

GLUTAMIC ACID DECARBOXYLASE (GAD) — AN AUTOANTIGEN IN INSULIN-DEPENDENT DIABETES MELLITUS (IDDM)

TURSKY T, BANDZUCHOVA E

DEKARBOXYLÁZA GLUTAMÁTU (GAD) — AUTOANTIGÉN PRI INZULÍN-DEPENDENTNOM DIABETES MELLITUS (IDDM)

Abstract

Tursky T, Bandzuchova E:
Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) — An Autoantigen in Insulin-dependent Diabetes mellitus (IDDM)
 Bratisl Lek Listy 1999; 100 (2): 85–88

The number of antibodies to pancreatic beta-cell antigens in IDDM increased in the last years, involving antibodies to glutamic acid decarboxylase (GADab). A short review is given about the diagnostic and prognostic value of GADab determination in IDDM. The GAD plays an important, possibly a key role in the initial immunological events leading to the destruction of beta cells. The question is open whether the immunological reaction against GAD is a primary one, or if it is a result of mimicry of a part of an infectious protein antigen (Coxsackie virus). The immunological reaction to GAD is associated with both humoral and cellular responses. The cellular response seems to be more important than the humoral one. The cellular response may be mediated through the HLA complex class I cells (cytotoxic lymphocytes) and the HLA complex class II cells (helper lymphocytes). There are arguments for both possibilities. The principles of GADab determination are shortly described. (*Ref. 34.*)

Key words: insulin-dependent diabetes mellitus, autoantibodies, glutamic acid decarboxylase.

Roku 1990 uverejnili Baekkeskov a spol. prácu, v ktorej ukázali, že antigén s molekulovou hmotnosťou 64 kDa, ktorý dlhšie sledovali a ktorého protilátky sa nachádzajú v sérach pacientov s IDDM, je enzým prítomný v betabunkách pankreasu — dekarboxyláza kyseliny glutámovej (GAD). Tak ku dovtedy známym antigénom inzulínu, karboxypeptidáze H, proteínu tepelného šoku a ďalším (Solimena a spol., 1994) pribudol nový definovaný autoantigén. Stimulom pre zameranie pozornosti na

Abstrakt

Turský T., Bandžuchová E.:
 Dekarboxyláza glutamátu (GAD) — autoantigén pri inzulín-dependentnom diabetes mellitus (IDDM)
 Bratisl. lek. Listy, 100, 1999, č. 2, s. 85–88

Po roku 1990 bol počet protilátok prítomných v krvi pri IDDM rozšírený o protilátky proti dekarboxyláze glutamátu (GADab). V stručnom prehľade sa uvádzajú práce potvrdzujúce diagnostický a prognostický význam stanovenia GADab. V autoimunitnom procese, ktorý vedie k zničeniu pankreatických betabuniek, sa GAD zúčastňuje významným, možno rozhodujúcim spôsobom. Otázka, či autoimunitná reakcia proti GAD je primárna, alebo je dôsledkom mimikry časti proteínu infekčného agensu (Coxsackie vírus) je otvorená. Imunitná odpoveď na GAD je humorálna aj bunková, pričom bunková odpoveď má zjavne väčší význam. Bunková odpoveď môže prebiehať cez ovplyvnenie HLA-komplexu triedy I (cytotoxické lymfocyty), alebo triedy II (helperové lymfocyty). Argumenty sú pre obe možnosti. V stručnosti sú uvedené princípy stanovenia GAD protilátok. (*Lit. 34.*)

Kľúčové slová: inzulín-dependentný diabetes mellitus, autoprotilátky, dekarboxyláza glutamátu.

GAD bola krátko predtým zistená prítomnosť protilátok proti GAD u pacienta s diagnózou "stiff-man syndrom" (SMS), u ktorého sa v priebehu choroby vyvinula epilepsia a IDDM (Solimena a spol., 1988). Od roku 1990 boli publikované mnohé práce z klinických aj experimentálnych pracovísk, ktoré potvrdili diagnostický význam stanovenia protilátok proti GAD (GADab), ako aj potenciálny význam antigénneho pôsobenia GAD pre pochopenie patogenézy IDDM.

Institute of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry, School of Medicine, Comenius University, Bratislava

Address for correspondence: T. Turský, MD, PhD, Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LFUK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovakia.

Phone: +421.7.5357 293

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave

Dekarboxyláza kyseliny glutámovej (GAD) katalyzuje rozštiepenie kyseliny glutámovej na kyselinu gamaaminomaslovú (GABA) a oxid uhličitý. Tento enzým sa vyskytuje v mnohých mikroorganizmoch, rastlinách a zo živočíšnych orgánov má najvyššiu aktivitu v mozgu. V tomto tkanive sú tiež najpodrobnejšie preskúmané jeho fyziologické funkcie, z ktorých hlavnou je tvorba GABA ako inhibičného mediátora. Popri tejto, dnes už dost podrobne preskúmanej účasti v prenose nervového vzruchu má dekarboxylačná reakcia ďalšie, už menej jednoznačne stanovené funkcie (Turský, 1993). Aj keď v pankrease aktivita GAD predstavuje len 1 % aktivity v mozgu, v betabunkách Langerhansových ostrovčekov sa aktivita tohto enzýmu približuje aktivite v mozgových bunkách. O funkcii GAD v tomto tkanive sa vie málo (Turský, 1993). GAD s pomerne vysokou aktivitou sa ďalej nachádza v periférnom nervovom systéme, v obličkách, v oviduktoch a s malou aktivitou v pečeni a v srdci.

V mozgu aj v betabunkách Langerhansových ostrovčekov sa nachádzajú dva izoenzýmy GAD, jeden s molekulovou hmotnosťou 65 kDa (585 aminokyselinových zvyškov), druhý 67 kDa (594 aminokyselinových zvyškov). Oba enzýmy sú kódované odlišnými génmi (Petersen a spol., 1993; Erlander a Tobin, 1991). Medzi GAD₆₅ a GAD₆₇ je približne 65 % homológia, pričom sa obe formy výrazne odlišujú v prvých 100 aminokyselinách N-koncovej oblasti. GAD₆₇ je solubiná, GAD₆₅ má hydrofóbné vlastnosti (Shi a spol., 1994). Proti GAD₆₅ sa tvoria protilátky pri IDDM, ako aj pri neurologickom ochorení SMS. Autoantigénne vlastnosti GAD₆₇ sú u ľudí na rozdiel od experimentálnych myší (Elliot a spol., 1994) zanedbateľné.

Autoprotiľátky proti GAD₆₅ (GADab) v diagnostike IDDM.

Už dlhšie sa v diagnostike IDDM využívajú dve stanovenia protilátok: 1. ICA-protilátky proti ostrovčekovým bunkám, ktoré sa tvoria proti zmesi nedefinovaných antigénov (Bottazzo a spol., 1974), z ktorých, ako sa dnes vie, proti betabunkám tvorí väčšinu GAD₆₅.

2. IAA-inzulínové autoprotiľátky (Palmer a spol., 1983). Problémom stanovenia ICA je reprodukovateľnosť a štandardizácia a časová náročnosť (Petersen a spol., 1994 b), IAA obmedzuje podávanie inzulínu. Je preto pochopiteľné hľadanie ďalších možností a GADab je jednou z nich.

Porovnanie ICA, IAA a GADab pri IDDM poskytujú viaceré práce. Dôkladná štúdia sa robila v skupine 491 švédskych detí s čerstvo diagnostikovaným IDDM a v kontrolnej skupine 415 zdravých detí. Priemerný vek detí bol 9 rokov (0–15), rovnako boli zastúpení chlapci a dievčatá. U diabetických detí boli pozitívne nálezy pri GADab 70 %, pri ICA 84 % a pri IAA 56 %. U zdravých detí boli pozitívne nálezy pri GADab 4,1 %, pri ICA 4,1 % a pri IAA 2,8 %. Pozitivita GADab u diabetických dievčat bola 75–80 % u diabetických chlapcov 60–65 % (Hagopian a spol., 1995).

Vandewalle a spol. (1995) sledovali výskyt autoprotiľátok pri IDDM pacientov v závislosti od veku, v ktorom sa ochorenie prejavilo. Kým pri ochorení v prvej dekáde (0–9 rokov) GADab boli pozitívne v 64 %, v druhej dekáde stúpol počet pozitívnych stanovení na 80 %, v tretej a štvrtej dekáde sa udržiaval na 78 %. Naproti tomu pozitivita ICA bola u pacientov v prvej dekáde 86 %, v druhej 84 %, v tretej a štvrtej klesala na 60 %. V prvej dekáde bola pozitivita IAA 78 %, v druhej 43 %, v tretej a štvrtej 29 %. Vysoká hladina protilátok GADab u dospelých (20–40 rokov) by mohla byť vhodná na stanovenie, či sa pacient s NIDDM

nestáva inzulín-dependenčným. Čiastočne odlišné údaje o pozitívnych testoch GADab a ICA v závislosti od veku, v ktorom sa choroba objavila, uvádzajú Petersen a spol. (1994 b). V skupine detí vo veku 0–9 rokov bolo GADab pozitívnych 70 %, ICA pozitívnych 50 %. U detí vo veku 10–19 rokov bolo GADab pozitívnych 80 %, ICA pozitívnych 65 %, 20–29 rokov 85 % GADab pozitívnych, 80 % ICA pozitívnych a 30–60 rokov 55 % GADab a 30 % ICA pozitívnych.

Kawasaki a spol. (1994) sledovali GADab a ICA z dvoch aspektov. Na jednej strane závislosť ich pozitivity od dĺžky trvania choroby, na druhej v závislosti od toho, či IDDM sprevádzala autoimunitná choroba tyreoidie (ATD). U Japoncov je koexistencia týchto dvoch autoimunitných ochorení najčastejšia. Pri trvaní choroby do 1 roka bola pozitivita GADab aj ICA pri samej IDDM 80 %. Pri IDDM a ATD spolu stúpala pozitivita oboch testov na 100 %. Hladiny protilátok boli pri súčasnom postihnutí oboch orgánov 5-krát vyššie ako pri samej IDDM. Pri trvaní choroby od 3 do 22 rokov boli GADab pozitívne u 50 % a ICA pozitívne u 17 % diabetikov. Pri súčasnej IDDM a ATD bola pozitivita GADab 76 %, ICA 52 %, opäť s podstatne vyššími hladinami protilátok, ako pri samej IDDM. V priebehu roka sledovali Petersen a spol. (1994a) pri IDDM vzťah medzi poklesom betabuniek stanovenom cez glukagónom stimulované uvoľňovanie C-peptidu a prítomnosťou (GADab⁺) alebo neprítomnosťou (GADab⁻) GADab. U pacientov s GADab⁺ klesalo od 6. mesiaca stimulované vylučovanie C-peptidu na rozdiel od pacientov s GADab⁻, u ktorých bolo po 12 mesiacoch stimulované vylučovanie C-peptidu o 30 % vyššie ako u pacientov s GADab⁺. Na rozdiel od prítomnosti GADab, prítomnosť ICA v krvi pacientov nespovedávala pokles stimulovaného vylučovania C-peptidu. Cyklosporín podávaný pacientom s GADab⁺ odstránil pokles vylučovania C-peptidu. Cyklosporín ďalej pozitívne ovplyvnil inzulín nevyžadujúce remisie, nezávisle od GADab⁺ alebo GADab⁻.

V predklinickom štádiu sa v časti u príbuzných diabetikov našli vysoké hladiny GADab, pričom len 10 % z nich ochorelo do 4 rokov. U druhej časti boli hladiny GADab nízke a z nej 50 % do 4 rokov ochorelo (Yu, 1994). Tento jav pravdepodobne súvisí s tým, že pri autoantigénnom pôsobení GAD existuje bipolárny vzťah medzi rozvojom humorálnej a bunecnej imunity. Ak je GAD patogénny antigén, je u pacientov s rýchlejšie progresujúcou chorobou výraznejšia bunková odpoveď, u pacientov s pomalou progresivitou vyššia humorálna odpoveď (Harrison a spol., 1993).

Vzťah GAD k patogenéze IDDM. V patogenéze IDDM nemajú zatiaľ celkom jasnú úlohu genetické a environmentálne faktory. Ak sa u jedného z monozygotných dvojčiat vyvinie IDDM, u druhého je 42 % pravdepodobnosť ochorenia, u dizygotných dvojčiat je pravdepodobnosť 26 % a u súrodencov 6 % (Kumar a spol., 1993). Genetická náchylnosť k IDDM je spojená najmä s antigénmi HLA-DQ hlavného histokompatibilného komplexu (Rønningen, 1997; Ilonen a spol., 1996). Z environmentálnych faktorov sú to hlavne infekcie, uvádza sa aj podávanie kravskeho mlieka dojčatám.

Infekcia vírusmi Coxsackie často predchádza vzniku IDDM (Michalková a spol., 1989), čo vedie k predpokladu ich príčinnej súvislosti. V súhlase s týmto predpokladom je zistenie, že v bielkovine P2-C z Coxsackie CB4 E2 sa nachádza 6-členná sekvencia aminokyselín presne rovnaká ako v GAD₆₅. V GAD₆₇ je v tejto sekvencii jedna odlišná aminokyselina. Peptidy z vírusovej bielkoviny (KILPEVKEKHEF), z GAD₆₅ (sekvencia 256–268 YKMFPEV-

KEKGMA), aj z GAD₆₇ boli zosyntetizované a vytvorili sa k nim protilátky. Protilátka ku peptidu z P2-C reagovala s peptidom z GAD₆₅, nereagovala s peptidom z GAD₆₇. Rovnako protilátka ku peptidu z GAD₆₅ reagovala s peptidom z P2-C. Je obzvlášť pozoruhodné, že protilátky v sérach pacientov s IDDM reagovali s peptidom z P2-C a s peptidom z GAD₆₅ a len nepatrne s peptidom z GAD₆₇ (Hou a spol., 1994). GADab sa viažu na GAD₆₅ a prakticky sa neviažu na GAD₆₇. Epitopy zistené na chimérických GAD, vytvorených z časti GAD₆₇ a GAD₆₅, boli v oblasti 240—435 (E1) a 451—570 (E2) (Daw a Powers, 1995). Väzbové miesto pre molekulové mimikry by pre P2-C bielkovinu bolo na E1 epitope.

Naproti tomu Wicker a spol. (1996) a Panina-Bordignon (1995) ukázali, že línie ľudských T-buniek s reaktivitou ku GAD nemali sekvencie homológne ku P2-C bielkovine z Coxsackie vírusu. Potenciálnu úlohu molekulových mimikry naznačujú tiež homológne sekvencie v bielkovinách 11 vírusov a epitopových oblastiach GAD₆₅ (Jones a Crosby, 1996). Problémy súvisiace s molekulovými mimikry viedli Atkinsona (1997) k záveru, že predstávajú síce atraktívnu, ale stále len hypotézu.

U NOD myši stimuluje GAD od 4. týždňa proliferáciu lymfocytov. Miesto v molekule GAD, ktoré má takýto účinok, je na začiatku v sekvencii 509—528. V 7. týždni získava výrazný proliferatívny účinok sekvencia 248—266, v ktorej sa nachádza šesťčlenný peptid rovnaký ako v P2-C (Kaufman a spol., 1993). O bipolarite humorálnej a celulárnej autoimunitnej reakcie GAD sa už hovorilo (Harrison a spol., 1993). U pacientov s IDDM opisali Atkinson a spol. (1992) proliferáciu mononukleárových buniek vyvolanú s GAD. Pokusy na NOD myšiach, u ktorých GAD špecifické T-bunky produkujú interferón gama, ukázali, že tieto bunky patria ku CD4⁺ T1-helperom so skôr cytotoxickým pôsobením (Kaufman a spol., 1993). Na možnú príliferáciu cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytov vyvolanú s GAD pri IDDM u ľudí poukázala práca Panina-Bordignon (1995). Vzhľadom na miesto spracovania a prezentáciu antigénu HLA-antigénmi triedy I by potvrdenie nálezov GAD špecifických cytotoxických T-lymfocytov pri IDDM znamenalo výrazný posun v poznaní patogenézy IDDM.

Z inej strany na vplyv cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytov (HLA-antigény triedy I) pri pôsobení GAD₆₅ v patogenéze IDDM poukázali Togun a spol. (1997). Na rozdiel od inzulínu a niektorých ďalších relevantných a irelevantných antigénov, len GAD₆₅ znižovala stimulačný index CD8⁺ T-lymfocytov. Pri iných autoimunitných ochoreniach (Hashimotova tyreoiditída, reumatická artritída) GAD₆₅ neznižovala stimulačný index. V tomto smere je pre IDDM GAD₆₅ špecifický autoantigén. Autori predpokladajú, že CD8⁺ T-lymfocyty sú supresorové bunky pri IDDM a porucha antigén špecifickej indukcie supresorových T-buniek by mohla byť rozhodujúcim faktorom v patogenéze choroby.

GAD a IDDM u NOD myši. Experimentálnym modelom pre IDDM sú samičky neobéznych diabetických (NOD) myši, u ktorých sa v 80 % vyvíja spontánny diabetes. Aj u týchto zvierat je známa široká skupina autoantigénov. Kaufman a spol. (1993) a Tisch a spol. (1993) sledovali vplyv týchto antigénov na proliferáciu T-buniek. Zistili, že GAD vyvoláva proliferáciu už u 4-týždňových myši, proliferatívne pôsobenie ďalších autoantigénov sa objavuje neskôr. Paralelne prebieha objavovanie sa protilátok, opäť najskôr GADab v 4. týždni, neskôr ďalších protilátok (Tisch a spol., 1993). U NOD myši proliferáciu lymfocytov vyvoláva

GAD₆₅ aj GAD₆₇. Aj protilátky sú GAD₆₅ab a GAD₆₇ab. Súvisí to zjavne s tým, že v pankrease myši (na rozdiel od človeka a potkana) je prevládajúcou formou GAD₆₇ (Elliot a spol., 1994). Od 4. týždňa sa tiež začína vyvíjať u NOD myši inzulinída. Intravenózne podanie GAD aj jej injikovanie do týmusu 3-týždňovým myšiam (Kaufman a spol., 1993; Tisch a spol., 1993) tolerizovalo zvieratá proti vývoju IDDM. Potlačil sa rozvoj inzulinídy, GAD nebola schopná vyvolať proliferáciu lymfocytov a potlačil sa vznik diabetu. Naproti tomu tolerizácia nepotlačila tvorbu protilátok, čo ukazuje, že sa u NOD myši môže vyvolať rozštiepená tolerancia (split tolerance) (Tisch a spol., 1993). Závažným poznatkom z tolerizácie s GAD bolo, že aj ostatné autoantigény stratili schopnosť vyvolávať proliferáciu lymfocytov. Naopak pokus o tolerizáciu s inými autoantigénmi bol neúčinný. Na základe týchto poznatkov Kaufman (1993) urobil záver: 1. GAD je kľúčový autoantigén pri indukcii IDDM u NOD myši. 2. Autoimunita ku GAD spúšťa odpoveď T-buniek k ostatným antigénom z betabuniek. 3. Spontánna autoimunitná choroba môže byť tolerizovaná vyvolávacím antigénom. S problematikou tolerizácie u NOD myši sa zaoberali ďalšie práce (Petersen a spol., 1994 c; Elliot a spol., 1994).

Stanovenie protilátok proti dekarboxyláze kyseliny glutámovej (GADab). V rámci druhého medzinárodného pracovného stretnutia v 52 laboratóriách preskúšali tri spôsoby stanovenia GADab: RIA, ELISA a enzýmový imunoprecipitačný test (Schmidli a spol., 1995). K RIA skúškam sa použila jednak izolovaná dekarboxyláza kyseliny glutámovej z mozgu prasata značená s ¹²⁵I, jednak rekombinantné GAD značené alebo s ¹²⁵I alebo ³⁵S z metionínu zabudovaného pri rekombinantnej syntéze. Stanovila sa rádioaktivita enzýmu s naviazanou protilátkou. Test bol preskúšaný v 26 laboratóriách, pozitívnych výsledkov bolo 76 % (48—87). Pri ELISA sa použila rekombinantná ľudská a potkana GAD a izolovaná GAD z mozgu a pankreasu. Na imobilizovaný antigén sa naviazala protilátka a na jej stanovenie sa použila druhá protilátka s naviazaným enzýmom. Merala sa reakcia katalyzovaná týmto enzýmom. Test sa použil v 19 laboratóriách a získalo sa 36 % (15—84) pozitívnych výsledkov. Enzýmový imunoprecipitačný test spočíval v použití očisteného enzýmu z mozgového tkaniva, na ktorý sa naviazala protilátka. Komplex enzým—protilátka sa naviazal na protein-A-sefáru a po premytí sa stanovila dekarboxylázová aktivita komplexu. Test sa použil v 7 laboratóriách a získalo sa 49,9 % pozitívnych výsledkov (33—65). Za pozitívne sa pokladajú výsledky 2 SD nad priemerom kontrol. Novú modifikáciu RIA v pevnej fáze pre rýchle rutinné použitie zaviedli Tiberti a spol. (1997). Použili rekombinantnú ľudskú GAD₆₅ a protein A (značený s ¹²⁵I), ktorý viaže komplex GAD-protilátka. Obe látky sú komerčne prístupné. Stanovenie GADab sa vďaka možnosti získavať rekombinantný enzým stane pravdepodobne široko prístupné.*

Literatúra

Atkinson M.A.: Molecular mimikry and the pathogenesis of IDDM still just an attractive hypothesis. *Ann. Med.*, 29, 1997, s. 387—392.

Atkinson M.A., Kaufman D.L., Campbell L., Gibbs K.A., Shah S.C., Bu D.F., Erlander M.G., Tobin A.J., Maclaren N.K.: Response of pe-

* Autori venujú túto prácu prof. MUDr. V. Mézešovi pri príležitosti jeho životného jubilea.

- ripheral-blood mononuclear cells to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *Lancet*, 339, 1992, s. 458–459.
- Baekkeskov S., Aanstood H.I., Christgau S., Reetz A., Solimena M., Cascalho M., Folli F., Richter-Olesen H., DeCamilli P.:** Identification of the 64K autoantigen in insulin dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*, 347, 1990, s. 151–156.
- Bottazo G.F., Florin-Christensen A., Doniach D.:** Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*, 2, 1974, s. 1279–80.
- Daw K., Powers A.C.:** Two distinct glutamic acid decarboxylase autoantibody specificities in IDDM target different epitopes. *Diabetes*, 44, 1995, s. 216–220.
- Elliot J.F., Qin H.Y., Bhatti S., Smith D.K., Sing R.K., Dillon T., Lauzon J., Singh B.:** Immunization with the larger isoform of mouse GAD₆₇ prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*, 43, 1994, s. 1494–1499.
- Erlander M.G., Tobin A.J.:** The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: A review. *Neurochem. Res.*, 16, 1991, s. 215–226.
- Hagopian W.A., Sanjeevi C.B., Kockum I., Landin-Olsson M., Karlsson A.E., Sundkvist G., Dahlquist G., Palmer J., Lernmark A.:** Glutamate decarboxylase-, insulin-, islet cell autoantibodies and HLA typing to detect diabetes in a general population-based study of Swedish children. *J. Clin. Invest.*, 95, 1995, s. 1505–1511.
- Harrison L.C., Honeymoon M.G., DeAizpurua H.J., Schmidli R.S., Colman P.G., Tait B.D., Cram D.S.:** Inverse relation between humoral and cellular immunity to glutamic acid decarboxylase in subjects at risk of insulin-dependent diabetes. *Lancet*, 341, 1993, s. 1365–1369.
- Hou J., Said C., Franchi D., Dockstader P., Chatterjee N.K.:** Antibodies to glutamic acid decarboxylase and P2-C peptides in sera from coxsackie virus B4 — infected mice and IDDM patients. *Diabetes*, 43, 1994, s. 1260–1266.
- Ilonen J., Reijonen H., Herva E. a spol.:** Rapid HLA-DQB1 genotyping for four alleles in the assessment of risk for IDDM in the Finnish population. *Diabetes Care*, 8, 1996, s. 795–800.
- Jones C.B., Crosby I.:** Proliferative lymphocyte responses to virus antigens homologous to GAD₆₅ in IDDM. *Diabetologia*, 39, 1996, s. 1318–1324.
- Kaufman D.L., Clare-Salzler M., Tian J., Forsthuber T., Ting G.S.P., Robinson P., Atkinson M.A., Sercarz E.E., Tobin A.J., Lehmann P.V.:** Spontaneous loss of T-cell self tolerance to glutamate decarboxylase is a key event in the pathogenesis of murine insulin-dependent diabetes. *Nature (London)*, 366, 1993, s. 69–72.
- Kawasaki E., Takino H., Yano M., Uotani S., Matsumoto K., Takao Y., Yamaguchi Y., Akazawa S., Nagataki S.:** Antibodies to glutamic acid decarboxylase in patients with IDDM and autoimmune thyroid disease. *Diabetes*, 43, 1994, s. 80–86.
- Kumar D., Gemayel N.S., Deapen D., Kapadia D., Yamashita P.H., Lee M., Dwyer J.H., Royburman P., Bray G.A., Mack T.M.:** North-American twins with IDDM — genetic, etiological, and clinical significance of disease concordance according to age, zygosity and the interval after diagnosis in 1st twin. *Diabetes*, 42, 1993, s. 1351–1362.
- Michalková D., Petrovičová A., Kolář J., Jančová E., Silešová J.:** Spolučasť infekcie vírusmi Cocksackie na vývoji diabetes mellitus typu 1 a vplyv na ďalší postiniciálny priebeh ochorenia v detskom veku. *Čs. Pediat.*, 44, 1989, s. 257–262.
- Palmer J.P., Asplin C.M., Clemons P., Lyen K., Tatputi O., Raghu P., Pauquette T.L.:** Insulin autoantibodies in insulin-dependent diabetes before insulin treatment. *Science (Wash. DC)*, 222, 1983, s. 1337–39.
- Panina-Bordignon P., Lang R., vanEndert P.M., Benazzi E., Felix A.M., Pastore R.M., Spinass G.A., Sinigaglia F.:** Cytotoxic T cells specific for glutamic acid decarboxylase in autoimmune diabetes. *J. exp. Med.*, 181, 1995, s. 1923–1927.
- Petersen J.S., Russel S., Marshall M.O., Kofod H., Buschard K. a spol.:** Differential expression of glutamic acid decarboxylase in rat and human islets. *Diabetes*, 42, 1993, s. 484–495.
- Petersen J.S., Dyrberg T., Karlsson A.E., Molvig J., Michelsen B., Nerup J., Mandrup-Poulsen T.:** GAD₆₅ autoantibodies in prediction of beta cell function and remission in recent onset IDDM after cyclosporin treatment. *Diabetes*, 43, 1994 a, s. 1291–1296.
- Petersen J.S., Hejnaes K.R., Moody A., Karlsson A.E., Marshall M.O. a spol.:** Detection of GAD₆₅ antibodies in diabetes and other autoimmune diseases using a simple radioligand assay. *Diabetes*, 43, 1994 b, s. 459–467.
- Petersen J.S., Karlsson A.E., Markholst H., Worsaae A., Dyrberg T., Michelsen B.:** Neonatal tolerization with glutamic acid decarboxylase but not with bovine serum albumin delays the onset of diabetes in NOD mice. *Diabetes*, 44, 1994 c, s. 1478–1484.
- Rønningen K.S.:** Genetics in prediction of insulin dependent diabetes mellitus: From theory to practise. *Ann. Med.*, 29, 1997, s. 387–392.
- Schmidli R.S., Colman P.G., Bonifacio E. and participating laboratories:** Disease sensitivity and specificity of 52 assays for glutamic acid decarboxylase antibodies. *Diabetes*, 44, 1995, s. 636–640.
- 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.*, 6, 1994, s. 927–934.
- Solimena M., Folli F., Denis-Donini S., Comi G.S., Pozza G., DeCamilli P., Vigari A.M.:** Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in a patient with stiff man syndrome, epilepsy and type I diabetes mellitus. *New Engl. J. Med.*, 318, 1988, č. 16, s. 1012–1020.
- Solimena M., Butler M.H., DeCamilli P.:** GAD, diabetes and stiff-man syndrome: Some progress and more questions. *J. Endocrinol. Invest.*, 17, 1994, s. 509–520.
- Tiberti C., Falorni A., Torresi P., Vecchi E., Anastasi A., Dotta F., DiMarrío U.:** A new solid phase radioimmunoassay to detect anti-GAD₆₅ autoantibodies. *J. Immunol. Metab.*, 207, 1997, s. 107–113.
- Tisch R., Yang X.D., Singer S.M., Liblau R.S., Fugger L., McDevitt H.O.:** Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature (London)*, 366, 1993, s. 72–75.
- Togun R.A., Resetkova E., Kawai K., Enomoto T., Volpé R.:** Activation of CD8⁺ T lymphocytes in insulin dependent diabetes mellitus. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 82, 1997, s. 243–249.
- Turský T.:** Kyselina t-aminomaslová (GABA) a dekarboxyláza glutamátu (GAD). *Bratisl. lek. Listy*, 94, 1993, s. 336–372.
- Vandewalle C.H.L., Falorni A., Svanholm S., Lernmark A., Pipeleers D.G., Gorus F.K.:** High diagnostic sensitivity of glutamate decarboxylase autoantibodies in insulin dependent diabetes mellitus with clinical onset between age 20 and 40 years. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 80, 1995, s. 846–851.
- Wicker L.S., Chen S.L., Nepom G.T. a spol.:** Naturally processed T cell epitopes from human glutamic acid decarboxylase identified using mice transgenic for the type 1 diabetes associated MHC class II allele DRB1*0401. *J. Clin. Invest.*, 98, 1996, s. 2597–2603.
- Yu L., Gianani R., Eisenbarth G.:** Quantitation of glutamic acid decarboxylase autoantibody levels in prospectively evaluated relatives of patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, 43, 1994, s. 1229–1233.