

Bedeutung von Zink-Transporter-8 –Autoantikörpern in der Risikostratifizierung und Differenzierung des autoimmun vermittelten Diabetes mellitus: Ergebnisse aus der Karlsburger Typ 1 Diabetes Risiko-Studie

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2023

vorgelegt von: Baumann, Kathrin

geb. am: 09.06.1988

in: Greifswald

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie (Direktor: Prof. Dr. med. Stephan Kersting, MBA) an der Universitätsmedizin Greifswald

Dekan/in: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Stephan Kersting

2. Gutachter/in: Frau Prof. Dr. med. Barbara Ludwig

Prüfungsausschuss:

Vorsitzende: Prof. Dr. med. Sylvia Stracke

Mitglieder: Prof. Dr. med. Stephan Kersting

Prof. Dr. med. Lukas Bosaller

Ort, Raum: Universitätsmedizin Greifswald, Klinik für Innere Medizin, Raum
7.0.15/17, Fleischmannstraße 8, 17475 Greifswald

Tag der Disputation: 18.03.2024

Einleitung

Der Typ 1 Diabetes mellitus ist eine autoimmun vermittelte, multikausale chronische Erkrankung, deren eine Zerstörung der Insulin-produzierenden β -Zellen des Pankreas zugrunde liegt und bei der neben einer genetischen Prädisposition sowohl in HLA- als auch in non-HLA-Genen wie INS, PTPN22 und IL2RA auch Umwelteinflüsse bei der Krankheitsentwicklung eine zunehmende Rolle zu spielen scheinen. Dessen steigende Inzidenz mit einer entsprechend der Analyse der EURODIAB-Datenbank weltweit jährlichen Zuwachsrate von 3,4% stellt das Gesundheitssystem vor große Herausforderungen. Dabei gilt es schwerwiegende Krankheitsverläufe und damit einhergehende organische Komplikationen zu verhindern oder zumindest möglichst lange hinauszuzögern [1, 2].

Hierfür sind die Möglichkeiten der Früherkennung aufgrund der häufig fulminanten Manifestationen des Typ 1 Diabetes mellitus begrenzt. Besser ist daher eine präklinische Detektion der gefährdeten Personen, um hier gezielt einzugreifen.

In der Prädiktion spielten bisher sowohl unspezifische Autoantikörper (AAK) wie ICA als auch die bereits länger bekannten β -Zell-spezifischen Autoantikörper gegen Insulin (IAA), die Glutamat-Decarboxylase (GADA) und das Insulinoma-assoziierte Antigen-2 (IA-2A) die größte Rolle. Hier zeigte sich in der Gruppe der Proband*innen mit multiplen Autoantikörpern ein höheres Erkrankungsrisiko als in der Gruppe mit singulären Autoantikörpern. Die nun zusätzlich detektierten Autoantikörper gegen den Zink-Transporter 8 (ZnT8A) wurden in verschiedenen Studien hinsichtlich einer besseren Risikostratifizierung in den beiden Risikokollektiven und einer präziseren Einschätzung der Krankheitsdynamik untersucht [3-5].

Zink spielt bei der Regulation verschiedenster zellulärer Prozesse wie der Insulinsynthese, -speicherung und -sekretion als auch in der Kommunikation der Langerhanszellen untereinander eine wichtige Rolle. Der Zink-Transporter 8 befindet sich in der Membran der Insulin-speichernden Granula der β -Zellen des Pankreas, kommt aber auch in anderen Geweben wie den folliculären Zellen der Schilddrüse vor [6, 7]. Dieser Kationen-Efflux-Transporter aus der SLC30-Familie besteht aus acht Transmembrandomänen, sowie einer amino- und einer carboxy-terminalen Antigen-präsentierenden zytoplasmatischen Domäne. Während die NH₂-spezifischen ZnT8A derzeit keine wesentliche Rolle in der Detektion Diabetes-spezifischer AAK spielen, ist es eines Single-Nukleotid-Polymorphismus (SNP),

rs13266634) im Bereich der COOH-terminalen Domäne des kodierenden ZnT8-Gens (SLC30A8) auf Chromosom 8 geschuldet, dass entsprechend der an Stelle 325 kodierten Aminosäure (aa325) verschiedene ZnT8-Entitäten auftreten. Während durch das Wildtyp C-Allel Arginin (CGG) kodiert wird, weisen etwa 30% der europäischen Bevölkerung an dieser Stelle das Tryptophan (TGG)-kodierende T-Allel auf, wodurch es zum Austausch dieser beiden Aminosäuren und schließlich zur Synthese eines veränderten Proteins kommt, was letztendlich zur einer konsekutiven Reduktion der basalen Insulinfreisetzung führt. Während dieses SNP mit einem erhöhten Risiko für einen Typ-2-Diabetes mellitus assoziiert ist, ließ sich dies erstaunlicherweise für den autoimmun vermittelten Diabetes mellitus bisher nicht nachweisen. Bei Letzterem zeigte sich hingegen eine entsprechend der kodierten Aminosäure (aa325) endogen determinierte Autoantikörperbildung – ZnT8RA (Arginin) und ZnT8WA (Tryptophan). Während CC-Allelträger fast ausschließlich ZnT8RA und nur sehr selten auch ZnT8WA aufweisen, ist dies bei den homozygoten T-Allel-Trägern umgekehrt der Fall. Weniger als 1% der europäischen Bevölkerung weist einen anderen SNP, rs16889462, auf, welcher an dieser Stelle Glutamin (CAG) anstatt Arginin (CGG) kodiert, sodass auch ZnT8QA (Glutamin) detektiert werden können. Eine ZnT8Q-spezifische Immunantwort ist jedoch sehr selten und wird daher in den meisten Studien nicht berücksichtigt [2, 5, 8-12].

Neben einer inversen Korrelation der ZnT8A-Prävalenz mit dem Alter scheint die intrazelluläre Lokalisation des Zink-Transporters 8 mit folglich nur temporärer Antigenpräsentation während der Exozytose Ursache des Vorkommens von ZnT8A nahe der Manifestation und damit in einer bereits präklinischen Phase mit fortgeschrittener β -Zell-Destruktion zu sein. Damit zeigen die ZnT8A in der akuten Phase eine ähnliche Dynamik wie die IA-2A, um mit fortschreitender Krankheitsdauer wieder abzufallen. So überrascht es nicht, dass die ZnT8A-Prävalenzen in jüngeren Individuen mit rascher Krankheitsprogression eines klassischen Typ 1 Diabetes mellitus am höchsten und in älteren Patient*innen mit einem latenten Verlauf wie beim Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) deutlich niedriger ausfallen [4, 11, 19-22].

Bisher wurde der prädiktive Wert der ZnT8A allerdings überwiegend in Proband*innen mit erstgradiger Typ-1-Diabetes-Verwandschaft oder in bereits vorselektierten Gruppen mit entsprechenden Hochrisiko-HLA-Allelen untersucht.

Jedoch weist der Großteil der Patient*innen mit einem Typ 1 Diabetes mellitus keine positive Familienanamnese auf, sodass gerade bei steigender Inzidenz mit zunehmendem Einfluss von Umweltfaktoren auf die Krankheitsentstehung der Verifizierung der Bedeutung von ZnT8A in einem die Allgemeinbevölkerung repräsentierenden Proband*innenkollektiv eine große Bedeutung zukommt [4, 5, 13, 14].

Mit dem Ziel der verbesserten Risikoeinschätzung der Entwicklung eines autoimmun vermittelten Diabetes mellitus in dieser Bevölkerungsgruppe, haben wir den prädiktiven Wert der ZnT8A in Zusammenschau mit den bereits etablierten diabetes-spezifischen Autoantikörpern gegen Insulin, GAD65 und das Insulinoma-assoziierte Antigen-2 in Schulkindern ohne ein hereditäres Diabetes-mellitus-Risiko oder vorherige Selektion durch HLA-Genotypisierung aus der Karlsburg Typ 1 Diabetes Risiko-Studie untersucht und diese Ergebnisse mit denen in Typ 1 Diabetes-Patient*innen, LADA-Patient*innen und phänotypischen initial Autoantikörper-negativen Typ 2 Diabetes-Patient*innen verglichen.

Material und Methoden

Die Karlsburg Typ 1 Diabetes Risikostudie umfasst Seren von insgesamt 14.778 Schulkindern zwischen 6 und 17 Jahren, die in den Zeiträumen von Januar 1995 bis Juni 1996 und von Oktober 1998 und Juli 1999 in der Region Vorpommern gesammelt wurden. Um eine genetische Prädisposition auszuschließen, wurden Kinder mit einem Diabetes mellitus Typ 1 in der erstgradigen Verwandtschaft mittels Fragebogen identifiziert und entsprechend exkludiert. Schließlich wurden die Seren von 11.986 Kindern (5914 Mädchen und 6072 Jungen) auf das Vorhandensein von GADA, IA-2A und IAA mittels Radiobinding-Assays getestet, wobei ein Autoantikörpertiter oberhalb der 98. Perzentile einer Kontrollgruppe ohne multiple Autoantikörper und mit unauffälliger Familienanamnese bezüglich Diabetes mellitus und autoimmun-vermittelter Schilddrüsenerkrankungen festgelegt wurde. Die 865 Autoantikörper-positiven Kinder (7.2%), davon 69 (0.58%) mit multiplen Autoantikörpern wurden zum Follow-up eingeladen. 65% (562/865, davon 293 Mädchen) konnten hierfür erfolgreich rekrutiert und entsprechend weiteren Autoantikörper-Testungen, nun mit höherer Spezifität und geringerer Sensitivität an der 99. Perzentile der gesunden Kontrollgruppe, und einer HLA-Genotypisierung

unterzogen werden. Dadurch reduzierte sich im ersten Follow-up der Anteil der Autoantikörper-positiven Kinder auf 1.99% (155/562, davon 81 Mädchen) und die Prävalenz multipler Autoantikörper sank auf 0.46%. Letztere und diejenigen mit hochtitrigen (>99.9. Perzentile) singulären Autoantikörpern wurden jährlich, alle anderen zwei-jährlich untersucht. Den primären Endpunkt stellte die klinische Manifestation eines Typ 1 Diabetes mellitus entsprechende den WHO-Kriterien dar [15-18]

In der aktuellen Untersuchung wurden nun Seren unterschiedlicher Untersuchungszeitpunkte von insgesamt 137 Schulkindern aus der Karlsburger Typ 1 Diabetes Risiko-Studie, die für mindestens einen der im Vorfeld bereits getesteten Autoantikörper gegen GAD, IA-2 und/oder Insulin positiv waren, darunter 109 mit singulären und 28 mit multiplen Autoantikörpern, auf ZnT8A untersucht. Eine HLA-Genotypisierung lag bei 132 Kindern vor [15, 16, 18, 19].

Weiterhin wurden die Seren von 102 Typ 1 Diabetes-Patient*innen, 88 LADA-Patient*innen nach den beschriebenen Diagnosekriterien und 119 Typ 2 Diabetes-Patient*innen untersucht [12,15].

Die ZnT8A wurden mittels Immunfällung mit rekombinanten mit 35S-Methionin markierten ZnT8-Antigenen, welche via in vitro Transkription und Translation aus den carboxyterminalen Domänen der ZnT8-Isoformen (ZnT8R325, ZnT8W325, ZnT8Q) codierenden pTNT-Plasmiden hergestellt wurden, und anschließender Waschung mittels Gelchromatographie, nachgewiesen [19]. GADA und IA-2A wurden durch Flüssigphasen ¹²⁵I-Antigen-Bindungsassays und Immunausfällung mit dem rekombinanten humanen GAD65 und IA-2ic und die IAA wurden mittels Micro-Assay zur Immunausfällung von A14-¹²⁵Insulin-gebundenen Autoantikörpern nachgewiesen wie in der Literatur ausführlich beschrieben [16, 17, 20].

Die HLA-Genotypisierung wurde mit extrahierter DNA aus venösen Blutproben von 132 Kindern mittels nicht-radioaktiver Oligonukleotidhybridisierung durchgeführt [16, 18]. Dabei wurden Kinder mit mindestens einem DQ2- und/oder DQ8-Allel ohne DQ*0602-Allel als DQB1*02- und/oder 0302-positiv und Kinder mit mindestens einem DQB1*0602-Allel als DQB1*0602-positiv definiert.

Für die statistischen Analysen wurden sowohl die nicht-parametrische Spearman's-Korrelationsanalyse zum Vergleich von Autoantikörpertitern als auch der zweiseitige Chi-Square-Test bzw. Fisher's Exact-Test, wenn anwendbar, um Proportionen in verschiedenen Gruppen miteinander zu vergleichen (GRAPHPAD Prism 5.0, SPSS),

eingesetzt. Zur Berechnung und zum Vergleich der Risiken in den genannten untersuchten Gruppen mit dem Logrank-Test kam die Kaplan-Meier-Lifetable-Analyse zur Anwendung (SPSS). Die Latenzzeit bis zur Manifestation wurde ab dem Zeitpunkt der ersten Autoantikörper-positiven Blutprobe gemessen. Die Probanden ohne Krankheitsmanifestation wurden bis zum letzten Kontaktdaten verfolgt. Statistische Signifikanz wurde als zweiseitiger p-Wert <0.05 definiert [19].

Ergebnisse

AAK-positive Schulkinder

Die Prävalenz von ZnT8A betrug in der Gesamtgruppe der AAK-positiven Schulkinder 18% (24/137), wobei diese in der Subgruppe der Schulkinder mit multiplen AAK signifikant höher lag als in der Subgruppe mit singulären AAK (75% vs. 2.8%). Dabei zeigte sich eine positive Assoziation der ZnT8A-Prävalenz mit der Anzahl der anderen vorhandenen AAK.

Insgesamt entwickelten 21% (29/137) der AAK-positiven Schulkinder im Verlauf einen Typ 1 Diabetes mellitus, wobei in der Subgruppe der Kinder mit multiplen AAK eine deutlich höhere Manifestationsrate zu verzeichnen war als in der Subgruppe der Kinder mit singulären AAK (86% vs. 4.6%). Unter den Kindern, die im weiteren Verlauf manifestierten, waren insgesamt 76% (22/29) ZnT8A-positiv. Dabei war die ZnT8A-Positivität sowohl in der Gesamtgruppe der AAK-positiven Schulkinder als auch in der Subgruppe mit multiplen AAK mit einem größeren Manifestationsrisiko und weiterhin auch mit einem kürzeren krankheitsfreien Intervall assoziiert und konnte insbesondere in IA-2A-negativen Kindern diejenigen mit einem hohen Progressionsrisiko identifizieren.

Diabetes Mellitus-Patienten

Während die Prävalenz von ZnT8A in der Gruppe der Patient*innen mit einem klassischen T1D bei ca. 56% lag und auch hier ein den Schulkindern gleichendes Reaktionsmuster gegen alle drei Antigene zu sehen war, lag die Prävalenz in LADA-Patient*innen bei nur 10% und die ZnT8A-Reaktivität präsentierte sich hier mit überwiegend ZnT8RA- und ZnT8WA-spezifischen Immunantworten deutlich different. Auch in vier der 119 initial als AAK-negative T2D-Patienten (3.4%) klassifizierten Personen fanden sich ZnT8A.

Korrelation mit anderen AAK

Sowohl unter den ZnT8A-positiven Schulkindern als auch unter den T1D-Patienten war der Großteil auch GADA-positiv (96 bzw. 82%). In der Gruppe der AAK-positiven Schulkinder wies unter den ZnT8A-positiven Kindern ein größerer Anteil IAA (75%) als IA-2A (67%) auf, während dies in der Gruppe der T1D-Patienten umgekehrt war (68% IAA und 81% IA-2A).

Assoziation von ZnT8A mit HLA-Allelen

ZnT8A-Positivität zeigte eine positive Assoziation mit dem HLA-DR3- und auch mit HLA-DR4- und HLA-DQB1*02/und/oder*0302-Allel, wobei die stärkste Assoziation mit der Allelkombination HLA-DR3/DR4 im Vergleich zur Kombination HLA-DR4/X nachgewiesen wurde. Das HLA-DQB1*0602-Allel hingegen war sowohl mit der ZnT8A-Positivität als auch mit dem Nachweis multipler AAK und einer Krankheitsmanifestation negativ assoziiert.

Diskussion

Die Prädiktion des autoimmun vermittelte Diabetes mellitus als multikausale Erkrankung durch β -Zell-spezifische Autoantikörper hat aufgrund der seit den 1980er Jahren steigenden Inzidenz im Kindesalter bezüglich der Krankheitsentstehung mit künftig zu entwickelnden Interventionsmöglichkeiten einen hohen Stellenwert. Da hierbei der Anteil an betroffenen Kindern mit einem hohen genetischen Erkrankungsrisiko abnimmt, gewinnt die Erforschung von einflussnehmenden Umweltfaktoren sowie die Identifikation der gefährdeten Individuen in der Allgemeinbevölkerung zunehmend an Bedeutung [2, 13]. Dabei wurde über die Zeit eine Veränderung des Immunophänotyps in den betroffenen Individuen mit einer zunehmenden Prävalenz von IA-2A und ZnT8A bei gleichbleibender Prävalenz von IAA und GADA und damit der Trend zu einer rascheren Progression beobachtet [21]. In unserer die Allgemeinbevölkerung repräsentierenden Schulkinderkohorte ohne hereditäres Diabetes mellitus-Risiko oder vorherige Selektion nach HLA-Risiko-Allelen lag die ZnT8A-Prävalenz bei 18% und damit nahe der Prävalenz in Kohorten genetisch prädisponierter Probanden mit einer Variationsbreite von 20-43%. Die Variationsbreite und die vergleichsweise niedrige ZnT8A-Prävalenz in unserem sehr jungen Patient*innenkollektiv sind am ehesten der inversen Korrelation der ZnT8A-Prävalenz mit steigendem Alter als genetischen Ursachen zuzuordnen [4, 5, 10, 14].

Dennoch zeigt die HLA-Genotypisierung auch in dieser Kohorte eine positive Assoziation der ZnT8A-Positivität mit Hochrisikoallelen und erwartungsgemäß eine negative Korrelation mit dem protektiven HLA-DQB1*0602-Allel, was erneut die multifaktorielle Genese der Erkrankung unterstreicht [16].

Die zu den bereits etablierten Autoantikörpern ergänzende Bestimmung von ZnT8A stratifiziert das Risiko einer Krankheitsmanifestation nicht nur im Hochrisikokollektiv mit multiplen Autoantikörpern, sondern konkordant zu vorigen Studienergebnissen anscheinend auch in der Gruppe der Schulkinder mit initial niedrigem Erkrankungsrisiko bei singulären Autoantikörpern [4, 5]. Auch wenn die Probandenzahl in unserer Untersuchung zu gering war, um eine statistische Signifikanz zu erreichen, ist es dennoch erwähnenswert, dass einer der drei ZnT8A-positiven Kinder mit singulären Autoantikörpern im weiteren Verlauf einen Diabetes mellitus entwickelte und folglich mit einem hohen Manifestationsrisiko neu klassifiziert werden muss.

Sowohl das Insulinoma-assoziierte Antigen-2 als auch der Zinktransporter 8 befinden sich in der Membran der intrazellulär gelegenen Insulingranula und werden dem Immunsystem, außer bei der Exozytose, erst bei fortgeschrittener Zerstörung der β -Zellen präsentiert, sodass folglich auch die entsprechenden Antikörper erst in einer bereits späteren präklinischen Phase auftauchen und eine ähnliche Dynamik zeigen. Deren kombinierte Testung konnte in Studien mit genetisch prädisponierten Proband*innen diejenigen mit einer raschen Diabetesmanifestation kosteneffektiv identifizieren, wobei der zusätzliche ZnT8A-Nachweis insbesondere in älteren und solchen Individuen mit einem geringeren genetischen Risiko eine bessere Risikoprädiktion bot. Unsere Ergebnisse zeigen den prognostischen Wert von ZnT8A insbesondere in IA-2A-negativen Kindern, sodass eine kombinierte Testung dieser beiden Autoantikörper, wie bereits in der Belgian Diabetes Registry berichtet, auch in Kindern ohne hereditäres Risiko ein gutes Instrument darstellt, um diejenigen zu identifizieren, die zeitnah manifestieren werden [4, 14, 22, 23].

Passend zu diesen Erkenntnissen zeigten sich sowohl in der gesamten AAK-positiven Schulkinderkohorte als auch in der Subgruppe der Kinder mit multiplen AAK bei den ZnT8A-positiven Personen ein signifikant kürzeres krankheitsfreies Intervall verglichen mit den ZnT8A-negativen Individuen. Entsprechend der zu diesem Zeitpunkt bereits deutlich reduzierten β -Zellreserve zeigten Niechcial et al. ein

erhöhtes Risiko einer Ketoazidose bei ZnT8A-positiven Personen unabhängig von Geschlecht, Alter und Anzahl der nachgewiesenen Autoantikörper. Zudem konnte hier eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der Autoantikörper und der Ausprägung der Ketoazidose zum Manifestationszeitpunkt gefunden werden [24]. Die Assoziation von ZnT8A und IA-2A scheint auch im weiteren Krankheitsverlauf bestehen zu bleiben, wobei die rückläufige ZnT8A-Prävalenz post manifestationem mit sinkendem C-Peptid-Level eine abnehmende β -Zellreserve anzuzeigen scheint. [25, 26].

Hier öffnet sich ein diagnostisches Fenster zur besseren Einschätzung der Dynamik des Krankheitsverlaufs sowohl in der präklinischen Phase als auch post manifestationem. Betrachtet man nämlich die verschiedenen Patient*innengruppen, zeigen sich zudem bezüglich der Autoantikörper gegen den ZnT8 unterschiedliche Reaktionsmuster. Während in den Schulkindern mit hohem Progressionsrisiko und manifestierten T1D-Patient*innen eine vom SNP, rs13266634 unabhängige ZnT8A-Bildung dominiert, ist diese bei den erwachsenen LADA-Patient*innen mit verzögertem Insulinbedarf bei milderem Krankheitsverlauf mit einer ZnT8WA-dominierten Antwort deutlich different, was die Vermutung einer unterschiedlichen Krankheitsgenese nahelegt. Auch die deutlich niedrigere ZnT8A-Prävalenz von 10% in LADA-Patienten im Vergleich zu 56% der klassischen T1D-Patient*innen unterstützt diese Theorie. Dabei erschweren jedoch die uneinheitlichen diagnostischen Kriterien für einen LADA die präzise Einordnung der Patient*innen. LADA-Patient*innen werden häufig als T2D-Patient*innen missklassifiziert, da der zugrunde liegende autoimmune Prozess, der jedoch für die Therapieentscheidungen und entsprechende Prognose eine entscheidende Bedeutung hat, nicht erkannt wird. Auch in unserer T2D-Kohorte kann die Erkrankung bei vier der 119 initial AAK-negativen Patient*innen durch die zusätzliche Testung von ZnT8A nun als autoimmun-vermittelter Diabetes mellitus diagnostiziert werden, wovon ein Proband aufgrund des umgehenden Insulinbedarfs nach Diagnosestellung als T1D-Patient, die anderen drei jedoch basierend auf den diagnostischen Kriterien als LADA-Patient*innen identifiziert werden können. Die ZnT8A-Prävalenz lag in den phänotypischen T2D-Patient*innen mit 3,4% nahe den Ergebnissen anderer Untersuchungen.

Die Bestimmung von ZnT8A kann dementsprechend bei der Differenzierung des Diabetes-mellitus-Typs insbesondere im Erwachsenenalter helfen, wodurch eine präzisere Therapie eingeleitet und schwerwiegende Komplikationen verhindert werden können [25, 27].

Weiterhin scheinen die Titer der nachweisbaren Autoantikörper und auch deren Fluktuationen eine Auswirkung auf das phänotypische Erscheinungsbild des LADA zu haben [28].

Lediglich ein T1D-Patient wies eine ZnT8Q-spezifische Autoantikörperbildung auf, war jedoch im Vorfeld bereits durch GADA identifiziert worden, sodass die zusätzliche ZnT8QA-Testung hier keinen zusätzlichen Nutzen brachte. Der in der europäischen Bevölkerung ohnehin sehr seltene SNP, rs16889462 scheint anders als der SNP, rs13266634 keine Bedeutung in der Generierung der β -Zell-spezifischen Immunantwort und damit der Krankheitsgenese zu haben [2, 5, 9, 10]. Da Personen mit Autoimmunerkrankungen häufig nicht nur ein betroffenes Organ haben, sondern vielmehr multiple autoimmune Prozesse parallel ablaufen, wurden vor dem Hintergrund der häufigen Assoziation von autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen und autoimmun-vermitteltem Diabetes mellitus im Rahmen des Autoimmunen Polyendokrinen Syndroms (APS) Typ II bereits Untersuchungen der humoralen Situation durchgeführt. Dabei wurden erwartungsgemäß β -Zell-spezifische Autoantikörper in Patient*innen mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen gefunden, wenn auch die Prävalenz für ZnT8A, GADA und IA-2A geringer war als in jenen Individuen, bei denen neben der Hashimoto-Thyreoiditis oder einem Morbus Basedow auch einen Typ 1 Diabetes mellitus diagnostiziert wurde, lag diese dennoch statistisch signifikant über derer der gesunden Kontrollgruppe. Bei diskrepanten Ergebnissen bezüglich der Prävalenzen, sind GADA und ZnT8A hier insbesondere in Anbetracht der erwachsenen Patient*innen und der ubiquitären Bedeutung von Zink bei zahlreichen biochemischen Prozessen erwartungsgemäß die vorherrschenden Autoantikörper. So ist es denkbar, dass ein Screening auf die β -Zell-spezifischen Autoantikörper neben der Anwendung in der breiten Allgemeinbevölkerung auch bei Personen mit anderen Autoimmunerkrankungen im Rahmen eines gezielten Screening-Programms auch im Erwachsenenalter, jene prädisponierte Personen identifizieren können, die zu einem späteren Zeitpunkt manifestieren, um diese im Follow-up entsprechend

engmaschig überwachen zu können [7].

Literatur

- [1] Regnell SEL, Ake. Early Prediction of autoimmune (type 1) diabetes. *Diabetologia* 2017;60:1370-81.
- [2] Williams Claire L. LAE. What has zinc transporter 8 autoimmunity taught us about type 1 diabetes? *Diabetologia* 2019;62:1969-76.
- [3] Zhang L and Eisenbarth GS. Prediction and prevention of Type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes* 2011;3:48-57.
- [4] Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, 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;104:17040-5.
- [5] Achenbach P, Lampasona V, Landherr U, Koczwara K, Krause S, Grallert H, et al. Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLC30A8 genotype stratify type 1 diabetes risk. *Diabetologia* 2009;52:1881-8.
- [6] Chimienti F, Favier A, and Seve M. ZnT-8, a pancreatic beta-cell-specific zinc transporter. *Biometals* 2005;18:313-7.
- [7] Cai Y. Autoimmune thyroid disease correlates to islet autoimmunity on zinc transporter 8 autoantibody. *Endocr Connect* 2021:534-42.
- [8] Brorsson C, Bergholdt R, Sjogren M, Eising S, Sorensen KM, Hougaard DM, et al. A non-synonymous variant in SLC30A8 is not associated with type 1 diabetes in the Danish population. *Mol Genet Metab* 2008;94:386-8.
- [9] Wenzlau JM, Frisch LM, Gardner TJ, Sarkar S, Hutton JC, and Davidson HW. Novel antigens in type 1 diabetes: the importance of ZnT8. *Curr Diab Rep* 2009;9:105-12.
- [10] Wenzlau JM, Liu Y, Yu L, Moua O, Fowler KT, Rangasamy S, et al. A common nonsynonymous single nucleotide polymorphism in the SLC30A8 gene determines ZnT8 autoantibody specificity in type 1 diabetes. *Diabetes* 2008;57:2693-7.
- [11] Cauchi S, Proenca C, Choquet H, Gaget S, De Graeve F, Marre M, et al. Analysis of novel risk loci for type 2 diabetes in a general French population: the D.E.S.I.R. study. *J Mol Med (Berl)* 2008;86:341-8.
- [12] Xiang J, Li XY, Xu M, Hong J, Huang Y, Tan JR, et al. Zinc transporter-8 gene (SLC30A8) is associated with type 2 diabetes in Chinese. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4107-12.

- [13] Gillespie KM. The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of high-risk HLA haplotypes LANCET 2004;Nov 6-12;364(9446):1699-700.
- [14] De Grijse J, Asanghanwa M, Nouthe B, Albrecher N, Goubert P, Vermeulen I, et al. Predictive power of screening for antibodies against insulinoma-associated protein 2 beta (IA-2beta) and zinc transporter-8 to select first-degree relatives of type 1 diabetic patients with risk of rapid progression to clinical onset of the disease: implications for prevention trials. Diabetologia 2010;53:517-24.
- [15] Schlosser M, Strebelow M, Rjasanowski I, Kerner W, Wassmuth R, and Ziegler M. Prevalence of diabetes-associated autoantibodies in schoolchildren: the Karlsburg Type 1 Diabetes Risk Study. Ann N Y Acad Sci 2004;1037:114-7.
- [16] Schlosser M, Strebelow M, Wassmuth R, Arnold ML, Breunig I, Rjasanowski I, et al. The Karlsburg type 1 diabetes risk study of a normal schoolchild population: association of beta-cell autoantibodies and human leukocyte antigen-DQB1 alleles in antibody-positive individuals. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:2254-61.
- [17] Strebelow M, Schlosser M, Ziegler B, Rjasanowski I, and 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;42:661-70.
- [18] Till AM, Kenk H, Rjasanowski I, Wassmuth R, Walschus U, Kerner W, et al. Autoantibody-defined risk for Type 1 diabetes mellitus in a general population of schoolchildren: results of the Karlsburg Type 1 Diabetes Risk Study after 18 years. Diabet Med 2014.
- [19] Baumann K, Kesselring, K, Schlosser, M. Autoantibodies against zinc transporter 8 further stratify the autoantibody-defined risk for type 1 diabetes in a general population of schoolchildren and have distinctive isoform binding patterns in different forms of autoimmune diabetes: results from the Karlsburg Type 1 Diabetes Risk Study. Diabet Med 2020;38.
- [20] Williams AJ, Bingley PJ, Bonifacio E, Palmer JP, and Gale EA. A novel micro-assay for insulin autoantibodies. J Autoimmun 1997;10:473-8.
- [21] Long AE, Gillespie KM, Rokni S, Bingley PJ, and Williams AJ. Rising incidence of type 1 diabetes is associated with altered immunophenotype at diagnosis. Diabetes 2012;61:683-6.

- [22] Salonen KM, Ryhanen S, Harkonen T, Ilonen J, and Knip M. Autoantibodies against zinc transporter 8 are related to age, metabolic state and HLA DR genotype in children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2013.
- [23] Long AE, Gooneratne AT, Rokni S, Williams AJ, and Bingley PJ. The role of autoantibodies to zinc transporter 8 in prediction of type 1 diabetes in relatives: lessons from the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT) cohort. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:632-7.
- [24] Niechcial E. Autoantibodies against zinc transporter 8 are related to age and metabolic state in patients with newly diagnosed autoimmune diabetes. *Acta Diabetologica* 2017;55:287-94.
- [25] Kawasaki E. Zinc transporter 8 autoantibodies complement glutamic acid decarboxylase and insulinoma-associated antigen-2 autoantibodies in the identification and characterization of Japanese type 1 diabetes *J Diabetes Investig* 2020 Sep;11(5):1181-1187.
- [26] Wenzlau JM, Walter M, Gardner TJ, Frisch LM, Yu L, Eisenbarth GS, et al. Kinetics of the post-onset decline in zinc transporter 8 autoantibodies in type 1 diabetic human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4712-9.
- [27] Lampasona V, Petrone A, Tiberti C, Capizzi M, Spoletini M, di Pietro S, et al. Zinc transporter 8 antibodies complement GAD and IA-2 antibodies in the identification and characterization of adult-onset autoimmune diabetes: Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) 4. *Diabetes Care* 2010;33:104-8.
- [28] Sorgjerd. Type 1 Diabetes-related Autoantibodies in Different Forms of Diabetes *Current diabetes reviews* 2019;15:199-204.

Zusammenfassung

- Zink-Transporter 8-Autoantikörper sind auch in Kindern ohne hereditäres Diabetes-Risiko in der Lage, das Erkrankungsrisiko zu stratifizieren, was auf eine ähnliche Pathophysiologie hinweist, und insbesondere in anderweitig als niedrig-risikobehaftet eingestuft und in IA-2A-negativen Individuen diejenigen identifiziert, die manifestieren werden.
- ZnT8A sind zudem hilfreich in der Identifizierung eines autoimmun-vermittelten Diabetes mellitus im Erwachsenenalter, insbesondere bei phänotypisch als T2D eingestuft Patient*innen, sodass eine entsprechende Therapie und damit die Prognose sowie das Langzeit-Outcome in diesem Patientenkollektiv positiv beeinflusst werden kann.
- Das entsprechend des SNP im kodierenden SLC30A8-Gen getriggerte Reaktionsmuster ist in T1D-Patient*innen und hoch-risikobehafteten Kindern mit überwiegend davon unabhängiger Autoantikörperantwort gegenüber der ZnT8WA-dominierenden Antwort in LADA-Patient*innen deutlich different, was die Hypothese unterschiedlicher Pathomechanismen dieser beiden Diabetesformen unterstützt.
- Die zusätzliche Testung von ZnT8QA trägt nicht zu einer zusätzlichen Risikostratifizierung bei, sodass ein kombiniertes ZnT8A-Screening mit einem ZnT8-Arg325-Trp325-Hybridkonstrukt eine deutliche Zeit- und Kostenersparnis ohne Sensitivitätsverlust darstellt.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt in memoriam Herrn PD Dr. rer. nat. Michael Schlosser für die jahrelange hingebungsvolle Begleitung und Unterstützung. Zudem danke ich Kirsten Kesselring, die mich weit über die Laborgrenzen hinaus unterstützt hat, sowie meiner Familie, die mich immer wieder angetrieben hat.

Wir danken Kindern und Ärzten, die an der Studie mitgewirkt und unterstützt haben, Angelika Kell und Heidrun Kenk für ihre exzellente technische Assistenz und Janik Riese und Christopher Pohl für die Unterstützung bei den statistischen Analysen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

DR MICHAEL SCHLOSSER (Orcid ID : 0000-0001-8173-6578)

Article type : Research Article

Title: Diabetic Medicine

Created by: Maria Davie

Email proofs to: schlosse@uni-greifswald.de

Article no.: DME-2020-00031

Article type: Research Article

Figures:5; Tables:3; Equations:0; References: 30

Short title/*Authors running head*: ZnT8 autoantibodies for prediction and differentiation of autoimmune diabetes • K. Baumann *et al.*

Research:

Autoantibodies against zinc transporter 8 further stratify the autoantibody-defined risk for type 1 diabetes in a general population of schoolchildren and have distinctive isoform binding patterns in different forms of autoimmune diabetes: results from the Karlsburg Type 1 Diabetes Risk Study

K. Baumann^{1*}, K. Kesselring¹, V. Lampasona⁴, U. Walschus¹, W. Kerner², R. Wassmuth³ and M. Schlosser¹

¹Department of General Surgery, Visceral, Thoracic and Vascular Surgery, University Medical Centre Greifswald, Greifswald, ²Centre of Diabetes and Metabolic Disorders, Karlsburg, ³Department of Quality

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the [Version of Record](#). Please cite this article as [doi: 10.1111/DME.14389](https://doi.org/10.1111/DME.14389)

This article is protected by copyright. All rights reserved

Management, University Medical Center Duesseldorf, Duesseldorf, Germany, and ⁴San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy

**Current affiliation: Albertinen-Hospital, Department of Gynaecology and Obstetrics, Hamburg, Germany*

†Current affiliation: CHEPLAPHARM Arzneimittel GmbH, Greifswald, Germany

Correspondence to: Michael Schlosser. E-mail: schlosse@uni-greifswald.de

What's new?

- The Karlsburg Type 1 Diabetes Risk Study was based on combined analysis of glutamic acid decarboxylase autoantibodies, insulinoma-associated antigen-2 (IA-2) autoantibodies and insulin autoantibodies in approximately 12 000 schoolchildren. As zinc transporter 8 (ZnT8) autoantibodies have subsequently been described, autoantibody-positive schoolchildren from the study were analysed with regard to ZnT8 autoantibody isoforms and compared with people with type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults.
- In IA-2 antibody-positive and, importantly, in seven IA-2 antibody-negative schoolchildren, ZnT8 autoantibodies further stratified the diabetes risk and identified those with disease progression.
- Zinc transporter 8 autoantibodies in schoolchildren and people with type 1 diabetes were predominantly directed against all three ZnT8 variants, whereas in latent autoimmune diabetes in adults the reactivity was restricted to ZnT8W. This possibly supports the hypothesis that the immunological genesis of these two autoimmune diabetes forms might be different.

Abstract

Aims To evaluate the diagnostic relevance of autoantibodies against zinc transporter 8 (ZnT8) in schoolchildren from the general population as well as in people with autoimmune diabetes.

Methods A total of 137 schoolchildren positive for at least one of the three major diabetes-associated autoantibodies, without diabetes heredity or preselection on HLA typing, from the Karlsburg Type 1 Diabetes Risk Study, as well as 102 people at type 1 diabetes onset, 88 people with latent autoimmune diabetes in adults and 119 people with type 2 diabetes, were analysed for different ZnT8 autoantibody variants.

Results Zinc transporter 8 autoantibody positivity was found in 18% of autoantibody-positive schoolchildren, with a noticeable association with other autoantibodies associated with type 1 diabetes and disease progression. Furthermore, ZnT8 autoantibody positivity was associated with diabetes progression in schoolchildren positive for autoantibodies against insulinoma-associated antigen-2 (IA-2) and, importantly, in seven IA-2 autoantibody-negative schoolchildren. Additionally, ZnT8

autoantibodies were found in 56% of people with type 1 diabetes, predominantly directed against all three ZnT8 variants and comparable to schoolchildren with multiple autoantibodies. In contrast, ZnT8 autoantibodies were detected in 10% of people with latent autoimmune diabetes in adults, none of them with reactivity to all three isoforms.

Conclusion Zinc transporter 8 autoantibodies are useful markers for prediction of type 1 diabetes in a general population, further stratifying the risk of progression in autoantibody-positive children. ZnT8 autoantibodies are also important markers in adult-onset diabetes, with a completely different reaction pattern in type 1 diabetes in comparison to latent autoimmune diabetes in adults, and may therefore help to differentiate between the two forms.

Introduction

Islet-cell-specific autoantibodies have a high predictive and diagnostic value in human autoimmune diabetes [1]. Major type 1 diabetes-associated autoantibodies include those against insulin, the 65kD isoform of glutamic acid decarboxylase (GAD), insulinoma-associated antigen-2 (IA-2) and zinc transporter 8 (ZnT8), a more recently discovered autoantigen [1,2].

One of the epitopes in the COOH-terminal domain of the ZnT8 molecule is affected by single nucleotide polymorphisms (SNPs; rs13266634) in the ZnT8 gene (SLC30A8) defined by an arginine (R325), a tryptophan (W325) or glutamine (Q325) at amino acid residue 325. Correspondingly, different ZnT8 autoantibodies were identified whose binding is restricted by arginine (ZnT8R autoantibodies) or tryptophan (ZnT8W autoantibodies) at amino acid 325, as well as others unaffected by either of these two amino acids (ZnT8Q autoantibodies) [3,4]. While SNP rs13266634 was previously linked to type 2 diabetes no such association with type 1 diabetes was found [3,5]. However, the development of ZnT8RA and ZnT8WA restricted autoantibodies is genetically determined by the SLC30A8 genotype.

ZnT8 autoantibodies are detectable not only in people at type 1 diabetes onset, including some who would otherwise be deemed negative for the three established autoantibodies GAD, IA-2 and insulin autoantibodies [2,6], but also in at-risk people as observed in several studies [1,7,8]. ZnT8 autoantibodies might therefore play an important role in prediction of type 1 diabetes. So far, their predictive value has been examined mainly in first-degree relatives of people with type 1 diabetes and children carrying risk HLA alleles [1,2,5,9]. Considering the rising type 1 diabetes incidence and the fact that 90% of people with type 1 diabetes have no first-degree relatives with diabetes and that HLA-based preselection excludes a substantial portion of individuals with prediabetes, the development of strategies for risk assessment and intervention trials in the general population become increasingly important [1,8,10]. With the aim of improving risk assessment of type 1 diabetes in the general population, we therefore evaluated the

predictive usefulness of ZnT8 autoantibodies and the major diabetes-associated autoantibodies (GAD, IA-2 and insulin autoantibodies) in schoolchildren without diabetes heredity or preselection by HLA genotypes from the Karlsburg Type 1 Diabetes Risk Study. For comparison, ZnT8 autoantibodies were also measured in people with type 1 diabetes, latent autoimmune diabetes in adults (LADA), and type 2 diabetes.

Methods

Study participants

Schoolchildren from the general population without diabetes heredity

Zinc transporter 8 autoantibodies were analysed in 137 schoolchildren from the Karlsburg Type 1 Diabetes Risk Study {median [interquartile range (IQR)] age 12 [9.4–14.3] years; 72 girls} who were positive for at least one of the established autoantibodies against GAD, IA-2 and/or insulin. Details of the Karlsburg Type 1 Diabetes Risk Study were described previously [8,11,12]. Briefly, a total of 11 986 schoolchildren (5914 girls) were analysed for GAD, IA-2 and insulin autoantibodies. Schoolchildren positive for two or more of these autoantibodies, defined as ‘multiple’ autoantibody-positive hereafter, or with high-titre single autoantibodies were re-examined annually, while all other ‘single’ autoantibody-positive participants were followed-up bi-annually [8]. The endpoint was type 1 diabetes manifestation according to the WHO criteria [13]. Of the schoolchildren, 109 had single autoantibodies, with a lower risk of subsequent disease progression, while 28 had multiple autoantibodies and were classified as high-risk probands. HLA genotyping was performed in 132 autoantibody-positive schoolchildren.

Individuals with diabetes

Three groups of people with different diabetes forms were also examined. The first group comprised 102 people at type 1 diabetes onset [median (IQR) age 12.8 (7.7–19.7) years; 53 female]. Diagnosis was based on the American Diabetes Association criteria [13]. Blood samples were taken within 45 days after starting insulin treatment (median latency 1 day) in the Centre of Diabetes and Metabolic Disorders, Karlsburg, Germany. The second group comprised 88 people [median (IQR) age 59.5 (47.6–66.5) years; 38 female] with LADA, according to the diagnostic criteria [14–16] with GAD and/or IA-2 antibody positivity and an onset age of ≥ 30 years [median (IQR) onset age (41.0–59.6) years] and lack of insulin requirement for at least 6 months [median (IQR) insulin latency 5 (2.0–9.2) years] after diagnosis. The third group comprised 119 people with type 2 diabetes [median (IQR) age 66.3 (54.4–75.5) years; 57 female] with a median (IQR) onset age of 48.6 (41.1–63.4) years and a median (IQR) disease duration of 10.9 (5.4–17.6) years and negativity for GAD and IA-2 autoantibodies.

Autoantibody assays

Zinc transporter 8 autoantibody assay

Zinc transporter 8 autoantibodies were measured by immunoprecipitation of radiolabelled recombinant ZnT8 antigens as described previously using pTNT™ plasmids (prepared at the Diabetes Research Institute, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy) which encoded the carboxy-terminal domains (aa268-369) of the three ZnT8-COOH isoforms (ZnT8R325, ZnT8W325, ZnT8Q325) [15]. ZnT8-COOH proteins were produced by *in vitro* transcription/translation (TNT^R SP6 Quick Coupled Transcription/Translation System; Promega GmbH, Konstanz, Germany), labelled with ³⁵S-Methionin (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) and purified by gel chromatography (Nap™-5-Columns; GE Healthcare GmbH, Solingen, Germany). Radioactivity was measured in a Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter (Perkin Elmer, Rodgau, Germany).

Immunoprecipitation was conducted in 96-deep-well plates (HJ-Bioanalytik GmbH, Erkelenz, Germany) for each serum sample, with serial dilutions of a standard ZnT8 autoantibody-positive sample from a person with type 1 diabetes. Then, 25 µl of the labelled ZnT8-COOH isoforms (20 000 cpm) per well were added to 5 µl serum and incubated overnight at 4°C. After 20 h, antibody-bound ³⁵S-ZnT8-COOH proteins were immunoprecipitated by incubation with standardized Pansorbin cells (Calbiochem, Affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 60 min at 4°C while shaking. After five washes with TBST and centrifugation for 10 min at 2500 rpm (GS-6R Centrifuge, Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) the immunoprecipitates were transferred into OptiPlates-96 (OptiPlate™, Perkin Elmer), washed and centrifuged once more after addition of 200 µl Microscint™ 40 scintillation fluid (Perkin Elmer). Radioactivity was measured in a TopCount NXT beta-Counter (Packard, Meriden, CT, USA). The threshold for ZnT8 autoantibody positivity was set at or above the 99th percentile, measured in 100 sera from healthy blood donors and 97 autoantibody-negative schoolchildren.

Glutamic acid decarboxylase, IA-2 and insulin autoantibody assays

Glutamic acid decarboxylase and IA-2 antibodies were determined by fluid-phase ¹²⁵I-antigen binding assays and immunoprecipitation using human recombinant GAD65 (Diamyd Diagnostics AB, Stockholm, Schweden) and IA-2ic (BRAHMS Diagnostica GmbH, Berlin, Deutschland), respectively, as described recently [12,17]. The GAD autoantibody assay achieved a diagnostic sensitivity of 82% and specificity of 96% [area under the receiver-operating characteristic curve (AUC) = 0.95], and the IA-2 antibody assay a diagnostic sensitivity of 66% and specificity of 100% (AUC = 0.867) in the Diabetes Antibody Standardization Programme [18].

Insulin autoantibodies were determined by micro-assay, with a protein A/G mixture for immunoprecipitation of A14-¹²⁵I-insulin-bound autoantibodies [12,19]. In the Diabetes Antibody

Standardization Programme proficiency test, the insulin autoantibody micro-assay achieved a sensitivity of 58% and a specificity of 97% (AUC = 0.85) [20].

HLA genotyping

For 132 autoantibody-positive children, DNA was extracted from venous blood samples with a salting-out technique, and HLA-DQB1 and HLA-DRB1 genotyping was performed by non-radioactive oligonucleotide hybridization of PCR-amplified DNA, as previously described [8,12]. Children carrying at least one DQ2 and/or DQ8 allele, but no DQ*0602 allele, were classified as DQB1*02 and/or 0302-positive, whereas children with at least one DQB1*0602 allele were classified as DQB1*0602-positive.

Statistical analysis

Correlation between the levels of different ZnT8 autoantibody isoforms as well as between ZnT8 autoantibody isoforms and GAD, insulin or IA-2 autoantibodies was examined by non-parametric Spearman's correlation analysis using GRAPHPAD PRISM 5.0 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). The two-sided chi-squared test or Fisher's exact test, if applicable, was used to compare proportions between groups by GRAPHPAD PRISM 5.0 and SPSS 15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Kaplan–Meier lifetable analysis was used to calculate and compare risks for different groups with log-rank test for significance testing and hazard ratio (HR) determination by unadjusted Cox regression with 95% CIs using SPSS. Additionally, fitting of the Cox regression, adjusted for key risk factors age, gender, HLA genotype and autoantibody positivity for each of GAD, insulin and IA-2, was performed with SPSS. Time to event in participants with progression was defined as time between dates of autoantibody-positive sample and clinical manifestation. Participants without diabetes onset were censored at date of last contact. Statistical significance was defined as a two-tailed *P* value <0.05.

Ethics

The study protocol was authorized by the Ministry of Culture and Education of the state government of Mecklenburg-Vorpommern and approved by the ethics committee of the Ernst-Moritz-Arndt-University of Greifswald, Germany. Informed consent was obtained from parents or legal guardians of the schoolchildren [8,12].

Results

Prevalence of ZnT8 autoantibodies in schoolchildren and their relevance for diabetes progression

The overall prevalence of ZnT8 autoantibodies in autoantibody-positive schoolchildren was 18% (24/137). ZnT8R autoantibodies were most prevalent (15%), followed by ZnT8W and ZnT8Q autoantibodies, each

with a prevalence of 12%, whereas no child had ZnT8Q autoantibodies only (Fig. 1a). Among all ZnT8 autoantibody-positive schoolchildren, 46% (11/24) had ZnT8 autoantibodies against all three isoforms (Fig. 1a), 10 with multiple autoantibodies and later progression to diabetes (Fig. 1b) and only one girl with single GAD autoantibodies and no progression (Fig. 1c). All four children with ZnT8R autoantibodies only and two children with ZnT8W autoantibodies only also had multiple autoantibodies and further progressed to the disease. Figure S1a shows the levels of autoantibodies against the ZnT8 isoforms in autoantibody-positive schoolchildren.

The number of ZnT8 autoantibody-positive individuals was significantly higher (chi-square = 80.48; $P < 0.001$) in schoolchildren with multiple autoantibodies (21/28; 75%) than in single autoantibody-positive children (3/109; 2.8%). Furthermore, ZnT8 autoantibody positivity was associated with the number of autoantibodies [3/109 (2.8% of those with single, 8/14 (57%) of those with double, and 13/14 (93%) of those with triple autoantibody positivity; chi-square = 86.65, $P < 0.0001$). ZnT8 autoantibody prevalence was significantly higher in IA-2 antibody-positive vs IA-2 antibody-negative schoolchildren (chi-square = 55.29, $P < 0.001$) as well as GAD autoantibody-positive vs GAD autoantibody-negative (chi-square = 9.21, $P = 0.0013$) and insulin autoantibody-positive vs insulin autoantibody-negative schoolchildren (chi-square = 10.39, $P = 0.0015$). Regarding the four different autoantibody specificities including ZnT8 autoantibodies, 48% had single GAD autoantibodies, 28% single insulin autoantibodies, 1.5% single IA-2 autoantibodies, and 23% multiple autoantibodies. Among multiple autoantibody-positive schoolchildren, 42% (13/31) were positive for all four autoantibodies (Fig. 2).

Overall, 21% (29/137) of autoantibody-positive schoolchildren developed type 1 diabetes, with a median (IQR) age at onset of 15.9 (13.7–19.7) years. Of those, 76% (22/29) were ZnT8 autoantibody-positive. The proportion of those with disease progression was significantly higher in multiple autoantibody-positive vs single autoantibody-positive schoolchildren (86 vs 4.6%; chi-square = 87.86, $P < 0.001$).

Zinc transporter 8 autoantibody positivity was significantly associated with disease progression as 92% (22/24) of ZnT8 autoantibody-positive and only 6.2% (7/113) of ZnT8 autoantibody-negative children developed diabetes (chi-square = 86.66, $P < 0.001$). Among schoolchildren with multiple autoantibodies, a progression rate of 100% (21/21) in ZnT8 autoantibody-positive compared with only 43% (3/7) of the ZnT8 autoantibody-negative individuals was observed (chi-square = 14.0, $P < 0.001$; Table 1). Only five schoolchildren with a single autoantibody developed diabetes, but one of them was additionally ZnT8 autoantibody-positive [33 vs 3.8%; $P = 0.0158$ (Table 1)].

The diabetes-free survival curves of ZnT8 autoantibody-positive and ZnT8 autoantibody-negative schoolchildren demonstrate a significantly shorter diabetes-free survival time in ZnT8 autoantibody-positive individuals [chi-square = 64.22, $P < 0.001$, HR 34.64, 95% CI 12.75–94.06 (Fig. 3)]. Additionally, after adjusting ZnT8 autoantibody-positive and ZnT8-negative schoolchildren for all other risk markers, GAD, insulin and IA-2 autoantibodies, HLA-DR, HLA-DQ, age and gender, the diabetes-free survival time

was significant shorter in ZnT8-positive people (chi-square = 82.01, $P = 0.001$, HR 8.66, 95% CI 2.31–32.52). Data for Cox regression analysis adjusted for individual risk markers were comparable to the unadjusted analysis and are presented in Table S1. In the subgroup with multiple autoantibodies, a significant difference in the diabetes-free survival between ZnT8 autoantibody-positive and ZnT8 autoantibody-negative schoolchildren was obtained (chi-square = 4.351, $P=0.037$, HR 3.04, 95% CI 1.02–9.05; data not shown).

Zinc transporter 8 autoantibody positivity contributed to risk stratification in IA-2 autoantibody-positive schoolchildren [chi-square = 3.91, $P = 0.048$, HR 4.05, 95% CI 0.91–17.98 (Fig. 4a)] and, importantly, identified those with disease progression in seven IA-2 autoantibody-negative schoolchildren [chi-square = 46.46, $P<0.001$, HR 21.49, 95% CI 6.09–75.81 (Fig 4b)]. In contrast, this was not obtained for GAD and insulin autoantibody positivity or negativity (data not shown).

Prevalence and levels of ZnT8 autoantibodies in people with different diabetes forms

Among people with type 1 diabetes, 56% (57/102) had ZnT8 autoantibodies, with the majority (47%, 27/57) directed against all three ZnT8 variants, while only one person with type 1 diabetes tested positive for ZnT8Q autoantibodies only (Fig. 5a). Additionally, ZnT8 autoantibody frequencies did not differ between people with age at type 1 diabetes onset ≤ 20 years ($n = 76$) or >20 years ($n = 25$), with 57% vs 52% ($P=0.8172$), respectively. In people with type 1 diabetes, 91/102 (89%) were positive for at least one autoantibody. No one with type 1 diabetes had single ZnT8 autoantibodies, but nine people with type 1 diabetes who were initially single autoantibody-positive became multiple autoantibody-positive by additional testing for ZnT8 autoantibodies. In this group, 27/91 (30%) had autoantibodies against all four antigens (Fig. S2), which is comparable to the 42% (13/31) found in schoolchildren. Figure S1b shows the levels of autoantibodies against the ZnT8 isoforms in people with type 1 diabetes.

The ZnT8 autoantibody prevalence in people with LADA was 10% (9/88). In contrast to people with type 1 diabetes and schoolchildren, none of the people with LADA had reactivity to all three isoforms. ZnT8W-autoantibody-only ($n = 2$) and ZnT8R-autoantibody-only ($n = 2$) -restricted immune reactions were seen, with ZnT8W autoantibodies ($n = 7$) the most common isoform (8.0%), followed by ZnT8Q (5.7%) and ZnT8R autoantibodies (2.3%; Fig. 5b). Figure S1c shows the levels of autoantibodies against the ZnT8 isoforms in people with LADA.

Four of the 119 people with type 2 diabetes (3.4%) were ZnT8 autoantibody-positive, all of them restricted to ZnT8R autoantibodies only.

Association between ZnT8 autoantibody isoforms and with other autoantibodies

In autoantibody-positive schoolchildren, levels of ZnT8R and ZnT8Q autoantibodies ($r_s = 0.427$, $P = 0.0375$) as well as ZnT8W and ZnT8Q autoantibodies ($r_s = 0.697$, $P < 0.001$) were significantly correlated

(Table 2, Fig. S3b,c). This was also observed in people with type 1 diabetes for levels of ZnT8R and ZnT8Q autoantibodies ($r_s = 0.632$, $P < 0.001$) as well as ZnT8W and ZnT8Q autoantibodies ($r_s = 0.645$, $P < 0.001$; Table 2).

Among the 24 ZnT8 autoantibody-positive schoolchildren, 23 (96%) were also GAD autoantibody-positive, 18 (75%) were also insulin autoantibody-positive and 16 (67%) were also IA-2 antibody-positive. For the 57 ZnT8 autoantibody-positive people with type 1 diabetes, 47 (82%) were also GAD autoantibody-positive, 39 (68%) were also insulin autoantibody-positive and 46 (81%) were also IA-2 antibody-positive. However, levels of all three ZnT8 autoantibody isoforms were not correlated with levels of GAD, insulin or IA-2 autoantibodies (data not shown).

Association of ZnT8 autoantibodies with HLA alleles in schoolchildren

Zinc transporter 8 autoantibody positivity was essentially positively associated with the HLA-DR3 allele (64% vs 14%; chi-square = 16.67, $P < 0.001$), but also the HLA-DR4 allele (28% vs 11%; chi-square = 6.097, $P = 0.0204$) and the HLA-DQB1*02 and/or *0302 allele (26% vs 6%; chi-square = 8.452, $P = 0.0046$) as well as negatively associated with the DQB1*0602 allele [0% vs 21%; chi-square = 5.238, $P = 0.0237$ (Table 3)]. The DQB1*0602 allele was also negatively associated with multiple autoantibody positivity (chi-square = 6.637, $P = 0.007$) and diabetes progression (chi-square = 5.782, $P = 0.013$). The strongest association for ZnT8 autoantibody positivity was observed with the combination of HLA-DR3/DR4 compared to the combination of HLA-DR4/X (80% vs 23%; chi-square = 7.272, $P = 0.0191$; 'X': all DR alleles other than DR3).

Discussion

Development of intervention strategies for prevention of type 1 diabetes requires identification of individuals at high risk. Besides family history and genetic aspects, autoantibodies are important for prediction of type 1 diabetes [8]. Previous results from several studies confirm that positivity for multiple autoantibodies confers a higher risk of progression, not only in first-degree relatives of people with type 1 diabetes but also in the general population [2,5,7,8,12,21,22].

The present work on ZnT8 autoantibodies was conducted on sera of 137 schoolchildren of the Karlsburg Type 1 Diabetes Risk Study who initially tested positive for insulin, GAD or IA-2 autoantibodies between 1995 and 1999, which was confirmed in re-examination [8]. Therefore, children who originally tested autoantibody-negative and possibly seroconverted later were not included. A total of 18% of the examined schoolchildren were ZnT8 autoantibody-positive, a prevalence close to the 20% in first-degree relatives with similar age [5,9]. In previous studies, the proportion of first-degree relatives with other autoantibodies who tested ZnT8 autoantibody-positive ranged from 20% to 43%, and ZnT8 autoantibody incidence was

inversely correlated with age [2,4,5,9]. These observations suggest that the slightly lower ZnT8 autoantibody prevalence in the present study is probably attributable to age differences rather than genetic factors.

In agreement with previous studies in first-degree relatives we could stratify the diabetes risk in autoantibody-positive schoolchildren by ZnT8 autoantibody positivity [2,5,9]. Regarding this, it is noteworthy that one out of three ZnT8 autoantibody-positive schoolchildren with only one other autoantibody progressed to diabetes. This observation is consistent with the increased progression risk in children classified as low-risk individuals but who tested ZnT8 autoantibody-positive [2,5].

Regarding IA-2 autoantibody status, the results confirm the high predictive value of IA-2 autoantibody positivity and demonstrate that ZnT8 autoantibody positivity stratifies the diabetes risk among seven IA-2 autoantibody-negative children by identifying those with disease progression. This observation was consistent with that reported for first-degree relatives in the Belgian Diabetes Registry [9]. Thus, ZnT8 and IA-2 autoantibodies both add sensitivity to combinations of autoantibodies for prediction of type 1 diabetes in the general population [9,23].

In the present study, 56% of people were ZnT8 autoantibody-positive at onset of type 1 diabetes, a prevalence within the range reported in previous studies [2,4,24,25]. Also consistent with previous studies was a trend towards higher ZnT8 autoantibody prevalence in younger people with type 1 diabetes [2,4]. In people with LADA, the ZnT8 autoantibody prevalence of 10% was within the 4% to 48% reported in previous studies, a wide range probably attributable to non-uniform diagnostic criteria [6,15–17,26,27]. ZnT8 autoantibodies were generally rare among people classified as having type 2 diabetes, suggesting that ZnT8 autoantibody testing might help to identify autoimmune diabetes in adults, as also proposed by other studies [15,27]. Of the four ZnT8 autoantibody-positive people originally classified as having type 2 diabetes, three could instead be categorized as LADA based on clinical characteristics, whereas the fourth should be considered as having classic type 1 diabetes with adult onset because of immediate insulin requirement.

In the present study, the ZnT8 autoantibody reactivity pattern in 46% of schoolchildren positive for multiple autoantibodies and in 47% of people with type 1 diabetes was directed against all three ZnT8 isoforms, as previously shown in other studies in people with type 1 diabetes [4], and as also demonstrated by the correlation analysis performed in these two groups. Since 10 out of the 11 schoolchildren with reactivity to all three ZnT8 isoforms, four with ZnT8R autoantibodies only and two with ZnT8W autoantibodies only, have multiple other autoantibodies and progressed to diabetes (Fig. 1b), multiple autoantibody positivity seems to be a stronger marker for disease progression in ZnT8 autoantibody-positive children, and the reaction pattern against amino acid 325 might be of minor importance. In contrast, ZnT8 autoantibodies in people with LADA were predominantly directed against ZnT8W, a finding that differs from results published recently reporting ZnT8R autoantibodies as the most prevalent

variant [28]. The different binding pattern in people with type 1 diabetes and multiple autoantibody-positive schoolchildren compared with people with LADA supports the assumption that the two autoimmune diabetes forms might have a different immunological genesis and that ZnT8 autoantibody isoform determination might help to differentiate them.

Regarding associations of ZnT8 autoantibodies with GAD, insulin and IA-2 autoantibodies in schoolchildren, we found a high concordance of positivity, while levels of ZnT8 autoantibody isoforms did not correlate with those of the other autoantibodies. Finally, the results confirmed the positive or negative association of ZnT8 autoantibodies with selected disease-associated and/or protective HLA-DQB1 and HLA-DRB1 alleles [12,29]. As expected, in autoantibody-positive schoolchildren, a negative association of ZnT8 autoantibody positivity with the HLA-DQB1*0602 allele and an especially strong positive association with HLA-DR3, but also HLA-DR4 and HLA-DQB1 alleles *02 and/or *0302, was observed. However, ZnT8 autoantibody positivity was most strongly associated with the combined appearance of HLA-DR3/DR4, with 4/5 (80%) carriers of this allele combination being positive for ZnT8 autoantibodies. This demonstrates that the observed associations of ZnT8 autoantibody positivity with either HLA-DR3 or HLA-DR4 are probably not independent of co-expression of the respective other allele.

In conclusion, in autoantibody-positive children from the general population, ZnT8 autoantibodies stratified the type 1 diabetes risk, as previously shown in first-degree relatives, providing further evidence that antibody-positive first-degree relatives of people with type 1 diabetes and at-risk persons from the general population appear to experience similar pathobiology. ZnT8 autoantibodies have the potential to identify those children with disease progression, importantly, in seven IA-2 autoantibody-negative individuals and in children otherwise classified as low-risk based on single positivity for other autoantibodies. ZnT8 autoantibodies were also found to be a marker of autoimmunity in people originally classified as having type 2 diabetes and hence could be helpful for differentiating clinical phenotypes of diabetes in adults.

In people with type 1 diabetes and multiple autoantibody-positive children at highest diabetes risk, ZnT8 autoantibodies predominantly reacted with all three ZnT8 isoforms. In contrast, no person with LADA had ZnT8 autoantibodies against all three variants, with a pattern restricted to the ZnT8W isoform, supporting the hypothesis that the immunological genesis of these two autoimmune diabetes forms might be different.

Finally, additional ZnT8Q autoantibody testing did not improve risk stratification. A hybrid ZnT8-Arg325-Trp325 construct could thus facilitate ZnT8 autoantibody screening in the general population without decreasing sensitivity [30].

Funding sources

The Karlsburg Type 1 Diabetes Risk Study was supported by the Federal Ministry of Research and Technology (BMFT 07NBL02/D4), the government of Mecklenburg-Vorpommern (EMAU16/1995), the *Else-Kröner-Fresenius-Stiftung*, the *Deutsche Diabetes-Stiftung* and *Arbeitsamt Stralsund* (ABM4576/98, 2902/01, 2833/02, 2717/3), by the Community Medicine Project of the University of Greifswald, and by the BRAHMS Diagnostica GmbH, Berlin. Additional support was obtained from the BMFT-funded Centre for Interdisciplinary Clinical Research at the Friedrich Alexander University Erlangen-Nuernberg (Grant 01KS9601), by the *Deutsche Forschungsgemeinschaft* (Grant SFB263) and by the Association for Support of Diabetes Research, Karlsburg, Greifswald e.V.

Competing interests

None declared.

Acknowledgements

We thank the participating children and physicians supporting the study, Angelika Kell (Centre of Diabetes and Metabolic Disorders, Karlsburg, Germany) and Heidrun Kenk (Institute of Pathophysiology, Research Group of Predictive Diagnostics, University Medical Center Greifswald, Karlsburg, Germany) for excellent technical assistance and Janik Riese and MSc Christopher Pohl (Department of General Surgery, Visceral, Thoracic and Vascular Surgery, University Medical Center Greifswald) for assistance in statistical analysis.

References

- [1] Zhang L, Eisenbarth GS. Prediction and prevention of Type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes* 2011; **3**:48–57.
- [2] Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P *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**:17040–17045.
- [3] Wenzlau JM, Frisch LM, Gardner TJ, Sarkar S, Hutton JC, Davidson HW. Novel antigens in type 1 diabetes: the importance of ZnT8. *Curr Diab Rep* 2009; **9**:105–112.
- [4] Wenzlau JM, Liu Y, Yu L, Moua O, Fowler KT, Rangasamy S *et al*. A common nonsynonymous single nucleotide polymorphism in the SLC30A8 gene determines ZnT8 autoantibody specificity in type 1 diabetes. *Diabetes* 2008; **57**:2693–2697.
- [5] Achenbach P, Lampasona V, Landherr U, Koczwara K, Krause S, Grallert H *et al*. Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLC30A8 genotype stratify type 1 diabetes risk. *Diabetologia* 2009; **52**:1881–1888.
- [6] Trabucchi A, Faccinetti NI, Guerra LL, Puchulu FM, Frechtel GD, Poskus E *et al*. Detection and characterization of ZnT8 autoantibodies could help to screen latent autoimmune diabetes in adult-onset patients with type 2 phenotype. *Autoimmunity* 2012; **45**:137–142.
- [7] Bingley PJ. Clinical applications of diabetes antibody testing. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; **95**:25–33.

- [8] Till AM, Kenk H, Rjasanowski I, Wassmuth R, Walschus U, Kerner W *et al.* Autoantibody-defined risk for Type 1 diabetes mellitus in a general population of schoolchildren: results of the Karlsburg Type 1 Diabetes Risk Study after 18 years. *Diabet Med* 2015;**32**:1008–1016.
- [9] De Grijse J, Asanghanwa M, Nouthe B, Albrecher N, Goubert P, Vermeulen I *et al.* Predictive power of screening for antibodies against insulinoma-associated protein 2 beta (IA-2beta) and zinc transporter-8 to select first-degree relatives of type 1 diabetic patients with risk of rapid progression to clinical onset of the disease: implications for prevention trials. *Diabetologia* 2010; **53**:517–524.
- [10] Long AE, Gillespie KM, Rokni S, Bingley PJ, Williams AJ. Rising incidence of type 1 diabetes is associated with altered immunophenotype at diagnosis. *Diabetes* 2012; **61**:683–686.
- [11] Schlosser M, Strebelow M, Rjasanowski I, Kerner W, Wassmuth R, Ziegler M. Prevalence of diabetes-associated autoantibodies in schoolchildren: the Karlsburg Type 1 Diabetes Risk Study. *Ann N Y Acad Sci* 2004;**1037**:114–117.
- [12] Schlosser M, Strebelow M, Wassmuth R, Arnold ML, Breunig I, Rjasanowski I *et al.* The Karlsburg type 1 diabetes risk study of a normal schoolchild population: association of beta-cell autoantibodies and human leukocyte antigen-DQB1 alleles in antibody-positive individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**:2254–2261.
- [13] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004;**27** (Suppl. 1):S5–S10.
- [14] Kawasaki E, Nakamura K, Kuriya G, Satoh T, Kuwahara H, Kobayashi M *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* 2010;**95**:707–713.
- [15] Lampasona V, Petrone A, Tiberti C, Capizzi M, Spoletini M, di Pietro S *et al.* Zinc transporter 8 antibodies complement GAD and IA-2 antibodies in the identification and characterization of adult-onset autoimmune diabetes: Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) 4. *Diabetes Care* 2010;**33**:104–108.
- [16] Tuomi T, Santoro N, Caprio S, Cai M, Weng J, Groop L. The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity. *Lancet* 2013;**383**:1084–1094.
- [17] 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**:661–670.
- [18] Torn C, Mueller PW, Schlosser M, Bonifacio E, Bingley PJ. Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. *Diabetologia* 2008;**51**:846–852.
- [19] Williams AJ, Bingley PJ, Bonifacio E, Palmer JP, Gale EA. A novel micro-assay for insulin autoantibodies. *J Autoimmun* 1997;**10**:473–478.

- [20] Schlosser M, Mueller PW, Torn C, Bonifacio E, and Bingley PJ. Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for insulin autoantibodies. *Diabetologia* 2010;53:2611-20.
- [21] 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;46:1701–1710.
- [22] Achenbach P, Hummel M, Thumer L, Boerschmann H, Hofelmann D, Ziegler AG. Characteristics of rapid vs slow progression to type 1 diabetes in multiple islet autoantibody-positive children. *Diabetologia* 2013;56:1615–1622.
- [23] Gorus FK, Balti EV, Vermeulen I, Demeester S, Van Dalem A, Costa O *et al.* Screening for insulinoma antigen 2 and zinc transporter 8 autoantibodies: a cost-effective and age-independent strategy to identify rapid progressors to clinical onset among relatives of type 1 diabetic patients. *Clin Exp Immunol* 2012;171:82–90.
- [24] Wenzlau JM, Moua O, Sarkar SA, Yu L, Rewers M, Eisenbarth GS *et al.* SIC30A8 is a major target of humoral autoimmunity in type 1 diabetes and a predictive marker in prediabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1150:256–259.
- [25] Fabris M, Zago S, Liguori M, Trevisan MT, Zanatta M, Comici A *et al.* Anti-zinc transporter protein 8 autoantibodies significantly improve the diagnostic approach to type 1 diabetes: an Italian multicentre study on paediatric patients. *Auto Immun Highlights* 2015;6:17–22.
- [26] Park Y, Hong S, Park L, Woo J, Baik S, Nam M *et al.* LADA prevalence estimation and insulin dependency during follow-up. *Diabetes Metab Res Rev* 2011;27:975–979.
- [27] Huang G, Xiang Y, Pan L, Li X, Luo S, Zhou Z. Zinc transporter 8 autoantibody (ZnT8 autoantibodies) could help differentiate latent autoimmune diabetes in adults (LADA) from phenotypic type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* 2013;29:363–368.
- [28] Vaziri-Sani F, Oak S, Radtke J, Lernmark K, Lynch K, Agardh CD *et al.* ZnT8 autoantibody titers in type 1 diabetes patients decline rapidly after clinical onset. *Autoimmunity* 2010;43:598–606.
- [29] Erlich H, Valdes AM, Noble J, Carlson JA, Varney M, Concannon P *et al.* HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes* 2008;57:1084–1092.
- [30] Wenzlau JM, Walter M, Gardner TJ, Frisch LM, Yu L, Eisenbarth GS *et al.* Kinetics of the post-onset decline in zinc transporter 8 autoantibodies in type 1 diabetic human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4712–4719.

Supporting information

This article is protected by copyright. All rights reserved

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1 Levels of autoantibodies against the different ZnT8-isoforms in 137 autoantibody-positive schoolchildren (a), 102 people with type 1 diabetes (b) and 88 people with latent autoimmune diabetes in adults (c). Data are given as individual values and median.

Figure S2 Venn diagram showing overlaps of ZnT8 autoantibodies with GAD, IA-2 and insulin autoantibodies in 91 autoantibody-positive people with type 1 diabetes, of whom a majority (30%) are positive for all four autoantibodies.

Figure S3 Correlations of the ZnT8 autoantibody isoforms among each other in autoantibody-positive schoolchildren: (a) correlation of ZnT8R with ZnT8W autoantibodies ($r_s = -0.0539$, $P=0.8024$), (b) correlation of ZnT8R with ZnT8Q autoantibodies ($r_s = 0.427$, $P=0.0375$), (c) correlation of ZnT8W with ZnT8Q autoantibodies ($r_s = 0.697$, $P<0.001$).

FIGURE 1 Venn diagrams showing prevalence and overlaps of the zinc transporter 8 (ZnT8) autoantibody isoforms in (a) all autoantibody-positive schoolchildren ($n = 137$), (b) multiple autoantibody-positive schoolchildren ($n = 28$) and (c) single autoantibody-positive schoolchildren ($n = 109$). In multiple autoantibody-positive schoolchildren the ZnT8 autoantibody reactivity was predominantly directed against all three ZnT8 isoforms. ZnT8QA, xxx; ZnT8RA, xxx; ZnT8WA, xxx.

FIGURE 2 Venn diagram showing overlaps of zinc transporter 8 (ZnT8) autoantibodies with glutamic acid decarboxylase (GAD), insulinoma-associated antigen-2 (IA-2) and insulin autoantibodies in autoantibody-positive schoolchildren ($n = 137$).

FIGURE 3 Diabetes-free survival in autoantibody-positive schoolchildren, irrespective of the number of autoantibodies, stratified according to zinc transporter 8 (ZnT8) autoantibody status. Solid line shows ZnT8 autoantibody-positive and dotted line ZnT8 autoantibody-negative schoolchildren; log-rank $P < 0.001$.

Figure 4 Diabetes-free survival in (a) insulinoma-associated antigen-2 (IA-2) autoantibody-positive and (B) IA-2 antibody-negative schoolchildren, stratified according to zinc transporter 8 (ZnT8) autoantibody status. Solid lines show ZnT8 autoantibody-positive and dotted lines ZnT8 autoantibody-negative schoolchildren; log rank chi-square = 3.908, $P = 0.0481$ (a) and chi-square = 46.31, $P < 0.001$ (b).

FIGURE 5 (a) Venn diagram showing prevalence and overlaps of the autoantibodies against the ZnT8-isoforms in 102 people with type 1 diabetes. The zinc transporter 8 (ZnT8) autoantibody reactivity was predominantly directed against all three ZnT8 isoforms. (b) Venn diagram showing prevalence and overlaps of the autoantibodies against the ZnT8 autoantibody isoforms in 88 people with latent autoimmune diabetes in adults. In contrast to people with type 1 diabetes, the ZnT8 autoantibodies reactivity was restricted to the ZnT8W-isoform. ZnT8QA, xxx; ZnT8RA, xxx; ZnT8WA, xxx.

Table 1 Diabetes progression depending on zinc transporter 8 autoantibody status in 28 multiple vs 109 single autoantibody-positive schoolchildren

All autoantibody-positive schoolchildren ($n = 137$)		Multiple autoantibody-positive schoolchildren ($n = 28$)		Single autoantibody-positive schoolchildren ($n = 109$)	
ZnT8 autoantibody-positive ($n = 24$)	ZnT8 autoantibody-negative ($n = 113$)	ZnT8 autoantibody-positive ($n = 21$)	ZnT8 autoantibody-negative ($n = 7$)	ZnT8 autoantibody-positive ($n = 3$)	ZnT8 autoantibody-negative ($n = 106$)

Type 1 diabetes progression, <i>n</i> (%)	22 (92)	7 (6.2)	21 (100.0)	3 (43)	1 (33)	4 (3.8)
No type 1 diabetes progression, <i>n</i> (%)	2 (8.3)	106 (94)	0 (0.0)	4 (57)	2 (67)	102 (96)

Table 2 Results of correlation analysis of zinc transporter 8 autoantibody isoforms with each other in autoantibody-positive schoolchildren and people with type 1 diabetes at or above the respective threshold

	Autoantibody-positive schoolchildren	People with type 1 diabetes
ZnT8R vs ZnT8W autoantibodies		
r_s^*	-0.054	0.307
<i>P</i>	0.8024	0.082
ZnT8R vs ZnT8Q autoantibodies		
r_s^*	0.427	0.632
<i>P</i>	0.0375	<0.001
ZnT8W vs ZnT8Q autoantibodies		
r_s^*	0.697	0.645
<i>P</i>	<0.001	<0.001

*Spearman's rho.

Table 3 Prevalence of HLA-DQB1 and HLA-DRB1 alleles in 132 autoantibody-positive schoolchildren according to zinc transporter 8 autoantibody status

Allele (<i>n</i> = 132)	ZnT8 autoantibody-positive (<i>n</i> = 24)	ZnT8 autoantibody-negative (<i>n</i> = 108)	Chi-square	<i>P</i>

	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)		
HLA-DR4+ (<i>n</i> = 53)	15 (28)	38 (72)	6.097	0.0135
HLA-DR4- (<i>n</i> = 79)	9 (11)	70 (89)		
HLA-DR4/3+ (<i>n</i> = 5)	4 (80)	1 (20)	7.272	0.0191
HLA-DR4/X+ (<i>n</i> = 48)	11 (23)	37 (77)		
HLA-DR3+ (<i>n</i> = 11)	7 (64)	4 (36)	16.67	0.0006
HLA-DR3- (<i>n</i> = 121)	17 (14)	104 (86)		
HLA-DQB1*02 and/or 0302+ (<i>n</i> = 81)	21 (26)	60 (74)	8.452	0.0046
HLA-DQB1*02 and/or 0302- (<i>n</i> = 51)	3 (5.9)	48 (94)		
HLA-DQB1*0602+ (<i>n</i> = 20)	0 (0)	20 (100)	5.238	0.0237
HLA-DQB1*0602- (<i>n</i> = 112)	24 (21)	88 (79)		

Figure 1

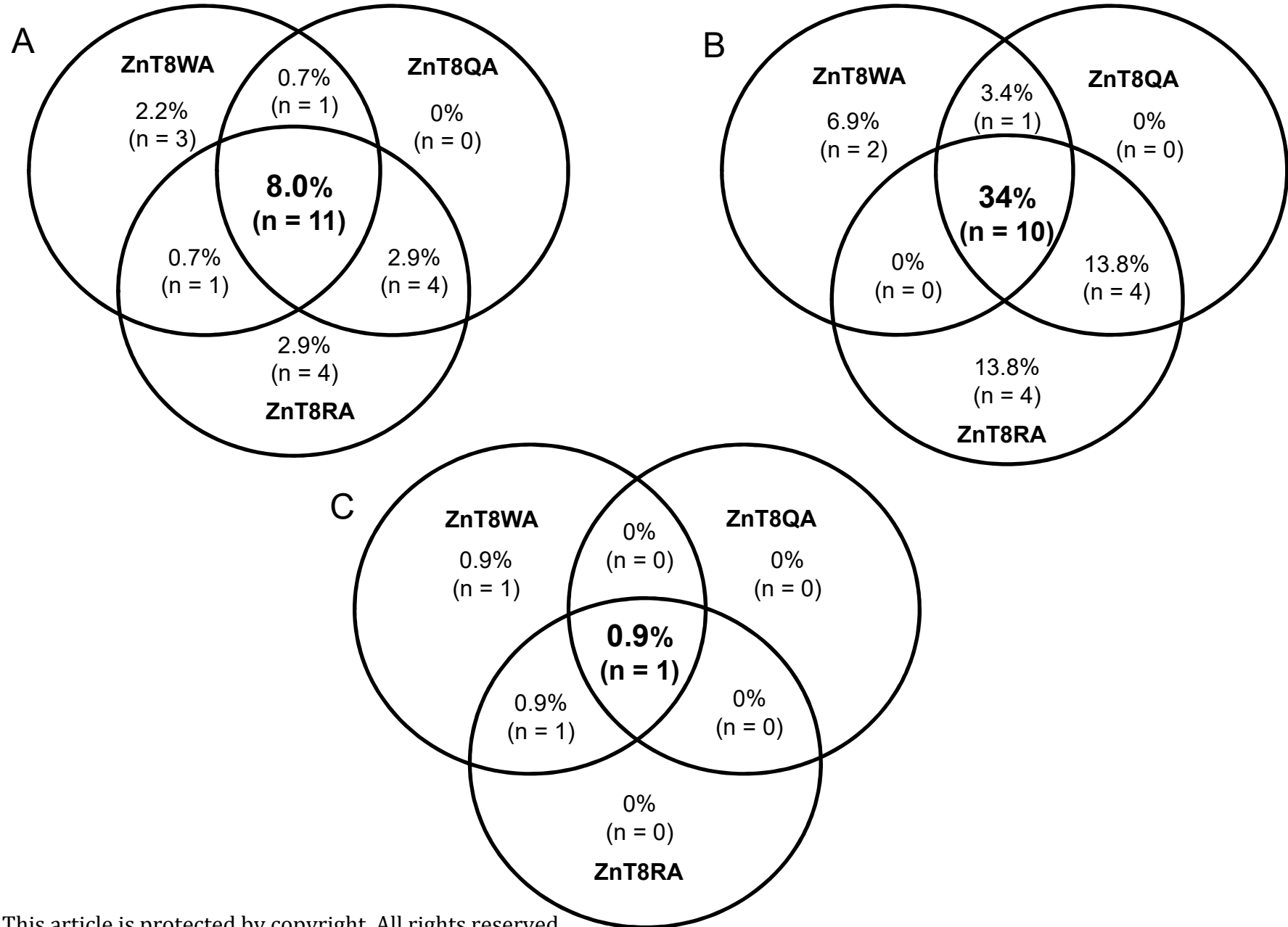
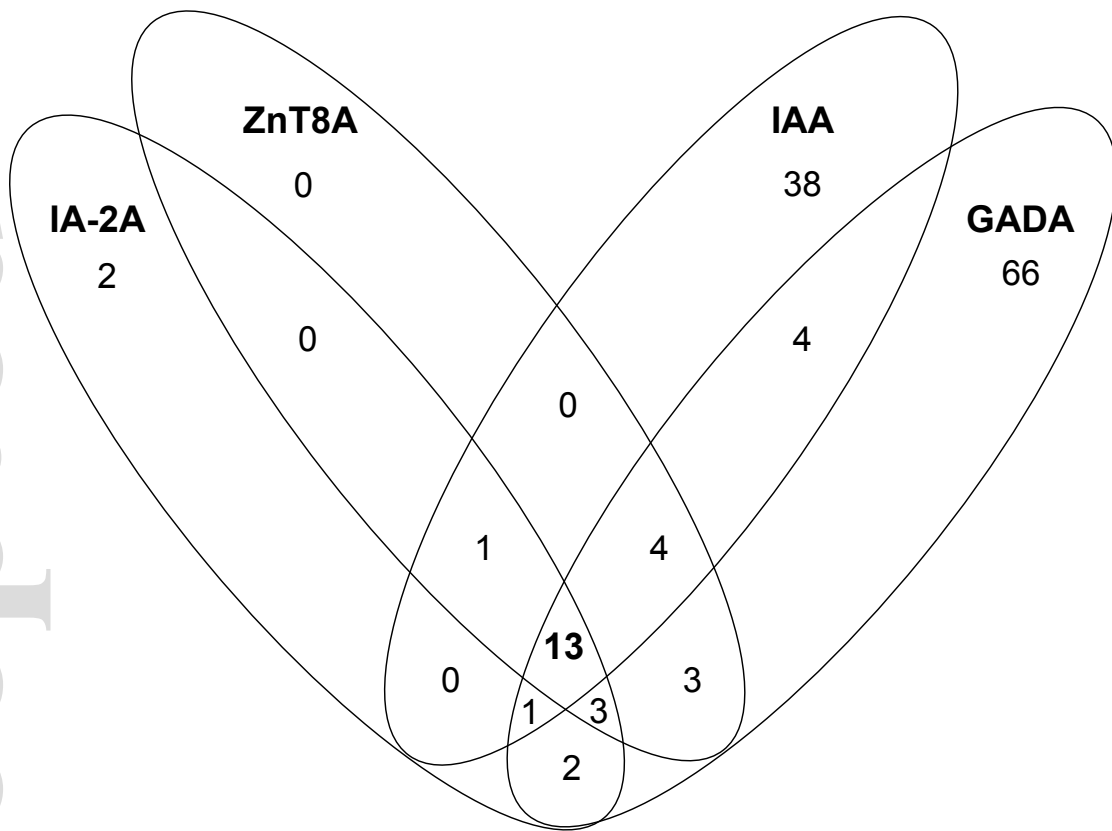
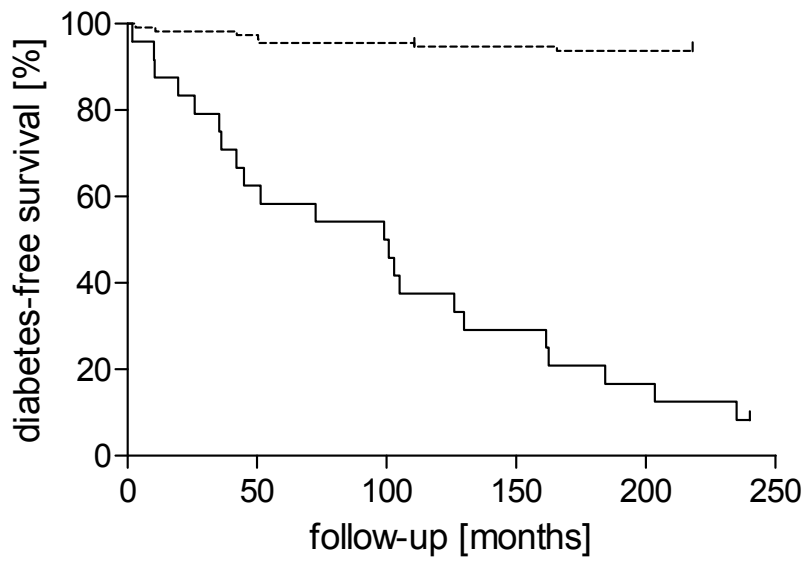


Figure 2



dme_14389_f2.eps

Figure 3



ZnT8A +

24

15

11

7

4

2

ZnT8A -

113

110

108

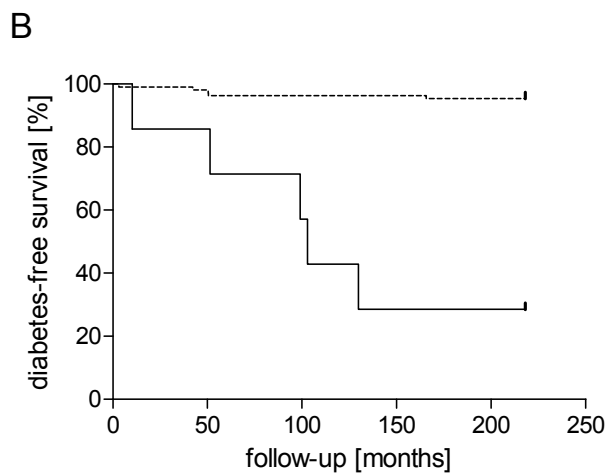
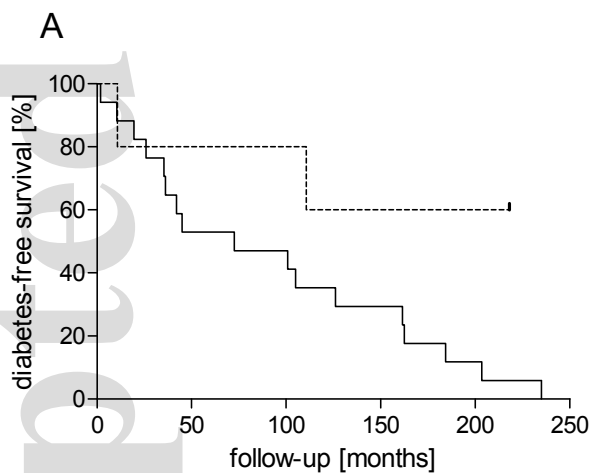
107

106

106

dme_14389_f3.eps

Figure 4



IA-2A-positive

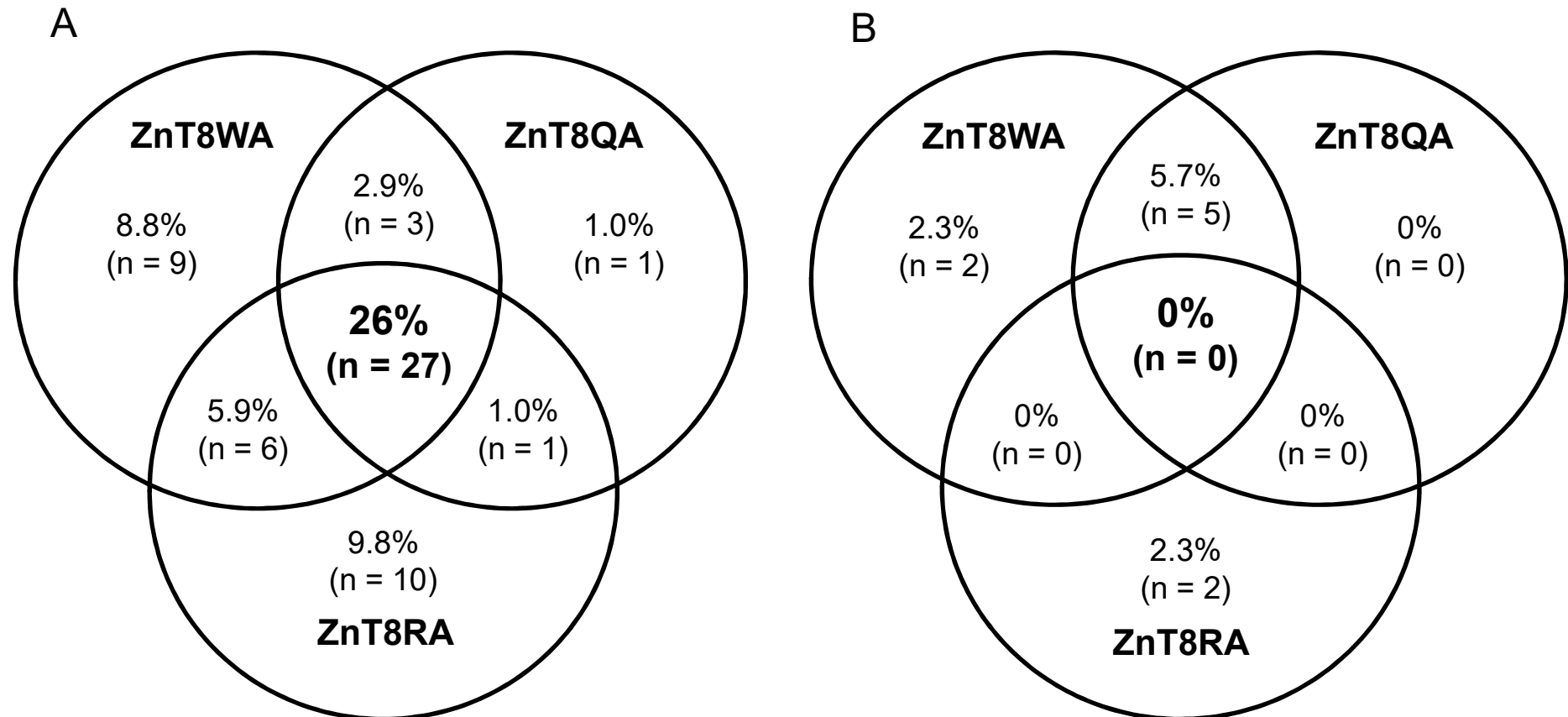
ZnT8A +	17	9	8	5	2	0
ZnT8A -	5	4	4	3	3	3

IA-2A-negative

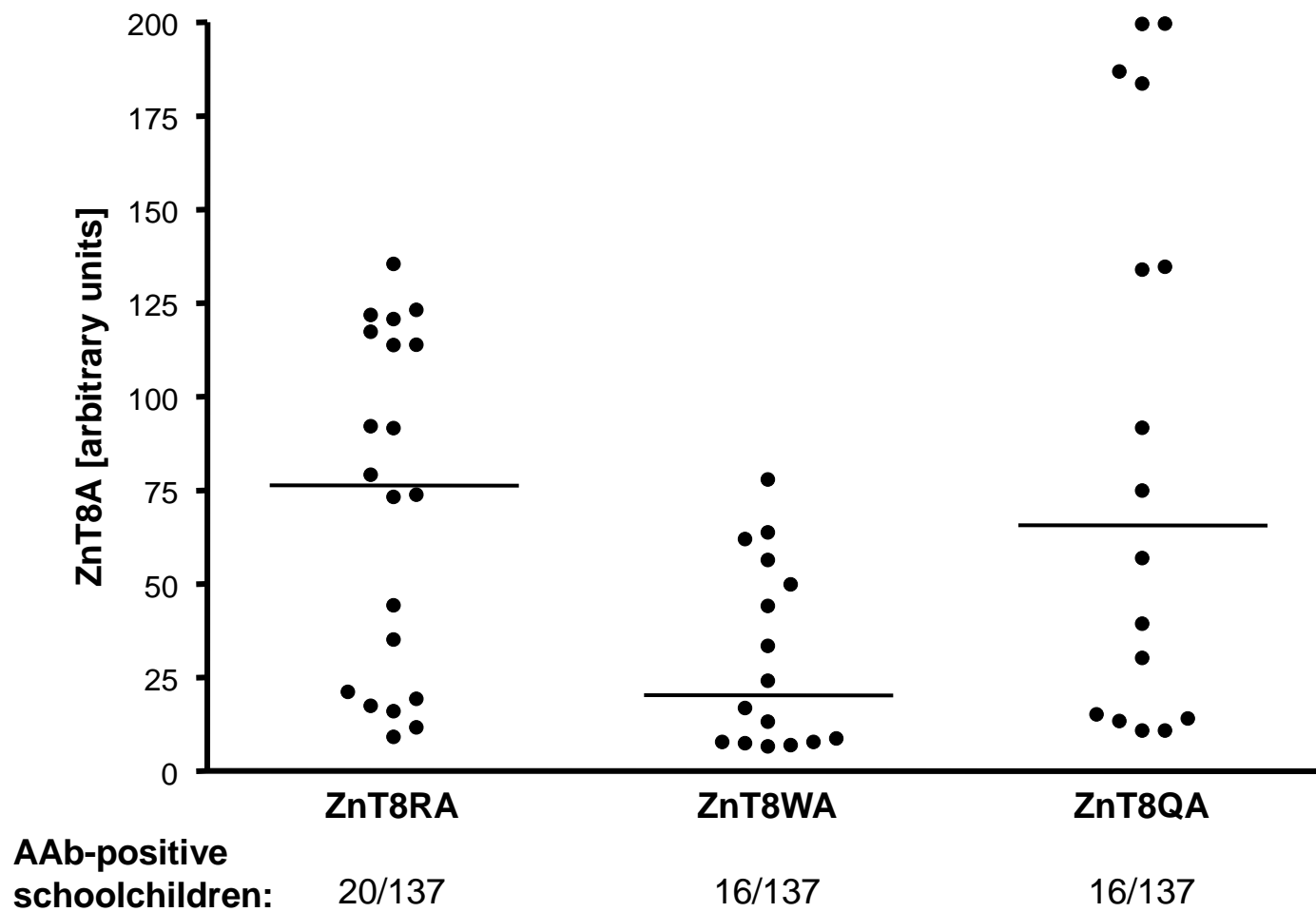
ZnT8A +	7	6	4	2	2
ZnT8A -	108	106	104	104	103

dme_14389_f4.eps

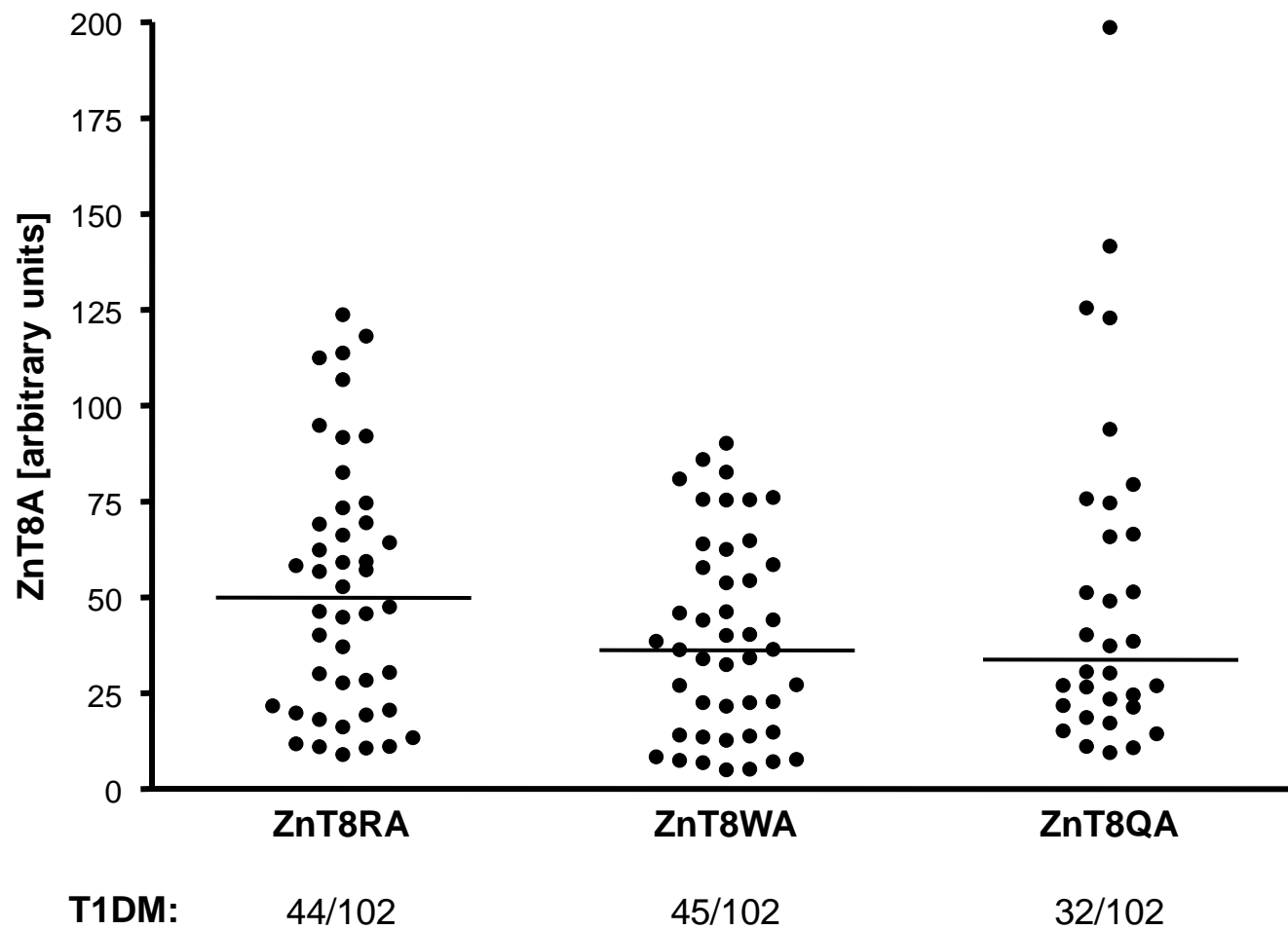
Figure 5



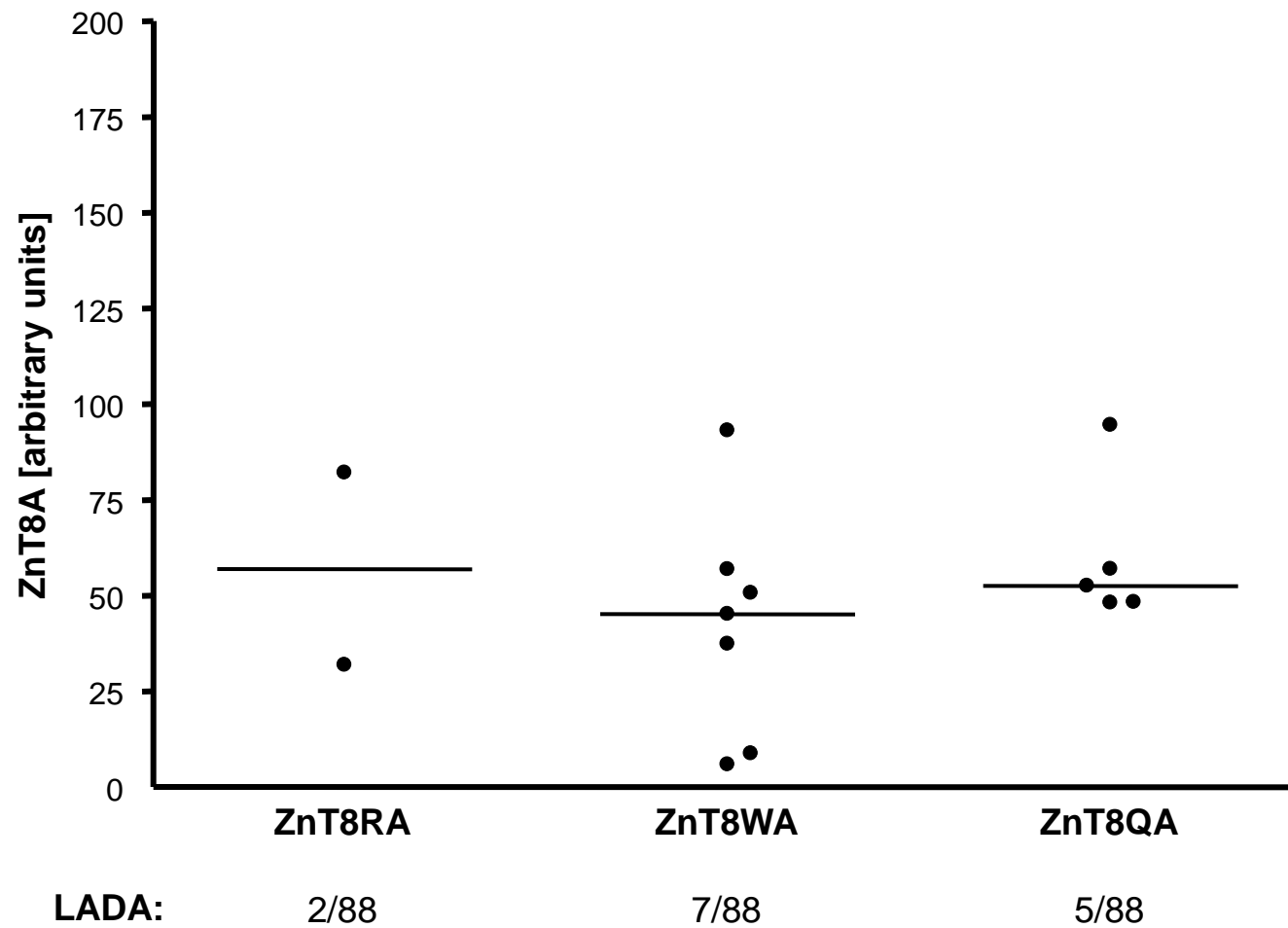
Supplementary figure 1A



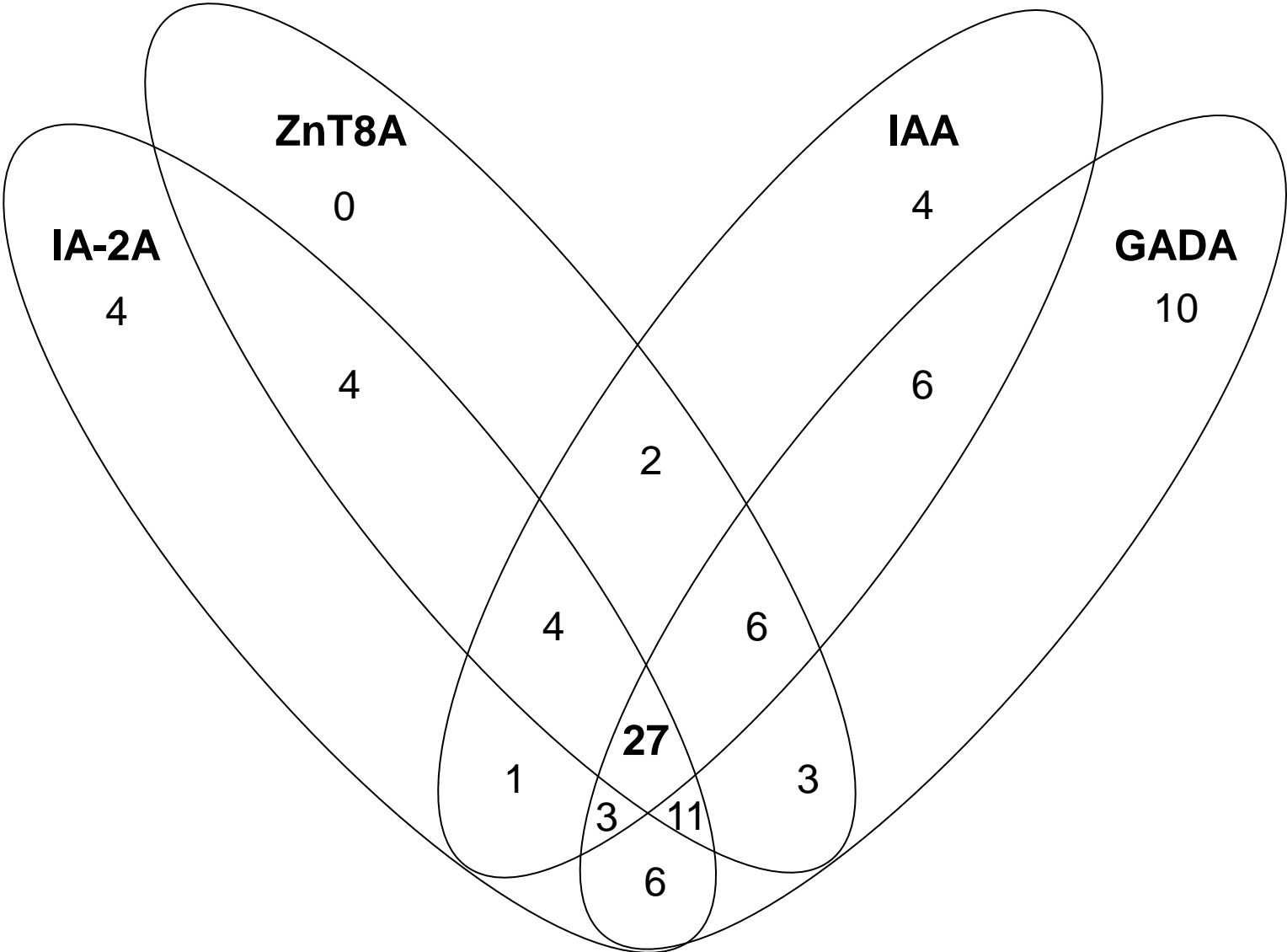
Supplementary figure 1B



Supplementary figure 1C



Supplementary Figure 2



Supplementary figure 3 A-C

