

Deutsches Diabetes-Forschungsinstitut  
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. med. W. Scherbaum

**Antikörper gegen das Enzym Gewebs-Transglutaminase  
Etablierung eines neuen Screeningverfahrens  
zum Nachweis einer Zöliakie**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
vorgelegt von

Stefanie Boms

2002

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Scherbaum

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. U. Wendel

## **Meinen Eltern**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1. 1. Definition und Klassifikation der Zöliakie	1
1. 2. Epidemiologie	2
1. 3. Klinisches und histologisches Bild	2
1. 4. Assoziierte Erkrankungen	5
1. 4. 1. Zusammenhang zwischen Zöliakie und Typ 1 Diabetes mellitus	7
1. 5. Pathogenese der Erkrankung	9
1. 5. 1. Genetische Faktoren	9
1. 5. 2. Umweltfaktoren	11
1. 5. 3. Gluten	12
1. 5. 4. Immunologische Aspekte	13
1. 6. Bedeutung der Autoantikörper	17
1. 7. Physiologische Funktion der Gewebs-Transglutaminase und ihre Bedeutung im Rahmen der Zöliakie	19
<b>2. Zielstellung</b>	<b>22</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>23</b>
3. 1. Reagenzien	23
3. 2. Geräte	25
3. 3. Lösungen und Puffer	26
3. 3. 1. Pufferlösungen	26
3. 3. 2. Elektrophoresereagenzien	26
3. 3. 3. Transformation	27
3. 4. Patientenseren	28
3. 5. Klonierung, Expression und radioaktive Markierung der humanen Gewebs-Transglutaminase	29
3. 5. 1. Klonierung der humanen Gewebs-Transglutaminase (TG)	29
3. 5. 1. 1. Isolierung der mRNA und PCR des cDNA-Klons	29
3. 5. 1. 2. Klonierung des PCR-Produktes in den pGEM 4Z-Vektor	30
3. 5. 2. Umklonierung des TG-cDNA-Klons in den SP64PolyA-Vektor	31
3. 5. 3. In vitro Expression von humaner TG und Markierung mit	

[ <sup>35</sup> S]-Methionin	32
3. 6. Nachweis der spezifischen Bindung der TG und Entwicklung des Radioimmunassays	33
3. 6. 1. Nachweis der spezifischen Bindung der [ <sup>35</sup> S]-Methionin markierten TG mittels SDS-Gelelektrophorese und Autoradiographie	33
3. 6. 2. Entwicklung eines Radioimmunoassays zum Nachweis der Antikörper gegen rekombinante humane TG (TG-Ak)	34
3. 7. Bestimmung der IgA-Endomysium-Antikörper	35
3. 8. Bestimmung der IgA-Gliadin-Antikörper	35
3. 9. Statistische Auswertung	36
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>37</b>
4. 1. Klonierung des Gewebs-Transglutaminase-cDNA-Klons	37
4. 2. Expression des TG-cDNA-Klons durch in vitro Transkription/Translation	38
4. 3. Entwicklung des Radioimmunassays zum Nachweis von Autoantikörpern gegen TG	40
4. 4. Bedeutung der TG-Ak für die Zöliakie	43
4. 4. 1. Prävalenz der TG-Ak bei Zöliakiepatienten	43
4. 4. 2. Korrelation der TG-Ak mit dem Alter und Geschlecht	47
4. 4. 3. Korrelation der TG-Antikörper mit Endomysium-Antikörpern und Antikörpern gegen Gliadin	49
4. 5. Prävalenz der TG-Ak bei Patienten mit Verdacht auf Zöliakie	51
4. 6. Untersuchung der TG-Ak bei Autoimmunerkrankungen	53
4. 6. 1. Prävalenz der TG-Ak bei Patienten mit Typ 1 Diabetes	53
4. 6. 2. Prävalenz der TG-Ak bei Patienten mit Morbus Basedow und Hashimoto-Thyreoiditis	54
4. 6. 3. Prävalenz der TG-Ak bei Patienten mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises	55
4. 7. Prävalenz der TG-Ak in den Seren gesunder Kontrollpersonen	55
4. 8. Vergleich der TG-Antikörperprävalenz und TG-Antikörperspiegel in den verschiedenen Patientengruppen	56
4. 9. Bedeutung der TG-Ak für die Diagnose einer latenten Zöliakie	57
<b>5. Diskussion</b>	<b>59</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>67</b>

<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>70</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>71</b>
<b>9. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>Anhang</b>	

## 1. Einleitung

### 1. 1. Definition und Klassifikation der Zöliakie

Die Zöliakie ist eine chronische Erkrankung des Dünndarms, welche sich bei genetisch prädisponierten Personen (HLA-DQ2) durch eine Immunreaktion gegen Gliadin, einem Bestandteil des Glutens in Getreideprodukten, entwickelt (*Mäki und Collin 1997, Sollid und Thorsby 1993*). Unter glutenhaltiger Kost kommt es zu charakteristischen Veränderungen an der Schleimhaut des oberen Dünndarms mit Atrophie der Darmzotten, Hypertrophie der Krypten und Ansammlung von intra-epithelialen Lymphozyten. Außerdem sind in Serum und Darmflüssigkeit Antikörper gegen Gliadin (AGA) und körpereigene Bestandteile (Anti-Endomysium (EmA), Anti-Transglutaminase (TG-Ak)) nachweisbar und für diagnostische Zwecke nutzbar. Bereits im Jahre 1888 beschrieb S. Gee detailliert einen Patienten mit Zöliakie. Gee definierte die Erkrankung als ein im Kindesalter, meist im zweiten Lebensjahr, beginnendes Leiden, das durch Einhalten einer Diät, die mehlhaltige Nahrung ausschloß, zu regulieren war (*Auricchio und Troncone 1996*). Der Niederländer W. K. Dicke erkannte in den 40er Jahren, daß Weizen- und Roggenmehl, aber nicht Weizenstärke, für die bei seinen Patienten beobachtete Verdauungsstörung verantwortlich waren. Er identifizierte die alkohollösliche Komponente des Weizens als Gliadin (*Dicke et al. 1953*). Mit der Einführung der peroralen Dünndarmbiopsie durch M. Shiner 1956 konnten den klinischen Symptomen spezifische Veränderungen der Dünndarmschleimhaut zugeordnet werden, und 1962 demonstrierten Rubin und Mitarbeiter experimentell den Zusammenhang zwischen Glutenexposition und den nachweisbaren Schäden der Darmschleimhaut (*Auricchio und Troncone 1996*).

Die Diagnose der Zöliakie erfolgt heute nach den modifizierten Richtlinien der European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN) (*Walker-Smith 1990*):

- Das Vorliegen einer zöliakiespezifischen Mukosaschädigung mit Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie unter glutenhaltiger Diät und das Erreichen einer klinischen Remission unter glutenfreier Diät (GFD) genügen als diagnostische Kriterien.

- Das Auftreten von zirkulierenden Antikörpern gegen Gliadin (AGA), Retikulin (ARA) und Endomysium (EmA) unterstützt die Diagnose.
- Eine Glutenbelastung wird nicht mehr zwingend zur Diagnosestellung gefordert, sondern soll nur noch in zweifelhaften Fällen durchgeführt werden.

In unklaren Fällen kann die definitive Diagnose nur durch eine Dünndarmbiopsie gesichert werden (*McNeish et al. 1979*). Die Erkrankung manifestiert sich meist schon im Kindesalter, wenn die Kinder von der Muttermilchernährung auf Kleinkindkost umgestellt worden sind. Sie ist allerdings nicht auf das Kindesalter beschränkt, sondern kann in jedem Lebensalter auftreten.

## 1. 2. Epidemiologie

Die Prävalenz der Zöliakie beträgt ungefähr 1:1000. Eine höhere Prävalenz wird in Schweden und Italien beschrieben (3,51/1000 bzw. 3,9/1000 bei Erwachsenen) (*Catassi et al. 1996, Greco et al. 1992, Grodzinsky et al. 1992*). Die Anzahl asymptomatischer Patienten (1/256) ist in Schweden 4-fach höher als die symptomatischer Patienten (1/1000) (*Grodzinsky et al. 1992*). In Italien konnte bei einem landesweiten Screening bei 5,44/1000 Schulkindern eine bisher nicht bekannte Zöliakie diagnostiziert werden (*Catassi et al. 1996*). Bei bioptisch nicht geprüften, auf Endomysium-Antikörpernachweis basierenden Studien wurden Prävalenzwerte bis 1:100 angegeben (*McMillan et al. 1996*). In den USA wurden bei 1/250 Blutspendern EmA nachgewiesen (*Not et al. 1998*).

## 1. 3. Klinisches und histologisches Bild

Bei der klassischen Form der Zöliakie (Synonyme: glutensensitive Enteropathie, einheimische Sprue) weisen die Patienten ein Malabsorptionssyndrom auf, das sich auf die entzündlichen Veränderungen und die Atrophie der Dünndarmschleimhaut zurückführen läßt. Die Patienten setzen aufgrund einer Fettverdauungsstörung fetthaltige, voluminöse Stühle ab (Steatorrhoe). Ferner klagen sie über Meteorismus, und manchmal magern sie stark ab. Nach längerem Krankheitsverlauf weisen sie durch die schlechte Aufnahme der fettlöslichen

Vitamine A, D, E, K und Eisen Mangelerscheinungen und eine Anämie auf. Ferner fallen die Kinder durch psychische Veränderungen auf, sie sind meist übellaunig.

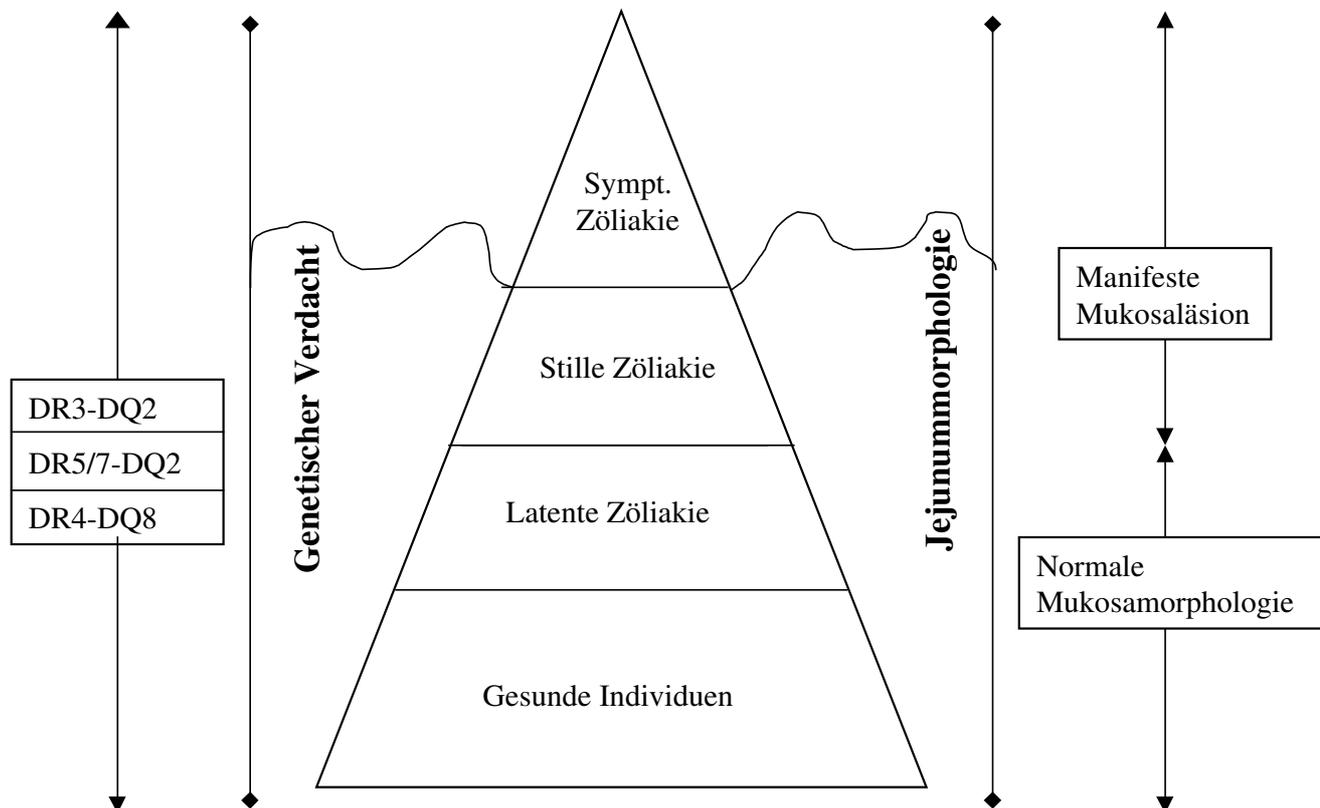
Man konnte nachweisen, daß die immunologischen und histologischen Veränderungen des betroffenen Darmabschnittes im Krankheitsverlauf zunehmen. Die verschiedenen Schädigungsformen des Darms können nach dem histologischen Befund in eine infiltrative (Mukosa mit normaler Krypten- und Zottenarchitektur, aber einer hohen Dichte an intraepithelialen Lymphozyten (IEL)), eine hyperplastische (neben der Infiltration eine Kryptenhyperplasie) und eine destruierende (flache Mukosa mit Kryptenhyperplasie) Läsion unterteilt werden (*Marsh 1988, Marsh 1992, Ziegler und Ferguson 1984*).

Neben der klassischen Form der Zöliakie konnten epidemiologische Studien nachweisen, daß ein weit größerer Anteil der Patienten oligosymptomatisch ist oder nur unspezifische Symptome aufweist und dadurch häufig der Diagnose entgeht (*Ferguson et al. 1993*). Diese subklinischen Formen der Zöliakie unterteilt man klinisch wie folgt:

- Die *stille* Form der Zöliakie wird bei asymptomatischen Patienten gefunden, die unter normaler Ernährung eine Schädigung der Darmwand aufweisen, wie sie auch bei der klassischen Form gefunden wird, und die sich unter glutenfreier Diät zurückbildet (*Mäki und Collin 1997*).
- Die Bezeichnung *latente* Zöliakie trifft bei symptomatischen Patienten zu, die unter normaler Ernährung eine intakte Mukosa aufweisen, die aber anamnestisch histologische Veränderungen hatten, die sich unter glutenfreier Ernährung normalisierten (*Mäki und Collin 1997*).
- Patienten, bei denen die klassische Form der Zöliakie nie bioptisch gesichert werden konnte, die aber immunologische Auffälligkeiten aufweisen, die denen bei Zöliakiepatienten ähnlich sind, werden als *potentiell* erkrankt bezeichnet. Marker dafür sind das Vorliegen von Endomysium-Antikörpern (EmA) im Serum, eine hohe Zahl intraepithelialer Lymphozyten (IEL), eine erhöhte Dichte von IEL mit  $\gamma/\delta$  T-Zell-Rezeptoren (TCR) und ein bestimmtes intestinales Antikörpermuster. Dies ist definiert durch den Nachweis von IgM-AGA zusammen mit IgA-AGA, IgM-Anti-Ovalbumin und IgM-Anti-Betalactoglobulin in der Darmflüssigkeit (*Ferguson et al. 1993, Troncone et al. 1996*).

Die hohe Rate unerkannter subklinischer Erkrankungen führt zu Schwierigkeiten bei der Beurteilung epidemiologischer Daten.

Einen Überblick über das Spektrum der glutensensitiven Enteropathie gibt *Abb. 1*.



**Abbildung 1 Der Zöliakieeisberg und das Spektrum der glutensensitiven Enteropathie**

Es werden die verschiedenen Manifestationsformen der glutensensitiven Enteropathie dargestellt. Nur ein Teil der Erkrankten kann über die manifeste Mukosaläsion identifiziert werden, ein noch geringerer Anteil über die klinischen Symptome. Es liegt eine genetische Prädisposition vor. *(modifiziert nach Mäki und Collin 1997)*

Durch eine größere Beachtung vorübergehender, atypischer und geringgradiger Symptome konnte die Diagnoserate erhöht und dadurch eine ständige Senkung des Patientenalters bei Diagnosestellung erreicht werden.

Patienten mit Zöliakie müssen eine lebenslange glutenfreie Diät einhalten. Es dürfen keine Nahrungsmittel verzehrt werden, welche Prolamine (u. a. Gliadin) enthalten. Es

ist unklar, ob man den Genuß von Hafer erlauben kann, denn die Antigenität des Hafers ist deutlich geringer als die anderer Getreide, weil der Gehalt des Haferprolamins Avenin viel geringer ist (*Mäki und Collin 1997*). Bardella et al. fanden bei 47 jugendlichen Zöliakiepatienten, die ihre Diät beendeten, innerhalb von 1-16 Jahren ein Wiederauftreten der histologischen Veränderungen (*Bardella et al. 1994*).

Die Behandlung stiller Formen wird aus folgenden Gründen gefordert (*Catassi et al. 1997*):

- Die meisten in Studien untersuchten Patienten waren nicht völlig asymptomatisch, so daß auch sie sich nach Diätbeginn besser fühlten. Gewichts- und Größenzunahme, eine bessere Stimmung und verbesserte Leistungen in der Schule waren zu verzeichnen.
- Stille Formen stimmen in der Art der Darmschädigung, dem immunologischen Muster und dem genetischen Hintergrund mit der symptomatischen Form überein, weshalb sie auch gleich behandelt werden sollten.
- Spätschäden wie Infertilität, Osteoporose und Tumore treten auch bei unbehandelter stiller Zöliakie auf.

#### **1. 4. Assoziierte Erkrankungen**

Die Zöliakie ist mit bestimmten Erkrankungen statistisch signifikant häufiger assoziiert. Dazu gehören die Dermatitis herpetiformis, ein selektiver IgA-Mangel, der Typ 1 Diabetes und die primär biliäre Zirrhose (*Collin et al. 1994, Kingham und Parker 1998, Meini et al. 1996, Niveloni et al. 1998, Reunala und Collin 1997*). Bei diesen Erkrankungen liegt die Zöliakie häufig subklinisch vor (*Visakorpi und Mäki 1994*).

Die Dermatitis herpetiformis (M. Dühring/DH) ist eine glutensensitive, subepidermale Bläschen bildende Hauterkrankung (*Gawkrodger et al. 1984*). Gastrointestinale Symptome sind selten, obwohl bis 80% der Patienten eine subtotale Zottenatrophie und fast 100% Schleimhautinfiltrate mit  $\gamma/\delta$  TCR-tragenden T-Lymphozyten aufweisen (*van de Meer 1969*). Es wird angenommen, daß die DH eine spezielle Hautmanifestation der glutensensitiven Enteropathie ist (*Reunala et al. 1977, Fry et*

al. 1973). AGA und EmA werden auch bei Patienten mit DH mit hoher Prävalenz gefunden (Reunala et al. 1987).

Bei Patienten mit Zöliakie wird ein selektiver IgA-Mangel signifikant häufiger als in der Normalbevölkerung (1:700) gefunden. Das Auftreten einer Zöliakie bei Kindern mit einem IgA-Mangel wird mit einer Häufigkeit zwischen 0,7 und 30,7% angegeben (Collin et al. 1992, De Laat et al. 1991, Klemola 1987, Klemola 1988, Klemola et al. 1988, Savilahti et al. 1971, Savilahti und Pelkonen 1979). Es ist für die Zöliakiediagnostik wichtig, einen eventuell vorliegenden IgA-Mangel zu erkennen, um ein negatives Ergebnis bei Tests, die auf der Bestimmung von IgA-Antikörpern basieren (z. B. EmA), richtig zu interpretieren (Cataldo et al. 1998, Meini et al. 1996).

Die Assoziation vieler neurologischer Krankheitsbilder (Ataxien, periphere Neuropathien, Myo- und Myelopathien sowie Epilepsien) mit einer Zöliakie wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (Chapman et al. 1978, Gobbi et al. 1992, Hadjivassiliou et al. 1996, Hadjivassiliou et al. 1997, Laidlow et al. 1977). Es wird vermutet, daß zöliakieassoziierte Antikörper in immunologische Mechanismen involviert sein könnten, die auch neurologische Defizite verursachen (Collin und Mäki 1997).

Als weitere Komplikation einer Zöliakie kann die Reproduktionsfähigkeit bei beiden Geschlechtern eingeschränkt sein (Baker und Read 1975, Collin et al. 1996, Farthing et al. 1982, Farthing et al. 1983, Farthing et al. 1983, Hirson 1970).

Knochendichtemessungen zeigen bei unbehandelter Zöliakie häufig Mineralisationsstörungen, welche sich unter GFD bessern (Mora et al. 1993, Valdimarsson et al. 1996).

In verschiedenen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen Schilddrüsenerkrankungen und einer Zöliakie beschrieben. Bei einer begleitenden Hypothyreose wird die Diagnose beider Krankheiten wegen der Symptomähnlichkeit der Erkrankungen (Adynamie) häufig verzögert (Counsell et al. 1994, Midhagen et al. 1988, Snook et al. 1989).

In einer Studie fanden sich bei Zöliakiepatienten gehäuft Chromosomenanomalien und -brüche, welche mit der hohen Prävalenz von Tumoren und Lymphomen des MDT dieser Patienten ursächlich in Zusammenhang gebracht werden (*Fundia et al. 1996*). Bei Zöliakiepatienten wird eine 50-100fach erhöhte und bei Patienten mit DH eine 10-fach erhöhte Inzidenz von intestinalen Lymphomen beschrieben (*Collin et al. 1996, Holmes et al. 1976*). Sie werden auch als „enteropathy-associated-T-cell-lymphoma“ (EATCL) bezeichnet und zeichnen sich aufgrund der späten Diagnosestellung und eines fehlenden etablierten Therapiekonzeptes durch eine infauste Prognose aus (*Ferguson und Kingstone 1996*). Eine jahrelange glutenfreie Diät kann vor der Entwicklung von Tumoren schützen (*Holmes et al. 1989*).

#### **1. 4. 1. Zusammenhang zwischen Zöliakie und Typ 1 Diabetes mellitus**

Beim Typ 1 Diabetes mellitus kommt es über einen Autoimmunprozeß zu einer Zerstörung der Insulin produzierenden  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas, wobei genetische Faktoren eine prädisponierende Rolle spielen. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch das Auftreten autoreaktiver T-Lymphozyten und diabetesspezifischer Autoantikörper. Dazu gehören zytoplasmatische Inselzellantikörper (ICA), Insulinautoantikörper (IAA), Antikörper gegen das Enzym Glutamat-Decarboxylase (GADA) und gegen das Protein Tyrosinphosphatase IA-2 (IA-2A) (*Seissler et al. 1996, Seissler et al. 1998*).

Etwa jeder 20. bis 50. Patient mit einem Typ 1 Diabetes erkrankt an einer manifesten Zöliakie. In verschiedenen Studien wurden bei 1,0 bis 7,8% der Typ 1 Diabetiker durch Screening auf AGA oder EmA und durch bioptische Bestätigung eine asymptomatische Zöliakie gefunden (*Acerini et al. 1998, Collin et al. 1989, Cronin et al. 1997, DeVitis et al. 1996, Gadd et al. 1992, Koletzko et al. 1988, Mäki et al. 1984, Mäki et al. 1995, Page et al. 1994, Rensch et al. 1996, Saukkonen et al. 1996, Savilahti et al. 1986, Talal et al. 1997*). Eine wahrscheinliche Ursache dieser Assoziation liegt in dem ähnlichen genetischen Hintergrund, da beide Erkrankungen mit dem HLA-DQB1\*0201-Allel assoziiert sind (*Sollid et al. 1989*).

Es wird berichtet, daß ein temporäres Auftreten von IgG-AGA überzufällig häufig bei der Manifestation eines Typ 1 Diabetes gefunden wird, obwohl bioptisch keine

Zöliakie nachgewiesen werden kann (*Catassi et al. 1987, Catassi et al. 1991*). Diese Gliadinantikörper entstehen im Rahmen einer unspezifischen Autoantikörperproduktion bei der Diabetesmanifestation (*Atkinson et al. 1993, Cacciari et al. 1987*). Dadurch wird wahrscheinlich auch die regelmäßige Entwicklung einer Zöliakie bei Kindern mit Typ 1 Diabetes bald nach der Diabetesmanifestation erklärt, während die umgekehrte Reihenfolge eher selten ist (*Saukkonen et al. 1996*).

In mehreren Studien wurde gezeigt, daß die meisten Diabetiker mit begleitender Zöliakie symptomfrei sind und dadurch klinisch nicht entdeckt werden können (*Acerini et al. 1998, Cronin et al. 1997, Gadd et al. 1992, Savilahti et al. 1986, Sigurs et al. 1993*). Die Patienten mit Zöliakie und Diabetes sind signifikant häufiger weiblich und jünger am Zeitpunkt der Diabetesmanifestation als die Diabetiker ohne Zöliakie (*Barera et al. 1991, Eterman und Feltkamp 1978, Koletzko et al. 1988, Mäki et al. 1984*). Da bei Patienten mit Diabetes mellitus die Ernährung mit individueller Verteilung der Kohlenhydrate eine entscheidende Säule der Diabetestherapie darstellt, ist ein frühzeitiges Erkennen einer begleitenden Zöliakie von besonderer Bedeutung. Ferner müssen wegen des Auftretens von Spätfolgen (u. a. Tumoren, Infertilität, Osteoporose) auch Diabetespatienten mit asymptomatischer Zöliakie mit einer glutenfreien Diät behandelt werden. Diese Therapie bringt bei den durch die Diabeteserkrankung diätetisch ohnehin eingeschränkten Patienten einige Probleme mit sich, zumal die Patienten oft jüngeren Alters sind und dadurch zusätzliche Compliancedefizite entstehen. Aufgrund fehlender prospektiver Studien kann bisher der Nutzen einer glutenfreien Kost bei an stiller Zöliakie erkrankten Typ 1 Diabetikern nicht sicher abgeschätzt werden.

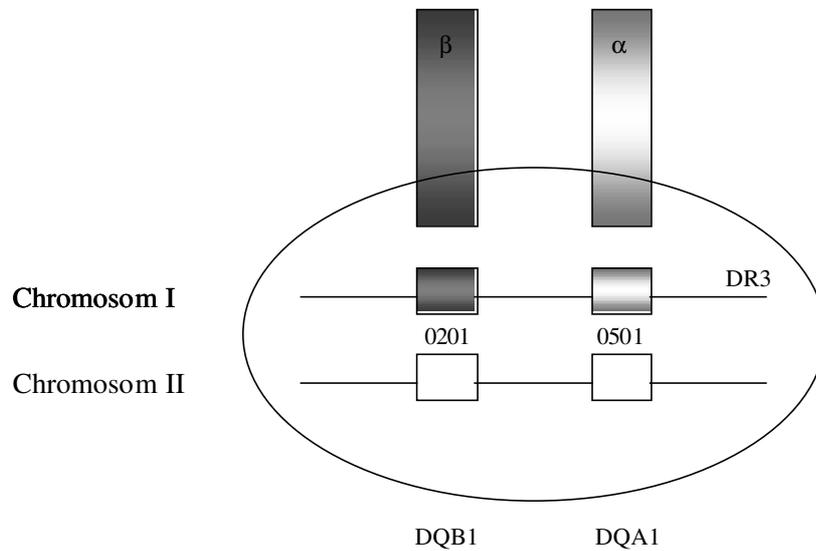
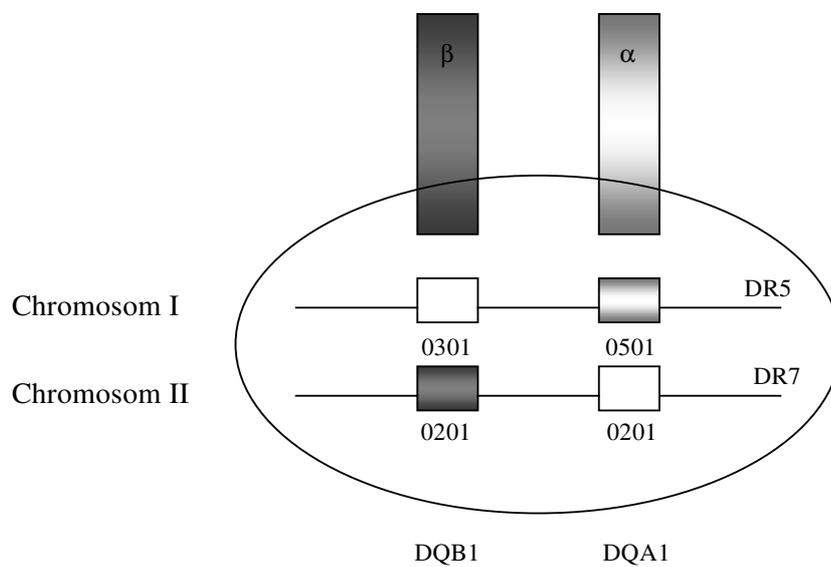
Bei Patienten mit einem Typ 2 Diabetes mellitus konnte im Vergleich zu gesunden Kontrollen kein gehäuftes Auftreten einer Zöliakie beobachtet werden (*Lampasona et al. 1998, Page et al. 1994, Walsh et al. 1978*).

## 1. 5. Pathogenese der Erkrankung

### 1. 5. 1. Genetische Faktoren

Die Zöliakie kann familiär gehäuft auftreten, wobei die Verwandten oft symptomfrei sind (*MacDonald et al. 1965*). Die Prävalenz der Erkrankung unter erstgradig Verwandten liegt bei 10% (*Ellis 1981, Marsh 1992*). Bei HLA identischen Geschwistern beträgt die Konkordanzrate um 30% (*Mearin et al. 1983*), bei eineiigen Zwillingen fast 70% (*Polanco et al. 1981*). Dies belegt, daß neben genetischen auch Umweltfaktoren für das Auslösen der Krankheit verantwortlich sind.

Ein Hauptdispositionsfaktor für eine glutensensitive Enteropathie findet sich auf einem ungefähr 4000 kb großen Abschnitt des kurzen Arms des Chromosoms 6, wo die HLA-Moleküle kodiert sind. HLA-Moleküle (human leukocyte antigen) sind membrangebundene Glykoproteine, welche als Heterodimere aus je einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette exprimiert werden. Die Klasse I enthält die Gruppen A, B und C, die Klasse II die Gruppen DR, DQ und DP. Die Funktion der HLA-Moleküle besteht in der Bindung von Peptidfragmenten prozessierter Proteine und deren Präsentation an der Oberfläche. Die Klasse I bindet v.a. endogene, die Klasse II v. a. exogene Peptide. Die HLA-Klasse II-Moleküle werden von B-Zellen, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert, ihre Bildung kann durch Interferon- $\gamma$  und den Tumornekrose-Faktor (TNF) induziert werden. Der wichtigste Haplotyp (die bestimmte Kombination von mütterlichen und väterlichen Allelen auf einem Chromosom), der bei 90-95% der Zöliakiepatienten vorkommt, ist das DQ  $\alpha/\beta$ -Heterodimer (DQw2). Dieses weist eine starke Koppelung (gemeinsame Übertragung von Genen) mit DR3 und B8 auf (*Brautbar et al. 1981, Corazza et al. 1985, Djilial-Saiah et al. 1994, Palavecino et al. 1990, Ploski et al. 1993, Tosi et al. 1983*). Auch von HLA-DR7/DR5 und einigen HLA-DP Merkmalen wurde eine Assoziation mit einer Zöliakie berichtet (*Bugawan et al. 1989, Caffrey et al. 1990, Howell et al. 1986, Howell et al. 1988, Kagnoff et al. 1989, Tiwari und Terasaki 1985*). Über eine Sequenzierung von HLA-DQ Genen konnten verschiedene Untergruppen identifiziert werden. Es ergab sich, daß die Zöliakie primär mit einem bestimmten HLA-DQ  $\alpha/\beta$ -Heterodimer (DQA1\*0501/DQB1\*0201) assoziiert ist. Es spielt dabei keine Rolle, ob diese Gene in cis- oder in trans-Stellung, d.h. auf demselben oder zwei verschiedenen Chromosomen, lokalisiert sind (*Abb. 2*) (*Sollid et al. 1989*).

HLA-DQ Moleküle in cis-StellungHLA-DQ Moleküle in trans-Stellung**Abbildung 2 Primäre Assoziation bestimmter HLA-Gene bei Patienten mit Zöliakie**

Patienten mit Zöliakie, die für DR3 oder DR5/DR7 heterozygot sind, haben eventuell dasselbe DQ-Molekül. Die Gene DQA1\*0501 und DQB1\*0201 können dabei in cis- oder trans-Stellung stehen (*modifiziert nach Sollid et al. 1989*)

In den meisten untersuchten Populationen finden sich etwa 10% Zöliakiepatienten, die nicht das DQA1\*0501/DQB1\*0201-Heterodimer besitzen (*Polvi et al. 1998*). Die Mehrzahl von ihnen weist HLA-DR4 auf, so daß ein anderer Krankheitszweig angenommen wird (*DeMarchi und Carbonara 1984, Tosi et al. 1986*). Dies wird dadurch unterstützt, daß DR3/DR7 negative Patienten niedrigere AGA-Spiegel aufweisen als positive Patienten (*Bonamico et al. 1991*). Da die meisten Menschen, die die oben beschriebenen Gene tragen, trotz glutenhaltiger Ernährung keine Zöliakie entwickeln, ist es wahrscheinlich, daß noch weitere, bisher unbekannte Gene an der Pathogenese beteiligt sind.

### **1. 5. 2. Umweltfaktoren**

Neben genetischen Faktoren werden auch Umweltfaktoren als krankheits-triggernd angesehen. Zum einen gehört dazu das unten ausführlich beschriebene Gluten, zum anderen wird die Rolle frühkindlicher Ernährungsformen untersucht und die Bedeutung eines viralen Agens diskutiert.

Es wurden Studien durchgeführt, die einen möglichen Zusammenhang zwischen Stillen, Kuhmilchgabe, Beginn glutenhaltiger Ernährung, der Menge des konsumierten Glutens und der Entstehung einer Zöliakie aufdecken sollten. Ascher et al. konnten 1997 keinen statistischen Zusammenhang feststellen und schreiben diesen Faktoren daher eine geringe Bedeutung in der Pathogenese zu.

Die  $\alpha$ -Gliadin-Peptidkomponente des Glutens enthält eine Aminosäuresequenz, welche der des Glykoproteins E1B des humanen intestinalen Adenovirus 12 sehr ähnlich ist. Die Antikörper gegen E1B reagieren kreuz mit  $\alpha$ -Gliadin, und es gibt serologische Beobachtungen, welche darauf hinweisen, daß die Entwicklung einer Zöliakie nach einer vorausgegangenen Exposition mit dem Adenovirus 12 erfolgte (*Kagnoff et al. 1987*).

### 1. 5. 3. Gluten

Die Erkenntnis, daß die Aufnahme von Weizenprodukten für Patienten mit einer Zöliakie schädlich ist, hat dazu geführt, daß das Gliadin als Auslöser der Erkrankung identifiziert werden konnte. Weizenmehl läßt sich durch Waschen in Wasser in einen Stärkeanteil und einen Proteinanteil, das Gluten, auftrennen. Aus dem Gluten kann man über Alkoholextraktion, z.B. mit 70%igem Ethanol, eine alkohollösliche Fraktion, das Gliadin, und eine unlösliche Fraktion, das Glutenin, gewinnen. Die Toxizität des Gliadins wurde in vielen Studien belegt, das Glutenin zeigt nur einen schwachen Effekt. Gliadin ist sehr reich an Glutamin (~40%) und Prolin (~17%), aber sehr arm an Tryptophan und Lysin. Man kann vom Gliadin 4 verschiedene Klassen unterscheiden ( $\omega$ 5-,  $\omega$ 1,2-,  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Typ), wobei ein Teil des  $\gamma$ -Typs als die toxische Komponente identifiziert wurde. In drei verschiedenen Studien wurde gezeigt, daß die toxischen Gliadinpeptide die Sequenzen Prolin-Serin-Glutamin-Glutamin und Glutamin-Glutamin-Glutamin-Prolin gemeinsam haben (*DeRitis et al. 1988, Jos et al. 1983, Wieser 1996, Wieser et al. 1986*). Pankreasenzyme können die schädigende Wirkung des Gliadins nicht zerstören, wohl aber Papain (*Frazer et al. 1959, Frazer 1960, Messer et al. 1964, van de Kramer et al. 1955*).

Proteine, welche wie Gliadin reich an Prolin und Glutamin und arm an den essentiellen Aminosäuren (z.B. Tryptophan) sind, werden Prolamine genannt. Neben dem Gliadin, welches v.a. im Weizen vorkommt, gehören dazu das Hordein der Gerste und das Zein im Mais. Es ist nicht wissenschaftlich begründet, daß Hafer und sein Prolamin Avenin toxisch wirken. Der Anteil des Prolamins am Hafer ist 5-fach geringer als der der entsprechenden Prolamine in Weizen, Roggen und Gerste, so daß dies wahrscheinlich die größere Toleranz der Patienten gegen dieses Getreide bedingt (*Mäki und Collin 1997*).

#### 1. 5. 4. Immunologische Aspekte

Die glutensensitive Enteropathie nimmt in der Gruppe der Autoimmunerkrankungen eine Sonderstellung ein, weil die Erkrankung durch einen exogenen Faktor ausgelöst wird und von der Gliadinexposition abhängig ist. Ferner werden die meisten organspezifischen Autoimmunerkrankungen durch einen irreversiblen Gewebeschaden symptomatisch. Bei der Zöliakie regenerieren die Zotten des Darms wieder, wenn Gluten aus der Nahrung entfernt wird (*Marsh 1997*).

Bei der Zöliakie finden sich, wie bereits erwähnt, auch bei asymptomatischen Verläufen immunohistochemische Veränderungen der Darmschleimhaut, zu denen auch eine Ansammlung von Lymphozyten intraepithelial gehört (*Arranz und Ferguson 1993, Cellier et al. 1998, Ferguson und Murray 1971, Halstensen et al. 1989, Kutlu et al. 1993, Savilahti et al. 1990, Spencer et al. 1989*). Bei den Lymphozyten handelt es sich um CD3+ T-Lymphozyten mit  $\alpha/\beta$ - und  $\gamma/\delta$ -T-Zell-Rezeptoren (TCR) (*Kaukinen et al. 1998*). Die aktivierten CD 45R0+ T-Zellen exprimieren Interleukin (IL)-2-Rezeptoren an ihrer Oberfläche. Die Zellen finden sich bei genetisch verdächtigen Personen nur in der Lamina propria des Darms, bei Zöliakiepatienten auch im peripheren Blut (*Kerttula 1998*). Die T-Zellen des Darms exprimieren v. a. HLA-DQ  $\alpha/\beta$ , während im peripheren Blut auch andere Glykoproteintypen vorkommen (*Gjertsen et al. 1994, Lundin et al. 1990, Molberg et al. 1997*). Für das Vorhandensein einer Typ 1-Immunantwort (zytotoxische Reaktion mit Gewebeerstörung) nach Glutenbelastung bei Zöliakiepatienten spricht die Erhöhung von IFN- $\gamma$  und IL-6 produzierenden Zellen im Blut bei fehlender Zunahme der IL-4/IL-10-Produktion (*Hansson et al. 1999*).

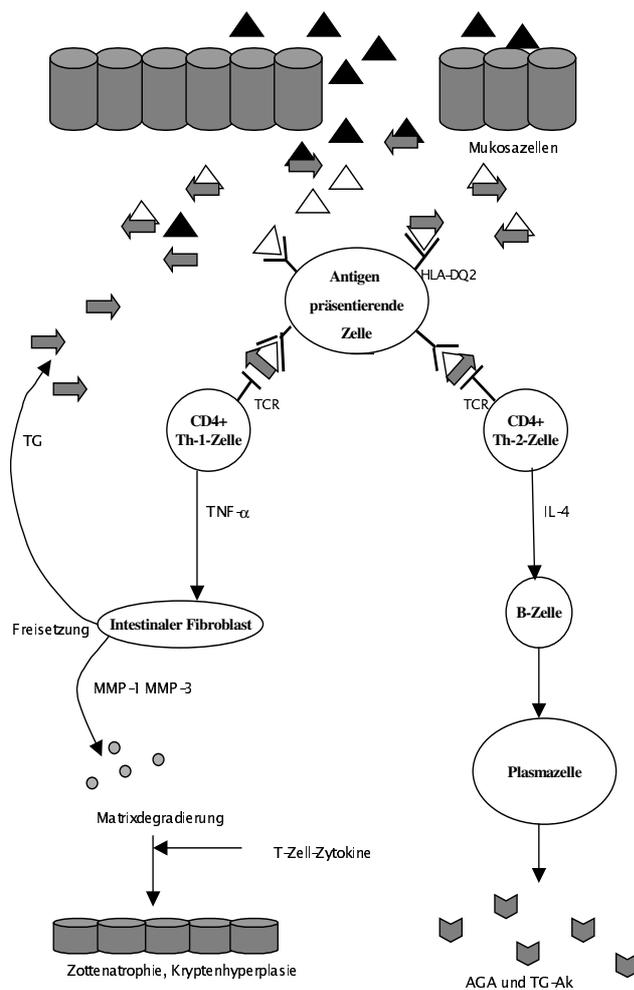
Es ist nicht vollständig geklärt, warum bei der Zöliakie nach Aufnahme eines exogenen Triggerfaktors Antikörper gegen körpereigenes Gewebe entstehen und es zu einer Schädigung der Darmschleimhaut kommt. Bisher existieren mehrere hypothetische Erklärungsmodelle:

- Eventuell führt die Aufnahme des Gliadins zu einer Demaskierung von Kryptenretikulin- und Endomysiumepitopen. Die Präsentation der Autoantigene mittels HLA-Klasse II-Molekülen antigenpräsentierender Zellen kann inflammatorische T-Zell-Populationen aktivieren. Die Immunantwort auf diese

Epitope ist spezifisch DQ  $\alpha/\beta$  mediiert und kann auch in vitro bei genetisch prädisponierten Personen ohne Zöliakie ausgelöst werden. Eine weitere Gliadinzufuhr führt zu einer Selbsterhaltung des entzündlichen, die Mukosa destruierenden Prozesses (*Mäki 1996*).

Nachdem das Enzym Gewebs-Transglutaminase (TG) als Antigen der EmA identifiziert wurde, wird nun im Rahmen der Zöliakie diskutiert, daß Gliadin eines der wenigen Donatorsubstanzen der TG ist. Die Entstehung der Antikörper gegen TG und Gliadin und die histologisch erkennbaren Mukosaveränderungen erklären sich Schuppan et al. über folgenden Mechanismus:

- Die Schädigung der Darmwand über Gluten oder andere Faktoren (z. B. Infektion) führt zur Freisetzung von TG v.a. aus mononukleären und mesenchymalen Zellen (z. B. Fibroblasten) der Lamina propria des Darms. Durch die Vernetzung des Gliadins mit der TG entstehen Komplexe, die neue antigen wirksame Epitope darstellen. Eventuell können auch Peptide des deamidierten Gliadins an die antigenpräsentierenden Zellen gebunden werden. Bei genetisch prädisponierten Personen wird nun eine Th2-Immunantwort induziert, welche zur Bildung der Antikörper gegen TG und Gliadin führt. Die Präsentation der Gliadinpeptide bzw. Gliadin-TG-Komplexe erfolgt auch an TNF- $\alpha$  produzierende T-Zellen. Diese zytotoxische Th1-Antwort führt zur Schädigung der Mukosazellen mit Freisetzung von TG und Metalloproteinasen und zur weiteren Unterhaltung des Prozesses (*Dieterich et al. 1997, Schuppan et al. 1998*). Die Immunantwort im Rahmen einer glutensensitiven Enteropathie wird in *Abb. 3* modellhaft dargestellt.



#### Erklärung

1. Mukosaschaden führt zum Eindringen von Gliadin ▲
2. Reaktion des Gliadins mit Transglutaminase freigesetzt aus Fibroblasten und anderen Zellen; Komplexbildung und Deamidierung des Gliadins ▲
3. Bindung an HLA-DQ2+ antigenpräsentierende Zellen ▲
4. Erkennung durch den T-Zellrezeptor CD4+ T-Zellen; Auslösung einer Immunantwort abhängig von T-Zell-Typ ▲
5. Th-1-Zellen aktivieren über TNF- $\alpha$  Fibroblasten, die u. a. Transglutaminase (▲) und Metalloproteinasen (○) freisetzen; Matrixdegradation und Destruktion der Darmmukosa unter Mithilfe von T-Zell-Zytokinen ▲
6. Th-2-Zellen aktivieren über Interleukin-4 B-Zellen, die sich in Plasmazellen differenzieren; Produktion von Antikörpern gegen Gliadin und Transglutaminase (■)

#### Abbildung 3

Immunantwort und Mukosazerstörung im Rahmen der glutensensitiven Enteropathie (modifiziert nach Schuppan et al. 1998)

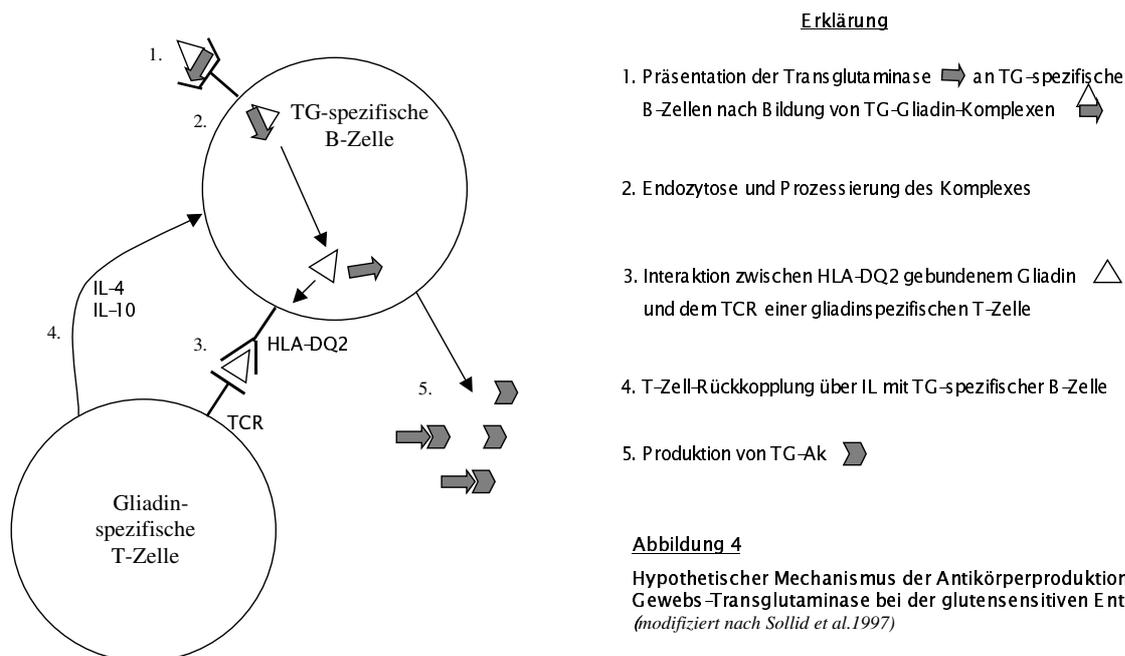
Dieses Modell der T-Zell-Aktivierung als Ursache der Darmveränderungen wird durch zahlreiche andere Untersuchungen gestützt:

Molberg et al. konnten einen Teil des  $\gamma$ -Gliadins, das durch Glutamindeamidierung entsteht, als Bestandteil des Epitops für DQ2-restringierte T-Zellen identifizieren. Die Deamidierung des  $\gamma$ -Gliadins konnte neben einer Säurebehandlung auch durch Zugabe von TG erreicht werden (Molberg et al. 1998, Sjostrom et al. 1998). Ferner wurde durch die Klonierung von DQ2+ und CD4+ Mukosa-T-Zellen eine Produktion proinflammatorischer Zytokine, u. a. von IFN- $\gamma$ , nachgewiesen (Kerttula et al. 1999, Nilsen et al. 1995, Troncone et al. 1998). In einer Studie fand sich eine Th1-Antwort nur bei intestinalen T-Zellen, nicht aber im Blut (Kerttula et al. 1999). Außerdem konnte in subepithelialen Fibroblasten und Makrophagen bei Patienten mit aktiver Zöliakie eine erhöhte mRNA-Expression für Metalloproteinase 1 (MMP-1) und 3 (MMP-3) nachgewiesen werden. Diese Enzyme führen zu einer extrazellulären

Matrixdegradierung, die einen entscheidenden Faktor zu den histologischen Veränderungen beitragen kann. Die Produktion der Proteine normalisiert sich unter glutenfreier Diät. Dies wäre durch eine Abnahme der Th1-Antwort bei fehlender Neoepitopbildung erklärbar (Daum et al. 1999).

Sollid et al. schlagen einen alternativen Mechanismus der Antikörperproduktion gegen TG und Gliadin nach Bildung der Gliadin-TG-Komplexe vor (Sollid et al. 1997):

- Es gibt spezifische B-Zellen, die Antikörper gegen Autoantigene mit Hilfe von T-Zellen bilden können. Dafür muß das Autoantigen an ein Trägerprotein, z.B. das T-Zell-Epitop eines Fremdantigens, gebunden werden (Haptenbildung). Es gibt gliadinspezifische CD4+ T-Helferzellen in der Dünndarmmukosa, die nach Bildung der Gliadin-TG-Komplexe die Aktivierung TG-spezifischer B-Zellen bewirken können (Abb. 4). Auch dieses Modell erklärt, warum unter glutenfreier Diät die Produktion der Antikörper gegen TG absinkt. Außerdem sind die Antikörper gegen TG krankheitsspezifischer als die AGA, weil sie nur im Darm gebildet werden können, wo eine Koppelung von Gliadin an TG möglich ist. AGA können auch in regionalen Lymphknoten ohne ein pathologisches Substrat gebildet werden.



## 1. 6. Bedeutung der Autoantikörper

Bei einer Zöliakie können verschiedene Antikörper gefunden werden, die bisher mit unterschiedlicher Aussagekraft für das Screening größerer Populationen eingesetzt werden. Dazu gehören Personen, welche ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer Zöliakie aufweisen, sei es wegen erblicher Faktoren, assoziierter Erkrankungen oder extraintestinaler Symptome. Die serologischen Marker sind insbesondere dann von Nutzen, wenn die Patienten nicht über typische Durchfälle berichten oder sogar asymptomatisch sind (*Ferguson 1993, Johnston et al. 1996*). Neben der Biopsie werden als diagnostische Marker Antikörper gegen Endomysium und Gliadin eingesetzt, wobei mehrere epidemiologische Studien zeigen konnten, daß die IgA-Endomysium-Antikörper die sensitivsten und spezifischsten serologischen Marker für die Zöliakie darstellen und den Gliadin-Antikörpern überlegen sind (*Ferreira et al. 1992, Ferguson 1993, Johnston et al. 1996, Mäki 1995*). In einer großen italienischen Studie konnte durch das Screening auf EmA bei 111 von 17.201 (0,7%) Schulkindern eine Zöliakie nachgewiesen werden (*Catassi et al. 1996*). Die Mehrzahl der positiven Kinder hatte nur geringgradige Beschwerden, so daß in den meisten Fällen die Erkrankung nicht bekannt war (Verhältnis von bekannter zu unbekannter Zöliakie 1:7). In der Biopsie waren jedoch Zeichen einer leichten bis mäßiggradigen Entzündung der Dünndarmschleimhaut nachweisbar, so daß hier eine latente Zöliakie besteht. Ähnlich hohe Prävalenzen (1:152-1:256) fanden sich in anderen europäischen Studien (*Grodzinsky 1996, Johnston et al. 1996*). Bei Patienten mit latenter Zöliakie wird die Diagnose und eine effektive Therapie häufig über viele Jahre verzögert. Diese Patienten fallen meist erst auf, wenn sich Nebenwirkungen der chronischen Resorptionsstörungen wie z.B. Wachstumsdefizite, Fertilitätsstörungen, Anämie und Osteoporose zeigen. Da bei Patienten mit subklinischer Zöliakie über eine deutlich erhöhte Mortalität berichtet wurde (*Collin 1994*) und ein 8- bzw. 30-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung gastrointestinaler Malignome bzw. Lymphome besteht (*Logan et al. 1989*), ist es von großer Wichtigkeit, diese Patienten so früh wie möglich zu diagnostizieren.

Ein diagnostischer Marker sind Antikörper der IgA- und IgG-Klasse gegen Gliadin (AGA). Diese Marker werden meist über einen Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA) nachgewiesen. Sie sind ein guter Indikator für eine aktive Zöliakie und können genutzt werden, um die diätetische Compliance von Patienten zu beurteilen

(Savilahti et al. 1983, Volta et al. 1983). Sie sind ferner altersabhängig und werden genetisch beeinflusst (Kumar 1991, Levenson et al. 1985, Mearin et al. 1984, Savilahti et al. 1983, Troncone und Ferguson 1991, Weiss et al. 1983). Die verschiedenen Tests variieren trotz grundlegend gleicher Methodik in ihren Ergebnissen. Für IgG-AGA werden Sensitivitäten zwischen 82% und 100%, für IgA-AGA zwischen 52% und 99,9% angegeben. Die Spezifitäten schwanken zwischen 50% und 100% für IgG-AGA und 65% und 100% für IgA-AGA (Kumar et al. 1984, Lebenthal und Heitlinger 1983, Lerner und Lebenthal 1991, Tucker et al. 1988). IgG-AGA kommen auch häufig bei anderen Erkrankungen und bei gesunden Individuen vor (Mäki 1995). Deshalb werden IgA-AGA als spezifischer und IgG-AGA als sensitiver angesehen (Lerner und Lebenthal 1991, Lerner et al. 1994, Sacchetti et al. 1996, Stern et al. 1996, Troncone und Ferguson 1991). Es gibt Antikörper, die mit anderen Strukturen als Gliadin kreuzreagieren. Dazu gehören antigene Strukturen auf Enterozyten und Calretikulin, die mit denselben Peptiden, die die Bindung zum  $\alpha$ -Gliadin herstellen, gebunden werden (Krupickova et al. 1999). Calretikulin ist ein Ca-bindendes Protein, welches in den meisten Zellen exprimiert wird und mit dem endoplasmatischen Retikulum in Verbindung steht.

Ein weiterer diagnostischer Marker sind Antikörper gegen R<sub>1</sub>-Retikulin (ARA). Sie binden an Bindegewebe, das den Kollagen Typ III enthält (Hallström 1989, Mäki et al. 1984, Seah et al. 1971). Die IgA-Klasse wird als krankheitsspezifisch angesehen. Die Antikörper werden über eine indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen, wobei sich Sensitivitäten zwischen 30% und 95% bei Spezifitäten zwischen 59% und 100% ergeben (Kumar et al. 1984, Lebenthal und Heitlinger 1983, Lerner und Lebenthal 1991, Tucker et al. 1988).

Seit 1983 ist noch eine weitere Antikörpergruppe bekannt, die als EmA bezeichnet wird. Sie richtet sich gegen das Endomysium, d.h. die intermyofibrillären Bindegewebestrukturen, welche die glatten Muskelzellen in der Darmschleimhaut umgeben. Sie besteht hauptsächlich aus Antikörpern der IgA-Klasse und wird als sehr spezifisch und sensitiv in der Diagnose der Zöliakie angesehen (Chorzelski et al. 1983, Hallström 1989, Kapuscinska et al. 1987, Kumar et al. 1989, Rossi et al. 1988, Rostoker et al. 1988, Valeski et al. 1990). Die Antikörperproduktion kann auch in vitro durch Gliadin induziert werden (Picarelli et al. 1996). Der Nachweis der Antikörper erfolgt durch indirekte Immunfluoreszenz entweder an Kryostatschnitten

von Ösophagus, Dünndarm oder humanem Nabelschnurgewebe (*Not et al. 1997, Not et al. 1998, Sulkanen et al. 1998*).

Börner et al. konnten verschiedene Antigene aus unterschiedlichen Tiergeweben isolieren, die für den Nachweis von EmA/ARA-positiven Seren über einen ELISA genutzt wurden. Sie vermuten daher, daß das Antikörperspektrum bei der Zöliakie größer ist als die bisher bekannten Antikörper EmA, ARA, AGA (*Börner 1996*).

Als weitere Möglichkeit, das Vorliegen einer glutensensitiven Enteropathie z.B. bei asymptomatischen erstgradig Verwandten zu erkennen, dient die rektale Glutenbelastung. Sie ist im Vergleich zur oralen Belastung schneller sowie sicher und aussagekräftig (*Loft et al. 1990, Dezi et al. 1997*). Neben diesen Tests wurde ein Permeabilitätstest für die Darmschleimhaut entwickelt, welcher sich aber wegen wenig aussagekräftiger Resultate nicht etabliert hat (*Bode und Gudmand-Hoyer 1987*).

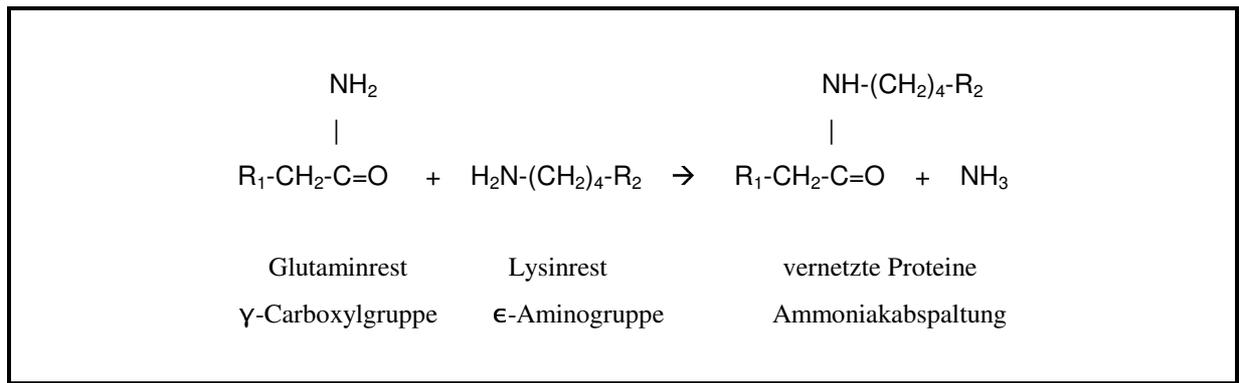
## **1. 7. Physiologische Funktion der Gewebs-Transglutaminase und ihre Bedeutung im Rahmen der Zöliakie**

Die Gewebs-Transglutaminase (TG) (E.C. 2.3.2.13) ist ein intrazelluläres Protein, welches ubiquitär im Organismus exprimiert wird. Das Protein hat eine Größe von 716 Aminosäuren und wird bei einer Zellschädigung in das Gewebe freigesetzt. Dort vernetzt die TG extrazelluläre Matrixproteine über die Bildung von kovalenten Glutamin-Lysin-Brücken und stabilisiert so die Bestandteile des Granulationsgewebes im Rahmen der Wundheilung. Während viele verschiedene Proteine als Akzeptorsubstrate dienen können, ist die Zahl der Donatoren der TG limitiert (*Wang und Johnson 1992*). Eine Sonderform der TG kommt im Plasma vor. Als Blutgerinnungsfaktor XIII wird sie in der Leber synthetisiert und vernetzt nach Aktivierung durch Thrombin Fibrinmonomere zu Fibrin. Im Rahmen des M. Crohn dient sie als Marker der Krankheitsaktivität, denn ihr Serumspiegel ist im floriden Stadium vermindert (*D`Argenio et al. 1995*). Die Gewebs-Transglutaminase arbeitet kalziumabhängig und wirkt bei der Apoptose, dem programmierten Zelltod, mit (*Bowness et al. 1987, Piacentini 1995*).

Da die IgA-Endomysium-Antikörper einen fast pathognomonischen Marker für die Zöliakie darstellen, ist es möglich, durch Screening auf EmA eine asymptomatische Zöliakie mit hoher Sicherheit zu identifizieren. Der Nachteil der EmA liegt in den aufwendigen Nachweismethoden über einen indirekten Immunfluoreszenztest (*Ferguson 1993, Ferreira 1996, Johnston 1992, Mäki 1995*). Dieterich et al. identifizierten 1997 die Gewebs-Transglutaminase als das Zielantigen der EmA. Sie konnten zeigen, daß Seren von Patienten mit manifester Zöliakie ein Protein der Molekularmasse 85000 Dalton präzipitieren, nicht aber Kontrollseren von gesunden Probanden, Patienten mit autoimmunen Erkrankungen oder Kolitis ulzerosa. Das isolierte Protein wurde nach proteolytischer Aufspaltung in Peptide über N-terminale Aminosequenzierung als Gewebstransglutaminase identifiziert. Um die TG als Zielantigen der EmA zu bestätigen, wurden indirekte Immunfluoreszenztests durchgeführt, bei denen Seren, die hochtitrig EmA enthielten, mit und ohne TG vorinkubiert wurden. Während die unbehandelten Zöliakieseren das charakteristische Honigwabenmuster zeigten, war bei den mit TG vorbehandelten Seren das Muster fast komplett aufgehoben (*Dieterich et al. 1997*).

TG ist involviert in das Protein Crosslinking, führt zur Bildung einer E-( $\gamma$ -Glutamyl)-Lysin Bindung (*Abb. 5*) und zur Deamidierung von Gliadin. Im Gegensatz zu Gliadin werden Kontrollproteine wie verschiedene Albumine und  $\beta$ -Lactoglobulin von TG nicht vernetzt (*Dieterich et al. 1997, Szabolet et al. 1987*). Wie oben beschrieben konnte kürzlich nachgewiesen werden, daß die Deamidationsreaktion zur Bildung von Neoepitopen mit Gliadinpeptiden führen kann, welche von spezifischen T-Lymphozyten erkannt werden. Durch das Crosslinking zwischen Gliadin und TG könnte auch die durch Gliadinaufnahme induzierte Bildung von Autoantikörpern gegen TG erklärt werden (*Molberg et al. 1998*). Nach der Identifizierung von TG als Antigen der EmA wurden Enzyme-linked Immunoassays (ELISA) für den einfachen Nachweis der TG-Antikörper entwickelt.

Den genauen Mechanismus der TG-Reaktion stellt *Abb. 5* dar.



### **Abbildung 5 Reaktionsmechanismus der Gewebs-Transglutaminase**

Die Gewebs-Transglutaminase vernetzt Substrate mit  $\gamma$ -Carboxyl und  $\epsilon$ -Aminogruppen zu Proteinen. Eines ihrer Substrate ist das Gliadin, mit dem sie nach Deamidierung Komplexe ausbildet, die in der Pathogenese der Zöliakie eine wichtige Rolle spielen.

## 2. Zielstellung

Bisher sind die EmA die sensitivsten und spezifischsten Marker für das Vorliegen einer Zöliakie und werden deshalb auch für Screeningzwecke eingesetzt. Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung der Autoantikörper gegen das Enzym Gewebs-Transglutaminase (TG-Ak) im Vergleich zu den Antikörpern gegen Endomysium (EmA) und Gliadin (AGA) als Screeningmarker für das Vorliegen einer Zöliakie zu untersuchen. Zur Bestimmung der TG-Ak soll ein einfach durchführbarer Radioimmunassay etabliert werden, der sensitiv und schnell einen quantitativen Nachweis der Antikörper ermöglicht. Die Gewebs-Transglutaminase soll aus humanem Gewebe kloniert werden und das radioaktiv markierte Protein als Antigen in einem neuen Test eingesetzt werden. Der Test soll so konzipiert sein, daß er auch als breit angelegtes Screeningverfahren in Populationen mit erhöhtem Zöliakierisiko verwendet werden kann. Durch die Testung von Antikörpern der Klassen IgA und IgG sollen Unterschiede in den serologischen Reaktionsmustern von Patienten mit manifester Zöliakie, Verdacht auf Zöliakie, Typ 1 Diabetes mellitus und anderen Autoimmunerkrankungen analysiert werden. Durch die Untersuchung von Zöliakiepatienten und gesunden Kontrollen soll die diagnostische Sensitivität und Spezifität des neuen Radioimmunassay und durch den Vergleich mit den herkömmlichen Antikörpern gegen Endomysium und Gliadin der Stellenwert des neuen Verfahrens für die Identifizierung von Personen mit einer Zöliakie bestimmt werden. Weiterhin soll die Aussagekraft des neuen Immunmarkers für die Identifizierung von Personen mit einem hohen Risiko für eine Zöliakie auch in subklinischer Form ermittelt werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3. 1. Reagenzien

Agarose LM-MP (BOEHRINGER / Mannheim (D))

Alkalische Phosphatase (BOEHRINGER / Mannheim (D))

AMV Reverse Transkriptase (BOEHRINGER / Mannheim (D))

Anti-human IgA-Agarose (SIGMA / Deisenhofen (D))

ATP (BOEHRINGER / Mannheim (D))

Autoradiographiefilme (KODAK X-OMAT AR 50)

Benzamidinhydrochlorid (SIGMA / Deisenhofen (D))

Chloroform-Isoamyl-Alkohol (SIGMA / Deisenhofen (D))

Chloroform (SIGMA / Deisenhofen (D))

Coomassie Brilliant Blue (BIORAD / Hercules (USA))

Dephosphorylasepuffer (BOEHRINGER / Mannheim (D))

2,5-Diphenyloxazol (PPO) (MERCK / Darmstadt (D))

1kb DNA-Marker (PROMEGA / Madison (USA))

Dünndarmschnitte des Affen (EUROIMMUN / Groß Grönau bei Lübeck (D))

ELISA-Test für IgA-Gliadin-Antikörper (EUROIMMUN / Groß Grönau bei Lübeck (D))

Essigsäure 99% (ROTH / Karlsruhe (D))

Ethanol 96% (ROTH / Karlsruhe (D))

Ethidiumbromid (ROTH / Karlsruhe (D))

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (ROTH / Karlsruhe (D))

Expand High Fidelity PCR System (BOEHRINGER / Mannheim (D))

Gel loading solution (SIGMA / Deisenhofen (D))

GeneClean System (DIANOVA / Hamburg (D))

Glycerin (SIGMA / Deisenhofen (D))

Glycin (MERCK / Darmstadt (D))

High Pure Plasmid Isolation Kit (BOEHRINGER / Mannheim (D))

HINC II (PROMEGA / Madison (USA))

HIND III (PROMEGA / Madison (USA))

Isopropanol (SIGMA / Deisenhofen (D))

Kaliumchlorid (ROTH / Karlsruhe (D))

Kaliumdihydrogenphosphat (ROTH / Karlsruhe (D))

Kodak Entwickler und Fixierer (SIGMA / Deisenhofen (D))  
Kompetente E. coli (JM 109) (PROMEGA / Madison (USA))  
Ligasepuffer (PROMEGA / Madison (USA))  
Lithiumchlorid (SIGMA / Deisenhofen (D))  
L-Methionin (SIGMA / Deisenhofen (D))  
Methanol (MALLINCKRODT BAKER / Deventer (NL))  
[<sup>35</sup>S]-Methionin (>1000Ci/mmol) (AMERSHAM / Braunschweig (D))  
Microscint 20 (Szintillator) (PACKARD / Groningen (NL))  
Miniprepsystem (BOEHRINGER / Mannheim)  
Natriumacetat (SIGMA / Deisenhofen (D))  
Natriumchlorid (MALLINCKRODT BAKER / Deventer (NL))  
Natriumhydrogenphosphat (ROTH / Karlsruhe (D))  
Natronlauge 5N (MERCK / Darmstadt (D))  
Nuclease free water (PROMEGA / Madison (USA))  
PGEM 4Z-Klonierungsvektor (PROMEGA / Madison (USA))  
Phenolchloroform (SIGMA / Deisenhofen (D))  
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) (SIGMA / Deisenhofen (D))  
Protein A-Sepharose (PHARMACIA / Freiburg (D))  
Protein Molecular Weight Standard (BIORAD / Hercules (USA))  
Puffer A für Endonukleasen (BOEHRINGER / Mannheim (D))  
RNA-Clean (AGS / Heidelberg (D))  
SAC I (PROMEGA / Madison (USA))  
Salzsäure 5 N (MERCK / Darmstadt (D))  
Sodiumdodecylsulfate (SDS) (BIORAD / Hercules (USA))  
SP64PolyA-Vektor (PROMEGA / Madison (USA))  
T<sub>4</sub> DNA Ligase (PROMEGA / Madison (USA))  
T<sub>4</sub> Kinase (SIGMA / Deisenhofen (D))  
TNT SP6 Quick Coupled Transkription / Translation System (PROMEGA / Madison (USA))  
Trichloressigsäure (MERCK / Darmstadt (D))  
Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (ROTH / Karlsruhe (D))  
Triton X-100 (MERCK / Darmstadt (D))

Alle verwendeten Reagenzien wiesen einen Reinheitsgrad von „pure“ oder höher auf.

### 3. 2. Geräte

Agarosegelsystem (Modell B1A) (*OWL SCIENTIFIC Inc. / Woburn (MA)*)  
Automatisches Sequenziergerät (*APPLIED BIOSYSTEMS (ABI) / Forster City (CA)*)  
Biofuge fresco (*HERAEUS / Hanau (D)*)  
Eismaschine Scotsman (*FRIMONT / Milan (I)*)  
ELISA-Rüttler Titramax 100 (*HEIDOLPH / Schwabach (D)*)  
Falcons (*GREINER / Nürtingen (D)*)  
Geldokumentationssystem (*MWG Biotech / Ebersberg (D)*)  
8-Kanalmultipipette (Finnpipette) (*LABSYSTEMS / Frankfurt (D)*)  
Klebefolien S 695 (*FASSON / Champ Sur Drac (F)*)  
96-well Mikrotiterplatten (*GREINER / Nürtingen (D)*)  
Minifuge G (*HERAEUS / Hanau (D)*)  
Multiscreen Adapter Plates (*PACKARD / Groningen (NL)*)  
Multiscreen Assay System (Filtrationsplatten) (*MILLIPORE / Molsheim (F)*)  
Pipetten (*EPPENDORF / Hamburg (D)*)  
Pipettenspitzen (*SARSTEDT / Nümbrecht (D)*)  
Reagenztubes (1,5 und 0,5 ml) (*EPPENDORF / Hamburg (D)*)  
Reinstwassersystem (*MILLIPORE / Molsheim (F)*)  
SDS-Gelsystem (Mini Protean II Cell) (*BIORAD / Hercules (USA)*)  
Software für den Counter (*PACKARD / Groningen (NL)*)  
Top Count Beta Counter (*PACKARD / Groningen (NL)*)  
Vakuumgeltrockner (Modell 583) (*BIORAD / Hercules (USA)*)  
Zentrifuge 3K30 (*SIGMA / Deisenhofen (D)*)

### 3. 3. Lösungen und Puffer

#### 3. 3. 1. Pufferlösungen

##### Puffer A

20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM Benzamidin, 2 mM EDTA; pH 7,4

##### Puffer B

Puffer A; dazu 5 mM Methionin, 1 mM PMSF, 0,5% Triton-100; pH 7,4

##### Puffer C

100 mM Tris/HCl, 500 mM LiCl; pH 9,0

##### Phosphatpuffer (PBS)

135 mM NaCl, 13,5 mM KCl, 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2

#### 3. 3. 2. Elektrophoresereagenzien

##### Agarosegel 1%

0,4 g Agarose; 40 ml TAE-Puffer 1x

##### Coomassiefärbung

0,5 g/l Coomassie Brilliant Blue, 60 g/l TCA, 70 ml/l Eisessig, 100 ml/l Methanol; ad Aqua bidest

##### Gelentfärber

290 ml/l Methanol, 30 ml/l Eisessig; ad Aqua bidest

##### Laufpuffer

3,4 mM SDS, 24,8 mM Tris, 40 mM Glycin; ad Aqua bidest

##### PPO-Puffer

0,9 M PPO; ad Essigsäure

##### Probenpuffer (10 ml)

5,13 ml H<sub>2</sub>O, 1,28 ml Tris (0,5M), 1,02 ml Glycerol, 2,05 ml SDS (10%), 0,513 ml Mercaptoethanol, einige Körner Bromphenolblau

##### Sammelgel (2 ml)

1,4 ml H<sub>2</sub>O, 0,33 ml Acrylamid (30%), 0,25 ml Tris, 20 µl SDS (10%), 20 µl APS (10%), 2 µl TEMED

##### Sammelgelpuffer

49,5 mM Tris; ad Aqua bidest; pH 6,8

TAE-Puffer (1x)

0,04 M Tris, 1,14 ml/l Eisessig, 1 mM EDTA; ad Aqua bidest

Trenngel 10% (10 ml)

2,5 ml Trenngelpuffer, 4,0 ml Aqua bidest, 3,3 ml Acrylamid/Bis, 100 µl SDS (10%), 100 µl APS (10%), 4 µl TEMED

Trenngelpuffer

1,5 M Tris; ad Aqua bidest; pH 8,8

3. 3. 3. Transformation

Agarplatten

0,875 g LB-Agar mit 25 ml H<sub>2</sub>O autoklavieren; abkühlen auf 50 °C; 25 µl Ampicillin (1:1000), 25 µl X-Gal (1:1000), 125 µl IPTG 100 mM; für eine Platte

SOC-Medium

20 g/l Tryptone, 0,5 g/l Hefeextrakt, 100 mM NaCl, 25 mM KCl, 200 mM Mg<sup>2+</sup>, 200 mM Glucose; ad Aqua bidest; autoklavieren; pH 7,0

LB (Luria-Bertaini)-Medium

10 g/l Tryptone, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl; ad Aqua bidest; autoklavieren; pH 7,5

### 3. 4. Patientenseren

Es wurden Serumproben von 45 Patienten mit neu diagnostizierter und biopsisch gesicherter Zöliakie getestet. Des weiteren wurden 30 Patienten mit Verdacht auf Zöliakie, die gastrointestinale Symptome aufwiesen und EmA-positiv waren, aber nicht biopsiert werden konnten, untersucht. Außerdem dienten 305 Patienten mit einem frisch manifestierten Typ 1 Diabetes, 130 Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen (Morbus Basedow und Hashimoto Thyreoiditis) sowie 111 Patienten mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises (rheumatoide Arthritis, Kollagenosen) als Kontrollen. Die Diagnosen der Schilddrüsenerkrankungen wurden aufgrund klinischer Kriterien (endokrine Orbitopathie, Hyper- und Hypothyreose), Sonographie, TSH, fT3 und fT4 gestellt. Weitere 574 Kontrollseren stammten von gesunden Probanden, die keine gastrointestinales Symptome aufwiesen und in deren Familie kein Diabetes mellitus bekannt war. Die Untersuchungen wurden nach Aufklärung mit schriftlicher Zustimmung der Probanden durchgeführt.

	Anzahl			Alter (Jahre)		
	n	M	W	Spannweite	Median	Mittel
Zöliakie	45	14	31	2 – 67	21	27,1 ± 18,6
V. a. Zöliakie	30	9	21	2 – 66	21	26,2 ± 17,7
Typ 1 Diabetes	305	187	118	0,1 – 71	13	18,6 ± 14,4
SD-Pat.	130	25	105	1 – 85	43	44,8 ± 13,6
RA/ Kollag.Pat.	111	82	29	19 – 84	55	53,6 ± 14,4
Blutspender	574	325	249	7 – 40	30	30,2 ± 6,5

**Tabelle 1** Übersicht über die Studienpopulation

Es wurden Seren von Patienten mit gesicherter Zöliakie, mit Verdacht auf Zöliakie, Patienten mit Typ 1 Diabetes, autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen (SD-Pat.) sowie mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises (rheumatoide Arthritis (RA), Kollagenosen (Kollag.)) untersucht  
M = männliche, W = weibliche Probanden

### **3. 5. Klonierung, Expression und radioaktive Markierung der humanen Gewebs-Transglutaminase**

#### **3. 5. 1. Klonierung der humanen Gewebs-Transglutaminase (TG)**

##### **3. 5. 1. 1. Isolierung der m-RNA und PCR des cDNA-Klons**

Zunächst wurde die Gesamt-RNA mittels RNA-Clean aus humanem Schilddrüsengewebe isoliert. Dazu wurde das Gewebe in RNA-Clean homogenisiert, dann die RNA durch Chloroform aus dem Homogenisat extrahiert, mit Isopropanol präzipitiert und zum Schluß mit 70%igem Ethanol gewaschen. Durch AMV reverse Transkriptase wurde die RNA in cDNA mittels Poly-A- und Random-Primern umgeschrieben. Der TG-Klon wurde anschließend über eine PCR mit folgenden Primern (Genbank Nummer M55153) über 33 Zyklen amplifiziert:

Forward-Primer: 5'-GCCGCCACCATGGCCGAGGAGCTGGTCTTA-3'

Reverse-Primer: 5'-CTTAGGCGGGGCCAATGATGA-3'.

Die Reaktionsschritte wurden wie folgt gewählt: Denaturierung zunächst für 7 min bei 94 °C und anschließend in jedem Zyklus 30 sec bei 94 °C; Hybridisierung bei 58 °C für 30 sec und Extension bei 72 °C für weitere 30 sec. Nach dem letzten Zyklus wurde, um möglichst vollständige PCR-Produkte zu erhalten, die Extension auf 6 min verlängert. Das PCR-Produkt wurde auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt, die Bande wurde im entsprechenden Molekulargewichtsbereich ausgeschnitten, und 1 µl wurde erneut einer PCR über 30 Zyklen unter gleichen Bedingungen unterzogen.

### 3. 5. 1. 2. Klonierung des PCR-Produktes in den pGEM 4Z-Vektor

Anschließend wurde das PCR-Produkt in den mit Hinc II geschnittenen pGEM 4Z-Vektor kloniert. Hierzu wurde der Vektor zunächst mit Hinc II für 2 Std bei 37°C verdaut und, um eine Religation während der Ligation zu verhindern, dephosphoryliert. Nach einstündiger Dephosphorylierung (30 min bei 37°C und 30 min bei 56°C) mit 1 µl alkalischer Phosphatase, 10 µl Dephosphorylasepuffer und 39 µl HPLC-Wasser wurde der Vektor mittels einer Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt. Dazu wurden 100 µl des Dephosphorylierungsansatzes mit 100 µl Phenol-Chloroform nach 1 min vortexen 15 min bei 13000g zentrifugiert und anschließend die wäßrige Phase mit 9 µl 7,5 M Natriumacetat und 240 µl 96%igem Ethanol 30 min bei -80°C aufbewahrt. Dann wurde erneut 15 min bei 13000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol nochmals 5 min durch Zentrifugation gewaschen. Das Pellet wurde in 15 µl Wasser gelöst. Das PCR-Produkt wurde nach Inkubation mit ATP und T4 Kinase für 30 min phosphoryliert und mittels Gene Clean Kit aufgereinigt.

Als nächster Schritt erfolgte die Ligation des Inserts mit dem pGEM 4Z-Vektor. Es wurden 2 µl Vektor, 10 µl PCR-Produkt, 1 µl Ligase und 2 µl Ligasepuffer über Nacht bei 15°C inkubiert. 5 µl des Ligationsproduktes wurden für die Transformation in einem sterilen 1,5 ml Mikrotube auf Eis mit 20 µl kompetenten E. coli (JM 109) inkubiert. Nach 20 min wurden die Zellen 45 sec bei 42°C im Wasserbad hitzegeschockt und dann für weitere 2 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde nach Zugabe von 500 µl SOC-Medium 1 Stunde bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Suspension wurde auf einer Ampicillin-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Morgen wurde ein Blau-Weiß-Screening durchgeführt. Weiße Kolonien wurden gepickt und einzeln in 5 ml LB-Amp-Medium für 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Plasmidpräparation wurde das Miniprep-System der Firma Boehringer Mannheim gemäß Anleitung verwendet. Die Plasmide wurden mit Hind III und Sac I verdaut, auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt und 15 Minuten in Ethidiumbromid gefärbt. Die spezifische Bande mit einer Größe von ca. 2000 Basenpaaren wurde unter UV-Licht im Geldokumentationssystem ausgeschnitten. Klone mit einem Insert der richtigen Größe wurden mittels eines automatischen Sequenziersystems komplett sequenziert.

### **3. 5. 2. Umklonierung des TG-cDNA-Klons in den SP64PolyA-Vektor**

Um eine höhere Effizienz bei der in vitro Translation und Transkription zu erreichen, wurde der TG-cDNA-Klon in den SP64PolyA-Vektor umkloniert. Dafür wurden der Vektor und der Klon über Nacht bei 37°C mit den Enzymen Hind III und Sac I verdaut und auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und die Bande bei ca. 2 kB (Insert) bzw. 3 kB (Vektor) über das Gene Clean System isoliert. Der SP64PolyA-Vektor wurde analog dem pGEM4Z-Vektor einer Dephosphorylierung unterzogen. Anschließend erfolgten die Ligation, die Transformation und die Plasmidpräparation wie oben beschrieben. Um die korrekte Klonierung zu dokumentieren, wurde das SP64PolyA-TG-Insert vom 5'- und 3'- Ende ansequenziert.

### 3. 5. 3. In vitro Expression von humaner TG und Markierung mit [<sup>35</sup>S]-Methionin

Die Expression des rekombinanten Proteins und die radioaktive Markierung wurden mit Hilfe des TNT SP6 Quick Coupled Transkription/Translation Systems durchgeführt. Dazu wurde der TG-Klon (3 µl) mit 40 µl SP6 Mastermix, 5 µl Nuklease-freiem Wasser und 2 µl [<sup>35</sup>S]-Methionin (>1000Ci/mmol) gemischt und nach kurzem Vortexen für 90 min bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Die Bestimmung der Markierungsrate des Produktes wurde wie folgt durchgeführt: auf einem Stück Filterpapier wurde 1 µl des Produktes getrocknet und zweimal in 30 ml 65°C heißer Trichloressigsäure 10% für 10 min inkubiert. Hierdurch wurde das radioaktiv markierte Protein auf dem Filterpapier präzipitiert und das nicht eingebaute [<sup>35</sup>S]-Methionin abgewaschen. Dann wurde das mit den markierten Proteinen beschichtete Filterpapier bei Raumtemperatur getrocknet und im Beta-Counter gemessen. Das restliche Material wurde in Mikrotubes portioniert und bei –80 °C eingefroren.

### **3. 6. Nachweis der spezifischen Bindung der TG und Entwicklung des Radioimmunassays**

#### **3. 6. 1. Nachweis der spezifischen Bindung der [<sup>35</sup>S]-Methionin markierten TG mittels SDS-Gelelektrophorese und Autoradiographie**

20.000 cpm TG wurden mit 10 µl Serum und 200 µl Puffer B über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden 100 µl Protein A-Sepharose (50% v/v in Puffer B) hinzugegeben und das Ganze für 2 Std auf Eis geschüttelt. Nach viermaligem Waschen mit Puffer B und einmaligem Waschen mit PBS-Puffer wurde das Gemisch nach Zugabe von 40 µl Elektrophoresepuffer 5 min gekocht und anschließend zentrifugiert. Die präzipitierten Proteine wurden auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel bei einer konstanten Stromstärke (50 mA) für 60 min aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend für 2 Std in Coomassie gefärbt, nacheinander in Entfärber (für 1 Std), reiner Essigsäure (für 15 min) und 20% PPO (für 30 min) inkubiert und auf Whatman-Filterpapier im Vakuumtrockner 2 Std bei 80°C getrocknet. Das getrocknete Gel wurde auf einen Kodak X-Omat Film aufgelegt, in einer Filmkassette für 2 Wochen im -80° C Gefrierschrank inkubiert und anschließend entwickelt.

### 3. 6. 2. Entwicklung eines Radioimmunoassays zum Nachweis der Antikörper gegen rekombinante humane TG (TG-Ak)

Für den Nachweis der Antikörper gegen TG (TG-Ak) wurde ein System verwendet, welches bereits erfolgreich bei der Detektion von Antikörpern gegen diabetesspezifische Autoantikörper eingesetzt wird. Hierbei erfolgen die Inkubation und Waschschriffe auf 96-well Mikrotiter- bzw. 96-well Filtrationsplatten, um einen hohen Probenumsatz zu gewährleisten. Die Serummenge von 5 µl wurde von diesen Radioimmunoassays übernommen, da hier für die Bindung der Antigen-Antikörperkomplexe nur eine geringe Menge Protein A-Sepharose bzw. IgA-Agarose benötigt wird (*Seissler et al. 1998*).

Für den Test wurde die 96-well Mikrotiterplatte eine Stunde mit 200 µl/well Puffer B inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen zu reduzieren. Anschließend wurden 5 µl Serum im Doppelansatz pipettiert. Auf jeder Platte wurden die gleichen positiven und negativen Standardseren ebenfalls vierfach mitbestimmt (jeweils 2 Doppelansätze). Pro Well wurde ein Aliquot des markierten Proteins (15.000 cpm) mit 50 µl Puffer B zugegeben. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C auf einem ELISA-Rüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden pro Well 10 µl Protein A-Sepharose und 10 µl IgA-Agarose dazu pipettiert und für weitere 2 Stunden inkubiert. Bei den IgA- bzw. IgG-spezifischen Assays wurden entweder 10 µl IgA-Agarose oder Protein A-Sepharose zugegeben. Die Proben wurden mit 8-Kanalmultipipetten auf spezielle, zuvor mit Puffer B inkubierte, 96-well Filterplatten überführt und über ein Vakuumsystem 15 mal mit Puffer B (je 200 µl) gewaschen. Nach dem Trocknen der Platten für eine Stunde bei Raumtemperatur wurden 20 µl einer Szintillationsflüssigkeit zugefügt, und nach weiteren 30 min wurde die Aktivität in einem 96-well Beta-Counter gemessen.

Die Antikörperkonzentration wurde nach folgender Formel unter Einbeziehung der Werte der mitgeführten Kontrollen berechnet und in Units angegeben :

$$\text{TG-Ak Units} = \frac{\text{cpm (Testserum)} - \text{cpm (Negativkontrolle)}}{\text{cpm (Positivkontrolle)} - \text{cpm (Negativkontrolle)}} \times 100$$

### **3. 7. Bestimmung der IgA-Endomysium-Antikörper**

Die Bestimmung der IgA-Endomysium-Antikörper wurde mit einem indirekten Immunfluoreszenztest durchgeführt. Dazu wurden kryogefrorene Affendünndarmschnitte mit 10 µl Serum (1:5 in PBS verdünnt) überschichtet und für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Schnitte für weitere 30 sec mit einem FITC-konjugierten anti-human IgA-Antikörper (1:10000) inkubiert, erneut dreimal mit PBS gewaschen und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Bei jedem Versuch wurde ein negatives und ein positives Serum mitgeführt.

### **3. 8. Bestimmung der IgA-Gliadin-Antikörper**

Die Bestimmung der Antikörper gegen Gliadin wurde mit einem ELISA durchgeführt. Dazu wurden im ersten Schritt 100 µl von den Patientenseren, eine Positivkontrolle sowie Kalibrationsseren in mit Gliadin beschichteten Reagenzgefäßen für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die entleerten Gefäße dreimal mit 200 µl des beigefügten Waschpuffers gewaschen. Nun wurden die gebundenen Antikörper für 30 min mit 100 µl Peroxidase-markiertem anti-human IgG bei RT inkubiert und danach erneut wie oben beschrieben dreimal gewaschen. Im nächsten Schritt wurden 100 µl der Chromogen-Substratlösung in die Reagenzgefäße pipettiert und im Dunkeln bei RT für 15 min stehen gelassen. Entsprechend dem Pipettierschema bei der Zugabe der Farbstofflösung wurde durch Zugabe von 100 µl Stopplösung die Reaktion beendet. Die Auswertung erfolgte über photometrische Messung bei 450 nm Meßwellenlänge und 630 nm Referenzwellenlänge innerhalb von 30 min nach Beenden der Reaktion. Mit Hilfe einer Standardkurve, die aus den drei mitgeführten Kalibrationsseren erstellt wurde, konnte die Antikörperkonzentration der Testseren ermittelt werden. Der angegebene Cut-off lag bei 25 RE/ml.

### 3. 9. Statistische Auswertung

Der optimale Schwellenwert, ab dem ein Serum als TG-Ak-positiv eingestuft wurde, konnte für den kombinierten IgG/IgA-Antikörpertest sowie für die IgA- bzw. IgG-spezifischen Assays über die Receiver-Operating-Characteristic (ROC-Plot) Methode ermittelt werden (*Zweig und Campbell 1993*). Hierfür wurden 45 Seren von Patienten mit bioptisch gesicherter Zöliakie und Seren von 574 gesunden Blutspendern verwendet.

In diesem Test werden für jeden möglichen Schwellenwert Sensitivitäts-/Spezifitätspaare gebildet. Der Test beschreibt dann die Überlappung zwischen den zwei Verteilungen, indem er für jeden möglichen Schwellenwert die Sensitivität gegen 1 - Spezifität aufträgt. Auf der y-Achse wird die aus den Erkrankten bestimmte Sensitivität, auf der x-Achse die aus den gesunden Kontrollpersonen errechnete Zahl falsch positiver Personen (entspricht 1 - Spezifität) aufgetragen. Der optimale Wert wird dann als Cut-off Wert verwendet. Er entspricht der maximalen Entfernung eines Wertes von der 45°- Diagonalen, welche mit positiver Steigung von links unten nach rechts oben verläuft. Bei einem Test mit optimaler Diskriminierung, d.h. ohne Überlappen von zwei Verteilungen, verläuft die Kurve durch die obere linke Ecke, in der die Sensitivität 100% und die falsch positive Fraktion 0 (entsprechend 100% Spezifität ) entspricht. Je ungenauer der Test ist, desto mehr nähert er sich der 45°- Diagonalen an.

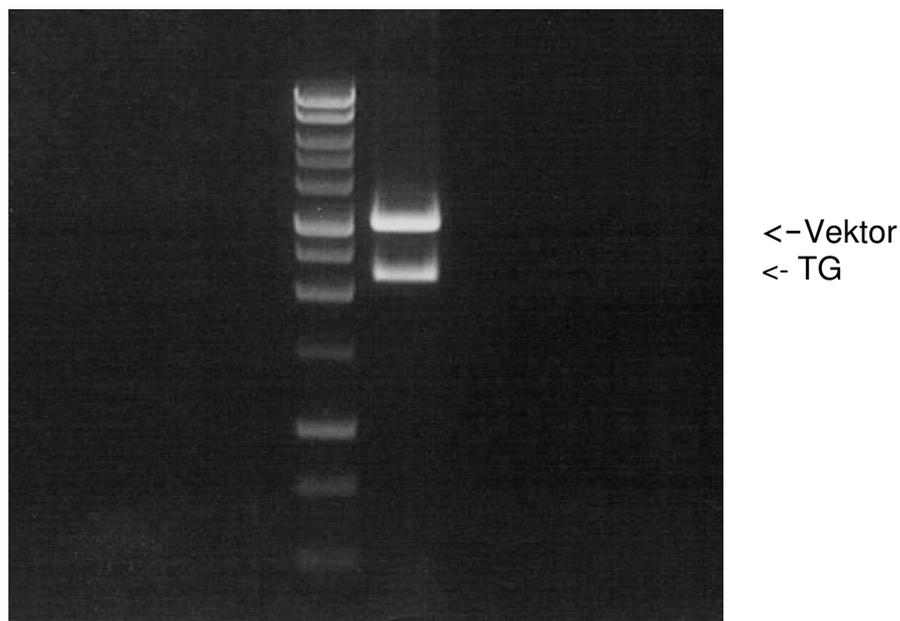
Für den Vergleich zwischen den Gruppen wurde der Fisher's Exact Test und der Student's t-Test verwendet. Ein P-Wert < 0,05 wurde als signifikant angesehen.

Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism (Version 2.01, 1996).

## 4. Ergebnisse

### 4. 1. Klonierung des Gewebs-Transglutaminase-cDNA-Klons

Unter Verwendung der bekannten Sequenz der humanen Gewebs-Transglutaminase (TG) wurde durch RT-PCR ein PCR-Produkt mit einem Molekulargewicht von 2073 Basenpaaren isoliert. Wie *Abb. 6* zeigt, konnte nach Ligation mit dem SP64PolyA-Vektor ein Insert mit korrektem Molekulargewicht gewonnen werden. Nach der kompletten Sequenzierung dieses Klons zeigte sich, daß die Sequenz zu fast 100% der zuvor publizierten Sequenz entsprach. Auf folgenden Positionen wurde ein Aminosäureaustausch beobachtet: In Position 51 und 186 war Glutamin gegen Glutaminsäure, in Position 224 Glycin gegen Valin, in Position 533 Threonin gegen Asparagin und in Position 655 Valin gegen Leucin ausgetauscht.



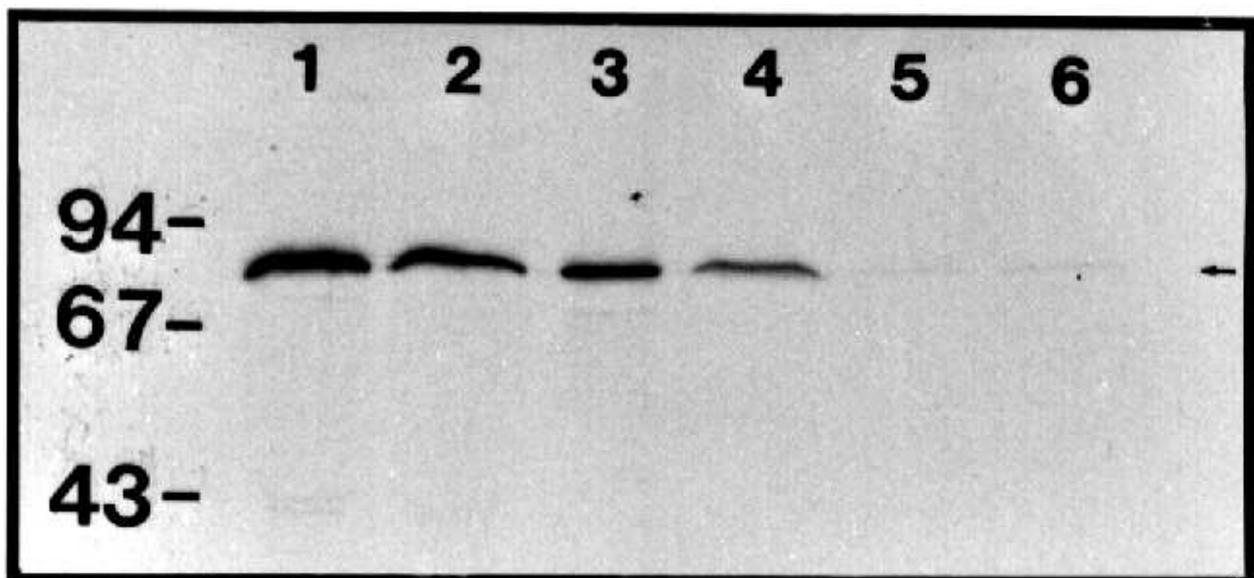
**Abbildung 6 Darstellung des TG-cDNA-Klons nach Restriktionsverdau mit Hind III und Sac I**

Die obere Bande entspricht dem SP64PolyA-Vektor, die untere Bande dem Insert. Auf der linken Seite ist der Molekulargewichtsstandard aufgetragen.

#### 4. 2. Expression des TG-cDNA-Klons durch in vitro Transkription/Translation

Für die Überprüfung der richtigen Größe des rekombinanten Proteins wurde das mit [<sup>35</sup>S]-Methionin markierte Lysat in einem 10% SDS-Gel separiert und mittels Autoradiographie untersucht.

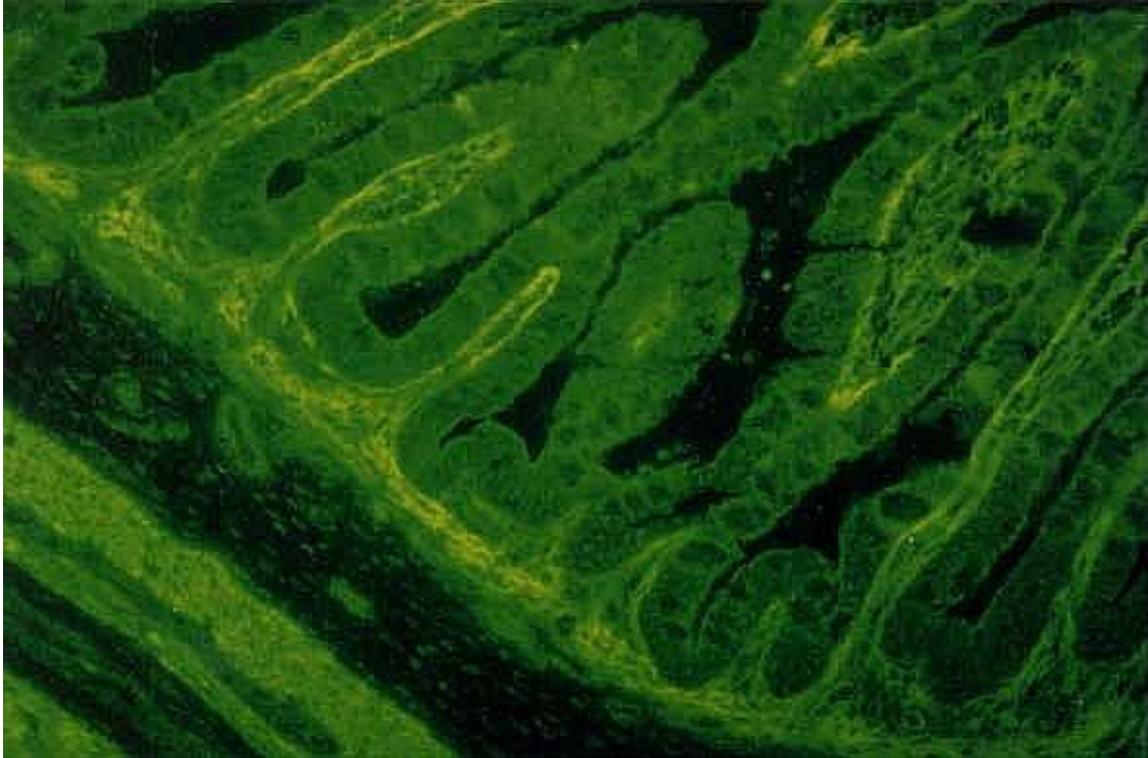
Um die immunologische Aktivität der Gewebs-Transglutaminase zu überprüfen, erfolgte eine Immunpräzipitation mit Endomysium-Antikörper-positiven Seren von Zöliakiepatienten und Seren von gesunden Kontrollen. Wie *Abb. 7* zeigt, fand sich in der Immunpräzipitation mit Endomysium-Antikörper-positiven Seren bei einem Molekulargewicht von 85.000 kD eine spezifische Bande, die sich nach Inkubation mit Normalseren nicht nachweisen ließ. Diese Ergebnisse belegen, daß nach Expression der humanen TG durch in vitro Transkription/Translation das Protein so vorliegt, daß zumindest die dominanten humoralen Epitope erhalten sind.



**Abbildung 7** Immunpräzipitation der humanen rekombinanten TG mit Seren von Patienten mit gesicherter Zöliakie (Bahn 1–4) und Normalseren (Bahn 5 und 6)

Auf der linken Seite ist der Molekulargewichtsstandard aufgetragen (in kD).

In *Abb. 8* erkennt man das typische Immunfluoreszenzmuster, welches bei der Testung eines EmA-positiven Patientenserums am Affendünndarm entsteht. Das Serum wies auch TG-Antikörper auf.

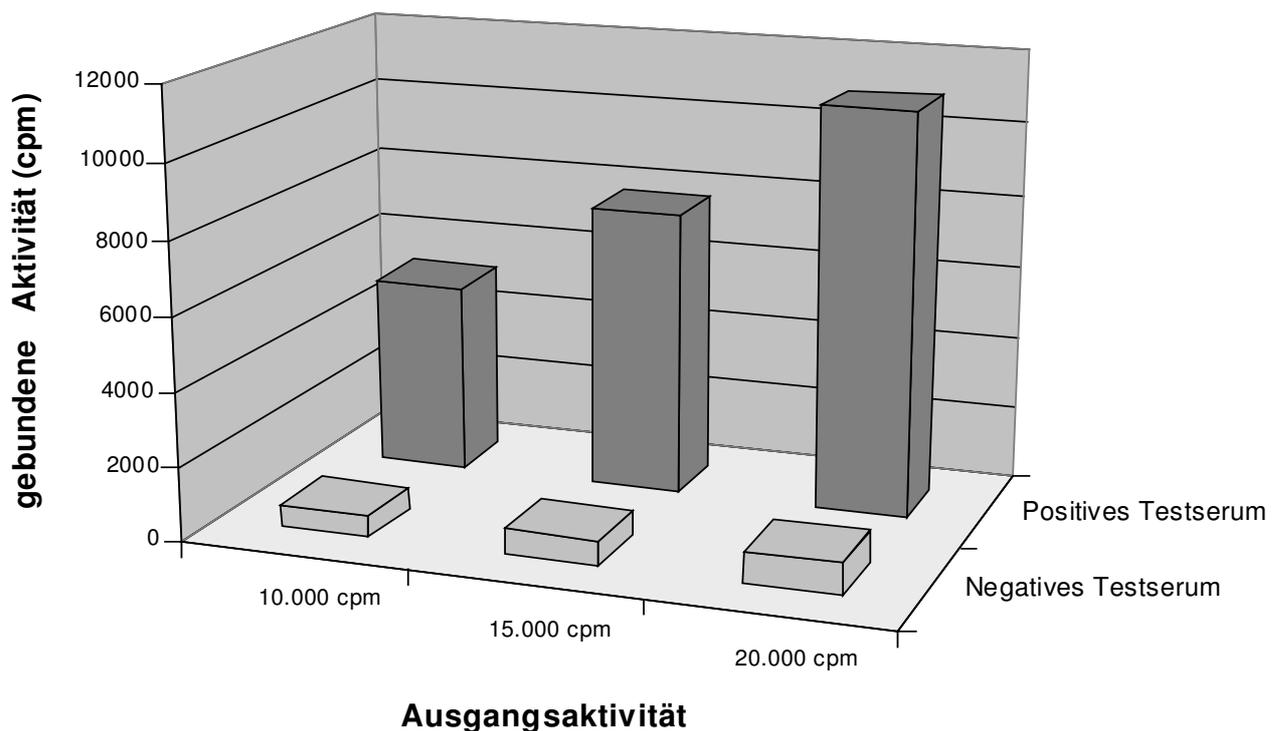


**Abbildung 8 Nachweis von Endomysium-Antikörpern im indirekten Immunfluoreszenztest**

Bindung von Antikörpern gegen Endomysium des Affendünndarms nach Inkubation mit einem Serum eines Zöliakiepatienten

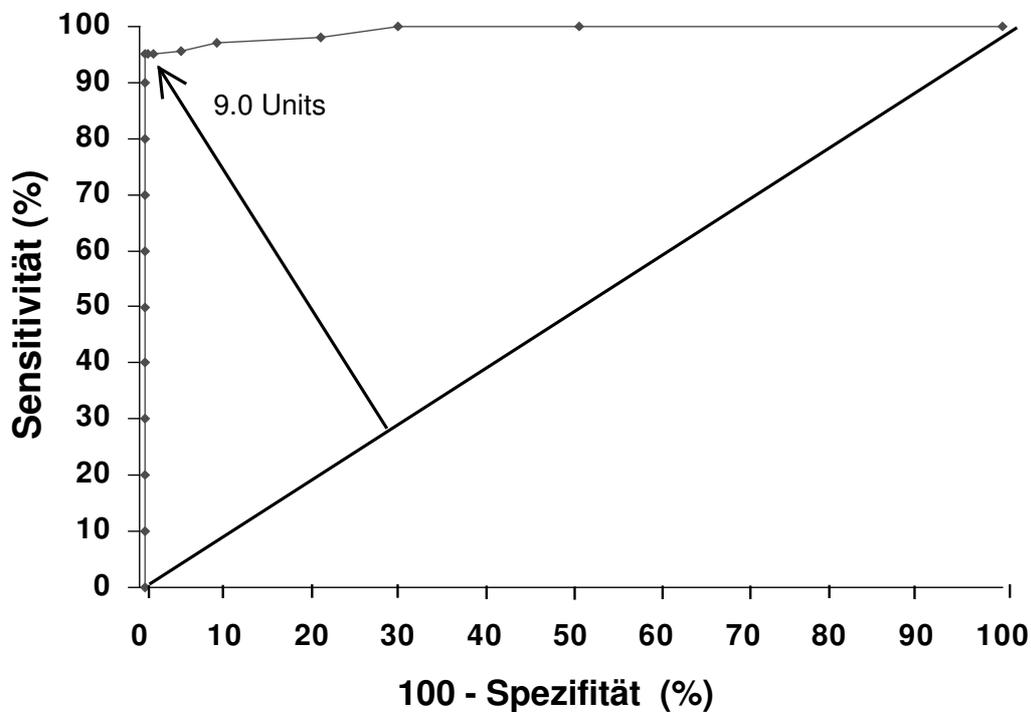
#### 4. 3. Entwicklung des Radioimmunoassays zum Nachweis von Autoantikörpern gegen TG

Für den Aufbau eines Radioimmunoassays wurden verschiedene Konzentrationen des Antigens untersucht. Die markierte TG wurde mit 5 µl Serum inkubiert. Nach Inkubation von positiven und negativen Seren mit 10.000 cpm, 15.000 cpm und 20.000 cpm des markierten Antigens zeigte sich eine gute Diskriminierung zwischen Patienten und Normalpersonen bereits bei einer Antigenmenge von 15.000 cpm. Eine weitere Erhöhung der Antigenkonzentration erbrachte keine deutliche Verbesserung (Abb. 9). Für die Etablierung des Radioimmunoassays wurden deshalb 5 µl Serum und eine Antigenmenge von 15.000 cpm verwendet.



**Abbildung 9** Nachweis der Autoantikörperbindung gegen TG bei Variation der Antigenmenge

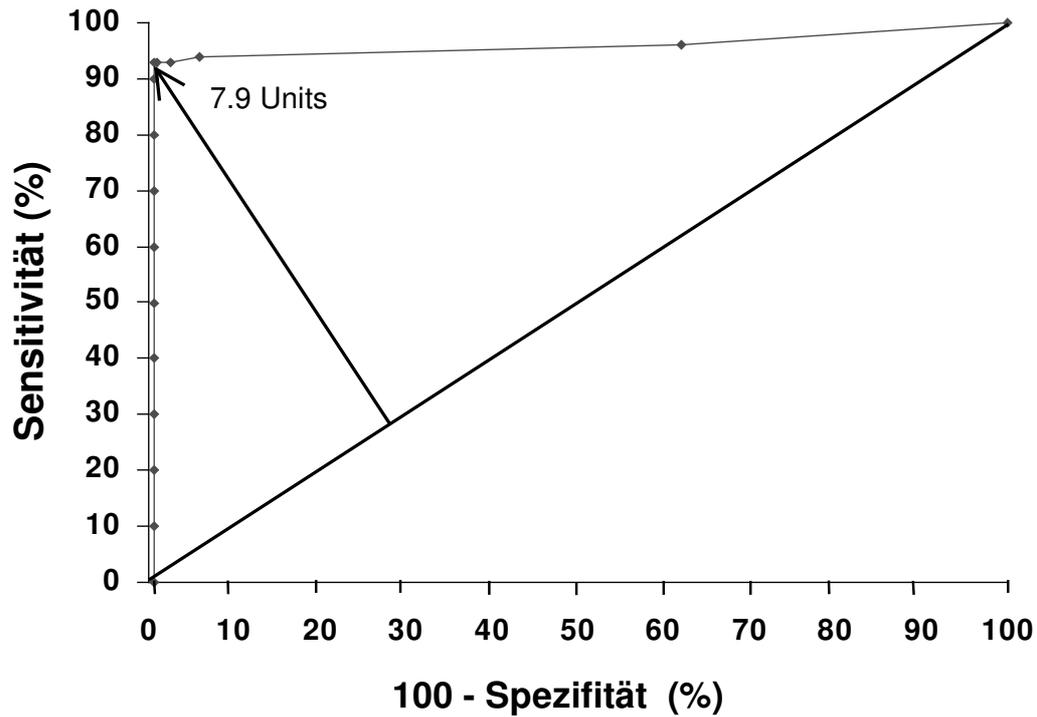
Um die Grenzwerte (Cut-offs) der Radioimmunoassays zu bestimmen, wurden Seren von 45 Patienten mit gesicherter Zöliakie sowie Seren von 574 gesunden Blutspendern jeweils im kombinierten IgA/IgG-Test als auch in IgA- und IgG-spezifischen Tests untersucht. Für alle möglichen Grenzwerte wurden die Sensitivitäts-/Spezifitätspaare errechnet und in einem Roc-Plot-Diagramm dargestellt. Anschließend wurde der Meßwert berechnet, der die optimale Diskriminierung zwischen Patienten und Normalpersonen erlaubt. Dies entspricht dem weitesten Abstand zwischen der Kurve und der 45° Diagonalen im Roc-Plot-Diagramm. Nach dieser Berechnung liegt der optimale Cut-off für die IgA-TG-Antikörper bei 8,3 Units, für die IgG-TG-Antikörper bei 7,9 Units und für den kombinierten Antikörpertest bei 9,0 Units (*Abb. 10A-C*).



**Abbildung 10A** ROC-Plot Diagramm für den kombinierten IgG/IgA-TG-Ak-Test

Die Kurve wurde aus 45 Zöliakiepatienten und aus 574 gesunden Kontrollen erstellt.

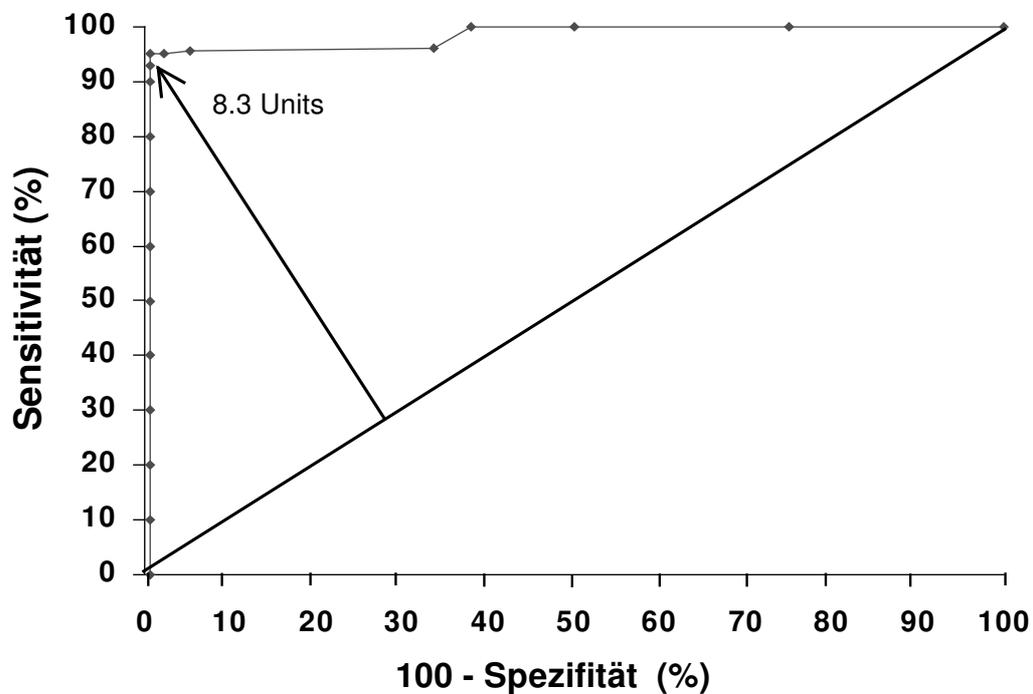
Als Cut-off ergibt sich ein Wert von 9,0 Units.



**Abbildung 10B** ROC-Plot Diagramm für den IgG-spezifischen TG-Ak-Test

Die Kurve wurde aus 45 Zöliakiepatienten und aus 574 gesunden Kontrollen erstellt.

Als Cut-off ergibt sich ein Wert von 7,9 Units.



**Abbildung 10C** ROC-Plot Diagramm für den IgA-spezifischen TG-Ak-Test

Die Kurve wurde aus 45 Zöliakiepatienten und aus 574 gesunden Kontrollen erstellt.

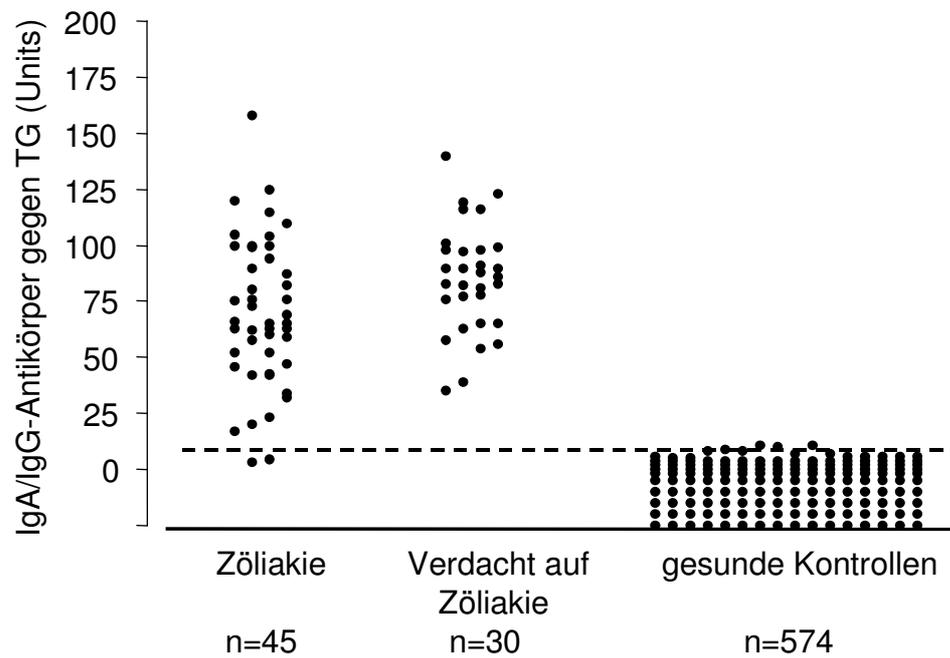
Als Cut-off ergibt sich ein Wert von 8,3 Units.

#### 4. 4. Bedeutung der TG-Antikörper für die Zöliakie

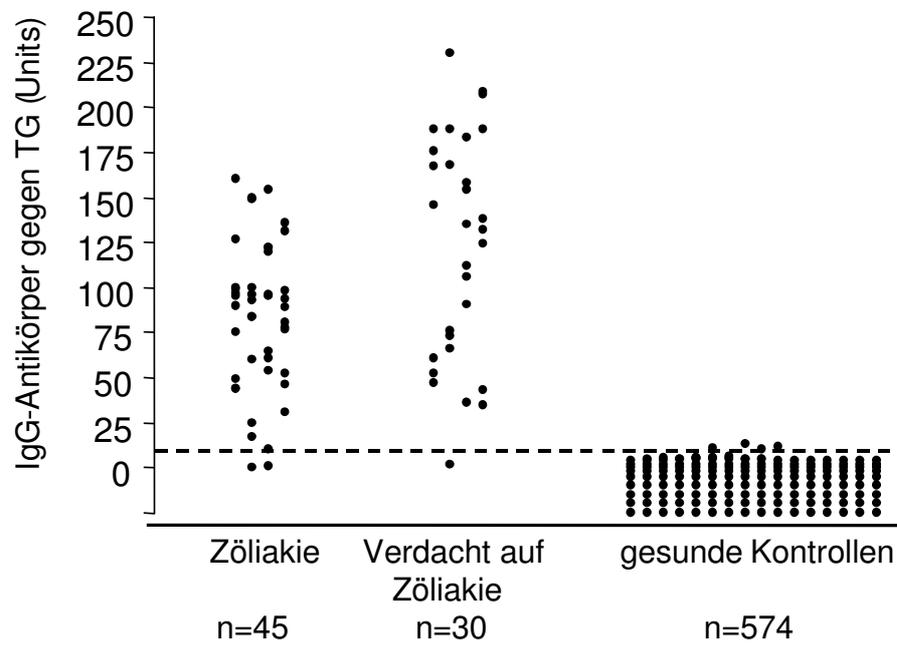
##### 4. 4. 1. Prävalenz von TG-Antikörpern bei Patienten mit Zöliakie

Es wurden 45 Seren von Patienten untersucht, die klinische Symptome einer Zöliakie wie Diarrhö, Malabsorption und intermittierende Bauchschmerzen aufwiesen und bei denen die Erkrankung durch eine Dünndarmbiopsie gesichert wurde. Das Alter der Patienten variierte von 2-67 Jahren, der Mittelwert lag bei  $27 \pm 18,6$  Jahren. Von den 45 Patienten waren 31 (68,9%) weiblich und 14 (31,1%) männlich. Einige der Patienten wiesen neben der Zöliakie folgende Zweiterkrankungen auf: Fünf Patienten litten unter einem Typ 1 Diabetes, ein Patient an einem Malt-Lymphom und ein Patient an einem M. Basedow. Die Prävalenz der TG-Antikörper in den Seren der Zöliakiepatienten zeigte gegenüber den gesunden Kontrollpersonen einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,0001$ ).

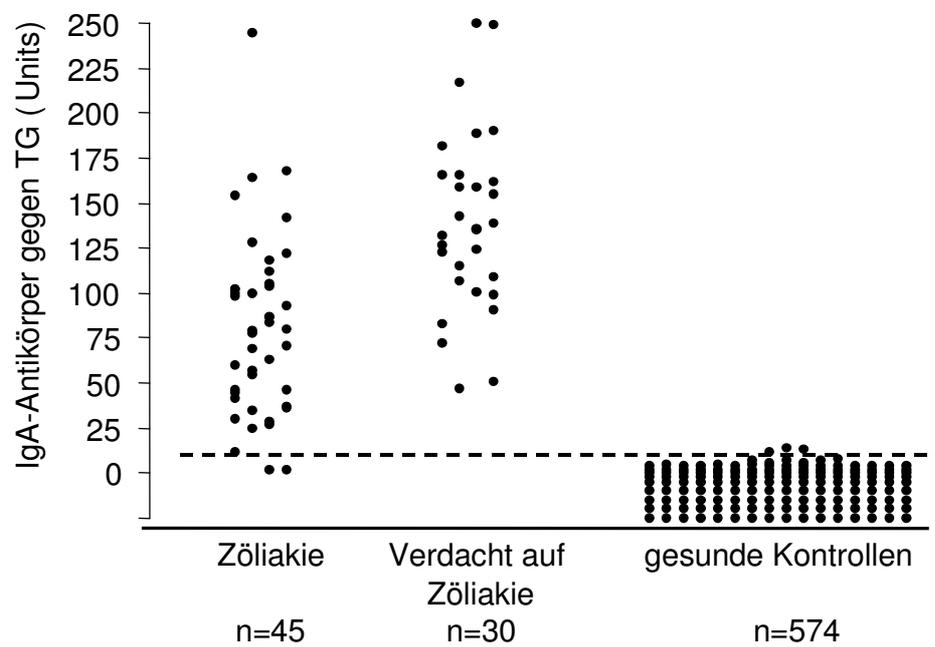
Bei den 45 Patienten mit bioptisch gesicherter Zöliakie konnten in 43 Seren Antikörper gegen TG im kombinierten IgA/IgG-Test nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Sensitivität von 95,5%. Alle im kombinierten Test positiven Seren wiesen auch in den Einzeltestungen IgG- bzw. IgA-spezifische Antikörper auf. Die Titer der TG-Ak bei Patienten mit gesicherter Zöliakie, Verdacht auf Zöliakie und bei den Kontrollen sind in den Diagrammen der *Abbildungen 11A-C* für den kombinierten Test und die IgA- bzw. IgG-spezifischen Testungen dargestellt.



**Abbildung 11A** Titer der TG-Antikörper bei Patienten mit gesicherter Zöliakie, mit Verdacht auf Zöliakie und gesunden Kontrollen im kombinierten IgG/IgA-Radioimmunassay  
Die gestrichelte Linie entspricht dem Cut-off



**Abbildung 11B** Titer der TG-Antikörper bei Patienten mit gesicherter Zöliakie, mit Verdacht auf Zöliakie und gesunden Kontrollen im IgG-spezifischen Radioimmunassay  
Die gestrichelte Linie entspricht dem Cut-off



**Abbildung 11C** Titer der TG-Antikörper bei Patienten mit gesicherter Zöliakie, mit Verdacht auf Zöliakie und gesunden Kontrollen im IgA-spezifischen Radioimmunassay

Die gestrichelte Linie entspricht dem Cut-off

#### 4. 4. 2. Korrelation der TG-Antikörper mit dem Alter und Geschlecht

Die Daten wurden ferner auf einen möglichen Zusammenhang zwischen den TG-Ak-Spiegeln und dem Alter bzw. Geschlecht der Zöliakiepatienten untersucht. Die Antikörpertiter bei den Zöliakiepatienten schwankten in der gesamten Population (2-67 Jahre) zwischen 3,6-158,8 Units im kombinierten Test, 1,7-240,7 Units im IgA-Test und 1,2-230,9 Units im IgG-Test. Besonders hohe Spiegel wurden in der Altersgruppe der 2-10jährigen nachgewiesen, v. a. in den Einzeltestungen auf IgA-Ak ( $143,8 \pm 54,9$  Units/Median = 132,1 Units) und IgG-Ak ( $148,8 \pm 50,9$  Units/Median = 147,5 Units). Die niedrigsten Spiegel wiesen die Patienten der Altersgruppe 51-67 Jahre auf. Hier lag der Mittelwert der IgA-Antikörper bei  $33,9 \pm 28,6$  Units, der Median betrug 29,7 Units. Die in einer Antikörperklasse jeweils höchsten gemessenen Werte wurden nicht bei demselben Patienten gemessen, sie verteilten sich auf drei verschiedene Personen.

Die Altersgruppen unterschieden sich bezüglich der TG-Antikörpertiter bis auf eine Ausnahme nicht signifikant voneinander. Beim Vergleich der Spiegel in den Altersgruppen 1-10 Jahre ( $90,1 \pm 17,0$  Units) und 51-70 Jahre ( $50,8 \pm 26,3$  Units) war ein signifikanter Unterschied zu verzeichnen ( $p < 0,05$ ). Die durchschnittliche Differenz betrug  $39,4 \pm 10,5$  Units (*Tabelle 3*).

Es konnte mit dem t-Test keine signifikante Assoziation zwischen Geschlecht und Höhe der IgG/IgA-TG-Antikörperspiegel festgestellt werden. Die mittleren Antikörperspiegel lagen bei den 14 Patienten bei  $68,9 \pm 29,3$  Units und bei den 31 Patientinnen bei  $76,8 \pm 31,0$  Units (*Tabelle 2*).

TG-Antikörper	TG-Ak-Titer		
	n=45	W (n=31)	M (n=14)
IgG/IgA-TG-Ak	74,8 ± 30,4	76,8 ± 31,0	68,9 ± 29,3
IgA-TG-Ak	94,2 ± 61,3	90,4 ± 57,0	102,6 ± 71,6
IgG-TG-Ak	97,8 ± 51,0	97,2 ± 47,2	99,2 ± 60,6

**Tabelle 2** Assoziation der TG-Ak-Titer mit dem Geschlecht bei Patienten mit Zöliakie

Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichung der TG-Ak-Spiegel in Units

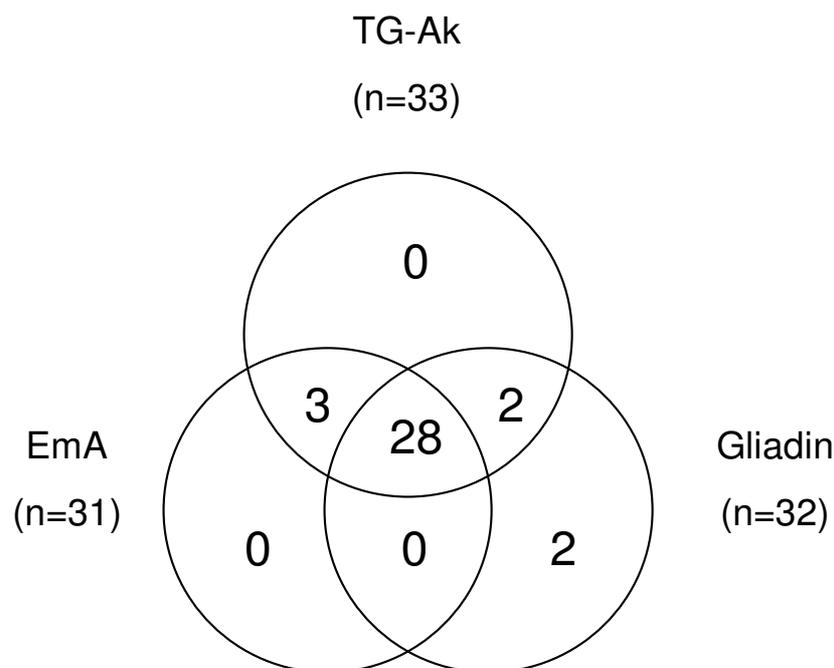
TG-Antikörper	TG-Ak-Titer			
	1 – 10 Jahre (n=10)	11 – 30 Jahre (n=18)	31 – 50 Jahre (n=9)	51 – 70 Jahre (n=8)
IgG/IgA-TG-Ak	90,1 ± 17,0	74,1 ± 33,9	78,2 ± 28,0	50,8 ± 26,3
IgA-TG-Ak	143,8 ± 54,9	84,3 ± 54,8	112,9 ± 52,2	33,9 ± 28,7
IgG-TG-Ak	148,7 ± 50,9	81,3 ± 40,6	93,0 ± 42,1	76,9 ± 42,5

**Tabelle 3** Assoziation der TG-Ak-Titer mit dem Alter bei Patienten mit Zöliakie

Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichung der TG-Ak-Spiegel in Units

#### 4. 4. 3. Korrelation der TG-Antikörper mit Endomysium-Antikörpern und Antikörpern gegen Gliadin

Um die Korrelation der TG-Antikörper mit dem Auftreten anderer Marker zu untersuchen, wurden EmA und Gliadin-Ak getestet. Es wiesen 41 (91,1%) der 45 Patienten in der Immunfluoreszenz IgA-Endomysium-Ak auf. Zusätzlich wurden 35 der 45 Patienten mit einem ELISA auf IgA-Gliadin-Ak untersucht, welche bei 32 (91,4%) vorhanden waren. Bei allen Patienten konnte wenigstens ein Antikörper nachgewiesen werden. Bei den 35 auf alle drei Antikörper getesteten Patienten waren 2 (5,7%) nur für einen Marker (Gliadin) positiv, in 5 (14,3%) Seren wurden zwei Marker und bei 28 (80%) alle drei Antikörper im Serum gefunden (*Abb. 12*).



**Abbildung 12** Korrelation der Autoantikörper in den Seren von 35 Patienten mit manifester Zöliakie

Antikörper der IgA-Klasse, gegen Transglutaminase gerichtet (TG-Ak),

IgA-Antikörper gegen Endomysium (EmA), IgA-Antikörper gegen Gliadin

Wenn man die Verteilung der verschiedenen getesteten Antikörper (TG-Ak, EmA, AGA) betrachtet, waren 2 (4,4%) von 45 getesteten Patienten negativ für TG-Ak. In diesen Fällen waren auch keine EmA, jedoch AGA nachweisbar. Die TG-Ak-negativen Patienten gehörten verschiedenen Altersgruppen an. Eine Patientin war 24 Jahre, der andere Patient war 54 Jahre alt. Die weiteren zwei EmA-negativen Patienten (w 45 J.; w 5 J.) wiesen positive Werte sowohl für TG-Ak als auch für AGA auf. Die 3 Patienten, die im Gliadintest negative Werte zeigten, waren ebenfalls in den anderen Antikörpertestungen positiv. Auffällig ist hier, daß diese 3 Patienten alle Kinder (8 J.) bzw. Jugendliche (12 J., 14 J.) waren, 2 waren Mädchen.

Bei 5 Patienten waren, wie bereits anfangs beschrieben, Zweiterkrankungen bekannt. Der 67-jährige Patient mit dem MALT-Lymphom war für alle Tests positiv, die TG-Ak-Spiegel lagen um 100 Units. Die 46-jährige Patientin mit dem M. Basedow war gleichfalls für TG-Ak, EmA und Gliadin positiv mit relativ hohen IgA-TG-Ak-Spiegeln um 144 Units. Die 5 (11,1%) Patienten, die neben der Zöliakie noch einen Typ 1 Diabetes mellitus aufwiesen, befanden sich alle in der Altersgruppe 6-19 Jahre, 4 waren Mädchen und ein Junge. Sie waren alle positiv für TG-Ak, EmA und AGA, bei einer Patientin wurde AGA nicht bestimmt.

#### 4. 5. Prävalenz der TG-Antikörper bei Patienten mit Verdacht auf Zöliakie

Untersucht wurden 30 Patienten, die die klassischen Symptome der Zöliakie aufwiesen, aber keine biopsische Sicherung der Diagnose hatten. Als weitere Vorbedingung galt der positive Nachweis IgA-Endomysium-Ak. Das Alter dieser Patienten variierte von 2-66 Jahren, der Mittelwert lag bei  $26,2 \pm 17,7$  Jahren. Die Seren stammten von 21 (70%) weiblichen und 9 (30%) männlichen Patienten. Alle 30 getesteten Seren waren positiv im kombinierten Test und den Einzeltestungen, nur 1 (3,3%) Patient wies negative Resultate im IgG-Test auf (*Abb. 12 A-C*).

Bei 21 der 30 Patienten wurden zusätzlich Gliadin-Ak bestimmt. In 15 (71,4%) Seren konnten diese Antikörper nachgewiesen werden.

Die TG-Antikörperspiegel wiesen im Durchschnitt keinen signifikanten Unterschied zwischen den 21 weiblichen und 9 männlichen Patienten auf ( $p < 0,05$ ) (*Tabelle 4*). Zwischen den 5 Altersgruppen konnte auch kein signifikanter Unterschied der TG-Ak-Spiegel festgestellt werden ( $p < 0,05$ ) (*Tabelle 5*).

Beim Vergleich der TG-Antikörperspiegel in diesem Patientenkollektiv ( $n=30$ ) und dem der Patienten mit gesicherter Zöliakie ( $n=45$ ) konnte in der Altersgruppe 21–30 Jahre ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p < 0,05$ ). Bei den manifesten Zöliakiepatienten lagen die Antikörperspiegel im Durchschnitt bei  $54,5 \pm 11,7$  Units, bei den Patienten mit Verdacht auf Erkrankung bei  $94,0 \pm 17,8$  Units (*Tabelle 2 und 4*). Im Geschlechtsvergleich und bei den anderen Altersgruppen war kein signifikanter Unterschied feststellbar.

Die 12 Diabetiker (8-40 Jahre) waren bis auf einen Patienten alle TG-Antikörper positiv. Dieser Patient hatte negative Werte in der Einzeltestung auf IgG-Antikörper. Die mittleren Antikörperspiegel der 12 Patienten (IgA/IgG-TG-Ak  $77,7 \pm 22,6$ , IgA-TG-Ak  $130,4 \pm 37,0$  und IgG-TG-Ak  $108,7 \pm 67,3$  Units) waren nicht signifikant verschieden von denen der Gesamtgruppe ( $p < 0,05$ ) (*Tabelle 4*). Alle Diabetiker waren positiv für EmA. Gliadinantikörper waren bei 8 Patienten nachweisbar, 3 waren negativ, und in einem Fall wurden sie nicht bestimmt.

TG-Antikörper	TG-Ak-Titer		
	n=30	W (n=21)	M (n=9)
IgG/IgA-TG-Ak	81,6 ± 28,4	82,4 ± 27,0	79,7 ± 33,2
IgA-TG-Ak	117,2 ± 47,8	117,1 ± 51,2	117,3 ± 40,9
IgG-TG-Ak	103,0 ± 58,2	105,4 ± 58,9	97,4 ± 72,3

**Tabelle 4** Assoziation der TG-Ak-Titer mit dem Geschlecht bei Patienten mit Verdacht auf Zöliakie

angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der TG-Ak-Spiegel in Units

W = weiblich, M = männlich

TG-Antikörper	TG-Ak-Titer				
	1-10 Jahre (n=5)	11-20 Jahre (n=8)	21-30 Jahre (n=8)	31-50 Jahre (n=5)	51-70 Jahre (n=4)
IgG/IgA-TG-Ak	91,1 ± 27,2	75,3 ± 29,9	94,0 ± 17,8	63,4 ± 33,0	84,2 ± 37,7
IgA-TG-Ak	180,6 ± 45,5	114,5 ± 40,6	110,9 ± 41,5	93,4 ± 21,5	83,9 ± 38,4
IgG-TG-Ak	150,8 ± 50,2	98,3 ± 56,3	98,9 ± 57,3	57,1 ± 34,8	118,0 ± 58,9

**Tabelle 5** Assoziation der TG-Ak-Titer mit dem Alter bei Patienten mit Verdacht auf Zöliakie

angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der TG-Ak-Spiegel in Units

## 4. 6. Untersuchung der TG-Ak bei Autoimmunerkrankungen

### 4. 6. 1. Prävalenz der TG-Antikörper bei Patienten mit Typ 1 Diabetes

Es wurden 305 Patienten mit einem frisch manifestierten Typ 1 Diabetes mellitus auf IgA/IgG-TG-Antikörper untersucht. Die positiven Seren wurden anschließend noch getrennt auf IgA- bzw. IgG-TG-Antikörper getestet. Das Alter variierte von 2 Wochen bis 71 Jahre, der Mittelwert lag bei  $18,6 \pm 14,4$  Jahren (Median 13 Jahre). 50% der Patienten waren zwischen 9 und 27 Jahren alt. 187 (61,3%) Patienten waren männlich und 118 (38,7%) weiblich. Von den 305 getesteten Seren waren 12 TG-Ak-positiv. Dies entspricht einer Prävalenz von 3,9% im Gesamt-kollektiv, von 3,2% bei den männlichen und 5,1% bei den weiblichen Patienten.

In der Gesamtgruppe lag der durchschnittliche IgA/IgG-TG-Antikörperspiegel bei 5,0 Units, bei den weiblichen Patienten bei 7,4 Units und bei den männlichen Patienten bei 3,5 Units. Die Variationsbreite in der Gesamtpopulation betrug 0,1–201 Units. Es war kein signifikanter Unterschied der Titer zwischen den einzelnen Gruppen feststellbar ( $p < 0,05$ ).

Die Gruppe der 12 TG-Ak-positiven Patienten bestand aus 6 Mädchen und 6 Jungen. Das Alter variierte von 3 -11 Jahren bei den Mädchen und von 2–17 Jahren bei den Jungen. Das Durchschnittsalter in der Gruppe der positiven Patienten ( $8,3 \pm 4,6$  Jahre) war signifikant niedriger als das in der Gruppe der negativen Patienten ( $19,0 \pm 14,5$  Jahre) ( $p < 0,05$ ).

Die Antikörperspiegel der positiven Patienten variierten im Mittel nicht signifikant zwischen den einzelnen Testungen (*Tabelle 6*).

	Gesamt	W	M	TG-Ak pos.
Anzahl N	305 (100%)	118 (38,7%)	187 (61,3%)	12 (3,9%)
Alter (in Jahren)				
- mittleres Alter	18,6 ± 14,4	15,7 ± 13,2	20,5 ± 14,8	8,3 ± 4,6
- Variationsbreite	0,1 – 71	0,1 - 71	1 - 67	2 - 17
IgA/IgG-TG-Ak-Titer	5,0 ± 23,1	7,4 ± 32,2	3,5 ± 14,6	110,6 ± 77,9
IgA-TG-Ak-Titer	n.b.	n.b.	n.b.	66,2 ± 76,8
IgG-TG-Ak-Titer	n.b.	n.b.	n.b.	93,4 ± 75,5

**Tabelle 6** Mittleres Alter, Variationsbreite des Alters sowie durchschnittliche TG-Ak-Titer in der Gruppe der Diabetiker

Assoziation mit dem Geschlecht und der Gruppe der TG-Ak-positiven Diabetiker

W = weiblich, M = männlich, n.b. = nicht bestimmt (nur bei IgA/IgG-TG-Ak-positiven Personen)

Unter den 12 positiven Kindern war bei einer 5-jährigen Patientin die IgA-TG-Ak-Testung auch in Kontrollseren negativ. Im IgA/IgG-Test und im IgG-Test wies sie sehr hohe Antikörperspiegel auf (200,0 bzw. 191,3 Units). Sie hatte bei der Immunfluoreszenz auf Endomysiumantikörper auch ein negatives Ergebnis. Die weitere Abklärung erbrachte die Diagnose eines selektiven IgA-Mangels.

#### 4. 6. 2. Prävalenz der TG-Antikörper bei Patienten mit Morbus Basedow und Hashimoto-Thyreoiditis

Es wurden 130 Patienten mit dem kombinierten IgA/IgG-TG-Ak-Test untersucht. 105 (80,8%) der Patienten waren weiblich, 25 (19,2%) waren männlich. Das mittlere Alter betrug in der gesamten Gruppe 44,8±13,6 Jahre, bei den Frauen 45,2±14,3 Jahre und bei den Männern 43,2±10,1 Jahre. Die Patienten waren im IgA/IgG-TG-Antikörpertest alle negativ mit einem Mittelwert von 2,2 Units. Die Antikörperspiegel variierten von 0,1-6,4 Units.

Von 54 (41,5%) der 130 Patienten waren zusätzlich die Spiegel der Schilddrüsenantikörper TRAK (TSH-Rezeptorantikörper) und MAK (mikrosomaler Antikörper) bekannt. Diese Untergruppe unterschied sich in ihren Charakteristika nicht von der Gesamtgruppe der Schilddrüsenpatienten. TRAK war in 46 der 54 (85,2%) Patienten und MAK bei 34 (63,0%) der 54 Patienten positiv. 28 (51,9%) der 54 Patienten waren für beide Schilddrüsenantikörper positiv. Der mittlere TG-Ak-Titer betrug 2,0 Units. Es konnte keine Korrelation zwischen der Höhe der TG-Ak-Spiegel und Auftreten oder Höhe der Schilddrüsenantikörper festgestellt werden.

#### **4. 6. 3. Prävalenz der TG-Antikörper bei Patienten mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises**

In dieser Gruppe wurden 111 Patienten mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises (systemischer Lupus erythematodes, rheumatoide Arthritis, Sjögren´s Syndrom und Polymyositis) untersucht. Das mittlere Alter betrug  $53,6 \pm 14,4$  Jahre (Median 55 Jahre) mit einer Variationsbreite von 19-84 Jahren. 82 (73,9%) der Patienten waren weiblich, 29 (26,1%) männlich. Es wurde in 4 Fällen (3,6%) im kombinierten IgA/IgG-TG-Ak-Test ein positives Ergebnis gefunden. Alle 4 Patienten waren weiblich, und die Antikörpertiter waren mit  $15,9 \pm 6,6$  Untis (Median 13,3 Units) nur mäßig erhöht.

#### **4. 7. Prävalenz der TG-Antikörper in den Seren gesunder Kontrollpersonen**

Die Kontrollseren stammten von 574 gesunden Blutspendern. Von diesen waren 249 (43,4%) weiblich und 325 (56,6%) männlich, das Alter variierte von 7–40 Jahren mit einem mittlerem Alter von 30 Jahren. Von den Seren waren 3 (0,52%) positiv für TG-Ak, dies entspricht einer Testspezifität von 99,5%. Von den drei TG-Ak-positiven Seren waren zwei auch EmA-positiv. Die mittleren TG-Ak-Spiegel lagen für IgA bei 1,1 Units (0,1–14,3 Units) und für IgG bei 1,6 Units (0,1–9,9 Units). Der Unterschied zu den Patienten mit Zöliakie oder Verdacht auf Zöliakie war hochsignifikant ( $p < 0,0001$ ).

#### 4. 8. Vergleich der Antikörperprävalenz und Antikörperspiegel von TG in den verschiedenen Patientengruppen

Die höchsten Prävalenzen von Transglutaminase-Antikörpern wurden in den Seren von Zöliakiepatienten (95,5%) und von Patienten mit Verdacht auf Zöliakie (100%) gefunden. Im Gegensatz dazu waren TG-Antikörper in den Seren der Kontrollpatienten (Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen und Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises) und bei den gesunden Kontrollen (0,52%) nur in Einzelfällen nachweisbar. Die Typ 1 Diabetiker zeigten in 3,9%, die Patienten mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises in 3,6% und die Schilddrüsenpatienten in keinem Fall positive TG-Ak-Spiegel. Ein signifikanter Unterschied war zwischen den Zöliakiepatienten und den Kontrollpatienten sowie den gesunden Personen feststellbar, nicht aber zu den Patienten mit Verdacht auf Zöliakie ( $p < 0,05$ ).

Die mittleren Antikörperspiegel im kombinierten Test lagen bei den Zöliakiepatienten bei  $74,8 \pm 30,4$  Units und bei den Patienten mit Verdacht auf Zöliakie bei  $81,6 \pm 28,4$  Units und unterschieden sich damit signifikant von den Werten der positiven Rheumapatienten ( $15,9 \pm 6,6$  Units) ( $p < 0,05$ ). Ein signifikanter Unterschied lag auch zwischen den Zöliakiepatienten und den Diabetesprieten vor ( $p < 0,05$ ) (Tabelle 7).

Patientengruppen	TG-Ak-Prävalenzen	Antikörperspiegel (Units)
Zöliakie	95,5 %	$78,1 \pm 26,8$
V. a. Zöliakie	100 %	$81,6 \pm 28,4$
Typ 1 Diabetiker	3,9 %	$110,6 \pm 77,9$
Rheumat. Erkrankungen	3,6 %	$15,9 \pm 6,6$
Schilddrüsenerkrankungen	0 %	n.b.
Gesunde Kontrollen	0,52 %	n.b.

**Tabelle 7** Vergleich der TG-Ak-Prävalenzen und TG-Ak-Spiegel bei den verschiedenen Studienpopulationen im kombinierten Test

#### 4. 9. Bedeutung der TG-Antikörper für die Diagnose einer latenten Zöliakie

Um die Bedeutung der TG-Antikörper für die Identifizierung von Patienten mit latenter Zöliakie zu klären, wurden die Patienten mit Typ 1 Diabetes, die positive TG-Antikörpertiter aufwiesen, weiter untersucht. Alle 12 positiven Kindern wurden zusätzlich auf EmA getestet. Ein positives Ergebnis wiesen 11 (91,6%) Patienten auf. Bei einer Patientin waren keine Endomysiumantikörper nachweisbar (Ursache: IgA-Mangel, wie oben beschrieben).

Keines der 12 Kinder mit TG-Ak zeigte klinische Symptome, die zuvor den Verdacht auf eine Zöliakie gelenkt hätten. Bei 4 Kindern war retrospektiv ein geringer Gewichtsverlust, bei je einem Kind unklare Bauchschmerzen, Wachstumsverzögerung und gelegentliche Durchfälle zu verzeichnen. 7 der 12 Patienten mit positiven TG-Antikörpern waren zur Abklärung des Befundes mit der Durchführung einer Dünndarmbiopsie einverstanden. Bei 5 Kindern fand sich eine Zottenatrophie, Lymphozyteninfiltration und Hyperplasie der Krypten (Stadium 3 nach Marsh), bei einem Patienten war eine vermehrte Infiltration mit Lymphozyten bei normaler Schleimhaut zu verzeichnen (Stadium 1 nach Marsh). Eine Dünndarmbiopsie wurde als unauffällig bewertet. Die Daten der TG-Ak-positiven Patienten sind in *Tabelle 8* zusammengefaßt.

Nr.	Geschlecht	Alter	TG-Ak-Titer (Units)				Biopsie Stadium
			IgA/IgG	IgA	IgG	EmA	
1	W	3	23,8	50,0	9,8	pos.	pos. (III)
2	W	6	199,4	270,0	216,5	stark pos.	pos. (III)
3	M	6	50,4	54,6	57,9	pos.	
4	M	13	135,8	175,3	123,6	stark pos.	
5	M	13	51,9	65,8	46,8	pos.	neg.
6	M	2	18,2	14,4	10,7	pos.	pos. (I)
7	W	10	15,5	8,2	14,5	pos.	
8	M	17	48,7	26,4	24,8	pos.	
9	W	11	120,6	56,9	90,0	pos.	pos. (III)
10	W	5	78,9	117,0	70,2	pos.	
11	M	9	124,3	83,2	69,6	stark pos.	pos. (III)
12	W	5	200,0	2,7	191,3	neg.	pos. (III)

**Tabelle 8** Charakteristika der 12 TG-Ak-positiven Diabetiker; angegeben sind Geschlecht, Alter (in Jahren), TG-Ak-Spiegel, EmA-Befund und Biopsieergebnis mit histologischem Befund (Stadieneinteilung nach Marsh (I-III))

W = weiblich, M = männlich

## 5. Diskussion

Die Zöliakie ist die Folge einer Unverträglichkeitsreaktion gegen das Weizenprotein Gluten und artverwandte Getreideproteine, die durch eine lymphozytäre Infiltration und durch eine Zottenatrophie der Dünndarmschleimhaut gekennzeichnet ist. Im Rahmen der Erkrankung kommt es zum Auftreten von Antikörpern gegen Gliadin (AGA) und gegen Endomysium (EmA). Bis heute wird die Durchführung einer Biopsie aus dem Jejunum oder dem distalen Duodenum als Goldstandard für die Diagnose einer Zöliakie angesehen. Das Screening auf EmA stellt die Standardmethode für die Ermittlung des Zöliakierisikos in Risikopopulationen dar. Da die Bestimmung der EmA sehr arbeitsaufwendig ist und Probleme bei der Standardisierung zeigt, besteht sehr großes Interesse an der Entwicklung neuer Assays. Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß das Enzym Gewebs-Transglutaminase (TG) ein Hauptzielantigen bei der Zöliakie darstellt. Durch die Verwendung von humanem rekombinantem Antigen konnte ein neues quantitatives Nachweisverfahren etabliert werden, mit dem Autoantikörper gegen TG mit hoher Sensitivität und Spezifität bestimmt werden können. Diese Detektionsmethode bietet darüber hinaus den Vorteil der einfachen Handhabung, so daß große Probandenzahlen untersucht werden können. Wie die vorliegenden Daten bei Typ 1 Diabetikern zeigen, kann der Test ebenfalls für die Identifizierung von Personen mit latenter Zöliakie verwendet werden.

Vor kurzem wurde von Dieterich und Mitarbeitern nachgewiesen, daß Seren von Patienten mit Zöliakie ein Protein mit einem Molekulargewicht von 85.000 Dalton immunpräzipitieren, welches nach dem Ansequenzieren proteolytischer Fragmente eine Sequenzhomologie zu dem Enzym Gewebs-Transglutaminase (TG) aufwies. In weiteren Versuchen konnten EmA durch Vorinkubation mit aus der Leber von Meerschweinchen isolierter Transglutaminase blockiert werden, so daß die Autoren die Schlußfolgerung zogen, daß die TG ein wichtiges Zielantigen der EmA darstellt (*Dieterich et al. 1997*). Da die von Dieterich und Mitarbeitern verwendete Transglutaminase eine relativ unreine Präparation darstellte, war es unklar, ob die Blockierung der EmA allein durch die TG bedingt war oder teils auch durch Kontamination mit anderen Proteinbestandteilen (z.B. Retikulin) vermittelt wurde. Zur Klärung dieser Frage haben wir die humane Gewebs-Transglutaminase kloniert und

für den Nachweis von Autoantikörpern in einem Radioimmunassay (RIA) verwendet. Der von uns klonierte cDNA-Klon zeigte bis auf 5 Aminosäuren eine Sequenzhomologie mit der zuvor in der Literatur beschriebenen TG-Sequenz (*Gentile et al. 1991*). Für die Expression des rekombinanten Antigens wurde ein in vitro Transkriptions-/ Translationssystem verwendet, welches den Vorteil besitzt, daß hiermit in einem Schritt reines Antigen hergestellt und radioaktiv markiert werden kann. Dieses System war in vorangehenden Studien für die Expression der diabetesspezifischen Autoantigene Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD65 und GAD67), der Tyrosinphosphatase IA-2 und der p450-21-Hydroxylase in korrekter dreidimensionaler Konformation erfolgreich verwendet worden (*Seissler et al. 1996, Seissler et al. 1998, Seissler et al. 1999*). In der Immunpräzipitation mit EmA-positiven Seren konnte eine Antikörperbindung an die rekombinante TG eindeutig nachgewiesen werden. Durch in vitro Expression des cDNA-TG-Klons konnte somit rekombinantes Antigen produziert werden, in welchem zumindest die dominanten humoralen Epitope erhalten blieben. Dieses Antigen wurde für den Aufbau eines Radioimmunassays eingesetzt.

Unter Verwendung von 574 Seren gesunder Normalpersonen, 45 Seren von Patienten mit bioptisch gesicherter Zöliakie und 30 EmA-positiven Seren von Patienten mit V. a. Zöliakie wurden RIA-Systeme für den kombinierten Nachweis von IgG- und IgA-Antikörpern als auch RIAs für den isolierten IgA- bzw. IgG-Antikörpernachweis etabliert. Insgesamt erreichten der kombinierte wie auch die Isotypspezifischen Assays eine Sensitivität von 95,5% in der Population der Zöliakiepatienten und von 100% in der Gruppe der Patienten mit Verdacht auf Zöliakie bei einer Spezifität von 99,3-99,5%. In der vorliegenden Arbeit wiesen 91,1% der Zöliakiepatienten Antikörper gegen Endomysium auf, die alle durch die Testung auf TG-Ak identifiziert werden konnten. In zwei Seren konnten weder TG-Ak noch EmA, wohl aber Antikörper gegen Gliadin (AGA) nachgewiesen werden. In zwei weiteren EmA-negativen Seren wurden sowohl TG-Ak als auch AGA gefunden. In den 35 Seren, die auf TG-Ak, EmA und AGA getestet wurden, waren in 80% alle Antikörper nachweisbar. Diese Ergebnisse belegen erstmals eindeutig, daß rekombinante TG ein Hauptzielantigen bei der Zöliakie darstellt und daß die TG-Antikörper eine hohe diagnostische Sensitivität aufweisen.

Die vorliegenden Ergebnisse wurden von anderen Arbeitsgruppen weitgehend bestätigt, die TG-Antikörper entweder mittels ELISAs unter Verwendung der kommerziell erhältlichen, aus Meerschweinchengewebe isolierten TG oder mit einem RIA nachgewiesen haben. In allen Studien wurde eine hohe Korrelation zwischen EmA und TG-Ak mit Konkordanzwerten von 0,85-1 beschrieben (*Amin et al. 1999, Bazzigaluppi et al. 1999, Dieterich et al. 1998, Lock et al. 1999, Miller et al. 1999, Sulkanen et al. 1998, Troncone et al. 1999*). IgA-TG-Antikörper wurden bei 82-98% der unbehandelten Zöliakiepatienten nachgewiesen (*Biagi et al. 1999, Dieterich et al. 1998, Lock et al. 1999, Sulkanen et al. 1998*). Die trotz niedrigem Cut-off (Mittelwert + 1 x Standardabweichung) geringere Sensitivität bei einem Teil der ELISAs ist am ehesten auf die Verwendung von TG anderer Spezies zurückzuführen. Meerschweinchen-TG zeigt nur zu 80% eine Sequenzhomologie mit dem humanen Enzym. Ferner können Probleme beim Erhalt der für die Antikörperbindung notwendigen TG-Konformation ursächlich sein.

Im Vergleich zu unserem RIA war die Spezifität der TG-Ak ELISAs in manchen Studien deutlich geringer (82-84,7%) (*Amin et al. 1999, Lampasona et al. 1998*). Dies könnte vor allem auf die Verunreinigungen der TG-Präparation bei Verwendung von Meerschweinchengewebe zurückzuführen sein. Es ist außerdem bekannt, daß Patienten mit Zöliakie, aber auch Normalpersonen, häufig Antikörper gegen Nahrungsproteine aufweisen (*Scott et al. 1990*). Bei einem Teil der Patienten und Kontrollen könnten deshalb Antikörper gegen Rinderserumalbumin interferieren, welches für die Blockierung der ELISA-Platten verwendet worden war (*Bazzigaluppi et al. 1999, Dieterich et al. 1998, Sulkanen et al. 1998*). In unseren Assays wurde daher ein Tris-Puffer ohne Zusatz von Rinderalbumin als Inkubations- und Waschpuffer gewählt. Eine unspezifische Antikörperbindung aufgrund der Kopplung von TG an eine Festphase (ELISA-Platte) könnte eine weitere Ursache für die niedrige Spezifität darstellen. Dieses Phänomen wurde beim Nachweis von anderen Autoantikörpern wie z.B. Insulinautoantikörpern beschrieben. Im Falle der IAA erbringt die Messung von Autoantikörpern in Flüssigphasenassays deutlich spezifischere Ergebnisse (*Greenbaum et al. 1992, Schmidli et al. 1995*). Die höhere Spezifität eines Anti-TG-RIAs konnte von Bazzigaluppi und Lampasona bestätigt werden. In ihren Arbeiten wurden TG-Antikörper der IgA- und IgG-Klasse bei unbehandelten Zöliakiepatienten unter Verwendung humaner rekombinanter TG in

einem ähnlichen RIA-System nachgewiesen (Sensitivität 97,3-99%, Spezifität 95,7-96,7%) (*Bazzigaluppi et al. 1999, Lampasona et al. 1998*).

Bei den zöliakiespezifischen Antikörpern wie EmA und AGA wurde in verschiedenen Studien über eine Assoziation zwischen dem Alter, Geschlecht und dem Antikörperstatus berichtet. Bisher wurde diese Korrelation für die TG-Ak nicht untersucht. Da in der vorliegenden Arbeit 43 von 45 Patienten mit dem Vollbild einer Zöliakie TG-Ak-positiv waren, konnte keine Assoziation zum Geschlecht beobachtet werden. Allerdings wurden bei der Prüfung der Altersabhängigkeit der TG-Antikörpertiter bei den 2-10jährigen Zöliakiepatienten signifikant höhere Spiegel gemessen (IgG-Ak  $149\pm 51$  Units, IgA-Ak  $144\pm 55$  Units) im Vergleich zu eher niedrigen Werten bei den 51-70jährigen Patienten (IgG-Ak  $77\pm 43$  Units, IgA-Ak  $34\pm 29$  Units). Andere Studien haben berichtet, daß die Titer der IgA-TG-Antikörper unter Diät wie bei EmA stark abnehmen oder sich sogar normalisieren sowie unter Glutenbelastung erneut ansteigen (*Dieterich et al. 1998, Sulkanen et al. 1998*). In dieser Studie wurden keine Verlaufsbeobachtungen bei Zöliakiepatienten nach Erhalt einer glutenfreien Diät durchgeführt.

Für die Bestimmung der Spezifität der Antikörper gegen TG wurden in der vorliegenden Arbeit Patienten mit Erkrankungen untersucht, die keine starke Assoziation mit einer Zöliakie aufweisen. Dazu wurden Seren von Patienten mit Erkrankungen der Schilddrüse, mit rheumatoider Arthritis und Kollagenosen untersucht. Bei den 130 Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen konnten keine TG-Ak nachgewiesen werden, und bei Erkrankungen des rheumatischen Kreises waren 4 der 111 (3,6%) Seren schwach positiv mit Antikörpertitern von 13,1-25,7 Units (mittlerer Titer 15,9 Units). Andere Studien haben Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen und Typ 1 Diabetes untersucht. Hier konnten TG-Antikörper der IgA-Klasse bei 0-9% nachgewiesen werden (*Amin et al. 1999, Dieterich et al. 1998, Lampasona et al. 1999, Sulkanen et al. 1998*). Lampasona und Mitarbeiter wiesen 1999 TG-Antikörper der IgG-Klasse bei 42% von Typ 1 Diabetikern und 1,7% von Typ 2 Diabetikern nach. Da die Analyse der Isotypklassen ergeben hat, daß die TG-Antikörper, die im kombinierten Assay bei Patienten mit Bindegewebserkrankungen nachgewiesen worden sind, vor allem IgG-Antikörper darstellen, ist es möglich, daß IgG-TG-Antikörper etwas unspezifischer

sind als IgA-TG-Antikörper. Dies würde gut mit Daten der EmA und der Glutinantikörper übereinstimmen, bei denen vor allem die Antikörper der IgA-Klasse mit dem Befund einer Zöliakie korrelieren (*Chorzelski et al. 1983, Hallström 1989, Kapuscinska et al. 1987, Kumar et al. 1989, Lerner und Lebenthal 1991, Lerner et al. 1994, Rossi et al. 1988, Rostoker et al. 1988, Sacchetti et al. 1996, Stern et al. 1996, Troncone und Ferguson 1991, Valeski et al. 1990*).

Dieterich et al. fanden 1997 eine geringere Sensitivität und Spezifität der IgG-Antikörper im Vergleich zu IgA-Antikörpern und ein Auftreten von IgG-Titern in einigen Kontrollseren, v. a. bei Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen. Sulkanen et al. zeigten für die IgG-Klasse der TG-Ak bei unbehandelten Zöliakiepatienten mit normalen IgA-Spiegeln eine geringe Spezifität, während bei Patienten mit IgA-Mangel dieser Antikörper bei 11/14 (78,6%) Patienten hochtitrig nachgewiesen werden konnte.

Sowohl die RIAs wie auch die ELISAs besitzen im Vergleich zu den bisher verwendeten Assays zum Nachweis der EmA den Vorteil der quantitativen Messung der Antikörpertiter. Hierdurch könnte es nach Einführung eines internationalen Standardserums möglich werden, die Ergebnisse verschiedener Labors und verschiedener Tests besser zu vergleichen und in Verlaufsbeobachtungen einfacher als bisher eine Abnahme der Titer beurteilen zu können.

Da der hier etablierte Test durch die Verwendung von 96-well Platten für einen großen Probendurchsatz geeignet ist, wurde die Tauglichkeit des Assays als Screeningverfahren für die Identifizierung von Personen mit latenter Zöliakie analysiert. Untersucht wurde eine Population von 305 Typ 1 Diabetikern. Es ist aus verschiedenen Studien bekannt, daß Typ 1 Diabetiker ein im Vergleich zur Normalpopulation deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Zöliakie aufweisen (*Acerini et al. 1998, Collin et al. 1989, Cronin et al. 1997, DeVitis et al. 1996, Gadd et al. 1992, Koletzko et al. 1988, Mäki et al. 1984, Mäki et al. 1995, Page et al. 1994, Rensch et al. 1996, Saukkonen et al. 1996, Savilahti et al. 1986, Talal et al. 1997*). Das klinische Erscheinungsbild bei Typ 1 Diabetikern ist oft nicht durch die Leitsymptome Gewichtsverlust, Durchfälle oder Malabsorption charakterisiert, sondern tritt wesentlich häufiger als stille oder oligosymptomatische Form in

Erscheinung. Aufgrund fehlender Symptome wird die Diagnose oft verzögert. Da in dieser Population ein Screening auf Autoantikörper von besonderer Bedeutung ist, wurde in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung des Screenings auf TG-Ak in einer Population frisch manifestierter Typ 1 Diabetiker untersucht. Bisher wurde hierfür vor allem die Bestimmung der IgA-Gliadin-Antikörper (AGA) und der EmA eingesetzt, die in einer Prävalenz von 2,4-6,7% nachgewiesen worden waren (*Acerini et al. 1998, Barera et al. 1991, Mäki et al. 1984, Mäki et al. 1995, Saukkonen et al. 1995*). Für routinemäßige Screeninguntersuchungen großer Populationen (z.B. Schulkinder) sind die EmA aufgrund der aufwendigen und relativ teuren Nachweismethoden schlecht einsetzbar. AGA sind zwar preisgünstiger und mit ELISAs nachweisbar, diese Antikörper besitzen aber im Vergleich zu den EmA eine geringere Sensitivität und Spezifität (*Ascher 1996, Grodzinsky 1995, Lerner und Lebenthal 1991, Lerner et al. 1994, Rujner 1996, Sacchetti et al. 1996*).

In unserer Untersuchung wurden TG-Ak bei 3,9% von 305 Typ 1 Diabetikern detektiert. Die Prävalenz der TG-Ak ist somit vergleichbar mit Zöliakie-spezifischen Antikörperprävalenzen früherer Untersuchungen bei Typ 1 Diabetikern. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Studien, die EmA als Screeningmarker verwendet haben, wurden TG-Ak vor allem bei Kindern und Jugendlichen und nur selten bei Erwachsenen gefunden (*Barera et al. 1991, Koletzko et al. 1988*). Die betroffenen Patienten waren alle jünger als 18 Jahre und zeigten retrospektiv keine oder nur unspezifische Symptome, die zu keinem Krankheitsverdacht führten. In der vorliegenden Studie fanden sich bei 11 von 12 TG-Ak-positiven Diabetikern EmA. Eine getestete Patientin zeigte weder IgA-TG-Ak noch IgA-EmA, sondern nur IgG-TG-Ak. Bei diesem Kind lag ein bisher nicht diagnostizierter IgA-Mangel vor, so daß in diesem Falle der Verdacht auf eine Zöliakie nur durch die Bestimmung der IgG-TG-Ak ermöglicht worden ist. Dies zeigt, daß unsere Strategie, primär eine kombinierte Bestimmung auf IgG- und IgA-TG-Ak durchzuführen, der alleinigen Bestimmung der IgA-TG-Ak überlegen ist. Im Unterschied zu der vorliegenden Studie fanden Lampasona und Mitarbeiter mittels RIA bei 42% ihrer Diabetespatienten am Zeitpunkt der Diabetesmanifestation niedrigtitrige IgG-TG-Antikörper (1-11 Units bei einem Cutt-off von 0,9 Units), wobei 80,2% dieser Typ 1 Diabetiker IgA-TG-Antikörper negativ waren. Die IgG-TG-Ak konnten bei den 13 nach einem Jahr erneut untersuchten Patienten nicht mehr nachgewiesen werden (*Lampasona et al. 1999*).

Diese diskrepananten Befunde sind entweder auf Unterschiede in der Festlegung des Cut-offs der Assays zurückzuführen oder dadurch bedingt, daß Lampasona und Mitarbeiter Patienten aus Norditalien, einem Gebiet mit höherer Zöliakieprävalenz, untersucht haben. Zur Klärung dieser Frage müßte ein direkter Assay- oder Patientenvergleich durchgeführt werden.

Da bisher keine Daten zur Bedeutung der TG-Ak für die Identifizierung von Patienten mit latenter oder stiller Zöliakie vorlagen, wurde bei einem Teil der TG-Ak-positiven Typ 1 Diabetiker eine Dünndarmbiopsie durchgeführt. Unter den 7 Kindern, bei denen die Eltern einer Biopsie zustimmten, wurde in 6 (85,7%) Fällen (1,97% der Gesamtpopulation) ein mit einer Zöliakie vereinbarer histologischer Befund erhoben. Hierdurch konnte die Verdachtsdiagnose stille Zöliakie verifiziert werden. Damit konnte der Beweis erbracht werden, daß die TG-Ak eine sehr gute Methode darstellen, im Rahmen von Screeninguntersuchungen Patienten mit v. a. Zöliakie herauszufiltern, bei denen die Diagnose anschließend durch eine Biopsie gesichert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurden keine Verlaufsuntersuchungen über die Entwicklung der Antikörper unter glutenfreier Diät durchgeführt. Es steht noch aus, in einer größeren Anzahl von frisch diagnostizierten Patienten mit Zöliakie den Wert der Antikörper für die Beurteilung des Therapieerfolgs zu evaluieren. Ferner kann man durch genauere Untersuchungen die humoralen Epitope identifizieren und gegebenenfalls auf diesem Wege durch eine Testmodifizierung die Erkennung unspezifischer Antikörper einschränken und somit die Aussagekraft des Tests weiter verbessern. Diese Untersuchungen stehen noch aus.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine neue Methode zum Nachweis von Autoantikörpern gegen das Enzym Gewebs-Transglutaminase etabliert werden. Durch die Verwendung von humaner rekombinanter TG und eines 96-well Plattensystems wurden die Voraussetzungen für einen einfachen und schnellen Antikörpernachweis geschaffen, der es erlaubt, große Serumzahlen zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, daß die TG-Antikörper eine den EmA vergleichbare hohe diagnostische Sensitivität und Spezifität aufweisen, so daß der arbeitsaufwendige und teure Assay zum Nachweis der EmA ersetzt werden kann. Da eine Zöliakie häufig oligosymptomatisch auftritt und auch andere Erkrankungen wie z.B. tropische Enteropathie, Immunglobulinmangel, Infektionen und Parasitenerkrankungen ein ähnliches morphologisch-histologisches Bild aufweisen können, stellen die TG-Ak

einen wichtigen differentialdiagnostischen Marker dar. Wie die vorliegenden Daten zeigen, ist die Bestimmung der TG-Ak außerdem geeignet, Patienten mit stiller oder latenter Zöliakie zu identifizieren, die ansonsten für längere Zeit nicht diagnostiziert worden wären. Da sich das Screening mit dem TG-Ak-Test als effektiv erwiesen hat, sollten alle Patienten, die an Krankheiten mit einer hohen Assoziation zur Zöliakie leiden, auf TG-Ak getestet werden. Hierdurch könnte ein wichtiger Beitrag zur rechtzeitigen Diagnosestellung einer Zöliakie geleistet werden, um das Auftreten von Komplikationen wie Wachstumsstörungen, Eisenmangel, Osteoporose und maligne intestinale Lymphome zu vermeiden.

## 6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, den Stellenwert der Autoantikörper gegen ein neues Autoantigen – die Gewebs-Transglutaminase (TG) - für die Immundiagnostik von Patienten mit einer manifesten Zöliakie sowie von Personen mit einem hohen Zöliakierisiko zu untersuchen. Hierzu sollte humanes rekombinantes Antigen in einem sensitiven Nachweissystem umgesetzt werden. Im ersten Schritt wurde die humane Gewebs-Transglutaminase kloniert und durch in vitro Transkription/Translation als [<sup>35</sup>S]-Methionin markiertes Antigen exprimiert. Nach Bestätigung der korrekten Expression und Antikörperbindung in der Autoradiographie wurden IgA- und IgG-spezifische sowie ein kombinierter IgA/IgG-Radioimmunassay für den Nachweis der Antikörper gegen die Gewebs-Transglutaminase (TG-Ak) entwickelt, die einen äußerst niedrigem Serumproben- und Substratbedarf aufweisen. Die Cutoffs der Assays wurden mittels ROC-Plot Analyse nach Testung von 45 Patienten mit manifester Zöliakie und 574 gesunden Kontrollpersonen bei 9,0 Units (U) für den kombinierten Test und 8,3 bzw. 7,9 Units für den IgA- bzw. IgG-spezifischen Test festgelegt. Zum Vergleich mit etablierten Tests wurden Endomysium-Antikörper (EmA) mit einem indirekten Immunfluoreszenztest und Antigliadinantikörper (AGA) mit einem Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, daß TG-Ak sehr sensitiv und spezifisch für eine Zöliakie sind. 43 (95,5%) der bioptisch gesicherten Zöliakiepatienten wiesen TG-Ak in allen Testungen auf. In der Kontrollpopulation waren 3 (0,52%) Seren schwach Ak-positiv (9,9-14,3 Units). Somit weist der Test eine diagnostische Sensitivität von 95,5% bei einer Spezifität von 99,5% auf. Junge Patienten (2-10 Jahre) zeigten mit  $90,1 \pm 17,0$  U signifikant höhere TG-Ak-Spiegel als alte Patienten (51-70 Jahre) ( $50,8 \pm 26,3$  U; Daten für den kombinierten Test). Dagegen bestand kein signifikanter Unterschied zwischen männlichen ( $68,9 \pm 29,3$  U) und weiblichen ( $76,8 \pm 31,0$  U) Patienten.

Bei weiteren 30 EmA-positiven Patienten, die klinische Symptome einer Zöliakie ohne bioptische Sicherung des Verdachts zeigten, wurden in allen Fällen TG-Ak (100%) detektiert.

Die Mehrzahl (91,1%) der Zöliakiepatienten war EmA-positiv. Gliadinantikörper waren in 91,4% der getesteten Seren nachweisbar. In 80% der Seren waren alle 3 Antikörperspezifitäten nachweisbar.

Für die Bestimmung des Stellenwertes der TG-Ak in der Immundiagnostik von Patienten mit einem erhöhten Auftreten einer stillen oder latenten Zöliakie wurden 305 frisch manifestierte Typ 1 Diabetiker im kombinierten IgA/IgG-TG-Ak-Test untersucht. Die Prävalenz der Antikörper betrug bei 12 positiven Patienten 3,9% in der Gesamtpopulation. Die 12 TG-Ak-positiven Patienten waren mit einem Alter von 2-17 Jahren ( $8,3 \pm 4,6$  Jahre) signifikant jünger als die 293 TG-Ak-negativen Diabetiker ( $19,0 \pm 14,5$  Jahre). EmA waren in 11 der 12 TG-Ak-positiven Seren nachweisbar. Bei einer im kombinierten TG-Ak-Test positiven Patientin konnten im IgA-spezifischen Assay sowie bei der Testung auf EmA keine Antikörper nachgewiesen werden. Nach weiterer Abklärung wurde die Diagnose eines vorher unbekanntem selektiven IgA-Mangels gestellt.

Um die Bedeutung der TG-Antikörper für die Identifizierung von Patienten mit latenter oder stiller Zöliakie weiter zu klären, wurden die TG-Ak-positiven Typ 1 Diabetiker einer Dünndarmbiopsie unterzogen. Bei 6 (85,7%) von 7 Biopsien konnte ein Befund erhoben werden, der mit einer Zöliakie vereinbar war. Die Symptome der Patienten waren unspezifisch und nicht diagnoseweisend.

Bei 130 Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen waren in keinem Fall TG-Ak nachweisbar, bei Patienten mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises waren 4 von 111 (3,6%) Seren schwach positiv (mittlerer Titer 15,9 U).

Die ermittelten Prävalenzen der einzelnen Autoantikörper in den verschiedenen Patientengruppen demonstrieren, daß TG-Ak eine ähnlich hohe Sensitivität und Spezifität wie die EmA für eine manifeste oder latente Zöliakie besitzen. Allerdings besitzen die TG-Ak im Vergleich zu den EmA entscheidende Vorteile als primäres Screeningverfahren in der Zöliakiediagnostik. Die Bestimmungsmethode ist einfach und schnell durchzuführen und liefert quantitative Ergebnisse. Dies ist insbesondere für die Testung großer Populationen von Vorteil, wobei ferner durch den Einsatz der kombinierten Testung auch Patienten mit einem selektiven IgA-Mangel erfaßt werden

können. Durch die quantitative Meßmethode ist nach Einführung eines Standardserums ein Vergleich von Ergebnissen verschiedener Labors möglich und eine Verlaufsbeobachtung mit eventueller Abnahme der Titer unter Therapie einfacher durchführbar als bisher. Die vorliegende Studie zeigt somit, daß durch eine Bestimmung der TG-Ak die Immundiagnostik der Zöliakie deutlich vereinfacht und verbessert werden kann.

## 7. Abkürzungen

AGA	Gliadin-Antikörper
ARA	Retikulin-Antikörper
CD	Cluster of differentiation
DH	Dermatitis herpetiformis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EATCL	Enteropathie-assoziiertes-T-Zellymphom
ELISA	Enzyme-linked Immunoassays
EmA	Endomysium-Antikörper
GADA	Glutamat-Decarboxylase-Antikörper
GFD	glutenfreie Diät
HLA	humanes Leukozytenantigen
IAA	Insulinautoantikörper
IA-2A	Tyrosinphosphatase-Antikörper
ICA	zytoplasmatische Inselzell-Antikörper
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MDT	Magendarmtrakt
MMP	Metalloproteinase
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RIA	Radioimmunoassay
RFLP	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfate
TCA	Trichloressigsäure
TCR	T-Zellrezeptor
TG	Gewebstransglutaminase
TG-Ak	Transglutaminase-Antikörper
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

## 8. Literaturverzeichnis

Acerini-CL, Ahmed-ML, Ross-KM, Sullivan-PB, Bird-G, Dunger-DB (1998) Coeliac disease in children and adolescents with IDDM: clinical characteristics and response to gluten-free diet. *Diabet Med* 15: 38-44

Amin-M, Eckhardt-Th, Kapitza-S, Fleckenstein-B, Jung-G, Seissler-J, Weichert-H, Richter-Th, Stern-M, Mothes-Th (1999) Correlation between tissue transglutaminase antibodies and endomysium antibodies as diagnostic markers of coeliac disease. *Clin Chim Acta* 282: 219-225

Arranz-E, Ferguson-A (1993) Intestinal antibody pattern of celiac disease: occurrence in patients with normal jejunal biopsy histology. *Gastroenterology* 104: 1263-1272

Ascher-H, Hahn-Zoric-M, Hanson-LA, Kilander-AF, Nilsson-LA, Tlaskalova-H (1996) Value of serologic markers for clinical diagnosis and population studies of coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 31: 61-67

Ascher-H, Krantz-I, Rydberg-L, Nordin-P, Kristiansson-B (1997) Influence of infant feeding and gluten intake on coeliac disease. *Arch Dis Child* 76: 113-117

Atkinson-MA, Bowman-MA, Kao-KJ, Campbell-L, Dush-PJ, Shah-SC, Simell-O, Maclaren-NK (1993) Lack of immune responsiveness to bovine serum albumin in insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* 329: 1853-1858

Auricchio-S, Troncone-R (1996) History of coeliac disease. *Eur J Pediatr* 155: 427-428

Baker-PG, Read-AE (1975) Reversible infertility in male coeliac patients. *Br Med J* i: 316-317

Bardella-MT, Molteni-N, Prampolini-L, Giunta-AM, Baldassarri-AR, Morganti-D, Bianchi-PA (1994) Need for follow up in coeliac disease. *Arch Dis Child* 70: 211-213

Barera-G, Bianchi-C, Calisti-L, Cerutti-F, Dammacco-F, Frezza-E, Illeni-MT, Mistura-L, Pocecco-M, Prisco-F, Sacchetti-C, Saggese-G, Stoppoloni-G, Tonini-G, Chiumello-G (1991) Screening of diabetic children for coeliac disease with antigliadin antibodies and HLA typing. *Arch Dis Child* 66: 491-494

Bazzigaluppi-E, Lampasona-V, Barera-G, Venerando-A, Bianchi-C, Chiumello-G, Bonifacio-E, Bosi-E (1999) Comparison of tissue transglutaminase-specific antibody assays with established antibody measurements for coeliac disease. *Journal of Autoimmunity* 12: 51-56

Biagi-F, Ellis-HJ, Yiannakou-JY, Brusco-G, Swift-GL, Smith-PM, Corazza-GR, Ciclitira-PJ (1999) Tissue transglutaminase antibodies in celiac disease. *Am J Gastroenterol* 94:2187-2192

Bode-S, Gudmand-Hoyer-E (1987) The diagnostic value of the D-xylose absorption test in adult coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 22: 1217-1222

Bonamico-M, Morellini-M, Mariani-P, Triglione-P, Trabace-S, Lulli-P, Cappellacci-S, Ballati-G (1991) HLA-antigens and antigliadin antibodies in coeliac disease. *Dis Markers* 9: 313-317

Börner-H, Osman-AA, Meergans-TH, Weiske-T, Mothes-TH (1996) Isolation of antigens recognized by coeliac disease autoantibodies and their use in enzyme immunoassay of endomysium and reticulin antibody-positive human sera. *Clin Exp Immunol* 106: 344-350

Bowness-JM, Folk-JE, Timpl-RJ (1987) Identification of a substrate site for liver transglutaminase on the aminopropeptide of type III collagen. *J Biol Chem* 262: 1022-1024

Brautbar-C, Frier-S, Askenazi-A (1981) Histocompatibility determinants in Israeli Jewish patients with coeliac disease: Population and family study. *Tissue Antigen* 17: 313-322

Bugawan-TL, Angelini-G, Larrick-J, Auricchio-S, Ferrara-GB, Erlich-HA (1989) A combination of a particular HLA-DP $\beta$  allele and an HLA-DQ heterodimer confers susceptibility to coeliac disease. *Nature* 339: 470-473

Cacciari-E, Salardi-S, Volta-U, Biasco-G, Partesotti-S, Mantovani-W, Cicognani-A, Tonioli-S, Tassoni-P, Pirazzoli-P, Bianchi-B, Barboni-F, Pisi-E (1987) Prevalence and characteristics of coeliac disease in type I diabetes mellitus. *Acta Paediatr Scand* 76: 671-672

Caffrey-C, Hitman-GA, Niven-MJ, Cassell-PG, Kumar-P, Fry-L, Mackintosh-P, Gallagher-R, Feighery-C, Weir-D, Sachs-JA (1990) HLA-DP and coeliac disease: family and population studies. *Gut* 31: 663-667

Cataldo-F, Marino-V, Ventura-A, Bottaro-G, Corazza-GR (1998) Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. Italian Society of Paediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP) and "Club del Tenue" Working Groups on Coeliac Disease. *Gut* 42: 362-365

Catassi-C, Fabiani-E, Rättsch-IM, Coppa-GV, Giorgi-PL (1997) Celiac disease in the general population: should we treat asymptomatic cases? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 24: S10-S12 discussion S12-3

Catassi-C, Fabiani-E, Rättsch-IM, Coppa-GV, Giorgi-PL, Pierdomenico-R, Alessandrini-S, Iwanejko-G, Domenici-R, Mei-E, Miano-A, Marani-M, Bottaro-G, Spina-M, Dotti-M, Montanelli-A, Barbato-M, Viola-F, Lazzari-R, Vallini-M, Guariso-G, Plebani-M, Cataldo-F, Traverso-G, Ughi-C, Chiaravalloti-G, Baldassarre-M, Scarcella-P, Bascietto-F, Ceglie-L, Valenti-A, Paolucci-P, Caradonna-M, Bravi-E, Ventura-A (1996) The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects. *Acta Paediatr* 412: 29-35 (Suppl)

Catassi-C, Guerrieri-A, Bartolotta-E, Coppa-GV, Giorgi-PL (1987) Antigliadin antibodies at onset of diabetes in children. *Lancet* 2(8551): 158

Catassi-C, Natalini-G, Rättsch-IM, Gabrielli-O, Coppa-GV, Giorgi-PL (1991) Documented latent coeliac disease in a child with insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Pediatr* 150: 832-834

Cellier-C, Patey-N, Mauvieux-L, Jabri-B, Delabesse-E, Cervoni-JP, Burtin-ML, GuyGrand-D, Bouhnik-Y, Modigliani-R, Barbier-JP, Macintyre-E, Brousse-N, CerfBensussan-N (1998) Abnormal intestinal intraepithelial lymphocytes in refractory sprue. *Gastroenterology* 114: 471-481

Chapman-RG, Laidlow-JM, Colin Jones-DG, Eade-O, Smith-CL (1978) Increased prevalence of epilepsy in coeliac disease. *BMJ* 2: 250-251

Chorzelski-TP, Sulej-J, Tchorzewska-S, Jablonska-S, Beutner-EH, Kumar-V (1983) IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and coeliac disease. Beutner-EH; Nisengard-RJ; Albin-B, eds.; *Defined immunofluorescence and related cytochemical methods*. New York: Ann NY Acad Sci: 325-334

Collin-P, Mäki-M (1997) Celiac disease-even a neurological disorder. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 24: 116-117

Collin-P, Mäki-M, Keyriläinen-O, Hällström-O, Reunala-T, Pasternack-A (1992) Selective IgA deficiency and coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 27: 367-371

Collin-P, Pukkala-E, Reunala-T (1996) Malignancy and survival in dermatitis herpetiformis: a comparison with coeliac disease. *Gut* 38: 528-530

Collin-P, Reunala-T, Pukkala-E, Laippala-P, Keyriläinen-O, Pasternack-A (1994) Coeliac disease-associated disorders and survival. *Gut* 35: 1215-1218

Collin-P, Salmi-J, Hällström-O, Oksa-H, Oksala-H, Mäki-M, Reunala-T (1989) High frequency of coeliac disease in adult patients with type-I diabetes. *Scand-J-Gastroenterol* 24: 81-84

Collin-P, Salmi-J, Hallstrom-O, Reunala-T, Pasternack-A (1994) Autoimmune thyroid disorders and coeliac disease. *Eur-J-Endocrinol*. Feb; 130(2): 137-40

Collin-P, Vilksa-S, Heinonen-PK, Hällström-O, Pikkarainen-P (1996) Infertility and coeliac disease. *Gut* 39: 382-384

- Corazza-GR, Trabacchi-P, Frisconi-M, Prati-C, Gasbarrini-G (1985) DR and non-DR 1a allotypes are associated with susceptibility to coeliac disease. *Gut* 26: 1210-1213
- Counsell-CE, Taha-A, Ruddell-WSJ (1994) Association between coeliac disease and autoimmune thyroid disease. *Gut* 35: 844-846
- Cronin-CC, Feighery-A, Ferriss-JB, Liddy-C, Shanahan-F, Feighery-C (1997) High prevalence of celiac disease among patients with insulin-dependent (type I) diabetes mellitus. *Am J Gastroenterol* 92: 2210-2212
- D'Argenio-G, Biancone-L, Cosenza-V, Della Valle-N, D'Armiento-FP, Boirivant-M, Pallone-F, Mazzacca-G (1995) Transglutaminases in Crohn's disease. *Gut* 37: 690-695
- Daum-S, Bauer-U, Foss-HD, Schuppan-D, Stein-H, Riecken-EO, Ullrich-R (1999) Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinases-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease. *Gut* 44: 17-25
- De Laat-PCJ, Weemaes-CMR, Gonera-R, Van-Munster-PJ, Bakkeren-JA, Stoelinga-GB (1991) Clinical manifestations in selective IgA deficiency in childhood. *Acta Paediatr Scand* 80: 798-804
- De Ritis-G, Auricchio-S, Jones-HW, Lew EJ-L, Bernardin-JE, Kasarda-DD (1988) In vitro (organ culture) studies of the toxicity of specific A-gliadin peptides in coeliac disease. *Gastroenterology* 94: 41-49
- De Vitis-I, Ghirlanda-G, Gasbarrini-G (1996) Prevalence of coeliac disease in type I diabetes: a multicentre study. *Acta paediatr* 412: 56-57 (Suppl)
- DeMarchi-M, Carbonara-AO (1984) HLA-DR3 and DR7-negative celiac disease. Albert ed, *Histocompatibility testing*; Springer-Verlag, Berlin: 359-362
- Dezi-R, Niveloni-S, Sugai-E, Pedreira-S, Smecuol-E, Vazquez-H, Doldan-I, Cabanne-A, Boerr-L, Valero-J, Kogan-Z, Maurino-E, Bai-J (1997) Gluten sensitivity in the rectal mucosa of first-degree relatives of coeliac disease patients. *Am J Gastroenterol* 92: 1326-1330
- Dicke-WK, Weijers-HA, Kamer-JH van de (1953) Coeliac disease: the presence in wheat of a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr* 42: 34-42
- Dieterich-W, Ehnis-T, Bauer-M, Donner-P, Volta-U, Riecken-EO, Schuppan-D (1997) Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 3: 797-801
- Dieterich-W, Laag-E, Schöpfer-H, Volta-U, Ferguson-A, Gillett-H, Riecken-EO, Schuppan-D (1998) Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology* 115: 1317-1321
- Djilali-Saiah-I, Caillat-Zucman-S, Schmitz-J, Chaves-Viera-ML, Bach-JF (1994) Polymorphism of antigen processing (TAP, LMP) and HLA class II genes in coeliac disease. *Hum Immunol* 40: 8-16
- Ellis-A (1981) Coeliac disease: previous family studies. McConnel-RB ed. *The genetics of coeliac disease*. Lancaster, England: MTB: 197-200
- Eterman-KP, Feltkamp-TEW (1978) Antibodies to gluten and reticulin in gastrointestinal diseases. *Clin Exp Immunol* 31: 92-99
- Farthing-MJG, Edwards-CRW, Rees-LH, Dawson-AM (1982) Male gonadal function in coeliac disease. 1. Sexual dysfunction, infertility, and semen quality. *Gut* 23: 608-614
- Farthing-MJG, Rees-LH, Edwards-CRW (1983) Male gonadal function in coeliac disease. 3. Pituitary regulation. *Clin Endocrinol* 19: 661-671
- Farthing-MJG, Rees-LH, Edwards-CRW, Dawson-AM (1983) Male gonadal function in coeliac disease. 2. Sex hormones. *Gut* 24: 127-135

Ferguson-A, Kingstone-K (1996) Coeliac disease and malignancies. *Acta Paediatr* 412: 78-81 (Suppl)

Ferguson-A, Arranz-E, O'Mahony-S (1993) Clinical and pathological spectrum of coeliac disease-active, silent, latent, potential. *Gut* 34: 150-151

Ferguson-A, Arranz-E, O'Mahony-S (1993) Spectrum of expression of intestinal cellular immunity: proposal for a change in diagnostic criteria of celiac disease. *Ann Allergy* 71: 29-32

Ferguson-A, Murray-D (1971) Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. *Gut* 12: 988-994

Ferreira-M, Davies-SL, Butler-M, Scott-D, Clark-M, Kumar-P (1992) Endomysial antibody: is it the best screening test for coeliac disease? *Gut* 33: 1633-1637

Frazer-AC (1960) Pathogenetic concepts of the malabsorption syndrome. *Gastroenterology* 38: 389-398

Frazer-AC; Fletcher-RF; Ross-CA; Shaw-B; Sammons-HG; Schneider-R (1959) Gluten-induced enteropathy. The effect of partially-digested gluten. *Lancet* 2: 252-255

Fry-L, Seah-PP, Riches-DJ, Hoffbrand-AV (1973) Clearance of skin lesions in dermatitis herpetiformis after gluten withdrawal. *Lancet* i 10; 1(7798): 288-291

Fundia-A, Gomez-JC, Maurino-E, Boerr-L, Bai-JC, Larripa-I, Slavutsky-I (1996) Chromosome instability in untreated adult celiac disease patients. *Acta Paediatr* 412: 82-84 (Suppl)

Gadd-S, Silink-M, Kamath-KR, Skerritt-JH (1992) Co-existence of coeliac disease and insulin-dependent diabetes mellitus in children: screening sera using an ELISA test for gliadin antibody. *Aust NZ J Med* 22: 256-260

Gawkrodger-DJ, Blackwell-JN, Gilmour-HM, Rifkind-EA, Heading-RC, Barnetson-RS (1984) Dermatitis herpetiformis: diagnosis, diet and demography. *Gut* 25: 151-157

Gentile-V, Saydak-M, Chiocca-EA, Akande-O, Birckbichler-PJ, Lee-KN, Stein-JP, Davies-PJ (1991) Isolation and characterization of cDNA clones to mouse macrophage and human endothelial cell tissue transglutaminases. *J Biol Chem* 266: 478-483

Gjertsen-HA, Sollid-LM, Ek-J, Thorsby-E, Lundin-KEA (1994) T cells from the peripheral blood of coeliac disease patients recognize gluten antigens when presented by HLA-DR, -DQ, or -DP molecules. *Scand J Immunol* 39: 567-574

Gobbi-G, Bouquet-F, Greco-L, Lambertini-A, Tassinari-CA, Ventura-A, Zaniboni-MG (1992) Coeliac disease, epilepsy, and cerebral calcifications. *Lancet* 340: 439-443

Greco-L, Mäki-M, Di Donato-F, Visakorpi-JK (1992) Epidemiology of coeliac disease in Europe and the Mediterranean area. Auricchio-S; Visakorpi-JK, ed. *Common food intolerances 1: epidemiology of coeliac disease*. Basel: Karger: 25-44

Greenbaum-CJ, Palmer-JP, Kuglin-B, Kolb-H, participating laboratories (1992) Insulin autoantibodies measured by radioimmunoassay methodology are more related to insulin-dependent diabetes mellitus than those measured by enzyme-linked immunosorbent assay: results of the fourth international workshop on the standardization of insulin autoantibody measurement. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 1040-1044

Grodzinsky-E (1996) Screening for coeliac disease in apparently healthy blood donors. *Acta Paediatr* 412: 36-38 (Suppl)

Grodzinsky-E, Franzen-L, Hed-J, Ström-M (1992) High prevalence of coeliac disease in healthy adults revealed by antigliadin antibodies. *Ann Allergy* 69: 66-70

Grodzinsky-E, Jansson-G, Skogh-T, Stenhammar-L, Falth-Magnusson-K (1995) Anti-endomysium and anti-gliadin antibodies as serological markers for coeliac disease in childhood: a clinical study to develop a practical routine. *Acta Paediatr* 84: 294-298

Hadjivassiliou-M, Chattopadhyay-AK, Davies-Jones-GA, Gibson-A, Grünewald-RA, Lobo-AJ (1997) Neuromuscular disorder as a presenting feature of coeliac disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63: 770-775

Hadjivassiliou-M, Gibson-A, Davies-Jones-G, Lobo-AJ, Stephenson-TJ, Milford-Ward-A (1996) Does cryptic gluten sensitivity play a part in neurological illness? *Lancet* 347: 369-371

Hällström-O (1989) Comparison of IgA-class reticulin and endomysium antibodies in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *Gut* 30:1225-1232

Halstensen-TS, Scott-H, Brantzaeg-P (1989) Intraepithelial T cells of the TCR  $\gamma/\delta^+$  CD8<sup>-</sup> and V $\delta$ 1/J $\delta$ 1<sup>+</sup> phenotypes are increased in coeliac disease. *Scand J Immunol* 30: 665-672

Hansson-T, Dannaeus-A, Klareskog-L (1999) Cytokine-producing cells in peripheral blood of children with coeliac disease secrete cytokines with a type 1 profile. *Clinical & Experimental Immunology* 116: 246-250

Hirson-C (1970) Coeliac infertility-folic acid therapy. *Lancet* i: 412

Holmes-GKT, Prior-P, Lane-MR, Pope-D, Allan-RN (1989) Malignancy in coeliac disease-effect of a gluten free diet. *Gut* 30: 333-338

Holmes-GKT, Stokes-PL, Sorahan-TM, Prior-P, Waterhouse-JAM (1976) Coeliac disease, gluten free diet and malignancy. *Gut* 17: 612-619

Howell-M, Austin-RK, Kelleher-D, Nepom-GT, Kagnoff-MF (1986) An HLA-D region restriction fragment length polymorphism associated with coeliac disease. *J Exp Med* 164: 333-338

Howell-M, Smith-JR, Austin-RK, Kelleher-D, Nepom-GT, Volk-B, Kagnoff-MF (1988) An extended HLA-D region haplotype associated with coeliac disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 222-226

Johnston-SD, Watson-RGP, McMillan-SA, McMaster-D, Evans-A (1996) Preliminary results from follow-up of a large-scale population survey of antibodies to gliadin, reticulin and endomysium. *Acta Paediatr* 412: 61-64 (Suppl)

Jos-J, de Tand-MF, Arnaud-Battandier-D, Boissel-JP, Popineau-Y, Wajcman-H (1983) Separation of pure toxic peptides from a  $\alpha$ -gliadin subfraction using high-performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta* 134: 189-198

Kagnoff-MF, Harwood-JI, Bugawan-TL, Erlich-HA (1989) Structural analysis of the HLA-DR,-DQ and -DP alleles on the celiac disease associated HLA-DR3 haplotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6274-6278

Kagnoff-MF, Paterson-YJ, Kumar-PJ, Kasarda-DD, Carbone-FR, Unsworth-DJ, Austin-RK (1987) Evidence for the role of a human intestinal adenovirus in the pathogenesis of coeliac disease. *Gut* 28: 995-1001

Kapuscinska-A, Zalewski-T, Chorzelski-TP, Sulej-J, Beutner-EH, Kumar-V, Rossi-T (1987) Disease specificity and dynamics of changes in IgA class anti-endomysial antibodies in coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 6: 529-534

Kaukinen-K, Collin-P, Holm-K, Karvonen-AL, Pikkarainen-P, Mäki-M (1998) Small-bowel mucosal inflammation in reticulin or gliadin antibody-positive patients without villous atrophy. *Scand J Gastroenterol* 33: 944-949

Kerttula-TO, Collin-P, Mäki-M, Hurme-M (1999) Normal T-helper 1/T-helper 2 balance in peripheral blood of coeliac disease patients. *Scand J Immunol* 49: 197-202

- Kerttula-TO, Holm-K, Partanen-J, Polvi-A, Mäki-M (1998) Circulating T lymphocyte subsets in coeliac disease (CoD) patients and healthy family members. *Clin Exp Immunol* 111: 536-540
- Kingham-JGC, Parker-DR (1998) The association between primary biliary cirrhosis and coeliac disease: a study of relative prevalences. *Gut* 42: 120-122
- Klemola-T (1987) Deficiency of immunoglobulin A. *Ann Clin Res* 19: 248-257
- Klemola-T (1988) Immunohistochemical findings in the intestine of IgA-deficiency persons: number of intraepithelial T lymphocytes is increased. *J Paediatr Gastroenterol Nutr* 7: 537-543
- Klemola-T, Savilahti-E, Koskimies-S, Pelkonen-P (1988) HLA antigens in IgA deficient pediatric patients. *Tissue Antigens* 32: 218-223
- Koletzko-S, Bürgin-Wolff-A, Koletzko-B, Knapp-M, Burger-W, Grünekleee-D, Herz-G, Ruch-W, Thon-A, Wendel-U, Zuppinger-K (1988) Prevalence of coeliac disease in diabetic children and adolescents. *Eur J Pediatr* 148: 113-117
- Krupickova-S, Tuckova-L, Flegelova-Z, Michalak-M, Walters-JRF, Whelan-A, Harries-J, Vencovsky-J, Tlaskalova-Hogenova- H (1999) Identification of common epitopes on gliadin, enterocytes, and calreticulin recognized by antigliadin antibodies of patients with coeliac disease. *Gut* 44: 168-173
- Kumar-V, Lerner-A, Jain-N, Beutner-EH (1984) Are antigliadin antibodies specific for coeliac disease? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 3: 815
- Kumar-V, Lerner-A, Valeski-JE, Beutner-EH, Chorzelski-TP, Rossi-T (1989) Endomysial antibodies in the diagnosis of coeliac disease and the effect of gluten on antibody titres. *Immunol Invest* 18: 533-544
- Kutlu-T, Brousse-N, Rambaud-C, Le Deist-F, Schmitz-J, Cerf-Bensussan-N (1993) Numbers of T cell receptor (TCR)  $\alpha/\beta^+$  but not of TCR  $\gamma/\delta^+$  intraepithelial lymphocytes correlate with the grade of villous atrophy in celiac patients on a long term normal diet. *Gut* 34: 208-214
- Laidlow-JM, Chapman-RG, Colin Jones-DG, Eade-O, Smith-CL (1977) Increased prevalence of epilepsy in coeliac disease. *Gut* 18: A 943
- Lampasona-V, Bazzigaluppi-E, Barera-G, Bonifacio-E (1998) Tissue transglutaminase and combined screening for coeliac disease and type I diabetes-associated autoantibodies. *Lancet* 352: 1192-1193
- Lebenthal-E, Heitlinger-LA (1983) Gliadin antibodies in coeliac disease. *J Pediatr* 102: 711-712
- Lerner-A, Kumar-V, Iancu-TC (1994) Immunological diagnosis of childhood coeliac disease: comparison between antigliadin, antireticulin and antiendomysial antibodies. *Clin Exp Immunol* 95: 78-82
- Lerner-A, Lebenthal-E (1991) The controversy of antigluten antibody (AGA) as a diagnostic tool in coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 12: 407-409
- Levenson-SD, Austin-RK, Dietler-MD, Kasarda-DD, Kagnoff-MF (1985) Specificity of antigliadin antibody in coeliac disease. *Gastroenterology* 89: 1-5
- Lock-RJ, Pitcher-MC, Unsworth-DJ (1999) IgA anti-tissue transglutaminase as a diagnostic marker of gluten sensitive enteropathy. *J of clin pathology* 52: 274-277
- Loft-DE, Marsh-MN, Crowe-PT (1990) Rectal gluten challenge and diagnosis of coeliac disease. *Lancet* 335: 1293-1295
- Logan-RF, Rifkind-EA, Turner-ID, Ferguson-A (1989) Mortality in celiac disease. *Gastroenterology* 97: 265-271

Lundin-KEA; Sollid-LM; Qvigstad-E; Markussen-G; Gjertsen-HA; Ek-J; Thorsby-E (1990) T lymphocyte recognition of a celiac disease-associated cis- or trans-encoded HLA-DQ  $\alpha/\beta$ -heterodimer. *J Immunol* 145: 136-139

MacDonald-WC, Dobbins-WO, Rubin-CE (1965) Studies on the familial nature of coeliac sprue using biopsy of the small intestine. *N Engl J Med* 272: 448-456

Mäki-M (1995) The humoral immune system in coeliac disease. *Baillieres Clin Gastroenterol* 9: 231-249

Mäki-M (1996) Coeliac disease and autoimmunity due to unmasking of cryptic epitopes? *Lancet* 348: 1046-1047

Mäki-M, Collin-P (1997) Coeliac disease. *Lancet* 349: 1755-1759

Mäki-M, Hällström-O, Huupponen-T, Vesikari-T, Visakorpi-JK (1984) Increased prevalence of coeliac disease in diabetes. *Arch Dis Child* 59: 739-742

Mäki-M, Hällström-O, Vesikari-T, Visakorpi-JK (1984) Evaluation of a serum IgA class reticulin antibody test for the detection of childhood coeliac disease. *J Pediatr* 105: 901-905

Mäki-M, Huupponen-T, Holm-K, Hällström-O (1995) Seroconversion of reticulin autoantibodies predicts coeliac disease in insulin dependent diabetes mellitus. *Gut* 36: 239-242

Marsh-MN (1988) Studies of intestinal lymphoid tissue. XI: The immunopathology of cell-mediated reactions in gluten sensitivity and other enteropathies. *Scanning Microsc* 2: 1663-1684

Marsh-MN (1992) Gluten, Major Histocompatibility Complex, and the Small Intestine. *Gastroenterology* 102: 330-354

Marsh-MN (1997) Transglutaminase, gluten and celiac disease: food for thought. Transglutaminase is identified as the autoantigen of celiac disease [news; comment]. *Nat Med* 3: 725-726

McMillan-SA, Watson-RPG, McCrum-EE, Evans-AE (1996) Factors associated with serum antibodies to reticulin, endomysium and gliadin in an adult population. *Gut* 39: 43-47

McNeish-AS, Harms-HK, Rey-J, Shmerling-DH, Visakorpi-JK, Walker-Smith-JA (1979) The diagnosis of coeliac disease. A commentary on the current practices of members of the European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN). *Arch Dis Child* 54: 783-786

Mearin-ML, Biemond-I, Pena-AS, Polanco-I, Vazquez-C, Schreuder-GM, de Vries-RRP, van Rood-JJ (1983) HLA-DR phenotypes in Spanish coeliac children: their contribution to the understanding of the genetics of coeliac disease. *Gut* 24: 532-537

Mearin-ML, Koninckx-CR, Biemond-I, Polanco-I, Pena-AS (1984) Influence of genetic factors on the serum levels of anti-gliadin antibodies in coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 3: 373-377

Meini-A, Pillan-NM, Villanacci-V, Monafo-V, Ugazio-AG, Plebani-A (1996) Prevalence and diagnosis of celiac disease in IgA-deficient children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 77: 333-336

Messer-M, Anderson-CM, Hubbard-L (1964) Studies on the mechanism of destruction of the toxic action of wheat gluten in coeliac disease by crude papain. *Gut* 5: 295-303

Midhagen-G, Jarnerot-G, Kraaz-W (1988) Adult coeliac disease within a defined geographical area in Sweden. A study of prevalence and associated diseases. *Scand J Gastroenterol* 23: 1000-1004

Miller-A, Paspaliaris-W, Elliott-PR, d'Apice-A (1999) Anti-transglutaminase antibodies and coeliac disease. *Aust N Z J Med* 29:239-242

Molberg-O, Kett-K, Scott-H, Thorsby-E, Sollid-LM, Lundin-KEA (1997) Gliadin specific, HLA DQ2-restricted T cells are commonly found in small intestinal biopsies from coeliac disease patients, but not from controls. *Scand J Immunol* 46: 103-109

Molberg-O, McAdam-SN, Korner-R, Quartsen-H, Kristiansen-C, Madsen-L, Fugger-L, Scott-H, Noren-O, Roepstorff-P, Lundin-KE, Sjoström-H, Sollid-LM (1998) Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med* 4:713-717

Mora-S, Weber-G, Barera-G, Bellini-A, Pasolini-D, Prinster-C, Bianchi-C, Chiumello-G (1993) Effect of gluten-free diet on bone mineral content in growing patients with coeliac disease. *Am J Clin Nutr* 57: 224-228

Nilsen-EM, Lundin-KE, Krajci-P, Scott-H, Sollid-LM, Brandtzaeg-P (1995) Gluten specific HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon-gamma. *Gut* 37; 766-776

Niveloni-S, Dezi-R, Pedreira-S, Podesta-A, Cabanne-A, Vazquez-H, Sugai-E, Smecuol-E, Doldan-I, Valero-J, Kogan-Z, Boerr-L, Maurino-E, Terg-R, Bai-JC (1998) Gluten sensitivity in patients with primary biliary cirrhosis. *Am J of Gastroenterol* 93: 404-408

Not-T, Citta-A, Lucchesi-A, Torre-G, Martelossi-S, Ventura-A (1997) Anti-endomysium antibody on human umbilical cord vein tissue: an inexpensive diagnostic tool for the screening of coeliac disease. *Eur J Pediatr* 156: 616-618

Not-T, Horvath-K, Hill-ID, Partanen-J, Hammed-A, Magazzu-G, Fasano-A (1998) Celiac disease risk in the USA: High prevalence of antiendomysium antibodies in healthy blood donors. *Scand J Gastroenterol* 33: 494-498

Page-SR, Lloyd-CA, Hill-PG, Peacock-I, Holmes-GKT (1994) The prevalence of coeliac disease in adult diabetes mellitus. *Q J Med* 87: 631-637

Palavecino-EA, Mota-A, Award-J, et al (1990) HLA and coeliac disease in Argentina: involvement of DQ subregion. *Dis Markers* 8: 5-10

Piacentini-M (1995) Tissue Transglutaminase: A candidate effector element of physiological cell death. *Curr Top Microbiol Immunol* 200: 163-175

Picarelli-A, Maiuri-L, Frate-A, Greco-L, Auricchio-S, Londei-M (1996) Production of antiendomysial antibodies after in-vitro gliadin challenge of small intestine biopsy samples from patients with coeliac disease. *Lancet* 348: 1065-1067

Ploski-R, Ek-J, Thorsby-E, Sollid-LM (1993) On the HLA-DQ(a1\*0501,b1\*0201) associated susceptibility in coeliac disease: a possible gene dosage effect of DQ1\*0201. *Tissue Antigens* 41: 173-177

Polanco-I, Biemond-I, van Leeuwen-A, Schreuder-I, Kahn-PM, Guerrero-J, D'Amato-J, Vazquez-C, van Rood-JJ, Pena-AS (1981) Gluten sensitive enteropathy in Spain: genetic and environmental factors. *McConnell-RB ed.: The genetics of coeliac disease. Lancaster, England: MTB, 211-231*

Polvi-A, Arranz-E, Fernandez-Arquero-M, Collin-P, Mäki-M, Sanz-A, Calvo-C, Maluenda-C, Westman-P, de-la-Concha-EG, Partanen-J (1998) HLA-DQ2-negative celiac disease in Finland and Spain. *Hum Immunol* 59: 169-175

Rensch-MJ, Merenich-JA, Liebermann-M, Long-B, Davis-D, McNally-P (1996) Gluten sensitive enteropathy in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 124: 564-567

Reunala-T, Blomqvist-K, Tarpila-S, Halme-H, Kangas-K (1977) Gluten-free diet in dermatitis herpetiformis. I: Clinical response of 81 patients. *Br J Dermatol* 97: 473-480

Reunala-T, Chorzelski-TP, Viander-M, Sulej-J, Vainio-E, Kumar-V, Beutner-EH (1987) IgA anti-endomysial antibodies in dermatitis herpetiformis: correlation with jejunal morphology, gluten-free diet and anti-gliadin antibodies. *Br J Dermatol* 117: 185-191

Reunala-T, Collin-P (1997) Diseases associated with dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol* 136: 315-318

Rossi-TM, Kumar-V, Lerner-A, Heitlinger-LA, Tucker-N, Fisher-J (1988) Relationship of endomysial antibodies to jejunal mucosal pathology: specificity towards both symptomatic and asymptomatic coeliacs. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 7: 858-863

Rostoker-G, Andre-C, Branellec-A, Bourhala-S, Laurent-J, Lagrue-G (1988) Lack of antireticulin and IgA antiendomysium antibodies in sera of patients with primary IgA nephropathy associated with circulating IgA antibodies to gliadin. *Nephron* 48: 81

Rujner-J, Socha-J, Barra-E, Gregorek-H, Madalinski-K, Wozniewicz-B, Giera-B (1996) Serum and salivary antigliadin antibodies and serum IgA anti-endomysium antibodies as a screening test for coeliac disease. *Acta Paediatr* 85: 814-817

Sacchetti-L, Ferrajolo-A, Salerno-G, Esposito-P, Lofrano-MM, Oriani-G, Micillo-M, Paparo-F, Troncone-R, Auricchio-S, Salvatore-F (1996) Diagnostic value of various serum antibodies detected by diverse methods in childhood celiac disease. *Clin Chem* 42(11): 1838-1842

Saukkonen-T, Savilahti-E, Reijonen-H, Ilonen-J, Tuomilehto-Wolf-E, Akerblom-HK (1996) Coeliac disease: Frequent occurrence after clinical onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 13: 464-470

Savilahti-E, Arato-A, Verkasalo-M (1990) Intestinal gamma/delta bearing T-lymphocytes in celiac disease and inflammatory bowel diseases in children. Constant increase in celiac disease. *Pediatr Res* 28: 579-581

Savilahti-E, Pelkonen-P (1979) Clinical findings and intestinal immunoglobulins in children with partial IgA deficiency. *Acta Paediatr Scand* 68: 513-519

Savilahti-E, Pelkonen-P, Visakorpi-JK (1971) IgA deficiency in children. A clinical study with special reference to intestinal findings. *Arch Dis Child* 46: 665-670

Savilahti-E, Perkkio-M, Kalimo-K, Viander-M, Vainio-E, Reunala-T (1983) IgA gliadin antibodies: a marker for mucosal damage in childhood coeliac disease. *Lancet* 1: 320-322

Savilahti-E, Simell-O, Koskimies-S, Rilva-A, Akerblom-HK (1986) Celiac disease in insulin-dependent diabetes mellitus. *The J of Pediatrics* 108: 690-693

Schmidli-RS, Colman-PG, Bonifacio-E, participating laboratories (1995) Disease sensitivity and specificity of 52 assays for glutamic acid decarboxylase antibodies: the second international GADAb workshop. *Diabetes* 44: 636-640

Schuppan-D, Dieterich-W, Riecken-EO (1998) Exposing gliadin as a tasty food for lymphocytes. *Nat Med* 4: 666-667

Scott-H, Fausa-O, Ek-J, Valnes-K, Blystad-L, Brandtzaeg-P (1990) Measurements of serum IgA and IgG activities to dietary antigens. A prospective study of the diagnostic usefulness in adult coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 25: 287-292

Seah-PP, Fry-LL, Rossiter-MA, Hoffbrand-AV, Holborow-EJ (1971) Antiretikulin antibodies in childhood coeliac disease. *Lancet* ii:681-682

Seißler-J, Boms-S, Wohlrab-U, Morgenthaler-N.G., Mothes-T, Boehm-B.O., Scherbaum-W (1999) Antibodies to human recombinant tissue transglutaminase measured by radioligand assay: evidence for high diagnostic sensitivity for celiac disease. *Horm Metab Res* 31: 375-379

Seissler-J, de-Sonnaville-JJ, Morgenthaler-NG, Steinbrenner-H, Glawe-D, Khoo-Morgenthaler-UY, Lan-MS, Notkins-AL, Heine-RJ, Scherbaum-WA (1998) Immunological heterogeneity in type I diabetes: presence of distinct autoantibody patterns in patients with acute onset and slowly progressive disease. *Diabetologia* 41: 891-897

Seissler-J, Morgenthaler-NG, Achenbach-P, Lampeter-EF, Glawe-D, Payton-M, Christie-M, Scherbaum-WA (1996) Combined screening for autoantibodies to IA-2 and antibodies to glutamic acid decarboxylase in first degree relatives of patients with IDDM. The DENIS Study Group. *Deutsche Nikotinamid Interventions-Studie. Diabetologia* 39: 1351-1356

Shanahan-F, McKenna-R, McCarthy-CF, Drury-MI (1982) Coeliac disease and diabetes mellitus: a study of 24 patients with HLA typing. *Queens J of Med, New Series LI, No.203*, 329-335, Summer

Sigurs-N, Johansson-C, Elfstrand-PO, Viander-M, Lanner-A (1993) Prevalence of coeliac disease in diabetic children and adolescents in Sweden. *Acta Paediatr Scand* 82: 748-751

Sjostrom-H, Lundin-KE, Molberg-O, Korner-R, McAdam-SN, Anthonsen-D, Quarsten-H, Noren-O, Roepstorff-P, Thorsby-E, Sollid-LM (1998) Identification of a gliadin T-cell epitope in coeliac disease: general importance of gliadin deamidation for intestinal T-cell recognition. *Scand J Immunol* 48: 111-115

Snook-JA, de Silva-HJ, Jewell-DP (1989) The association of autoimmune disorders with inflammatory bowel disease. *Quart J Med* 269: 835-840

Sollid-LM, Markussen-G, Ek-J, Gjerde-H, Vartdal-F, Thorsby-E (1989) Evidence for a primary association of coeliac disease to a particular HLA-DQ  $\alpha/\beta$ -heterodimer. *J Exp Med* 169: 345-350

Sollid-LM, Molberg-O, McAdam-S, Lundin-KEA (1997) Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase-guilt by association? *Gut* 41: 851-852

Sollid-LM, Thorsby-E (1993) HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis *Gastroenterology* 105: 910-922

Spencer-J, Isaacson-PG, Diss-TC, McDonald-TT (1989) Expression of disulfide-linked and non disulfide-linked forms of the T-cell receptor  $\gamma/\delta$  heterodimer in human intraepithelial lymphocytes. *Eur J Immunol* 19: 1335-1338

Stern-M, Teuscher-M, Wechmann-T (1996) Serological screening for coeliac disease: methodological standards and quality control. *Acta Paediatr* 412; 49-51 (Suppl)

Sulkanen-S, Collin-P, Laurila-K, Mäki-M (1998) IgA- and IgG-class antihuman umbilical cord antibody tests in adult coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 33: 251-254

Sulkanen-S, Halttunen-T, Laurila-K, Kolho-KL, Korponay-Szabo-IR, Sarnesto-A, Savilahti-E, Collin-P, Mäki-M (1998) Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology* 115: 1322-1328

Szaboles-M, Sipka-S, Csorba-S (1987) In vitro crosslinking of gluten into high-molecular-weight polymers with transglutaminase. *Acta Paediatr Hung* 28: 215-227

Talal-AH, Murray-JA, Goeken-JA, Sivitz-WI (1997) Celiac disease in an adult population with insulin-dependent diabetes mellitus: use of endomysial antibody testing. *Am J Gastroenterol* 92: 1280-1284

Tiwari-JL, Terasaki-PI (1985) HLA and disease associations. New York, Springer-Verlag

Tosi-R, Tanigaki-N, Polanco-I, DeMarchi-M, Woodrow-JC, Hetzel-PA (1986) A radioimmunoassay typing study of non-DQw2-associated celiac disease. *Clin Immunol Immunopathol* 39: 168-172

Tosi-R, Vismara-D, Tanigaki-N, Ferrara-GB, Cicimarra-F, Buffolano-W, Follo-D, Auricchio-S (1983) Evidence that coeliac disease is primarily associated with a DC locus allelic specificity. *Clin Immunol Immunopathol* 28: 395-404

Troncone-R, Maurano-F, Rossi-M, Micillo-M, Greco-L, Auricchio-R, Salerno-G, Salvatore-F, Sacchetti-L (1999) IgA antibodies to tissue transglutaminase: An effective diagnostic test for celiac disease. *J Pediatr* 134:166-171

Troncone-R, Ferguson-A (1991) Antigliadin antibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 12: 150-158

Troncone-R, Gianfrani-C, Mazzarella-G, Greco-L, Guardiola-J, Auricchio-S, DeBerardinis-P (1998) Majority of gliadin-specific T-cell clones from celiac small intestinal mucosa produce interferon-gamma and interleukin-4. *DIGESTIVE-DISEASES-AND-SCIENCES*. 43: 156-161

Troncone-R, Greco-L, Mayer-M, Paparo-F, Caputo-N, Micillo-M, Mugione-P, Auricchio-S (1996) Latent and potential coeliac disease. *Acta Paediatr* 412: 10-14 (Suppl)

Tucker-NT, Barghuthy-FS, Prihoda-TJ, Kumar-V, Lerner-A, Lebenthal-E (1988) Antigliadin antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay as a marker of childhood coeliac disease. *J Pediatr* 113: 286-229

Valdimarsson-T, Löfman-O, Toss-G, Ström-M (1996) Reversal of osteopathia with diet in adult coeliac disease. *Gut* 38: 322-327

Valeski-JE, Kumar-V, Beutner-EH, Lerner-A, Chorzelski-TP (1990) Immunology of coeliac disease: tissue and species specificity of endomysial and reticulin antibodies. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 93: 1-7

van de Kamer-JH, Weijers-HA, Dicke-WK (1955) Coeliac disease V- some experiments on the cause of the harmful effect of wheat gliadin. *Acta Paediatr* 44: 465-469

van de Meer-JB (1969) Granular deposits of immunoglobulins in the skin of patients with dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol* 81: 493-503

Visakorpi-JK, Mäki-M (1994) Changing clinical features of coeliac disease. *Acta Paediatr Suppl* 83: 10-13

Volta-U, Lenzi-M, Cassani-F, Lazzari-R, Bianchi-FB, Pisi-E (1983) Gliadin antibodies in coeliac disease. *Lancet* 1:1285

Walker-Smith-JA (1990) Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. *Arch Dis Child* 65: 909-911

Walsh-CH, Cooper-BT, Wright-AD, Malins-JM, Cooke-WT (1978) Diabetes mellitus and coeliac disease: A clinical study. *Quart J Med New Series XLVII*, 185: 89-100

Wang-JY, Johnson-LR (1992) Role of transglutaminase and protein crosslinking in the repair of mucosal stress erosions. *Am J Physiol* 262: G818-G825

Weiss-JB, Austin-RK, Schanfield-MS, Kagnoff-MF (1983) Gluten-sensitive enteropathy. IgG heavy-chain (Gm) allotypes and the immune response to wheat gliadin. *J Clin Invest* 72: 96-101

Wieser-H (1996) Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatr* 412: 3-9 (Suppl)

Wieser-H, Belitz-HD, Idar-D, Ashkenazi-A (1986) Coeliac activity of the gliadin peptides CT-1 and CT-2. *Z Lebensm Unters Forsch* 182: 115-7

Ziegler-K, Ferguson-A (1984) Coeliac disease. Batt-RM; Lawrence-TLJ ed. Function and dysfunction of the small intestine. Liverpool. Liverpool University Press, 149-66

Zweig-MH, Campbell-G (1993) Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 39: 561-577

## 9. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1	Übersicht über die Studienpopulation.....	28
Tabelle 2	Assoziation der TG-Ak-Titer mit dem Geschlecht bei Patienten mit Zöliakie.....	48
Tabelle 3	Assoziation der TG-Ak-Titer mit dem Alter bei Patienten mit Zöliakie.....	48
Tabelle 4	Assoziation der TG-Ak-Titer mit dem Geschlecht bei Patienten mit Verdacht auf Zöliakie.....	52
Tabelle 5	Assoziation der TG-Ak-Titer mit dem Alter bei Patienten mit Verdacht auf Zöliakie.....	52
Tabelle 6	mittleres Alter, Variationsbreite des Alters sowie durchschnittliche TG-Ak-Titer in der Gruppe der Diabetiker.....	54
Tabelle 7	Vergleich der TG-Ak-Prävalenzen und TG-Ak-Spiegel bei den verschiedenen Studienpopulationen im kombinierten Test.....	56
Tabelle 8	Charakteristika der 12 TG-Ak-positiven Diabetiker; angegeben sind Geschlecht, Alter, TG-Ak-Spiegel, EmA-Befund und Biopsieergebnis mit histologischem Befund.....	58
Abbildung 1	Der Zöliakieeisberg und das Spektrum der glutensensitiven Enteropathie.....	4
Abbildung 2	Primäre Assoziation bestimmter HLA-Gene bei Patienten mit Zöliakie.....	10
Abbildung 3	Immunantwort und Mukosazerstörung im Rahmen der glutensensitiven Enteropathie..	15
Abbildung 4	Hypothetischer Mechanismus der Antikörperproduktion gegen Transglutaminase bei der glutensensitiven Enteropathie.....	16
Abbildung 5	Reaktionsmechanismus der Transglutaminase.....	21
Abbildung 6	Darstellung des TG-cDNA-Klons nach Restriktionsverdau mit Hind III und Sac I.....	37
Abbildung 7	Immunpräzipitation der humanen rekombinanten TG mit Seren von Patienten mit gesicherter Zöliakie und Normalseren.....	38
Abbildung 8	Nachweis von Endomysiumantikörpern im indirekten Immunfluoreszenztest.....	39
Abbildung 9	Nachweis der Autoantikörperbindung gegen TG.....	40
Abbildung 10A	ROC-Plot Diagramm für den kombinierten IgG/IgA-TG-Ak-Test.....	41
10B	ROC-Plot Diagramm für den IgG-spezifischen TG-Ak-Test.....	42
10C	ROC-Plot Diagramm für den IgA-spezifischen TG-Ak-Test.....	42
Abbildung 11A	Titer der TG-Ak bei Patienten mit gesicherter Zöliakie, mit Verdacht auf Zöliakie und gesunden Kontrollen im kombinierten IgG/IgA-Radioimmunassay.....	44
11B	Titer der TG-Ak bei Patienten mit gesicherter Zöliakie, mit Verdacht auf Zöliakie und gesunden Kontrollen im IgG-spezifischen Radioimmunassay.....	45
11C	Titer der TG-Ak bei Patienten mit gesicherter Zöliakie, mit Verdacht auf Zöliakie und gesunden Kontrollen im IgA-spezifischen Radioimmunassay.....	46
Abbildung 12	Korrelation der Autoantikörper in den Seren von 35 Patienten mit manifester Zöliakie.....	49

## **Veröffentlichungen und Kongresse**

Seissler-J, Schott-M, Boms-S, Wohrab-U, Ostendorf-B, Morgenthaler-NG,

Scherbaum-W (1999) Autoantibodies to human tissue transglutaminase identify silent coeliac disease in type I diabetes. Diabetologia 1440-41

Seißler-J, Boms-S, Wohrab-U, Morgenthaler-N.G., Mothes-T, Boehm-B.O.,

Scherbaum-W (1999) Antibodies to human recombinant tissue transglutaminase measured by radioligand assay: evidence for high diagnostic sensitivity for celiac disease. Horm Metab Res 31: 375-379

Boms-S, Morgenthaler-N, Boehm-BO, Scherbaum-W, Seissler-J (1999) Antikörper gegen das Enzym Transglutaminase: Etablierung eines neuen Screeningverfahrens zum Nachweis einer Zöliakie bei Patienten mit Typ 1 Diabetes.

(Poster No. 137); 34. Jahrestagung der deutschen Diabetes-Gesellschaft, Frankfurt am Main

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Scherbaum danke ich für die Überlassung des Themas der vorliegenden Promotionsarbeit und die Möglichkeit der Durchführung des experimentellen Teils in den Räumlichkeiten seines Institutes.

Ferner danke ich Herrn PD Dr. Seißler sehr herzlich für die gewissenhafte und kompetente Betreuung während der experimentellen Phase sowie das sorgfältige, konstruktive Lektorat der Arbeit.

Weiterhin danke ich Herr Prof. Dr. Wendel für die freundliche Übernahme der Koreferententätigkeit sowie Herr PD. Dr. Feindt für die Funktion als 3. Prüfer in der mündlichen Promotionsprüfung.

Meiner Familie und Herrn Dr. Yaldizli danke ich sehr für ihre zuverlässige Unterstützung.

## Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Name	Stefanie Boms
Anschrift	Onyxweg 10 41564 Kaarst
Geburtsdatum	7. Februar 1975
Geburtsort	Düsseldorf
Familienstand	Ledig

### **Schulbildung**

1981-1994	Gemeinschaftsgrundschule Holzbüttgen/ Kaarst Gymnasium Büttgen/ Kaarst, mittlere Reife Marie-Curie-Gymnasium Neuss, Abitur
-----------	--

### **Akademische Ausbildung**

10/1994	Immatrikulation an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Fachbereich Humanmedizin
08/1996	Ärztliche Vorprüfung, Düsseldorf
08/1997	1. Staatsexamen, Düsseldorf
03/2000	2. Staatsexamen, Düsseldorf
04-2000 – 03/2001	Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Düsseldorf, Wahlfach: Dermatologie
06/2001	3. Staatsexamen, Düsseldorf, Teilapprobation

### **Beruflicher Werdegang**

Seit 08/2001	Ärztin im Praktikum, Bochum, Sankt-Josef-Hospital, Fachbereich: Dermatologie, Prof. Dr. P. Altmeyer
--------------	--

Bochum, den 13.05.2002

## **Antikörper gegen das Enzym Gewebs-Transglutaminase: Etablierung eines neuen Screeningverfahrens zum Nachweis einer Zöliakie (Stefanie Boms)**

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, den Stellenwert der Autoantikörper gegen ein neues Autoantigen – die Gewebs-Transglutaminase (TG) - für die Immundiagnostik von Patienten mit einer manifesten Zöliakie sowie von Personen mit einem hohen Zöliakierisiko zu untersuchen. Hierzu sollte humanes rekombinantes Antigen in einem sensitiven Nachweissystem umgesetzt werden. Im ersten Schritt wurde die humane Transglutaminase kloniert und durch in vitro Transkription/Translation als [<sup>35</sup>S]-Methionin markiertes Antigen exprimiert. Nach Bestätigung der korrekten Expression und Antikörperbindung in der Autoradiographie wurden IgA- und IgG-spezifische sowie ein kombinierter IgA/IgG-Radioimmunoassay für den Nachweis der Antikörper gegen die Gewebs-Transglutaminase (TG-Ak) entwickelt, die einen äußerst niedrigem Serumproben- und Substratbedarf aufweisen. Die Cut-offs der Assays wurden mittels ROC-Plot Analyse nach Testung von 45 Patienten mit manifester Zöliakie und 574 gesunden Kontrollpersonen bei 9,0 Units (U) für den kombinierten Test und 8,3 bzw. 7,9 Units für den IgA- bzw. IgG-spezifischen Test festgelegt. Zum Vergleich mit etablierten Tests wurden Endomysium-Antikörper (EmA) mit einem indirekten Immunfluoreszenztest und Antigliadinantikörper (AGA) mit einem Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, daß TG-Ak sehr sensitiv und spezifisch für eine Zöliakie sind. 43 (95,5%) der bioptisch gesicherten Zöliakiepatienten wiesen TG-Ak in allen Testungen auf. In der Kontrollpopulation waren 3 (0,52%) Seren schwach Ak-positiv (9,9-14,3 Units). Somit weist der Test eine diagnostische Sensitivität von 95,5% bei einer Spezifität von 99,5% auf. Junge Patienten (2-10 Jahre) zeigten mit  $90,1 \pm 17,0$  U signifikant höhere TG-Ak-Spiegel als alte Patienten (51-70 Jahre) ( $50,8 \pm 26,3$  U; Daten für den kombinierten Test). Dagegen bestand kein signifikanter Unterschied zwischen männlichen ( $68,9 \pm 29,3$  U) und weiblichen ( $76,8 \pm 31,0$  U) Patienten. Bei weiteren 30 EmA-positiven Patienten, die klinische Symptome einer Zöliakie ohne bioptische Sicherung des Verdachts zeigten, wurden in allen Fällen TG-Ak (100%) detektiert. Die Mehrzahl (91,1%) der Zöliakiepatienten war EmA-positiv. Gliadinantikörper waren in 91,4% der getesteten Seren nachweisbar. In 80% der Seren waren alle 3 Antikörperspezifitäten nachweisbar.

Für die Bestimmung des Stellenwertes der TG-Ak in der Immundiagnostik von Patienten mit einem erhöhten Auftreten einer stillen oder latenten Zöliakie wurden 305 frisch manifestierte Typ 1 Diabetiker im kombinierten IgA/IgG-TG-Ak-Test untersucht. Die Prävalenz der Antikörper betrug bei 12 positiven Patienten 3,9% in der Gesamtpopulation. Die 12 TG-Ak-positiven Patienten waren mit einem Alter von 2-17 Jahren ( $8,3 \pm 4,6$  Jahre) signifikant jünger als die 293 TG-Ak-negativen Diabetiker ( $19,0 \pm 14,5$  Jahre). EmA waren in 11 der 12 TG-Ak-positiven Seren nachweisbar. Bei einer im kombinierten TG-Ak-Test positiven Patientin konnten im IgA-spezifischen Assay sowie bei der Testung auf EmA keine Antikörper nachgewiesen werden. Nach weiterer Abklärung wurde die Diagnose eines vorher unbekanntem selektiven IgA-Mangels gestellt.

Um die Bedeutung der TG-Antikörper für die Identifizierung von Patienten mit latenter oder stiller Zöliakie weiter zu klären, wurden die TG-Ak-positiven Typ 1 Diabetiker einer Dünndarmbiopsie unterzogen. Bei 6 (85,7%) von 7 Biopsien konnte ein Befund erhoben werden, der mit einer Zöliakie vereinbar war. Die Symptome der Patienten waren unspezifisch und nicht diagnoseweisend.

Bei 130 Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen waren in keinem Fall TG-Ak nachweisbar, bei Patienten mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises waren 4 von 111 (3,6%) Seren schwach positiv (mittlerer Titer  $15,9$  U).

Die ermittelten Prävalenzen der einzelnen Autoantikörper in den verschiedenen Patientengruppen demonstrieren, daß TG-Ak eine ähnlich hohe Sensitivität und Spezifität wie die EmA für eine manifeste oder latente Zöliakie besitzen. Allerdings besitzen die TG-Ak im Vergleich zu den EmA entscheidende Vorteile als primäres Screeningverfahren in der Zöliakiediagnostik. Die Bestimmungsmethode ist einfach und schnell durchzuführen und liefert quantitative Ergebnisse. Dies ist insbesondere für die Testung großer Populationen von Vorteil, wobei ferner durch den Einsatz der kombinierten Testung auch Patienten mit einem selektiven IgA-Mangel erfaßt werden können. Durch die quantitative Meßmethode ist nach Einführung eines Standardserums ein Vergleich von Ergebnissen verschiedener Labors möglich und eine Verlaufsbeobachtung mit eventueller Abnahme der Titer unter Therapie einfacher durchführbar als bisher. Die vorliegende Studie zeigt somit, daß durch eine Bestimmung der TG-Ak die Immundiagnostik der Zöliakie deutlich vereinfacht und verbessert werden kann.