



Nieuwe ontwikkelingen?

Dr. M.R. Batstra

Medisch Immunoloog





Classificatie

Type-1 diabetes

- Oorzaak: β -cell destructie
- Absolute insuline deficiëntie
Behandeling: insuline injecties
(*insulin dependent diabetes -- IDDM*)
- Klinische presentatie variabel
- Autoantistoffen zijn aanwezig in > 90% van patiënten

Type-2 diabetes

- Oorzaak: insuline resistentie
- Verhoogde insuline behoefte → relatieve insuline deficiëntie
- Behandeling: dieet, orale hypoglycaemische middelen, insuline injecties (non insulin dependent -- NIDDM)
- Milde klinische manifestatie
- Autoantistoffen aanwezig in <2% van de patienten

Other MODY

Gestational diabetes



LADA

Latent Autoimmune Diabetes of Adulthood

2005 IDS criteria

- Leeftijd >30 jaar
- Aanwezigheid van een of meer **diabetes gerelateerde autoantistoffen**
- >6 maanden na diagnose insuline onafhankelijk

Heterogene groep

- Variatie in snelheid van β -cell destructie
- Variatie in mate van insuline resistentie



Autoantistoffen in type-1 diabetes

Antistof	T1DM Patienten		Gezonden
	Kinderen	Volwassenen	
ICA	80 -90%	60%	<1%
IAA	40-69%	20-40%	<2%
GADA	60-80%	65-85%	<1%
IA2A _{IC}	40-70%	35-60%	<1%
ZnT8	55-70%	20-63%	<2%

Kolibrie studie Zuidwest Nederland (Batstra, Aanstoot, Roep, Bruining)

Kulmala P, et al. J Clin Invest 1998;101(2):327-36.

Verge CF et al. Diabetes 1996;45(7):926-33.

Batstra MR et al. Clin Chem. 1999; 45: 2269-2272.

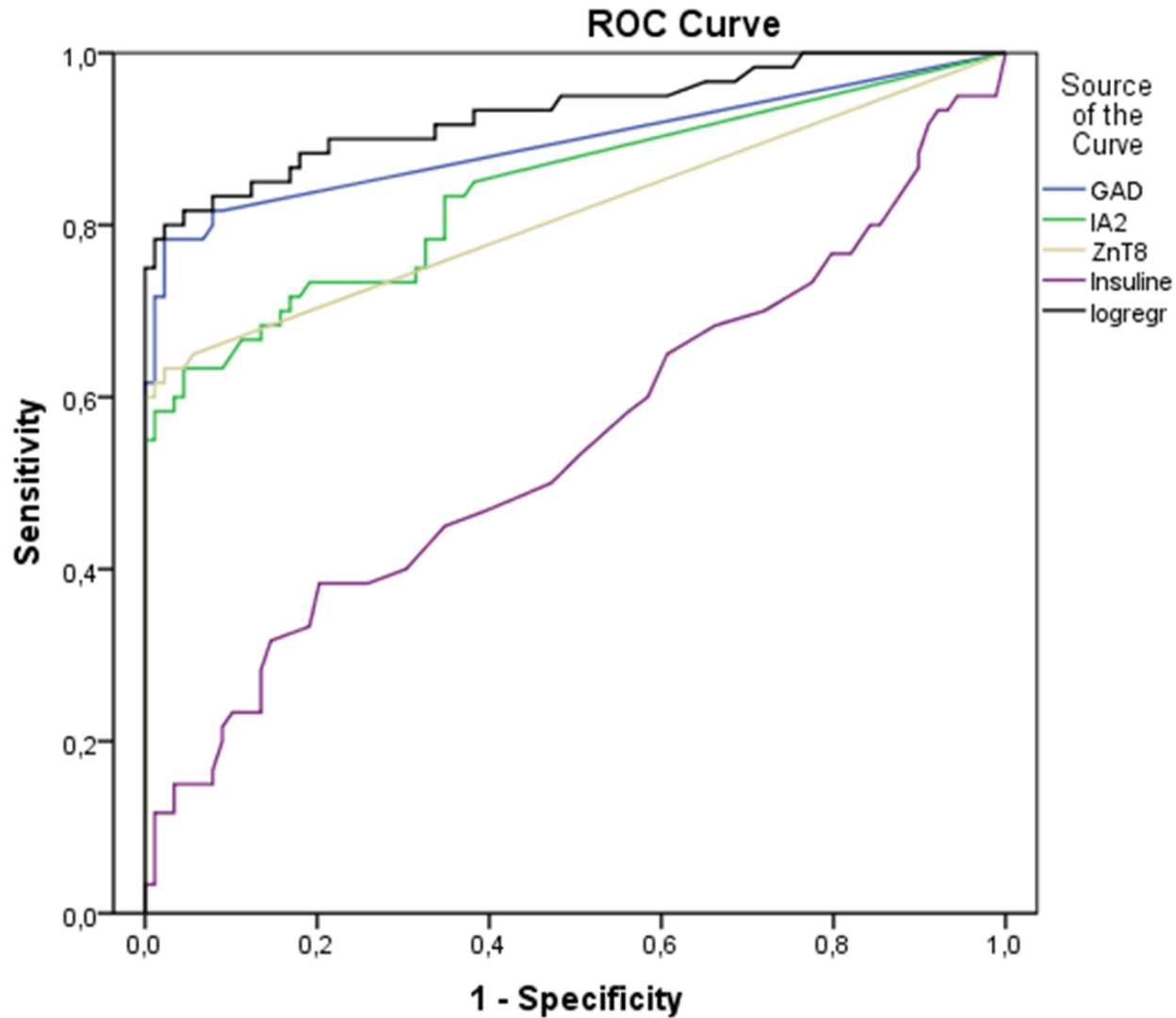
Batstra MR et al Hum Immunol. 2001; 62: 1106-1110

Wenzlau et al PNAS okt 2007

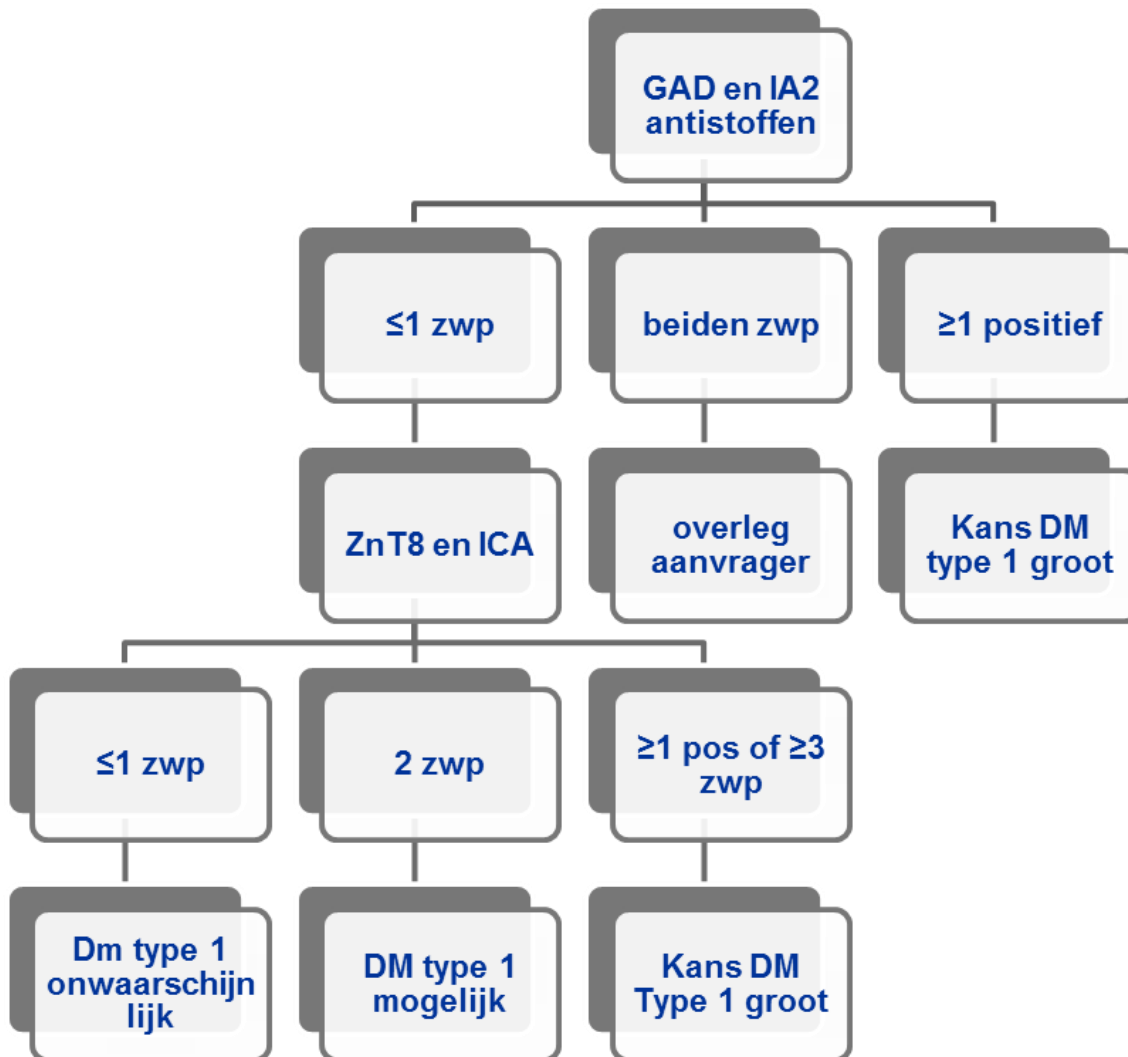
Vaziri-sani J. Imm meth 2011



ROC analyse IASP sera



Algoritme antistoffen voor diagnostiek T1-diabetes en LADA



- | | |
|-------------|-----------------|
| GAD | - zwpp 5,5 – 30 |
| | - pos >30 |
| IA2 | - zwpp 1 – 10 |
| | - pos >10 |
| ZnT8 | - zwpp 15 – 30 |
| | - pos > 30 |



Consult internist

Man 48 jaar, type-1 diabetes?

Analyse	Uitslagen (Vrl = Voorlopige uitslag)	Ref.waarden	Eenheid
---------	---	-------------	---------

IMMUNOLOGIE

(AUTO-) ANTISTOFFEN

Schildklier TPO as	<9 (negatief)	<34	IU/ml
Eil. van Langerhans as	negatief		
Zink transporter 8 (ZnT8) as	0 (negatief)	<15	IU/ml
GAD as	* 8.9 (positief)	<6.0	IU/ml
IA2 as	81 (negatief)	<126	IU/ml
IA2 as	0.6 (negatief)	<1.1	U/ml
Insuline as	<0.10 (negatief)	<0.40	U/ml
Endomysium IgA as	negatief		
TTG IgA as	2 (negatief)	<30	U/ml
Autorisatie	(*)		

(*) Lage GAD antistoffen in afwezigheid van andere diabetes gerelateerde antistoffen geeft weinig stenn voor de diagnose type-1 diabetes



Behandeling van LADA

Geen specifieke richtlijnen

Suggesties:

- Insuline behandeling
LADA betere beta cel reserves op langere termijn dan OHA (metformine of SU)
- Vaccinatiestudies met GAD: LADA betere beta cel reserve in low dose groep
- Combinatie Rosglitazone met insuline: betere HBA1c. Geen data over metformine



Kunnen we nog iets toevoegen?

- Nieuwe targets van antistoffen?
- Eigenschappen van bekende antistoffen?
 -
 -



Autoantistoffen in type-1 diabetes

- **ICAs: Islet Cell Antibodies (eilandjes van langerhans)**
indirect immunofluorescence – lastig te standaardiseren
- **GAD*^{*}: Glutamic Acid Decarboxylase**
Radio Binding assay (high affinity) of ELISA – Goed te standaardiseren
- **IA2_{ic}*^{*}: Insulinoma Antigen 2 a tyrosine phosphatase**
Radio Binding assay (high affinity) or ELISA – goed te standaardiseren
- **ZnT8: Zinc transporter 8: ELISA**
Radio binding assay – goed te standaardiseren
- **IAA: Insulin auto antibodies**
Radio binding assay (low affinity) – slechts enkele goede expertiselaboratoria
- Carboxypeptidase H
- ICA69
- **Tetraspanin-7**
GLN128



GLIMA38- antistoffen

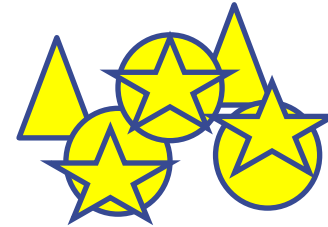
- Prevalentie: ~30% van de patiënten met type-1 diabetes, vrijwel niet in controles
- Geassocieerd met progressie naar diabetes in eerste-graads familieleden
- GLIMA:
 - Hydrofoob membraan eiwit
 - 38 kD
 - Zwaar geglycosyleerd
 - Neuroendocrien expressiepatroon

GLIMA38- antistoffen

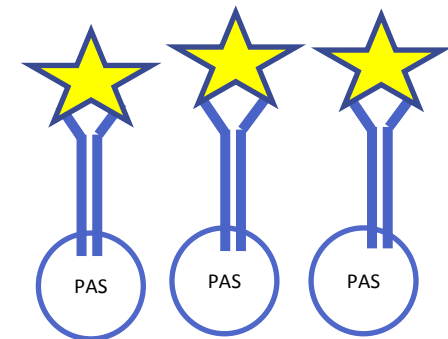
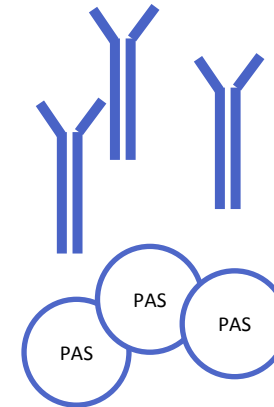


Immunoprecipitation assays

- Kweek van GLIMA positieve cellijn (GT 1.7) met ^{35}S methionine
- Incubatie patientenserum met membraanfractie van de cellijn
- Precipitatie van gebonden eiwitten met proteïn A sepharose
- Eiwit gel electroforese (SDS-PAGE) + eiwitkleuring (coomassie blauw)
- Contact X-ray film

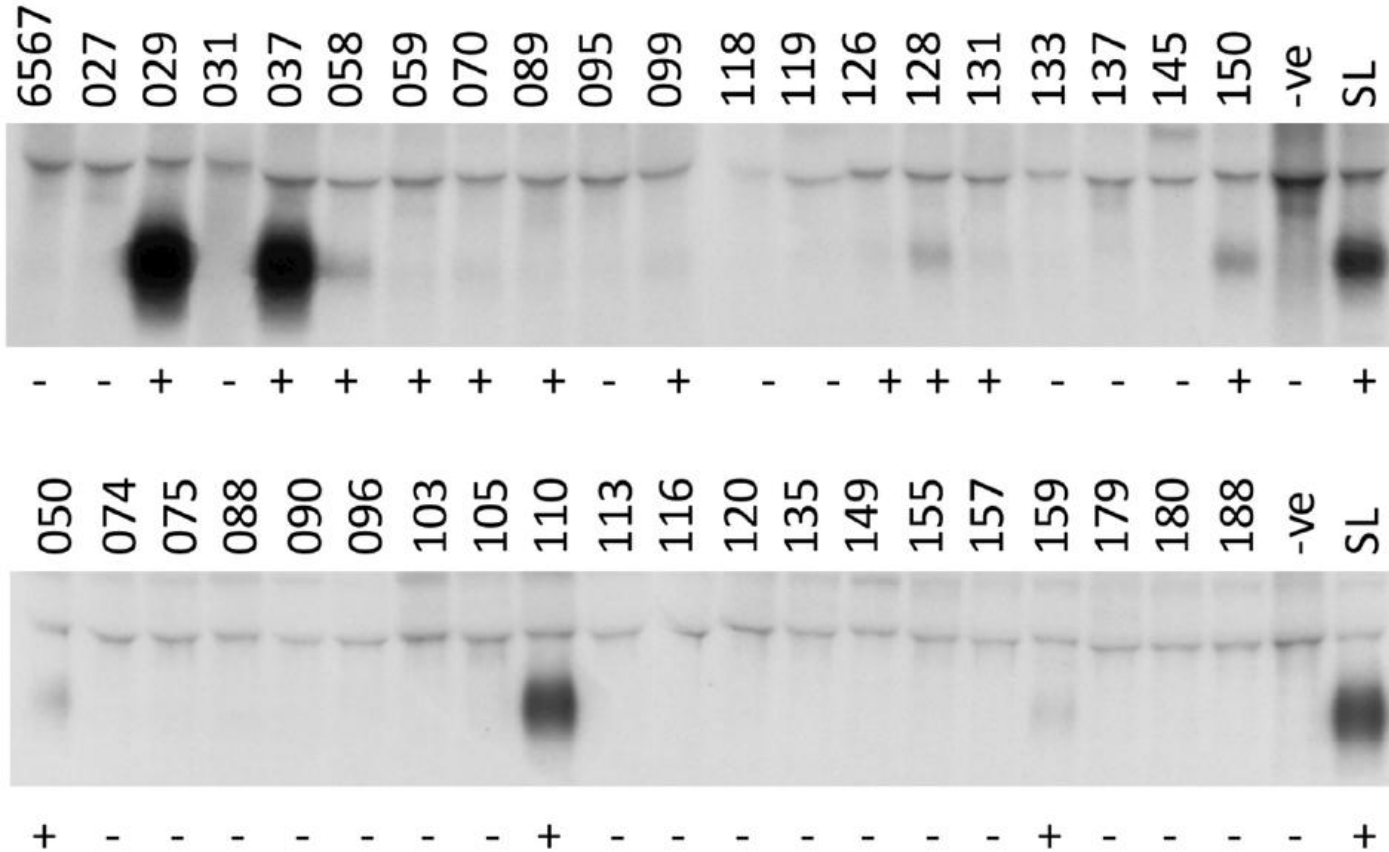


Glima 35





Immuunprecipitatie GLIMA antistoffen





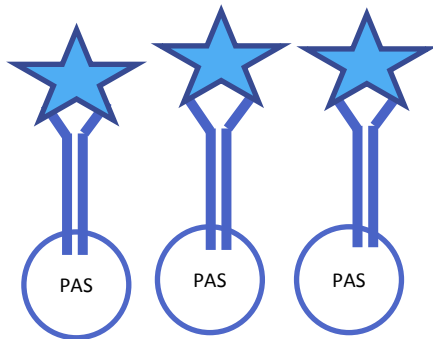
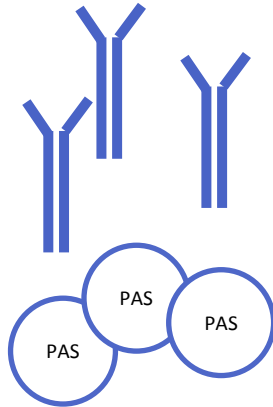
GLIMA38- competitie



³⁵S Glima 35

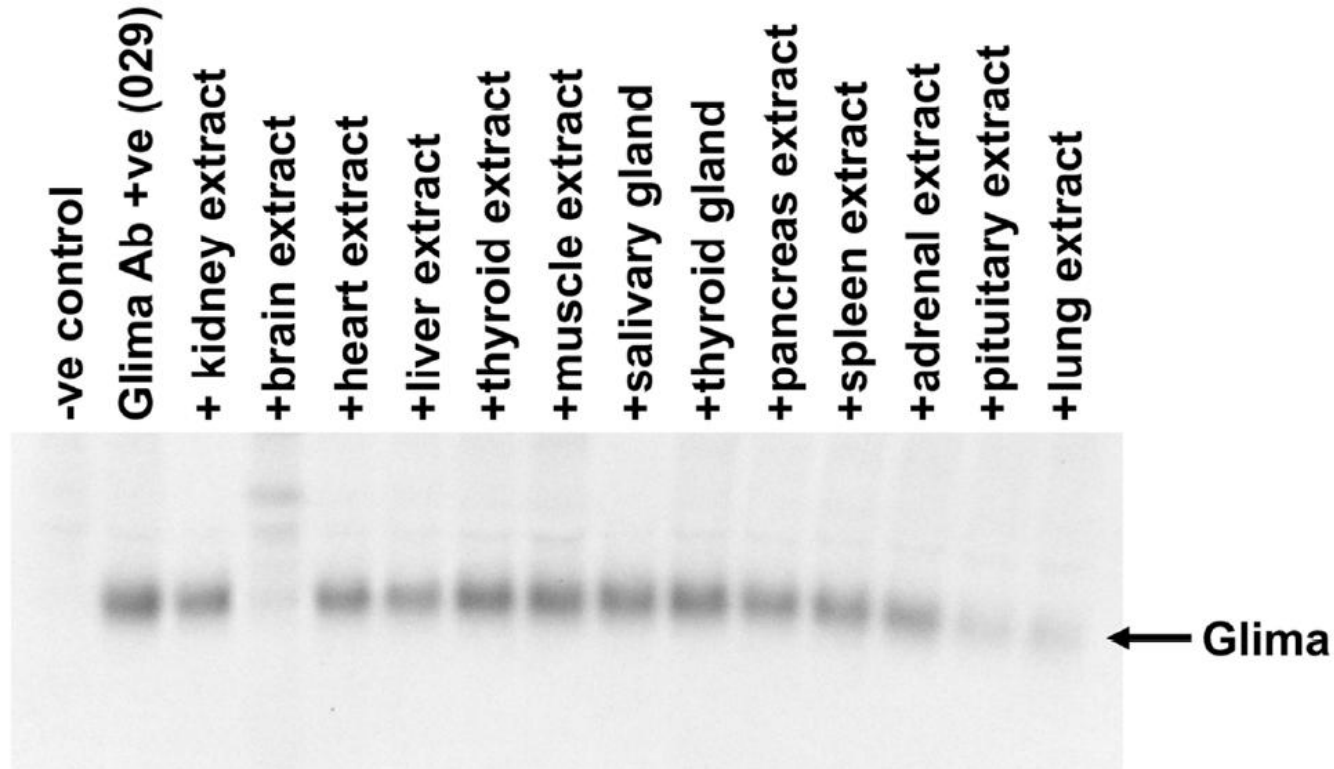


Glima 35





Competitie assay met muis weefsels



Conclusie: GLIMA expressie in **brein** en **long**



Identificatie van GLIMA -1

- Membraan eiwitten uit brein en longweefsel gezuiverd
- SDS-PAGE om eiwitten van 38 kD te identificeren.
- LC-MS/MS van 38 kD fractie
 - 65 kandidaat eiwitten in brein
 - 25 kandidaat eiwitten in long
 - 20 kandidaat eiwitten gemeenschappelijk

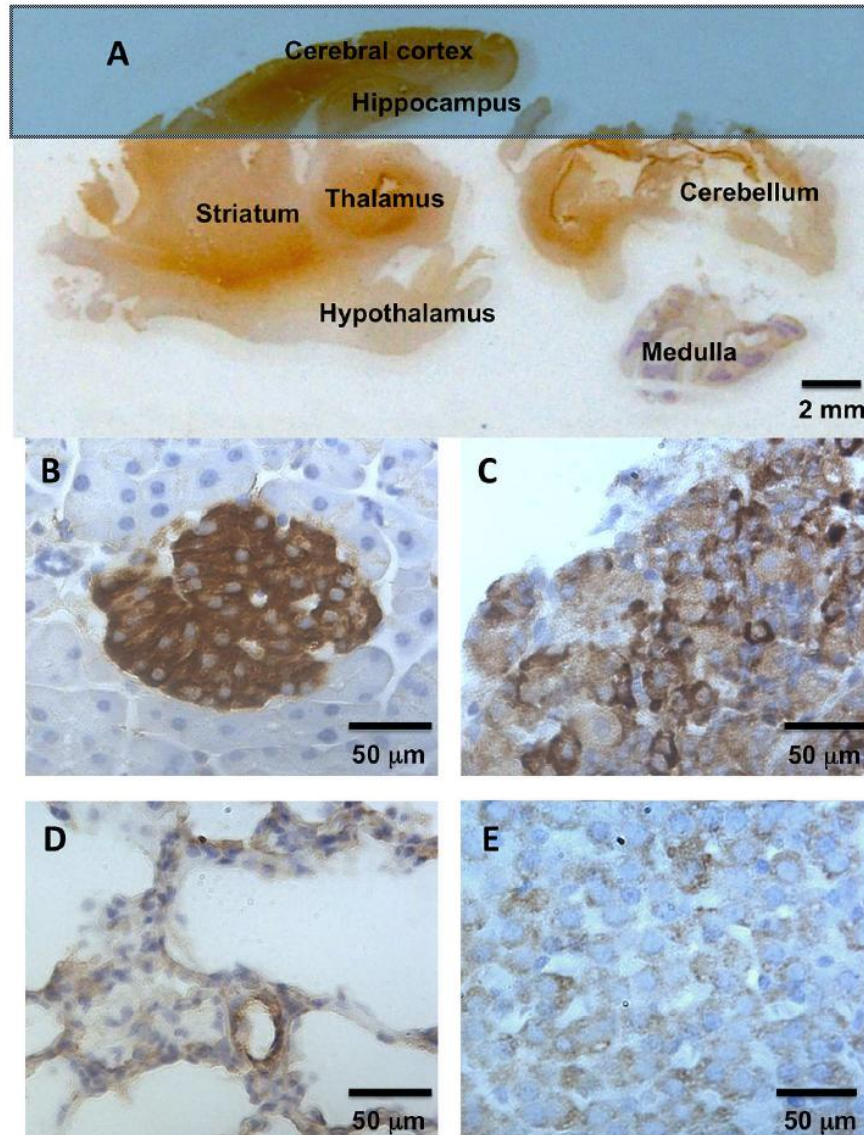


Identificatie van GLIMA-2

- Immunoaffinity precipitatie met pool van sterk positief GLIMA38 patiënten serum (en negatieve controle pool)
- Isolatie 38kD fractie middels SDS-PAGE
- Trypsine digestie van 38kD fractie
- LC-MS/MS van immuungeprecipiteerde 38kD fractie

- 3 kandidaten gemeenschappelijk met 20 brein/long eiwitten (en niet in GLIMA antistof negatieve samples)
 - cytoplasmic actin-1 (Actb), a ubiquitous nonglycosylated cytoskeletal protein with a predicted molecular weight of 42 kDa;
 - guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2 (Gnai2), a non-glycosylated membrane associated 40 kDa protein with a wide tissue distribution;
 - tetraspanin-7 (Tspan7), a hydrophobic four-transmembrane domain protein with core molecular weight 27.5 kDa, five putative N-glycosylation sites and a neuroendocrine distribution.

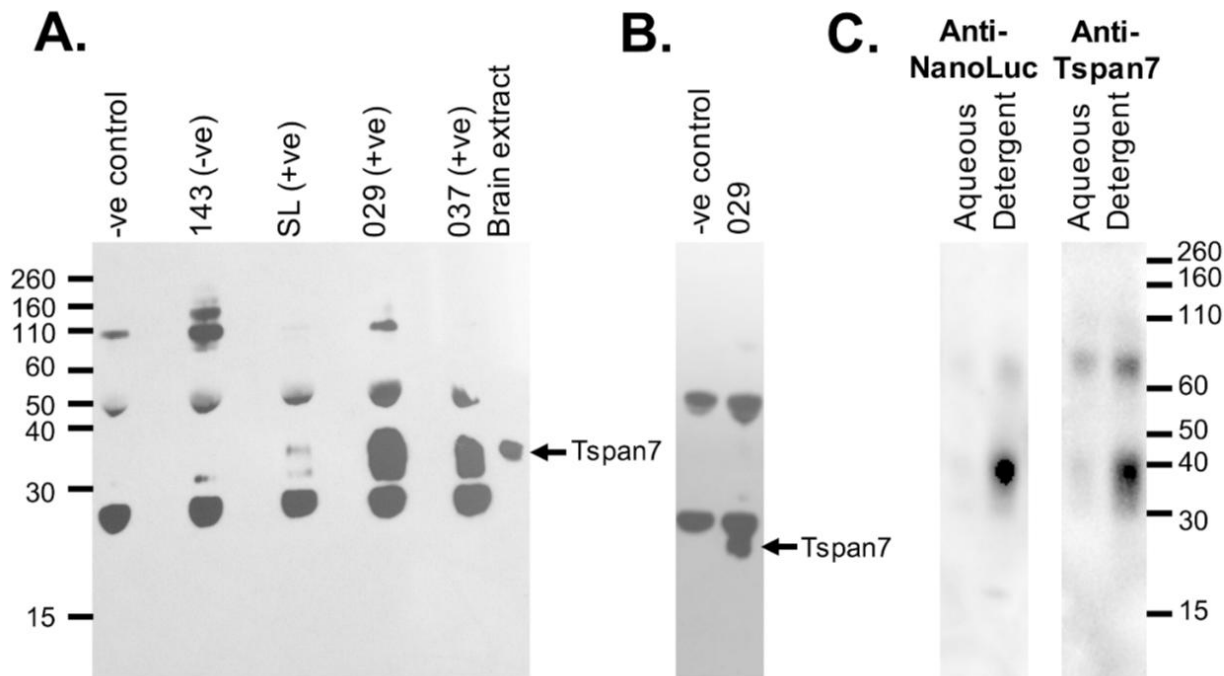
Check van identiteit GLIMA – tetraspanin 7





Immunoaffinity precipitatie van T span7 met diabetes sera

- Muis T-span7 werd gecloneerd en tot expressie gebracht in E. Coli
- Isolatie van hydrofobe eiwitten
- Incubatie met IgG fractie van GLIMA positieve en GLIMA negatieve diabetes sera
- SDS PAGE & western blotting
- Kleuring van Western blot met rabbit anti T-span antistoffen





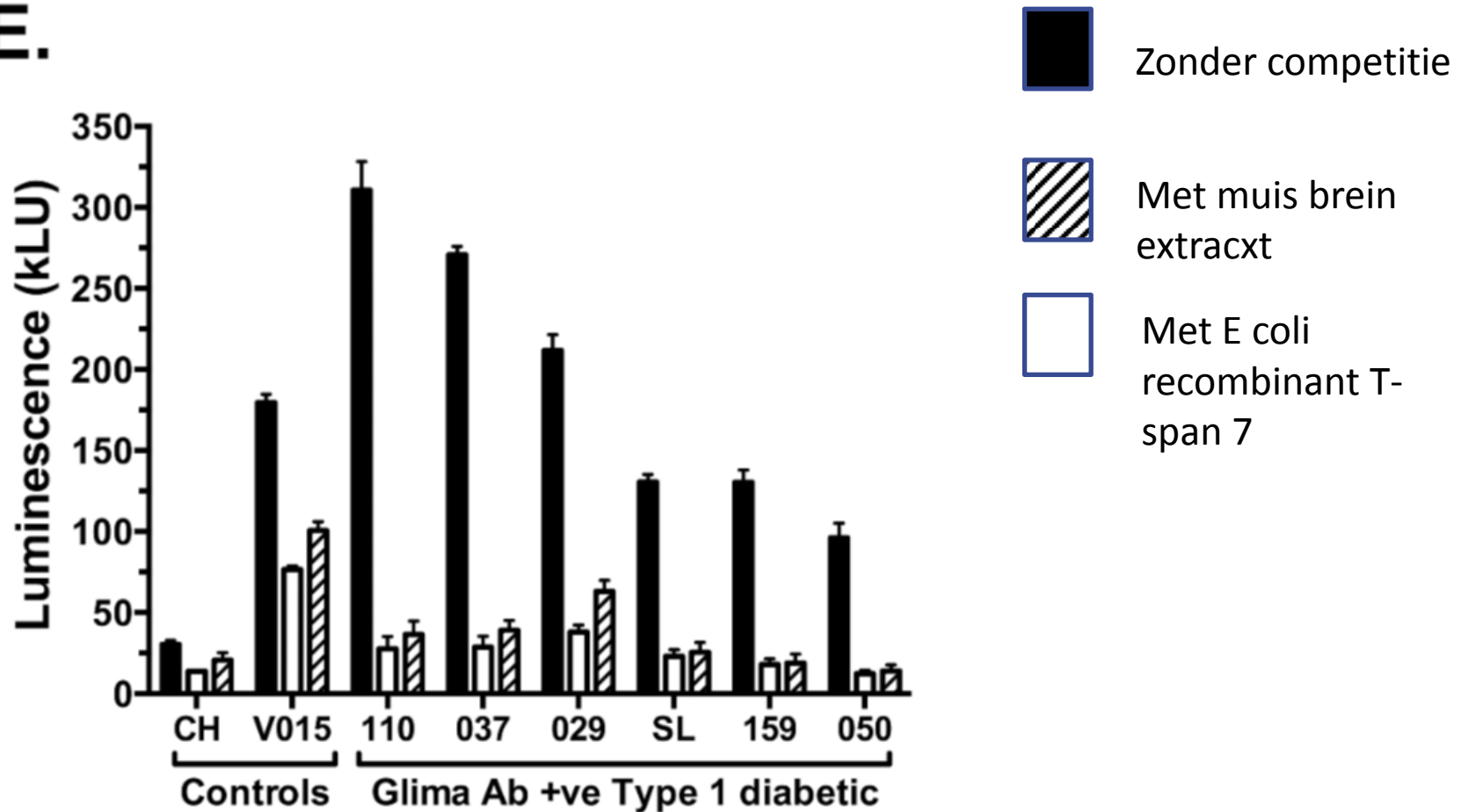
Proof of the pudding

- Luminescent immunoprecipitation assay (LIPS)
 - Expressie van “gelucifereerd” Tspan7 in HEK cellijn
 - Extractie van membraan fractie
 - Immuunprecipitatie met GLIMA +ve en GLIMA –ve patientensera
 - Luminiscentie activiteit is maat voor aanwezigheid GLIMA antistoffen
 - Competitie assay met rattenbrein weefsel



Lips assay Tspan7 met diabetes sera

E.



conclusie



GLIMA38 = Tetraspanin -7

Identification of Tetraspanin-7 as a Target of Autoantibodies in Type 1 Diabetes

Kerry A. McLaughlin¹, Carolyn C. Richardson^{1,2}, Aarthi Ravishankar¹, Cristina Brigatti³, Daniela Liberati⁴, Vito Lampasona⁴, Lorenzo Piemonti³, Diana Morgan⁵, Richard G. Feltbower⁵ and Michael R. Christie^{1,2}↑

 Author Affiliations

Corresponding author: Michael R. Christie, mchristie@lincoln.ac.uk.

Diabetes 2016 Jun; 65(6): 1690-1698.

<https://doi.org/10.2337/db15-1058>

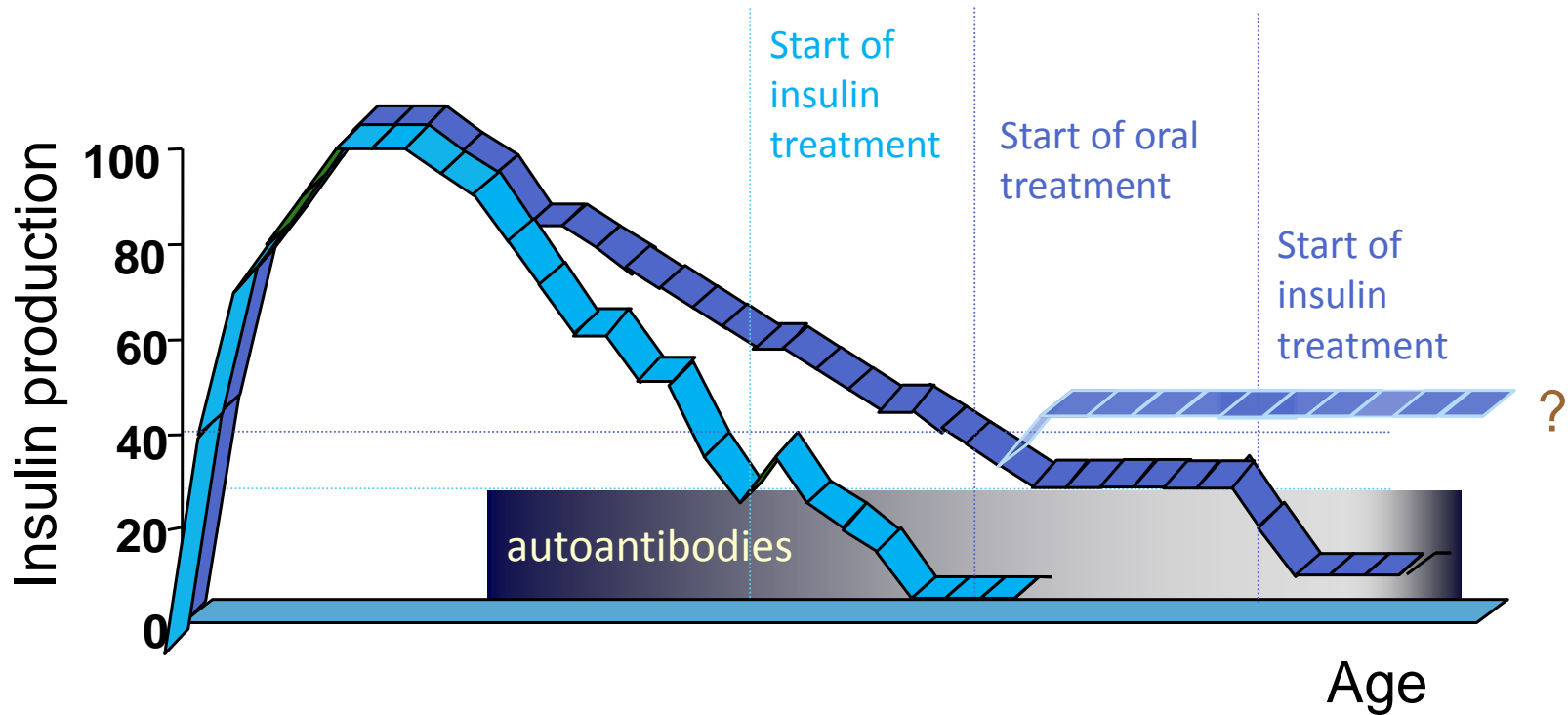




Kunnen we nog iets toevoegen?

- Nieuwe antistoffen? –
Tetraspanin 7
 - Bijdrage aan diagnostiek moet verder worden uitgezocht
- Eigenschappen van bekende antistoffen?
 - Concentratie
 - Andere epitopen

β -cel afbraak in type-1 diabetes en LADA





Type-1, LADA, Type-2

Karakteristieken	T1DM	LADA	T2DM
Leeftijd diagnose	Kinderen/adolescenten, zelden volwassenen	>30 jaar	Volwassenen, zelden kinderen/adolescenten
Presentatie	Acuut	Zelden acuut	Langzaam
Autoimmunitieit	↑↑	↑	=
Ketose	Vaak	Zelden	Zelden
Insuline resistentie	=	↑	↑↑
β-cel functie	↓↓	↓	= of ↑
Insuline afhankelijk	Bij diagnose	> 6 mnd na diagnose	Jaren na diagnose
BMI	= of ↓	= of ↑	↑ Of ↑↑
Metabool syndroom	=	↑	↑↑
HLA-susceptibility	↑↑	↑	=

Bimodale verdeling GADA antistoffen in LADA patiënten?

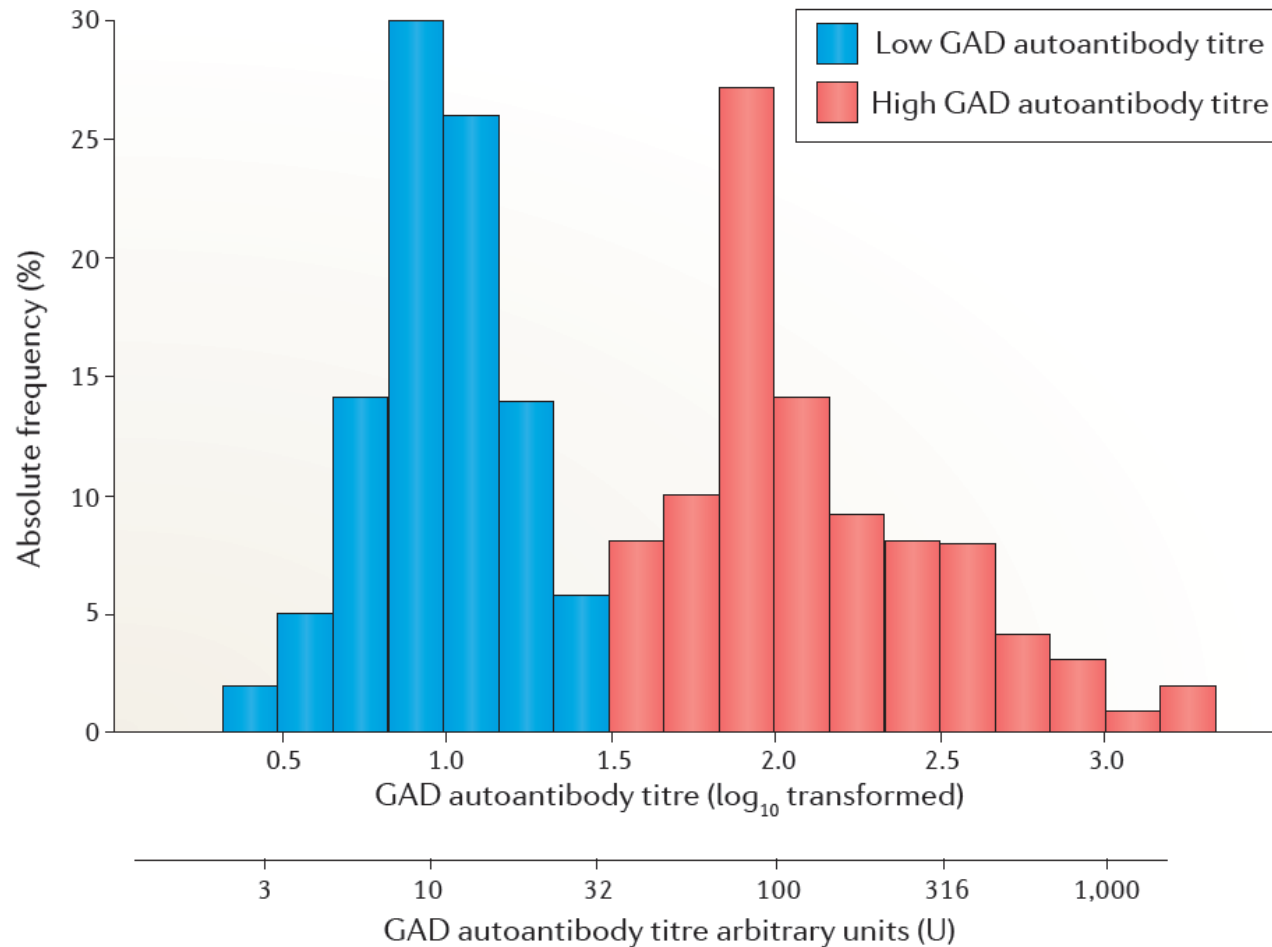
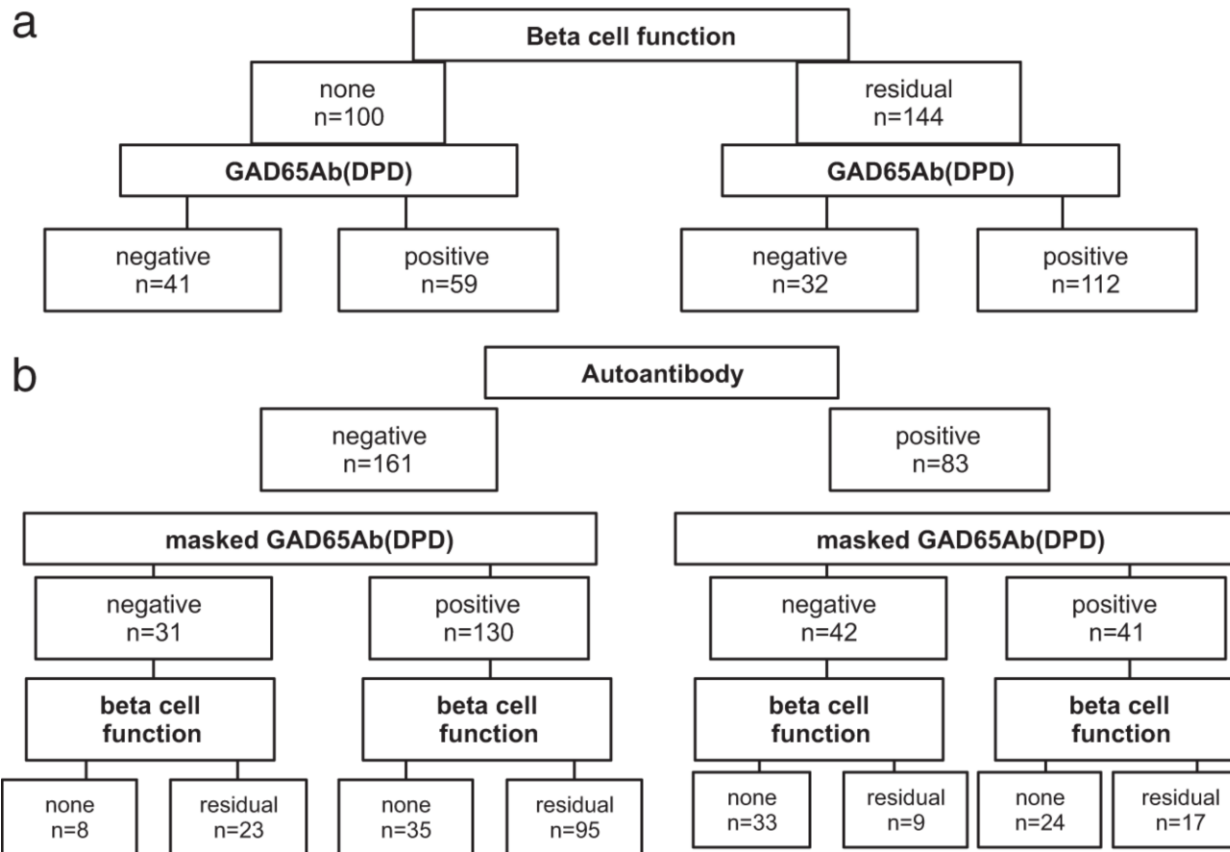


Figure 1 | **Bimodal distribution of the glutamic acid decarboxylase autoantibody titre in patients with latent autoimmune diabetes in adults.** The bar graph shows the

GAD antistoffen – epitooop herkenning in LADA



- GAD65Ab DPD is monoclonale antistof geïsoleerd van patiënt met type-1 diabetes
- Herkent N-terminale conformationele epitooop (AA 96 – 173)
- Prospectieve studie van 244 volwassenen met “ketosis prone” diabetes



From: Masked and Overt Autoantibodies Specific to the DPD Epitope of 65-kDa Glutamate Decarboxylase (GAD65-DPD) Are Associated With Preserved β -Cell Functional Reserve in Ketosis-Prone Diabetes

J Clin Endocrinol Metab. 2014;99(6):E1040-E1044. doi:10.1210/jc.2013-4189

J Clin Endocrinol Metab | Copyright © 2014 by the Endocrine Society



GAD antistoffen – epitooop herkenning in kinderen type-1 diabetes

Table 2 Comparison of characteristics in glutamic acid decarboxylase 65 autoantibody-positive patients with and without positive DPD epitope recognition ($n = 35$)

	DPD epitope-positive	DPD epitope-negative	P
Mean (SD) age at diagnosis, years	9.9 (3.3)	12.6 (3.3)	0.03
Male gender, % (n/N)	27.3 (3/11)	66.7 (16/24)	0.03
Race/Ethnicity, % (n/N)			
Non-Hispanic white	63.6 (7/11)	41.7 (10/24)	0.58
Ketoacidosis at diagnosis, % (n/N)	36.4 (4/11)	43.5 (10/23)	
HLA DR3-DQ2/DR4/DQ8, % (n/N)	27.3 (3/11)	31.8 (7/22)	
BMI percentile	85.7 (11.0)	72.1 (20.0)	
HbA _{1c} , mmol/mol			
At diagnosis	11.7 (2.4)	12.5 (2.2)	
At 7 weeks	7.8 (1.2)	7.9 (2.2)	
At last follow-up*	8.6 (2.1)	9.0 (2.1)	
Mean (SD) C-peptide, ng/ml	64 (0.33)	0.45 (0.24)	
GAD65/AD DPD recognition	100% (11/11)	0% (0/24)	N/A
ICA512/IA-2Ab	81.8 (9/11)	66.7 (16/24)	0.36
Insulin autoantibody	27.3 (9/23)	39.1 (3/11)	0.50
ZnT8Ab	45.5 (5/11)	70.8 (17/24)	0.15
Single autoantibody	9.1 (1/11)	13.0 (3/23)	0.74

*Only participants with follow-up > 6 months (median 1.4 years, $n = 74$).

GAD65Ab, glutamic acid decarboxylase 65 autoantibody; ICA512/IA-2Ab, islet cell autoantigen 512 autoantibody; ZnT8Ab, ZnT8 autoantibody.

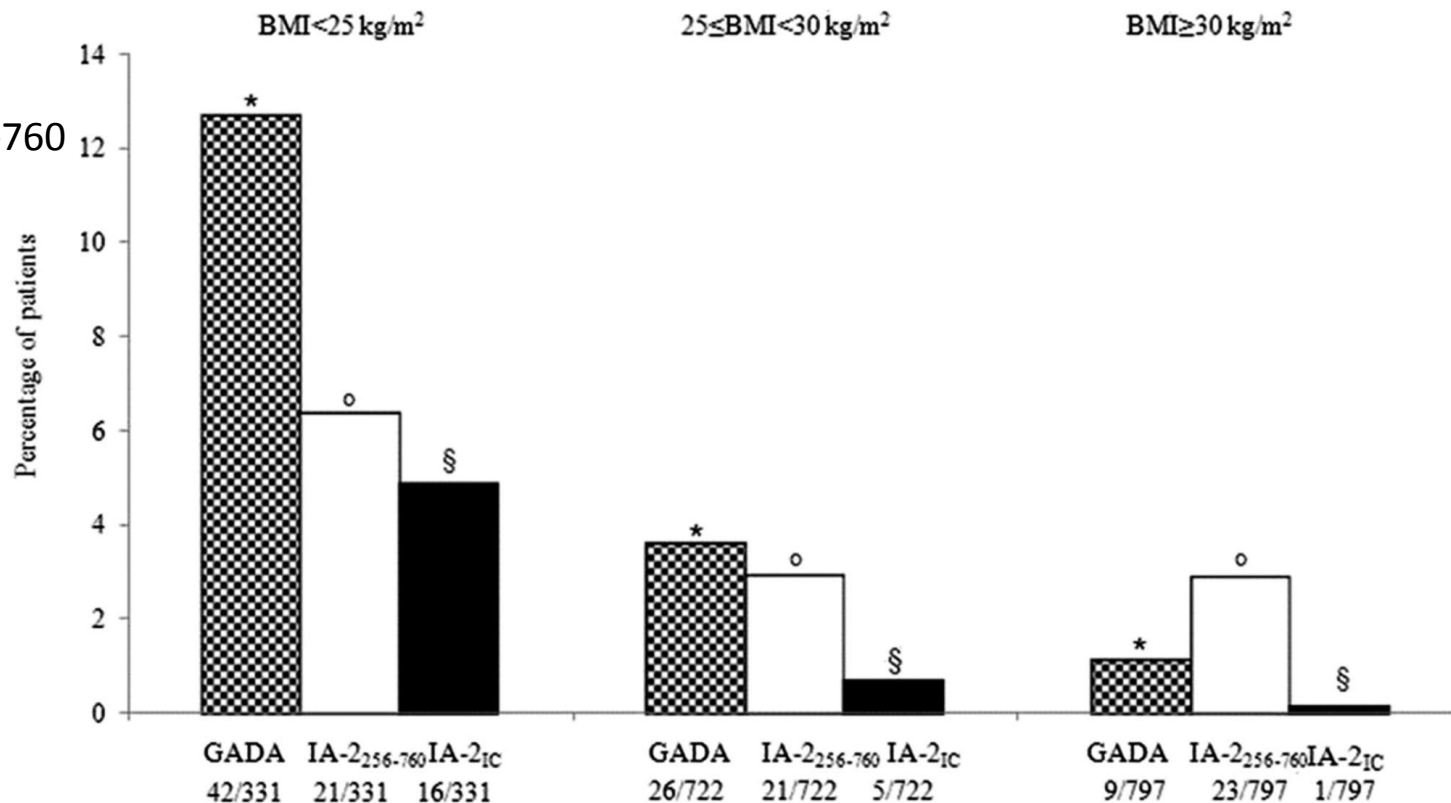


IA2 antistoffen in LADA & type-2 diabetes?

- 2 soorten IA2 antistoffen:

- IA2_{ic}

- IA2₂₅₆₋₇₆₀



*p < 0.0001 for trend

°p = 0.014 for trend

§p < 0.0001 for trend



Conclusies

- Zeer actief onderzoek naar type-1 diabetes
- Nieuwe antistoffen geïdentificeerd.
- Tetraspanin-7 (Tspan-7) antistoffen: veelbelovend
- Hogere concentratie GAD antistoffen geassocieerd met snelle progressie (ernstiger auto-immuun proces)
- Antistoffen tegen GAD-DPD geassocieerd met mildere vorm van auto-immuun diabetes in volwassenen (LADA) en kinderen
- Antistoffen tegen IA2₂₅₆₋₇₆₀ (extracellulair domein) geassocieerd met type-2 diabetes in volwassenen