

Aus dem Institut für Experimentelle Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Nachweis, Prävalenz und physiologische Bedeutung von
Autoantikörpern gegen den Insulin like Growth Factor-1
Rezeptor im Menschen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christian Schwiebert

aus Berlin

Datum der Promotion: 05.03.2021

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt (Deutsch)	2
Abstract (Englisch)	3
Abkürzungen.....	4
Einführung.....	5
Fragestellung	8
Methodik	9
Ergebnisse.....	12
Diskussion.....	18
Literaturverzeichnis	21
Eidesstattliche Versicherung	25
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	26
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen.....	28
Lebenslauf	55
Komplette Publikationsliste	57
Danksagung.....	59

Abstrakt (Deutsch)

Die Inzidenz von Autoimmunitäten nimmt weltweit zu, und die Beteiligung von Autoantikörpern (aAK) wird zunehmend als pathologisches Prinzip bei Erkrankungen anerkannt. Natürliche Autoantikörper gegen den IGF1-Rezeptor (IGF1R-aAK) wurden im Zusammenhang mit der Endokrinen Orbitopathie (Graves' Ophthalmopathy, GO) beschrieben. Andere physiologische Funktionen von natürlichen IGF1R-aAK sind aktuell nicht bekannt. Bei Patienten mit Morbus Basedow und gesunden Kontrollen zeigte sich eine relativ hohe Prävalenz von IGF1R-aAK. Der IGF1-Rezeptor (IGF1R) ist für die Energiehomöostase, körperliche Entwicklung und für Wachstum von Knochen und Muskulatur von hoher Bedeutung. Für die Identifizierung von Patienten mit IGF1R-aAK wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Test aufgebaut, bei dem ein Luciferase-IGF1R-Fusionsprotein genutzt wird. Anhand einer klinischen Beobachtungsstudie sollte getestet werden, ob die IGF1R-aAK mit der Körperkraft im Menschen assoziiert ist. Hierzu wurden Serumproben (n = 408) von jungen übergewichtigen Probanden (n = 143) während einer Lebensstilinterventionsstudie analysiert. Die Probanden konnten in zwei Kategorien eingeteilt werden, i.e., mit oder ohne nachweisbare IGF1R-aAK. Elf von 143 Probanden (7,7%) erwiesen sich anhand der Kriterien für Ausreißer-Werte als positiv für IGF1R-aAK. Von einigen der positiven und negativen Seren wurden die Antikörper isoliert. Diese zeigten in vitro eine antagonistische Aktivität am IGF1R. Beim Vergleich der Probanden zeigten sich keine Unterschiede im mittleren Körpergewicht, BMI, Körpergröße oder Alter. Allerdings unterschieden sich die IGF1- und Leptin-Konzentrationen zwischen den IGF1R-aAK-positiven und -negativen Probanden in einer Weise, die ein ungünstiges Verhältnis von Muskel- zu Fett-Anteil bei den IGF1R-aAK positiven Probanden erwarten lassen. Diese Hypothese wurde beim Vergleich von drei Parametern der Körperkraft unterstrichen. Die Sprungfähigkeit aus dem Stand sowie die Stärke der rechten und linken Hand waren bei den IGF1R-aAK-positiven Probanden im Vergleich zu den IGF1R-aAK-negativen Probanden signifikant geringer. Wir schlussfolgern, dass natürlich vorkommende IGF1R-aAK bei scheinbar gesunden Probanden nachweisbar sind und für die IGF1-abhängige IGF1R-Aktivierung als Antagonisten wirken können und mit einer reduzierten physischen Kraft verbunden sind. Obwohl die Kausalität dieser Assoziation unklar ist, implizieren die Daten einen möglichen Einfluss der IGF1R-Autoimmunität auf die Muskelentwicklung.

Abstract (Englisch)

The incidence of autoimmunity is globally on the rise, and the involvement of autoantibodies (aAb) is increasingly recognized as a pathological principle in a growing number of human diseases. Natural autoantibodies to the IGF1 receptor (IGF1R-aAb) have been described in relation to Graves' ophthalmopathy (GO). Other physiological roles of natural IGF1R-aAb are not known. We reported a relatively high prevalence of aAb against the IGF1R in Graves' disease patients and controls. The IGF1 receptor (IGF1R) is important for energy homeostasis, physical development and growth of bone and muscle. In order to enable the identification of patients with IGF1R-aAb, new diagnostic methods were developed as part of this work. An assay based on an immunoprecipitation step was developed employing a fusion protein of the IGF1R with firefly luciferase. In this study, the hypothesis was tested that IGF1R-aAb is associated with the development of muscles and physical strength in humans. Serum samples (n = 408) from young overweight subjects (n = 143) were collected during a lifestyle intervention study. Anthropometric parameters along with leptin, IGF1 and IGF1R-aAb concentrations were analyzed, and the subjects were categorized into positive or negative for IGF1R-aAb. Eleven out of 143 subjects (7.7%) were positive for IGF1R-aAb based on the mathematical criteria for outlier values. Identified IGF1R-aAb were molecularly characterized and showed antagonistic activity in vitro impairing IGF1-mediated IGF1R activation. Mean body weight, height or age were similar between IGF1R-aAb positive and negative subjects. However, the IGF1 and leptin concentrations differed between the IGF1R-aAb positive and negative subjects in a way that an unfavorable muscle-to-fat ratio can be expected in the IGF1R-aAb positive subjects. This hypothesis was underlined when comparing three parameters of physical strength. Jumping ability as well as right and left handgrip strengths were significantly lower in the IGF1R-aAb positive as compared to the IGF1R-aAb negative subjects. We conclude that natural IGF1R-aAb are detectable in apparently healthy subjects and are capable of antagonizing IGF1-dependent IGF1R activation. Moreover, presence of IGF1R-aAb is associated with poor physical strength. Even though the causality of this association is unclear, the data imply a potential influence of IGF1R autoimmunity on muscle development.

Abkürzungen

aAK / aAb	Autoantikörper / autoantibody
AID	autoimmune disease (Autoimmunerkrankung)
BMI	Body-Mass-Index (Körpermasseindex)
BSA	bovine serum albumin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 Ham
FCS	fetal calf serum
GD	Graves' Disease (Morbus Basedow)
GH	growth hormone
GO	Graves' ophthalmopathy
HEK	human embryonic kidney
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Ig	Immunglobulin
IGF1	Insulin like Growth Factor-1
IGF1R	Insulin like Growth Factor-1 Rezeptor
IGF1R-aAK	Insulin like Growth Factor-1 Rezeptor-Autoantikörper
IGF2	Insulin like Growth Factor-2
IQR	interquartile range (Interquartilsabstand)
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
Luc	firefly luciferase
mAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCF7	humane Brust-Adenokarzinom-Zellen
MHC	Major Histocompatibility Complex
PA	Protein-A Sepharose
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
RLU	relative light units (relative Lichteinheiten)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TSHR	thyroid stimulating hormone receptor (TSH-Rezeptor)
ÜN	über Nacht

Einführung

Werden körpereigene Proteine bzw. Zellen von den Erkennungsmechanismen des Immunsystems als nicht körpereigen identifiziert, werden durch die zelluläre und humorale Immunabwehr Mechanismen aktiviert, die Organe und körpereigene Strukturen zerstören können. Erfolgen diese Prozesse im Zusammenhang mit

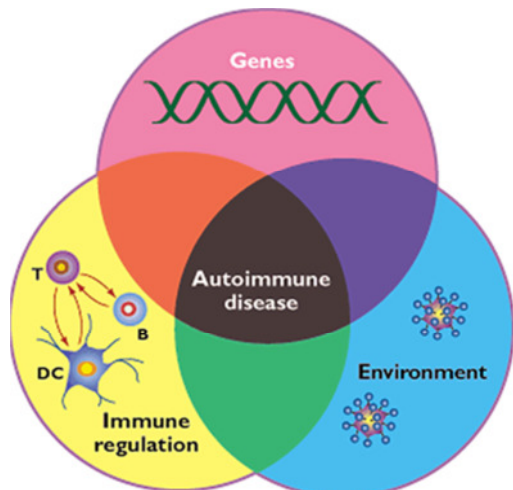


Abbildung 1: Relevante Komponenten für die Entwicklung einer Autoimmunerkrankung. Das Risiko für eine Autoimmunerkrankung wird wesentlich von der genetischen Prädisposition, von Umweltfaktoren und immunregulatorischen Faktoren bestimmt, Abb. aus [4].

klinischen Symptomen, wird dieser Ablauf als Autoimmunerkrankung (AID) bezeichnet. T-Zellen werden im Rahmen der klonalen Deletion im Thymus durch Bindung an MHC Moleküle in die Apoptose getrieben oder positiv für den Körper selektiert, so dass in der Folge die zirkulierenden T-Zellen körpereigene Strukturen tolerieren (Immuntoleranz) [1, 2]. Präsentieren MHC-Moleküle körperfremde Bestandteile, die den körpereigenen ähneln, so kann es zu einer autoreaktiven Reaktion führen, die molekulares Mimikry genannt wird [3].

Für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen gibt es drei relevante Komponenten, i.e., eine genetische Prädisposition, Umwelteinflüsse und immunregulatorische Faktoren (Abb. 1) [4]. Besonders das Zusammenspiel von genetischer Prädisposition in Kombination mit Einflüssen aus der Umwelt und Lebensstilfaktoren (Adipositas, Stress, Infektionen) ist für das Erkrankungsrisiko von hoher Relevanz [5, 6]. Des Weiteren nimmt man an, dass endogene Prozesse dazu führen, dass ein beträchtlicher Anteil autoreaktiver T-Zellen den Mechanismen der Kontrolle und Deletion im Thymus entgehen und in der Folge eine Autoimmunität verursachen können [7, 8]. Aktuell sind mehr als 100 Autoimmunerkrankungen mit einer zusammengenommenen Prävalenz von ca. 5-8% und einer in den letzten Jahren steigenden Inzidenz bekannt. Grundsätzlich können die Krankheiten in zwei Gruppen eingeteilt werden. Krankheiten, bei denen sich das Immunsystem gegen einzelne Organstrukturen richtet und systemische Krankheiten, die nicht organspezifisch sind, zu denen auch der rheumatische Formenkreis zählt [9]. Die Diagnose von Autoimmunerkrankungen erfolgt meist über den Nachweis von Autoantikörpern (aAK).

Der Insulin-like Growth Factor 1-Rezeptor (IGF1R) bildet ein zentrales Signalmolekül der Wachstumshormonachse, über die u.a. die Knochen- und Muskelentwicklung gesteuert wird. Der IGF1R zählt zu den Transmembranrezeptoren und zur Subfamilie der Tyrosinkinase Rezeptoren und besteht aus zwei durch Disulfidbrücken miteinander verbundenen alpha- und beta-Untereinheiten ($2\alpha 2\beta$ Subunits, hetero-Tetramer). Die Bindung des IGF1 erfolgt an der extrazellulären Domäne der α -Untereinheit des IGF1R. Dadurch wird die Konformation des Rezeptors verändert und die Tyrosinkinase-Domäne auf der intrazellulären β -Untereinheit aktiviert [10, 11]. Die IGF1R-Signalübertragung (Abb. 2) [11] umfasst die Autophosphorylierung und anschließende Tyrosin-Phosphorylierung von Shc und den Insulinrezeptorsubstraten (IRS) 1, 2, 3 und 4, die als cytoplasmatische Adapter-Moleküle weitere Proteine zu den Zellmembranrezeptoren rekrutieren [12-14]. IRS dienen somit als Docking-Proteine und können mehrere Signalwege aktivieren, einschließlich der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K), Akt und der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) [11, 12, 15, 16].

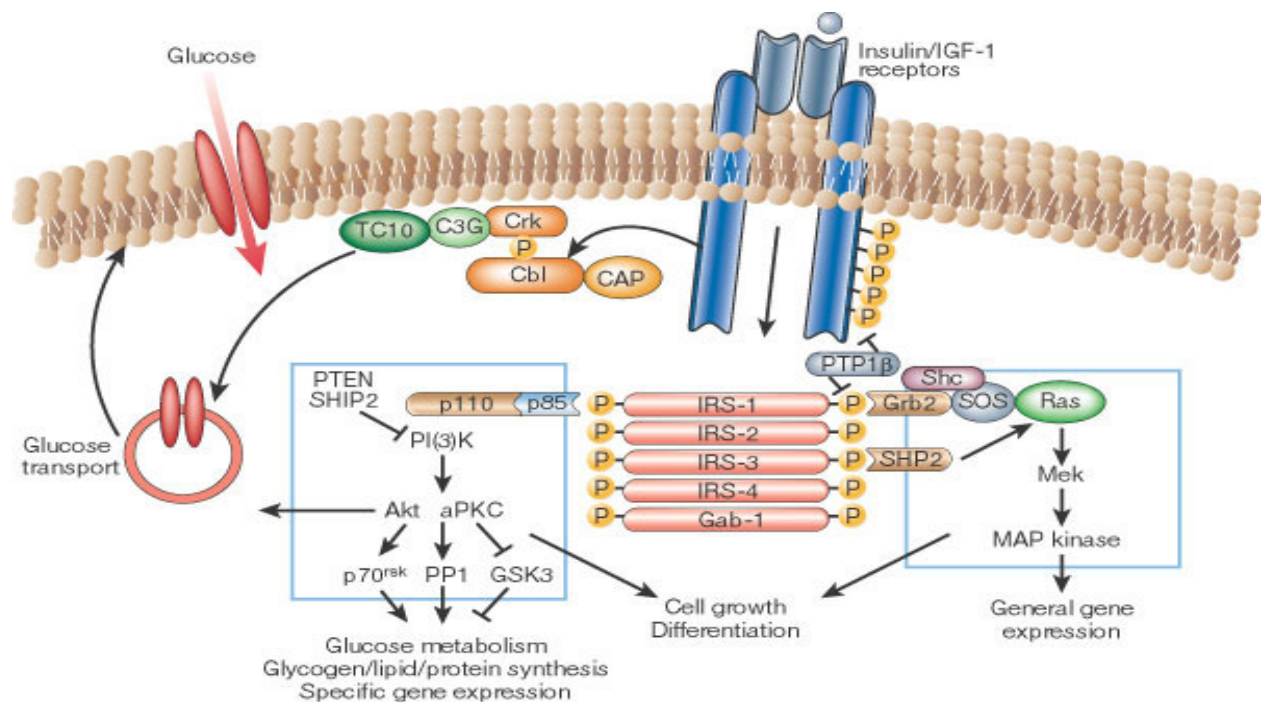


Abbildung 2: Insulin/IGF-1 Rezeptor Signaltransduktion. Die Phosphorylierung der IRS (Insulin receptor substrate) Proteine wird durch den aktivierten Insulin/IGF-1 Rezeptor katalysiert. Innerhalb der Signalkaskade aktivieren die IRS Proteine durch Rekrutierung weiterer Proteine drei unterschiedliche Signalwege: PI3Kinase Weg, Cbl/CAP (Casitas B lineage lymphoma / Cbl associated Protein) Weg und den MAP (mitogen-activated protein) Kinase Weg, Abb. aus [11].

Die Aktivierung dieser Signalwege induziert unterschiedliche biologische Wirkungen von IGF1, einschließlich Stimulation des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung, der Migration sowie der Inhibition von Apoptose [17-19]. Die Proliferation von Zellen wird

durch die Aktivierung der Gentranskription und der erhöhten Proteinsynthese über die Aufnahme von Aminosäuren unterstützt. Ebenfalls werden zahlreiche Enzyme induziert oder posttranslational in ihrer Aktivität beeinflusst [11]. Viele Krankheiten leiten sich aus der Störung des IGF1 / Insulingleichgewichtes im humanen Stoffwechsel ab und können im Verlauf weitere pathologische Veränderungen auslösen.

Der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor 1 (IGF1) und IGF2 wie auch supraphysiologische Insulinkonzentrationen können als positive Liganden dienen. Alle aktivieren dieselbe intrazelluläre Downstream-Kaskade, i.e., die ligandenabhängige Autophosphorylierung von Tyrosylresten in der cytoplasmatischen Domäne von IGF1R [20]. Die IGF1R-Aktivierung hat direkte Auswirkungen auf die Genexpression, die Proteinbiosynthese, den Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel sowie die Zellproliferation [21]. Studien mit transgenen Mausmodellen haben eine zentrale Bedeutung für das Muskel- und Knochenwachstum gezeigt [22]. Mutationen in den Genen, die entweder für IGF1R oder IGF1 kodieren, verursachen pränatale und postnatale Wachstumsbeschränkungen und Entwicklungsverzögerungen [23]. Das pathogene Spektrum der betroffenen Patienten hängt von der Art und dem Ort der Mutation und ihren strukturellen Konsequenzen ab [24]. Neben der Kontrolle des regelmäßigen Wachstums von Knochen und Muskeln, der physischen Stärke und des Stoffwechsels ist die IGF1R-abhängige Signalübertragung für die Krebsentstehung und -progression von großer Bedeutung [25].

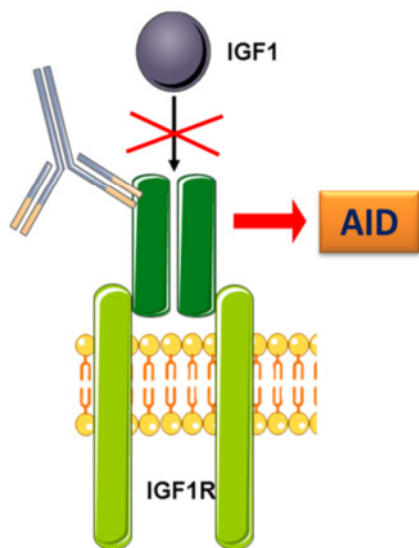
Aus bisher unbekanntem Gründen entwickeln sich Autoantikörper gegen endokrine Rezeptoren in einer Untergruppe menschlicher Probanden. Das bekannteste Beispiel ist der Thyrotropinrezeptor (TSHR). Sowohl blockierende als auch stimulierende TSHR-aAK werden als Modulatoren der Schilddrüsenachse beschrieben, die einen Hypo- oder Hyperthyreose-Phänotyp verursachen [26, 27]. Die Stimulation des TSHR durch TSHR-aAK ist die Ursache für Morbus Basedow (Graves' Disease, GD) und mit dem Risiko einer Endokrinen Orbitopathie (Graves' Ophthalmopathy, GO) verbunden [28]. IGF1R-aAK sind auch an der GD beteiligt und wirken möglicherweise synergistisch mit TSHR-aAK bei der Pathogenese von GO, indem sie die Expansion des retroorbitalen Gewebes und die Synthese der extrazellulären Matrix stimulieren und dadurch eine Augapfelproptose verursachen [29-31]. Diese Hypothese wird durch Zellkulturexperimente gestützt, die auf eine Synergie (cross-talk) zwischen beiden Rezeptoren hinweisen [32, 33]. Eine direkte Quantifizierung von natürlichem IGF1R-aAK über unser neues Verfahren konnte jedoch keinen Unterschied zwischen GO-

Patienten und Kontrollen feststellen [34]. Somit bleibt eine klinische und physiologische Bedeutung der messbaren IGF1R-aAK unklar.

Fragestellung

Die bisherigen Arbeiten haben gezeigt, dass es in gesunden und erkrankten Menschen Autoantikörper gegen den IGF1-Rezeptor (IGF1R-aAK) geben kann. Es konnten allerdings keine Unterschiede zwischen Patienten mit Morbus Basedow und gesunden Kontrollen festgestellt werden.

Somit stellt sich die Frage, ob IGF1R-aAK eine physiologische Relevanz haben. Da der IGF1 Signalweg ganz entscheidend für die gesunde Entwicklung, d.h., für das



Körperwachstum, die Muskelentwicklung und Fettverteilung ist, wäre eine Studie von Kindern bzgl. ihres Wachstums, ihrer physischen Kraft und Körperzusammensetzung im Hinblick auf das Vorhandensein oder die Abwesenheit von IGF1R-aAK sinnvoll und zielführend. Als Hypothese steht diesen Überlegungen der Gedanke zugrunde, dass IGF1R-aAK die gesunde Entwicklung stören, das Wachstum und die Fettverteilung beeinflussen und zu einer geringeren Körperkraft führen könnten [35].

Abbildung 3: Grafische Darstellung der Hypothese. Natürliche IGF1R-aAK hemmen die Bindung bzw. Signalweiterleitung von IGF1 und könnten Einfluss auf das Wachstum, die Muskelausbildung und die physische Entwicklung von Kindern und Jugendlichen haben bzw. zur Entstehung einer Autoimmunerkrankung (AID) führen.

Als klinisch relevante Studie steht für die Bearbeitung dieser Hypothese eine Probensammlung von einer Kohorte junger, übergewichtiger Probanden zur Verfügung, die an einer multimodalen Interventionsstudie zum Lebensstil teilgenommen haben, und bei denen die Kontrolle des Körpergewichts im Vordergrund stand [36]. Die Gründe für die Wahl dieser Kohorte beruhen hauptsächlich auf ihrer hervorragenden klinischen Charakterisierung, dem jungen Alter der Probanden, die dadurch noch nicht an Komorbiditäten und altersbedingten Erkrankungen leiden, sowie der Verfügbarkeit von Längsschnittproben über den Studienzeitraum von 18 Monaten, die eine Analyse der Stabilität von IGF1R-aAK über die Zeit in einem Individuum ermöglichen [35].

Methodik

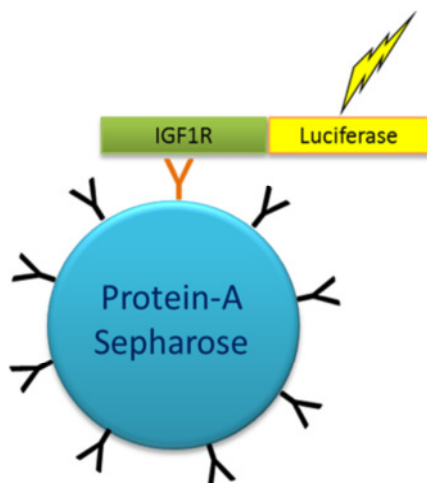
Erzeugung von IGF1R-Luc produzierenden Zellen

HEK 293 Zellen wurden in DMEM 10% FCS kultiviert und mit pIRESneo-IGF1R-Luc unter Verwendung von FuGENE6-Reagenz (Promega, Madison, USA) transfiziert. Durch Zugabe von 0,8 mg/mL G418 wurden 48 h nach Transfektion stabile Transfektanten erzeugt. Anschließend wurden Klone ausgewählt, die hohe Mengen an rekombinantem Protein stabil exprimieren (HEK 293-IGF1R-Luc). Abschließend wurden die stabilen HEK 293-IGF1R-Luc-Zellklone auf die Bindung von markiertem IGF1 analysiert [34].

Rekombinante Expression von IGF1R-Luc Fusionsproteinen

Konfluente HEK 293-IGF1R-Luc Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen in DMEM 10% FCS kultiviert. Die Zellen wurden durch Abschaben von der Oberfläche in PBS geerntet und durch Zentrifugation bei 1000 g konzentriert. Die in PBS gewaschenen Zellpellets wurden in Extraktionspuffer auf Eis lysiert (20 mM HEPES-NaOH (pH 7,5), 50 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% Glycerin). Die Zellsuspension wurde 15 min bei 5000 g, 4°C zentrifugiert und der Überstand bei -70°C gelagert [34, 35].

Immunpräzipitation und Quantifizierung von IGF1R-aAK



Die IGF1R-aAK werden über den Fc-Rezeptor des Immunglobulins unspezifisch immobilisiert, wodurch die variablen Bereiche frei präsentiert werden und eine spezifische Bindung am IGF1R Teil des Fusionsproteins möglich ist. Der entstandene aAK-Protein A-Reporter Komplex wird zur qualitativen und quantitativen Messung über die sensitive Luciferase genutzt. (Abb. 4). Der IGF1R-Luc-Zellextrakt wurde 1:10 mit Puffer (20 mM HEPES-

Abbildung 4: aAK-Protein A Reporter Komplex. Zur Detektion der aAK wird das Fusionsprotein eingesetzt, dass von aAK gebunden und über Protein A Sepharose als Komplex präzipitiert und gemessen wird.

NaOH (pH 7,5), 50 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% Glycerin 5 mg/ml BSA) verdünnt. Für Immunpräzipitationsstudien wurden 100 µL Extrakt (~10E+7 RLU) mit 10 µL Serum

über Nacht (ÜN) bei 4°C inkubiert. Immunkomplexe wurden durch Zugabe von 100 µL 10% iger Protein A-Sepharose-Suspension (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) für 1 h bei RT präzipitiert. Protein A-Sepharose wurde pelletiert und mit 1 mL Waschpuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 60 mM NaCl, 0,02% Tween 20) drei Mal gewaschen [34, 35]. Die Luciferase-Aktivität wurde in einem Luminometer (Berthold, Bad Wildbad, Deutschland) gemessen und als relative Lichteinheiten (RLU) aufgezeichnet (Abb. 5).

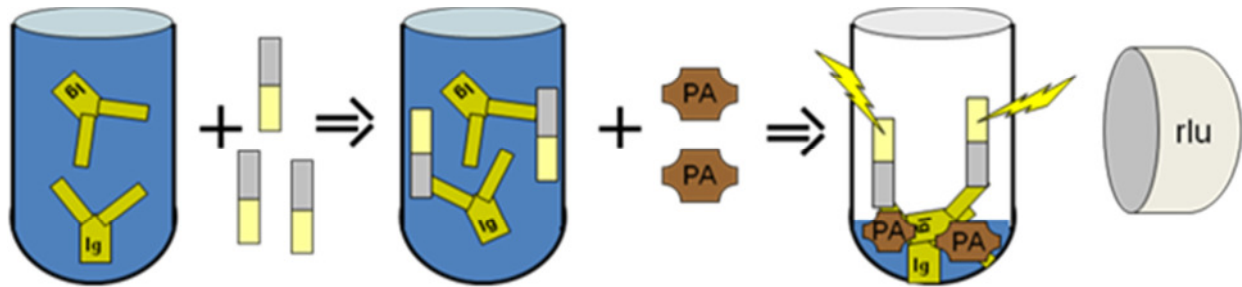


Abbildung 5: Testprinzip im Röhrenformat. Die in Serum vorliegenden Antikörper (Ig) binden spezifisch an das IGF1R-Luciferase Fusionsprotein. Durch Zugabe von Protein-A (PA) erfolgt die Komplexbildung und Präzipitation. Das Lumineszenzsignal (relative light units, rlu) wird nach multiplen Wasch- und Zentrifugationsschritten proportional zur aAK Konzentration detektiert.

Isolierung von humanen Immunglobulinen (Ig)

Humanserum (1 mL) wurde mit PBS (1 mL) verdünnt und ÜN bei 4°C mit 0,2 mL Protein G-Sepharose inkubiert. Die Komplexe wurden pelletiert und 10 x mit PBS gewaschen. Gebundene Ig wurden mit 25 mM Zitronensäure (pH 3,0) eluiert, und der pH Wert unter Verwendung von 1 M HEPES-NaOH (pH 8,0) auf pH 7,0 eingestellt. Eluierte Ig wurden unter Verwendung einer Speedvac bei RT auf 100 µL (~10 mg/mL) konzentriert. Das Protein wurde mittels Sephadex G25 Gelfiltration in DMEM/F12 transferiert [34].

Serumproben von Kindern, die an der Interventionsstudie teilgenommen haben

Serumproben (n = 408) von adipösen Kindern und Jugendlichen (n = 143), die an einer Interventionsstudie zur Reduzierung des Körpergewichts („MAINTAIN“) teilnahmen, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Abteilung für pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin gewonnen [36]. Die Studie wurde gemäß den Richtlinien der Erklärung von Helsinki durchgeführt und von der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin (EA2/015/09, 8.4.2009) genehmigt sowie bei ClinicalTrials (NCT00850629, 17.2.2009) registriert. Die Einverständniserklärung der Probanden bzw. eines oder beider Elternteile wurde vor

Studienbeginn eingeholt. Die Proben wurden drei Monate vor (T-3), bei Studieneintritt (T0) und nach Abschluss der Studie nach 12 Monaten (T12) entnommen [35]. Die zu analysierenden Proben wurden für die klinischen Merkmale verblindet und gemessen.

Anthropometrische Analysen

Drei Monate vor der Intervention im Lebensstil (T-3) wurde von allen Teilnehmern eine Reihe anthropometrischer Variablen analysiert, darunter Alter, Gewicht, Größe, Griffstärke der rechten und linken Hand, Sprungfähigkeit und Tailen Umfang [36]. Eine Blutprobe wurde entnommen und die endokrinen Parameter vom lokalen Diagnoseanbieter bestimmt (Labor Berlin - Charité Vivantes GmbH). Die gleichen Parameter wurden zu Studienbeginn (T0) und zwölf Monate später (T12) bestimmt [35].

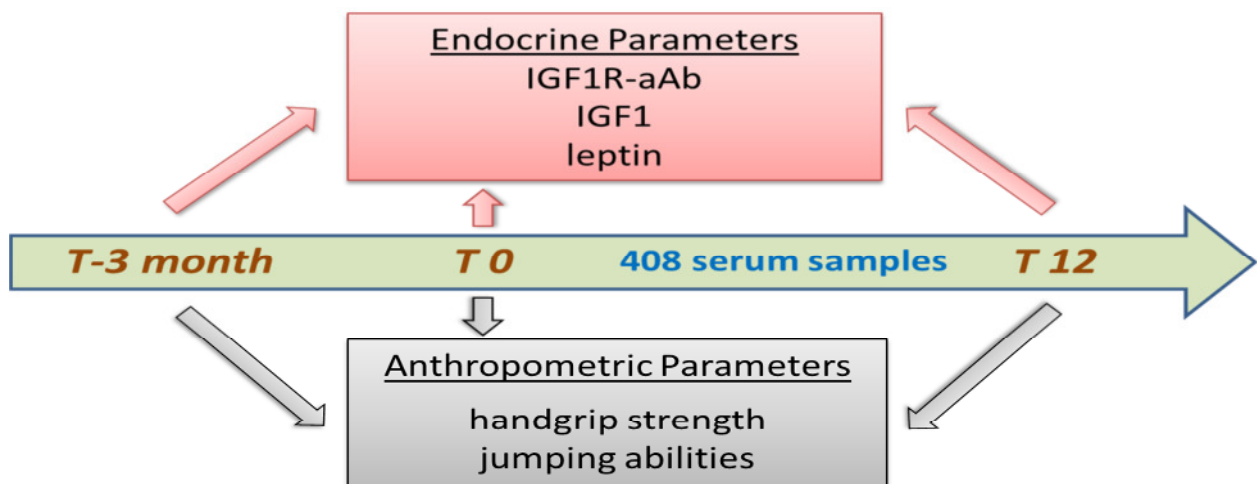


Abbildung 6: Von insgesamt 143 Teilnehmern wurden zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten T-3, T0 und T12 sowohl endokrine als auch anthropometrische Daten erhoben. Zum Zeitpunkt T12 befanden sich insgesamt 408 Proben in der Serumbank. Als endokrine Parameter wurden u.a. die Konzentrationen von IGF1R-aAK, IGF1 und Leptin ermittelt und als anthropometrische Parameter Körpergewicht, Größe, BMI, die Handgriffstärke und die Sprunghöhe.

Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism v4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) und mit SAS Version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA) durchgeführt. Die Daten werden mit Ausnahme von Alter und Geschlecht als Median und IQR dargestellt. Um die Unterschiede zwischen IGF1R-aAK-positiven und IGF1R-aAK-negativen Teilnehmern zu testen, wurde der zweiseitige nichtparametrische U-Mann-Whitney-Test verwendet. Die Signifikanzwerte (p-Werte) können möglicherweise nicht als bestätigend interpretiert werden, da alle Analysen als explorativ angesehen und nicht für mehrere Tests angepasst und korrigiert wurden [35].

Ergebnisse

Funktionale Expression von IGF1R-Luc in HEK 293-Zellen

Untransfizierte HEK 293 wie auch transfizierte HEK 293-IGF1R-Luc Zellen zeigten eine Bindung von Acridiniumester-markiertem IGF1, die durch unmarkiertes IGF1 konkurriert werden konnte ([34] Fig. 1). Die Bindung von markierten IGF1 an HEK 293-IGF1R-Luc-Zellen war im Vergleich zu untransfizierten HEK 293-Zellen höher, was auf eine erfolgreiche Überexpression und funktionelle Insertion des IGF1R-Luc-Fusionsproteins in die Plasmamembran hinweist. Da in der Membranfraktion von stabil transfizierten HEK 293-IGF1R-Luc-Zellen größere Mengen an rekombinantem IGF1R-Fusionsprotein gefunden wurden, konnte diese Annahme unterstützt werden [34].

Charakterisierung des IGF1R-aAK-Tests und Vermessung positiver Seren

Fünf verschiedene IGF1R-aAK positive Seren wurden ausgewählt und seriell verdünnt. Die Messungen ergaben konzentrationsabhängige Werte, die auf einen proportionalen Anstieg des IGF1R-aAK-Testsignals mit der IGF1R-aAK-Konzentration hinweisen ([34] Fig. 3A). Dieses Ergebnis wurde mit einem kommerziellen monoklonalen Antikörper (mAK) gegen den IGF1R verifiziert. Die schrittweise Verdünnung des IgG-Präparats ergab einen konzentrationsabhängigen Signalabfall. Das cutoff-Kriterium für die Positivität wurde bei 15 ng IgG/mL des mAK erreicht. Matrixeffekte wurden getestet, indem ein positives und ein negatives Serum im Verhältnis 1:1 gemischt und die IGF1R-aAK-Konzentrationen analysiert wurden. Die Werte entsprachen dem arithmetischen Mittel beider Proben, was darauf hinweist, dass keine Matrixeffekte den IGF1R-aAK-Test störten ([34] Fig. 3B). Die Stabilität der IGF1R-aAK im Serum wurde durch Langzeit-Lagerungsexperimente bestimmt. Die Signalstärken der Proben im IGF1R-aAK-Test waren nach Inkubation bei 37°C bzw. 4°C über Zeiträume von bis zu 10 Tagen unter Verwendung eines Pools von 5 Seren als Testprobe stabil ([34] Fig. 3C).

Vergleich von Seren und isolierten Ig-Präparaten

Fünf verschiedene Kontroll- und fünf IGF1R-aAK-positive Serumproben wurden mit gereinigten Ig-Präparaten aus diesen Proben verglichen, um zu testen, ob der IGF1R-aAK-Test Autoantikörper gegen IGF1R bestimmt. Nur die Proben aus positiven IGF1R-aAK-Seren zeigten Luciferase-Signale nach der Immunpräzipitation. Die relativen Signalstärken aus positiven und negativen Proben sowie innerhalb der Gruppe von

IGF1R-aAK-positiven Proben waren in beiden Datensätzen ähnlich unabhängig von vorheriger Ig-Isolierung ([34] Tab.1). Aus Gründen der Handhabung, Geschwindigkeit und der Kosten erscheint es daher nicht erforderlich, Ig vor der Analyse im IGF1R-aAK-Test zu isolieren [34].

Prävalenz von Seren mit IGF1R-aAK und Korrelation zum GO-Status

Insgesamt 584 Serumproben von 108 GD-Patienten und 92 gesunde Kontrollseren wurden in der Augenklinik des Universitätsklinikums Essen gesammelt. Die ersten Patientenproben wurden innerhalb von 12 Monaten, nach den ersten GO Symptomen, im unbehandelten Status entnommen. Die Quantifizierung der IGF1R-aAK erfolgte mittels Immunpräzipitation. Acht der Kontrollseren zeigten ein positives Signal von mehr als 15000 RLU, während der Rest der Seren ($n = 84$) unter 7700 RLU lag und als negativ für IGF1R-aAK eingestuft wurde. Die negativen Seren wurden verwendet, um einen Grenzwert für positive Proben mit der durchschnittlichen RLU und SD (1401 ± 1360 RLU) im IGF1R-aAK-Test zu bestimmen. Durch Anwenden einer Grenze von Mittelwert plus 3 Standardabweichungen (SD) wurde als Kriterium für positive IGF1R-aAK ein Messwert von > 5480 RLU definiert, so dass ein Serum mit einem höheren Signal als positiv in Bezug auf IGF1R-aAK eingestuft wird [34]. Bei Anwendung dieses Kriteriums waren 10 von 92 Seren der Kontrollgruppe positiv, was einer Prävalenz von 11% für IGF1R-aAK entspricht ([34] Fig. 2A). In der Gruppe der GD-Proben ergaben 60 von 584 Proben (10%) Signale von > 5480 RLU und konnten somit als positiv für IGF1R-aAK eingestuft werden. Da die 60 positiven Proben von 15 GO-Patienten zu verschiedenen Zeiten stammen, liegt die Prävalenz von IGF1R-aAK in der Gruppe von GO-Patienten bei 14% (15 von 108). Von 11 der 15 positiven GO-Patienten standen mehr als drei aufeinanderfolgende Serumproben zur Verfügung. Die IGF1R-aAK-Konzentrationen waren in den einzelnen Proben sehr ähnlich, was auf eine gute Präzision des Tests und relativ konstante Titer von IGF1R-aAK bei den GO-Patienten hinweist ([34] Fig. 2B).

Prävalenz von IGF1R-aAK bei übergewichtigen jungen Probanden

Alle Serumproben ($n = 408$) wurden auf IGF1R-aAK analysiert. Die erhaltenen Signale (RLU) zeigten eine ungleichmäßige Verteilung (Abb. 7A). Einige Signale waren sehr hoch und weisen auf das Vorhandensein von Proben mit hohen IGF1R-aAK Konzentrationen hin. Als Grenzwert für die Definition der Positivität wurden zwei

Ausreißerkriterien angewendet: die Summe des 75. Perzentilwerts (P75) plus das 1,5-fache des Interquartilbereichs (IQR) aller Proben ($P75 + 1,5 \times IQR$) (Abb. 7A), bzw. die Summe des Mittelwerts innerhalb der Normalen Verteilung (ohne die höchsten 10% der Proben) plus die dreifache Standardabweichung (Mittelwert + 3SD) (Abb. 7B). Die Verfahren zeigten einen Grenzwert von 9057 RLU ($4786 \text{ RLU} + 1,5 \times 2847 \text{ RLU}$, Abb.

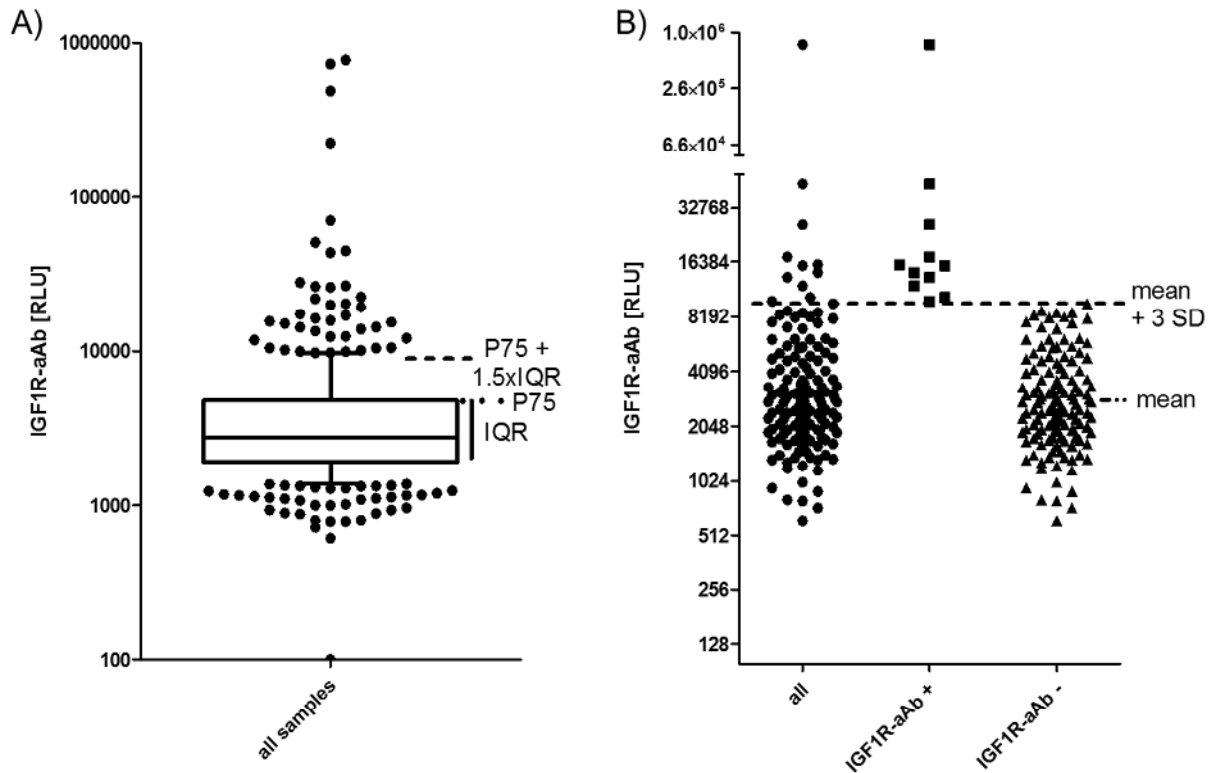


Abbildung 7: (A) Seren aus der vollständigen Probensammlung ($n = 408$) wurden auf IGF1R-aAK analysiert. Das Ausreißerkriterium von P75 plus dem 1,5-fachen des Interquartilbereichs ($P75 + 1,5 \times IQR$) wurde angewendet, um Proben mit positiven IGF1R-aAK zu identifizieren. (B) Analyse der Probanden zum Zeitpunkt T-3 Monate. Diese Analyse verwendete den Mittelwert plus drei Standardabweichungen (Mittelwert + 3 SD) als Ausreißerkriterium. Unabhängig vom verwendeten Ausreißerkriterium (A oder B) identifizierten beide Analysen die gleichen elf von 143 Probanden als positiv für natürliche IGF1R-aAK, Abb. aus [35].

7A) bzw. 8952 RLU ($3186 \text{ RLU} + 3 \times 1922 \text{ RLU}$, Abb. 7B). Die Anwendung dieser beiden Grenzwertkriterien auf die Daten ergibt eine Prävalenz von 11,3% – 11,5% von IGF1R-aAK-positiven Proben (Abb. 7A, B). Für die Analyse der potentiellen Relevanz des IGF1R-aAK für die klinischen Parameter, wurden die Probanden gemäß den Ergebnissen zum frühesten verfügbaren Zeitpunkt, bei Aufnahme in die Studie (T-3), als IGF1R-aAK positiv oder negativ klassifiziert. Unabhängig vom verwendeten Kriterium wurden dieselben elf Probanden als positiv für IGF1R-aAK eingestuft (Abb. 7B) [35].

Stabilität der IGF1R-aAK Konzentrationen während des Studienzeitraums

Von der Mehrheit der Probanden standen über einen Zeitraum von 15 Monaten drei longitudinale Proben zur Verfügung. Von den Zeitpunkten 3 Monate vor Beginn (T-3) über den Beginn (T0) bis zum Ende des zwölfmonatigen Studienzeitraums (T12). Während der gesamten Zeit der Studie blieb die Mehrheit der bei T-3 IGF1R-aAK positiven Probanden ($n = 11$) positiv für IGF1R-aAK, wobei sich die Signalstärke nur geringfügig änderte (Abb. 8A). Das zeigt eine hohe Stabilität der Autoimmunität gegenüber den IGF1R im Menschen. Vier Probanden aus der Gruppe der IGF1R-aAK-negativen Probanden entwickelten *de novo* natürliche IGF1R-aAK, und ihre bei T12 entnommenen Proben übertrafen den positiven Grenzwert (Abb. 8B). Die restlichen Probanden blieben unter dem Grenzwert bzw. waren negativ für IGF1R-aAK [35].

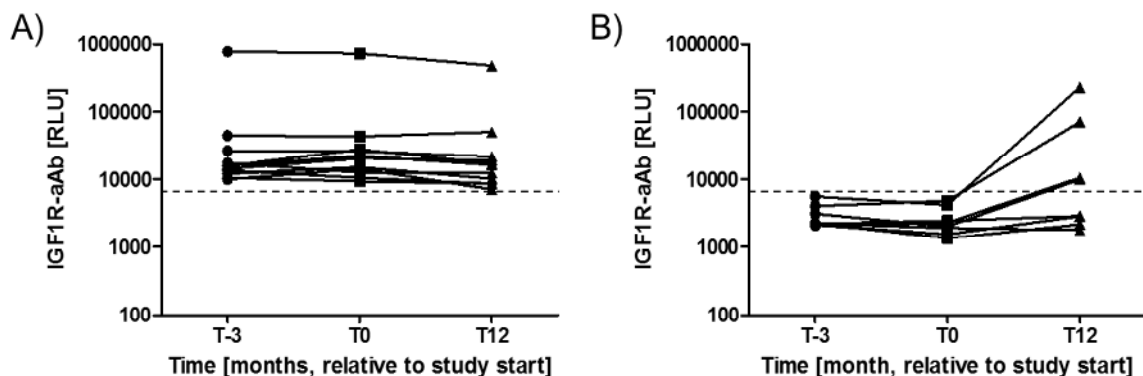


Abbildung 8: Verlauf der IGF1R-aAK-Konzentrationen im Zeitraum von 15 Monaten (3 Monate vor Studienbeginn (T-3), bei Studienstart (T0) und bei Studienende (T12)). (A) IGF1R-aAK positive Proben über den Studienzeitraum von T-3 bis T12. (B) Vier Proben entwickelten während der Studie natürliche IGF1R-aAK *de novo*. Signalstärken dieser Proben sind im Vergleich zu vier konstant negativen Proben dargestellt. Der Grenzwert für positive IGF1R-aAK wird durch die gestrichelten Linien gekennzeichnet, Abb. aus [35].

Vergleich anthropometrischer Parameter in Bezug auf IGF1R-aAK

Die Gruppe der elf Probanden, die als IGF1R-aAK-positiv identifiziert wurden, zeigte keine geschlechtsspezifische Ungleichverteilung. Sechs von 67 Jungen und fünf von 76 Mädchen waren positiv in der gesamten Kohorte (Abb. 9A). In ähnlicher Weise zeigten die Altersverteilung und das Durchschnittsalter in den Gruppen der IGF1R-aAK-positiven und -negativen Probanden keine Unterschiede ($12,7 \pm 2,0$ gegenüber $13,6 \pm 1,8$ Jahren bei T-3). Da die Probanden an einer Studie zur Gewichtsreduktion und -erhaltung teilnahmen, waren das Körpergewicht (Abb. 9B), das altersspezifische Fett (Abb. 9C) und der altersspezifische BMI (Abb. 9D) im Vergleich zu Referenzwerten relativ hoch, unterschieden sich jedoch zwischen den Gruppen von IGF1R-aAK

positiven und negativen Probanden nicht. Die Analyse der Körperzusammensetzung durch bioelektrische Impedanzanalyse zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen natürlichen IGF1R-aAK-positiven und -negativen Probanden [35].

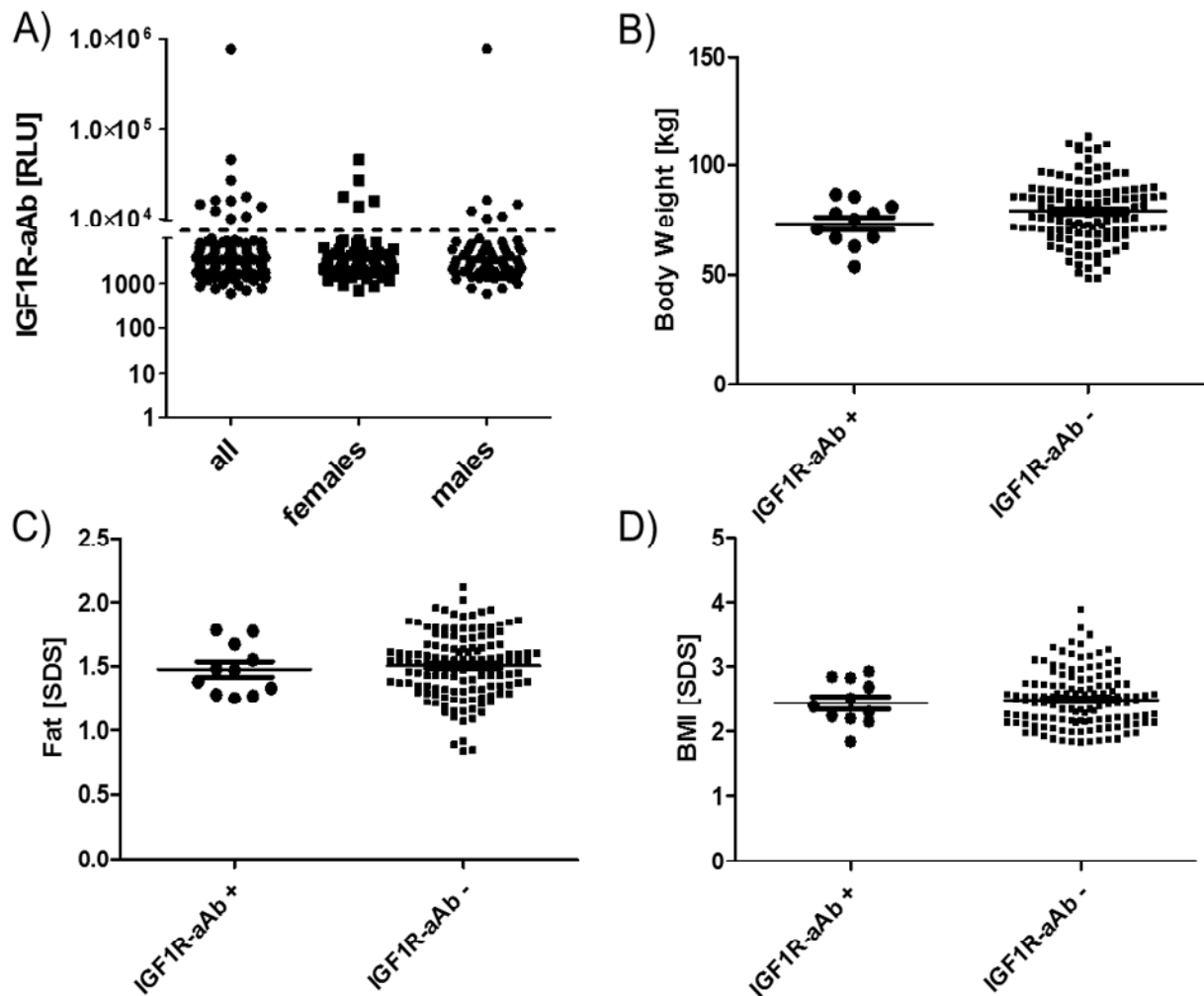


Abbildung 9: Vergleich von anthropometrischen Parametern zwischen Probanden mit positiven versus negativen IGF1R-aAK-Nachweis. Die Probanden wurden als IGF1R-aAK positiv (IGF1R-aAb +) bzw. negativ (IGF1R-aAb -) kategorisiert. Die beiden Gruppen unterschieden sich nicht in Bezug auf (A) Geschlechtsverteilung, (B) Körpergewicht, (C) Körperfett oder (D) BMI. Analyse durch U-Mann-Whitney-Test für ungepaarte nicht-normalverteilte Stichproben, Abb. aus [35].

Vergleich von Parametern des Hormonstatus und der Kraft in Bezug auf IGF1R-aAK

Unter den endokrinen Parametern wurde eine niedrigere durchschnittliche Konzentration (Median (IQR)) von zirkulierendem IGF1 in der Gruppe der IGF1R-aAK positiven im Vergleich zu den IGF1R-aAK negativen Probanden beobachtet (181,9 (133,4; 220,9) gegenüber 316,8 (211,4; 410,2) ng/mL, Abb. 10A). Parallel dazu unterschieden sich die Leptinkonzentrationen in umgekehrter Richtung. Leptin war bei den IGF1R-aAK-positiven Probanden leicht erhöht (30,1 (25,5; 43,4) gegenüber

23,3 (18,1; 29,9) ng/mL, Abb. 10B). IGF1R-aAK-positive Probanden zeigten eine relativ schlechte Sprungfähigkeit aus dem Stand mit geringer interindividueller Variation (25,0 (24,0; 28,0) gegenüber 28,0 (25,0; 31,5) cm, Abb. 10C). Die Stärke des rechten

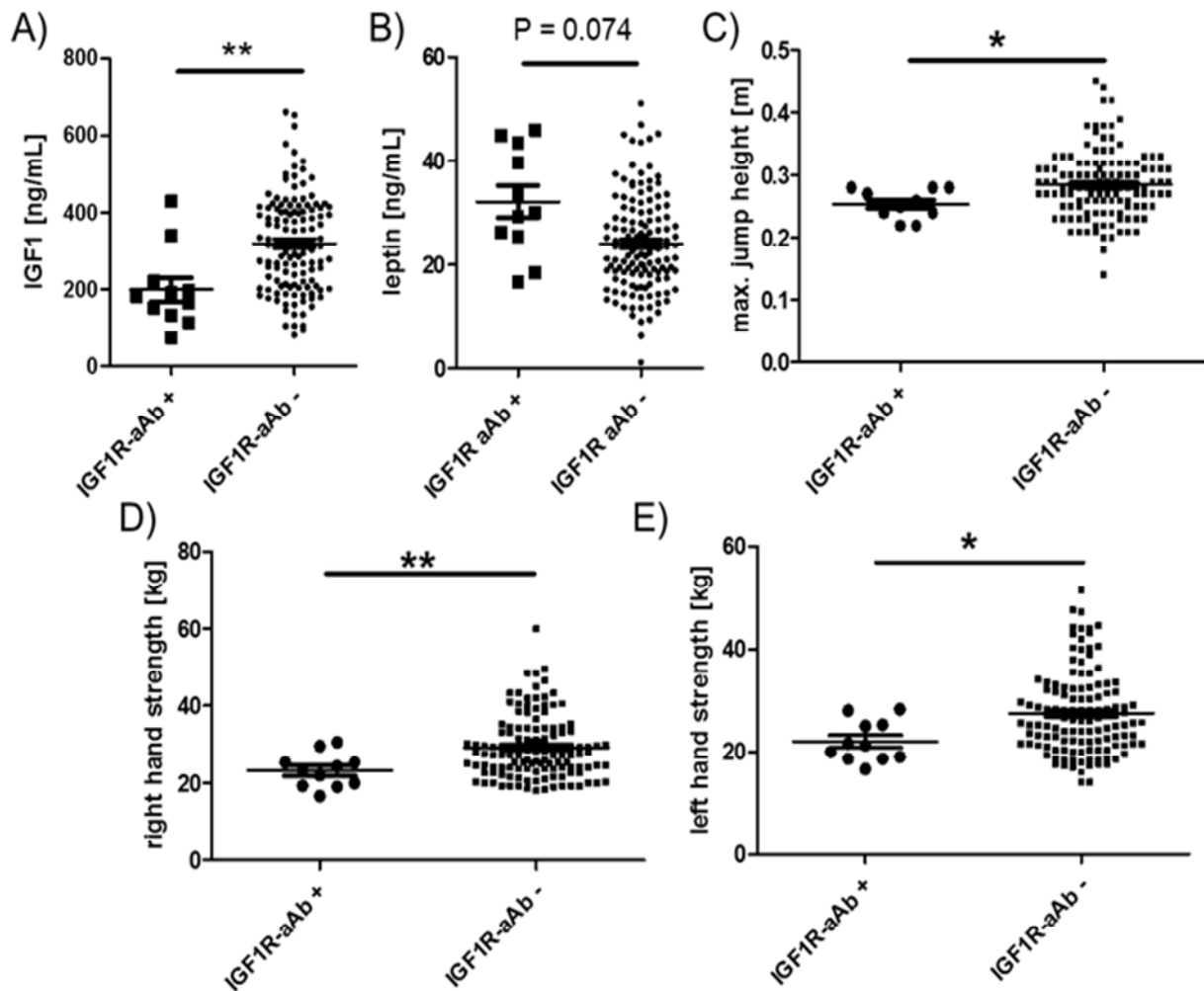


Abbildung 10: Vergleich der endokrinen Parameter und physischen Körperkraft zwischen den IGF1R-aAK positiven und negativen Probanden. Die Probanden wurden als IGF1R-aAK positiv bzw. IGF1R-aAK negativ kategorisiert. Beide Gruppen wurden hinsichtlich (A) IGF1-Konzentrationen, (B) Leptin-Konzentrationen, (C) maximaler Sprunghöhe sowie (D) Griffstärke für die rechte und (E) linke Hand verglichen. Analyse durch zweiseitigen nichtparametrischen U-Mann-Whitney-Test; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, Abb. aus [35].

Handgriffs (23,3 (19,3; 25,3) gegenüber 27,6 (23,6; 34,1) kg, Abb. 10D) und die Stärke des linken Handgriffs (21,3 (18,6; 25,3) gegenüber 26,0 (21,6; 32,1) kg, Abb. 10E) waren bei IGF1R-aAK-positiven Probanden im Vergleich zur Gruppe der IGF1R-aAK-negativen Probanden ebenfalls deutlich niedriger. Die interindividuelle Variabilität war innerhalb der IGF1R-aAK-positiven Gruppe im Vergleich zur Gruppe der IGF1R-aAK-negativen Probanden besonders gering [35].

Diskussion

Die mögliche Bedeutung von natürlichen Autoantikörpern gegen den IGF1R wird in dieser explorativen Studie vorgestellt. Es werden Hinweise auf ein relativ häufiges Vorhandensein und eine antagonistische Wirkung von natürlichen IGF1R-aAK bei jungen gesunden Probanden gezeigt. Es gibt eine Übereinstimmung der Ergebnisse mit der Hypothese, dass natürliche IGF1R-aAK von physiologischer Relevanz sein könnten und mit endokrinen Parametern des Stoffwechsels und der körperlichen Stärke assoziiert sind. Die Muskelentwicklung ist möglicherweise durch den negativen Effekt der IGF1R-aAK auf die anabolen IGF1 Signale eingeschränkt [35]. Für die Überprüfung dieser Hypothese wären allerdings prospektive Studien in der Kindesentwicklung nötig. Die Prävalenz von IGF1R-aAK bei den in dieser Studie analysierten Probanden betrug 7,7%. Das ist etwas niedriger als in der Studie mit erwachsenen GO-Patienten, in der 10-11% als IGF1R-aAK positiv identifiziert wurden [34]. Dieser leichte Unterschied kann krankheits-, alters- oder geschlechtsbedingt sein, da die Prävalenz von Autoantikörpern bei Autoimmunpatienten typischerweise höher ist als bei Gesunden, bei Erwachsenen höher als bei Kindern und im Allgemeinen bei Frauen höher als bei Männern [37].

Eine unabhängige Studie unter Verwendung eines neuartigen kommerziell erhältlichen IGF1R-aAK-Test-Nachweiskits berichtete über eine Prävalenz von etwa 25% bei Patienten [38]. Die Nachweismethode basiert auf einer IGF1R Proteinpräparation, die direkt auf einer festen Oberfläche immobilisiert wurde und die Menge an Immunglobulinen durch die Bindung an das rekombinante Protein quantifiziert. Nach unserer Erfahrung ist diese Art von Test-Design für Membranproteine schwierig durchzuführen und entsprechend unzuverlässig. Aufgrund der geringen Konzentrationen an natürlichen IGF1R-aAK und der Anwesenheit anderer Membranbestandteile ist das Signal-Rausch-Verhältnis typischerweise hoch. Dies wurde bereits während der Entwicklung eines TSHR-aAK-Tests [39-41] oder in Bezug auf aAK gegen Herzrezeptoren der G-Protein-gekoppelten Rezeptorfamilie gezeigt [42, 43]. Dennoch sind zusätzliche Studien erforderlich, in denen verschiedene Nachweismethoden direkt miteinander verglichen werden, um die Vor- und Nachteile verschiedener Ansätze herauszustellen und ihre potenzielle Eignung für die Diagnose von aAK gegen endokrine Rezeptoren zu testen [35].

Neben den beiden bereits erwähnten Methoden zur Quantifizierung von IGF1R-aAK gibt es auch biologische Tests für receptorspezifische aAK, die biochemische Effekte

quantifizieren. Solche Biotests nutzen typischerweise gereinigte Immunglobuline und werden z.B. für Studien von aAK gegen den TSHR [44] oder aAK gegen Herzrezeptoren [45] eingesetzt. Beim Morbus Basedow (Graves' Disease, GD) resultiert der Hyperthyreose-Phänotyp aus der spezifischen agonistischen Bindung von stimulierenden aAK gegen den TSHR [26, 27]. In ähnlicher Weise ist die Stimulierung von aAK zu Herzrezeptoren an der Chagas-Krankheit beteiligt [46, 47]. Im Gegensatz dazu werden in der Endokrinologie aber auch antagonisierende aAK beschrieben, z.B. bei Typ-B-Insulinresistenz, bei der aAK gegen den Insulinrezeptor die Signale von Insulin beeinträchtigen und eine Form von Diabetes verursachen, welche auf eine therapeutische Insulinanwendung nicht anspricht [48].

In unserer ersten Studie zu IGF1R-aAK isolierten wir Immunglobuline aus erwachsenen Patienten mit Basedow Augenbeteiligung (Graves' Ophthalmopathy, GO) und testeten ihre Auswirkungen auf die IGF1-Signalübertragung und die Proliferation von MCF7-Brustkrebszellen in vitro [34]. In Übereinstimmung mit unseren hier präsentierten Daten wurde die IGF1-induzierte Autophosphorylierung des IGF1R durch die Immunglobuline, die aus IGF1R aAK-positiven Seren isoliert wurden, spezifisch unterdrückt, was auf eine antagonistische Wirkung am IGF1R auf die IGF1-Signalübertragung hinweist. Solche antagonistischen Aktivitäten von IGF1R-aAK sind mit den hier geschilderten klinischen Befunden in der Studie übergewichtiger Kinder und Adoleszenten kompatibel. Eine verringerte körperliche Stärke in Kombination mit verringerten IGF1-Konzentrationen, die eine supprimierte GH-IGF1-Achse widerspiegeln, könnte mit einer kausal reduzierten IGF1-abhängige Muskelentwicklung assoziiert sein [35]. Die verringerte Sprungfähigkeit und Handgriffstärke wären auch mit einer antagonistischen Wirkung des IGF1R-aAK auf IGF1-unterstützte Muskeltrainingseffekte erklärbar [49]. Bemerkenswerterweise waren die Unterschiede in der Griffstärke der linken Hand aber etwas ausgeprägter als die Unterschiede in der rechten Hand, was eher auf einen entwicklungsbedingten und nicht gewohnheits- oder trainingsmäßigen Ursprung dieses Unterschieds hinweist. Die verringerte IGF1-Konzentration in Gegenwart von IGF1R-aAK weist Parallelen zu Kindern mit IGF1R-Mutationen auf [50, 51]. Es gibt jedoch auch Berichte von Probanden mit fehlerhafter IGF1R-Signalübertragung, bei denen erhöhte zirkulierende IGF1-Spiegel beobachtet wurden [24]. Hierzu sind zusätzliche Studien erforderlich, um den zugrundeliegenden Mechanismus zu erklären.

Eine besondere Stärke dieser Studie ist die relativ große Sammlung von Proben von jungen gesunden, aber übergewichtigen Probanden, die klinische Charakterisierung

mehrerer muskelbezogener und endokriner Parameter, die Verfügbarkeit von Längsschnittproben zur Quantifizierung der IGF1R-aAK-Konzentrationen über die Zeit und die In-vitro-Charakterisierung der antagonistischen Natur von IGF1R-aAK [35].

Darüber hinaus stimmen die relativ und unerwartet starken Assoziationen mit dem biologischen Wissen über die Relevanz der GH-IGF1-Achse für den Muskelaufbau überein. Die Ergebnisse erscheinen angesichts der antagonistischen Aktivität von IGF1R-aAK auf die IGF1-abhängigen Signalwege plausibel. Wir schließen daraus, dass eine Untergruppe von Kindern natürliche Autoantikörper gegen den IGF1R exprimiert, die mit einer verminderten körperlichen Stärke verbunden sind. Während diese Assoziation für die IGF1R-aAK-positiven Probanden gesundheitlich problematisch erscheint, da möglicherweise die anabolen Effekte von IGF1 negativ beeinträchtigt und die volle Muskelentwicklung behindert sind, wird auch berichtet, dass eine verringerte Aktivität in der GH-IGF1-Achse ebenso gesundheitliche Vorteile bieten kann [35].

Studien an Versuchsmodellen und Menschen mit Laron-Syndrom haben gezeigt, dass unter Bedingungen einer reduzierten Aktivität der GH-IGF1-Achse ein geringeres Krebs- und Diabetesrisiko und eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine lange Lebensdauer zu erwarten sind [52].

Zu erwähnen sind einige Limitationen der Studie. Erstens war die Anzahl der IGF1R-aAK-positiven Probanden relativ gering. Zweitens wurde keine Kohorte normalgewichtiger Kinder zum Vergleich analysiert, wodurch es schwierig ist, eine potenzielle Relevanz von IGF1R-aAK für Fettleibigkeit abzuleiten. Dies ist auf ethische Einschränkungen zurückzuführen, die die Entnahme von Serum von gesunden Kindern zu Forschungszwecken nicht zulassen. Drittens war die Studie beobachtend und explorativ und nicht darauf ausgelegt, potenzielle Kausalzusammenhänge zu identifizieren, was in prospektiven Studien noch getestet werden muss [35].

Zusammenfassend zeigt aber diese Studie eine potentiell sehr relevante Assoziation von IGF1R-aAK mit der Entwicklung von Sprungkraft und Handkraft in Kindern. Weiterführende Studien könnten sich nun auch mit den gesundheitsrelevanten Aspekten der Beeinflussung des Intermediärmetabolismus durch IGF1R-aAK befassen und die potentielle Relevanz der IGF1R-aAK für die großen endokrinen Erkrankungen wie Metabolisches Syndrom oder Diabetes mellitus herausarbeiten.

Literaturverzeichnis

1. Kroger, C.J.; Flores, R.R.; Morillon, M.; Wang, B.; Tisch, R. Dysregulation of thymic clonal deletion and the escape of autoreactive T cells. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis* **2010**, *58*, 449-457.
2. Fernando, M.M.A.; Stevens, C.R.; Walsh, E.C.; De Jager, P.L.; Goyette, P.; Plenge, R.M.; Vyse, T.J.; Rioux, J.D. Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS genetics* **2008**, *4*, e1000024.
3. Carl, J.W.; Liu, J.-Q.; Joshi, P.S.; El-Omrani, H.Y.; Yin, L.; Zheng, X.; Whitacre, C.C.; Liu, Y.; Bai, X.-F. Autoreactive T cells escape clonal deletion in the thymus by a CD24-dependent pathway. *The Journal of immunology* **2008**, *181*, 320-328.
4. Ermann, J.; Fathman, C.G. Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation. *Nature immunology* **2001**, *2*, 759-761.
5. Sepa, A.; Wahlberg, J.; Vaarala, O.; Frodi, A.; Ludvigsson, J. Psychological stress may induce diabetes-related autoimmunity in infancy. *Diabetes care* **2005**, *28*, 290-295.
6. Camprubí, C. & Monk, D. Does genomic imprinting play a role in autoimmunity? *Advances in experimental medicine and biology* **2011**, *711*, 103-116.
7. Morlacchi, S.; Soldani, C.; Viola, A.; Sarukhan, A. Self-antigen presentation by mouse B cells results in regulatory T-cell induction rather than anergy or clonal deletion. *Blood* **2011**, *118*, 984-991.
8. Dembić, Z.; Weiss, S.; Bogen, B. Thymic selection of immunoglobulin idiotype specific T-cells. *Thymus* **1994**, *22*, 141-152.
9. Gershwin, M.E.; Shoenfeld, Y. Cutting-edge issues in organ-specific autoimmunity. *Clinical reviews in allergy & immunology* **2011**, *41*, 123-125.
10. Kido, Y.; Nakae, J.; Accili, D. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **2001**, *86*, 972-979.
11. Saltiel, A.R.; Kahn, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **2001**, *414*, 799-806.
12. Delafontaine, P.; Song, Y.-H.; Li, Y. Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2004**, *24*, 435-444.
13. Tsuruzoe, K.; Emkey, R.; Kriauciunas, K.M.; Ueki, K.; Kahn, C.R. Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 impair IRS-1- and IRS-2-mediated signaling. *Molecular and cellular biology* **2001**, *21*, 26-38.
14. Johnson, G.L.; Lapadat, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **2002**, *298*, 1911-1912.
15. Manning, B.D.; Cantley, L.C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **2007**, *129*, 1261-1274.

16. LeRoith, D.; Werner, H.; Beitner-Johnson, D.; Roberts, C.T. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocrine reviews* **1995**, *16*, 143-163.
17. Stewart, C.E.; Rotwein, P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiological reviews* **1996**, *76*, 1005-1026.
18. Peruzzi, F.; Prisco, M.; Dews, M.; Salomoni, P.; Grassilli, E.; Romano, G.; Calabretta, B.; Baserga, R. Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis. *Molecular and cellular biology* **1999**, *19*, 7203-7215.
19. Juin, P.; Hueber, A.O.; Littlewood, T.; Evan, G. c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes & development* **1999**, *13*, 1367-1381.
20. Caball, M. Z.; Li, S.; Lemmon, E.; Bowen, M. E.; Hubbard, S. R.; Miller, W. T. The insulin and IGF1 receptor kinase domains are functional dimers in the activated state. *Nature communications* **2015**, *6*, 6406.
21. Blakesley, V.A.; Scrimgeour, A.; Esposito, D.; Le Roith, D. Signaling via the insulin-like growth factor-I receptor: does it differ from insulin receptor signaling? *Cytokine & growth factor reviews* **1996**, *7*, 153-159.
22. Baker, J.; Liu, J.P.; Robertson, E.J.; Efstratiadis, A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* **1993**, *75*, 73-82.
23. Abuzzahab, M.J.; Schneider, A.; Goddard, A.; Grigorescu, F.; Lautier, C.; Keller, E.; Kiess, W.; Klammt, J.; Kratzsch, J.; Osgood, D.; Pfäffle, R.; Raile, K.; Seidel, B.; Smith, R.J.; Chernausk, S.D.; Intrauterine Growth Retardation (IUGR) Study Group. IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *The New England journal of medicine* **2003**, *349*, 2211-2222.
24. Walenkamp, M.J.E.; Losekoot, M.; Wit, J.M. Molecular IGF-1 and IGF-1 receptor defects: from genetics to clinical management. *Endocrine development* **2013**, *24*, 128-137.
25. LeRoith, D.; Roberts, C.T. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer letters* **2003**, *195*, 127-137.
26. McLachlan, S.M.; Rapoport, B. Thyrotropin-blocking autoantibodies and thyroid-stimulating autoantibodies: potential mechanisms involved in the pendulum swinging from hypothyroidism to hyperthyroidism or vice versa. *Thyroid* **2013**, *23*, 14-24.
27. Diana, T.; Krause, J.; Olivo, P.D.; König, J.; Kanitz, M.; Decallonne, B.; Kahaly, G.J. Prevalence and clinical relevance of thyroid stimulating hormone receptor-blocking antibodies in autoimmune thyroid disease. *Clinical and experimental immunology* **2017**, *189*, 304-309.
28. Eckstein, A.K.; Plicht, M.; Lax, H.; Neuhäuser, M.; Mann, K.; Lederbogen, S.; Heckmann, C.; Esser, J.; Morgenthaler, N.G. Thyrotropin receptor autoantibodies are independent risk factors for Graves' ophthalmopathy and help to predict severity and outcome of the disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **2006**, *91*, 3464-3470.

29. Wiersinga, W.M. Autoimmunity in Graves' ophthalmopathy: the result of an unfortunate marriage between TSH receptors and IGF-1 receptors? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **2011**, *96*, 2386-2394.
30. Bahn, R.S. Graves' ophthalmopathy. *The New England journal of medicine* **2010**, *362*, 726-738.
31. Smith, T.J. TSH-receptor-expressing fibrocytes and thyroid-associated ophthalmopathy. *Nature reviews. Endocrinology* **2015**, *11*, 171-181.
32. Krieger, C.C.; Place, R.F.; Bevilacqua, C.; Marcus-Samuels, B.; Abel, B.S.; Skarulis, M.C.; Kahaly, G.J.; Neumann, S.; Gershengorn, M.C. TSH/IGF-1 Receptor Cross Talk in Graves' Ophthalmopathy Pathogenesis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **2016**, *101*, 2340-2347.
33. Marcus-Samuels, B.; Krieger, C.C.; Boutin, A.; Kahaly, G.J.; Neumann, S.; Gershengorn, M.C. Evidence That Graves' Ophthalmopathy Immunoglobulins Do Not Directly Activate IGF-1 Receptors. *Thyroid* **2018**, *28*, 650-655.
34. Minich, W.B.; Dehina, N.; Welsink, T.; Schwiebert, C.; Morgenthaler, N.G.; Köhrle, J.; Eckstein, A.; Schomburg, L. Autoantibodies to the IGF1 receptor in Graves' orbitopathy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **2013**, *98*, 752-760.
35. Schwiebert, C.; Kühnen, P.; Becker, N.-P.; Welsink, T.; Keller, T.; Minich, W.B.; Wiegand, S.; Schomburg, L. Antagonistic Autoantibodies to Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Associate with Poor Physical Strength. *International journal of molecular sciences* **2020**, *21*, E463.
36. Bau, A.-M.; Ernert, A.; Krude, H.; Wiegand, S. Hormonal regulatory mechanisms in obese children and adolescents after previous weight reduction with a lifestyle intervention: maintain - paediatric part - a RCT from 2009-15. *BMC obesity* **2016**, *3*, 29.
37. Beeson, P.B. Age and sex associations of 40 autoimmune diseases. *The American journal of medicine* **1994**, *96*, 457-462.
38. Marinò, M.; Rotondo Dottore, G.; Ionni, I.; Lanzolla, G.; Sabini, E.; Ricci, D.; Sframeli, A.; Mazzi, B.; Menconi, F.; Latrofa, F.; Vitti, P.; Marcocci, C.; Chiovato, L. Serum antibodies against the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) in Graves' disease and Graves' orbitopathy. *Journal of endocrinological investigation* **2019**, *42*, 471-480.
39. Chazenbalk, G.D.; Pichurin, P.; McLachlan, S.M.; Rapoport, B. A direct binding assay for thyrotropin receptor autoantibodies. *Thyroid* **1999**, *9*, 1057-1061.
40. Giuliani, C.; Saji, M.; Bucci, I.; Napolitano, G. Bioassays for TSH Receptor Autoantibodies, from FRTL-5 Cells to TSH Receptor-LH/CG Receptor Chimeras: The Contribution of Leonard D. Kohn. *Frontiers in endocrinology* **2016**, *7*, 103.
41. Tozzoli, R.; Bagnasco, M.; Giavarina, D.; Bizzaro, N. TSH receptor autoantibody immunoassay in patients with Graves' disease: improvement of diagnostic accuracy over different generations of methods. Systematic review and meta-analysis. *Autoimmunity reviews* **2012**, *12*, 107-113.

42. Haberland, A.; Müller, J.; Wallukat, G.; Wenzel, K. Antigen-free control wells in an ELISA set-up for the determination of autoantibodies against G protein-coupled receptors-a requisite for correct data evaluation. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2018**, *410*, 5101-5105.
43. Boege, F.; Westenfeld, R.; Jahns, R. β 1AAb Determined by Peptide ELISA: A Signal in the Noise? *Journal of the American College of Cardiology* **2017**, *70*, 807-808.
44. Diana, T.; Kanitz, M.; Lehmann, M.; Li, Y.; Olivo, P.D.; Kahaly, G.J. Standardization of a bioassay for thyrotropin receptor stimulating autoantibodies. *Thyroid* **2015**, *25*, 169-175.
45. Joshi-Barr, S.; Haberland, A.; Bartel, S.; Müller, J.; Choi, T.; Wallukat, G. High throughput bioassay for beta1-adrenoceptor autoantibody detection. *International journal of cardiology* **2016**, *219*, 98-104.
46. Jahns, R.; Boivin, V.; Schwarzbach, V.; Ertl, G.; Lohse, M.J. Pathological autoantibodies in cardiomyopathy. *Autoimmunity* **2008**, *41*, 454-461.
47. Vicco, M.H.; Ferini, F.; Rodeles, L.; Cardona, P.; Bontempi, I.; Lioi, S.; Beloscar, J.; Nara, T.; Marcipar, I.; Bottasso, O.A. Assessment of cross-reactive host-pathogen antibodies in patients with different stages of chronic Chagas disease. *Revista espanola de cardiologia* **2013**, *66*, 791-796.
48. Klubo-Gwiedzinska, J.; Lange, M.; Cochran, E.; Semple, R.K.; Gewert, C.; Brown, R.J. & Gorden, P. Combined Immunosuppressive Therapy Induces Remission in Patients With Severe Type B Insulin Resistance: A Prospective Cohort Study. *Diabetes care* **2018**, *41*, 2353-2360.
49. Chikani, V. Ho, K.K.Y. Action of GH on skeletal muscle function: molecular and metabolic mechanisms. *Journal of molecular endocrinology* **2014**, *52*, R107-R123.
50. Walenkamp, M.J.E.; van der Kamp, H.J.; Pereira, A.M.; Kant, S.G.; van Duyvenvoorde, H.A.; Kruithof, M.F.; Breuning, M.H.; Romijn, J.A.; Karperien, M.; Wit, J.M. A variable degree of intrauterine and postnatal growth retardation in a family with a missense mutation in the insulin-like growth factor I receptor. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **2006**, *91*, 3062-3070.
51. Labarta, J.I.; Barrio, E.; Audí, L.; Fernández-Cancio, M.; Andaluz, P.; de Arriba, A.; Puga, B.; Calvo, M.T.; Mayayo, E.; Carrascosa, A.; Ferrández-Longás, A. Familial short stature and intrauterine growth retardation associated with a novel mutation in the IGF-I receptor (IGF1R) gene. *Clinical endocrinology* **2013**, *78*, 255-262.
52. Laron, Z.; Kauli, R.; Lapkina, L. Werner, H. IGF-I deficiency, longevity and cancer protection of patients with Laron syndrome. *Mutation research. Reviews in mutation research* **2017**, *772*, 123-133.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christian Schwiebert, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Nachweis, Prävalenz und physiologische Bedeutung von Autoantikörpern gegen den Insulin like Growth Factor-1 Rezeptor im Menschen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Ort, Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Christian Schwiebert hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Minich, W.B.; Dehina, N.; Welsink, T.; **Schwiebert, C.**; Morgenthaler, N.G.; Köhrle, J.; Eckstein, A.; Schomburg, L. Autoantibodies to the IGF1 receptor in Graves' orbitopathy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **2013**, *98*, 752-760.

Journal Summary List:	Journal Impact Factor:	6,310 (2013); 5,605 (2018)
	Eigenfaktor:	0,118 (2013); 0,090 (2018)

Beitrag im Einzelnen:

- Rekombinante Expression, zelltechnische Herstellung und Konzentrierung der Fusionsproteine
- Aufbau und Etablierung des Testsystems
- Durchführung der Messungen zur Prävalenz der IGF1R-aAK
- Beiträge zur Auswertung der Ergebnisse und biostatistischen Analyse der Daten (Fig. 1, 2, 3, 4 und Tab. 1)
- Erstellung von Fig. 2 A, B in der Publikation
- Literaturrecherche und kritische Beiträge zur Diskussion in der Publikation

Publikation 2:

Kühn, E.C.; Slagman, A.; Kühn-Heid, E.C.D.; Seelig, J.; **Schwiebert, C.**; Minich, W.B.; Stoppe, C.; Möckel, M.; Schomburg, L. Circulating levels of selenium-binding protein 1 (SELENBP1) are associated with risk for major adverse cardiac events and death. *Journal of trace elements in medicine and biology* **2019**, *52*, 247-253.

Journal Summary List:	Journal Impact Factor:	2,895 (2018)
	Eigenfaktor:	0,005 (2018)

Beitrag im Einzelnen:

- Rekombinante Expression, Reinigung und Konzentrierung der genutzten Antikörper
- Diskussionsbeiträge zum erstmaligen Aufbau des ELISA
- Literaturrecherche und kritische Beiträge zur Diskussion in der Publikation

Publikation 3:

Schwiebert, C.; Kühnen, P.; Becker, N.-P.; Welsink, T.; Keller, T.; Minich, W.B.; Wiegand, S.; Schomburg, L. Antagonistic Autoantibodies to Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Associate with Poor Physical Strength. *International journal of molecular sciences* **2020**, *21*, E463.

Journal Summary List:	Journal Impact Factor:	4,183 (2018)
	Eigenfaktor:	0,115 (2018)

Beitrag im Einzelnen:

- Konzepterstellung der Studie in Zusammenarbeit mit dem Mentor und den Co-Autoren
- Rekombinante Expression, zelltechnische Herstellung und Konzentrierung der Fusionsproteine
- Durchführung der Messungen zur Prävalenz der IGF1R-aAK
- Beiträge zur Auswertung der Ergebnisse und biostatistische Analyse der Daten
- Konzept zur Publikation in Zusammenarbeit mit dem Mentor und den Co-Autoren
- Erstellung von Fig. 1, 2, 4 und 5 in der Publikation
- Literaturrecherche und Diskussion mit dem Mentor und den Co-Autoren
- Erstellung der Manuskriptfassung zusammen mit dem Mentor
- Begleitung des Review Prozesses

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Minich, W.B.; Dehina, N.; Welsink, T.; Schwiebert, C.; Morgenthaler, N.G.; Köhrle, J.; Eckstein, A.; Schomburg, L. Autoantibodies to the IGF1 receptor in Graves' orbitopathy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2013, *98*, 752-760.

URL: <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1771>

Kühn, E.C.; Slagman, A.; Kühn-Heid, E.C.D.; Seelig, J.; Schwiebert, C.; Minich, W.B.; Stoppe, C.; Möckel, M.; Schomburg, L. Circulating levels of selenium-binding protein 1 (SELENBP1) are associated with risk for major adverse cardiac events and death. *Journal of trace elements in medicine and biology* 2019, 52, 247-253.

URL: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.01.005>

Schwiebert, C.; Kühnen, P.; Becker, N.-P.; Welsink, T.; Keller, T.; Minich, W.B.; Wiegand, S.; Schomburg, L. Antagonistic Autoantibodies to Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Associate with Poor Physical Strength. *International journal of molecular sciences* 2020, 21, E463.

URL: <https://doi.org/10.3390/ijms21020463>

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Wissenschaftliche Artikel:

Schwiebert, C.; Kühnen, P.; Becker, N.-P.; Welsink, T.; Keller, T.; Minich, W.B.; Wiegand, S.; Schomburg, L. Antagonistic Autoantibodies to Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Associate with Poor Physical Strength. *International journal of molecular sciences* **2020**, *21*, E463. Impact Factor: 4,183 (2018)

Kühn-Heid, E.C.D.; Kühn, E.C.; Ney, J.; Wendt, S.; Seelig, J.; **Schwiebert, C.**; Minich, W.B.; Stoppe, C.; Schomburg, L. Selenium-Binding Protein 1 Indicates Myocardial Stress and Risk for Adverse Outcome in Cardiac Surgery. *Nutrients* **2019**, *11*, E2005. Impact Factor: 4,171 (2018)

Kühn, E. C.; Slagman, A.; Kühn-Heid, E.C.D.; Seelig, J.; **Schwiebert, C.**; Minich, W.B.; Stoppe, C.; Möckel, M.; Schomburg, L. Circulating levels of selenium-binding protein 1 (SELENBP1) are associated with risk for major adverse cardiac events and death. *Journal of trace elements in medicine and biology* **2019**, *52*, 247-253. Impact Factor: 2,895 (2018)

Renko, K.; Hoefig, C. S.; Dupuy, C.; Harder, L.; **Schwiebert, C.**; Köhrle, J.; Schomburg, L. A Nonradioactive DEHAL Assay for Testing Substrates, Inhibitors, and Monitoring Endogenous Activity. *Endocrinology* **2016**, *157*, 4516-4525. Impact Factor: 4,286 (2016)

Renko, K.; Schäche, S.; Hoefig, C. S.; Welsink, T.; **Schwiebert, C.**; Braun, D.; Becker, N.-P.; Köhrle, J.; Schomburg, L. An Improved Nonradioactive Screening Method Identifies Genistein and Xanthohumol as Potent Inhibitors of Iodothyronine Deiodinases. *Thyroid* **2015**, *25*, 962-968. Impact Factor: 4,265 (2015)

Minich, W.B.; Dehina, N.; Welsink, T.; **Schwiebert, C.**; Morgenthaler, N.G.; Köhrle, J.; Eckstein, A.; Schomburg, L. Autoantibodies to the IGF1 receptor in Graves' orbitopathy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **2013**, *98*, 752-760. Impact Factor: 6,310 (2013)

Wiedemann, P.; Worf, M.; Wiegemann H.B.; Egner, F.; **Schwiebert, C.**; Wilkesman, J.; Guez, J.S.; Quintana J.C.; Assanza, D.; Suhr, H. On-line and real time cell counting and viability determination for animal cell process monitoring by in situ microscopy. *BMC Proceedings* **2011**, *22*, Suppl 8, P77.

Wiedemann, P.; Guez, J.S.; Wiegemann, H.B.; Egner, F.; Quintana, J.C.; Asanza-Maldonado, D.; Filipaki, M.; Wilkesman, J.; **Schwiebert, C.**; Cassar, J.P.; Dhulster, P.; Suhr, H. In situ microscopic cytometry enables noninvasive viability assessment of animal cells by measuring entropy states. *Biotechnology and bioengineering* **2011**, *108*, 2884-2893. Impact Factor: 4,587 (2011)

Poster / Vorträge:

Haudum C.; Minich, W.B.; Münzker, J.; Groselj-Strele, A.; Kolesnik, E.; Mursic I.; **Schwiebert, C.**; Welsink, T.; Schmidt, A.; Pieber, T.; Schomburg, L.; Obermayer-Pietsch, B. Association of IGF1 receptor autoantibodies with height and body size. Poster, 20th European Congress of Endocrinology, Barcelona, Spain, 5/2018, Endocrine Abstracts (2018) 56 GP189.

Schwiebert, C.; Becker, N.-P.; Kühnen, P.; Welsink, T.; Minich, W.B.; Wiegand, S.; Schomburg, L. Autoantibodies to the IGF1-receptor in healthy children. Vortrag, 61. Deutscher Kongress für Endokrinologie (DGE), Bonn, Germany, 3/2018.

Boeder, S.; Kurani, P.; Levin M.; Barba, L.; Chi, N.; Mir, D.; **Schwiebert, C.;** Minich W.B.; Schomburg, L.; Santos Cavaiola, T. Profound Hypoglycemia in an Atypical Case of Type B Insulin Resistance Confirmed by a Novel Immunoassay. Poster, American Diabetes Association's 77th Scientific Sessions, San Diego, California, USA, 6/2017.

Schwiebert, C.; Welsink, T.; Schuette, A.; Becker, N.-P.; Brown, R.J.; Gorden, P.; Minich, W.B.; Schomburg, L. Novel methods for the analysis of autoantibodies to the insulin receptor in patients with type B insulin resistance. Poster, 59. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE), München, Germany, 5/2016.

Schwiebert, C.; Welsink, T.; Schuette, A.; Becker N.-P.; Brown, R.J.; Gorden, P.; Minich, W.B.; Schomburg, L. Quantification of autoantibodies to receptors of the insulin receptor family in patients with insulin resistance. Poster, 12th Dresden Symposium on Autoantibodies, Dresden, Germany, 9/2015.

Schuette, A.; Minich, W.B.; Welsink, T.; **Schwiebert, C.;** Seemann, P.; Moghaddam-Alvandi, A.; Schmidmaier, G.; Schomburg, L. Autoantibodies and Bone Regeneration. Poster, International Symposium on Bone Regeneration, Berlin, Germany, 6/2015.

Schwiebert, C.; Welsink, T.; Schuette, A.; Becker N.-P.; Brown, R.J.; Gorden, P.; Minich, W.B.; Schomburg, L. Detection of autoantibodies to the insulin receptor in patients with type B insulin resistance. Poster, 8th Senftenberg Innovation Forum on Multiparametric Analysis, Autoimmune Diagnostics, Senftenberg, Germany, 5/2014.

Schwiebert, C.; Welsink, T.; Minich, W.B.; Schomburg, L. Detection of autoimmunity against the insulin- and insulin-like growth factor-1 receptor and their prevalence in humans. Poster, 11th Dresden Symposium on Autoantibodies, Dresden, Germany, 9/2013.

Welsink, T.; **Schwiebert, C.;** Minich, W.B.; Schomburg, L. Autoantibodies to the insulin- and IGF1-receptor in human sera. Poster, 15th European Congress of Endocrinology, Copenhagen, Denmark, 5/2013, Endocrine Abstracts (2013) 32 P353.

Minich, W.; Welsink, T.; **Schwiebert, C.;** Koehrlé, J.; Eckstein, A.; Schomburg, L. Biochemical characterization of autoantibodies to the IGF1 Receptor. Poster, 36th Annual Meeting of the European Thyroid Association, Pisa, Italy, 9/2012.

Wiedemann, P.; Worf, M.; Wiegemann, H.B.; Egner, F.; **Schwiebert, C.;** Wilkesman, J.; Guez, J.S.; Quintana, J.C.; Assanza, D.; Suhr, H. On-line and real time cell counting and viability determination for animal cell process monitoring by in situ microscopy, Poster 22nd Annual Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT), Vienna, Austria, 5/2011.

Wiedemann, P.; Egner, F.; Wiegemann, H.; Quintana J.C.; Storhas, W.; Guez, J.S.; **Schwiebert, C.;** Suhr, H. Advanced in situ microscopy for online monitoring of animal cell culture. Poster, 21st Annual Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT), Dublin, Ireland, 6/2009.

Schwiebert, C.; Daeschlein, G.; Wolf, V.; Lange, R. Evaluation of a new method for the detection of autoantibodies by indirect Immunfluorescence (IIF). Vortrag, 3rd Dresden Symposium on Autoantibodies, Dresden, Germany, 9/1996.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, allen Menschen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, zu danken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Lutz Schomburg vom Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin. Danke für die Möglichkeit in einem modernen wissenschaftlichen Umfeld, an einem interessanten Thema, Ideen und Inspirationen umzusetzen, insbesondere um einen Beitrag zur Weiterentwicklung der Medizin zu leisten. Danke für Geduld, Motivation, Inspiration, Rückhalt und Offenheit.

Weiterhin geht ein besonderer Dank an Dr. Wolfgang Weglöhner, Siegmund Karasch und Dr. Nils Morgenthaler, die durch ein tolles inspirierendes Umfeld in der InVivo Biotech Services GmbH, mir die Möglichkeit gaben, mich in alle Richtungen zu entfalten und dabei jederzeit persönliche und finanzielle Sicherheit garantierten.

Dr. Waldemar Minich und Dr. Tim Welsink möchte ich an dieser Stelle für die endlose Geduld in vielen anregenden Diskussionen und Gesprächen danken. Vor allem euer großartiges Wissen und Motivation konntet ihr oft auf mich übertragen. Die vielen gemeinsamen Stunden im Labor und auf Reisen zu Seminaren und Kongressen bleiben immer in meiner Erinnerung.

Dr. Susanna Wiegand und Dr. Peter Kühnen vom Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin sowie Prof. Dr. Anja Eckstein von der Klinik für Augenheilkunde der Universität Essen, danke ich für die Bereitstellung der Serumproben, die gemeinsame Auswertung, die konstruktiven Diskussionen und die sehr angenehme Zusammenarbeit bei der Analyse dieser essentiellen klinischen Studien.

Dem gesamten Team des Instituts für Experimentelle Endokrinologie der Charité danke ich für die großartige Unterstützung, für die vielen Ratschläge und andauernden Motivationen bei allen wissenschaftlichen und technischen Fragen. Stellvertretend dafür möchte ich Vartitér Seher, Dr. Kostja Renko sowie Dr. Nils-Peter Becker erwähnen.

Meinen vielen Kollegen bei InVivo Biotech möchte ich an dieser Stelle Danke sagen. Danke, dass ihr mich jederzeit und in allem unterstützt. Stellvertretend dafür, möchte ich Michael Schubert erwähnen, der in vielen Dingen ein toller Kollege an meiner Seite ist und für alle Fragen und Probleme stets ein offenes Ohr hat.

Tiefe Dankbarkeit erfüllt mich, wenn ich an dieser Stelle meine Eltern erwähne, ohne die ich diese Zeilen nicht schreiben würde und die ein bedeutender Antrieb für alles Gute in meinem Leben sind. Danke, ihr werdet immer in meinem Herzen sein.

Abschließend möchte ich meiner Frau Silke und meiner Tochter Kaja für alles Danken, was ihr mir jeden Tag gebt: Geborgenheit und Liebe. Das wichtigste, um wirklich Leben zu können und jeden Tag etwas Neues zu bewegen. Alles geht nur mit Euch!