, University of Bristol, Bristol, United Kingdom; and §Department of Medicine, King's College School of Medicine, London, United Kingdom

Received for publication January 17, 2001. Accepted for publication February 13, 2002.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹The study was supported by grants from the European Union (BIOMED 2 project DIABMARKER and TMR project CT970142), the Bundesministerium für Forschung, Bildung und Technologie (BMBF 01KD89030 and 1KD9601), the Alexander von Humboldt Foundation, Diabetes U.K. (RD99/0001886), and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Zi 310/12–1).

²Address correspondence and reprint requests to Dr. Ezio Bonifacio, Department of Medicine 1, Istituto Scientifico San Raffaele, Via Olgettina 60, 20132 Milan, Italy. E-mail address: bonifacio.ezio@hsr.it

³Abbreviations used in this paper: IA, islet Ag; JM, juxtamembrane; PTP, protein tyrosine phosphatase; CI, confidence interval.

Abs to individual IA-2 JM epitopes, sera from 106 IA-2 Ab-positive first-degree relatives of patients with type 1 diabetes were used. These included 20 children participating in the German BABYDIAB study (23), 42 relatives from the Munich family study (24), and 43 relatives from the Barts Oxford family study (25). The 106 IA-2 Ab-positive relatives were from 105 unrelated families and included one sibling pair. Broad Ab reactivity to the IA-2 JM and PTP regions was previously reported in a portion of subjects from these cohorts (16, 21). The relatives had a median age of 11.8 years at Ab testing (interquartile range: 5.2–19.2 years), and 54 developed type 1 diabetes during follow-up (median time to diabetes or last contact if no diabetes: 3.3 years; range: 0.1–14.5 years). All relatives also had auto-antibodies to insulin and/or glutamic acid decarboxylase.

IA-2/IA-2β constructs

Constructs used in this study are shown in Fig. 1. The IA-2₆₀₄₋₉₇₉ (IA-2IC) and IA-2β₇₄₁₋₁₀₃₃ (IA-2βIC) constructs (16) were used to construct the chimeras. All the chimeric constructs were obtained by in-frame joining of different portions of IA-2 and IA-2β using the Seamless (Stratagene, La Jolla, CA) method with appropriate oligonucleotide primers. The correct in-frame sequence of joining boundaries was confirmed by DNA sequencing.

Ab measurements

Abs to each construct were measured by radio binding assay to [³⁵S]methionine-labeled, in vitro transcribed and translated proteins as previously described (16). Purified plasmid DNA of the constructs were obtained by Quantum Prep (Bio-Rad, Hercules, CA) spin columns and in vitro transcribed and translated using the TnT SP6-coupled rabbit reticulocyte lysate system (Promega, Madison, WI) in the presence of 40 μCi of Redivue L-[³⁵S]methionine (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Unincorporated [³⁵S]methionine was removed by gel chromatography on a NAP5 column (Amersham Pharmacia Biotech). In all cases the expected size of the product was confirmed on SDS-PAGE. A total of 20,000 cpm of product in TBST (25 μl of 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Tween 20 (pH 7.4)) was incubated overnight at 4°C with 2 μl of sera and an excess of bacterially expressed intracellular IA-2β to compete out binding to the non-IA-2-specific epitopes of the chimeras and mutants as previously described (16). The quantity necessary for complete inhibition of binding to the IA-2β was determined by titration against sera with high-titer IA-2β-binding Abs. Protein A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) was subsequently added for 1 h, washed five times with 800 μl ice-cold TBST, and counted in a TopPlate beta counter (Canberra Packard, Groningen, The Netherlands). To control for binding efficiency a serum with Abs to PTP epitopes shared between IA-2 and IA-2β and no reactivity to IA-2- or IA-2β-specific epitopes was included in each assay. This serum should not be influenced by mutations from IA-2 to IA-2β because binding is equivalent to both proteins. Sera from IA-2 Ab-negative normal control subjects

were also included in each assay. Positivity against each protein was defined by the upper limit of normal control sera.

Further definition of epitopes within the IA-2 JM region was performed by competition with 20-mer peptides corresponding to IA-2 601–620, IA-2 611–631, IA-2 621–641, and IA-2 631–651. Serum (2 μl) was preincubated with 1 μg of peptide for 1 h at 4°C before testing in the radiobinding assay.

HLA class II typing

HLA DR and DQ typing was performed on DNA using sequence-specific oligonucleotides in 80 of the IA-2 Ab-positive first-degree relatives and in the 19 IA-2 JM Ab-positive patients with type 1 diabetes.

Statistical analysis

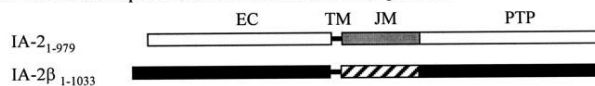
Analyses of the associations of JM Ab specificities with HLA class II alleles and genotypes were performed using Fisher's exact test. Kaplan-Meier survival analysis was used to determine the risk for developing type 1 diabetes. For all statistical methods the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Chicago, IL) was used.

Results

Characterization of IA-2 JM epitopes

To identify the IA-2-specific epitopes within the JM region, IA-2/IA-2β chimeras were made joining different portions of the IA-2 JM with the remaining part of the molecule belonging to IA-2β (Fig. 1). Sera from the 19 patients with IA-2 JM Abs were then tested against these chimeras in the presence of an excess of unlabeled IA-2βIC to inhibit binding to non-IA-2 regions of the chimeras (Table I). Eight sera (nos. 1–8) recognized JM₆₀₁₋₆₂₀, JM₆₀₁₋₆₄₂, JM₆₀₁₋₆₈₂, and JM₆₀₁₋₇₇₇ chimeras, suggesting the presence of at least one epitope within IA-2 residues 601–620. In all eight sera binding could also be obtained against the IA2₁₋₆₃₀ and to IA-2IC, indicating that an IA-2 JM epitope recognized by these sera should be contained within IA-2 residues 604–620 (IA-2 JM1 epitope). In seven of these eight sera, binding to the JM₆₀₁₋₆₈₂ chimera could be totally inhibited by competition with unlabeled JM₆₀₁₋₆₂₀ chimera, suggesting that the IA-2 JM reactivity was solely against the JM₆₀₁₋₆₂₀ epitope, whereas in one serum (no. 8) binding to the JM₆₀₁₋₆₈₂ chimera was only partially inhibited, indicating the presence of Abs to additional IA-2 JM epitopes.

A Schematic representation of IA-2 and IA-2 β proteins



B IA-2/IA-2 β chimeric constructs

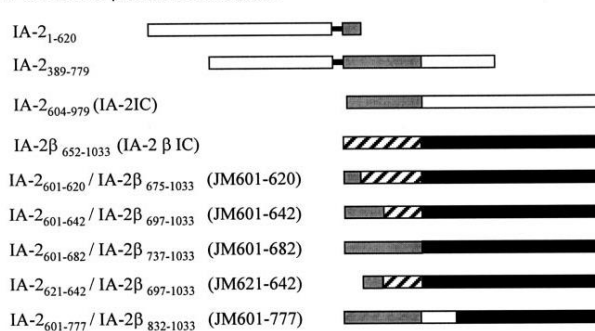


FIGURE 1. Chimeric and mutant constructs used in this study. *A*, Schematic representation of IA-2 and IA-2β indicating the ectodomain (EC), transmembrane region (TM), JM region (shown in gray for IA-2 and hatched for IA-2β), and the PTP-like domain. *B*, Chimeric and deletion constructs with the IA-2 and IA-2β portions represented according to *A*. An abbreviated nomenclature indicating the IA-2 regions of the JM chimeras is given in parentheses.

Table I. Patients with newly diagnosed type 1 diabetes and Abs against IA-2 JM

Patient	Reactivity Against IA-2 Deletion Mutants and IA-2/IA-2 β Chimeras							
	IA-2 ₃₈₂₋₇₇₉ mutant	JM ₆₀₁₋₆₂₀ chimera	JM ₆₀₁₋₆₄₂ chimera	JM ₆₀₁₋₆₈₂ chimera	JM ₆₀₁₋₇₇₇ chimera	IA-2 ₁₋₆₂₀ mutant	JM ₆₂₁₋₆₄₂ chimera	JM ₆₀₁₋₆₈₂ inhibited with JM ₆₀₁₋₆₂₀
1	++	++	++	++	++	+	-	-
2	++	++	++	++	++	+	-	-
3	++	++	++	++	++	+	-	-
4	++	+	+	+	+	+	NT*	-
5	++	+	+	+	+	+	NT	-
6	++	+	+	+	+	+	NT	-
7	+	+	+	+	+	+	NT	-
8	++	+	++	++	++	-	+	+
9	++++	-	++++	++++	++++	-	++	NT
10	++	-	++	++	++	-	+	NT
11	++	-	++	++	++	-	+	NT
12	++	-	++	++	++	-	+	NT
13	+	-	+	+	+	-	+	NT
14	+	-	+	+	+	-	+	NT
15	+++	-	-	-	++	-	NT	NT
16	++	-	-	-	+	-	NT	NT
17	++	-	-	-	-	++	NT	NT
18	+	-	-	-	-	-	NT	NT
19	+	-	-	-	-	-	NT	NT

* NT, Not tested.

Another six sera (nos. 9–14) bound JM₆₀₁₋₆₄₂, JM₆₀₁₋₆₈₂, and JM₆₀₁₋₇₇₇, but not the JM₆₀₁₋₆₂₀ chimera, indicating the presence of an epitope beyond IA-2 aa 620 and up to aa 642. These sera also bound a chimeric construct in which IA-2 aa 601–620 were deleted (JM₆₂₁₋₆₄₂), indicating that the epitope was contained within aa 621–642 and that aa 601–620 were not involved in the formation of this epitope (IA-2 JM2 epitope).

Two sera (nos. 15 and 16) bound the JM₆₀₁₋₇₇₇ chimera, only suggesting the presence of epitope(s) within or extending to the IA-2 PTP region. Three sera (nos. 17–19), despite showing binding to the original IA-2₃₈₉₋₇₇₉ deletion construct, did not bind any of the JM₆₀₁₋₆₂₀, JM₆₀₁₋₆₄₂, JM₆₀₁₋₆₈₂, and JM₆₀₁₋₇₇₇ chimeras. One of these sera (no. 17) bound a truncated IA-2₁₋₆₂₀ protein, suggesting that there is an epitope that includes residues upstream from the intracellular region. For this serum, binding to the original IA-2₃₈₉₋₇₇₉ construct was not inhibited by competition with an IA-2IC construct (data not shown), further suggesting that the nonintracellular portion of IA-2 was essential for binding to this epitope.

Competition with peptides identifies small contiguous IA-2 JM epitopes

Further definition of JM1 and JM2 epitopes was performed using 20-mer peptides to compete the binding to the JM₆₀₁₋₆₈₂ chimera (Fig. 2). Sera with single JM1 or JM2 specificities in the absence of Ab binding to IA-2 PTP or IA-2 β epitopes were used in these competition studies. Binding in sera with JM1 Abs was completely inhibited by competition with IA-2 601–620 and IA-2 611–630 peptides but was unaffected by competition with IA-2 591–610, 621–640, and 631–650 peptides, indicating that the JM1 epitope is contained with IA-2 residues 611–620. Binding in sera with JM2 Abs was completely inhibited by competition with IA-2 611–630 and IA-2 621–640 peptides but was unaffected by competition with IA-2 591–610, 601–620, and 631–651 peptides, indicating that the JM2 epitope is contained within IA-2 residues 621–630.

Abs to JM1 and JM2 epitopes are mutually exclusive of each other

We determined Ab reactivity to the distinct JM1 and JM2 epitopes in 106 IA-2 Ab-positive first-degree relatives of patients with type 1

diabetes (Fig. 3). JM1 Abs were identified by binding to JM₆₀₁₋₆₂₀ and JM₆₀₁₋₆₈₂ chimeras and JM2 Abs by binding to the JM₆₀₁₋₆₄₂ and JM₆₀₁₋₆₈₂ but not the JM₆₀₁₋₆₂₀ chimera. The additional presence of JM2 Abs in sera with JM1 Abs was ascertained when binding to the JM₆₀₁₋₆₈₂ chimera was only partially inhibited by competition with excess unlabeled JM₆₀₁₋₆₂₀ chimera. Sera from 72 (68%) of these 104 relatives had Abs to JM1 and/or JM2 epitopes. IA-2 JM-1 Abs were found in 34 relatives and IA-2 JM-2 Abs were found in 40 relatives. Abs to IA-2 JM-1 and IA-2 JM-2 epitopes were almost mutually exclusive, with only two relatives having Abs to both epitopes ($p < 0.0001$). Nineteen relatives had Abs to either JM1 or JM2 epitopes in the absence of Abs to the IA-2 PTP domain (data not shown).

Abs to the adjacent IA-2 JM1 and JM2 epitopes associate with distinct HLA class II genotypes

We previously reported HLA associations in the type and broadness of IA-2 Ab reactivity that appeared in early childhood (21).

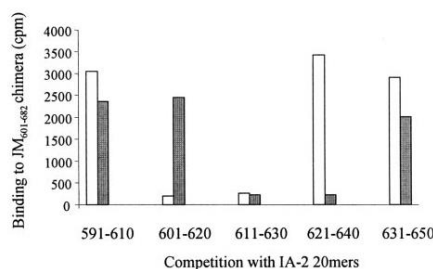


FIGURE 2. Competition of binding to IA-2 JM epitopes with peptides. Binding (cpm) to IA-2₆₀₁₋₆₈₂/IA-2 β ₇₃₇₋₁₀₃₃ by sera with Abs to IA-2 JM1 (open bars) or IA-2 JM2 (gray bars) epitopes in the presence of 1 μ g of IA-2 20-mer peptides. IA-2 peptides 601–620 and 611–630 completely inhibited the binding to the JM1 epitope, whereas peptides 611–630 and 621–640 completely inhibited the binding to the JM2 epitope. Data are from a representative experiment.

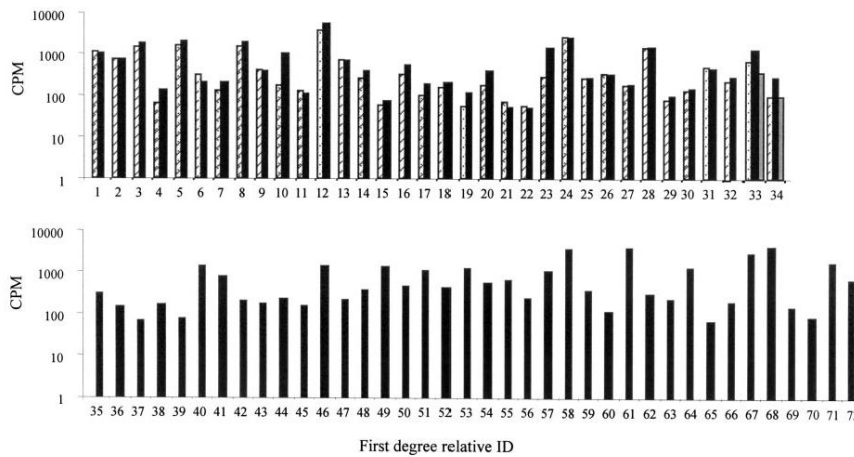


FIGURE 3. IA-2 JM1 and JM2 Abs in first-degree relatives of patients with type 1 diabetes. Binding (cpm after subtraction of the upper limit of control samples) to IA-2₆₀₁₋₆₂₀/IA-2₆₇₅₋₁₀₃₃ (hatched bars) and IA-2₆₀₁₋₆₈₂/IA-2₇₃₇₋₁₀₃₃ (filled bars) is shown for sera from first-degree relatives of patients with type 1 diabetes. When sera were positive against to IA-2₆₀₁₋₆₂₀/IA-2₆₇₅₋₁₀₃₃, the binding to IA-2₆₀₁₋₆₈₂/IA-2₇₃₇₋₁₀₃₃ was competed with excess cold IA-2₆₀₁₋₆₂₀/IA-2₆₇₅₋₁₀₃₃ (gray bars). *Upper panel*, Relatives with JM1 Abs; *lower panel*, JM2 Abs without JM1 Abs. Sera from an additional 34 relatives had no binding to either chimera and are not shown. IA-2 JM1 Abs were identified by binding to the JM₆₀₁₋₆₂₀ and JM₆₀₁₋₆₈₂ chimeras and an accompanying inhibition of binding to JM₆₀₁₋₆₈₂ chimera by competition with JM₆₀₁₋₆₂₀. JM2 Abs were identified by binding to 601–642 (data not shown) and 601–682 chimeras, but not the JM₆₀₁₋₆₂₀ chimera. The additional presence of JM2 Abs in sera with JM1 Abs was ascertained when binding to the JM₆₀₁₋₆₈₂ chimera was only partially inhibited by competition with excess unlabeled JM₆₀₁₋₆₂₀ chimeras (subjects 33 and 34).

Children with the high diabetes risk HLA DR3/4 or DR4/4 genotypes developed broad IA-2 Ab reactivity to multiple IA-2 epitopes, whereas those without these genotypes often developed Abs to the IA-2 JM region before PTP Abs. HLA DR typing was available in 83 of the 106 IA-2 Ab-positive relatives in this study, including 28 with no IA-2 JM Abs, 23 with JM1 Abs only, 31 with JM2 Abs only, and 1 with both JM1 and JM2 Abs (Table II). HLA genotypes in the 23 relatives with JM1 Abs only differed markedly from those of the relatives with JM2 Abs only or no JM Abs. Fewer than half (11 of 23) of the JM1 Ab-positive relatives had DR4-containing genotypes, whereas 30 of 31 JM2 Ab-positive and 24/28 IA-2 JM Ab-negative relatives had HLA DR4 ($p < 0.0001$, JM1 Ab positive vs JM2 Ab positive; $p < 0.01$, JM1 Ab positive vs JM Ab negative). Moreover, HLA DR genotypes found in JM2 Ab-positive or JM-negative relatives were relatively restricted when compared with those in relatives with JM1 Abs. The high diabetes risk DR3/4 genotype was present in 12 (39%) JM2 Ab-positive relatives and 11 (39%) JM Ab-negative relatives com-

pared with only one (4%) of the JM1 Ab-positive relatives ($p < 0.005$ vs JM2 Ab positive and $p < 0.01$ vs JM Ab negative). Six of 32 JM2 Ab-positive relatives had the less common DR4/13 genotype and five had the DR1/4 genotype, whereas only one of the JM1 Ab-positive ($p < 0.01$) and one of the JM Ab-negative ($p < 0.005$) relatives had these genotypes. The one relative with both JM1 and JM2 Abs was DR4/12. Consistent with our previous observation (21), none of the 14 HLA-typed relatives with IA-2 JM Abs in the absence of IA-2 PTP Abs had the HLA DR3/4 genotype.

The same associations between HLA DR genotypes and JM1 or JM2 Abs was also observed in the 19 IA-2 JM Ab-positive patients at diabetes onset used to describe the epitopes. In this cohort, none of the eight JM1 Ab-positive patients and five (84%) of the six JM2-positive relatives had the HLA DR3/4 genotype ($p < 0.005$), and five (62%) of the JM1 Ab-positive patients had non-DR4-containing genotypes.

Footprinting demonstrates differences in protection of Ag proteolysis between IA-2 JM1 and JM2 Abs

To demonstrate whether binding of IA-2 to JM1 and JM2 Abs may alter Ag proteolysis, footprinting studies using mild trypsin treatment of IA-2 Ag bound to JM-specific Abs were undertaken (Fig. 4). Mild trypsin digestion of IA-2IC resulted in minor bands at 40, 30, 27, and 24 kDa and a major band of small molecular mass fragments using 0.1 mg/ml trypsin, with a progressive loss of the minor bands when 1 mg/ml trypsin was used (Fig. 4A). Trypsin treatment of IA-2IC bound to Abs of the JM1 specificity yielded a similar pattern (Fig. 4B), whereas IA-2IC bound to Abs of the JM2 specificity was markedly more resistant to trypsin digestion with a major 40-kDa fragment and a relatively small amount of low molecular mass fragments remaining even when 1 mg/ml trypsin was used (Fig. 4C). The footprinting pattern of IA-2IC complexed to

Table II. HLA DR genotypes in IA-2 Ab-positive relatives according to their JM epitope reactivity

HLA DR Genotype	IA-2 JM Autoantibody Reactivity			
	JM1 only (n = 23)	JM2 only (n = 31)	JM1 and JM2 (n = 1)	JM negative (n = 28)
DR3/4	1 (4) ^a	12 (39)	0	11 (39)
DR13/4	1 (4)	6 (19)	0	0
DR1/4	0	5 (16)	0	1 (4)
DR4/3 ^b	9 (39)	8 (26)	1	12 (43)
DRx/x ^c	12 (52)	1 (3)	0	4 (14)

^a Percentages are listed in parentheses.
^b y, Alleles other than DR1, DR3, and DR13.
^c x, Alleles other than DR4.

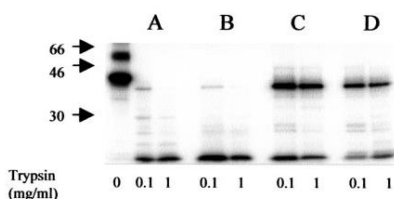


FIGURE 4. Modification of trypsin proteolysis by autoantibody binding to IA-2. *A*, SDS-PAGE/autoradiograph of in vitro transcribed and translated [³⁵S]methionine-labeled IA-2₆₀₄₋₉₇₉ (IA-2IC) after treatment with trypsin at 4°C for 10 min. *B–D*, SDS-PAGE/autoradiograph of trypsin-treated in vitro transcribed and translated [³⁵S]methionine-labeled IA-2IC, which is bound to anti-IA-2 JM1 (*B*), anti-IA-2 JM2 (*C*), and anti-IA-2-specific PTP (*D*) autoantibody.

IA-2-specific PTP domain Abs gave a similar pattern to that seen with JM2 Abs (Fig. 4*B*).

IA-2 JM Abs and risk of progression to diabetes

We previously reported an increased risk for developing type 1 diabetes in young relatives who had Abs to the JM region of IA-2 (21). Therefore, we examined diabetes development in the 104 IA-2 Ab-positive relatives according to IA-2 JM Ab status (Fig. 5). Of the 54 relatives who developed type 1 diabetes on follow-up, 36 were IA-2 JM Ab positive. The 6-year risk after first IA-2 Ab detection was 63% (95% confidence interval (CI): 40–86%), 49% (95% CI: 33–65%), and 70% (95% CI: 51–89%) in relatives who had JM1 Abs only, JM2 Abs only, and no JM Abs, respectively. Despite having low-risk HLA genotypes, the 12 non-DR4 IA-2 JM1 Ab-positive relatives had a similar risk to develop diabetes within 6 years (67%) as the DR4 IA-2 Ab-positive relatives (data not shown).

Discussion

The related PTP-like proteins IA-2 and IA-2β are autoantigens of type 1 diabetes in humans. Autoimmunity is predominantly against IA-2, and IA-2-specific epitopes are major targets of type 1 diabetes-associated autoantibodies. In this study we have identified

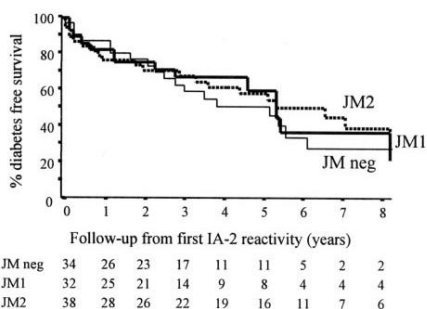


FIGURE 5. Type 1 diabetes-free survival in relatives with IA-2 autoantibodies according to the presence of anti-IA-2 JM1 and anti-IA-2 JM2 Abs. Survival curves were calculated using Kaplan-Meier survival analysis. Follow-up time is calculated from the first detection of IA-2 autoantibodies in the relative to type 1 diabetes onset or last contact. The numbers in each group remaining on follow-up is shown below the x-axis. The two relatives with both JM1 and JM2 Abs are not shown.

two major contiguous epitopes of the short IA-2 JM region. The two major JM epitopes are found within IA-2 residues 611–620 (epitope JM1) and 621–630 (epitope JM2), account for most of the Ab reactivity against the JM region, and are recognized by sera from the majority of IA-2 Ab-positive relatives. Remarkable is the finding that autoantibodies to these epitopes are almost mutually exclusive of each other and associate with distinct HLA class II genotypes. To our knowledge this is the first example of HLA-associated B cell responses to epitopes within a single autoantigen in humans.

This mapping of IA-2 JM1 and JM2 humoral epitopes suggested that they are contained within short linear adjacent sequences. The complete JM1 epitope appeared to be contained within residues 611–620 and contact residues for Ab binding outside 611–620 seem unlikely. This was deduced by the observation that 1) binding could be obtained against IA-2₁₋₆₂₀, the JM₆₀₁₋₆₂₀ chimera, and to IA-2₆₀₄₋₉₇₉, indicating that residues 604–620 should be sufficient for Ab binding and 2) complete inhibition of binding was obtained with the overlapping peptides 601–620 and 611–630, whereas no inhibition was obtained with IA-2 peptide 591–610. Abs recognizing the JM2 epitopes bound a chimera in which IA-2 residues 601–620 were deleted and in which IA-2 residues 643–979 were replaced by the corresponding residues of IA-2β. Together with previous studies which showed that JM Abs bind the JM region when IA-2 PTP 683–979 is deleted (15), the binding data suggest that necessary residues are contained within IA-2 aa 621–642, although we cannot exclude that residues common between IA-2 and IA-2β in region 643–682 are also involved. That inhibition of binding was achieved by peptides 611–630 and 621–640, but not 631–650, suggested that the essential residues involved in Ab binding are within 621–630. This is also supported by a recent report identifying an epitope within IA-2 aa 623–631 (19).

The location of these two epitopes is intriguing from the viewpoint of IA-2 function. It was recently reported that IA-2 contains a PDZ domain that includes residues 663–700 within the JM region, and that this is involved in the binding of IA-2 to β2-syntrophin which in turn links IA-2 and secretory granules to the cytoskeleton (7, 8). Release of the secretory granule is postulated to result through cleavage by μ-calpain and involving residues 643–659 (8). Cleavage would result in a truncated protein containing the two epitopes and would dissociate these JM epitopes from those contained within the PTP domain of IA-2. In our experience, IA-2 autoantibodies rarely if ever require both the JM and the PTP domain for Ag recognition and usually do not bind epitopes that span across the JM-PTP junction. Therefore, it could be postulated that autoreactivity is generated through the distinct intracellular portions that result from cleavage rather than the intact molecule. Remarkably, both these functional sites lie outside the binding sites of IA-2 autoantibodies. Similarly, autoantibodies to GAD and to insulin, the other major diabetes-associated autoantigens, rarely bind epitopes that are close to the functional domains of the proteins (26, 27). These observations imply that autoantibodies in type 1 diabetes do not directly interfere with protein function, and that functional regions of proteins may normally be protected from Ab binding.

The JM region of IA-2 appears to be highly immunogenic and to act as a distinct autoantigen from the PTP-like domains of IA-2 and IA-2β (15). It is unique to IA-2, having only weak homology to the corresponding region of IA-2β, and whereas autoantibodies binding to the IA-2 PTP-like domain often cross-react with IA-2β, autoantibodies binding to the JM region of IA-2β have not been identified (16, 17). Moreover, an alternatively spliced form of IA-2 (ICA512.bdc) that lacks exon 13 is also recognized by IA-2 PTP

Abs (22), but the deletion of residues 557–629 as a result of the exon 13 splicing would remove both JM1 and JM2 epitopes. Because these epitopes are important autoantibody targets, the use of ICA512.bdc IA-2 alone for autoantibody measurements is not advocated. Indeed, 19 of the 106 IA-2-positive relative sera, including 6 of the 54 who developed type 1 diabetes, had IA-2 Abs recognizing only the JM1 or JM2 epitopes (data not shown) and would not be expected to bind the alternatively spliced IA-2.

The uniqueness of the immunogenic JM region to IA-2 and not the related IA-2 β and ICA512.bdc proteins has potentially interesting implications for tolerance loss. Autoantigens have been detected in human thymus during fetal life (28). Remarkable is that transcription of the alternatively spliced ICA512.bdc form (which lacks the JM epitopes), but not IA-2, could be detected in human thymus (29). Therefore, the IA-2 JM epitopes and not those present on the remainder of the molecule or on IA-2 β could be “absent” during thymic education, and IA-2 JM autoreactive T cells could escape deletion or anergy, leading to an increased susceptibility to autoimmunity. So far, only isolated reports of IA-2 T cell epitopes have appeared (30, 31), and only a limited number of potential epitopes have been suggested, none of which reside in the IA-2 exon 13 region (30–32). Nevertheless, Ab responses suggest that the JM and PTP regions of IA-2 represent quite distinct entities for autoantigen recognition (15); therefore, T cell epitopes within the JM region are likely. An important role of the JM region of IA-2 early in tolerance loss to IA-2 is further suggested by our previous report that the IA-2 JM epitopes are the first IA-2 Ab epitopes that are recognized in almost 50% of subjects developing type 1 diabetes-associated autoantibodies (21). Moreover, in examining the age of first autoantibody appearance in the BABYDIAB cohort (21), we found that children who develop IA-2 JM Abs did so earlier and progressed to clinical diabetes more rapidly than children who developed islet autoantibodies without IA-2 JM specificities (median age of first IA-2 Ab appearance was 1.9 years in IA-2 JM-positive children vs 3.1 years in IA-2-positive JM-negative children; $p = 0.02$, Mann-Whitney U test).

Striking in our study was the observation that, despite the high prevalence of Abs to JM1 and JM2 epitopes, the simultaneous presence of Abs to both epitopes was rare in individual patients, suggesting that sustained expansion of both JM1- and JM2-responsive B cells was inhibited. An important factor in determining which of the B cells are expanded appeared to be related to HLA class II genes. HLA DR4-containing haplotypes were almost always found in relatives and patients with IA-2 JM2 Abs, but were present in only half of the relatives with IA-2 JM1 Abs. Moreover, none of the genotypes found in JM2 Ab-positive relatives were found in JM1 Ab-positive relatives. DR3/4, DR13/4, and DR1/4 were the predominant genotype (74%) of IA-2 JM2 Ab-positive relatives, whereas only 9% of the IA-2 JM1 Ab-positive relatives had these genotypes. HLA DR3 and DR13 almost always share the same allele at the *DRB3* locus, potentially explaining why both were associated with IA-2 JM2 Ab positivity. The mechanism leading to HLA-associated Ab reactivity to distinct epitopes is not entirely clear. Recent analysis of HLA class II genotype structure and diabetes risk strongly indicated that risk was related to autoantigen peptide binding to HLA class II molecules (33). Peptides are generated by proteolytic enzymes within vesicles of the endocytic pathway, and it has been postulated that selective responses may arise through modified processing of Ag due to its binding to specific B cell receptors (34). It is known that the dissociation rate of monovalent Ag from high-affinity Ab is slower than the time taken for Ag capture, endocytosis, and processing by professional APCs. Thus, when high-affinity Abs drive Ag uptake, either di-

rectly via B cell membrane Ig or indirectly via FcRs, the substrate for processing may frequently be an Ag/Ab complex. Ab-bound Ag can both prevent the generation of peptides and generate new “cryptic” epitopes and thereby alter the response of Ag-specific T cell clones (34, 35). In this study we find that proteolysis of IA-2 Ag bound by JM2 Abs in vitro differs from that of IA-2 bound by JM1 Abs or unbound Ag. Binding of IA-2 JM2 Abs protected against proteolysis of IA-2, a finding consistent with the relatively restricted HLA class II genotypes found in subjects with these Abs as compared with those with IA-2 JM1 Abs. It is conceivable that B cell receptor binding to the JM2 autoantibody epitopes preferentially generates T cell epitopes that can bind to HLA class II molecules expressed in DR3/4, DR13/4, or DR1/4 APCs and result in T cell help for JM2-specific B cells, whereas B cell receptors binding to JM1 autoantibody epitopes either do not generate these peptides or generate peptides that are preferentially bound by other class II molecules. Although the mechanism by which a HLA-associated epitope-specific Ab response occurs is speculative, the observation is consistent with processing and presentation of Ab-bound IA-2 Ag having an important role in the determination of the survival of specific B cell clones.

In conclusion, this study has demonstrated how chimeric construct screening together with point mutation can be used to identify specific autoantibody epitopes. This approach has identified two major diabetes-related adjacent potentially linear epitopes within the IA-2 JM region that are absent from the related autoantigens IA-2 β and ICA512.bdc. Relatives with Abs to either JM epitope have a high risk for developing type 1 diabetes, even in the absence of diabetes-associated HLA genotypes. However, the presence of Abs to one of these two epitopes was mutually exclusive of the other; the epitope specificity of Abs was strongly linked to HLA class II genotype; and the binding of Abs to one of the epitopes, but not the other, markedly affected proteolysis of IA-2. These findings are consistent with processing of specific Ab-bound Ag being a determinant for peptide presentation by HLA class II. This approach, together with the generation and characterization of mAbs (36) and their screening with peptide libraries (37), should lead to the definition of minimal epitopes that could be potentially be used in the modeling of molecular mimicry.

References

- Rabin, D. U., S. M. Pleasic, J. A. Shapiro, H. Yoo-Warren, J. Oles, J. M. Hicks, D. E. Glodstein, and P. M. M. Rae. 1994. Islet antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. *J. Immunol.* 152:3183.
- Lan, M. S., J. Lu, Y. Goto, and A. L. Notkins. 1994. Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma. *DNA Cell Biol.* 13:505.
- Lu, J., A. L. Notkins, and M. S. Lan. 1994. Isolation, sequence and expression of a novel mouse brain cDNA, mIA-2, and its relatedness to members of the protein tyrosine phosphatase family. *Biochim. Biophys. Acta* 204:930.
- Wasmeier, C., and J. C. Hutton. 1996. Molecular cloning of phogrin, a protein-tyrosine phosphatase homologue localized to insulin secretory granule membranes. *J. Biol. Chem.* 271:18161.
- Solimena, M., R. Dirlikx, Jr., J. M. Hermel, S. Pleasic-Williams, J. A. Shapiro, L. Caron, and D. U. Rabin. 1996. ICA 512, an autoantigen of type 1 diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules. *EMBO J.* 15:2102.
- Cui, L., W. P. Yu, H. J. DeAizpurua, R. S. Schmidli, and C. J. Pallen. 1996. Cloning and characterization of islet cell antigen-related protein-tyrosine phosphatase (PTP), a novel receptor-like PTP and autoantigen in insulin-dependent diabetes. *J. Biol. Chem.* 271:24817.
- Ort, T., E. Maksimova, R. Dirlikx, A. M. Kachinsky, S. Berghs, S. C. Froehner, and M. Solimena. 2000. The receptor tyrosine phosphatase-like protein ICA512 binds the PDZ domains of β 2-syntrophin and nNOS in pancreatic β -cells. *Eur. J. Cell Biol.* 79:621.
- Ort, T., S. Voronov, J. Guo, K. Zawalich, S. C. Froehner, W. Zawalich, and M. Solimena. 2001. Dephosphorylation of β 2-syntrophin and Ca^{2+} / μ -calpain-mediated cleavage of ICA512 upon stimulation of insulin secretion. *EMBO J.* 20:4013.
- Wasmeier, C., and J. C. Hutton. 2001. Secretagogue-dependent phosphorylation of the insulin granule membrane protein phogrin is mediated by cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276:31919.

10. Payton, M. A., C. J. Hawkes, and M. R. Christie. 1995. Relationship of the 37,000- and 40,000-M_r tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 (ICA512). *J. Clin. Invest.* 96:1506.
11. Bonifacio, E., V. Lampasona, S. Genovese, M. Ferrari, and E. Bosi. 1995. Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40K autoantigen and a target of islet cell Abs. *J. Immunol.* 155:5419.
12. Lu, J., Q. Li, H. Xie, Z. J. Chen, A. E. Borovitskaya, N. K. Maclaren, A. L. Notkins, and M. S. Lan. 1996. Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase, IA-2 β , as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37-kDa tryptic fragment. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 19:2307.
13. Bingley, P. J., M. R. Christie, E. Bonifacio, R. Bonifanti, M. Shattock, M. T. Fouts, G. F. Bottazzo, and E. A. M. Gale. 1994. Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell Ab-positive relatives. *Diabetes* 43:1304.
14. Verge, C. F., R. Gianani, E. Kawasaki, L. Yu, M. Pietropaolo, R. A. Jackson, H. P. Chase, and G. S. Eisenbarth. 1996. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 45:926.
15. Lampasona, V., M. Bearzatto, S. Genovese, E. Bosi, M. Ferrari, and E. Bonifacio. 1996. Autoantibodies in insulin-dependent diabetes recognize distinct cytoplasmic domains of the protein tyrosine phosphatase-like IA-2 autoantigen. *J. Immunol.* 157:2707.
16. Bonifacio, E., V. Lampasona, and P. J. Bingley. 1998. IA-2 (islet cell antigen 512) is the primary target of humoral autoimmunity against type 1-associated tyrosine phosphatase autoantigens. *J. Immunol.* 161:2648.
17. Hatfield, E. C., C. J. Hawkes, M. A. Payton, and M. R. Christie. 1997. Cross reactivity between IA-2 and phogrin/IA-2 β in binding of autoantibodies in IDDM. *Diabetologia* 40:1327.
18. Kawasaki, E., L. Yu, M. J. Revers, J. C. Hutton, and G. S. Eisenbarth. 1998. Definition of multiple ICA512/phogrin autoantibody epitopes and detection of intramolecular epitope spreading in relatives of patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 47:733.
19. Seisler, J., M. Schott, N. G. Morgenthaler, and W. A. Scherbaum. 2000. Mapping of novel autoreactive epitopes of the diabetes-associated autoantigen IA-2. *Clin. Exp. Immunol.* 122:157.
20. Notkins, A. L., B. Zhang, Y. Matsumoto, and M. S. Lan. 1997. Comparison of IA-2 with IA-2 β and with six other members of the protein tyrosine phosphatase family: recognition of antigenic determinants by IDDM sera. *J. Autoimmun.* 10:245.
21. Nasrakes, H. E., A. G. Ziegler, V. Lampasona, and E. Bonifacio. 1998. Early development and spreading of autoantibodies to epitopes of IA-2 and their association with progression to type 1 diabetes. *J. Immunol.* 161:6963.
22. Park, Y. S., E. Kawasaki, K. Kelemen, L. Yu, M. R. Schiller, M. Revers, M. Mizuta, G. S. Eisenbarth, and J. C. Hutton. 2000. Humoral autoreactivity to an alternatively spliced variant of ICA512/IA-2 in type 1 diabetes. *Diabetologia* 43:1293.
23. Ziegler, A.-G., M. Hummel, M. Schenker, and E. Bonifacio. 1999. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB study. *Diabetes* 48:460.
24. Dittler, J., D. Seidel, M. Schenker, and A.-G. Ziegler. 1998. GADIA2-combi determination as first-line screening for improved prediction of type 1 diabetes in relatives. *Diabetes* 47:592.
25. Gardner, S. G., E. A. Gale, A. J. Williams, K. M. Gillespie, K. E. Lawrence, G. F. Bottazzo, and P. J. Bingley. 1999. Progression to diabetes in relatives with islet autoantibodies: is it inevitable? *Diabetes Care* 22:2049.
26. Schwartz, H. L., J. M. Chandonia, S. F. Kash, J. Kanaani, E. Tunnell, A. Domingo, F. E. Cohen, J. P. Banga, A. M. Madec, W. Richter, and S. Baekkeskov. 1999. High-resolution autoreactive epitope mapping and structural modeling of the 65 kDa form of human glutamic acid decarboxylase. *J. Mol. Biol.* 287:983.
27. Karlsson, F., L. C. Harrison, C. R. Kahn, A. Itin, and J. Roth. 1982. Subpopulations of Abs directed against evolutionarily conserved regions of the insulin molecule in insulin-treated patients. *Diabetologia* 23:488.
28. Pugliese, A., M. Zeller, A. Fernandez, H., L. J. Zalcberg, R. J. Bartlett, C. Ricordi, M. Pietropaolo, G. S. Eisenbarth, S. T. Bennett, and D. D. Patel. 1997. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat. Genet.* 15:293.
29. Diez, J., Y. Park, M. Zeller, D. Brown, D. Garza, C. Ricordi, J. Hutton, G. S. Eisenbarth, and A. Pugliese. 2001. Differential splicing of the IA-2 mRNA in pancreas and lymphoid organs as a permissive genetic mechanism for autoimmunity against the IA-2 type 1 diabetes autoantigen. *Diabetes* 50:895.
30. Hawkes, C. J., N. C. Schlott, J. Marks, S. J. Willemen, J. W. Drijfhout, E. K. Mayer, M. R. Christie, and B. O. Roep. 2000. T-cell lines reactive to an immunodominant epitope of the tyrosine phosphatase-like autoantigen IA-2 in type 1 diabetes. *Diabetes* 49:356.
31. Honeyman, M. C., N. L. Stone, and L. C. Harrison. 1998. T-cell epitopes in type 1 diabetes to the autoantigen tyrosine phosphatase IA-2: potential for mimicry with rotavirus and other environmental agents. *Mol. Med.* 4:231.
32. Peakman, M., E. J. Stevens, T. Lohmann, P. Narendran, J. Dromey, A. Alexander, A. J. Tomlinson, M. Trucco, J. C. Gorga, and R. M. Chicz. 1999. Naturally processed and presented epitopes of the islet cell autoantigen IA-2 eluted from HLA-DR4. *J. Clin. Invest.* 104:1449.
33. Cucca, F., R. Lampis, M. Congia, E. Angius, S. Nutland, S. C. Bain, A. H. Barnett, and J. A. Todd. 2001. A correlation between the relative predisposition of MHC class II alleles to type 1 diabetes and the structure of their proteins. *Hum. Mol. Genet.* 10:2025.
34. Watts, C., A. Antoniou, B. Manoury, E. W. Hewitt, L. M. Mckay, L. Grayson, N. F. Fairweather, P. Emsley, N. Isaacs, and P. D. Simitsek. 1998. Modulation by epitope-specific Abs of class II MHC-restricted presentation of the tetanus toxin antigen. *Immunol. Rev.* 164:11.
35. Rajonen, H., T. L. Daniels, A. Lernmark, and G. T. Nepom. 2000. GAD65-specific autoantibodies enhance the presentation of an immunodominant T-cell epitope from GAD65. *Diabetes* 49:1621.
36. Kolm-Litty, V., S. Berlo, E. Bonifacio, M. Bearzatto, A. M. Engel, M. Christie, A.-G. Ziegler, T. Wild, and J. Endl. 2000. Human monoclonal Abs isolated from type 1 diabetes patients define multiple epitopes in the protein tyrosine phosphatase-like IA-2 antigen. *J. Immunol.* 165:4676.
37. Myers, M. A., J. M. Davies, J. C. Tong, J. Whisstock, M. Sealy, I. R. Mackay, and M. J. Rowley. 2000. Conformational epitopes on the diabetes autoantigen GAD65 identified by peptide phage display and molecular modeling. *J. Immunol.* 165:3830.

Í Humoral autoimmune responses to glutamic acid decarboxylase have similar target epitopes and subclass that show titer-dependent disease association Í **S. Piquer, C. Belloni, V. Lampasona, E. Bazzigaluppi, M. Vianello, B. Giometto, E. Bosi, G.F. Bottazzo, E. Bonifacio. Clinical Immunology. 2005;**

L'àcid glutàmic decarboxilassa (GAD) és un enzim que catalitza la conversió de l'àcid L-glutàmic a àcid γ -aminobutíric (GABA), localitzat majoritàriament al citoplasma i a les vesícules micro-secretores de les neurones secretores i de les cèl·lules β pancreàtiques. Les espècies de mamífers expressen dues isoformes altament homòlogues de GAD, anomenades GAD65 i GAD67 d'acord amb el seu pes molecular en kDa. GAD65 és una de les principals dianes de la resposta humoral immune en la T1D, en el síndrome de Stiff man (SMS) i en el síndrome poliendocrí autoimmune de tipus II (APS-II) on diverses endocrinopaties autoimmunes (principalment malalties autoimmunes del tiroides, gastritis, la malaltia d'Addison i la T1D) coincideixen en diverses combinacions. Diversos estudis han analitzat el perfil dels aacs contra la molècula de GAD en aquestes tres patologies suggerint una relació entre el patró humoral autoimmune detectat i el tipus de patologia. En contra d'aquests treballs es troben els resultats obtinguts per un grup finlandès que indicarien que algunes d'aquestes diferències serien degudes a la diferència en el títol d'aacs entre els pacients afectes de T1D i de SMS.

L'objectiu d'aquest treball era determinar la possible existència d'un patró específic de resposta contra la molècula de GAD (reconeixement de diferents epítops i/o subclasses) en individus afectes de T1D, SMS i APS-II. Per tal

Per assolir aquest objectiu es va quantificar i caracteritzar la resposta d'aacs contra la molècula de GAD en pacients afectes de aquestes tres patologies tot i analitzant 44, 18 i 24 mostres, respectivament. Dins del grup de pacients afectes de T1D existeixen dos subgrups:

- 20 pacients positius per GAD seleccionats aleatòriament.
- 24 individus positius per GAD seleccionats en base al nivell de reactivitat contra aquesta molècula (>1000 unitats).

L'anàlisi dels aacs contra la molècula de GAD va detectar diferències significatives entre els diferents grups d'estudi. Els títols de GAD en els individus afectes de T1D (mitja 70 unitats; rang: 31-150 unitats) eren molt inferiors als detectats en els pacients afectes de SMS (mitja 40500 unitats; rang: 1180-50000 unitats) o APS-II (mitja 2630 unitats; rang: 1130-12200 unitats).

Tots els individus positius per GAD van ser positius per IgG1, amb un títol molt més elevat en els pacients afectes de T1D seleccionats en base a un alt títol d'aacs contra la molècula de GAD, els individus afectes de SMS i els pacients afectes de APS-II (tots $p < 0.0002$). El patró detectat per IgG2, IgG3 i IgG4 (detectades a títols molt inferiors que la IgG1) va ser semblant, amb una prevalença significativament superior en els pacients afectes de T1D seleccionats en base a un alt títol d'aacs contra la molècula de GAD (23/24 $p = 0.0003$) i els pacients afectes de APS-II (21/24 $p = 0.004$) però no en els individus afectes de SMS (11/18).

Pel que fa a la reactivitat contra els diferents epítops l'anàlisi dels resultats també va mostrar diferències entre els individus afectes de T1D positius per GAD seleccionats aleatòriament i la resta dels grups (tots $p < 0.0001$) (els títols detectats contra totes les proteïnes i quimeres de GAD eren inferiors en el grup de pacients afectes de T1D seleccionats aleatòriament). La prevalença dels aacs contra els epítops NH₂-terminal i MID-b (AA 96 - 242) i contra la molècula de GAD67, minoritària en els individus afectes de T1D seleccionats aleatòriament (25%, 30% i 25%, respectivament) va ser significativament superior en la resta dels grups analitzats, pacients afectes de SMS (95%, 100%, 84%; tots $p < 0.0001$), individus afectes de APS-II (75%, 79%, 67%; tots $p < 0.005$) i pacients afectes de T1D seleccionats en base a un alt títol d'aacs (79%, 79%, 75%; tots $p < 0.002$).

Els resultats d'aquest estudi indiquen que la prevalença incrementada dels aacs contra els epítops NH₂-terminal de la molècula de GAD65 i contra la molècula de GAD67 així com dels aacs de subclasses IgG2, IgG3 i IgG4 detectada en els pacients afectes de SMS és un efecte secundari degut a l'alt títol d'aacs d'aquest grup ja que el patró de reconeixement dels diferents epítops i subclasses és similar quan es comparen amb els altres grups de pacients seleccionats en base a un títol d'aacs semblant. Així doncs, la possible existència d'un patró humoral específic de resposta contra la molècula de GAD en les diferents patologies analitzades quedaria descartada.

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Clinical Immunology 117 (2005) 31–35

Clinical
IMMUNOLOGYwww.elsevier.com/locate/yclim

Humoral autoimmune responses to glutamic acid decarboxylase have similar target epitopes and subclass that show titer-dependent disease association

Sandra Piquer^{a,c}, Cristina Belloni^a, Vito Lampasona^b, Elena Bazzigaluppi^a, Marika Vianello^c,
Bruno Giometto^c, Emanuele Bosi^a, Gian Franco Bottazzo^d, Ezio Bonifacio^{a,*}

^aImmunology of Diabetes Unit, Istituto Scientifico San Raffaele, Via Olgettina 60, 20132 Milan, Italy

^bDepartment of Laboratory Medicine, Istituto Scientifico San Raffaele, Milan, Italy

^cDepartment of Neurological and Psychiatric Sciences, Second Neurological Clinic, University of Padua, Padua, Italy

^dAutoimmunity and Immunogenetics Laboratories, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Rome, Italy

^eEndocrinology and Diabetes Unit, Hospital Clinic/Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Received 21 February 2005; accepted with revision 14 June 2005

Available online 18 July 2005

Abstract

Glutamic acid decarboxylase (GAD) is an autoantigen in stiff man syndrome (SMS) and type 1 diabetes (T1DM). Different GAD autoantibody characteristics in these disorders have suggested distinct underlying mechanisms of autoimmunity. Here, it is shown that increased prevalence of autoantibodies to GAD65 amino terminal and GAD67 epitopes and autoantibodies of IgG2, IgG3, or IgG4 subclass in patients with SMS ($P < 0.001$ vs. T1DM) are secondary to the markedly higher autoantibody titers in SMS patients ($P < 0.0001$) and that autoantibody epitopes and subclasses were similar when patients were matched for autoantibody titer. Exposure to autoantigen in the disorders is likely to involve similar humoral antigenic determinants, but different B cell regulation.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: GAD antibodies; GAD epitopes; IgG subclasses; Stiff man syndrome; Type 1 diabetes

Introduction

Glutamic acid decarboxylase (GAD) is an enzyme localized in the cytoplasm and microsecretory vesicles of γ amino butyric acid (GABA)-secreting neurons and pancreatic β cells [1,2] that catalyzes the conversion of glutamic acid to the inhibitory neurotransmitter GABA. It exists as two protein isoforms of 65 kDa (585 AA) and 67 kDa (594 AA) which are encoded by two distinct genes [3]. The smaller form of GAD is a common target of the humoral immune response in stiff man syndrome (SMS), a rare neurological disorder characterized by painful spasms and progressive symmetric rigidity of the axial and proximal muscles [4], type 1 diabetes mellitus [5], and in a form of

autoimmune polyendocrine syndrome (APS) in whom autoimmune endocrinopathies coincide in diverse combinations [6].

Several studies have reported differences in GAD autoantibody profiles associated with type 1 diabetes, SMS, and APS, suggesting a link between the pattern of humoral autoimmunity and those different clinical conditions [7–9]. In SMS, the most common reported GAD epitopes include one or more within the NH₂ terminal region [7]. In type 1 diabetes, dominant epitopes are reported to be predominantly conformational and have been mapped within the central (amino acids 243–444) and COOH terminal (amino acids 445–585) portions [7,10–13]. Distinct isotype patterns between patients with type 1 diabetes and SMS are also suggested [9]. A highly restricted isotype response comprising of only IgG1 and IgG3 was observed in type 1 diabetes, whereas a broad isotype spectrum was

* Corresponding author. Fax: +39 02 26433790.

E-mail address: bonifacio.ezio@hsr.it (E. Bonifacio).

found in SMS. Some of the differences are likely to be due to differences in autoantibody titers between patients with type 1 diabetes and SMS [14]. Nevertheless, the notion that the disorders are associated with different epitope recognition and the use of different IgG subclasses has led to speculation that underlying mechanisms of autoimmunity may also differ [9].

The aim of our study was to determine whether humoral GAD epitope recognition and GAD antibody subclasses are disease or antibody titer-specific. GAD antibody responses were quantified and characterized in patients with SMS, APS type II (APS-II), and type 1 diabetes. The findings indicate that GAD antibody characteristics are dependent upon titer and not disease.

Subjects and methods

Subjects

Four groups of GAD65 antibody (GADA) positive subjects were studied. GADA characteristics of stiff man syndrome were measured in sera from 18 patients with stiff man syndrome diagnosed according to reported methods [15] (6 males and 12 females; median age, 52 years). Eight SMS patients also had type 1 diabetes. In order to obtain a group of patients with type 1 diabetes that had comparable GADA titers to those found in SMS and APS-II, a cohort of 24 patients with new onset type 1 diabetes diagnosed at the San Raffaele Hospital between 1989 and 2001 were selected on the basis of GADA titer > 1000 units. This represents 5% of patients with new onset type 1 diabetes that were examined. The median age of these patients was 21 years, and 6 were males. In order to obtain GADA characteristics that were representative of patients with type 1 diabetes, another 20 patients (8 males and 12 females; median age, 12 years) were randomly selected from GADA positive patients with new onset type 1 diabetes diagnosed at the San Raffaele Hospital between 1989 and 2001. Differences in the clinical characteristics between the two T1DM patient groups were not assessed due to incomplete data. GADA characteristics were also measured in 24 GADA positive patients with APS-II (9 males, 15 females; median age, 52 years), including 9 who had type 1 diabetes [6]. All but one had thyroid autoantibodies, and 14 had thyroid autoimmune disease. Twenty-one patients had gastric parietal cell antibodies, including five with pernicious anemia. Two patients had Addison's disease, two vitiligo, two premature ovarian failure, and one hypoparathyroidism.

Quantification of GAD65 antibodies in sera

GADA were measured by protein A radiobinding assays as previously described [16,17] using [³⁵S] methionine-labelled in vitro translated recombinant human GAD65.

Samples with antibody titers above the discriminatory range of the assays were titrated until they fell within this part of the standard curve and the units multiplied by the appropriate dilution factor. The thresholds for positivity in each assay corresponded to the 99th percentile of control subjects. This assay had a sensitivity and specificity of 84% and 96% in the Third Diabetes Autoantibodies Standardization Program.

GAD epitope antibody assay

Determination of GADA epitope specificity was performed by radiobinding assay on [³⁵S]methionine-labelled in vitro translated recombinant human GAD65, GAD67, and GAD65/67 chimeric proteins as previously described [17,18]. Chimeric constructs used were GAD65_{1–95}/GAD67_{101–593} (GAD65-NH₂-terminal), GAD67_{1–101}/GAD65_{96–242}/GAD67_{252–593} (GAD65-Mid b), GAD67_{1–251}/GAD65_{243–444}/GAD67_{453–593} (GAD65-Mid a), and GAD67_{1–452}/GAD65_{445–585} (GAD65-COOH-terminal). When used in radiobinding immunoprecipitation assays, these constructs are able to detect both conformational and linear epitopes, thereby measuring antibodies to the major GAD65 and GAD67 epitopes that have been previously reported. GAD epitope reactivity was measured against GAD65, GAD67, and the GAD65/67 chimeras by radiobinding assay as for GADA. Results were expressed as arbitrary units relative to a standard curve prepared by measurement in each assay of a serum from a subject with high autoantibody levels serially diluted in normal serum. Thresholds for positivity were defined as the upper limit of 50 control subject sera. GAD antibody epitope specificities were classified as GAD65-NH₂-terminal (residues 1–96), GAD65-MID a (residues 243–444), GAD65-MID b (residues 96–242), GAD65-COOH-terminal (residues 445–585), and/or GAD67.

IgG subclass autoantibody assay

IgG subclasses of GADA were determined by radiobinding assays as previously described [18,19] using IgG subclass or isotype-specific biotin-labelled mouse-anti-human monoclonal antibodies (Becton Dickinson, San Diego, CA) bound on Sepharose 4B streptavidin beads (Zymed, San Francisco, CA). The antibodies used were mouse monoclonal antibodies against human IgG1 (clone G17-1), IgG2 (clone G18-21), IgG3 (clone G18-3), and IgG4 (clone JDC-14). Non-specific binding was determined for each serum using anti-rat IgM mAb (clone G53-238)-coated beads. The absence of cross-reactivity between subclasses was confirmed using high titer human IgG1 monoclonal GADA antibodies. GADA IgG subclasses were expressed as delta cpm (IgG subclass or isotype specific cpm-anti-rat IgM cpm) and converted to a SD score (SDS). The cut-off for positivity for each GADA IgG subclass was 3 SDS.

Statistical analyses

Comparisons between subject groups were performed using the Mann–Whitney *U* test or Fisher's Exact Test. A multivariate logistic regression for T1DM was performed with GADA titer, epitope, and IgG subclass status as covariates. For all analyses, a two-tailed *P* value of 0.05 was considered significant. All statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Science (SPSS 11.0, Chicago, IL.).

Results

GADA titers in GADA positive patients with type 1 diabetes (median, 70 units; inter-quartile range, 31–150 units) were markedly lower than in patients with SMS (median, 40500; inter-quartile range, 1180–>50,000; $P < 0.0001$) or APS-II (median, 2630 units; inter-quartile range, 1130–12,200 units; $P < 0.0001$).

All GADA positive subjects had IgG1-GADA (Fig. 1). Compared to titers in GADA positive patients with type 1 diabetes, IgG1-GADA titers were markedly higher in patients with type 1 diabetes selected for high titer GADA, in patients with SMS, and in patients with APS-II (all $P < 0.0002$). IgG2, IgG3, and IgG4 GADA were detected at much lower titers than IgG1-GADA in all patient groups. IgG2, IgG3, and/or IgG4 GADA were detected in 9 of 20 GADA positive patients with T1DM. The 9 patients with IgG2, IgG3, and/or IgG4 GADA had significantly higher GADA titers than the 11 patients with only IgG1 GADA ($P = 0.003$) consistent with a dependence upon GADA titer for the detection of these subclasses. Accordingly, IgG2, IgG3, and/or IgG4 GADA prevalence was significantly increased in patients with type 1 diabetes selected for high titer GADA (23/24 patients; $P = 0.0003$) and in patients with APS-II (21/24 patients; $P = 0.004$), but not in patients with SMS (11/18 patients). GADA IgG subclasses did not differ

between SMS patients with type 1 diabetes and those without T1DM, or between APS patients with and without T1DM.

Antibody reactivity to epitopes of GAD differed markedly between patients with T1DM and the other study groups (Fig. 2). Titers against all GAD proteins and chimeras were significantly lower in patients with T1DM compared to SMS patients, APS-II patients, and high titer GADA T1DM patients (all $P < 0.0001$). The prevalence of antibodies to the minor GAD epitopes was represented by reactivity to the NH2-terminal and MID b GAD65 epitopes, and GAD67 were detected in a minority of patients with T1DM (25%, 30%, and 20%, respectively). Within the T1DM patients, the presence of autoantibodies to one of these minor GAD epitopes (6 of 20 patients) was significantly associated with high titer GADA ($P = 0.006$). Antibodies to these epitopes were found in most patients with SMS (95%, 100%, 84%; all $P < 0.0001$) or APS-II (75%, 79%, 67%; all $P < 0.005$). The majority of patients with type 1 diabetes selected for high titer GADA also had antibodies to these minor epitopes (79%, 79%, 75%; all $P < 0.002$ vs. T1DM group). GADA epitope reactivity did not differ between SMS patients with and those without type 1 diabetes, or between APS-II patients with or without T1DM.

Multiple logistic regression that included GADA titer, epitope (categorized as antibodies against or not against minor GAD epitopes), and IgG subclass (categorized as having or not having IgG2, IgG3, and/or IgG4 GADA) indicated that the T1DM patients were primarily associated with GADA titer ($P = 0.01$) and that neither epitope nor subclass contributed further to the disease classification.

Discussion

This study confirms that patients with T1DM and SMS differ in their GADA characteristics but that previously

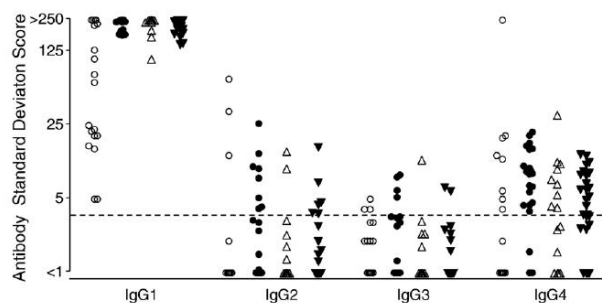


Fig. 1. IgG subclasses of GAD autoantibodies in GAD autoantibody positive patients with T1DM (open circles), high titer (>1000 units) GAD autoantibody positive patients with T1DM (filled circles), GAD autoantibody positive patients with SMS (open triangles), and GAD autoantibody positive APS-II patients (filled triangles). The broken line indicates the threshold of positivity.

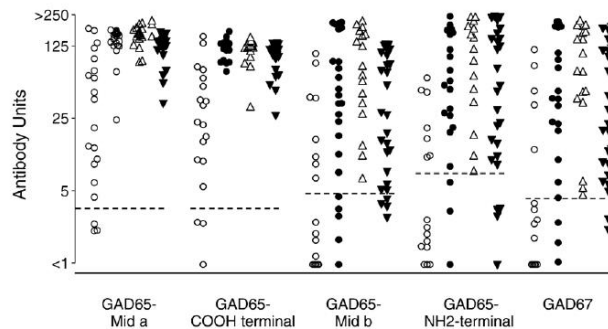


Fig. 2. Autoantibodies to GAD65/GAD67 chimeras and GAD67 in GAD autoantibody positive patients with T1DM (open circles), high titer (>1000 units) GAD autoantibody positive patients with T1DM (filled circles), GAD autoantibody positive patients with SMS (open triangles), and GAD autoantibody positive APS-II patients (filled triangles). The broken line indicates the threshold of positivity.

reported differences in epitope reactivity and IgG subclass usage are likely to reflect the marked differences in GADA titers between these two patient groups. SMS patients had a broader reactivity that included antibodies to epitopes expressed in the NH2 terminal and in GAD67, whereas GADA in patients with T1DM infrequently bound these epitopes, unless they had high titer GADA. Patients with T1DM who had GADA titers approaching those found in SMS had GADA epitope reactivity that was significantly different to those in unselected GADA positive T1DM patients and similar to that in patients with SMS. Similarly, the presence of GADA subclasses other than IgG1, which had previously been reported to be a specific feature of GADA in SMS patients, was associated with GADA titer in T1DM patients and was found in the majority of T1DM patients with very high titer GADA. These data suggest that the qualitative differences in GADA characteristics found between subjects are not disease-specific but are a consequence of differences in antibody titer.

This study provides comparative data from three GADA positive disease groups and is the first that attempts to determine whether GADA characteristics in these groups are related to disease or titer. The findings are that SMS and the APS-II patients are similar to those previously reported, with a broad higher titer IgG antibody response to multiple GAD65 epitopes throughout the whole molecule [7]. Differences in GADA titers between patients with T1DM and SMS are well noted [7,14], and in this aspect, our findings are also similar to previous reports. The GADA epitope differences that were previously reported are also similar [7,9]. The novel finding is that patients with T1DM and high titer GADA also have broad responses that are similar to those in SMS patients. The study used similar methods and constructs to those previously reported, indicating that

the current findings are more likely due to the consideration of titer rather than methodological differences. Other differences between GAD autoreactivity in patients with T1DM and patients with SMS were reported at the T cell level [9]. These are more likely to reflect differences in HLA class II alleles between patients with T1DM and those with SMS [20] which would lead to generation and presentation of distinct GAD65 peptides to T cells.

The implications of the findings are that the autoantibody determinants that are targeted on GAD65 are similar between SMS/APS-II-associated and T1DM-associated humoral immune responses. This speaks for exposure to similar antigen, but with distinct expansion or regulatory control of the antibody responses in T1DM as compared to SMS/APS-II. Although the study cannot exclude that there are disease-specific epitopes within each of the major epitope regions, it highlights the importance of considering both titer and target when examining disease or prognostic differences and emphasizes that the magnitude of the response is the major difference between GAD autoimmunity in neurological and T1DM-related pathologies. This consideration is also highly relevant to recent reports of antibody epitope and IgG subclass differences between GAD antibody positive subjects who progress and do not progress to T1DM [21,22]. Of relevance to T1DM is the finding that the majority of GAD antibody positive subjects with a genetic predisposition do not develop T1DM and that neither titer nor epitope of the autoantibodies is predictive of progression to T1DM [18]. These findings are analogous to those of SMS or APS-II, where around 50% of the GAD antibody patients do not develop T1DM, regardless of GADA titer. Similarly, progression to T1DM in all GAD antibody positive groups is strongly associated with the additional presence of autoantibodies to IA-2 [6,18,23].

References

- [1] M.G. Erlander, A.J. Tobin, The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review, *Neurochem. Res.* 16 (1991) 215–226.
- [2] A. Reetz, M. Solimena, M. Matteoli, F. Folli, K. Takei, P. De Camilli, GABA and pancreatic beta-cells: colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic-like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion, *EMBO J.* 10 (1991) 1275–1284.
- [3] D.F. Bu, M.G. Erlander, B.C. Hitz, N.J. Tillakaratne, D.L. Kaufman, C.B. Wagner-McPherson, G.A. Evans, A.J. Tobin, Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 2115–2119.
- [4] M. Solimena, F. Folli, S. Denis-Donini, G.C. Comi, G. Pozza, P. De Camilli, A.M. Vicari, Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in a patient with stiff-man syndrome, epilepsy, and type 1 diabetes mellitus, *N. Engl. J. Med.* 318 (1988) 1012–1020.
- [5] S. Baekkeskov, H.L. Aanstoot, S. Christgau, A. Reetz, M. Solimena, M. Cascalho, F. Folli, H. Richter-Olesen, P. De Camilli, P.D. Camilli, Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase, *Nature* 347 (1990) 151–156.
- [6] M.R. Christie, S. Genovese, D. Cassidy, E. Bosi, T.J. Brown, M. Lai, E. Bonifacio, G.F. Bottazzo, Antibodies to islet 37k antigen, but not to glutamate decarboxylase, discriminate rapid progression to IDDM in endocrine autoimmunity, *Diabetes* 43 (1994) 1254–1259.
- [7] J. Kim, M. Namchuk, T. Bugawan, Q. Fu, M. Jaffe, Y. Shi, H.J. Aanstoot, C.W. Turck, H. Erlich, V. Lennon, Higher autoantibody levels and recognition of a linear NH₂-terminal epitope in the autoantigen GAD65, distinguish stiff-man syndrome from insulin-dependent diabetes mellitus, *J. Exp. Med.* 180 (1994) 595–606.
- [8] K. Daw, N. Ujihara, M. Atkinson, A.C. Powers, Glutamic acid decarboxylase autoantibodies in stiff-man syndrome and insulin-dependent diabetes mellitus exhibit similarities and differences in epitope recognition, *J. Immunol.* 156 (1996) 818–825.
- [9] T. Lohmann, M. Hawa, R.D. Leslie, R. Lane, J. Picard, M. Londei, Immune reactivity to glutamic acid decarboxylase 65 in stiff man syndrome and type 1 diabetes mellitus, *Lancet* 356 (2000) 31–35.
- [10] W. Richter, Y. Shi, S. Baekkeskov, Autoreactive epitopes defined by diabetes-associated human monoclonal antibodies are localized in the middle and C-terminal domains of the smaller form of glutamate decarboxylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 2832–2836.
- [11] K. Daw, A.C. Powers, Two distinct glutamic acid decarboxylase autoantibody specificities in IDDM target different epitopes, *Diabetes* 44 (1995) 216–220.
- [12] K. Syren, L. Lindsay, B. Stoehrer, K. Jury, F. Luhder, S. Baekkeskov, W. Richter, Immune reactivity of diabetes-associated human monoclonal autoantibodies defines multiple epitopes and detects two domain boundaries in glutamate decarboxylase, *J. Immunol.* 157 (1996) 5208–5214.
- [13] H.L. Schwartz, J.M. Chandonia, S.F. Kash, J. Kanaani, E. Tunnell, A. Domingo, F.E. Cohen, J.P. Banga, A.M. Madec, W. Richter, S. Baekkeskov, High-resolution autoreactive epitope mapping and structural modeling of the 65 kDa form of human glutamic acid decarboxylase, *J. Mol. Biol.* 287 (1999) 983–999.
- [14] P. Sohnlein, M. Muller, K. Syren, U. Hartmann, B.O. Bohm, H.M. Meinck, M. Knip, H.K. Akerblom, W. Richter, Epitope spreading and a varying but not disease-specific GAD65 antibody response in Type 1 diabetes. The Childhood Diabetes in Finland Study Group, *Diabetologia* 43 (2000) 210–217.
- [15] T.R. Lorish, G. Thorsteinsson, F.M. Howard Jr., Stiff-man syndrome updated, *Mayo Clin. Proc.* 64 (1989) 629–636.
- [16] E. Bonifacio, S. Genovese, S. Braghi, E. Bazzigaluppi, V. Lampasona, P.J. Bingley, L. Rogge, M.R. Pastore, E. Bogneri, G.F. Bottazzo, Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity, *Diabetologia* 38 (1995) 816–822.
- [17] E. Bonifacio, V. Lampasona, L. Bernasconi, A.G. Ziegler, Maturation of the humoral autoimmune response to epitopes of GAD in preclinical childhood type 1 diabetes, *Diabetes* 49 (2000) 202–208.
- [18] P. Achenbach, K. Warncke, J. Reiter, H.E. Naserke, A.J. Williams, P.J. Bingley, E. Bonifacio, A.G. Ziegler, Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics, *Diabetes* 53 (2004) 384–392.
- [19] E. Bonifacio, M. Scirpoli, K. Kredel, M. Fuchtenbusch, A.G. Ziegler, Early autoantibody responses in prediabetes are IgG1 dominated and suggest antigen-specific regulation, *J. Immunol.* 163 (1999) 525–532.
- [20] A. Pugliese, M. Solimena, Z.L. Awdeh, C.A. Alpe, T. Bugawan, H.A. Erlich, P. De Camilli, G.S. Eisenbarth, Association of HLA-DQB1*0201 with stiff-man syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77 (1993) 1550–1553.
- [21] T. Kobayashi, S. Tanaka, M. Okubo, K. Nakanishi, T. Murase, A. Lemmark, Unique epitopes of glutamic acid decarboxylase autoantibodies in slowly progressive type 1 diabetes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (2003) 4768–4775.
- [22] M. Hillman, C. Tom, H. Thorgeirsson, M. Landin-Olsson, IgG(4)-subclass of glutamic acid decarboxylase antibody is more frequent in latent autoimmune diabetes in adults than in type 1 diabetes, *Diabetologia* 47 (2004) 1984–1989.
- [23] F.K. Gorus, P. Goubert, C. Semakula, C.L. Vandewalle, J. De Schepper, A. Scheen, M.R. Christie, D.G. Pipeleers, IA-2-autoantibodies complement GAD65-autoantibodies in new-onset IDDM patients and help predict impending diabetes in their siblings. The Belgian Diabetes Registry, *Diabetologia* 40 (1997) 95–99.

Í Radiobinding assay for detecting autoantibodies to single epitopesÍ V. Lampasona, C. Belloni, S. Piquer, S. Bonicchio, R. Furlan, E. Bonifacio. *Journal of Immunological Methods* 2008; 336:127-134.

L'objectiu d'aquest treball era el desenvolupament d'un assaig per tal de poder i quantificar els aacs contra epítops específics de la molècula d'IA2, donat que la seva detecció és una ajuda important en la caracterització de la progressió de la T1D.

Per tal de assolir aquest objectiu es van generar diferents constructes tot i integrant seqüències peptídiques que contenen diferents epítops de la molècula dins una seqüència bacteriana codificant de la thioredoxin A (TrxA), seqüència modificada que conté un polilinker dins la zona del loop actiu que sobresurt cap al solvent provocant així una eficient presentació de l'epítop insertat. Les seqüències insertades van ser els epítops JM1 (aminoàcids 609-621), JM2 (aminoàcids 619-631) i JM3 (aminoàcids 609-631), així com l'epítop MOG₄₀₋₅₅ que correspon al domini *immunoglobulin-like* de la proteïna MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) utilitzat per a la validació del radioimmunoassaig de fase líquida. Per a la realització d'aquest mètode es transcriuen i tradueixen *in vitro* aquests constructes en presència de ³⁵S-methionine per tal de poder utilitzar les proteïnes generades com a antígens en l'assaig d'immunoprecipitació.

El primer que es va realitzar va ser la validació del radioimmunoassaig epítop-específic tot i utilitzant un model animal de sencefalitis al·lèrgica experimental (EAE) generat mitjançant la immunització de ratolins C57BL/6 amb el pèptid corresponent als aminoàcids 40 a 55 de la proteïna MOG. Els anticossos contra aquest epítop van ser detectats en 11 dels 12 animals utilitzats confirmant així

l'eficiència del mètode per tal de detectar els anticossos contra epítops específics.

Posteriorment es va realitzar l'assaig amb mostres humanes. Es van utilitzar sèrums provinents d'una cohort de 113 pacients neodiagnosticats per T1D, dels quals 89 tenien aacs contra la molècula d'IA2 (mostres prèviament caracteritzades per la presència d'aacs contra la regió del JM d'IA2) així com sèrums de 87 individus controls. Els aacs contra l'epítop IA-2₆₀₉₋₆₃₁ van ser detectats en 50 dels 113 sèrums de pacients analitzats però en cap dels individus control. D'aquests 50 individus positius, 34 també reaccionaven contra l'epítop IA-2₆₀₉₋₆₂₁ (JM1) i 33 contra l'epítop IA-2₆₁₉₋₆₃₁ (JM2). Aquest assaig va identificar un nou epítop, anomenat JM3, a partir de 7 sèrums de pacients neodiagnosticats de T1D, positius per l'epítop IA-2₆₀₉₋₆₃₁ però negatius per a les subespècies JM1 i JM2.

Tot seguit es va voler comparar l'eficiència d'aquest assaig amb un mètode de ELISA que utilitzava l'epítop IA-2₆₀₉₋₆₃₁ com a antígen. El nou mètode de radioimmunoassaig epítop-específic va resultar més sensible que no pas l'ELISA utilitzat, ja que aquest darrer només detectava alguns dels sèrums positius per JM1 i JM3 però cap dels positius per JM2.

La combinació del radioimmunoassaig epítop-específic desenvolupat amb estratègies de mutagènesi d'un únic aminoàcid de l'epítop IA-2₆₀₉₋₆₃₁ va permetre la identificació dels diferents aminoàcids implicats en la unió dels aacs contra JM2 i JM3 mostrant així les seves diferències pel que fa als requeriments d'unió residu-específics.

Els resultats d'aquest estudi demostren que la presentació d'un pèptid petit que codifica per un epítop complet a l'interior d'una proteïna neutra, tipus la TrxA, és un mètode prou sensible per detectar específicament els diferents epítops d'una molècula. Per altra banda, aquest sistema permet l'aplicació de l'anàlisi mutacional que condueix a la identificació dels residus clau per a la formació dels epítops i els subseqüents subtipus d'especificitats antigèniques.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Immunological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jim

Research paper

Radiobinding assay for detecting autoantibodies to single epitopes

Vito Lampasona^a, Cristina Belloni^a, Sandra Piquer^b, Sara Bonicchio^a, Roberto Furlan^c, Ezio Bonifacio^{b,d,*}^a Diagnostica e Ricerca San Raffaele, San Raffaele Scientific Institute, Milano, Italy^b Immunology of Diabetes Unit, San Raffaele Scientific Institute, Milano, Italy^c Neuroimmunology Unit – Dibat, San Raffaele Scientific Institute, Milano, Italy^d Center for Regenerative Therapies, Technische Universität Dresden, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 December 2007

Received in revised form 2 April 2008

Accepted 4 April 2008

Available online 1 May 2008

Keywords:

Autoantibodies
Antibody epitope
Immunoassay
Type 1 diabetes
Epitope mapping

ABSTRACT

Autoantibodies, a hallmark of autoimmune disease, are directed against diverse antigens and epitopes. This diversity aids in characterising disease progression and identifying disease-associated autoantibodies. Here we aimed to develop a sensitive assay to detect and quantify epitope-specific autoantibodies. We generated constructs to integrate known peptide epitopes into the TrxA protein, and used these to *in vitro* synthesize radio-labelled proteins for a radiobinding assay (RBA). This assay was first validated with an animal model using mice immunized with the MOG_{40–55} peptide. Using type 1 diabetes-associated protein tyrosine phosphatase-like autoantigen IA-2 as a human model, we expressed IA-2_{609–621}, IA-2_{619–631}, or IA-2_{609–631} peptide in the TrxA construct and used the RBA to test sera from 113 patients with type 1 diabetes and 87 controls. Antibodies were detected to the IA-2_{609–631} epitope in 37 of 113 patient sera and one control; 17 sera were reactive to the IA-2_{609–621} (JM1) epitope, and 16 to the IA-2_{619–631} (JM2) epitope. Interestingly, a novel third epitope (JM3) was identified in 7 sera that reacted to IA-2_{609–631} but not the JM1 and JM2 sub-specificities. An ELISA using IA-2_{609–631} was less sensitive than the RBA, as it detected only some of the JM1 and JM3 antibody positive sera and none of the JM2. Mutagenesis of single IA-2_{609–631} amino acids in combination with the RBA showed that antibodies to JM2 and JM3 were highly diverse in their specific residue requirements. Our strategy using *in vitro* synthesized antigens and the RBA was thus a highly sensitive and versatile method to identify epitopes and quantify epitope-specific antibodies.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Autoantibodies can differ markedly in their epitope specificity and these differences can have prognostic value. Differences in epitope specificity, for example, can be used to identify progression of autoimmunity in type 1 diabetes via evidence of spreading to new epitopes (Bonifacio et al., 1998; Kawasaki et al., 1998; Hoppu et al., 2004). In some cases, epitope reactivity

can distinguish islet autoantibodies that are disease related (Mayr et al., 2007), or associated with poor prognosis (Achenbach et al., 2004a,b), from those that are not disease-related. It is not straightforward, however, to identify epitopes and quantify epitope-specific autoantibodies. An epitope usually consists of relatively few amino acids arranged in a specific conformation that is determined by varying factors. Some epitope conformations directly correspond to the linear sequence of the protein autoantigen, whereas others depend on the arrangement of amino acids in close proximity within the autoantigen molecular structure, but not its sequence (Atassi and Smith, 1978; Greenspan and Di Cera, 1999; Kim et al., 2007). Currently, most methods to identify epitopes corresponding to individual antibody specificity involve screening antigen fragments, chimeric and mutant antigens, or peptide libraries (Mackay and Rowley, 2004). Although these studies have

Abbreviations: JM1, epitope corresponding to IA-2_{609–621}; JM2, epitope corresponding to IA-2_{619–631}; JM3, epitope corresponding to IA-2_{609–631}; RBA, radiobinding assay; EAE, experimental allergic encephalitis; MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein; TrxA, thioredoxin A.

* Corresponding author. DFG research center and cluster of excellence for Regenerative Therapies Dresden, Technische Universität Dresden, Tatzberg 47/49, 01307 Dresden, Germany. Tel.: +49 351 46340092; fax: +49 351 46340348.

E-mail address: ezio.bonifacio@crt-dresden.de (E. Bonifacio).

0022-1759/\$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jim.2008.04.005

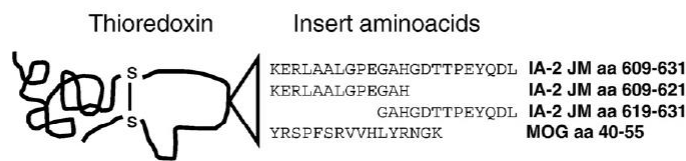


Fig. 1. Amino acid sequences of antigen epitopes inserted within the active site loop of thioredoxin.

identified some autoantigen regions that induce antibody responses, they have not usually provided assays that allow specific measurement of antibodies to single epitopes (Savoca et al., 1991, Schwab et al., 1993).

Radiobinding assays (RBA) have been used to obtain sensitive measurements of islet autoantibody titre, and radio-labelled *in vitro* synthesized recombinant antigen has facilitated identification of immuno-reactive antigen regions (Bearzatto et al., 2003). Here, we combined these two techniques to detect and quantify autoantibodies to single epitopes. As a model, we used the type 1 diabetes-associated protein tyrosine phosphatase-like autoantigen IA-2 in which two contiguous linear epitopes are already known within amino acids 611 to 630 (Bearzatto et al., 2002). We *in vitro* synthesized radio-labelled proteins from constructs designed to individually express these epitopes on a neutral backbone protein, and then used RBAs to measure autoantibodies directed against these epitopes in patients with type 1 diabetes. This system proved sensitive and versatile, allowing quantification of epitope-specific antibodies and identification of single amino acids involved in autoantibody binding. Moreover, it enabled us to determine a novel disease-associated epitope within IA-2.

2. Materials and methods

2.1. Constructs

As a neutral backbone protein to express and present short epitope sequences, we used the bacterial thioredoxin A (TrxA) coding sequence derived from the pHiTrx vector (Invitrogen, Carlsbad, California) (Fig. 1). This modified thioredoxin possesses a polylinker within its active site loop that protrudes into the solvent and thus efficiently presents inserted epitope sequence. The complete TrxA coding sequence was amplified using oligonucleotides modified to introduce a Nco I restriction site and two additional start codons upstream of the first TrxA ATG, and a stop codon followed by a Sma I restriction site downstream of the last TrxA residue. The amplified product was cloned into corresponding sites of the pSPUTK plasmid vector (Stratagene), which allows efficient *in vitro* transcription and translation from the SP6 promoter due to the UTK gene untranslated leader sequence and a Kozak initiation of translation consensus sequence.

Epitope cDNA sequences were inserted within the active loop of pSPUTK-TrxA by a PCR based mutagenesis strategy that followed the Quickchange protocol (Stratagene). Briefly, forward and reverse complementary primers (Table 1) were designed to cover coding regions: IA-2 juxtamembrane region aa 609 to 621 (epitope JM1), aa 619 to 631 (epitope JM2) and aa

609 to 631; and the immunoglobulin-like domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein MOG1a aa 40 to 55 (epitope MOG₄₀₋₅₅) (Mendel et al., 1995). Each epitope specific primer terminated with in-frame sequences corresponding to amino acids of the TrxA loop. These oligonucleotides were used in a PCR reaction using Pfu thermostable DNA polymerase to amplify the whole pSPUTK-TrxA, introducing epitope sequences within the loop. Template plasmid DNA was removed by digestion with the restriction enzyme Dpn I, and the PCR products were transformed in XL1 Blue *E. coli* cells. Several clones for each mutagenesis were analysed by automated sequencing of plasmid DNA to verify that the inserts corresponded to the correct in-frame chimeric TrxA-epitope sequences.

Residues 619 to 631 of the TrxA-IA-2 aa 609 to 631 construct (epitope JM2) were additionally subjected to alanine scanning, using the Quickchange PCR based mutagenesis protocol, by individually mutating each of the IA-2 codon residues to alanine.

2.2. Radiobinding assay

Purified plasmid DNA of our constructs was obtained by Quantamprep spin column preparation (Biorad, Hercules, CA), and *in vitro* transcribed and translated utilizing the TnT SP6-coupled rabbit reticulocyte lysate system (Promega,

Table 1
Primers used in the study

TrxA Nco I 5'>3'
CT ACC ATG GCC ATG AGG ATG ACC GAT AAA ATT ATT C
TrxA Sma I 5'>3'
TCC CCC GGG TCA AGA CTA CAG GTT AGC GTC GAG AAC T
IA-2 JM1-TrxA forward 5'>3'
CTG GCA GCC CTG GGG CCT GAG GGG GCC CAT GAG CTC GCG GCC GCG ATA
IA-2 JM1-TrxA reverse 5'>3'
AGG CCC CAG GGC TGC CAG GCG CTC CTT TCT GGC CGG CTG GGC CCA
IA-2 JM2-TrxA forward 5'>3'
GGT GAC ACT ACC TTT GAG TAC CAG GAC CTG GAG CTC GCG GCC GCG ATA
IA-2 JM2-TrxA reverse 5'>3'
AGG CCC GAC GGC TGC CAG GCG CTC CTT TCT GGC CGG CTG GGC CCA
IA-2 JM1 + JM2-TrxA forward 5'>3'
CCT GAG GGG GCC CAT GGT GAC ACT ACC TTT GAG TAC CAG GAC
CTC GAG CTC GCG GCC GCG ATA
IA-2 JM1+JM2-TrxA reverse 5'>3'
ACC ATG GCG CCC CTC AGG CCC CAG GGC TGC CAG GCG CTC CTT TCT
GGC CGG CTG GGC CCA
MOG ₄₀₋₅₅ forward 5'>3'
CCA TTT AGT AGA GTA GTA CAT TTA TAT AGA AAT GGA AAA GAG CTC GCG
GCC CGG ATA
MOG ₄₀₋₅₅ reverse 5'>3'
TCT ATA TAA ATG TAC TAC TCT ACT AAA TCC ACT TCT GTA TCT GGC CGG
CTG GGC CCA

Madison, WI) in the presence of ^{35}S -methionine (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), according to the manufacturer's instructions. Unincorporated ^{35}S -methionine was removed by gel chromatography on a NAP5 column (Amersham Biosciences). SDS-PAGE and autoradiography were used to verify that the molecular size of the translated protein matched that predicted from the amino acid sequence. For immunoassay, 2 μl of serum were added to 25 μl of 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Tween 20 (TBST) containing 20,000 cpm of labelled recombinant protein in wells of a 96-well plate (Beckman, Fullerton, CA) and incubated overnight on ice. Immune complexes were recovered by adding 1 mg of protein A-Sepharose (Amersham Biosciences) to human serum or 4 μl protein G-Sepharose to mouse serum (Amersham Biosciences), pre-swollen and resuspended in 50 μl of TBST, then incubated for 1 h at 4 °C with shaking. The beads were then washed 5 times with 800 μl of PBST and centrifuged at 600 g for 3 min to pellet beads between washes. After washing, the beads were transferred in 100 μl of TBST to a 96-well Optiplat (Perkin-Elmer, Waltham, MA), 150 μl of Microscint-40 (Perkin-Elmer) was added and the plates were shaken for 30 min followed by counting for 5 min in a TopCount (Perkin-Elmer) scintillation counter to measure recovered cpm.

For competition of binding to radio-labelled TrxA-IA-2 chimeric proteins, unlabelled TrxA-IA-2 proteins were expressed by *in-vitro* transcription and translation in the presence of non radioactive methionine, according to the TnT kit manufacturer's instructions. The amount of competitor necessary for efficient competition was determined in titration experiments using serial dilution of cold antigen to compete sera with specific reactivities. Non specific binding of human sera to the TrxA backbone was competed using 2.5 μl of a bacterially expressed TrxA protein cloned in the pTrcHis vector (Invitrogen, Carlsbad CA, USA).

2.3. Peptide ELISA

A peptide corresponding to IA-2 juxtamembrane region amino acids 609 to 631 was synthesised (Primm, Milano Italy) and then conjugated to BSA. Briefly, peptide and BSA, at a ratio of 1 mg of peptide to 3 mg of BSA, were incubated for 2.5 h in the presence of 0.1% glutaraldehyde, followed by addition of glycine (200 mM final concentration) and dialysis overnight against PBS. Maxisorp™ 96-well polystyrene ELISA plates (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) were coated with the equivalent of 1 μg of peptide per well overnight at 4 °C in carbonate buffer pH 9.5 and then blocked with 1% BSA in PBS. For the ELISA assay, 100 μl of diluted sera (1/1000 in 0.1% BSA, 0.05% Tween-20, PBS (PBST)) were added to the wells and the plates incubated overnight at 4 °C, washed 6 times with 200 μl PBST, incubated with an HRP-conjugated second antibody diluted 1/2000 in PBST for 1 h at room temperature, washed 6 times with 200 μl PBST and developed with *o*-phenylenediamine solution in citrate buffer pH 5.

2.4. Sera and antibodies

Serum samples obtained at onset of type 1 diabetes from 113 patients recruited at the San Raffaele Hospital, Milan, Italy were included (64 males; mean age, 10.45 years; range, 1–35 years).

Of these, 89 were IA-2 antibody positive. Sera were previously classified as positive or negative for antibodies to the JM region of IA-2 (Bearzatto et al., 2002). Sera from 87 Italian non-diabetic IA-2 antibody negative control subjects (50 males; mean age, 5 years; range, 0.1–11 years) obtained from children without diabetes or a family history of diabetes presenting at the San Raffaele Hospital paediatrics department were also included. The monoclonal antibody 76F directed against the JM2 epitope (Piquer et al., 2006) and serum from a type 1 diabetes patient previously characterised as positive for antibodies against the JM1 epitope were used as positive controls.

For experiments involving the Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG)_{40–55} epitope, we used serum samples from 12 female C57BL/6 mice. Four to six week old mice were immunized with incomplete Freund's adjuvant (IFA; Difco, Detroit, MI) supplemented with 4 mg/ml Mycobacterium Tuberculosis (strain H37Ra; Difco) and 200 mg MOG40-55 (Roche Milano Ricerche, Milano, Italy) peptide followed by intraperitoneal injection of 500 ng of pertussis toxin (Sigma, St. Louis, MI) the same day and 48 h later. Sera were collected at day 1, 7, 17, 27, 35, and 43 post-immunization.

3. Results

3.1. Validation of the epitope-specific RBA in EAE immunization model

To test the epitope-specific RBA, we used a well established experimental allergic encephalitis (EAE) mouse model in which C57BL/6 mice are immunized with a peptide corresponding to amino acid residues 40–55 of MOG. Serum reactivity at sequential time points after immunization with MOG_{40–55} peptide was tested in 12 mice by radiobinding with a MOG_{40–55} TrxA chimera (Fig. 2). A rise of antibody titres above pre-immune levels was detected in 11 mice from two weeks after immunization. Antibody titres as detected by radiobinding increased in the majority of mice until the follow-up ended seven weeks post immunization. These results confirmed our ability to determine antibody levels to specific epitopes using the RBA.

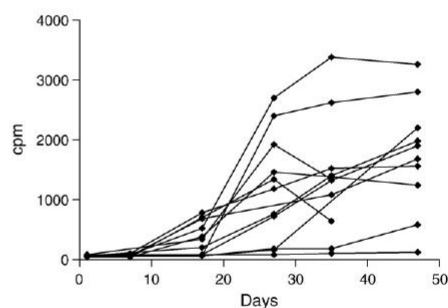


Fig. 2. Epitope specific RBA for immunization peptides. Serum antibody binding (cpm; y axis) detected with the MOG_{40–55} epitope specific RBA in 12 mice at sequential time points after immunization with MOG_{40–55} peptide (days; x axis).

3.2. The RBA detects antibodies to IA-2 JM TrxA chimeric proteins

The type 1 diabetes autoantigen IA-2 was used to determine the utility of the epitope-specific RBA in human autoimmunity. Binding above the 99th centile of the control sera was observed in 37 (34%) of 113 patients for the IA-2_{JM₆₀₉₋₆₃₁} TrxA chimeric protein, 17 (15%) of 113 patients for the IA-2_{JM₆₀₉₋₆₂₁} TrxA chimeric protein, and 16 (14%) of 113 patients for IA-2_{JM₆₁₉₋₆₃₁} TrxA chimeric protein (Fig. 3A). All positive patient sera were confirmed using whole intracellular IA-2/IA-2 β chimeras with competition as previously described (data not shown). Binding above background to IA-2 JM TrxA chimeric proteins was observed in 3 of 87 control subjects (Fig. 3A). All three control sera bound each of the constructs with similar cpms, suggesting that they were directed against the TrxA backbone of the chimeric proteins. In support of this, competition with cold TrxA protein completely inhibited binding to IA-2 JM TrxA chimeric proteins in these sera (Fig. 3B). In contrast to the control sera, binding to the IA-2_{JM₆₀₉₋₆₃₁} TrxA chimeric protein was not abolished by addition of cold TrxA protein in all 37 positive patient sera (Fig. 3B). Thus, this RBA strategy is feasible for investigating human autoimmunity.

3.3. IA-2 JM epitope groups

Consistent with previous data using complete intracellular IA-2/IA-2 β chimeras (Bearzatto et al., 2002), in patients tested with competition with cold TrxA protein most positive samples bound the long IA-2_{JM₆₀₉₋₆₃₁} TrxA chimera plus one of the two short chimeras (Fig. 4A). 14 patients had antibodies that bound both IA-2_{JM₆₀₉₋₆₃₁} TrxA and IA-2_{JM₆₀₉₋₆₂₁} TrxA chimeric proteins, but not IA-2_{JM₆₁₉₋₆₃₁} TrxA, consistent with antibodies to the JM1 epitope; a further 11 samples showed binding to IA-2_{JM₆₀₉₋₆₃₁} TrxA and IA-2_{JM₆₁₉₋₆₃₁} TrxA chimeric proteins, but not IA-2_{JM₆₀₉₋₆₂₁} TrxA, consistent with antibodies to the JM2 epitope. In two of these patients (#29, #30), binding was markedly higher for the longer IA-2_{JM₆₀₉₋₆₃₁} TrxA chimeric protein, suggesting the presence of antibodies that bind to epitopes better expressed in the longer construct. Antibodies from 3 patients (#26, #27, #28) bound all three constructs, consistent with being directed against both JM1 and JM2 epitopes. Surprisingly, we found that sera from a further 7 patients only bound IA-2_{JM₆₀₉₋₆₃₁} TrxA protein. This novel finding suggests the presence of antibodies to an epitope that crosses the IA-2₆₀₉₋₆₂₁ and IA-2₆₁₉₋₆₃₁ boundaries (designated JM3) (Fig. 4B). In total, we detected antibodies to three specific epitopes, designated JM1, JM2 and JM3, using the RBA.

3.4. Comparison of ELISA and the RBA antibody epitope detection

A peptide ELISA was performed to compare the efficiency of ELISA vs the RBA at detecting antibodies to JM specific peptide epitopes (Fig. 5A). The peptide ELISA identified binding that was above background in sera from 3 of 6 patients positive for antibodies to the JM1 epitope, 1 of 6 patients positive for antibodies to the JM2 epitope, and 1 of 4 patients positive for antibodies to the JM3 epitope. Interestingly, competition with this peptide in the IA-2_{JM₆₀₉₋₆₃₁} TrxA chimeric protein RBA was consistent with the ELISA results, showing inhibition of binding for the three ELISA positive JM1 antibody sera and the one ELISA positive serum against the JM3 epitope, but not ELISA negative sera with antibodies to the JM1 and JM3 epitopes (Fig. 5B). None of the sera positive against the JM2 epitope was inhibited with cold IA-2₆₀₉₋₆₃₁ peptide. In contrast, binding of patient sera to the IA-2_{JM₆₀₉₋₆₃₁} TrxA chimeric protein was readily inhibited with the relevant IA-2 JM TrxA chimeric proteins (Fig. 5C). These data indicate that conformational differences exist between the peptide and the epitope presented in the TrxA loop or the whole intracellular protein, and that there is diversity in antibody binding to small peptides.

3.5. Mutagenesis epitope mapping using the RBA strategy

Mutagenesis of the IA-2_{JM₆₀₉₋₆₃₁} TrxA chimera confirmed that individual sera bind different epitopes within the JM2 and JM3 clusters (Fig. 6). Mutagenesis of residues 621, 622, 625, 626, 627, and 630 abolished binding of all four tested sera containing antibodies to the JM2 epitope. Additionally, mutagenesis of residues 619, 624, 628, and 631 distinguished different patterns within these four sera. Reactivity to the mutagenized IA-2_{JM₆₀₉₋₆₃₁} TrxA chimeras

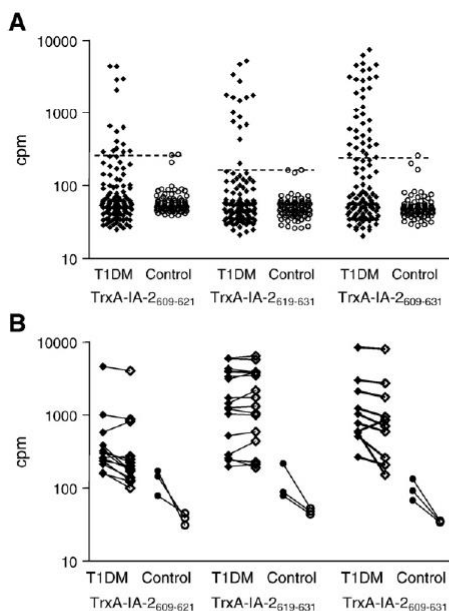


Fig. 3. Epitope specific RBA for autoantibodies. A. Serum antibody binding (cpm; y axis) detected by epitope specific RBA for IA-2_{JM₆₀₉₋₆₂₁}, IA-2_{JM₆₁₉₋₆₃₁}, or IA-2_{JM₆₀₉₋₆₃₁} TrxA chimeric proteins in patients with type 1 diabetes (filled symbols) and control subjects (open symbols). Threshold corresponding to the 99th centile of controls is shown as a dotted line. B. Binding (cpm; y axis) without (filled symbols) and with (open symbol) competition by cold TrxA protein in sera from patients with type 1 diabetes (diamonds) and control subjects (circles).

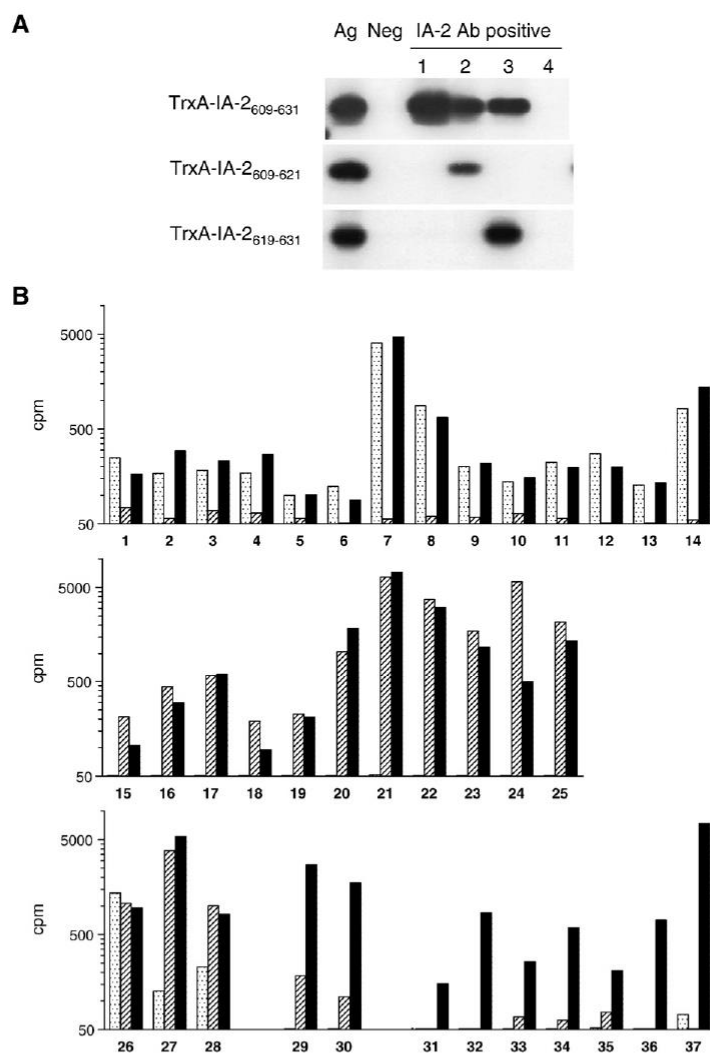


Fig. 4. Distinction of antibodies to IA-2 JM1, JM2, and JM3 epitopes by RBA. A. Autoradiography after SDS-PAGE of radiolabelled TrxA IA-2 JM chimeric proteins immunoprecipitated with patient IA-2 antibody positive sera: binding to the JM3 epitope (serum 1) JM1 epitope (serum 2), JM2 epitope (serum 3), or the IA-2 PTP domain (serum 4). B. Binding (cpm; y axis) to IA-2 JM₆₀₉₋₆₂₁ (dotted columns), IA-2 JM₆₁₉₋₆₃₁ (hatched columns), and IA-2 JM₆₀₉₋₆₃₁ (filled columns) TrxA chimeric proteins defines patients with reactivity against the JM1 epitope alone (sera 1–14), the JM2 epitope alone (sera 15–25), JM2 and JM3 epitopes (sera 29–30), or the JM3 epitope alone (sera 31–37). Binding was performed in the presence of TrxA protein.

in the sera with antibodies to the JM3 epitope was markedly different to that of antibodies to the JM2 epitope. Moreover, reactivity was heterogeneous between sera positive against the JM3 epitope. Mutagenesis of residues 621 and 623 markedly reduced binding in one serum, whereas in the

other serum binding was abolished by mutagenesis of residues 619, 623, 624, 627 and 628, and reduced by mutagenesis of residues 621, 630 and 631. For antibodies to the JM1 epitope, mutagenesis of residue 619 abolished binding to the IA-2 JM₆₀₉₋₆₃₁ TrxA chimera. Thus the RBA

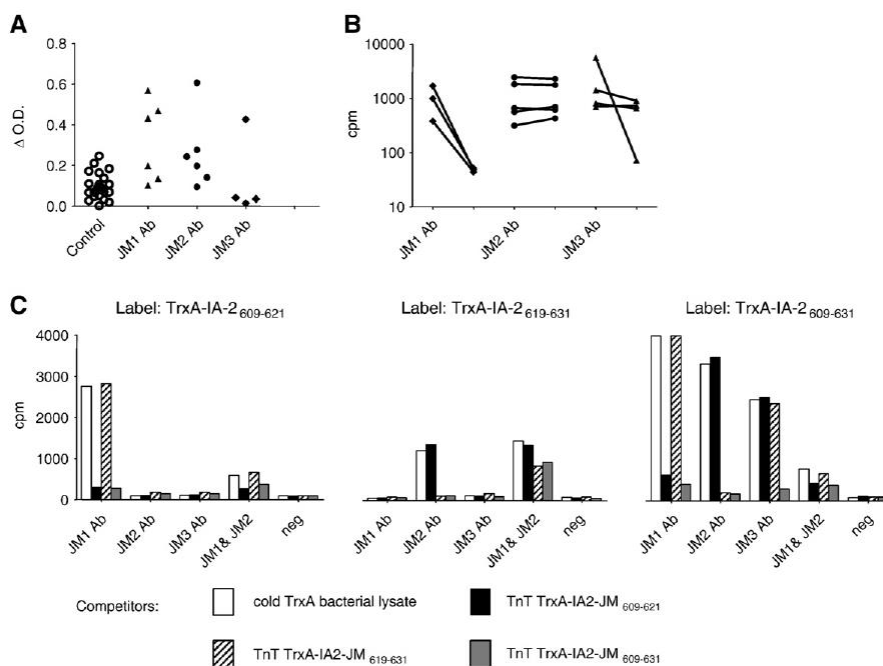


Fig. 5. Comparison of RBA and ELISA for detection of JM epitopes. **A.** Binding (OD; y axis) in ELISA to the IA-2₆₀₉₋₆₃₁ peptide by selected patients sera that were positive in RBA for antibodies against the JM1, JM2 or JM3 epitopes. **B.** Binding (cpm; y axis) without (filled symbols) and with (open symbol) competition by cold IA-2₆₀₉₋₆₃₁ peptide in the IA-2₆₀₉₋₆₃₁ construct RBA for selected sera with antibodies to JM1, JM2, or JM3 epitopes. **C.** Binding (cpm; y axis) to the IA-2₆₀₉₋₆₂₁, IA-2₆₁₉₋₆₃₁, IA-2₆₀₉₋₆₃₁ constructs with competition by the corresponding cold in vitro transcribed and translated proteins or just cold TrxA bacterial lysate for selected sera with antibodies to JM1, JM2, JM3, or JM1&JM2 epitopes.

can be used in combination with mutagenesis epitope mapping.

4. Discussion

Here we used recombinant DNA expression of antigen in combination with a RBA to quantify antibody reactivity to single epitopes. This work is proof of principle that presenting a small peptide encoding a complete epitope in a neutral backbone protein, such as TrxA, is a sensitive method to detect autoantibody specificity. Moreover, the method is amenable to mutational analysis that allows identification of residues critical for epitope formation and further sub-typing of antibody specificities.

Two factors were considered critical for our method. First, peptide corresponding to the epitope was expressed within a backbone frame that facilitated exposure of this protein in a conformation that was recognisable by antibodies. The TrxA backbone protein was used here, but other backbone proteins are likely to be applicable. Of note, sera from a few control subjects appeared to have weak binding to the backbone protein that could be inhibited by cold TrxA protein. Thus it is important to confirm binding specificity through a competition

experiment using non-epitope containing protein. The second critical factor was the use of liquid phase binding with radio-labelled protein. Combined with peptide insertion into a relatively inert backbone protein, use of the liquid phase RBA format enabled sensitive detection of antibodies to specific linear epitopes. Importantly, comparison to the ELISA peptide format showed clear differences. The ELISA was unable to detect antibodies to the JM2 epitope, and only detected some of the JM1 and JM3 epitopes, indicating the likely existence of conformational differences in the peptide due to the method of presentation. Additionally, we expect that the RBA format is more permissive to conformational adjustment relative to antibody binding architecture.

With respect to autoantibody responses to the IA-2 JM region in type 1 diabetes, our study shows even higher heterogeneity within a small antigenic region than previously demonstrated (Bearzatto et al., 2002). First, we identified a novel third epitope cluster that appears to span the previously defined JM1 and JM2 boundaries. Second, mutagenesis showed that between patients there were numerous small differences in the amino acids within epitope clusters that were required for efficient autoantibody binding. It is likely that these differences reflect natural permutations resulting

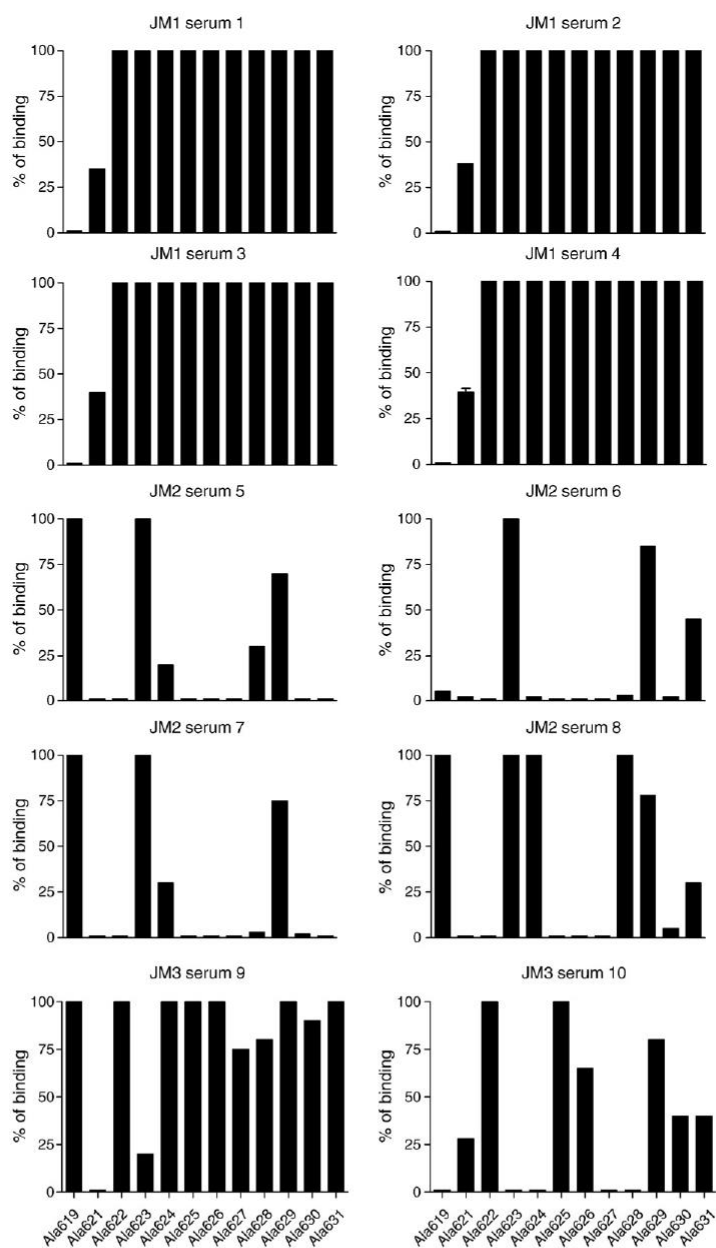


Fig. 6. Binding (cpm; y axis) of selected patient sera with antibodies to IA-2 JM2 epitopes and IA-2 JM3 epitopes in epitope specific radiobinding assay with alanine scanning mutants of the IA-2 JM₆₀₉₋₆₃₁-TrxA chimeric protein.

from clonal maturation of B cell responses, as well as the heterogeneity of antibody specificity within each patient for a given epitope cluster.

In summary, we propose a sensitive assay format that can be employed to quantify antibodies to single epitope clusters. Here, this assay proved to be very effective at quantifying antibodies to so-called linear epitopes, and was adapted to amino acid epitope mapping by relatively simple mutagenesis experiments. Future testing is required to determine the applicability of this format to detect antibodies to conformational epitopes.

Acknowledgements

Sandra Piquer was supported by an EU training and Mobility fellowship (ERBFMRXCT 970142). The work was supported by funding from the Italian Health Ministry (Ricerca Finalizzata 2006) and the DFG research center and cluster of excellence for Regenerative Therapies Dresden. This work is part of the dissertation of Sandra Piquer.

References

- Achenbach, P., Koczwar, K., Knopff, A., Naserke, H., Ziegler, A.G., Bonifacio, E., 2004a. Mature high-affinity immune responses to (pro)insulin anticipate the autoimmune cascade that leads to type 1 diabetes. *J. Clin. Invest.* 114, 589.
- Achenbach, P., Warncke, K., Reiter, J., Naserke, H.E., Williams, A.J., Bingley, P.J., Bonifacio, E., Ziegler, A.G., 2004b. Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics. *Diabetes* 53, 384.
- Atassi, M.Z., Smith, J.A., 1978. A proposal for the nomenclature of antigenic sites in peptides and proteins. *Immunochemistry* 15, 609.
- Bearzatto, M., Naserke, H., Piquer, S., Koczwar, K., Lampasona, V., Williams, A., Christie, M.R., Bingley, P.J., Ziegler, A.G., Bonifacio, E., 2002. Two distinctly HLA-associated contiguous linear epitopes uniquely expressed within the islet antigen 2 molecule are major autoantibody epitopes of the diabetes-specific tyrosine phosphatase-like protein autoantigens. *J. Immunol.* 168, 4202.
- Bearzatto, M., Lampasona, V., Belloni, C., Bonifacio, E., 2003. Fine mapping of diabetes-associated IA-2 specific autoantibodies. *J. Autoimmun.* 21, 377.
- Bonifacio, E., Lampasona, V., Bingley, P.J., 1998. IA-2 (islet cell antigen 512) is the primary target of humoral autoimmunity against type 1 diabetes-associated tyrosine phosphatase autoantigens. *J. Immunol.* 161, 2648.
- Greenspan, N.S., Di Cera, E., 1999. Defining epitopes: it's not as easy as it seems. *Nat. Biotechnol.* 17, 936.
- Hoppu, S., Harkonen, T., Ronkainen, M.S., Akerblom, H.K., Knip, M., Childhood Diabetes in Finland Study Group, 2004. IA-2 antibody epitopes and isotypes during the prediabetic process in siblings of children with type 1 diabetes. *J. Autoimmun.* 23, 361.
- Kawasaki, E., Yu, L., Rewers, M.J., Hutton, J.C., Eisenbarth, G.S., 1998. Definition of multiple ICA512/phogrin autoantibody epitopes and detection of intramolecular epitope spreading in relatives of patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 47, 733.
- Kim, S.J., Jeong, D.G., Jeong, S.K., Yoon, T.S., Ryu, S.E., 2007. Crystal structure of the major diabetes autoantigen insulinoma-associated protein 2 reveals distinctive immune epitopes. *Diabetes* 56, 41.
- Mackay, I.R., Rowley, M.J., 2004. Autoimmune epitopes: autoepitopes. *Autoimmun. Rev.* 3, 487.
- Mayr, A., Schlosser, M., Grober, N., Kenk, H., Ziegler, A.G., Bonifacio, E., Achenbach, P., 2007. GAD autoantibody affinity and epitope specificity identify distinct immunization profiles in children at risk for type 1 diabetes. *Diabetes* 56, 1527.
- Mendel, I., Kerlero de Rosbo, N., Ben-Nun, A., 1995. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: Fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur. J. Immunol.* 25, 1951.
- Piquer, S., Valera, L., Lampasona, V., Jardin-Watelet, B., Roche, S., Granier, C., Roquet, F., Christie, M.R., Giordano, T., Malosio, M.L., Bonifacio, E., Laune, D., 2006. Monoclonal antibody 76F distinguishes IA-2 from IA-2beta and overlaps an autoantibody epitope. *J. Autoimmun.* 26, 215.
- Savoca, R., Schwab, C., Bosshard, H.R., 1991. Epitope mapping employing immobilized synthetic peptides. How specific is the reactivity of these peptides with antiserum raised against the parent protein? *J. Immunol. Methods* 141, 245.
- Schwab, C., Twardek, A., Lo, T.P., Brayer, G.D., Bosshard, H.R., 1993. Mapping antibody binding sites on cytochrome c with synthetic peptides: are results representative of the antigenic structure of proteins? *Protein Sci.* 2, 175.

DISCUSSIÓ

5. Discussió

Diversos estudis han associat la presència de autoanticossos contra l'illot amb el desenvolupament de la T1D ³⁰¹. La aparició de aacs contra un o més dels autoantígens coneguts associats a aquesta malaltia (GAD65, IA2 o IAA) és el senyal del procés patogènic autoimmune de mort β cel·lular. De fet, l'atac contra la cèl·lula β pot ser detectat per la presència de aacs depenent dels factors de risc associats al genotip, l'isotip i el subtipus dels aacs així com la seva especificitat respecte els epítops. Tot i que un estudi recent publicat per Strollo i col·laboradors suggereix que incloure la determinació de aacs contra la molècula de insulina oxidada respecte els IAA que mesuren aacs contra la molècula nativa, millora l'avaluació del risc i la precisió de la predicció a desenvolupar T1D en una població de nens positius per aacs standarts contra l'illot ³⁰² i que alguns estudis estudien la possibilitat que la determinació de aacs contra ZnT8 pugui substituir la determinació contra IAA, GAD65 i IA2 com a valor predictiu per al desenvolupament de la T1D ³⁰³ fins ara la presència de anticossos contra la molècula de IA2 implica un risc més elevat pel desenvolupament de la T1D que no pas la sola presència de aacs contra GAD i/o IAA. Aquest fet implica una possible relació causal de aquesta molècula en el desenvolupament de la malaltia. La manca d'informació respecte la funció de aquesta molècula així com els pocs recursos existents per a la realització de estudis dirigits a conèixer la funció i regulació de aquesta proteïna ens va portar al desenvolupament del treball que porta per títol %Monoclonal antibody 76F distinguishes IA2 from IA2 β and overlaps an autoantibody epitope+. En

aquest treball es descriu l'obtenció de dos acs monoclonals el 76F i IA9 que reconeixen la molècula d'IA2 exclusivament i les molècules d'IA2 i IA2 β , respectivament. Un altre treball més recent publicat per Takeyama i col·laboradors mostra l'obtenció de dos nous acs monoclonals contra la molècula d'IA2 anomenats SK1 i CC20 amb una especificitat d'epítop pels residus 446-479 i 696-745, respectivament ¹⁷⁵.

El 76F reconeix la forma nativa i desnaturalitzada de la molècula d'IA2 d'origen humà i murí (rata i ratolí) i té una especificitat d'epítop pels residus 626-630 (FEYQD) que es troben en la regió de juxtamenbrana de IA2 humà i murí però no a la de IA2 β . Aquesta regió per la seva banda correspon a un epítop linear trobat en anticossos de pacients afectes de T1D (JM2), la unió dels quals a IA2 es veu inhibida per la presència del 76F.

L'obtenció d'aquest ac ens porta a la realització de l'objectiu II d'aquesta tesi que es basa en la seva utilització en treballs per a la detecció d'epítops específics en la TD1 i en estudis funcionals.

Pel que fa a l'autoimmunitat, el 76F ha estat utilitzat en diversos treballs per a la detecció d'epítops específics en la TD1. De fet, un anàlisi realitzat en el nostre grup demostra com la presència del residu 626 és crítica per la unió de l'ac anomenat JM2 que reconeix l'epítop 621-630 de la molècula d'IA2. La superposició del 76F amb epítops reconeguts per acs relacionats amb la diabetis el fan un bon candidat per tal de ser utilitzat en assaigs per detectar acs epítop específics mitjançant desplaçament de l'ac monoclonal ²¹⁷. Un treball que forma part d'aquesta tesis *Two distinctly HLA associated contiguous linear epitopes uniquely expressed within the IA-2 molecule are major autoantibody epitopes of the diabetes-specific tyrosine phosphatase like*

protein autoantigens+també utilitza el 76F. Els epítops JM (epítops JM1(IA2₆₁₁₋₆₂₀) i JM2 (IA2₆₂₁₋₆₃₀)) són reconeguts pel 67% dels subjectes afectes per TD1 positius per acs contra la molècula dIA2 i els familiars positius per aquests acs tenen un risk de més del 50% a desenvolupar T1D en 6 anys fins i tot en absència de genotips HLA associats a T1D. La inhibició de la unió del 76F a la molècula dIA2 és altament específica per part dels sèrums que contenen acs contra l'epítop JM2 (IA2₆₂₁₋₆₃₀) i permet diferenciar els sèrums que contenen acs que reconeixen l'epítop adjacent JM1(IA2₆₁₁₋₆₂₀). Els sèrums amb acs contra epítops distants tampoc no inhibeixen la unió del 76F a IA2. Per altra banda, les diferències detectades en l'habilitat dels diferents sèrums amb anticossos contra l'epítop JM2 per inhibir la unió del 76F a IA2 estan directament relacionades amb el títol d'anticossos contra la molècula dIA2 d'aquests sèrums i amb les diferències en els residus de l'epítop JM2 dels diferents pacients (observacions del nostre grup no publicades). Tot i que existeixen diferents assaigs per tal de diferenciar els acs específics per alguns dels epítops dIA2 els resultats d'aquest treball demostren que es possible desenvolupar noves metodologies que utilitzin acs monoclonals dirigits a regions d'autoepítops per tal de diferenciar aacs que reconeixen epítops adjacents. Aquest fet és important per tal de poder fer una monitorització del procés d'autoimmunitat, factor important ja que s'ha demostrat que la progressió i gravetat d'una malaltia estan sovint relacionades amb el desenvolupament d'acs contra epítops nous ³⁰⁴ o específics ³⁰⁵. Aquest fet també es important per tal de poder monitoritzar teràpies que estiguin associades amb el desenvolupament de nous processos d'autoimmunitat. El mateix estudi conclou que la presència d'acs contra un d'aquests dos epítops

és mútuament exclouent de l'altre; Es van trobar aacs JM2 i no JM1 en familiars amb genotips HLA DR3/4, DR4/13 o DR1/4 i es demostra com la unió dels aacs a l'epítop JM2, però no a l'epítop JM1, va afectar notablement la proteòlisi de la molècula d'IA2.

En aquest punt cal destacar que un article publicat a Diabetes el juny d'aquest any identifica aacs contra una variant de la molècula d'IA2, IA2var, que té tres substitucions aminoacídiques (Cys²⁷, Gly⁶⁰⁸ i Pro⁶⁷¹) respecte la molècula completa. Es van analitzar els aacs contra IA2var en 1686 familiars de primer grau de pacients amb T1D provinents de l'estudi anomenat TrialNet Pathway to Prevention Study i la presència d'aquests es va relacionar amb una progressió accelerada cap al desenvolupament de la T1D en aquells individus positius per GAD65 i/o insulina, però negatius per IA2 en els tests standards. A més a més, els familiars positius per aacs contra IA2var i per a un dels aacs utilitzats en els assaigs tradicionals i amb l'haplotip d'alt risc HLA-DRB1*04-DQB1*03:02 debuten ràpidament. El modelatge molecular de la molècula d'IA2var prediu que la variació genòmica dels tres aminoàcids induïx canvis en la estructura tridimensional que podria provocar el desenmascarament d'epítops en el domini extracel·lular de la molècula. Així aquest estudi suggereix que la presència d'aquests aacs identificaria subjectes amb alt risc per desenvolupar la malaltia que podrien participar en estudis de prevenció i que tenen un sol aac en els screenings standards, de manera que sense la determinació dels aacs contra aquesta variant de la molècula serien classificats com a familiars amb baix risc per al desenvolupament de la T1D ³⁰⁶.

El 76F també ha estat utilitzat com a control positiu en el desenvolupament d'assaigs per detectar aacs contra epítops específics ³⁰⁷, com és el cas de l'article "Radiobinding assay for detecting autoantibodies to single epitopes" que forma part de aquesta tesi i en la caracterització de l'ac monoclonal humà 96/3 mitjançant assaigs de mutagènesis dirigida ³⁰⁸.

IA2 és una molècula involucrada en els processos de secreció de la insulina ^{189, 191, 193}. Els mecanismes pels quals la cèl·lula β aconsegueix mantenir una reserva constant de grànuls de secreció són encara desconeguts. Es coneix que IA2 és una proteïna intrínseca de membrana dels grànuls de secreció el domini citosòlic de la qual s'uneix a la β -2-sintrofina, a la proteïna associada a la F-actina i pateix un tall per la μ -calpaina (residus 658-659) en el seu domini citoplasmàtic que genera un fragment anomenat ICA512-CCF (residus 659-979) que es dirigeix cap al nucli i regula positivament la transcripció de gens dels grànuls com la insulina i el seu propi gen. Per altra banda, l'ICA512-CCF també pot dimeritzar amb la molècula intacta d'IA2 dels grànuls desplaçant la β -2-sintrofina i provocant un augment de la mobilitat dels grànuls i de la secreció d'insulina. La funció d'IA2 β , molècula altament homòloga a IA2 en el seu domini citoplasmàtic, és menys coneguda. Així doncs, eines per poder distingir IA2 d'IA2 β , així com diferents regions d'IA2 són molt útils a l'hora d'estudiar les funcions d'aquestes dues proteïnes. En el moment de la realització d'aquest treball hi havia poques eines per a la detecció d'IA2 i d'IA2 β i la majoria eren anticossos policlonals que reconeixien ambdues proteïnes o anticossos pèptid-específics. Existia un ac humà (96/3) obtingut a partir de una línia cel·lular B d'un pacient afecte de TD1 transformada amb EBV ³⁰⁹ però aquest ac s'unia a un epítop conformacional

compartit pel domini PTP de les molècules d α A2 i IA2 β representat pel motiu NXEXX(AA aromàtic)XXG que inclou els residus N⁸⁵⁸, E⁸³⁶ i F⁷⁹⁹. El 76F té un requeriment d'epítop mínim (AA aromàtic) X (AA aromàtic) (Q/N/C/M/H/P), seqüència conservada a la regió de jxtamembrana propera a la regió de tall de la μ -calpaina de la molècula d α A2 de ratolí, rata i humans que no es troba conservada en la molècula d α A2 β per la manca d'un AA aromàtic al principi del motiu. Així, el 76F pot distingir entre les molècules d α A2 i d α A2 β així com entre la molècula intacta d α A2 i la molècula d α A2 que ha estat tallada per la μ -calpaina i que per tant, ha perdut el seu domini citoplasmàtic. Aquest darrer fet és molt interessant a l'hora de realitzar estudis funcionals. En aquest sentit, també és important la generació de l'ac CC2 per part de Takeyama i col·laboradors en un estudi publicat l'any 2009 que reconeix específicament la molècula d α A2 entre els residus 696 i 745 i que per tant permetria distingir i localitzar el domini citoplasmàtic de la proteïna generat pel tall de la μ -calpaina ¹⁷⁵.

El 76F ha estat utilitzat en diversos treballs de caracterització funcional i regulació de l'expressió de la molècula d α A2.

Roberts i col·laboradors van utilitzar aquest ac monoclonal en l'estudi de l'expressió de la molècula d α A2 durant el desenvolupament dels illots pancreàtics ¹⁸³. En aquest treball es demostra mitjançant tècniques d'immunohistoquímica com l'expressió d α A2 es detecta durant el desenvolupament fetal del pàncrees de rata només en les estructures tipus illot positives per insulina i glucagó i negatives per PDX1 en el dotzè dia de gestació. Aquest mateix estudi va detectar un increment de la reactivitat per IA2 en els illots de rates neonatals des de nivells molt baixos en el dia 1 de vida fins

a nivells moderats en el dia 10, nivells que augmenten considerablement en els illots de rates adultes on s'observa una expressió heterogènia en tots els tipus cel·lulars de l'illot. Per demostrar aquest darrer punt el 76F és la proteïna utilitzada tant en les tècniques de immunohistoquímica com en la realització dels western blots corresponents.

Un altre treball on s'utilitza el 76F és un dels articles que forma part de aquesta tesis i que porta per títol "Different regulated expression of the tyrosine phosphatase-like proteins IA-2 and phogrin by glucose and insulin in pancreatic islets" on s'estudia la regulació de l'expressió de la molècula d'IA2 en illots humans i de rata ¹⁸⁴. L'objectiu d'aquest estudi és definir els efectes de la glucosa i la insulina en la regulació de l'expressió als illots pancreàtics de les molècules d'IA2 i IA2 β així com investigar la relació de ambdues molècules amb la secreció d'insulina. L'estudi demostra com existeix un increment en l'expressió d'IA2 en l'illot (estudis realitzats a 1, 5 i 10 dies del naixement), augment específic ja que no es detecta en els nivells d'IA2, els nivells de la qual es mantenen estables des del naixement. Amb la finalitat de trobar la causa d'aquest increment es van realitzar estudis de secreció d'insulina amb glucosa i amb estimuladors i/o bloquejants de la secreció que demostren com la insulina és un regulador important de l'expressió de la molècula d'IA2 i el mediador dominant dels efectes estimuladors de la glucosa en els nivells d'IA2 de l'illot in vitro. Aquest treball demostra una regulació d'IA2 a nivell de RNA missatger per part de la glucosa i una concentració elevada d'AMPc així com un efecte de la insulina sobre els nivells proteics d'IA2 mitjançant l'estimulació de la biosíntesi de la proteïna.

Els experiments de pulse-chase, per la seva banda, indiquen que la degradació de IA2 és lenta a baixes concentracions de glucosa i que no es veu influenciada en presència de insulina.

El 76F és una metodologia mitjançant la qual es quantifica la presència d'IA2 en illots de rata de diferents edats mitjançant western blots. En aquest punt és important la utilització del 76F ja que la seva especificitat per la molècula d'IA2 permet estudiar l'expressió d'aquesta molècula tot i comparant-la amb l'expressió d'IA2 β . Aquest treball també quantifica mitjançant western blot tot i utilitzant el 76F com a anticòs primari els efectes de la glucosa i de diferents agents com la tolbutamida, el IBMX, la forskolina, el PMA, la insulina, el IGF, l'anticòs contra el receptor de la insulina i la diazoxida sobre IA2 a nivell proteic. Per tal d'estudiar la regulació post-transcripcional de la molècula d'IA2 aquest estudi també utilitza el 76F en estudis de marcatge metabòlic en illots de rata aïllats.

L'objectiu III d'aquesta tesis es basa en l'estudi de diferents aspectes de la resposta humoral específica contra les molècules de GAD i IA2 (reconeixement de diferents epítops i/o subclasses) en la T1D. Dins d'aquest objectiu es desenvolupen dos punts concrets, la determinació d'un possible patró diferencial de resposta contra la molècula de GAD en individus afectes de diabetis T1D respecte altres malalties autoimmunes així com la identificació molecular dels epítops més rellevants i immunogènics específics per a la molècula d'IA2 en individus afectes de T1D i el desenvolupament d'un mètode quantitatiu prou sensible per mesurar la seva prevalença.

Per respondre la pregunta sobre la possible existència d'un patró diferencial contra la molècula de GAD en individus afectes de T1D respecte individus afectes d'altres malalties autoimmunes com el síndrome de Stiff man o el síndrome poliendocrí autoimmune de tipus II (APS-II) varem desenvolupar una serie d'experiments de l'execució dels quals varem obtenir els resultats que es mostren en l'article "Humoral autoimmune responses to glutamic acid decarboxylase have similar target epitopes and subclass that show titer-dependent disease association". Per realitzar aquest estudi es van utilitzar mostres de pacients afectes de les tres patologies i en el cas dels pacients afectes de T1D es van fer dos grups, un dels amb pacients positius per GAD seleccionats aleatòriament i l'altre amb individus positius per GAD seleccionats en base a un alt nivell de reactivitat contra aquesta molècula (> 1000 unitats). L'anàlisi dels resultats va confirmar la diferència prèviament descrita en la resposta autoimmune contra la molècula de GAD entre els pacients afectes de T1D i SMS^{310, 314} però aquesta diferència en la reactivitat contra els diferents epítops i en subclasses de IgG és deguda a la marcada diferència existent pel que fa als nivells d'acs contra la molècula de GAD entre aquests dos grups. Així, la presència de tipus de subclasses diferents a IgG1 que fins al moment era considerada una característica específica dels pacients afectes de SMS, ha estat associada a la majoria dels pacients afectes de T1D amb una alta reactivitat contra la molècula de GAD. Els resultats indiquen que la prevalença incrementada dels acs de subclasses IgG2, IgG3 i IgG4 detectada en els pacients afectes de SMS és un efecte secundari degut a l'alt títol d'acs d'aquest grup ja que el patró de reconeixement de les diferents subclasses és similar

quan es comparen amb els altres grups de pacients seleccionats en base a un títol d'anticòs semblant.

De la mateixa manera, els pacients afectes de SMS tenen una àmplia reactivitat contra la molècula de GAD que inclou anticòs contra els epítops que s'expressen a l'extrem NH₂ terminal i contra la molècula de GAD67, mentre que en el cas dels pacients afectes de T1D només tenen anticòs contra aquests epítops aquells que tenen un alt títol d'anticòs contra la molècula de GAD.

Els resultats del nostre treball indiquen que les diferències qualitatives descrites per altres autors no són específiques del tipus de malaltia sinó que són una conseqüència de les diferències existents pel que fa als nivells d'anticòs, idea que ja havia estat suggerida per alguns autors³¹². Així doncs, la possible existència d'un patró humoral específic de resposta contra la molècula de GAD en les diferents patologies analitzades quedaria descartada.

En aquest punt seria interessant destacar els resultats obtinguts per Wyatt i col·laboradors en un estudi publicat l'any 2018 on degut a que l'extrem N-terminal de la molècula de GAD65 contribueix poc als epítops reconeguts pels anticòs contra la molècula associats a la T1D i que un treball previ del mateix grup demostrava una major especificitat per la malaltia en els assaigs de radioinmunoassaig de la molècula truncada GAD65(96-585) respecte la molècula sencera es va crear un nou constructe, la molècula truncada GAD65(143-585) per tal d'intentar millorar l'especificitat de l'assaig. Els experiments realitzats amb aquest nou constructe mostren una millora de l'especificitat de l'assaig tot i que no afecta la sensibilitat d'aquest, de manera que els familiars dels pacients amb T1D positius pels constructes truncats tenen un risc més elevat de desenvolupar T1D en 15 anys que no pas aquells

que només són positius per la molècula sencera ³¹⁵. Adicionalment, un estudi realitzat per Achenbach i col·laboradors utilitzant la molècula truncada de GAD65(96-585) en pacients afectes de diabetis autoimmune latent de l'adult (LADA) demostra com la presència d'anticòs contra la molècula truncada en aquests individus s'associa amb el fenotip clínic de la T1D autoimmune i amb un increment de la necessitat de tractament amb insulina ³¹⁶.

Així, aquest nou radioimmunoassaig amb les molècules truncades es podria també aplicar al nostre estudi per tal de seguir analitzant possibles diferències qualitatives entre ambdues malalties no detectades anteriorment amb les metodologies aplicades.

Dins del darrer objectiu de aquesta tesis s'inclou el treball "Radiobinding assay for detecting autoantibodies to single epitopes" on es desenvolupa un mètode quantitatiu per tal de poder mesurar la prevalença dels epítops més rellevants i immunogènics específics per a la molècula de IA2 en individus afectes de T1D donat que la seva detecció podria esdevenir una ajuda important en la caracterització de la progressió de la T1D.

Per tal d'assolir aquest objectiu es van generar diferents constructes integrant seqüències peptídiques que contenen diferents epítops de la molècula de IA2 dins una seqüència bacteriana codificant de la thioredoxin A (TrxA), seqüència modificada que conté un polilinker dins la zona del loop actiu que sobresurt cap al solvent provocant així una eficient presentació de l'epítop insertat i es va combinar aquest mètode d'expressió de DNA recombinant amb el radioimmunoassaig. Aquest nou mètode no només és un mètode prou sensible per a la detecció d'anticòs contra epítops linears específics, sinó que a més a més accepta un anàlisi mutacional que permet la identificació de residus crítics en

la formació dels epítops i demostra que entre pacients existeixen un gran nombre de diferències en els aminoàcids que formen part dels clústers d'epítops que són necessàries per una unió eficient dels acs. El treball també identifica un tercer epítop JM3, que es troba entre les fronteres dels constructes IA2₆₀₉₋₆₂₁ i IA2₆₁₉₋₆₃₁.

Els resultats d'aquest estudi demostren que la presentació d'un pèptid petit que codifica per un epítop complet a l'interior d'una proteïna neutra, tipus la TrxA, és un mètode prou sensible per detectar específicament els diferents epítops d'una molècula. Per altra banda, aquest sistema permet l'aplicació de l'anàlisi mutacional que condueix a la identificació dels residus clau per a la formació dels epítops i els subseqüents subtipus d'especificitats antigèniques.

En el moment de la realització d'aquest treball l'objectiu era la identificació i caracterització dels autoantígens associats a la T1D que actuaven com a dianes de la resposta immune, amb un doble objectiu ja que els anticossos contra aquestes molècules podien actuar com a marcadors predictius del desenvolupament de la malaltia i la modulació d'aquesta resposta immune contra un antigen podria alterar el curs de la malaltia. És per això que es postulava que un augment de les eines necessàries per al seu estudi aportant un millor coneixement d'aquests marcadors permetria identificar característiques dels acs específiques de la malaltia o altres marcadors que poguessin ajudar a diferenciar els individus que no desenvoluparan diabetis d'aquells que ho faran ràpidament o bé d'aquells que ho faran a llarg termini permetent així també que aquests individus puguin, un cop caracteritzats, ser susceptibles de participar en diferents estudis per tal de definir noves estratègies terapèutiques dirigides a millorar el tractament de la TD1.

Malhauradament els estudis realitzats a llarg termini no han trobat que cap dels autoantígens analitzats fos clau en el desenvolupament de la malaltia o q la presència de aacs contra la seva molècula o els seus diferents epítops tingués un caràcter altament predictiu del desenvolupament de la malaltia i és per aquesta raò que mètodes com el desenvolupat pel nostre grup no han sigut utilitzats com es preveia o s'esperava durant el seu desenvolupament.

Destacar per altra banda, que a mida que s'han detectat nous aacs i/o epítops rellevants s'han anat desenvolupant mètodes de screening com el publicat per Yu et al on es va generar una triple proteïna quimèrica IA2-ZnT8WR que inclou la molècula d'IA2 i dos polimorfismes habituals en la molècula de ZnT8, arginina o triptòfan en la posició 325 ²⁷² per tal de mesurar en un sol assaig (mantenint un 100% de sensibilitat i de especificitat respecte els radioinmunoassaigs realitzats amb les molècules individuals) els aacs contra ambdues molècules obtenint així tècniques més econòmiques i eficients. De fet, un estudi publicat l'any 2018 per Boudiaf i col·laboradors mostra evidències que l'anàlisi simultània dels aacs contra ambdues molècules comporta un diagnòstic millor i més eficient de la T1D ³⁰³.

CONCLUSIONS

6. Conclusions

1. Hem obtingut i caracteritzat el 76F, ac monoclonal que distingeix entre IA2 i IA2 β , dues proteïnes amb un grau d'homologia elevat caracteritzades com dos dels principals autoantígens en la T1D. El 76F reconeix la forma nativa i desnaturalitzada de IA2 d'origen humà, de rata i de ratolí.
2. L'epítop de reconeixement del 76F està format pels residus FEYQD, seqüència localitzada a la regió de jxtamembrana de la molècula d'IA2 inexistent a IA2 β , que forma part d'un dels epítops linears reconeguts pels aacs dels pacients afectes de T1D. Aquesta darrera característica la assenyalava com una eina molt valuosa en els assaigs que requereixin un reconeixement epitòpic específic. **Hem utilitzat el 76F per a la identificació de dos epítops linears contigus a la regió de JM de IA2, específics per a aquesta molècula, JM1 (aminoàcids 611-620) i JM2 (aminoàcids 621-630), contra els quals va dirigida la majoria de la reactivitat dels aacs contra aquesta regió i que són reconeguts per una gran part dels sèrums dels familiars de primer grau positius per IA2.** La presència d'aacs contra un d'aquests epítops és pràcticament mútuament excloent i s'associa a diferents genotips HLA de classe II.

- 3. Hem utilitzat el 76F per a la demostració de la regulació diferencial d'IA2 i IA2 β , dues proteïnes altament homòlogues que formen part dels grànuls de secreció i per a la identificació de IA2 com una proteïna sota la regulació autocrina de la insulina.** El contingut d'IA2, però no el d'IA2 β , augmenta en els illots de rata durant els primers 10 dies de vida, mentre la secreció d'insulina augmenta en resposta a la insulina fins a assolir el nivell adult. En illots de rata en cultiu de 5 dies de postnatal els nivells de proteïna i RNA d'IA2 es veuen incrementats per la glucosa i per agents que potencien la secreció d'insulina via AMPc. L'addició d'insulina augmenta els nivells proteics d'IA2 i la biosíntesis d'insulina sense cap efecte en els nivells del mRNA de IA2. El bloqueig de la secreció d'insulina amb diazoxida o de l'acció de la insulina mitjançant anticòns contra el seu receptor inhibeixen els increments en els nivells proteics d'IA2 induïts per la glucosa però no afecta els nivells de mRNA de la proteïna. Els nivells d'expressió d'IA2 β no canvien amb cap dels mètodes i agents aplicats. Així, IA2 és regulada a nivell de mRNA per la glucosa i alts nivells de AMPc, mentre que la insulina secretada localment modula els nivells de proteïna d'IA2 tot i estimulant la seva biosíntesi. L'expressió d'IA2 β és insensible als factors que modifiquen la funció cel·lular.

-
- 4. Hem descartat la possible existència d'un patró humoral específic de resposta contra la molècula de GAD en individus afectes de SMS respecte altres patologies com la T1D i IAPS-II.** La prevalença incrementada dels aacs contra els epítops NH₂-terminal de la molècula de GAD65 i contra la molècula de GAD67 així com dels aacs de subclasses IgG2, IgG3 i IgG4 detectada en els pacients afectes de SMS és un efecte secundari degut a l'alt títol d'aacs d'aquest grup ja que el patró de reconeixement dels diferents epítops i subclasses és similar quan es compara amb el d'altres grups de pacients seleccionats en base a un títol d'aacs semblant.
- 5. Hem desenvolupat un mètode prou sensible que mitjançant la presentació d'un pèptid petit que codifica per un epítop complet a l'interior d'una proteïna neutra, tipus la TrxA, permet detectar específicament els diferents epítops d'una molècula així com l'aplicació de l'anàlisi mutacional que possibilita la identificació dels residus clau per a la formació dels epítops i els subseqüents subtipus d'especificitats antigèniques.**

BIBLIOGRAFIA

7. Bibliografia

1. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1997;20(7):1183-1197.
2. Katsarou A, Gudbjörnsdóttir S, Rawshani A, et al. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3(1):17016.
3. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia*. 2012;55(1):88-93.
4. Rewers M, LaPorte RE, King H, Tuomilehto J. Trends in the prevalence and incidence of diabetes: insulin-dependent diabetes mellitus in childhood. *World Heal Stat Q*. 1988;41(3-4):179-189.
5. Moltchanova E V., Schreier N, Lammi N, Karvonen M. Seasonal variation of diagnosis of Type 1 diabetes mellitus in children worldwide. *Diabet Med*. 2009;26(7):673-678.
6. Vandewalle CL, Coeckelberghs MI, De Leeuw IH, et al. Epidemiology, clinical aspects, and biology of IDDM patients under age 40 years. Comparison of data from Antwerp with complete ascertainment with data from Belgium with 40% ascertainment. The Belgian Diabetes Registry. *Diabetes Care*. 1997;20(10):1556-1561.
7. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltesz G. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet*. 2009;373(9680):2027-2033.
8. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39(3):481-497.
9. Dahlquist GG, Nystrom L, Patterson CC. Incidence of type 1 diabetes in Sweden among individuals aged 0-34 years, 1983-2007: an analysis of time trends. *Diabetes Care*. 2011;34(8):1754-1759.
10. Atkinson MA. The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2(11).
11. Molbak AG, Christau B, Marnér B, Borch-Johnsen K, Nerup J. Incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in age groups over 30 years in Denmark. *Diabet Med*. 1994;11(7):650-655.
12. Bonifacio E, Bingley PJ, Shattock M, et al. Quantification of islet-cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes. *Lancet*. 1990;335(8682):147-149.
13. Johnston C, Millward BA, Hoskins P, Leslie RD, Bottazzo GF, Pyke DA. Islet-cell antibodies as predictors of the later development of type 1 (insulin-dependent) diabetes. A study in identical twins. *Diabetologia*. 1989;32(6):382-386.
14. McCulloch DK, Palmer JP. The appropriate use of B-cell function testing in the preclinical period of type 1 diabetes. *Diabet Med*. 1991;8(9):800-804.
15. Thivolet C, Beaufrere B, Betuel H, et al. Islet cell and insulin autoantibodies in subjects at high risk for development of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: the Lyon family study. *Diabetologia*. 1988;31(10):741-746.

16. Spinas GA, Matter L, Wilkin T, Staffelbach O, Berger W. Islet-cell and insulin autoantibodies in first-degree relatives of type I diabetics: a 5-year follow-up study in a Swiss population. *Adv Exp Med Biol.* 1988;246:209-214.
17. Maclaren N, Lan M, Coutant R, et al. Only multiple autoantibodies to islet cells (ICA), insulin, GAD65, IA-2 and IA-2beta predict immune-mediated (Type 1) diabetes in relatives. *J Autoimmun.* 1999;12(4):279-287.
18. Landin-Olsson M, Palmer JP, Lernmark A, et al. Predictive value of islet cell and insulin autoantibodies for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based study of newly-diagnosed diabetic and matched control children. *Diabetologia.* 1992;35(11):1068-1073.
19. Karjalainen JK. Islet cell antibodies as predictive markers for IDDM in children with high background incidence of disease. *Diabetes.* 1990;39(9):1144-1150.
20. Yu J, Yu L, Bugawan TL, et al. Transient antiislet autoantibodies: infrequent occurrence and lack of association with genetic+risk factors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(7):2421-2428.
21. Riley WJ, Maclaren NK, Krischer J, et al. A prospective study of the development of diabetes in relatives of patients with insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med.* 1990;323(17):1167-1172.
22. Redondo MJ, Rewers M, Yu L, et al. Genetic determination of islet cell autoimmunity in monozygotic twin, dizygotic twin, and non-twin siblings of patients with type 1 diabetes: prospective twin study. *Bmj.* 1999;318(7185):698-702.
23. Singal DP, Blajchman MA. Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. *Diabetes.* 1973;22(6):429-432.
24. Erlich H, Valdes AM, Noble J, et al. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes.* 2008;57(4):1084-1092.
25. Noble JA, Valdes AM, Cook M, Klitz W, Thomson G, Erlich HA. The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. *Am J Hum Genet.* 1996;59(5):1134-1148.
26. Thomson G, Robinson WP, Kuhner MK, et al. Genetic heterogeneity, modes of inheritance, and risk estimates for a joint study of Caucasians with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Hum Genet.* 1988;43(6):799-816.
27. Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature.* 1987;329(6140):599-604.
28. Robertson CC, Rich SS. Genetics of type 1 diabetes. *Curr Opin Genet Dev.* 2018;50:7-16.
29. Pociot F, Lernmark Å. Genetic risk factors for type 1 diabetes. *Lancet.* 2016;387(10035):2331-2339.
30. Wen L, Wong FS, Tang J, et al. In vivo evidence for the contribution of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DQ molecules to the development of diabetes. *J Exp Med.* 2000;191(1):97-104.

31. Pugliese A, Zeller M, Fernandez Jr. A, et al. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet.* 1997;15(3):293-297.
32. Bell GI, Selby MJ, Rutter WJ. The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. *Nature.* 1982;295(5844):31-35.
33. Kennedy GC, German MS, Rutter WJ. The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription. *Nat Genet.* 1995;9(3):293-298.
34. Lucassen AM, Sreaton GR, Julier C, Elliott TJ, Lathrop M, Bell JI. Regulation of insulin gene expression by the IDDM associated, insulin locus haplotype. *Hum Mol Genet.* 1995;4(4):501-506.
35. Bennett ST, Wilson AJ, Esposito L, et al. Insulin VNTR allele-specific effect in type 1 diabetes depends on identity of untransmitted paternal allele. The IMDIAB Group. *Nat Genet.* 1997;17(3):350-352.
36. Chentoufi AA, Polychronakos C. Insulin expression levels in the thymus modulate insulin-specific autoreactive T-cell tolerance: the mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes. *Diabetes.* 2002;51(5):1383-1390.
37. Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, et al. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Hum Mol Genet.* 1996;5(7):1075-1080.
38. Ueda H, Howson JM, Esposito L, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature.* 2003;423(6939):506-511.
39. Dahlquist GG. Viruses and other perinatal exposures as initiating events for beta-cell destruction. *Ann Med.* 1997;29(5):413-417.
40. Ellis TM, Atkinson MA. Early infant diets and insulin-dependent diabetes. *Lancet.* 1996;347(9013):1464-1465.
41. Knip M, Akerblom HK. Environmental factors in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1999;107 Suppl:S93-100.
42. Ginsberg-Fellner F, Witt ME, Yagihashi S, et al. Congenital rubella syndrome as a model for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: increased prevalence of islet cell surface antibodies. *Diabetologia.* 1984;27 Suppl:87-89.
43. Menser MA, Forrest JM, Bransby RD. Rubella infection and diabetes mellitus. *Lancet.* 1978;1(8055):57-60.
44. Honeyman MC, Coulson BS, Stone NL, et al. Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes.* 2000;49(8):1319-1324.
45. Lonrot M, Korpela K, Knip M, et al. Enterovirus infection as a risk factor for beta-cell autoimmunity in a prospectively observed birth cohort: the Finnish Diabetes Prediction and Prevention Study. *Diabetes.* 2000;49(8):1314-1318.
46. Salminen K, Sadeharju K, Lonrot M, et al. Enterovirus infections are associated with the induction of beta-cell autoimmunity in a prospective birth cohort study. *J Med Virol.* 2003;69(1):91-98.

47. Fuchtenbusch M, Irnstetter A, Jager G, Ziegler AG. No evidence for an association of coxsackie virus infections during pregnancy and early childhood with development of islet autoantibodies in offspring of mothers or fathers with type 1 diabetes. *J Autoimmun.* 2001;17(4):333-340.
48. Graves PM, Norris JM, Pallansch MA, Gerling IC, Rewers M. The role of enteroviral infections in the development of IDDM: limitations of current approaches. *Diabetes.* 1997;46(2):161-168.
49. Salminen KK, Vuorinen T, Oikarinen S, et al. Isolation of enterovirus strains from children with preclinical Type 1 diabetes. *Diabet Med.* 2004;21(2):156-164.
50. Sadauskaite-Kuehne V, Ludvigsson J, Padaiga Z, Jasinskiene E, Samuelsson U. Longer breastfeeding is an independent protective factor against development of type 1 diabetes mellitus in childhood. *Diabetes Metab Res Rev.* 2004;20(2):150-157.
51. Vaarala O, Knip M, Paronen J, et al. Cow's milk formula feeding induces primary immunization to insulin in infants at genetic risk for type 1 diabetes. *Diabetes.* 1999;48(7):1389-1394.
52. Virtanen SM, Hyponen E, Laara E, et al. Cow's milk consumption, disease-associated autoantibodies and type 1 diabetes mellitus: a follow-up study in siblings of diabetic children. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabet Med.* 1998;15(9):730-738.
53. Holmberg H, Wahlberg J, Vaarala O, Ludvigsson J. Short duration of breast-feeding as a risk-factor for beta-cell autoantibodies in 5-year-old children from the general population. *Br J Nutr.* 2007;97(1):111-116.
54. Hummel M, Fuchtenbusch M, Schenker M, Ziegler AG. No major association of breast-feeding, vaccinations, and childhood viral diseases with early islet autoimmunity in the German BABYDIAB Study. *Diabetes Care.* 2000;23(7):969-974.
55. Norris JM, Beaty B, Klingensmith G, et al. Lack of association between early exposure to cow's milk protein and beta-cell autoimmunity. Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *JAMA.* 1996;276(8):609-614.
56. Rewers M. environmental risk factors for type 1 diabetes. 2016.
57. Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, et al. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA.* 2003;290(13):1713-1720.
58. Ziegler AG, Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA.* 2003;290(13):1721-1728.
59. Pastore MR, Bazzigaluppi E, Belloni C, Arcovio C, Bonifacio E, Bosi E. Six months of gluten-free diet do not influence autoantibody titers, but improve insulin secretion in subjects at high risk for type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(1):162-165.
60. Virtanen SM, Jaakkola L, Rasanen L, et al. Nitrate and nitrite intake and the risk for type 1 diabetes in Finnish children. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabet Med.* 1994;11(7):656-662.
61. Kostraba JN, Gay EC, Rewers M, Hamman RF. Nitrate levels in community drinking waters and risk of IDDM. An ecological analysis. *Diabetes Care.* 1992;15(11):1505-1508.
62. Helgason T, Jonasson MR. Evidence for a food additive as a cause of

- ketosis-prone diabetes. *Lancet*. 1981;2(8249):716-720.
63. Dahlquist GG, Blom LG, Persson LA, Sandstrom AI, Wall SG. Dietary factors and the risk of developing insulin dependent diabetes in childhood. *Bmj*. 1990;300(6735):1302-1306.
 64. van Maanen JM, Albering HJ, de Kok TM, et al. Does the risk of childhood diabetes mellitus require revision of the guideline values for nitrate in drinking water? *Env Heal Perspect*. 2000;108(5):457-461.
 65. Infections and vaccinations as risk factors for childhood type I (insulin-dependent) diabetes mellitus: a multicentre case-control investigation. EURODIAB Substudy 2 Study Group. *Diabetologia*. 2000;43(1):47-53.
 66. McKinney PA, Parslow R, Gurney KA, Law GR, Bodansky HJ, Williams R. Perinatal and neonatal determinants of childhood type 1 diabetes. A case-control study in Yorkshire, U.K. *Diabetes Care*. 1999;22(6):928-932.
 67. Pundziute-Lycka A, Urbonaite B, Dahlquist G. Infections and risk of Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus in Lithuanian children. *Diabetologia*. 2000;43(10):1229-1234.
 68. Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention. Association of 1 yr of cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion. The Canadian-European Randomized Control Trial Group. *Diabetes*. 1988;37(11):1574-1582..
 69. Foulis AK, Stewart JA. The pancreas in recent-onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: insulin content of islets, insulinitis and associated changes in the exocrine acinar tissue. *Diabetologia*. 1984;26(6):456-461.
 70. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia*. 2001;44(12):2115-2133.
 71. Mandrup-Poulsen T. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia*. 1996;39(9):1005-1029.
 72. Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev*. 1998;14(2):129-151.
 73. Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1994;331(21):1428-1436.
 74. Tun RY, Peakman M, Alviggi L, et al. Importance of persistent cellular and humoral immune changes before diabetes develops: prospective study of identical twins. *Bmj*. 1994;308(6936):1063-1068.
 75. Delovitch TL, Singh B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity*. 1997;7(6):727-738.
 76. Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell*. 1996;85(3):291-297.
 77. Kanazawa Y, Komeda K, Sato S, Mori S, Akanuma K, Takaku F. Non-obese-diabetic mice: immune mechanisms of pancreatic beta-cell destruction. *Diabetologia*. 1984;27 Suppl:113-115.
 78. Wicker LS, Miller BJ, Coker LZ, et al. Genetic control of diabetes and insulinitis in the nonobese diabetic (NOD) mouse. *J Exp Med*. 1987;165(6):1639-1654.
 79. Gottlieb PA, Eisenbarth GS. Mouse and man: multiple genes and multiple autoantigens in the aetiology of type I DM and related autoimmune disorders. *J Autoimmun*. 1996;9(2):277-281.

80. Maruyama T, Takei I, Yanagawa T, et al. Insulin autoantibodies in non-obese diabetic (NOD) mice and streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes Res.* 1988;7(2):93-96.
81. Todd JA, Aitman TJ, Cornall RJ, et al. Genetic analysis of autoimmune type 1 diabetes mellitus in mice. *Nature.* 1991;351(6327):542-547..
82. Oldstone MB. Prevention of type I diabetes in nonobese diabetic mice by virus infection. *Science (80-).* 1988;239(4839):500-502.
83. Wilberz S, Partke HJ, Dagnaes-Hansen F, Herberg L. Persistent MHV (mouse hepatitis virus) infection reduces the incidence of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Diabetologia.* 1991;34(1):2-5.
84. Bendelac A, Carnaud C, Boitard C, Bach JF. Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *J Exp Med.* 1987;166(4):823-832.
85. Charlton B, Mandel TE. Progression from insulinitis to beta-cell destruction in NOD mouse requires L3T4+ T-lymphocytes. *Diabetes.* 1988;37(8):1108-1112.
86. Wicker LS, Miller BJ, Mullen Y. Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes.* 1986;35(8):855-860.
87. Serreze D V, Chapman HD, Varnum DS, et al. B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new speed congenic+stock of NOD.Ig mu null mice. *J Exp Med.* 1996;184(5):2049-2053.
88. Haskins K, Atkinson M. Prediction of diabetes and response to therapy in individual animals: are there lessons for man? Report on the JDF/Snow Mountain Meeting, 5-7 October 2000, Winter Park, CO, USA. *J Autoimmun.* 2001;16(1):15-19.
89. Abiru N, Yu L, Miao D, et al. Transient insulin autoantibody expression independent of development of diabetes: comparison of NOD and NOR strains. *J Autoimmun.* 2001;17(1):1-6.
90. Robles DT, Eisenbarth GS, Dailey NJ, Peterson LB, Wicker LS. Insulin autoantibodies are associated with islet inflammation but not always related to diabetes progression in NOD congenic mice. *Diabetes.* 2003;52(3):882-886.
91. Crisa L, Mordes JP, Rossini AA. Autoimmune diabetes mellitus in the BB rat. *Diabetes Metab Rev.* 1992;8(1):4-37.
92. Mordes JP, Bortell R, Doukas J, et al. The BB/Wor rat and the balance hypothesis of autoimmunity. *Diabetes Metab Rev.* 1996;12(2):103-109.
93. King C, Ilic A, Koelsch K, Sarvetnick N. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell.* 2004;117(2):265-277.
94. Elder ME, Maclaren NK. Identification of profound peripheral T lymphocyte immunodeficiencies in the spontaneously diabetic BB rat. *J Immunol.* 1983;130(4):1723-1731.
95. Yokoi N, Kanazawa M, Kitada K, et al. A non-MHC locus essential for autoimmune type I diabetes in the Komeda Diabetes-Prone rat. *J Clin Invest.* 1997;100(8):2015-2021.

96. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*. 1974;2(7892):1279-1283.
97. Genovese S, Bonifacio E, McNally JM, et al. Distinct cytoplasmic islet cell antibodies with different risks for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1992;35(4):385-388.
98. Gianani R, Pugliese A, Bonner-Weir S, et al. Prognostically significant heterogeneity of cytoplasmic islet cell antibodies in relatives of patients with type I diabetes. *Diabetes*. 1992;41(3):347-353.
99. Timsit J, Caillat-Zucman S, Blondel H, Chedin P, Bach JF, Boitard C. Islet cell antibody heterogeneity among type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia*. 1992;35(8):792-795.
100. Dozio N, Belloni C, Girardi AM, et al. Heterogeneous IgG subclass distribution of islet cell antibodies. *J Autoimmun*. 1994;7(1):45-53.
101. Bottazzo GF, Dean BM, Gorsuch AN, Cudworth AG, Doniach D. Complement-fixing islet-cell antibodies in type-I diabetes: possible monitors of active beta-cell damage. *Lancet*. 1980;1(8170):668-672.
102. Boitard C, Bonifacio E, Bottazzo GF, Gleichmann H, Molenaar J. Immunology and Diabetes Workshop: report on the Third International (Stage 3) Workshop on the Standardisation of Cytoplasmic Islet Cell Antibodies. Held in New York, New York, October 1987. *Diabetologia*. 1988;31(7):451-452.
103. Greenbaum CJ, Palmer JP, Nagataki S, et al. Improved specificity of ICA assays in the Fourth International Immunology of Diabetes Serum Exchange Workshop. *Diabetes*. 1992;41(12):1570-1574.
104. Lernmark A, Molenaar JL, van Beers WA, et al. The Fourth International Serum Exchange Workshop to standardize cytoplasmic islet cell antibodies. The Immunology and Diabetes Workshops and Participating Laboratories. *Diabetologia*. 1991;34(7):534-535.
105. Bonifacio E, Genovese S, Braghi S, et al. Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity. *Diabetologia*. 1995;38(7):816-822.
106. Srikanta S, Ganda OP, Rabizadeh A, Soeldner JS, Eisenbarth GS. First-degree relatives of patients with type I diabetes mellitus. Islet-cell antibodies and abnormal insulin secretion. *N Engl J Med*. 1985;313(8):461-464.
107. Goday A, Fernandez J, Gonzalez-Clemente JM, et al. Natural history of islet cell antibodies during the clinical period of type 1 diabetes. High titres at diagnosis are associated with longer persistence. *Diabetes Res*. 1991;17(4):169-174.
108. Tarn AC, Thomas JM, Dean BM, et al. Predicting insulin-dependent diabetes. *Lancet*. 1988;1(8590):845-850.
109. Bingley PJ. Interactions of age, islet cell antibodies, insulin autoantibodies, and first-phase insulin response in predicting risk of progression to IDDM in ICA+ relatives: the ICARUS data set. Islet Cell Antibody Register Users Study. *Diabetes*. 1996;45(12):1720-1728.
110. Knip M, Karjalainen J, Akerblom HK. Islet cell antibodies are less predictive of IDDM among unaffected children in the general population than in sibs of children with diabetes. The Childhood Diabetes in Finland

- Study Group. *Diabetes Care*. 1998;21(10):1670-1673.
111. Bingley PJ, Bonifacio E, Williams AJ, Genovese S, Bottazzo GF, Gale EA. Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes*. 1997;46(11):1701-1710.
 112. Bonifacio E, Scirpoli M, Kredel K, Fuchtenbusch M, Ziegler AG. Early autoantibody responses in prediabetes are IgG1 dominated and suggest antigen-specific regulation. *J Immunol*. 1999;163(1):525-532.
 113. Greenbaum CJ, Palmer JP, Kuglin B, Kolb H. Insulin autoantibodies measured by radioimmunoassay methodology are more related to insulin-dependent diabetes mellitus than those measured by enzyme-linked immunosorbent assay: results of the Fourth International Workshop on the Standardization of Insuli. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992;74(5):1040-1044.
 114. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*. 1990;347(6289):151-156.
 115. Rabin DU, Pleasic SM, Palmer-Crocker R, Shapiro JA. Cloning and expression of IDDM-specific human autoantigens. *Diabetes*. 1992;41(2):183-186.
 116. Lan MS, Lu J, Goto Y, Notkins AL. Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma. *DNA Cell Biol*. 1994;13(5):505-514.
 117. Rabin DU, Pleasic SM, Shapiro JA, et al. Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. *J Immunol*. 1994;152(6):3183-3188.
 118. Lu J, Li Q, Xie H, et al. Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase, IA-2beta, as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37-kDa tryptic fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(6):2307-2311.
 119. Wasmeier C, Hutton JC. Molecular cloning of phogrin, a protein-tyrosine phosphatase homologue localized to insulin secretory granule membranes. *J Biol Chem*. 1996;271(30):18161-18170.
 120. Castano L, Russo E, Zhou L, Lipes MA, Eisenbarth GS. Identification and cloning of a granule autoantigen (carboxypeptidase-H) associated with type I diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991;73(6):1197-1201.
 121. Lernmark A, Freedman ZR, Hofmann C, et al. Islet-cell-surface antibodies in juvenile diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1978;299(8):375-380.
 122. Carrillo J, Puertas MC, Alba A, et al. Islet-infiltrating B-cells in nonobese diabetic mice predominantly target nervous system elements. *Diabetes*. 2005;54(1):69-77.
 123. Erlander MG, Tobin AJ. The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. *Neurochem Res*. 1991;16(3):215-226.
 124. Reetz A, Solimena M, Matteoli M, Folli F, Takei K, De Camilli P. GABA and pancreatic beta-cells: colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic-like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion. *Embo J*. 1991;10(5):1275-1284.
 125. Ellis TM, Atkinson MA. The clinical significance of an autoimmune response against glutamic acid decarboxylase. *Nat Med*. 1996;2(2):148-153.

- .126. Erdo SL, Joo F, Wolff JR. Immunohistochemical localization of glutamate decarboxylase in the rat oviduct and ovary: further evidence for non-neural GABA systems. *Cell Tissue Res.* 1989;255(2):431-434.
127. Persson H, Pelto-Huikko M, Metsis M, et al. Expression of the neurotransmitter-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase in male germ cells. *Mol Cell Biol.* 1990;10(9):4701-4711.
128. Bu DF, Erlander MG, Hitz BC, et al. Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(6):2115-2119.
129. Kaufman DL, McGinnis JF, Krieger NR, Tobin AJ. Brain glutamate decarboxylase cloned in lambda gt-11: fusion protein produces gamma-aminobutyric acid. *Science (80-).* 1986;232(4754):1138-1140..
130. Karlsten AE, Hagopian WA, Grubin CE, et al. Cloning and primary structure of a human islet isoform of glutamic acid decarboxylase from chromosome 10. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(19):8337-8341.
131. Bu DF, Tobin AJ. The exon-intron organization of the genes (GAD1 and GAD2) encoding two human glutamate decarboxylases (GAD67 and GAD65) suggests that they derive from a common ancestral GAD. *Genomics.* 1994;21(1):222-228.
132. Martin DL, Rimvall K. Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *J Neurochem.* 1993;60(2):395-407.
133. Qu K, Martin DL, Lawrence CE. Motifs and structural fold of the cofactor binding site of human glutamate decarboxylase. *Protein Sci.* 1998;7(5):1092-1105.
134. Dirx Jr. R, Thomas A, Li L, et al. Targeting of the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase to intracellular organelles is mediated by its interaction with the NH2-terminal region of the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *J Biol Chem.* 1995;270(5):2241-2246.
135. Sheikh SN, Martin DL. Heteromers of glutamate decarboxylase isoforms occur in rat cerebellum. *J Neurochem.* 1996;66(5):2082-2090.
136. Christgau S, Schierbeck H, Aanstoot HJ, et al. Pancreatic beta cells express two autoantigenic forms of glutamic acid decarboxylase, a 65-kDa hydrophilic form and a 64-kDa amphiphilic form which can be both membrane-bound and soluble. *J Biol Chem.* 1991;266(31):21257-21264.
137. Christgau S, Aanstoot HJ, Schierbeck H, et al. Membrane anchoring of the autoantigen GAD65 to microvesicles in pancreatic beta-cells by palmitoylation in the NH2-terminal domain. *J Cell Biol.* 1992;118(2):309-320.
138. Solimena M, Aggujaro D, Muntzel C, et al. Association of GAD-65, but not of GAD-67, with the Golgi complex of transfected Chinese hamster ovary cells mediated by the N-terminal region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(7):3073-3077.
139. Solimena M, Butler MH, De Camilli P. GAD, diabetes, and Stiff-Man syndrome: some progress and more questions. *J Endocrinol Invest.* 1994;17(7):509-520.
140. Namchuk M, Lindsay L, Turck CW, Kanaani J, Baekkeskov S. Phosphorylation of serine residues 3, 6, 10, and 13 distinguishes membrane anchored from soluble glutamic acid decarboxylase 65 and is restricted to glutamic acid decarboxylase 65alpha. *J Biol Chem.*

- 1997;272(3):1548-1557.
141. Shi Y, Veit B, Baekkeskov S. Amino acid residues 24-31 but not palmitoylation of cysteines 30 and 45 are required for membrane anchoring of glutamic acid decarboxylase, GAD65. *J Cell Biol.* 1994;124(6):927-934.
 142. Kaufman DL, Houser CR, Tobin AJ. Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *J Neurochem.* 1991;56(2):720-723.
 143. Condie BG, Bain G, Gottlieb DI, Capecchi MR. Cleft palate in mice with a targeted mutation in the gamma-aminobutyric acid-producing enzyme glutamic acid decarboxylase 67. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(21):11451-11455.
 144. Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, et al. Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(12):6496-6499.
 145. Kash SF, Johnson RS, Tecott LH, et al. Epilepsy in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(25):14060-14065.
 146. Kash SF, Tecott LH, Hodge C, Baekkeskov S. Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(4):1698-1703.
 147. Hensch TK, Fagiolini M, Mataga N, Stryker MP, Baekkeskov S, Kash SF. Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Science (80-).* 1998;282(5393):1504-1508.
 148. Solimena M, Folli F, Denis-Donini S, et al. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in a patient with stiff-man syndrome, epilepsy, and type I diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1988;318(16):1012-1020.
 149. Christie MR, Genovese S, Cassidy D, et al. Antibodies to islet 37k antigen, but not to glutamate decarboxylase, discriminate rapid progression to IDDM in endocrine autoimmunity. *Diabetes.* 1994;43(10):1254-1259.
 150. Bonifacio E, Lampasona V, Bernasconi L, Ziegler AG. Maturation of the humoral autoimmune response to epitopes of GAD in preclinical childhood type 1 diabetes. *Diabetes.* 2000;49(2):202-208.
 151. Baekkeskov S, Nielsen JH, Marner B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark A. Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature.* 1982;298(5870):167-169.
 152. Hawa M, Rowe R, Lan MS, et al. Value of antibodies to islet protein tyrosine phosphatase-like molecule in predicting type 1 diabetes. *Diabetes.* 1997;46(8):1270-1275.
 153. Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, Atkinson MA, Maclaren NK, Tobin AJ. Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1992;89(1):283-292..
 154. Velloso LA, Kampe O, Hallberg A, Christmansson L, Betsholtz C, Karlsson FA. Demonstration of GAD-65 as the main immunogenic isoform of glutamate decarboxylase in type 1 diabetes and determination of autoantibodies using a radioligand produced by eukaryotic expression. *J*

- Clin Invest.* 1993;91(5):2084-2090.
155. Gorus FK, Goubert P, Semakula C, et al. IA-2-autoantibodies complement GAD65-autoantibodies in new-onset IDDM patients and help predict impending diabetes in their siblings. The Belgian Diabetes Registry. *Diabetologia.* 1997;40(1):95-99.
 156. Harrison LC, Honeyman MC, DeAizpurua HJ, et al. Inverse relation between humoral and cellular immunity to glutamic acid decarboxylase in subjects at risk of insulin-dependent diabetes. *Lancet.* 1993;341(8857):1365-1369..
 157. Lohmann T, Sessler J, Verlohren HJ, et al. Distinct genetic and immunological features in patients with onset of IDDM before and after age 40. *Diabetes Care.* 1997;20(4):524-529.
 158. Schmidli RS, DeAizpurua HJ, Harrison LC, Colman PG. Antibodies to glutamic acid decarboxylase in at-risk and clinical insulin-dependent diabetic subjects: relationship to age, sex and islet cell antibody status, and temporal profile. *J Autoimmun.* 1994;7(1):55-66.
 159. Vandewalle CL, Falorni A, Svanholm S, Lernmark A, Pipeleers DG, Gorus FK. High diagnostic sensitivity of glutamate decarboxylase autoantibodies in insulin-dependent diabetes mellitus with clinical onset between age 20 and 40 years. The Belgian Diabetes Registry. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(3):846-851.
 160. Atkinson MA, Kaufman DL, Newman D, Tobin AJ, Maclaren NK. Islet cell cytoplasmic autoantibody reactivity to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest.* 1993;91(1):350-356.
 161. Christie MR, Roll U, Payton MA, Hatfield EC, Ziegler AG. Validity of screening for individuals at risk for type I diabetes by combined analysis of antibodies to recombinant proteins. *Diabetes Care.* 1997;20(6):965-970..
 162. Bingley PJ, Christie MR, Bonifacio E, et al. Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. *Diabetes.* 1994;43(11):1304-1310.
 163. Torn C, Landin-Olsson M, Ostman J, et al. Glutamic acid decarboxylase antibodies (GADA) is the most important factor for prediction of insulin therapy within 3 years in young adult diabetic patients not classified as Type 1 diabetes on clinical grounds. *Diabetes Metab Res Rev.* 2000;16(6):442-447.
 164. Tuomi T, Groop LC, Zimmet PZ, Rowley MJ, Knowles W, Mackay IR. Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulin-dependent onset of disease. *Diabetes.* 1993;42(2):359-362.
 165. Turner R, Stratton I, Horton V, et al. 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.* 1997;350(9087):1288-1293.
 166. Niskanen LK, Tuomi T, Karjalainen J, Groop LC, Uusitupa MI. GAD antibodies in NIDDM. Ten-year follow-up from the diagnosis. *Diabetes Care.* 1995;18(12):1557-1565.
 167. Laakso M, Sarlund H, Pyorala K. Prevalence of insulin deficiency among initially non-insulin-dependent middle-aged diabetic individuals. *Diabetes Care.* 1986;9(3):228-231.

168. Dozio N, Beretta A, Belloni C, et al. Low prevalence of islet autoantibodies in patients with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1997;20(1):81-83.
169. Fuchtenbusch M, Ferber K, Standl E, Ziegler AG. Prediction of type 1 diabetes postpartum in patients with gestational diabetes mellitus by combined islet cell autoantibody screening: a prospective multicenter study. *Diabetes*. 1997;46(9):1459-1467.
170. Petersen JS, Dyrberg T, Damm P, Kuhl C, Molsted-Pedersen L, Buschard K. GAD65 autoantibodies in women with gestational or insulin dependent diabetes mellitus diagnosed during pregnancy. *Diabetologia*. 1996;39(11):1329-1333.
171. Mitchell ML, Hermos RJ, Larson CA, Palomaki GE, Haddow JE. Prevalence of GAD autoantibodies in women with gestational diabetes: a retrospective analysis. *Diabetes Care*. 2000;23(11):1705-1706.
172. Solimena M, Dirx Jr. R, Hermel JM, et al. ICA 512, an autoantigen of type I diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules. *Embo J*. 1996;15(9):2102-2114.
173. Xie H, Notkins AL, Lan MS. IA-2, a transmembrane protein tyrosine phosphatase, is expressed in human lung cancer cell lines with neuroendocrine phenotype. *Cancer Res*. 1996;56(12):2742-2744.
174. Cui L, Yu WP, DeAizpurua HJ, Schmidli RS, Pallen CJ. Cloning and characterization of islet cell antigen-related protein-tyrosine phosphatase (PTP), a novel receptor-like PTP and autoantigen in insulin-dependent diabetes. *J Biol Chem*. 1996;271(40):24817-24823.
175. Takeyama N, Ano Y, Wu G, et al. Localization of insulinoma associated protein 2, IA-2 in mouse neuroendocrine tissues using two novel monoclonal antibodies. *Life Sci*. 2009;84(19-20):678-687.
176. Lan MS, Modi WS, Xie H, Notkins AL. Assignment of the IA-2 gene encoding an autoantigen in IDDM to chromosome 2q35. *Diabetologia*. 1996;39(8):1001-1002.
177. van den Maagdenberg AM, Olde Weghuis D, Rijss J, et al. Assignment of the human gene for receptor-type protein tyrosine phosphatase IA-2 (PTPRN) to chromosome region 2q35 --> q36.1 and identification of an intragenic genetic marker. *Cytogenet Cell Genet*. 1996;73(1-2):145-148.
178. Xie J, Zhang B, Lan MS, Notkins AL. Genomic structure and promoter sequence of the insulin-dependent diabetes mellitus autoantigen, IA-2 (PTPRN). *Genomics*. 1998;54(2):338-343.
179. Lu J, Notkins AL, Lan MS. Isolation, sequence and expression of a novel mouse brain cDNA, mIA-2, and its relatedness to members of the protein tyrosine phosphatase family. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;204(2):930-936.
180. Cai T, Krause MW, Odenwald WF, Toyama R, Notkins AL. The IA-2 gene family: homologs in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and zebrafish. *Diabetologia*. 2001;44(1):81-88.
181. Magistrelli G, Toma S, Isacchi A. Substitution of two variant residues in the protein tyrosine phosphatase-like PTP35/IA-2 sequence reconstitutes catalytic activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;227(2):581-588..
182. Kim SJ, Jeong DG, Jeong SK, Yoon TS, Ryu SE. Crystal structure of the major diabetes autoantigen insulinoma-associated protein 2 reveals

- distinctive immune epitopes. *Diabetes*. 2007;56(1):41-48.
183. Roberts C, Roberts GA, Lobner K, et al. Expression of the protein tyrosine phosphatase-like protein IA-2 during pancreatic islet development. *J Histochem Cytochem*. 2001;49(6):767-776.
 184. Lobner K, Steinbrenner H, Roberts GA, et al. Different regulated expression of the tyrosine phosphatase-like proteins IA-2 and phogrin by glucose and insulin in pancreatic islets: relationship to development of insulin secretory responses in early life. *Diabetes*. 2002;51(10):2982-2988.
 185. Ort T, Maksimova E, Dirx R, et al. The receptor tyrosine phosphatase-like protein ICA512 binds the PDZ domains of beta2-syntrophin and nNOS in pancreatic beta-cells. *Eur J Cell Biol*. 2000;79(9):621-630.
 186. Berghs S, Aggujaro D, Dirx Jr. R, et al. betaIV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of ranvier in the central and peripheral nervous system. *J Cell Biol*. 2000;151(5):985-1002.
 187. Hu YF, Zhang HL, Cai T, Harashima S, Notkins AL. The IA-2 interactome. *Diabetologia*. 2005;48(12):2576-2581.
 188. Gross S, Blanchetot C, Schepens J, et al. Multimerization of the protein-tyrosine phosphatase (PTP)-like insulin-dependent diabetes mellitus autoantigens IA-2 and IA-2beta with receptor PTPs (RPTPs). Inhibition of RPTPalpha enzymatic activity. *J Biol Chem*. 2002;277(50):48139-48145.
 189. Ort T, Voronov S, Guo J, et al. Dephosphorylation of beta2-syntrophin and Ca²⁺/mu-calpain-mediated cleavage of ICA512 upon stimulation of insulin secretion. *Embo J*. 2001;20(15):4013-4023.
 190. Trajkovski M, Mziaut H, Schubert S, Kalaidzidis Y, Altkruger A, Solimena M. Regulation of insulin granule turnover in pancreatic beta-cells by cleaved ICA512. *J Biol Chem*. 2008.
 191. Trajkovski M, Mziaut H, Altkruger A, et al. Nuclear translocation of an ICA512 cytosolic fragment couples granule exocytosis and insulin expression in {beta}-cells. *J Cell Biol*. 2004;167(6):1063-1074.
 192. Mziaut H, Trajkovski M, Kersting S, et al. Synergy of glucose and growth hormone signalling in islet cells through ICA512 and STAT5. *Nat Cell Biol*. 2006;8(5):435-445.
 193. Saeki K, Zhu M, Kubosaki A, Xie J, Lan MS, Notkins AL. Targeted disruption of the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 results in alterations in glucose tolerance tests and insulin secretion. *Diabetes*. 2002;51(6):1842-1850.
 194. Harashima S, Clark A, Christie MR, Notkins AL. The dense core transmembrane vesicle protein IA-2 is a regulator of vesicle number and insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(24):8704-8709.
 195. Kim J, Bang H, Ko S, Jung I, Hong H, Kim-Ha J. Drosophila ia2 modulates secretion of insulin-like peptide. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2008;151(2):180-184.
 196. Nakajima K, Wu G, Takeyama N, et al. Insulinoma-associated protein 2-deficient mice develop severe forms of diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin. *Int J Mol Med*. 2009;24(1):23-27.
 197. Harashima SI, Harashima C, Nishimura T, Hu Y, Notkins AL. Overexpression of the autoantigen IA-2 puts beta cells into a pre-apoptotic state: autoantigen-induced, but non-autoimmune-mediated, tissue destruction. *Clin Exp Immunol*. 2007;150(1):49-60.

198. Kim SM, Power A, Brown TM, et al. Deletion of the secretory vesicle proteins IA-2 and IA-2beta disrupts circadian rhythms of cardiovascular and physical activity. *Faseb J*. 2009;23(9):3226-3232.
199. Nishimura T, Kubosaki A, Ito Y, Notkins AL. Disturbances in the secretion of neurotransmitters in IA-2/IA-2beta null mice: changes in behavior, learning and lifespan. *Neuroscience*. 2009;159(2):427-437.
200. Leiter EH, Tsumura H, Serreze D V, et al. Mapping to chromosomes 1 and 12 of mouse homologs of human protein tyrosine phosphatase, receptor-type, related genes encoding pancreatic beta cell autoantigens. *Mamm Genome*. 1997;8(12):949-950.
201. Kubosaki A, Gross S, Miura J, et al. Targeted disruption of the IA-2beta gene causes glucose intolerance and impairs insulin secretion but does not prevent the development of diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 2004;53(7):1684-1691.
202. Wasmeier C, Hutton JC. Secretagogue-dependent phosphorylation of phogrin, an insulin granule membrane protein tyrosine phosphatase homologue. *Biochem J*. 1999;341 (Pt 3):563-569.
203. Kubosaki A, Nakamura S, Notkins AL. Dense Core Vesicle Proteins IA-2 and IA-2{beta}: Metabolic Alterations in Double Knockout Mice. *Diabetes*. 2005;54 Suppl 2:S46-51.
204. Kubosaki A, Nakamura S, Clark A, Morris JF, Notkins AL. Disruption of the transmembrane dense core vesicle proteins IA-2 and IA-2beta causes female infertility. *Endocrinology*. 2006;147(2):811-815.
205. Caromile LA, Oganessian A, Coats SA, Seifert RA, Bowen-Pope DF. The neurosecretory vesicle protein phogrin functions as a phosphatidylinositol phosphatase to regulate insulin secretion. *J Biol Chem*. 285(14):10487-10496.
206. Torii S, Saito N, Kawano A, et al. Gene silencing of phogrin unveils its essential role in glucose-responsive pancreatic beta-cell growth. *Diabetes*. 2009;58(3):682-692.
207. Christie MR, Tun RY, Lo SS, et al. Antibodies to GAD and tryptic fragments of islet 64K antigen as distinct markers for development of IDDM. Studies with identical twins. *Diabetes*. 1992;41(7):782-787..
208. Payton MA, Hawkes CJ, Christie MR. Relationship of the 37,000- and 40,000-M(r) tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 (ICA512). *J Clin Invest*. 1995;96(3):1506-1511.
209. Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E. Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40K autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *J Immunol*. 1995;155(11):5419-5426.
210. Leslie RD, Pozzilli P. Type I diabetes masquerading as type II diabetes. Possible implications for prevention and treatment. *Diabetes Care*. 1994;17(10):1214-1219.
211. Seissler J, de Sonnaville JJ, Morgenthaler NG, et al. Immunological heterogeneity in type I diabetes: presence of distinct autoantibody patterns in patients with acute onset and slowly progressive disease. *Diabetologia*. 1998;41(8):891-897.

212. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, et al. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes*. 1996;45(7):926-933.
213. Genovese S, Bonfanti R, Bazzigaluppi E, et al. Association of IA-2 autoantibodies with HLA DR4 phenotypes in IDDM. *Diabetologia*. 1996;39(10):1223-1226.
214. Bingley PJ, Bonifacio E, Gale EA. Antibodies to glutamic acid decarboxylase as predictors of insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet*. 1994;344(8917):266-267.
215. Decochez K, De Leeuw IH, Keymeulen B, et al. IA-2 autoantibodies predict impending type I diabetes in siblings of patients. *Diabetologia*. 2002;45(12):1658-1666.
216. Zhang B, Lan MS, Notkins AL. Autoantibodies to IA-2 in IDDM: location of major antigenic determinants. *Diabetes*. 1997;46(1):40-43.
217. Bearzatto M, Naserke H, Piquer S, et al. Two distinctly HLA-associated contiguous linear epitopes uniquely expressed within the islet antigen 2 molecule are major autoantibody epitopes of the diabetes-specific tyrosine phosphatase-like protein autoantigens. *J Immunol*. 2002;168(8):4202-4208.
218. Xie H, Zhang B, Matsumoto Y, Li Q, Notkins AL, Lan MS. Autoantibodies to IA-2 and IA-2 beta in insulin-dependent diabetes mellitus recognize conformational epitopes: location of the 37- and 40-kDa fragments determined. *J Immunol*. 1997;159(7):3662-3667.
219. Lan MS, Wasserfall C, Maclaren NK, Notkins AL. IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(13):6367-6370.
220. Roll U, Ziegler AG. Combined antibody screening for improved prediction of IDDM--modern strategies. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1997;105(1):1-14.
221. Leslie RD, Atkinson MA, Notkins AL. Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*. 1999;42(1):3-14.
222. Alejandro R, Shienvold FL, Hajek SA, Pierce M, Paul R, Mintz DH. A ganglioside antigen on the rat pancreatic B cell surface identified by monoclonal antibody R2D6. *J Clin Invest*. 1984;74(1):25-38.
223. Eisenbarth GS, Shimizu K, Bowring MA, Wells S. Expression of receptors for tetanus toxin and monoclonal antibody A2B5 by pancreatic islet cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(16):5066-5070.
224. Gillard BK, Thomas JW, Nell LJ, Marcus DM. Antibodies against ganglioside GT3 in the sera of patients with type I diabetes mellitus. *J Immunol*. 1989;142(11):3826-3832.
225. Dotta F, Colman PG, Lombardi D, et al. Ganglioside expression in human pancreatic islets. *Diabetes*. 1989;38(11):1478-1483.
226. Dotta F, Gianani R, Previti M, et al. Autoimmunity to the GM2-1 islet ganglioside before and at the onset of type I diabetes. *Diabetes*. 1996;45(9):1193-1196.
227. Lucchetta M, Rudilosso S, Costa S, et al. Anti-ganglioside autoantibodies in type 1 diabetes. *Muscle Nerve*. 2009.

228. Davidson HW, Hutton JC. The insulin-secretory-granule carboxypeptidase H. Purification and demonstration of involvement in proinsulin processing. *Biochem J.* 1987;245(2):575-582.
229. Hanahan D. Peripheral-antigen-expressing cells in thymic medulla: factors in self-tolerance and autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 1998;10(6):656-662.
230. Kent SC, Chen Y, Bregoli L, et al. Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. *Nature.* 2005;435(7039):224-228.
231. Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, et al. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature.* 2005;435(7039):220-223.
232. Jasinski JM, Yu L, Nakayama M, et al. Transgenic insulin (B:9-23) T-cell receptor mice develop autoimmune diabetes dependent upon RAG genotype, H-2g7 homozygosity, and insulin 2 gene knockout. *Diabetes.* 2006;55(7):1978-1984.
233. Jaeckel E, Lipes MA, von Boehmer H. Recessive tolerance to preproinsulin 2 reduces but does not abolish type 1 diabetes. *Nat Immunol.* 2004;5(10):1028-1035.
234. Berson SA, Yalow RS. Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. *J Clin Invest.* 1959;38:1996-2016..
235. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, et al. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science (80-).* 1983;222(4630):1337-1339.
236. Ziegler AG, Vardi P, Gross DJ, et al. Production of insulin antibodies by mice rejecting insulin transfected cells. *J Autoimmun.* 1989;2(3):219-227.
237. Hirata Y, Tominaga M, Ito JI, Noguchi A. Spontaneous hypoglycemia with insulin autoimmunity in Graves disease. *Ann Intern Med.* 1974;81(2):214-218.
238. Di Mario U, Perfetti R, Anastasi E, et al. Autoantibodies to insulin do appear in non-diabetic patients with autoimmune disorders: comparison with anti-immunoglobulin antibodies and other autoimmune phenomena. *Acta Endocrinol.* 1990;122(3):303-308.
239. Kimpimaki T, Knip M. Disease-associated autoantibodies as predictive markers of type 1 diabetes mellitus in siblings of affected children. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2001;14 Suppl 1:575-587.
240. Jaeger C, Hatzigelaki E, Stroedter A, et al. The Giessen-Bad Oeynhausen family study: improved prediction of type I diabetes in a low incidence population of relatives using combinations of islet autoantibodies in a dual step model. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1999;107(8):496-505.
241. Hagopian WA, Sanjeevi CB, Kockum I, et al. Glutamate decarboxylase-, insulin-, and islet cell-antibodies and HLA typing to detect diabetes in a general population-based study of Swedish children. *J Clin Invest.* 1995;95(4):1505-1511.
242. Kimpimaki T, Kulmala P, Savola K, et al. Natural history of beta-cell autoimmunity in young children with increased genetic susceptibility to type 1 diabetes recruited from the general population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(10):4572-4579.

243. Yu L, Robles DT, Abiru N, et al. Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: evidence for early determination of subsequent diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(4):1701-1706.
244. Ziegler AG, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes*. 1999;48(3):460-468.
245. Hummel M, Bonifacio E, Schmid S, Walter M, Knopff A, Ziegler AG. Brief communication: early appearance of islet autoantibodies predicts childhood type 1 diabetes in offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med*. 2004;140(11):882-886.
246. Barker JM, Barriga KJ, Yu L, et al. Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(8):3896-3902.
247. Colman PG, Steele C, Couper JJ, et al. Islet autoimmunity in infants with a Type I diabetic relative is common but is frequently restricted to one autoantibody. *Diabetologia*. 2000;43(2):203-209.
248. Hamalainen AM, Ronkainen MS, Akerblom HK, Knip M. Postnatal elimination of transplacentally acquired disease-associated antibodies in infants born to families with type 1 diabetes. The Finnish TRIGR Study Group. Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(11):4249-4253.
249. Naserke HE, Bonifacio E, Ziegler AG. Prevalence, characteristics and diabetes risk associated with transient maternally acquired islet antibodies and persistent islet antibodies in offspring of parents with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(10):4826-4833.
250. Achenbach P, Koczwara K, Knopff A, Naserke H, Ziegler AG, Bonifacio E. Mature high-affinity immune responses to (pro)insulin anticipate the autoimmune cascade that leads to type 1 diabetes. *J Clin Invest*. 2004;114(4):589-597.
251. Pietropaolo M, Castano L, Babu S, et al. Islet cell autoantigen 69 kD (ICA69). Molecular cloning and characterization of a novel diabetes-associated autoantigen. *J Clin Invest*. 1993;92(1):359-371.
252. Stassi G, Schloot N, Pietropaolo M. Islet cell autoantigen 69 kDa (ICA69) is preferentially expressed in the human islets of Langerhans than exocrine pancreas. *Diabetologia*. 1997;40(1):120-122.
253. Spitzenberger F, Pietropaolo S, Verkade P, et al. Islet cell autoantigen of 69 kDa is an arfaptin-related protein associated with the Golgi complex of insulinoma INS-1 cells. *J Biol Chem*. 2003;278(28):26166-26173..
254. Pilon M, Peng XR, Spence AM, Plasterk RH, Dosch HM. The diabetes autoantigen ICA69 and its *Caenorhabditis elegans* homologue, ric-19, are conserved regulators of neuroendocrine secretion. *Mol Biol Cell*. 2000;11(10):3277-3288.
255. Karges W, Gaedigk R, Hui MF, Cheung R, Dosch HM. Molecular cloning of murine ICA69: diabetes-prone mice recognize the human autoimmune-epitope, Tep69, conserved in splice variants from both species. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1360(2):97-101.

256. Martin S, Kardorf J, Schulte B, et al. Autoantibodies to the islet antigen ICA69 occur in IDDM and in rheumatoid arthritis. *Diabetologia*. 1995;38(3):351-355.
257. Atkinson MA, Bowman MA, Kao KJ, et al. Lack of immune responsiveness to bovine serum albumin in insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med*. 1993;329(25):1853-1858.
258. Winer S, Gunaratnam L, Astsaturov I, et al. Peptide dose, MHC affinity, and target self-antigen expression are critical for effective immunotherapy of nonobese diabetic mouse prediabetes. *J Immunol*. 2000;165(7):4086-4094.
259. Fricker LD, Snyder SH. Purification and characterization of enkephalin convertase, an enkephalin-synthesizing carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 1983;258(18):10950-10955.
260. Supattapone S, Fricker LD, Snyder SH. Purification and characterization of a membrane-bound enkephalin-forming carboxypeptidase, an enkephalin convertase. *J Neurochem*. 1984;42(4):1017-1023.
261. Kasimiotis H, Myers MA, Argentaro A, et al. Sex-determining region Y-related protein SOX13 is a diabetes autoantigen expressed in pancreatic islets. *Diabetes*. 2000;49(4):555-561.
262. Lampasona V, Scirpoli M, Bosi E, Bonifacio E. ICA12(SOX13) autoantibodies are unlikely to be a useful marker for pre-clinical Type I diabetes. *Diabetologia*. 2001;44(2):267.
263. Steinbrenner H, Lohmann T, Ostendorf B, Scherbaum WA, Seissler J. Autoantibodies to ICA12 (SOX-13) are not specific for Type I diabetes. *Diabetologia*. 2000;43(11):1381-1384.
264. Chimienti F, Devergnas S, Favier A, Seve M. Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes*. 2004;53(9):2330-2337.
265. Chimienti F, Devergnas S, Pattou F, et al. In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 20):4199-4206.
266. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(43):17040-17045.
267. Achenbach P, Lampasona V, Landherr U, et al. Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLC30A8 genotype stratify type 1 diabetes risk. *Diabetologia*. 2009;52(9):1881-1888.
268. Lampasona V, Petrone A, Tiberti C, et al. Zinc Transporter 8 antibodies complement GAD and IA-2 antibodies in the identification and characterization of adult-onset autoimmune diabetes.: NIRAD 4. *Diabetes Care*. 2009.
269. Kawasaki E, Nakamura K, Kuriya G, et al. Autoantibodies to insulin, insulinoma-associated antigen-2, and zinc transporter 8 improve the prediction of early insulin requirement in adult-onset autoimmune diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 95(2):707-713.
270. Hertel JK, Johansson S, Raeder H, et al. Genetic analysis of recently identified type 2 diabetes loci in 1,638 unselected patients with type 2 diabetes and 1,858 control participants from a Norwegian population-based cohort (the HUNT study). *Diabetologia*. 2008;51(6):971-977.

271. Gohlke H, Ferrari U, Koczwara K, Bonifacio E, Illig T, Ziegler AG. SLC30A8 (ZnT8) Polymorphism is Associated with Young Age at Type 1 Diabetes Onset. *Rev Diabet Stud.* 2008;5(1):25-27.
272. Yu L, Liu Y, Miao D, et al. Triple chimeric islet autoantigen IA2-ZnT8WR to facilitate islet autoantibody determination. *J Immunol Methods.* 353(1-2):20-23.
273. Eugster A, Kraus G, Lidzba V, et al. Cytoplasmic ends of tetraspanin 7 harbour epitopes recognised by autoantibodies in type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2019;62(5):805-810.
274. Karounos DG, Wolinsky JS, Thomas JW. Monoclonal antibody to rubella virus capsid protein recognizes a beta-cell antigen. *J Immunol.* 1993;150(7):3080-3085..
275. Honeyman MC, Cram DS, Harrison LC. Transcription factor jun-B is target of autoreactive T-cells in IDDM. *Diabetes.* 1993;42(4):626-630.
276. Pak CY, Cha CY, Rajotte R V, McArthur RG, Yoon JW. Human pancreatic islet cell specific 38 kilodalton autoantigen identified by cytomegalovirus-induced monoclonal islet cell autoantibody. *Diabetologia.* 1990;33(9):569-572.
277. Arden SD, Roep BO, Neophytou PI, et al. Imogen 38: a novel 38-kD islet mitochondrial autoantigen recognized by T cells from a newly diagnosed type 1 diabetic patient. *J Clin Invest.* 1996;97(2):551-561.
278. McEvoy RC, Thomas NM, Greig F, et al. Anti-islet autoantibodies detected by monoclonal antibody 1A2: further studies suggesting a role in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia.* 1996;39(11):1365-1371.
279. Aanstoot HJ, Kang SM, Kim J, et al. Identification and characterization of glima 38, a glycosylated islet cell membrane antigen, which together with GAD65 and IA2 marks the early phases of autoimmune response in type 1 diabetes. *J Clin Invest.* 1996;97(12):2772-2783.
280. Roll U, Turck CW, Gitelman SE, et al. Peptide mapping and characterisation of glycation patterns of the glima 38 antigen recognised by autoantibodies in Type I diabetic patients. *Diabetologia.* 2000;43(5):598-608.
281. Winnock F, Christie MR, Batstra MR, et al. Autoantibodies to a 38-kDa glycosylated islet cell membrane-associated antigen in (pre)type 1 diabetes: association with IA-2 and islet cell autoantibodies. *Diabetes Care.* 2001;24(7):1181-1186.
282. Birk OS, Elias D, Weiss AS, et al. NOD mouse diabetes: the ubiquitous mouse hsp60 is a beta-cell target antigen of autoimmune T cells. *J Autoimmun.* 1996;9(2):159-166.
283. Jones DB, Hunter NR, Duff GW. Heat-shock protein 65 as a beta cell antigen of insulin-dependent diabetes. *Lancet.* 1990;336(8715):583-585.
284. Inman LR, McAllister CT, Chen L, et al. Autoantibodies to the GLUT-2 glucose transporter of beta cells in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(4):1281-1284.
285. Johnson JH, Crider BP, McCorkle K, Alford M, Unger RH. Inhibition of glucose transport into rat islet cells by immunoglobulins from patients with new-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1990;322(10):653-659.

286. Pehuet-Figoni M, Alvarez F, Bach JF, Chatenoud L. Autoantibodies in recent onset type-1 diabetic patients to a Mr 60K microsomal hepatic protein: new evidence for autoantibodies to the type-2 glucose transporter. *Clin Exp Immunol.* 2000;122(2):164-169.
287. Bingley PJ, Bonifacio E, Ziegler AG, Schatz DA, Atkinson MA, Eisenbarth GS. Proposed guidelines on screening for risk of type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2001;24(2):398.
288. Kulmala P, Savola K, Petersen JS, et al. Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings of children with diabetes. A population-based study. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *J Clin Invest.* 1998;101(2):327-336.
289. Bingley PJ, Williams AJ, Gale EA. Optimized autoantibody-based risk assessment in family members. Implications for future intervention trials. *Diabetes Care.* 1999;22(11):1796-1801.
290. Krischer JP, Cuthbertson DD, Yu L, et al. Screening strategies for the identification of multiple antibody-positive relatives of individuals with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(1):103-108.
291. Ziegler AG, Ziegler R, Vardi P, Jackson RA, Soeldner JS, Eisenbarth GS. Life-table analysis of progression to diabetes of anti-insulin autoantibody-positive relatives of individuals with type I diabetes. *Diabetes.* 1989;38(10):1320-1325.
292. Achenbach P, Warncke K, Reiter J, et al. Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics. *Diabetes.* 2004;53(2):384-392.
293. LaGasse JM, Brantley MS, Leech NJ, et al. Successful prospective prediction of type 1 diabetes in schoolchildren through multiple defined autoantibodies: an 8-year follow-up of the Washington State Diabetes Prediction Study. *Diabetes Care.* 2002;25(3):505-511.
294. Strebelow M, Schlosser M, Ziegler B, Rjasanowski I, Ziegler M. Karlsburg Type I diabetes risk study of a general population: frequencies and interactions of the four major Type I diabetes-associated autoantibodies studied in 9419 schoolchildren. *Diabetologia.* 1999;42(6):661-670.
295. Chase HP, Cooper S, Osberg I, et al. Elevated C-reactive protein levels in the development of type 1 diabetes. *Diabetes.* 2004;53(10):2569-2573.
296. Furlanos S, Narendran P, Byrnes GB, Colman PG, Harrison LC. Insulin resistance is a risk factor for progression to type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2004;47(10):1661-1667.
297. Hoppu S, Ronkainen MS, Kulmala P, Akerblom HK, Knip M. GAD65 antibody isotypes and epitope recognition during the prediabetic process in siblings of children with type I diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2004;136(1):120-128.
298. Naserke HE, Ziegler AG, Lampasona V, Bonifacio E. Early development and spreading of autoantibodies to epitopes of IA-2 and their association with progression to type 1 diabetes. *J Immunol.* 1998;161(12):6963-6969.
299. Verge CF, Stenger D, Bonifacio E, et al. Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes: Combinatorial Islet Autoantibody Workshop. *Diabetes.* 1998;47(12):1857-1866.

300. Pihoker C, Gilliam LK, Hampe CS, Lernmark A. Autoantibodies in diabetes. *Diabetes*. 2005;54 Suppl 2:S52-61.
301. Notkins AL, Lernmark A. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *J Clin Invest*. 2001;108(9):1247-1252.
302. Strollo R, Vinci C, Napoli N, et al. Antibodies to oxidized insulin improve prediction of type 1 diabetes in children with positive standard islet autoantibodies. *Diabetes Metab Res Rev*. 2019;35(4):e3132.
303. Lounici Boudiaf A, Bouziane D, Smara M, et al. Could ZnT8 antibodies replace ICA, GAD, IA2 and insulin antibodies in the diagnosis of type 1 diabetes? *Curr Res Transl Med*. 2018;66(1):1-7.
304. Kawasaki E, Yu L, Rewers MJ, Hutton JC, Eisenbarth GS. Definition of multiple ICA512/phogrin autoantibody epitopes and detection of intramolecular epitope spreading in relatives of patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 1998;47(5):733-742.
305. Salomonsson S, Sonesson SE, Ottosson L, et al. Ro/SSA autoantibodies directly bind cardiomyocytes, disturb calcium homeostasis, and mediate congenital heart block. *J Exp Med*. 2005;201(1):11-17.
306. Acevedo-Calado MJ, Pietropaolo SL, Morran MP, et al. Autoantibodies Directed to a Novel IA-2 Variant Protein Enhance Prediction of Type 1 Diabetes. *Diabetes*. June 2019;db181351. doi:10.2337/db18-1351
307. Lampasona V, Belloni C, Piquer S, Bonicchio S, Furlan R, Bonifacio E. Radiobinding assay for detecting autoantibodies to single epitopes. *J Immunol Methods*. 2008;336(2):127-134.
308. Dromey JA, Weenink SM, Peters GH, et al. Mapping of epitopes for autoantibodies to the type 1 diabetes autoantigen IA-2 by peptide phage display and molecular modeling: overlap of antibody and T cell determinants. *J Immunol*. 2004;172(7):4084-4090.
309. Kolm-Litty V, Berlo S, Bonifacio E, et al. Human monoclonal antibodies isolated from type I diabetes patients define multiple epitopes in the protein tyrosine phosphatase-like IA-2 antigen. *J Immunol*. 2000;165(8):4676-4684..
310. Lohmann T, Hawa M, Leslie RD, Lane R, Picard J, Londei M. Immune reactivity to glutamic acid decarboxylase 65 in stiffman syndrome and type 1 diabetes mellitus. *Lancet*. 2000;356(9223):31-35.
311. Kim J, Namchuk M, Bugawan T, et al. Higher autoantibody levels and recognition of a linear NH2-terminal epitope in the autoantigen GAD65, distinguish stiff-man syndrome from insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med*. 1994;180(2):595-606.
312. Daw K, Ujihara N, Atkinson M, Powers AC. Glutamic acid decarboxylase autoantibodies in stiff-man syndrome and insulin-dependent diabetes mellitus exhibit similarities and differences in epitope recognition. *J Immunol*. 1996;156(2):818-825.
313. Costa M, Saiz A, Casamitjana R, et al. T-cell reactivity to glutamic acid decarboxylase in stiff-man syndrome and cerebellar ataxia associated with polyendocrine autoimmunity. *Clin Exp Immunol*. 2002;129(3):471-478.

314. Falorni A, Ackefors M, Carlberg C, et al. Diagnostic sensitivity of immunodominant epitopes of glutamic acid decarboxylase (GAD65) autoantibodies in childhood IDDM. *Diabetologia*. 1996;39(9):1091-1098.
315. Wyatt RC, Brigatti C, Liberati D, et al. The first 142 amino acids of glutamate decarboxylase do not contribute to epitopes recognized by autoantibodies associated with Type 1 diabetes. *Diabet Med*. 2018;35(7):954-963.
316. Achenbach P, Hawa MI, Krause S, et al. Autoantibodies to N-terminally truncated GAD improve clinical phenotyping of individuals with adult-onset diabetes: Action LADA 12. *Diabetologia*. 2018;61(7):1644-1649.