

**Aus der Klinischen Abteilung
des Deutschen Diabetes-Forschungsinstituts
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitäts-Professor Dr. Werner A. Scherbaum**

**Humorale Immunantwort gegen Gluten bei Patienten
mit Typ-1-Diabetes mellitus bei Manifestation im
Erwachsenenalter**

Dissertation

**Zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine –Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Helene Kempf

(2004)

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

gez.: Univ.-Professor Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan

Referent: Prof. Dr. Kolb

Korreferent: Prof. Dr. vom Dahl

<u>Inhaltsverzeichnis</u>		Seite
<u>1. Einleitung</u>		
1.1	Allgemeines über Diabetes; Typ-1-Diabetes versus Typ-2-Diabetes	1
1.2	Ätiopathogenese des Typ-1-Diabetes	3
1.3	Epidemiologische Aspekte des Typ-1-Diabetes	6
1.4	Genetische Faktoren in der Entwicklung des Typ-1-Diabetes	7
1.5	Tiermodelle des Typ-1-Diabetes	7
1.6	Umweltfaktoren in der Pathogenese des Typ-1-Diabetes	9
	1.6.1 Diätetische Beeinflussung der Inzidenz des Typ-1-Diabetes in den Tiermodellen und beim Menschen	10
	1.6.1.1 Milch als diabetogener Nahrungsbestandteil	10
	1.6.1.2 Gluten als diabetogener Nahrungsbestandteil	13
1.7	Zöliakie-die glutensensitive Enteropathie	15
1.8	Assoziation zwischen Typ-1-Diabetes und Zöliakie	18
1.9	Problemstellung	20
 <u>2. Material und Methoden</u>		
2.1	Material	
	2.1.1 Geräte	22
	2.1.2 Verbrauchsmaterial	23
	2.1.3 Chemikalien	25
	2.1.4 Puffer und Substratlösungen	27
	2.1.4.1 Puffer und Substratlösungen für Gluten-ELISA	27
	2.1.4.2 Puffer und Substratlösungen für Gluten-Western Blot	29
	2.1.5 Patienten- und Kontrollseren	33
	2.1.6 Weizen-Gluten-Extrakt (WGE)	35
2.2	Methoden	
	2.2.1 ELISA	
	2.2.1.1 Beschreibung des Testprinzips	37
	2.2.1.2 Gluten-ELISA	39

2.2.1.3 Vorversuche Gluten-ELISA	41
2.2.1.3.1 Antigenkonzentration	41
	Seite
2.2.1.3.2 Spezifität der Reaktion gegen Gluten Extrakt (WGE)	42
2.2.1.3.3 Serumverdünnungsreihe	43
2.2.1.4 Subklassen-ELISA	44
2.2.2 Western Blot	44
2.2.2.1 Beschreibung des Testprinzips	44
2.2.2.2 WGE-Western Blot	47
2.2.2.3 WGE-Western Blot-Vorversuche	50
2.2.2.3.1 Standardserum	50
2.2.2.3.2 Negativkontrolle	52
2.2.2.3.3 Protein-Leiter	52
2.2.3 Statistische Auswertung	53

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse WGE-ELISA	
3.1.1 Gesamt-IgG-ELISA	54
3.1.2 IgG-Subklassen-ELISA	59
3.2 Ergebnisse WGE-Western Blot	62
3.2.1 Western Blot	62
3.2.2 Vergleich der Serumreaktivität bei Patienten mit Typ-1-Diabetes und	71
Kontrollpersonen im Western Blot	
3.2.2.1 Vergleich anhand der Anzahl der Reaktionsbanden	71
3.2.2.2 Vergleich der Antikörperaktivität gegen einzelne Banden	73
3.2.2.3 Vergleich anhand der durchschnittlichen	76
IgG-Antikörper-Reaktivität (ECL-Aktivität)	
3.2.2.4 Verhältnis der IgG-Reaktivität im Bereich 33 und 38 kDa zur	78
Aktivität aller Banden	

<u>4. Diskussion</u>	Seite
4.1 Humorale Immunantwort gegen Gluten bei Patienten mit Typ-1-Diabetes	
4.1.1 Das Vorliegen der Antikörper gegen den Nahrungsbestandteil Gluten ist beim Menschen nicht pathologisch	80
4.1.2 Keine Unterschiede in der humoralen Immunantwort gegen Gluten bei Patienten mit Typ-1-Diabetes und Kontrollpersonen im ELISA	81
4.1.3 Keine Unterschiede in der IgG-Subklassen-Analyse zwischen Patienten mit Typ-1-Diabetes und Kontrollpersonen	83
4.2 Spezifität der humoralen Immunantwort gegen Gluten im Western Blot	84
4.2.1 Nachweis von individuellen Bandenprofilen ist mit Western Blot möglich	84
4.2.2 Western Blot als Nachweismethode für die humorale Immunantwort gegen Glutenbestandteile und Interpretation der Western Blot Ergebnisse	85
4.3 Assoziation zwischen der Ätiopathogenese des Typ-1-Diabetes und Gluten	90
<u>5. Zusammenfassung</u>	92
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	93

Abkürzungsverzeichnis:

AK	Antikörper
AS	Aminosäure
BB	Bio Breeding
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbant-Assay
GAD	Glutaminsäuredecarboxylase
HLA	Human Leucocyte Antigen
IA-2	Insulinoma associated antigen 2
IAA	Insulin Autoantikörper
ICA	Islet Cell Antibody
IDDM	Insulin Dependent Diabetes Mellitus
Ig	Immunoglobulin
MHC	Major Histocompatibility Complex
NK	Negativkontrolle
NOD	Non obese diabetic
Delta OD	Delta optische Dichte
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
WGE	Weizen-Gluten-Extrakt

1. Einleitung

1.1

Allgemeines über Diabetes mellitus;

Typ-1-Diabetes versus Typ-2-Diabetes

Der Begriff Diabetes mellitus umfasst chronische Stoffwechselkrankheiten mit verminderter Insulinbildung und/oder Insulinwirkung. Gemeinsames Leitsymptom bei unbehandelten Patienten ist die chronische Hyperglykämie (Blutglukosewerte von über 110 mg/dl im nüchternen Zustand bzw. 200 mg/dl nach einer Mahlzeit). Die Diabeteshäufigkeit in der deutschen Bevölkerung beträgt mindestens 4 %. Bei schlechter Stoffwechseleinstellung entwickelt sich bei genetischer Prädisposition ein sogenanntes diabetisches Spätsyndrom, zu dem diabetische Retinopathie, koronare Herzerkrankung, diabetische Nephro-, Neuro- und Polyneuropathie sowie einige andere Komplikationen gehören.

Typ-1-Diabetes mellitus

Trotz der Erkenntnis, dass Typ-1-Diabetes ein Ergebnis der selektiven Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas ist, sind die Ätiologie und die einzelnen Sequenzen der Pathogenese noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Erkrankung manifestiert sich am häufigsten im ersten und zweiten Lebensjahrzehnten und wurde früher häufig als jugendlicher Typ des Diabetes bezeichnet. Diese Bezeichnung ließ sich aber nicht aufrechterhalten, da diese Form sich auch im späteren Alter manifestieren kann.

Das erbliche Risiko an einem Typ-1-Diabetes zu erkranken, kann nach den vorliegenden Daten als polygenetisch angesehen werden. Die Angaben über die Konkordanzraten bei eineiigen Zwillingen sind nicht ganz einheitlich: so liegen sie nach einigen Untersuchern bei 30-50 % (PALMER & MCULLOH 1991), nach anderen bei 13-33% (BARNETT et al. 1981, KAPRIO et al. 1992). Nur ein relativ kleiner Anteil (10%) der zum Typ-1-Diabetes genetisch prädisponierten Individuen entwickelt überhaupt das klinische Bild des Typ-1-Diabetes mellitus (ZIEGLER & HUMMEL 2001).

Eine gut untersuchte Hauptrisikogruppe sind erstgradige Verwandte von Personen mit Typ-1-Diabetes. Das Risiko in dieser Gruppe beträgt etwa 5% und ist um den Faktor zehn gegenüber der Allgemeinbevölkerung (0,3-0,5%) erhöht (ATKINSON & MACLAREN 1994).

Durch den absoluten Insulinmangel steigen die Glukosewerte im Blut und führen zu typischen klinischen Symptomen wie Durst, große Urinmengen, Gewichtsabnahme und Leistungsschwäche. Die Behandlung der Erkrankung erfolgt obligat mit Insulin.

Typ-2-Diabetes mellitus

Bei Typ-2-Diabetes mellitus handelt es sich um eine Erkrankung, die durch die Kombination von Insulinresistenz der peripheren Gewebe (Muskelgewebe, Fettgewebe) und gestörter Insulinsekretion der β -Zellen des Pankreas entsteht. Die Patienten sind meist älter als 40 Jahre und gewöhnlich übergewichtig. Im Anfangsstadium ist Typ-2-Diabetes symptomlos und wird in der Regel bei einer routinemäßigen Blutuntersuchung festgestellt. Die Entstehung ist multifaktoriell, die einzelnen Entstehungsmechanismen sind aber noch nicht geklärt.

Typ-2-Diabetes kommt häufig in Kombination mit Hyperlipoproteinämie, arterieller Hypertonie und Adipositas vor. Diese Syntropie wird als *metabolisches Syndrom* bezeichnet, welches mit einem stark erhöhten Risiko für eine koronare Herzkrankheit einhergeht.

Die dem metabolischen Syndrom zugrunde liegende pathophysiologische Störung ist wahrscheinlich eine genetisch determinierte Insulinresistenz, die durch Hyperinsulinämie zunächst kompensiert wird. Erst im Verlauf von mehreren Jahren manifestiert sich die diabetische Stoffwechselstörung, oft zusammen mit bereits bestehenden kardiovaskulären Komplikationen. Es liegen auch Hinweise auf eine chronische Aktivierung des unspezifischen Immunsystems als pathogenetische Grundlage des metabolischen Syndroms und der kardiovaskulären Erkrankung vor (DUNCAN & SCHMIDT 2001).

Die Therapie hängt vom Stadium und anderen Faktoren ab. Es besteht die Möglichkeit sowohl der medikamentösen (orale Antidiabetika, Insulin) als auch der nichtmedikamentösen (Bewegung, Diät) Therapie. Bei den meisten Typ-2-Diabetikern kommt es im Verlauf der Erkrankung zu einer progredienten Erschöpfung der β -Zellfunktion mit Insulinmangel und nachfolgender medikamentöser Insulinpflichtigkeit.

Differentialdiagnose

Das klinische Bild bildet die Grundlage der Differentialdiagnose zwischen Typ-1- und Typ-2-Diabetes mellitus. Die Abgrenzung kann, insbesondere bei Vorliegen einer Spätmanifestation

des Typ-1-Diabetes, schwierig sein. In diesem Fall ist die Diagnose mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Bestimmung von Autoantikörpern gegen Bestandteile der β -Zellen möglich, die nur bei Patienten mit Typ-1-Diabetes entstehen.

1.2

Ätiopathogenese des Typ-1-Diabetes

Der Typ-1-Diabetes gilt als eine Autoimmunerkrankung, deren pathologisches Korrelat die Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen ist (ATKINSON & MACLAREN 1994, YOON & JUN 2001). Durch die Untersuchungen an beiden Tiermodellen des Typ-1-Diabetes, der NOD-Maus und der BB-Ratte konnte eine autoimmune Genese der Erkrankung gestützt werden (YOON & JUN 2001).

Ein weiteres wichtiges Argument für die autoimmune Genese der Erkrankung ist die Verlangsamung des Krankheitsverlaufes durch Immunsuppressiva-Gabe oder auch durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern (LUDVIGSSON et al. 1983, LESLIE et al. 1985, VIALETTE et al. 1991, SKYLER et al. 1993, YILMAZ et al. 1993). Die Ursache des Typ-1-Diabetes mellitus beim Menschen ist bis heute nicht genau bekannt (ATKINSON & MACLAREN 1994).

Eine Hypothese der Immunpathogenese ist die sogenannte Trigger-Theorie. Auf dem Boden einer genetischen Disposition wird die autoimmune Reaktion gegen β -Zellen über einen oder mehrere Zusatzfaktoren oder Trigger in Gang gebracht. Zu diesen Triggerfaktoren gehören wahrscheinlich auch Umweltfaktoren wie Ernährung, virale Erkrankungen und andere Faktoren. Die Trigger-Hypothese wird durch Untersuchungen bei der NOD-Maus und der BB-Ratte unterstützt (LUPPI & TRUCCO 1999, THOMAS & KAY 2000).

Die Inselorganzerstörung führt in einem relativ späten Stadium zu einer Manifestation des Typ-1-Diabetes. Aus den Untersuchungen mit der NOD-Maus ist bekannt, dass bis zu 80-90% der β -Zellmasse zerstört sein müssen, bevor es zu einer klinischen Manifestation der Erkrankung kommt (DELOVITCH & SING 1997).

An der Pathogenese des Typ-1-Diabetes scheinen β -Zellautoantigene, Makrophagen, dendritische Zellen und auch B- und T-Lymphozyten beteiligt zu sein. Makrophagen und/oder dendritische Zellen als Zellen des unspezifischen Immunsystems sind die ersten Immunzellen,

die die Langerhansschen Inseln infiltrieren und zur sogenannten Insulitis führen. Die Makrophagen spielen dabei die entscheidende Rolle in der Entwicklung und Aktivierung der β -zellspezifischen zytotoxischen T-Zellen (KOLB 1999). Die B-Lymphozyten spielen wahrscheinlich eine Rolle als antigenpräsentierende Zellen (APC-Zellen) (LUPPI & TRUCCO 1999). Die zytotoxischen T-Zellen sind das Endstück dieser Zerstörungskaskade, in der die aktivierten Makrophagen, die T-Zellen und die von ihnen freigesetzten Zytokine synergistisch wirken (YOON & JUN 2001). KUKREJA et al. weisen darauf hin, dass auch ein Zusammenspiel von kleineren T-Zelldefekten möglicherweise zur Autoimmunität gegen insulinproduzierende β -Zellen des Pankreas beiträgt (KUKREJA et al. 2002).

Es gibt zunehmend Hinweise auf die Assoziation der Typ-1-Diabetes-Ätiopathogenese mit dem Ungleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Immunantwort und einer Fehlsteuerung des Immunsystems (KATZ et al. 1995, ROEP 1996, ROEP et al. 1996, KUKREJA et al. 2002). Dabei scheint die Th1-Immunantwort Typ-1-Diabetes zu vermitteln, während die Th2-Immunantwort die protektive Rolle zu spielen scheint (ZIEGLER & BONIFACIO 2000). Die Vermittlung erfolgt dabei durch die spezifischen Zytokine. Diese Assoziation wurde von RAPOPORT et al. 1993 bei NOD-Mäusen nachgewiesen (RAPOPORT et al. 1993).

Bei der NOD-Maus werden zwei verschiedene Phasen der Insulitis beobachtet. Bei der sogenannten benignen Insulitis überwiegen die Th2-Zellen und ihr Sekretionsprodukt Interleukin-4, die β -Zellen bleiben aber intakt. Im Falle der destruktiven Insulitis dominieren die Th1-Zellen und spezifische sowie unspezifische inflammatorische Komponenten des Immunsystems werden aktiviert (KATZ et al. 1995).

KALLMANN et al. wiesen eine erhöhte Produktion der Th1-Zytokine IFN- γ und TNF- α bei Patienten mit Typ-1-Diabetes nach. Damit wurde zum ersten Mal die systemische Dominanz der Th1-Antwort als Ausdruck einer gestiegenen zellulären Immunantwort gezeigt (KALLMANN et al. 1997).

Wenn die Rolle der einzelnen Immunsystemkomponenten im Th1/Th2-Gleichgewicht besser verstanden würde, bestünden auch Ansätze zum Eingreifen in den Immunprozess, der die Zerstörung der β -Zellen herbeiführt (KATZ et al. 1995, KOLB 1997).

Eine neuere Untersuchung von KARLSSON et al. weist eine übermäßige Produktion des Th1-typischen Zytokins Interferon- γ durch die peripheren mononukleären Zellen der Kinder mit einem hohen Typ-1-Diabetes-Risiko nach. Er interpretiert dieses Ergebnis als eine Th1-dominierte Immunantwort in der prädiabetischen Phase (KARLSSON et al. 2000).

Weiterhin konnten im Blut von Patienten mit Typ-1-Diabetes gegen β -Zellen gerichtete Autoantikörper nachgewiesen werden (BINGLEY et al. 1994, DITTLER et al. 1998).

Die etablierten molekular definierten Typ-1-Diabetes-Marker sind Insulinautoantikörper (IAA), Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase (GAD) und Tyrosinphosphatase IA-2. Da diese vor der klinischen Manifestation der Erkrankung nachweisbar sind, können sie zur Risikoabschätzung der Erkrankung vor der klinischen Manifestation verwendet werden (SCHMID & ZIEGLER 2001).

SCHMID & ZIEGLER empfehlen ein Screening zur Früherkennung bei Verwandten von Typ-1-Diabetes-Patienten ab dem 2. Lebensjahr mit einer kombinierten Testung der Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase, Tyrosinphosphatase IA-2 bzw. GAD und Insulin. Damit wäre eine Diabetesprädiaktion von 85% möglich. Bei den nichtverwandten Risikogruppen (z.B. Personen mit Zöliakie und anderen Autoimmunerkrankungen) gibt es noch keine Screeningempfehlung (SCHMID & ZIEGLER 2001, BINGLEY et al. 2001).

Die pathogenetische Rolle der Autoantikörper gegen Insulin, GAD und IA-2, die sich für die Diagnostik der Erkrankung etabliert haben, ist zurzeit nicht geklärt. In diesem Zusammenhang ist auch unklar, ob die Autoantikörper nur ein Epiphänomen im Rahmen der Pathogenese des Typ-1-Diabetes anzeigen, oder ob sie kausal daran beteiligt sind (ZIEGLER & HUMMEL 2001, YOON & JUN 2001).

Aufschluss über diese und viele anderen Fragen können die prospektiven Studien bei Typ-1-Diabetes-Risikokollektiven, wie die seit elf Jahren laufende deutsche BABYDIAB-Studie, geben.

Bisher sind in Deutschland über 1600 Kinder bei ihrer Geburt aufgenommen worden. Alle haben mindestens ein Elternteil, das an Typ-1-Diabetes erkrankt ist. Im Alter von neun Monaten sowie von zwei, fünf, elf und vierzehn Jahren werden die Kinder routinemäßig untersucht (ZIEGLER & HUMMEL 2001).

Die Studie untersucht prospektiv den Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Inselzellautoimmunität und genetischen sowie Umweltfaktoren. Dabei wurde bei den Nachkommen der Patienten mit Typ-1-Diabetes HLA-Typ-abhängig ein unterschiedlich hohes Risiko festgestellt, diabetesassoziierte Antikörper zu entwickeln. Die Kinder mit den HLA-Genotypen DR3/4 oder DR4/4 haben bereits vor dem 3. Lebensjahr etwa zehnmal häufiger positive Inselautoantikörper als Kinder ohne diese Haplotypen.

In einer Folgestudie sollen die festgestellten Hochrisikogenotypen (DR3/4 (DQ B1*57 non-Asp) und DR 4/4 (DQ B1*57 non-Asp)) engmaschig auf die Entstehung und den Verlauf der

Inselautoantikörper in den ersten drei Lebensjahren untersucht werden (ZIEGLER & HUMMEL 2001, SCHENKER et al. 1999).

Mit der Studie soll auch geklärt werden, ob Umweltfaktoren, die in den ersten beiden Lebensjahren einwirken, für die Dysregulation des Immunsystems und die Entstehung von Typ-1-Diabetes mellitus bei genetisch prädisponierten Personen verantwortlich sind (ZIEGLER & HUMMEL 2001).

Ergänzend wurde die BABYDIET-Studie gestartet. Das Ziel dieser Studie ist es, durch Modifizierung der Ernährung (u.a. mit glutenfreier Ernährung) die Initialisierung des Autoimmunprozesses zu verhindern und damit die Entwicklung des Typ-1-Diabetes in den ersten zwei Lebensjahren zu vermeiden (ZIEGLER & HUMMEL 2001).

1.3

Epidemiologische Aspekte des Typ-1-Diabetes

Die Prävalenz der Erkrankung in der Bevölkerung ist insgesamt niedrig (<1%). Die Inzidenz zeigt geographische Unterschiede. In Europa besteht die niedrigste Inzidenz in Mazedonien (3,2 pro 100.000 und pro Jahr) und die höchste in Finnland (35,3 pro 100.000 und pro Jahr). Weltweit gilt die niedrigste Inzidenz für den asiatischen Raum (0,5 pro 100.000 Einwohner und pro Jahr) und die höchste ebenfalls in Finnland (SERRANO-RIOS et al. 1999, MUNTONI & MUNTONI 1999).

Insgesamt wird ein Anstieg der Inzidenz des Typ-1-Diabetes weltweit beobachtet. Dieses zeigt sich sowohl in den Populationen mit einer hohen, als auch mit einer niedrigen Inzidenz. ONKAMO et al. prognostizieren eine 40% höhere Inzidenz im Jahre 2010 als im Jahre 1998 weltweit (ONKAMO et al. 1999).

Ausserden belegen die Migrationsstudien, dass Menschen die Diabetesinzidenz des Einwanderungslandes erwerben. Dies ist wiederum ein Argument für die Beteiligung der Umweltfaktoren an der Diabetespathogenese (AKERBLOM & KNIP 1998).

1.4

Genetische Faktoren bei der Entwicklung des Typ-1-Diabetes

Beim Vergleich der Erkrankungswahrscheinlichkeiten für Typ-1-Diabetes von Verwandten ersten Grades zeigt sich, dass monozygote Zwillinge häufiger als dizygote Zwillinge, als HLA-identische Geschwister oder als nicht-HLA-identische Geschwister erkranken (BARNETT et al. 1981, TILLIL & KOBBERLING 1987, OLMOS et al. 1988).

Die Assoziation des Typ-1-Diabetes mit dem Major Histocompatibilitätskomplex (MHC) kann weiterhin als gesichert angesehen werden. In erster Linie kommen dabei die HLA-Klasse-2-Antigene (HLA-DR 3, 4) in Betracht (WOLF et al. 1983).

Insgesamt liegen diese HLA-Antigene bei Patienten mit Typ-1-Diabetes mit 95% deutlich häufiger als in der Normalbevölkerung vor. Die stärkste Assoziation besteht mit HLA-DQ-Antigenen (TODD et al. 1987).

Im Rahmen der bevölkerungsspezifischen Untergruppenanalysen der MHC-Klasse-2-Antigene konnten sowohl positiv als auch negativ assoziierte HLA-Antigene (sog. „protektive“ Antigene) nachgewiesen werden (OLMOS et al. 1988, OWERBACH & GABBAY 1996). Klasse-2-HLA-Gene in der HLA-D-Region kodieren die Zell-Oberflächenmoleküle, die wiederum Antigene binden und den T-Zellen präsentieren. Sie scheinen damit eine Rolle in der Pathogenese der Erkrankung zu spielen.

Anhand der Ergebnisse der Zwillingsforschung gehen OLMOS et al. aber auch von einer wichtigen Rolle der nichtgenetischen Faktoren in der Pathogenese der Erkrankung aus (OLMOS et al. 1988), so dass zusätzlich Umweltfaktoren an der Ätiopathogenese beteiligt sein müssen (MUNTONI et al. 2000, LUPPI & TRUCCO 1999).

1.5

Tiermodelle des Typ-1-Diabetes

Beim Menschen ist es nur schwer möglich, die präklinische Phase des Typ-1-Diabetes invasiv (histologische Untersuchungen der Pankreasproben) zu untersuchen. Daher war es von großer Bedeutung, die unterschiedlichen Aspekte der Erkrankung in den Tiermodellen des spontanen Typ-1-Diabetes mellitus zu erforschen.

Die beiden Tiermodelle des Typ-1-Diabetes sind die BB(Bio Breeding)-Ratte und die NOD (non obese diabetic)-Maus (BACH & BOITARD 1987).

Nach der Erstbeschreibung der NOD-Maus durch MAKINO et al. im Jahre 1981 erlangte dieser Inzuchtstamm eine grosse Bedeutung aufgrund der Eigenschaft, spontan einen autoimmunen Diabetes zu entwickeln (MAKINO et al. 1981, DELOVITCH & SING 1997, THOMAS & KAY 2000). Dieses Charakteristikum der NOD-Maus unterliegt einer komplexen genetischen Kontrolle, die zusätzlich durch Umweltfaktoren moduliert wird.

Während alle Tiere synchron im Alter von drei bis vier Wochen erste Zeichen einer Insulinitis aufweisen, entwickelt sich ein manifester Diabetes nur bei einem Teil der Tiere, und zwar in einem ganz unterschiedlichen Alter (BACH & MATHIS 1997, DOTTA & EISENBARTH 1989).

Die genetische Prädisposition, einen insulinpflichtigen Diabetes zu entwickeln, wird hauptsächlich durch den Histokompatibilitätskomplex bestimmt (KIKUTANI & MAKINO 1992). Sowohl der Mangel an I-E (homolog dem menschlichen HLA-DR), als auch die Expression eines bestimmten I-A β -Lokus (His an Position 56, Ser an Position 57; homolog des menschlichen „diabetogenen“ HLA-DQ β -non-Asp an Position 57) sind mit einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit assoziiert (TODD et al. 1987).

Ein weiteres Tiermodell des Typ-1-Diabetes ist die BB (Bio-Breeding) Ratte. Obwohl an der autoimmunen Auslösung der Krankheit auch in diesem Modell kaum Zweifel bestehen, sind die genauen Ursachen der selektiven β -Zellzerstörung weiterhin unbekannt (MARLISS 1983). Analog zur NOD-Maus besteht auch bei der BB-Ratte ein genetischer Hintergrund, einen autoimmunen Diabetes zu entwickeln (PRUD'HOMME et al. 1985). Besonders prädisponiert sind MHC Haplotyp *RT1u* homozygote Ratten (COLLE et al. 1981).

Trotz des identischen genetischen Hintergrundes erkranken nur 30-90 % der Ratten an einem insulinpflichtigen Diabetes. Auch in diesem Tiermodell könnten Umwelteinflüsse an der Pathogenese der Erkrankung ursächlich mitbeteiligt sein (NAJI et al. 1985). Da Viren keinen gesicherten Effekt auf die Inzidenz des Typ-1-Diabetes der BB-Ratte haben (LIKE 1990), rückten auch bei der BB-Ratte Nahrungsbestandteile in den Mittelpunkt des Interesses (SCOTT 1996 b).

1.6

Umweltfaktoren bei der Pathogenese des Typ-1-Diabetes

Zu den Umweltfaktoren, die die Entstehung und Entwicklung des Typ-1-Diabetes beeinflussen sollen, gehören bestimmte Nahrungsbestandteile (Weizen, Soja, Milch), Infektionen durch Viren sowie ein Einfluss bestimmter toxischer Substanzen wie Streptozotocin, Nitrosamine, Nitrit und Schwermetalle (LIKE & ROSSINI 1976, KOLB 1987, VIRTANEN et al. 1994, KOSTRABA et al. 1992, PARSLOW et al. 1997, ECKHARDT et al. 1999).

Nach AKERBLOM & KNIP sind folgende Umweltfaktoren möglicherweise an der Immunpathogenese der Erkrankung beteiligt:

a) Nahrungsbestandteile bzw. Ernährungsfaktoren:

- Kuhmilchproteine (Casein, bovines Serumalbumin, β -Lactoglobulin, bovines Insulin)
- Gluten, Soja und andere Pflanzenproteine
- Fette
- Nitrate und Nitrite
- Kaffee, Tee
- Zinkmangel
- Vitamin D-Mangel (EURODIAB-Studie, 2000)
- Häufige Aufnahme protein- und kohlenhydratreicher Kost

b) Virale Infektionen:

- Mumps
- Rubella
- Zytomegalie
- Enteroviren
- Retroviren
- Rotavirus (HONEYMAN et al. 2000)

c) Impf- und Hygienestandards (KOLB & ELLIOT 1994)

d) Toxine:

- Alloxan
- Streptozotocin
- Nitrate, Nitrite

- e) Psychosoziale Faktoren
- f) Klima
- g) Prä- und perinatale Risikofaktoren (AKERBLOM & KNIP 1999).

1.6.1

Diätetische Beeinflussung der Inzidenz des Typ-1-Diabetes in den Tiermodellen und beim Menschen

Trotz der erwiesenen genetischen Determinanten in der Pathogenese des Typ-1-Diabetes mellitus ist eine bestimmte genetische Konstellation nicht ausreichend, um die Erkrankung zu entwickeln.

Es liegen überzeugende Ergebnisse vor die zeigen, dass die Entwicklung des spontanen Diabetes bei BB-Ratten und NOD-Mäusen, die die Tiermodelle des humanen Typ-1-Diabetes darstellen, zum großen Teil nahrungsabhängig ist. In erster Linie wurde diese Assoziation von SCOTT et al. nachgewiesen (SCOTT et al. 1983, 1985, 1988a, 1988b, 1989, 1994, 1996 a, 1996 b, 1997). Auch Untersuchungen anderer Wissenschaftler belegen den Zusammenhang (ELLIOT & MARTIN 1984, DANEMAN et al. 1987, ISSA-CHERGUI et al. 1988, ATKINSON et al. 1988, LEFKOWITH et al. 1990, HOORFAR et al. 1991, HOORFAR et al. 1992).

1.6.1.1

Milch als diabetogener Nahrungsbestandteil

Kuhmilch bzw. Ersatzmittel auf Kuhmilchbasis stehen seit längerem im Verdacht, die Entwicklung von Typ-1-Diabetes und einigen anderen immunsystemvermittelten Erkrankungen zu begünstigen. Die Rolle von Milchproteinen wird auch in der Ätiologie der multiplen Sklerose und der rheumatoider Arthritis diskutiert (HANGLOW et al. 1985, MALOSSE et al. 1992).

Die meisten Studien über den Zusammenhang zwischen der Entwicklung von Typ-1-Diabetes und dem Ernährungsfaktor Milch beziehen sich beim Menschen auf ein frühes Lebensalter von etwa sechs Monaten (BORCH-JOHNSEN et al. 1984, KARJALAINEN et al. 1992). Die Daten wurden zum Großteil in retrospektiven Fall-Kontroll-Studien oder epidemiologischen Untersuchungen erhoben (SCOTT 1990, NORRIS & SCOTT 1990).

BORCH-JOHNSEN et al. zeigten 1984 erstmals, dass eine negative Assoziation zwischen der Dauer der Stillzeit und der Diabetesinzidenz besteht (BORCH-JOHNSEN et al. 1984). Auf der anderen Seite wurde eine positive Assoziation zwischen Kuhmilchproteinaufnahme und der Diabetesinzidenz festgestellt (SCOTT 1990, DAHL-JORGENSEN et al. 1991, FAVA et al. 1994).

In der Folge zeigten diverse retrospektive Fall-Kontroll-Studien widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Bedeutung einer frühen Ernährung mit Kuhmilchprodukten bei genetisch prädisponierten Individuen (WASMUTH & KOLB 2000).

Zwei Metaanalysen der wichtigen Studien zeigten aber: Kinder, die mit Kuhmilch bis zum Alter von 3 Monaten ernährt wurden, wiesen ein erhöhtes Diabetesrisiko auf (GERSTEIN 1994, NORRIS & SCOTT 1990).

Gegen alle wichtigen Kuhmilchproteine konnte man bei frisch manifesten Patienten mit Typ-1-Diabetes Antikörper feststellen (SAVILAHTI et al. 1988, DI MARIO et al. 1988, DAHLQUIST et al. 1992, VIRTANEN et al. 1994, KROKOWSKI et al. 1995, ELLIOT et al. 1996, SAUKKONEN et al. 1998), aber nur eine Studie konnte eine hohe Spezifität der Antikörper gegen bovines Serumalbumin (BSA) bei Diabetekern nachweisen (KARJALAINEN et al. 1992). Allerdings wurde dieses Ergebnis später von LÜHDER et al. in Frage gestellt (LÜHDER et al. 1994).

Es zeigten sich außerdem erhöhte Antikörpertiter gegen Kuhmilchproteine bei Patienten mit selektivem IgA-Mangel (BUCKLEY & DEES (1969) und Zöliakie (FERGUSON (1977), die beide mit DQ 2 (A1* 0501, B1* 0201) assoziiert sind (HAMMARSTRON & SMITH 1983, SAUKKONEN et al. 1996).

Ein möglicher Mechanismus der Beeinflussung durch Kuhmilch ist wie auch bei der vermuteten viralen Beteiligung (s.o.) eine immunologische Kreuzreaktion (molekulare Mimikry) zwischen Kuhmilchproteinen und Autoantigenen der β -Zellen. Einige Sequenzähnlichkeiten der genannten Strukturen wurden bereits identifiziert (KOLB & POZZILLI 1999).

Eine andere Hypothese beinhaltet die Kreuzreaktivität zwischen β -Zellantigenen und bovinem Insulin aus der Kuhmilch. VAARALA zeigte, dass Kinder, die früh mit Ersatznahrung auf Kuhmilchbasis ernährt wurden, erhöhte Antikörpertiter gegen bovines Insulin haben (VAARALA et al. 1998, VAARALA et al. 1999).

In den letzten Jahren wurde die Auswirkung der Kuhmilchernährung auf die Diabetesentwicklung mit Hilfe der beiden Tiermodelle BB-Ratte und NOD-Maus genauer untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Vermeiden von Kuhmilchproteinen in der Nahrung zu einer niedrigeren, umgekehrt die Zugabe von Kuhmilchproteinen zu einer erhöhten Diabetesinzidenz führt (ELLIOT & MARTIN 1984, SCOTT et al. 1985, ISSA-CHERGUI et al. 1988, ELLIOT et al. 1988, SCOTT 1996 b).

Diese widersprüchlichen Ergebnisse sowohl in den Untersuchungen bei den Tiermodellen, als auch beim Menschen, führen zu der Annahme, dass weitere Faktoren, die die Diabeteshäufigkeit beeinflussen, nicht berücksichtigt wurden (KOLB & POZZILLI 1999).

Es besteht außerdem ein Zusammenhang zwischen Diabeteshäufigkeit und der Stilldauer bzw. dem Stillen überhaupt. Muttermilch enthält zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren, die eine große Rolle in der Ausreifung des darmassoziierten Immunsystems spielen (SRIVASTAVA et al. 1996). Der Kuhmilch fehlen diese Faktoren in biologisch aktiver Form, so dass man dies als möglichen beeinflussenden Faktor in Betracht ziehen sollte (KOLB & POZZILLI 1999).

Da die Ergebnisse der retrospektiven Studien aufgrund vieler Faktoren nicht eindeutig zu interpretieren sind, sind prospektive Studien nötig, die den Zusammenhang zwischen der Stilldauer und der Ernährung mit Kuhmilch bzw. Ersatznahrung auf Kuhmilchbasis und der Diabetesinzidenz sowie dem Erscheinen diabetescharakteristischer Antikörper untersuchen (HUMMEL et al. 1998, COUPER et al. 1998, HARRISON & HONEYMAN 1999).

In der prospektiven Studie BABYDIAB konnte unabhängig vom HLA-Genotyp keine Assoziation zwischen der Stillzeit bzw. dem Stillen allgemein und der Inselautoimmunität bzw. manifesten Typ-1-Diabetes bei Kindern diabetischer Mütter gezeigt werden (HUMMEL et al. 2000).

Die Rolle der Kuhmilchproteine in der Ätiopathogenese des Typ-1-Diabetes mellitus ist damit nicht eindeutig geklärt und es liegen noch zusätzliche unbekannte Faktoren vor, die ebenfalls Einfluß nehmen (WASMUTH & KOLB 2000).

1.6.1.2

Gluten als diabetogener Nahrungsbestandteil

Neben verschiedenen Kuhmilchproteinen konnte in einem Tiermodell des autoimmunen Diabetes, der BB-Ratte, das Gluten als weiteres diabetogenes Nahrungsprotein identifiziert werden (HOORFAR et al. 1992, SCOTT 1996). Dabei zeigte sich, dass die wichtigsten diabetogenen Nahrungsbestandteile Weizen und Soja sind, während Milchproteine in diesem Tiermodell eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheinen.

Genauere Untersuchungen zur Bedeutung des Glutens konnten aufdecken, dass durch diabetogene Nahrungsbestandteile im Tiermodell BB-Ratte das Verhältnis von Th1- zu Th2-assoziierten Zytokinen im Pankreas zugunsten der Th1-Immunantwort verändert wird. Die Verabreichung einer Diät auf HC (hydrolysed casein)-Basis wirkte sich diabetesprotektiv aus. Es kam zu einer geringeren lymphozytären Infiltration der Inseln und zu einem veränderten Zytokinmuster mit dem Überwiegen der Th2-Immunantwort (SCOTT et al. 1997).

Bei Patienten mit Typ-1-Diabetes scheint die Immunbalance in Richtung Th1-Immunantwort verschoben zu sein (KALLMANN et al. 1997), so dass eine Assoziation zwischen Gluten und Typ-1-Diabetes auch in diesem Zusammenhang möglich erscheint.

Auch das Alter bei Beginn der Diät spielt hinsichtlich einer möglichen Diabetogenität von Gluten bei der BB-Ratte eine Rolle (besonders empfindlich reagierten die Tiere im Pubertäts- und frühen Erwachsenenalter), und auch der Anteil des Glutens an der Gesamtmenge der aufgenommenen Proteine im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Beziehung (SCOTT et al. 1997).

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei BB-Ratten höhere Antikörperkonzentrationen gegen Bestandteile des Glutens nachweisbar sind als bei Kontrolltieren, die keinen spontanen Diabetes entwickeln (SCOTT et al. 1989). Somit kann sowohl von quantitativen als auch von qualitativen Unterschieden der Immunantwort gegen Gluten bei den prädisponierten Tieren ausgegangen werden.

Auch bei der NOD-Maus zeigten FUNDA et al., dass eine glutenfreie Ernährung der Tiere zu einer geringeren Diabetes-Inzidenz führte als in einer Kontrollgruppe. Der Zeitpunkt der Diabetes-Manifestation lag bei den glutenfreiernährten Tieren später und es zeigte sich ein

geringerer Insulitisgrad in der histopathologischen Untersuchung der Langerhansschen Inseln (FUNDA et al. 1999).

HOORFAR et al. berichteten, dass Weizenmehl bei NOD-Mäusen unter Diäten mit Einzelproteinquelle die höchste Diabetes-Inzidenz hervorgerufen hat (HOORFAR et al. 1993).

In den beiden Tiermodellen des Typ-1-Diabetes konnte ein diabetogenes Potential der Diäten auf Weizen- bzw. Sojabasis nachgewiesen werden (SCOTT et al. 1988, SCOTT 1988, HOORFAR et al. 1991, HOORFAR et al. 1993, SCOTT 1994 und 1995). Die Diäten auf Aminosäurebasis wirkten sich auf die Diabetesentwicklung dagegen protektiv aus (SCOTT et al. 1988, SCOTT 1988, ELLIOT et al. 1988, SCOTT et al. 1989, HOORFAR et al. 1991, HOORFAR et al. 1993, SCOTT 1996).

JOHNSON et al. zeigten 1990 in einer Studie mit BALB/c-Mäusen, dass die Ernährung der Tiere mit Weizen sowohl die Spezifität, als auch die Menge der getreidespezifischen Antikörper im Serum beeinflusst. Das unterstreicht die Bedeutung der oralen Toleranz gegen Weizenproteine (JOHNSON et al. 1990).

Es gibt insgesamt weniger Untersuchungen beim Menschen zur Assoziation zwischen Gluten und Typ-1-Diabetes als z.B. zur Assoziation zwischen Kuhmilch und Typ-1-Diabetes. So konnte demonstriert werden, dass Patienten mit Typ-1-Diabetes im Vergleich zu relevanten Kontrollpersonen eine gesteigerte zelluläre Immunantwort gegen Gluten aufweisen (KLEMETTI et al. 1998). Insgesamt war diese Immunantwort aber bei beiden Gruppen niedrig, so dass nach Meinung der Autoren die T-zellvermittelte Immunität gegen Gluten keine wichtige Rolle in der Pathogenese des Typ-1-Diabetes zu spielen scheint. Zusätzlich sind andere Untersuchungen zur T-zellvermittelten Immunantwort gegen Gluten bei gesunden Kontrollen z.T. widersprüchlich (JENSEN et al. 1995, GJERTSEN et al. 1994, SIKORA et al. 1976, BAKER et al. 1995).

CATASSI et al. berichteten weiterhin, dass AGA (Anti-Gliadin-Antikörper) bei frisch manifesten Patienten mit Typ-1-Diabetes ohne villöse Atrophie erhöht waren und später im Verlauf der Erkrankung abnahmen (CATASSI et al.).

Um das Ausmaß der glutenassoziierten Autoimmunität bei Patienten mit Typ-1-Diabetes zu untersuchen, bestimmten LAMPASONA et al. die humorale Immunantwort (IgA- und IgG-Antikörper) gegen Transglutaminase C in drei Gruppen: frisch manifeste Patienten mit Typ-1-

Diabetes, Typ-2-Diabetiker und die Kontrollgruppe. Die Transglutaminase C, auch Tissue Transglutaminase C genannt, ist ein wichtiger Zöliakie-Autoantigen.

In dieser Untersuchung zeigten ca. zehn Prozent der Patienten mit Typ-1-Diabetes eine zöliakietytische Immunantwort und weitere 30% niedrige Antikörpertiter gegen die Transglutaminase C. Im Vergleich dazu waren bei nur zwei Prozent der Typ-2-Diabetiker und einem Prozent der Kontrollpersonen diese Antikörper nachweisbar. Die Autoren stellen zwei mögliche Erklärungen für die hohe Prävalenz dieser zöliakietytischen Antikörper bei Patienten mit Typ-1-Diabetes zur Diskussion. Entweder besteht eine Beteiligung der darmassoziierten Immunität bzw. des Darmes an der Pathogenese des Typ-1-Diabetes oder die Transglutaminase ist ein Autoantigen, das sekundär im Prozess der β -Zellzerstörung entstanden ist (LAMPASONA et al. 1999).

1.7

Zöliakie – die glutensensitive Enteropathie

Zöliakie, auch einheimische Sprue oder glutensensitive Enteropathie genannt, wird als permanente Intoleranz gegen Nahrungsgliadin, die alkohol-lösliche Proteinfraction des Glutens, definiert. Sie ruft eine Atrophie der Dünndarmmukosa und eine konsekutive Malabsorption bei Betroffenen hervor. Das schädliche Agens des Glutens bei der Zöliakie ist das α -Gliadin (MOWAT 2000). Die Zöliakie ist wahrscheinlich das Ergebnis der gestörten Homöostasemechanismen der oralen Toleranz, die normalerweise die Ausbildung einer Immunantwort gegen Nahrungsproteine verhindert (JOHNSON et al. 1990, MÄKI & COLLIN 1997, MOWAT & WEINER 1999, MACDONALD et al. 1999, KOLB & POZZILLI 1999, FEIGHERY 1999).

Der Manifestationszeitpunkt der Erkrankung ist nicht nur auf das Kindesalter beschränkt, sondern kann in jedem Alter auftreten. Histologisch liegt das Bild einer villösen Atrophie des Dünndarmes, einer Hyperplasie der Krypten und einer Lymphozyteninfiltration der Lamina propria vor. Die Zöliakie-Prävalenz in der Bevölkerung liegt bei etwa 1:500. Dabei zeigen sich deutliche regionale Unterschiede (FASANO & CATASSI 2001).

Die klassische (typische) Zöliakie manifestiert sich mit Durchfällen, Gewichtsverlust, Malabsorption mit Steatorrhö und mit klinischen Zeichen von Vitaminmangelsymptomen.

Neben der klassischen Zöliakie werden zunehmend atypische, stumme und latente Zöliakieformen beobachtet. Bei der atypischen Zöliakie stehen Symptome im Vordergrund,

die keiner gastrointestinalen Organmanifestation entsprechen. Bei den Patienten bestehen beispielsweise lediglich rezidivierende Bauchschmerzen, Leistungsschwäche, Eisenmangelanämie u.a. (ZIMMER 2001). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass sogar die Mehrheit der durch Serumscreening entdeckten Zöliakie-Fälle zur latenten oder asymptomatischen Form gehören (CATASSI et al. 1995). Das bestätigen auch die Untersuchungen von ACERINI et al. 1998. Bei allen drei Unterformen können die Symptome ganz fehlen oder zumindest nicht zu jedem Zeitpunkt vorhanden sein. Zu den atypischen bzw. extraintestinalen Formen im Erwachsenenalter zählen Dermatitis herpetiformis Duhring, die Eisenmangelanämie, Kleinwuchs, Osteoporose, neurologische Störungen u.a. (FASANO & CATASSI 2001).

Die zurzeit favorisierte Theorie der Pathogenese der Zöliakie besagt, dass prädisponierte Personen auf Gluten mit einer abnormen Immunantwort in der Dünndarmmukosa reagieren und dass diese Reaktion durch lokalaktivierte T-Lymphozyten verursacht wird (MACDONALD et al. 1999). Demnach wäre Zöliakie eine Erkrankung, die durch das zelluläre Immunsystem vermittelt ist.

Diese Hypothese wird durch eine Reihe von Phänomenen unterstützt. So konnten glutenspezifische CD4-T-Zellen (auch T-Helfer-Zellen), die γ -Interferon produzieren, aus der Darmmukosa der Zöliakie-Patienten isoliert werden (NILSEN et al. 1995). Zum anderen gibt es eine enge Assoziation zwischen Zöliakie und bestimmten HLA-Haplotypen, insbesondere den HLA II-DQ2 und -DQ8 Antigenen (SOLLID & THORSBY 1993).

Die Funktion der HLA Klasse II-Moleküle ist die Bindung von Peptiden aus komplexen Proteinen und deren weitere Präsentation an T-Helfer-Zellen. Ein wahrscheinlich wesentlicher Schritt im Rahmen der Zöliakiepathogenese ist die Präsentation von bestimmten Epitopen des Gliadins und damit Aktivierung der T-Helfer-Zellen mit konsekutiver Immunantwort gegen diese Peptide (MACDONALD et al. 1999).

Die serologischen Tests sind nicht invasiv und bieten somit eine Screeningmöglichkeit für Risikopopulationen. Dazu gehören erstgradig Verwandte der Zöliakie-Patienten, Typ-1-Diabetes-Patienten, Menschen mit Down-Syndrom und mit IgA-Mangel-Syndrom (CHIRDO et al. 1999).

Die zöliakietyptischen Antikörper, deren Nachweis zurzeit auch zu diagnostischen Zwecken genutzt wird, sind: Antigliadin-Antikörper (AGA), Endomysium-IgA-Antikörper (EMA IgA), Antiretikulin-Antikörper (ARA) und IgG-Tissue-Transglutaminase-Antikörper (IgG-tGCA) (

HUMMEL et al. 2000). Diese Antikörper können auch bei Gesunden nachgewiesen werden. Ausschlaggebend für die Diagnose sind die Antikörpertitererhöhung (GONCZI et al. 1992) sowie das Vorliegen von klinischen Symptomen und positiven histologischen Dünndarmbiopsien (DAVIDSON & BRIDGES 1987, COLE & KAGNOFF 1985). MÄKI et al. betonen, dass weder der Nachweis eines einzelnen zöliakietyptischen Antikörpers noch der verschiedenen Antikörper eine 100 %-ige Prädiktion hinsichtlich der Diagnose haben. Die Dünndarmbiopsie bleibt nach wie vor der Goldstandard der Zöliakiediagnostik (MÄKI et al. 1998).

Eine diagnostische Herausforderung stellt die latente Zöliakie dar, die nur transient serologisch und/oder bioptisch wegweisende Befunde aufweist (ZIMMER 2001). KEMENY et al. untersuchten 1986 die Zöliakie-Patienten auf Gliadin-Antikörper im Erkrankungsverlauf und konnten eine Expositionsabhängigkeit der Antikörpertiter nachweisen. Nach der Glutenrestriktion fielen die Gliadinantikörpertiter ab (KEMENY et al. 1986).

Die Zöliakie-Patienten unterscheiden sich von Gesunden nicht nur durch die spezifischen Antikörper gegen Gliadin, sondern auch gegen andere Nahrungsantigene wie Ovalbumin und bovines Casein (KEMENY et al. 1986). Die Autoren erklären dieses mit einem durch die gestörte Darmmukosa erhöhten Antigentransport und nicht mit einer spezifischen immunologischen Reaktion auf Gliadin. Bei der Zöliakie konnte entsprechend eine erhöhte Darmpermeabilität nachgewiesen werden (BJARNASON et al. 1985, LAMPASONA et al. 1999).

Die Behandlung der Erkrankung erfolgt mit einer lebenslangen strikten glutenfreien Diät (keine Produkte aus Weizen, Gerste und Roggen). Durch die Diät werden nicht nur Folgen der Malabsorption wie Osteoporose und Vitaminmangelsyndrome verhindert, sondern auch die Spätfolgen mit gehäuftem Auftreten von Malignomen (HOLMES et al. 1989, ASHKENASI & BARATZ 1992).

Unter der Diät tritt gewöhnlich eine völlige Symptommfreiheit ein, und es liegt ein regelrechter histologischer Befund des Dünndarms vor. Da die Diät zum jetzigen Zeitpunkt die einzige effektive Therapie darstellt, gibt es weitere Untersuchungen zur Entwicklung neuer Therapiekonzepte, wie z.B. die Peptidtherapie (MOWAT 2000, ARENTZ-HANSEN et al. 2000, ANDERSON et al. 2000).

Ein anderer Ansatz ist die gentechnologische Herstellung von Weizen, aus dem die toxischen Gliadinpeptide entfernt wurden (ZIMMER 2001).

1.8

Assoziation zwischen Typ-1-Diabetes und Zöliakie

Eine Assoziation zahlreicher Autoimmunerkrankungen wie dem Typ-1-Diabetes mellitus, der chronischen Thyroiditis oder der atrophischen Gastritis mit der Zöliakie wurde in mehreren Studien nachgewiesen (LANCASTER-SMITH et al. 1974, KONTIAINEN et al. 1990, LAMPASONA et al. 1999).

In etwa drei bis fünf Prozent der Fälle treten die Autoimmunthyreoiditis, der Typ-1-Diabetes mellitus und die rheumatoide Arthritis zusammen mit der Zöliakie auf. In einer großen Studie mit 909 Zöliakiepatienten wurde gezeigt, dass die Prävalenz von Autoimmunerkrankungen mit der Dauer der Glutenexposition zunimmt (VENTURA et al. 1999).

Über die Assoziation zwischen Typ-1-Diabetes und Zöliakie wurde schon 1954 berichtet (PAYNE 1954, VISAKORPI 1969). Die Zöliakie-Prävalenz bei Diabetes liegt bei Kindern bei etwa 1-4 % und bei Erwachsenen bei 2-4% (CATASSI et al. 1994, CATASSI et al. 1995, KOLETZKO et al. 1988, GADD et al. 1992, BARERA et al. 1991, SIGURS et al. 1993, DE VITIS et al. 1996, SAUKKONEN et al. 1996, MÄKI et al. 1984, COLLIN et al. 1989, SATEGNA-GUIDETTI et al. 1994, VERGE et al. 1994, SJÖBERG et al. 1998). Somit liegt die Häufigkeit der Zöliakie bei Typ-1- Diabetikern um mehr als das 10-fache über der der allgemeinen Bevölkerung (0,26- 0,38%). Die Erhebung der Daten ist durch zahlreiche asymptomatische Fälle, sowohl in der allgemeinen Bevölkerung als auch bei Patienten mit Typ-1-Diabetes erschwert (CATASSI et al. 1994, CATASSI et al. 1995). Aktuell geht man davon aus, dass etwa 9% der Patienten mit Typ-1-Diabetes Antikörper haben, die für die Zöliakie charakteristisch sind (LAMPASONA et al. 1999, CRONIN & SHANAHAN 1997).

Unklar bleibt, ob eine Glutenrestriktion bei Patienten mit Typ-1-Diabetes, die gleichzeitig an Zöliakie leiden, die Rate und das Fortschreiten des Diabetes verändern (CRONIN & SHANAHAN 1997).

Patienten mit Typ-2-Diabetes zeigen interessanterweise eine ähnliche Zöliakie-Prävalenzrate wie die allgemeine Bevölkerung (PAGE et al. 1994, WALSH et al. 1978).

In den meisten Fällen tritt Zöliakie nach der Diabetes-Manifestation auf und in einigen Fällen sogar erst Jahrzehnte später (SJÖBERG et al. 1998). Die Ergebnisse von SAUKKONEN et al. zeigen, dass die Serokonversion in Richtung Zöliakie meist kurz nach der Manifestation stattfindet. Die höchste Prävalenz der Zöliakie liegt bei Patienten mit Diabetes im

Erwachsenenalter mit langer Erkrankungsdauer (4,1% im Vergleich zur Prävalenzrate bei einer Dauer von 3 Jahren von 2,4% (SAUKKONEN et al. 1996). Aufgrund der relativ hohen Zöliakie-Prävalenzraten und einigen Komplikationen der Erkrankung (metabolische Störungen, Anämie, sowie bösartige Dünndarmveränderungen) wird von einigen Autoren ein serologisches Screening z.B. mit EMA-AK bzw. IgA-AGA in 1-, 3- und 5-Jahreskontrolluntersuchungen empfohlen, um eine rechtzeitige Diagnosestellung zu gewährleisten (CRONIN & SHANAHAN 1997, ACERINI et al. 1998). HUMMEL et al. konnten zeigen, dass ein statistisch signifikanter Anteil der Verwandten von Patienten mit Typ-1-Diabetes eine zöliakiecharakteristische Autoimmunität bzw. eine latente Form der Zöliakie aufweisen. Aus dieser Untersuchung entstand die Empfehlung, ein Zöliakie-Antikörper-Screening nicht nur bei Patienten mit Typ-1-Diabetes, sondern auch bei deren erstgradigen Verwandten durchzuführen (HUMMEL et al. 2000, ZIEGLER & HUMMEL 2001). Zurzeit liegen noch keine Langzeitergebnisse des Screenings vor.

Zum einen erklärt der gemeinsame genetische Hintergrund die enge Assoziation beider Erkrankungen (CATINO et al. 1998, BONIFACIO et al. 1998). Diese sind mit bestimmten HLA-Regionen assoziiert, v.a. mit den Haplotypen A1, B8, DR3, DRB1*03 und DQ2. Der DQ 2-Locus und v.a. DQA1*0501/DQB1*0201-Heterodimere sind in über 90% der Zöliakie-Fälle in Europa vorhanden (SOLLID et al. 1989, SOLLID & THORSBY 1993).

Eine weitere Erklärung könnte eine Verbindung zwischen Darmimmunität, Darmschleimhautprozessen und Typ-1-Diabetes-Pathogenese über eine Störung der oralen Toleranz bei beiden Erkrankungen sein (LAMPASONA et al. 1999, MÄKI & COLLIN 1997, FEIGHERY 1999, JOHNSON et al. 1990, CRONIN & SHANAHAN 1997, BONIFACIO et al. 1998). Die Zöliakie zählt zu den Erkrankungen mit einer gestörten oralen Toleranz (MÄKI & COLLIN 1997, FEIGHERY 1999, JOHNSON et al. 1990).

Die dritte Möglichkeit ist, dass ein Vorliegen von erhöhten zöliakietypischen Antikörpern bei Typ-1-Diabetes-Patienten ein sekundäres Phänomen der autoimmunen β -Zellzerstörung ist (LAMPASONA et al. 1999).

Die Theorie über darmassoziierte Prozesse in der Ätiopathogenese des Typ-1-Diabetes (LAMPASONA et al. 1999) wird in Tiermodellen des Typ-1-Diabetes unterstützt, in denen durch Diätmodifikation die Erkrankungsinzidenz verändert wird (ELLIOT et al. 1988). Es gibt außerdem Studien, die zeigen, dass eine Ernährungsumstellung die Inzidenz von Autoimmunerkrankungen beeinflussen kann (ELLIS & ATKINSON 1996).

Bei Patienten mit Typ-1-Diabetes konnte zusätzlich eine erhöhte Darmpermeabilität nachgewiesen werden (BJARNASON et al. 1985, KUITUNEN et al. 1994).

Aus den immunhistochemischen Untersuchungen von Dünndarmbiopsien der Patienten mit Typ-1-Diabetes durch SAVILAJTI et al. ist folgendes bekannt: auch beim Fehlen von histologisch nachweisbaren entzündlichen Veränderungen der Dünndarmschleimhaut können in den meisten Proben immunhistochemisch Abnormalitäten mit Hinweisen auf Sekretion von Th1-typischen Zytokinen in der Darmschleimhaut nachgewiesen werden. Die Autoren sehen dies als einen Hinweis auf eine gestörte orale Immuntoleranz (SAVILAHTI et al. 1999).

1.9

Problemstellung

Der Typ-1-Diabetes mellitus ist eine Erkrankung, deren Ätiologie unklar ist. Neben einer bekannten genetischen Prädisposition scheinen Umweltfaktoren wie bakterielle und virale Erreger, Toxine, hygienische Verhältnisse und Ernährung an der Entwicklung der Erkrankung beteiligt zu sein (BACH et al. 1997, LUPPI & TRUCCO 1999). Vor allem Umweltfaktoren, die in den ersten beiden Lebensjahren einwirken, sollen für eine Dysregulation des Immunsystems und die Entstehung von Diabetes mitverantwortlich sein (ZIEGLER & HUMMEL 2001).

Vermutlich ist die genetische Prädisposition für die unterschiedliche regionale Inzidenz verantwortlich, während Umweltfaktoren die Entwicklung der Erkrankung in genetisch prädisponierten Individuen begünstigen (MUNTONI et al. 2000).

Ein möglicher Umweltfaktor könnte Gluten sein, da in beiden Tiermodellen des Typ-1-Diabetes, der NOD-Maus und der BB-Ratte, Gluten als möglicher diabetogener Nahrungsbestandteil identifiziert wurde (FUNDA et al. 1999, HOORFAR et al. 1992, SCOTT 1996a).

Für eine mögliche Assoziation zwischen der Pathogenese des Typ-1-Diabetes und einer oralen Glutenexposition gibt es theoretisch zwei pathogenetische Mechanismen:

- 1) Eine immunologische Kreuzreaktivität zwischen Bestandteilen des Glutens und Antigenen der β -Zellen des Pankreas (Molekularmimikry) oder
- 2) eine Störung der oralen Toleranz gegen Gluten und Dysregulation des Immunsystems mit Entstehung einer Autoimmunreaktion gegen Bestandteile der β -Zellen.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die humorale Immunantwort gegen Gluten bei erwachsenen frisch manifesten Patienten mit Typ-1-Diabetes und Kontrollpersonen im ELISA und Western Blot untersucht.

Das Ziel der Arbeit war es, die mögliche Assoziation zwischen der Pathogenese des Typ-1-Diabetes mellitus und der oralen Glutenexposition bei Menschen systematisch zu untersuchen.

Zwei wichtige Hinweise auf diese Assoziation sind:

- 1) Diabetogenität des Glutens in den Tiermodellen des Typ-1-Diabetes (BB-Ratte und NOD-Maus). HOORFAR et al. zeigten 1993, dass eine Weizen-Mehl-Diät unter den Monodiäten die höchste Diabetes-Inzidenz bei den NOD-Mäusen hervorrief (HOORFAR et al. 1993). Auch in Untersuchungen mit der BB-Ratte wurde die Diabetogenität des Glutens nachgewiesen (ELLIOT et al. 1988, SCOTT et al. 1988, SCOTT et al. 1996, SCOTT et al. 1997);
- 2) Epidemiologische Assoziation zwischen Typ-1-Diabetes und der glutensensitiven Enteropathie (CATASSI et al. 1994, CATASSI et al. 1995, KOLETZKO et al. 1988, GADD et al. 1992, BARERA et al. 1991, SIGURS et al. 1993, DE VITIS et al. 1996, SAUKKONEN et al. 1996, MÄKI et al. 1984, COLLIN et al. 1989, SATEGNA-GUIDETTI et al. 1994, VERGE et al. 1994, SJÖBERG et al. 1998).

Beim Menschen sind direkte Untersuchungen eines möglichen Zusammenhanges zwischen der Aufnahme von Nahrungsantigenen und der Pathogenese des Typ-1-Diabetes schwer möglich. Aufschluss sollen Untersuchungen zum Nachweis der zellulären und/oder der humoralen Immunität gegen Gluten bzw. prospektive Ernährungsstudien bei genetisch prädisponierten Kindern geben (BABYDIAB-Studie). Die zelluläre Immunantwort gegen Weizen-Gluten bei Patienten mit Typ-1-Diabetes und Gesunden wurde von KLEMETTI et al. 1998 untersucht (KLEMETTI et al. 1998).

2.

Material und Methoden

2.1

Material

2.1.1

Geräte

Analysenwaage A 200 S, Fa. Sartorius, Göttingen

Brutschrank Cytoperm, Fa. Heraeus, Düsseldorf

ELISA-Reader mit Software (SOFTmax), Fa. MWG-Biotech, Ebersberg,
Molecular Devices, Graefelfing

Grobwaage BP 610, Fa. Sartorius, Göttingen

Labor-pH-Meter Typ 647, Fa. Knick, Berlin

Lumi-Imager mit LumiAnalyst (3.0)-Software, Fa. Boehringer Mannheim, Mannheim

Magnetrührer mit Heizplatte, Fa. Janke & Kunkel, Staufen

Mini-Protean 2 Cell und Zubehör, Fa. Bio-Rad, Hercules, California USA

Mini-Protean 2 Multiscreen Apparatur mit Zubehör, Fa. Bio-Rad, Hercules, California, USA

Mini Trans-Blot Transfer Cell und Zubehör, Fa. Bio-Rad, Hercules, California, USA

Nunc-Immunoblot-Wash 12 Gerät, Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark

Pipetten, Fa. Eppendorf, Hamburg

Powersupply, Modell 1000/500, Fa. Bio-Rad, Hercules, California, USA

Schüttler duomax 2030, Fa. Heidolph, Kelheim

Schüttler Titramax 100 für Mikrotiterplatten, Fa. Heidolph, Kelheim

Schüttler Reax 2000 für Reaktionsgefäße, Fa. Heidolph, Kelheim

Thermomixer, Fa. Eppendorf, Hamburg

Wasseraufbereitungssystem Milli-Q UF plus, Fa. Millipore, Molsheim, Frankreich

Zentrifuge Omnifuge 2.ORS, Fa. Heraeus, Düsseldorf

2.1.2

Verbrauchsmaterial

Bechergläser verschiedener Größe, Fa. Duran/Schott, Mainz

Chemikalienlöffel, Fa. Roth, Karlsruhe

Combitips plus 50 ml, Fa. Eppendorf, Hamburg

Einmal-Pipetten, Fa. Greiner Labortechnik, Frickenhausen

Einmalskalpelle, Fa. Medicon, Tuttlingen

Einmal-Wiegeschalen, Fa. Roth, Karlsruhe

Elektrische Pipettierhilfe Pipettus-Standard, Fa. Roth, Karlsruhe

ELISA-Mikrotiterplatten, Fa. Greiner Labortechnik, Frickenhausen

Frischhaltefolie, Fa. Toppits/Melitta, Minden

Handschuhe, Fa. Ansell, Stockholm, Schweden

Kristallspitzen 0,5-20 µl, Fa. Biozym Diagnostik, Hess. Oldenburg

Laborschalen, Fa. Roth, Karlsruhe

Meßzylinder verschiedener Größe, Fa. Duran/Schott, Mainz

Nitrozellulosemembran (0,45 µm), Fa. Bio-Rad, Hercules, California, USA

Pasteur-Pipetten mit Saugaufsatz, Fa. Hilgenberg/Roth, Karlsruhe

Petrischalen, Fa. Greiner Labortechnik, Frickenhausen

Pinzette, Fa. Keller/Roth, Karlsruhe

Pipettenspitzen blau und gelb, Fa. Sarstedt, Nürnbrecht

Probenröhrchen 14ml, Fa. Greiner Labortechnik, Frickenhausen

Probenröhrchen 50 ml Falcon®, Fa. Becton/Dickinson, Franklin Lakes, N.I. USA

Reagenzglasstände untersch. Größe, Fa. Roth, Karlsruhe

Reaktionsgefäße, Fa. Sarstedt, Nürnbrecht und Fa. Eppendorf, Hamburg

Reaktionsgefäßstände, Fa. Roth, Karlsruhe

Spritzflaschen, Fa. Roth, Karlsruhe

Whattmann Filterpapier, Whattmann Int. Ltd., Maidstone, England

2.1.3

Chemikalien

ABTS (2,2'-Azino-bis-3-Ethylenbenzthiazolin-6-Schwefelsäure)

Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Acrylamid, Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen

APS, Fa. Serva, Heidelberg

Bromphenolblau, Fa. Serva, Heidelberg

Carbonat/Bicarbonat Puffer in Kapseln, Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Citronensäure-Monohydrat ($C_6H_8O_7 \times H_2O$), Fa. Merck, Darmstadt

Dinatriumphosphat-Dihydrat ($Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$), Fa. Merck, Darmstadt

EDTA, Fa. Merck, Darmstadt

Ethanol (C_2H_5OH), Fa. Merck, Darmstadt

Gelatine, Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Glycerol, Fa. Merck, Darmstadt

Glycin ($C_2H_5NO_2$), Fa. Serva, Heidelberg

Harnsäure, Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Kaliumchlorid (KCl), Fa. Merck, Darmstadt

Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄), Fa. Merck, Darmstadt

2-Mercaptoethanol (C₂H₆OS), Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Methanol (CH₃OH), Fa. Roth, Karlsruhe

Milchpulver, Fa. Glücksklee, Frankfurt a. M.

Natriumchlorid (NaCl), Fa. Merck, Darmstadt

Natriumhydroxid (NaOH), Fa. Merck, Darmstadt

N,N'-Methylen-bisacrylamid, Fa. Serva, Heidelberg

Perhydrol (H₂O₂) 30%, Fa. Merck, Darmstadt

Pharmalyte 3-10, Fa. Pharmacia, USA

PMSF, Fa. Roth, Karlsruhe

Reagenzwasser (reinst, Widerstand $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$),
im Folgenden als Wasser bezeichnet, Laborherstellung

Salzsäure (HCl) 37%, Fa. Merck, Darmstadt

Schwefelsäure (H₂SO₄), Fa. Merck, Darmstadt

TEMED, Fa. Serva, Heidelberg

Thimerosal, Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen

TRIS, Fa. Roth, Karlsruhe

Tween 20, Fa. Merck, Darmstadt

Weizen-Gluten, Ogilvie Mills, Kanada

2.1.4

Puffer und Substratlösungen

2.1.4.1

Puffer und Substratlösungen für Gluten-ELISA

ABTS-Lösung

5,5 mg ABTS

7,0 µl H₂O₂ (30%)

ad 10 ml Citratpuffer

Anti-Human-Gesamt IgG vom Kaninchen (HRP), Fa. DAKO, Dänemark

Anti-Human-Seren (2. Antikörper)

Blocking-Puffer (1% Gelatine in PBS)

5 g Gelatine

0,1 g Thimerosal

ad 500 ml PBS-Puffer

Citratpuffer, pH 4,35

0,1 M aus Citrat- Monohydrat

Coating-Puffer, pH 9,6 bei 25°C

1 Kapsel Carbonat/Bicarbonat Puffer 0,05 M

ad 100 ml Wasser

HRP-Mouse Anti Human IgG 1, Fa. Zymed, California, USA

HRP-Mouse Anti Human IgG 2, Fa. Zymed, California, USA

HRP-Mouse Anti Human IgG 3, Fa. Zymed, California, USA

Lysis-Puffer

27,0 g Harnsäure

1,0 ml Triton-x-100

1,0 ml Mercaptoethanol

1,0 ml Pharmalyte 3-10

70 mg PMSF

PBS-Waschpuffer pH 7,5; 10-fach konzentriert

40g NaCl

5,8g Na₂HPO₄ × 2 H₂O

1,0 g KH₂PO₄

1,0 g KCl

ad 500 ml Wasser

PBS-Waschpuffer pH 7,5

100 ml des 10-fach konz. Lsg.

0,5 ml Tween 20

ad 1l Wasser

Weizen-Gluten-Extrakt

in Lysis -Puffer, Konzentration 3,1 mg/ml

2.1.4.2

Puffer und Substratlösungen für Gluten-Western-Blot

Lösung A

48 ml 1 N HCl
36,3 g Tris
0,23 ml TEMED
ad 100 ml Wasser

Lösung B

48 ml 1 N HCl
5,98 g Tris
0,46 ml TEMED
ad 100 ml Wasser

Lösung C

20 g Acrylamid
0,26 g Bisacrylamid
ad 100 ml Wasser

APS-Lösung

0,05 g Ammoniumpersulfat
ad 0,5 ml Wasser

ProSieve 50 Gel Lösung

Fa. FMC Bio Products, Rockland, Maine, USA

SDS 10%

Fa. Bio Whittaker, Walkersville, Maryland, USA

1 N HCl

Sammelgel (Zusammensetzung für zwei Gele)

1250 μ l Lösung C
950 μ l Lösung B
5000 μ l Milli Q-Wasser
75 μ l 10%-SDS-Lösung
75 μ l APS

Trenngel (Zusammensetzung für zwei Gele)

5000 μ l Lösung C
2500 μ l Lösung A
2300 μ l Milli Q-Wasser
100 μ l 10%-SDS-Lösung
100 μ l APS

Tris-Lösung

Fa. Bio Whittaker, Walkersville, Maryland, USA

PMSF-Lösung

0,1742 g PMSF
ad 10 ml Isopropanol

EDTA-Lösung

0,3722 g EDTA
0,1 mg Bromphenol Blau
ad 10 ml Wasser

SLB (Sample Loading Buffer)

1000 μ l 10 % SDS
500 μ l 1 M Tris
200 μ l 100 mM PMSF-Lösung
100 μ l 100 mM EDTA-Lösung
1000 μ l Glycerol
500 μ l Mercaptoethanol
1700 μ l Wasser

TBS-Puffer, pH 7,5

6,05 g Tris
8,76 g NaCl
ad 1000 ml Wasser

TBS-Waschpuffer mit Tween 20

1 ml Tween 20
ad 1000 ml TBS-Puffer

Running Puffer 10-fach konz.

30,0 g Tris
142,0 g Glycin
100 ml SDS 10%
100 µl 100 mM PMSF
ad 1000ml Wasser

Running Puffer

100 ml der 10-fach konz. Lsg.
ad 1000 ml Wasser

Transfer Puffer 10-fach konz.

30,3 g Tris
144 g Glycin
ad 1000 ml Wasser

Transfer Puffer pH 8,3

100 ml der 10-fach konz. Lsg.
200 ml Methanol
ad 1000 ml Wasser

Blocking Puffer bzw. Verdünnungspuffer pH 7,5

5,0 g Milchpulver, Fa. Glücksklee, Frankfurt a.M.
ad 100 ml TBS-Puffer
Ponceau S-Lsg., Fa. Serva, Heidelberg

ECL Western blotting reagents (Lsg. 1 und Lsg. 2)

Fa. Amersham Life Science, Braunschweig

Protein- Molekulargewichts-Standards

- a) 10 kDa Protein-Leiter
- b) Bench Mark Prestained Protein-Leiter

Fa. Gibco BRL Life Technologies GmbH, Eggenstein

BM Chemiluminescence Blotting Substrate (Lsg. A und Lsg. B)

Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

Weizen-Gluten-Extrakt

in Lysis –Puffer, Konzentration 3,1 mg/ml

Detektion und Auswertung

Lumi Imager®, Fa. Boehringer

Anti-Human-Seren (2. Antikörper):

Anti-Human-Gesamt IgG vom Kaninchen (HRP), Fa. DAKO, Dänemark

HRP-Mouse Anti Human IgG₁, Fa. Zymed, California, USA

HRP-Mouse Anti Human IgG₂, Fa. Zymed, California, USA

HRP-Mouse Anti Human IgG₄, Fa. Zymed, California, USA

2.1.5

Patienten- und Kontrollseren

In der vorliegenden Arbeit wurden Seren von frisch manifesten Patienten mit Typ-1-Diabetes und von gesunden Kontrollpersonen auf Serumantikörper gegen Gluten untersucht und miteinander verglichen.

Die Patienten-Seren stammen aus der Serumbank des Diabetes-Forschungsinstitutes an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Seren wurden aus Blutproben gewonnen, die sofort nach der Diagnosestellung des Typ-1-Diabetes mellitus im Diabetes-Forschungsinstitut entnommen wurden. Die Proben wurden aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Die Seren der Kontrollpersonen stammen von Blutspendern des Deutschen Roten Kreuzes, Zentrale Nordrhein und wurden vom DRK-Zentrum der Serumbank des Diabetes-Forschungsinstitutes zur Verfügung gestellt. Als Kontrollpersonen dienten gesunde Blutspender, bei denen nach eigenen Angaben aus einem Fragebogen bekannt war, dass weder die Verwandten 1. und 2. Grades noch sie selbst an Diabetes mellitus erkrankt waren. Im Fragebogen wurde zwischen Typ-1- und Typ-2-Diabetes mellitus nicht unterschieden. Die Serumproben wurden nach der Entnahme ebenfalls aliquotiert und bis zur Antikörperbestimmung bei -20°C aufbewahrt.

Zur Untersuchung der Gesamt-IgG-Immunantwort im ELISA wurden 47 (16 weibliche und 31 männliche) Seren von Patienten mit einem frisch manifesten Typ-1-Diabetes mellitus und 61 (17 weibliche und 44 männliche) Seren von Kontrollpersonen in einer Verdünnung von 1:100 (**Tab. 2.1a**) untersucht.

Zur Untersuchung der IgG-Subklassen im ELISA wurden 20 (5 weibliche und 15 männliche) Seren von Patienten mit einem frisch manifesten Typ-1-Diabetes mellitus und 20 (9 weibliche und 11 männliche) Seren von Kontrollpersonen in einer Verdünnung von 1:100 (**Tab. 2.1b**) untersucht.

Im Western Blot wurden insgesamt 96 Seren von frisch manifesten Patienten mit Typ-1-Diabetes (40 weibliche und 56 männliche) im Alter von 18 bis 40 Jahre auf Antikörper gegen die Glutensubfraktionen untersucht. Die Kontrollgruppe bestand aus 72 Seren von gesunden Personen (31 weibliche und 41 männliche) im Alter von 18 bis 40 Jahre (**Tab. 2.1c**).

Im Weiteren wird die Gruppe der 18- bis 29-jährigen als Altersgruppe <30 und die der 30- bis 40-jährigen Personen als Altersgruppe >30 angegeben.

	Geschlecht/Alter	18-29 Jahre	30-40 Jahre	Gesamt
T1D n=47	weiblich	10 (23)	6 (35,8)	16 (27,8)
	männlich	13 (21,5)	18 (37,3)	31 (30,6)
Kontrollen n=61	weiblich	4 (23,2)	13 (35,2)	17 (32,4)
	männlich	15 (22,7)	29 (32,9)	44 (29,4)

Tab. 2.1a: Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten und Kontrollpersonen zur Untersuchung der Immunantwort gegen Gesamt-IgG zur Testmethode ELISA (in Klammern ist das mittlere Alter einer Gruppe in Jahren angegeben, T1D=Patienten mit Typ-1-Diabetes)

	Geschlecht/Alter	18-29 Jahre	30-40 Jahre	Gesamt
T1D n=20	weiblich	1 (25)	4 (32,8)	5 (31,2)
	männlich	9 (25,1)	6 (31,8)	15 (27,8)
Kontrollen n=20	weiblich	4 (25,5)	5 (35,6)	9 (31,1)
	männlich	6 (23,8)	5 (34,6)	11 (28,7)

Tab. 2.1b: Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten und Kontrollpersonen zur Untersuchung der Immunantwort gegen IgG-Subklassen zur Testmethode ELISA (in Klammern ist das mittlere Alter einer Gruppe in Jahren angegeben, T1D=Patienten mit Typ-1-Diabetes)

	Geschlecht/Alter	18-29 Jahre	30-40 Jahre	Gesamt
T1D n=96	weiblich	23 (22,2)	17 (33,6)	40 (27)
	männlich	29 (23,4)	27 (34,9)	56 (28,9)
Kontrollen n=72	weiblich	15 (27,3)	16 (35,4)	31 (31,5)
	männlich	23 (26,9)	18 (34,7)	41 (30,3)

Tab. 2.1c: Alters- und Geschlechtsverteilung der untersuchten Patienten und Kontrollpersonen zur Testmethode Western Blot (in Klammern ist das mittlere Alter einer Gruppe in Jahren angegeben, T1D=Patienten mit Typ-1-Diabetes)

2.1.6

Weizen-Gluten-Extrakt (WGE)

Gluten setzt sich aus mehreren Proteinen zusammen und macht einen großen Teil der Weizenkleie aus. Die Proteine des Weizens werden in vier Klassen eingeteilt: wasser- bzw. salzlösliche Albumine und Globuline und wasser- bzw. salzunlösliche Gliadine und Glutenine. Das in wässrigen Lösungen schlecht lösliche Gluten besteht weitgehend aus Gliadinen und Gluteninen.

Gliadine sind monomere Proteine (Molekulargewicht etwa 30-80 kDa). Sie sind schlecht löslich in neutralen Puffern, aber gut löslich in wässrigen Alkoholen, Laugen- und Säurelösungen. Anhand der elektrophoretischen Eigenschaften erfolgt die Klassifikation in α -, β -, γ - und ω -Gliadine (SHEWRY et al. 1989).

Die Glutenine sind polymere Moleküle, die aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 11 bis 150 kDa bestehen. Die Untereinheiten sind unter anderem durch Sulfidbrücken miteinander verknüpft (SKERRIT & UNDERWOOD 1986).

Das Gluten lässt sich mittels Elektrophorese in einzelne Proteine nach dem Molekulargewicht auftrennen und anschließend mittels Silberfärbung darstellen (s. **Abb. 2.1**). Im Western Blot können Antikörper gegen die einzelnen Proteinfractionen des Glutens in den zu untersuchenden Proben nachgewiesen und quantifiziert werden.

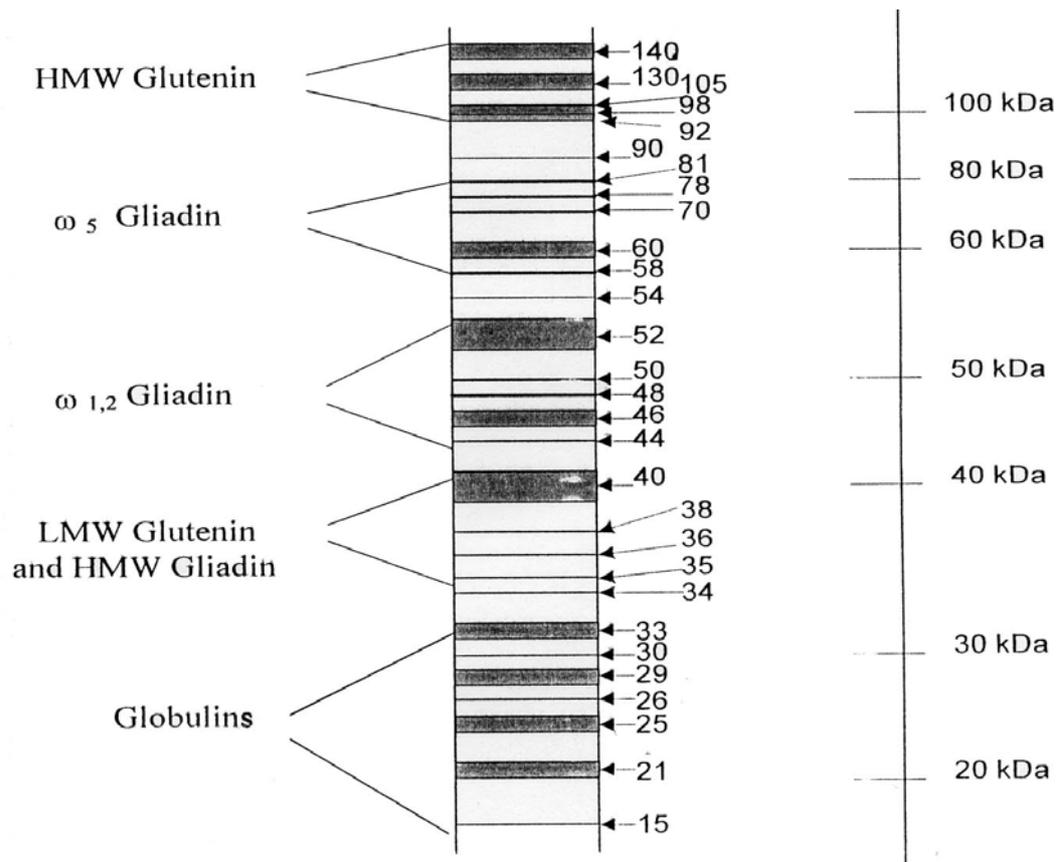


Abb. 2.1: Elektrophoretische Auftrennung von Gluten. Die schematische Darstellung der Ergebnisse der Silberfärbung stammt von Karolina Burghardt (Toxicology Research Division, Health Canada Ottawa, Canada, 1998). Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. HMW steht für Proteine mit einem hohen Molekulargewicht, LMW steht für Proteine mit einem niedrigen Molekulargewicht

Die **Abb.2.1** zeigt die Verteilung der einzelnen Subfraktionen des Glutens in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht. Einige Subfraktionen lassen sich in Gruppen zusammenfassen, wie z.B. die Glutenine, Globuline und Gliadine. Für Untersuchungen der humoralen Antwort gegen Gluten in den Seren von Patienten mit Typ-1-Diabetes und gesunden Kontrollpersonen war eine lösliche Gluten-Zubereitung erforderlich. Der Lysis-Puffer wurde aus angegebenen Bestandteilen zusammengesetzt und unter ständigem Rühren bis maximal 37° erwärmt. Nachfolgend wurden 31 mg des Weizen-Glutens in Pulverform in zehn Milliliter Puffer unter vorsichtiger Erwärmung bis 37°C gelöst und für 2 Stunden ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen, aliquotiert und bei -70°C bis zur Verwendung als Weizen-Gluten-Extrakt aufbewahrt. Sowohl das Rezept für diesen Puffer, als auch das Protokoll des Lösungsverfahrens wurden von Frau Karolina Burghardt und Dr. F.W. Scott aus Ottawa, Kanada zur Verfügung gestellt.

2.2

Methoden

2.2.1

ELISA

2.2.1.1

Beschreibung des Testprinzips

- a) Der ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) ist ein direkter Festphasenassay mit Kopplung des Antigens an die verwendeten Mikrotiterplatten.
- b) Der zu untersuchende Antikörper bindet nach Zugabe des menschlichen Serums an das an der Festphase gebundene Antigen. Der nicht gebundene Anteil des Serums wird durch mehrere Waschkvorgänge entfernt.
- c) Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgt durch einen zweiten, mit einem Enzym (z.B. Meerrettich-Peroxidase) konjugierten Antikörper, welcher gegen den Fc-Anteil humaner Antikörper gerichtet ist. Der nicht gebundene Anteil des zweiten Antikörpers wird durch einen erneuten Waschkvorgang entfernt.
- d) Durch die Zugabe eines Substrats (z.B. ABTS) kommt es zu einer Enzym-Substrat-Reaktion mit dem Enzymanteil des zweiten Antikörpers.
- e) Die Enzym-Substrat-Reaktion bewirkt eine Farbreaktion, deren Intensität anschließend bei einer definierten Wellenlänge mittels Photometrie bestimmt wird.

Das Testprinzip ist in der **Abb. 2.2** schematisch dargestellt:

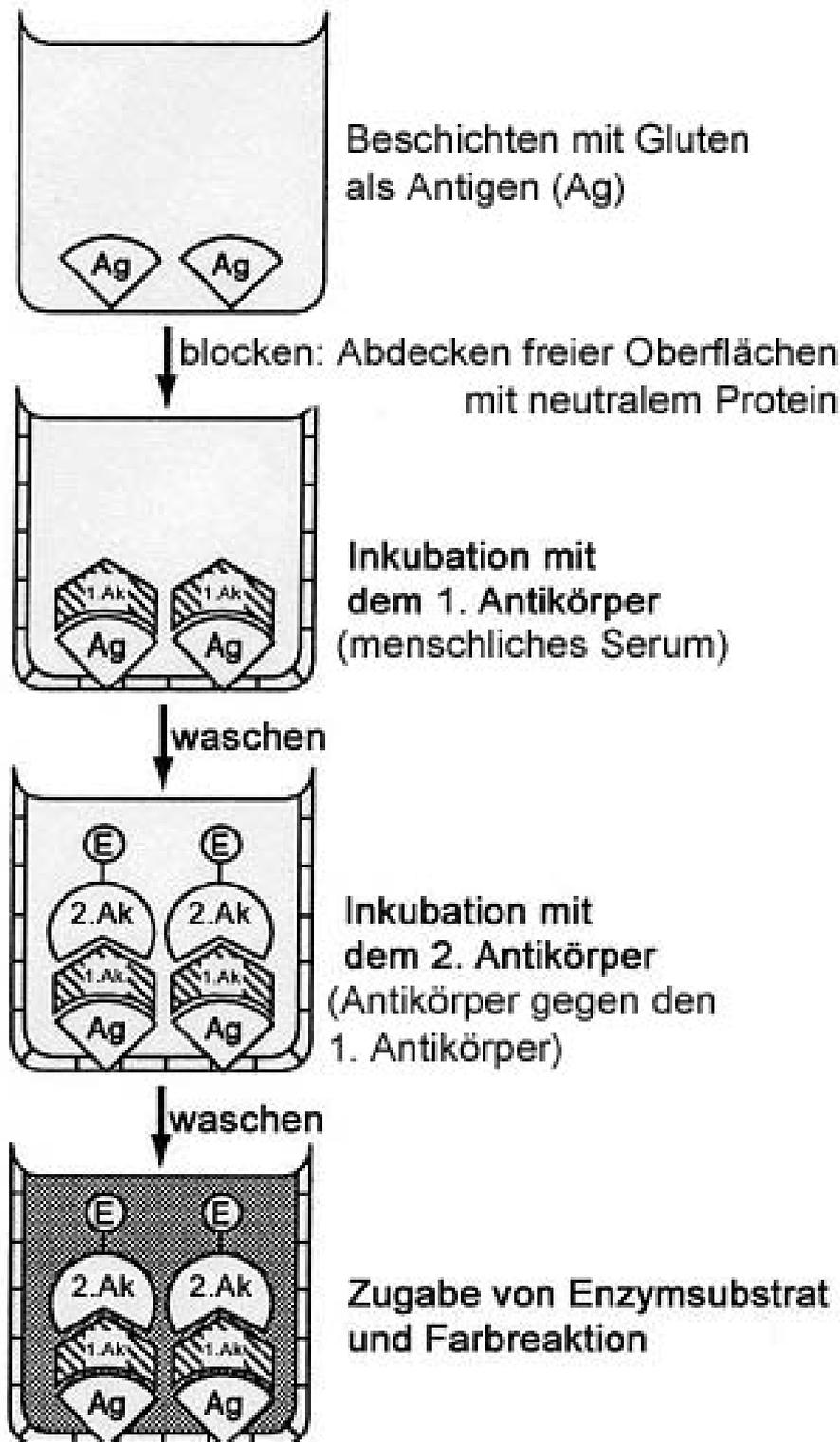


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des ELISA-Prinzips

2.2.1.2

Gluten -ELISA

Der Gluten-Extrakt (WGE oder Weizen-Gluten-Extrakt) wurde in einer Konzentration von 5 µg/ml im Coating-Puffer verdünnt und in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (50 µl/Vertiefung) gegeben. Die Inkubation der mit dem Antigen beschichteten Mikrotiterplatten erfolgte bei 4° C über Nacht (ca.14 Std.).

Nach der Inkubation wurde der Coating-Puffer verworfen und die Vertiefungen der Platten mit Waschpuffer (PBS/Tween 20) in vier Waschgängen von jeweils zwei Minuten Dauer gewaschen und anschließend mit je 100 µl Blocking-Puffer (Gelatine/Thimerosal, 37°C) gefüllt. Die Inkubationszeit der Platten betrug eine Stunde bei 37°C. Danach erfolgten erneut vier Waschgänge (s.o.).

Nach dem jeweiligen Pipettierschema wurden die Vertiefungen mit jeweils 100 µl des Serums in einer Verdünnung von 1:100 in PBS/Tween gefüllt.

Die Inkubationszeit der Platten betrug eine Stunde bei 37°C. Weitere vier Waschgänge (s.o.) folgten, um möglichst alle Serumbestandteile aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatten, die nicht an das WGE gebunden hatten, zu entfernen.

Anschließend wurden 100 µl eines mit Peroxidase gekoppelten Anti-Human-Antiserums in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS/Tween 20-Puffer in die Vertiefungen gegeben.

Es erfolgte erneut die Inkubation mit einem nachfolgenden Waschvorgang.

Daraufhin wurden Vertiefungen der Platten mit je 50 µl ABTS-Lösung pro Vertiefung gefüllt und für 10 min abgedeckt inkubiert. Das Stoppen der Enzym-Substrat-Reaktion erfolgte mit der einmolaren Schwefelsäure-Lösung. Die Extinktion der Farbänderung der einzelnen Vertiefungen wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm bei einer Referenzwellenlänge von 490 nm im ELISA-Reader gemessen.

Die Messeinheit für ELISA-Ergebnisse war die optische Dichte. Die Angabe der Ergebnisse ist in Delta optische Dichte (Delta OD).

In der **Tab. 2.2** ist das Protokoll des Gluten-ELISA dargestellt.

	Konzentration	Menge µl/well	Zeit	Temperatur
1. Beschichten und Inkubation	5 µg/ml	50	über Nacht	4 °C
2. 4x Waschen PBS/Tween 20	0,05%	200	2 min	Raumtemperatur
3. Blocken mit Gelatine/Thimerosal-Puffer	1%	100	1 h	37 °C
4. 4x Waschen PBS/Tween 20	0,05%	200	2 min	Raumtemperatur
5. Serum-Proben 1.AK-Inkubation	1:100	100	1 h	37 °C
6. 4x Waschen PBS/Tween 20	0,05%	200	2 min	Raumtemperatur
7. 2.AK-Inkubation	1:1000	100	1 h	37 °C
8. 4x Waschen PBS/Tween 20	0,05%	200	2 min	Raumtemperatur
9. Enzymreaktion mit Substratpuffer ABTS, Inkubation	0,55 %	50	10 min	Raumtemperatur
10. Stop mit H ₂ SO ₄	1M	50		Raumtemperatur
11. Lesen bei 405 nm und 490 nm				Raumtemperatur

Tab. 2.2: ELISA-Versuchsprotokoll

2.2.1.3

Vorversuche Gluten-ELISA

2.2.1.3.1

Antigenkonzentration

Zur Ermittlung der optimalen Gluten-Konzentration für die ELISA-Versuche wurden drei Humanseren verwendet. Die Bestimmung erfolgte anhand drei unterschiedlicher Konzentrationen des Weizen-Gluten-Extraktes und drei unterschiedlicher Konzentrationen des 2. Antikörpers. Somit ergaben sich für jedes Serum neun Proben, die auf Gesamt-IgG-Antikörper untersucht wurden.

Bei dem Vergleich der Reaktivitäten zeigten sich hinsichtlich der Antigen-Konzentration keine wesentlichen Unterschiede. Hingegen hatte die Konzentration des 2. Antikörpers einen deutlichen Effekt (**Abb. 2.3**). Bei der WGE-Konzentration und bei der Verdünnung des 2. Antikörpers wurde der mittlere Bereich gewählt: WGE-Konzentration von 5 µg/ml und Verdünnung des 2. Antikörpers auf 1:1000.

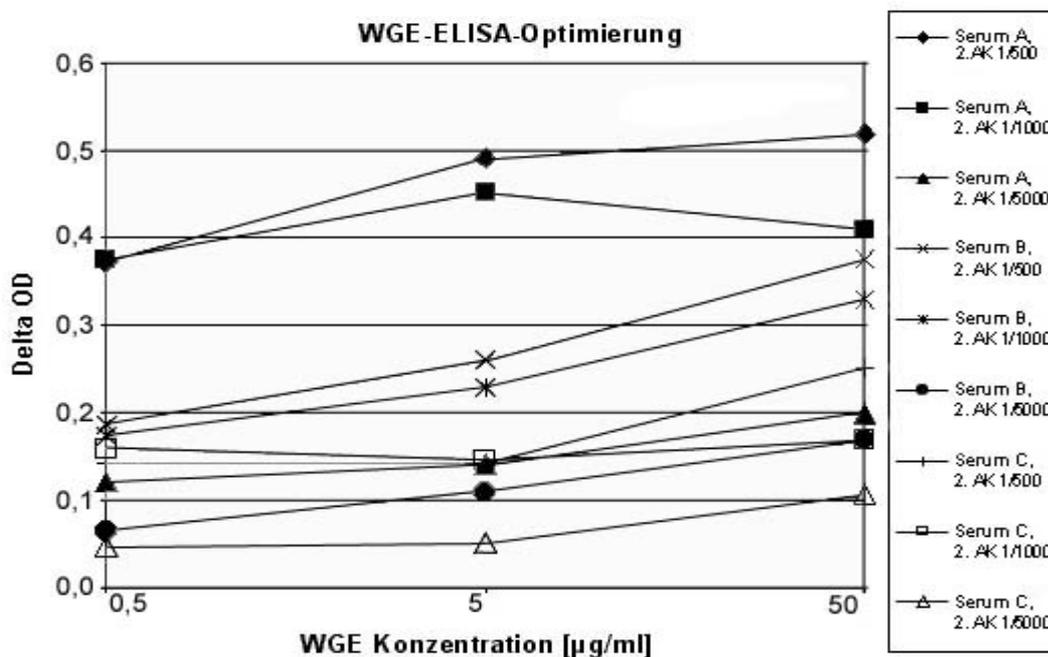


Abb. 2.3: Vorversuche zur Bestimmung der optimalen Antigenkonzentration im WGE-ELISA. Es wurden drei Seren verwendet, die mit Serum A, Serum B und Serum C gekennzeichnet sind. Der 2. Antikörper (2. AK) wurde in drei Konzentrationen verwendet: 1:500, 1:1000 und 1:5000 µg/ml

2.2.1.3.2

Spezifität der Reaktion gegen Gluten-Extrakt (WGE)

Um zu prüfen, ob das Testsystem eine lineare Abhängigkeit zwischen Antigenkonzentration und Signal aufweist, wurden zwei Humansenen mit Gluten-Extrakt in sechs verschiedenen Konzentrationen präinkubiert.

Die **Abb. 2.4** zeigt einen fast linearen Anstieg der Reaktivität gegen WGE bei Abnahme der WGE-Konzentration in der Präinkubation, was die Spezifität der nachgewiesenen Antikörper bestätigte. Damit war belegt, dass eine Antigen-abhängige spezifische Antikörperreaktion vorlag.

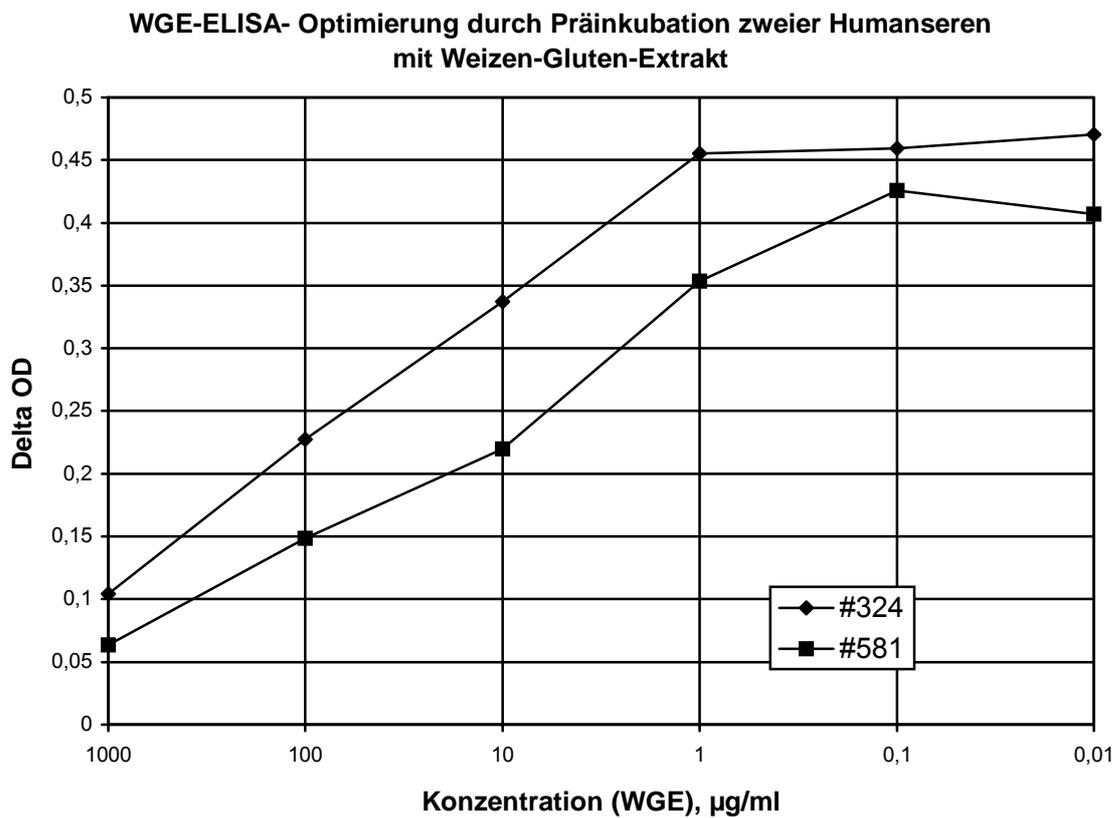


Abb. 2.4: Vorversuche zum Nachweis der Spezifität der Reaktion gegen WGE im ELISA (#324 und #581 stellen die beiden getesteten Seren dar)

2.2.1.3.3

Serumverdünnungsreihe

Anhand einer Humanserumverdünnungsreihe wurde die Spezifität der nachgewiesenen Serumreaktivität gegen WGE ebenfalls bestätigt. Es zeigte sich ein linearer Verlauf der Reaktivität bei einer WGE-Antigenkonzentration von 5 µg/ml (**Abb. 2.5**). Damit war das Testsystem für eine vergleichende Bestimmung von Antikörperaktivitäten geeignet.

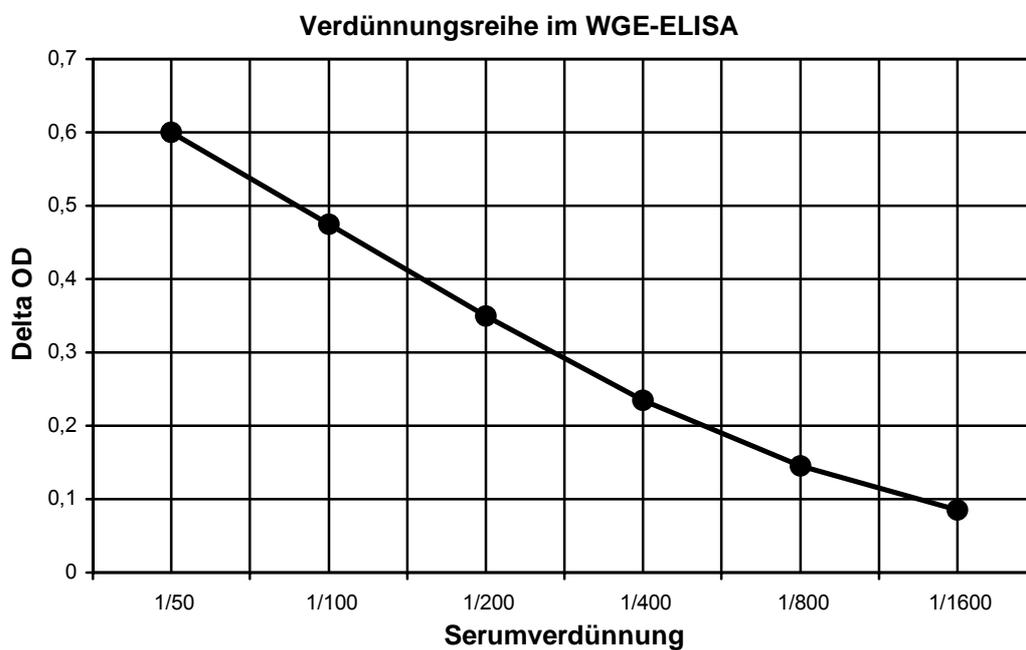


Abb. 2.5: Verdünnungsreihe eines Probenersums im WGE-ELISA; der Verlauf zeigt die fast lineare Beziehung zwischen der Serumverdünnung und der Reaktivität im ELISA in Delta optische Dichte bei gegebener Antigenkonzentration von 5 µg/ml

2.2.1.4

Subklassen-ELISA

Die IgG-Antikörperklasse, die in erster Linie hier untersucht wurde, ist eine von fünf Klassen der Immunglobuline. Die übrigen vier Klassen sind die IgA-, IgM-, IgD- und IgE-Antikörper.

Die Immunglobuline der Klasse IgG lassen sich weiterhin in vier Subklassen unterteilen:

IgG₁, IgG₂, IgG₃ und IgG₄.

Die Verteilung der einzelnen glutenspezifischen IgG-Antikörper bei frisch manifesten Typ-1-Diabetikern wurde im WGE-ELISA untersucht. Die Antigenkonzentration betrug 5 µg/ml, der 2. Antikörper wurde 1:1000 im Puffer verdünnt.

2.2.2

Western Blot

2.2.2.1

Beschreibung des Testprinzips

Ein Western Blot dient dem immunhistochemischen Nachweis von Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran (modifiziert n. LAEMMLI 1970).

Zunächst wird ein Proteingemisch mittels der SDS-PAGE-Technik aufgetrennt. Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ist eine hochauflösende und häufig eingesetzte analytische Technik zur Trennung komplexer Proteingemische. Man nutzt die Fähigkeit der Proteine, unabhängig von ihren isoelektrischen Punkten, mit dem anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) negativ geladene Komplexe zu bilden. Die von einem Protein gebundene SDS-Menge und damit die Ladung des Protein-SDS-Komplexes ist der Größe des Proteins etwa proportional. Zwischen der Größe der Protein-SDS-Komplexe und dem Molekulargewicht der Proteine besteht annähernd Linearität, so dass Proteine durch Elektrophorese anodisch wandernd in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden.

Der Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Matrix erfolgt unter Nutzung eines elektrischen Feldes (das eigentliche Blotting). Unter Blotting versteht man den Prozess der Überführung von Makromolekülen aus Trenngelen auf eine immobilisierende Matrix (z.B. Nitrozellulosemembran, NC-Membran).

Das Trenngel und die Transfermembran aus Nitrozellulose werden zwischen Filter- bzw. Schwammtuchlagen und Stützrahmen sandwichartig eingelegt und in einen mit Puffer gefüllten Elektrophoretank senkrecht zwischen flächenartig angeordneten Elektroden eingebracht (Abb. 2.6). Anschließend wird die Nitrozellulosemembran durch eine Proteinlösung „geblockt“, d.h. die proteinfreien Stellen der Membran binden die Proteine aus der Lösung. Damit erfolgt eine Blockade der Oberfläche für die unspezifischen Bindungen des 1. oder 2. Antikörpers.

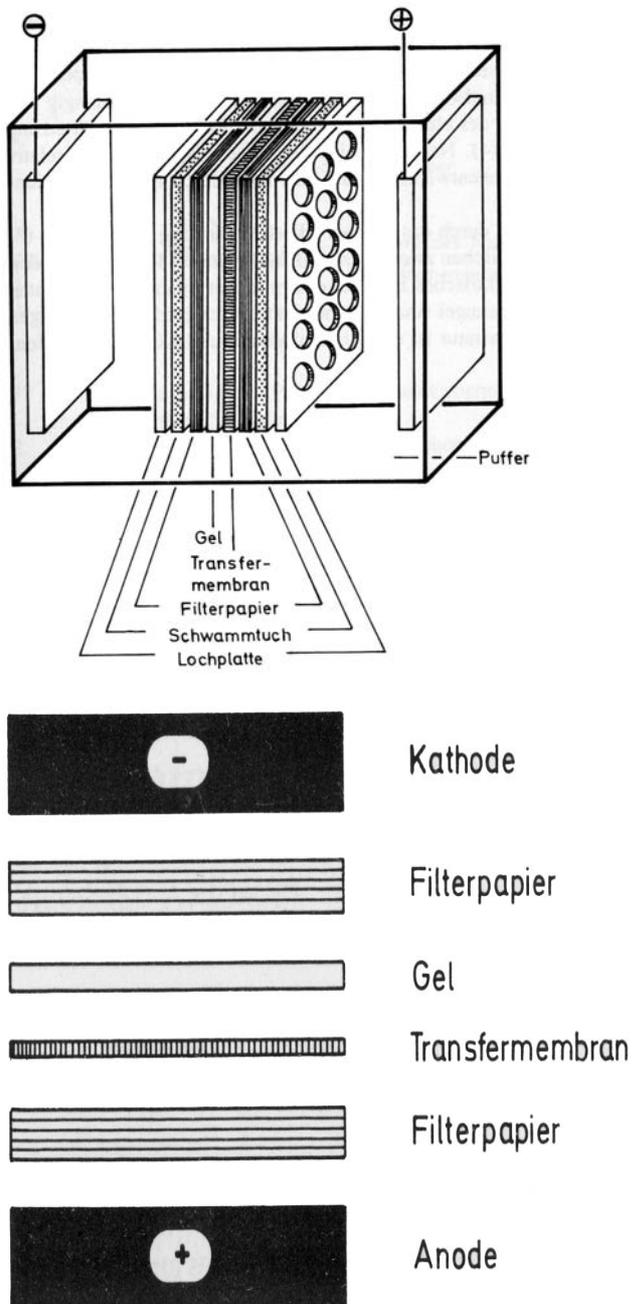


Abb. 2.6: Western Blot-Prinzip

Im Allgemeinen erfolgt der immunhistochemische Nachweis der auf Membranen übertragenen Proteine indirekt. Es wird zunächst ein primärer Antikörper an die Proteine gebunden. Nach einem Waschvorgang kann ein markierter (z.B. mit Meerrettich-Peroxidase) sekundärer Antikörper, der für den primären Antikörper spezifisch ist, an den primären Antikörper binden (**Abb. 2.7**).

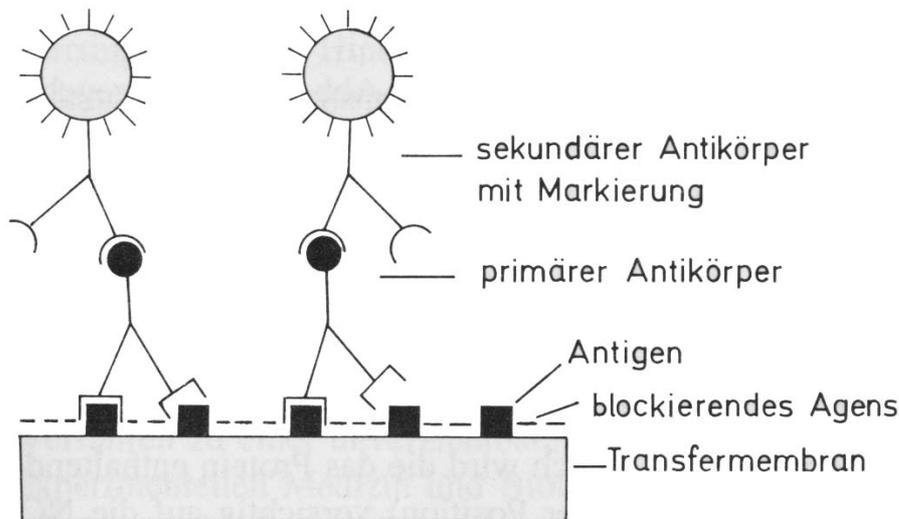


Abb. 2.7: Antigen-Antikörperbindung auf der Transfermembran (Nitrozellulosemembran) im Western Blot

Der Nachweis der Komplexe aus dem Antigen, dem 1. Antikörper und dem 2. Antikörper erfolgt mit Hilfe der Lumineszenz- oder ECL-Methode (ECL: Enhanced Chemiluminescence; WHITEHEAD 1979). Lumineszenz ist definiert als Lichtemission, die aus dem Energieverlust einer Substanz entsteht, welche sich in einem angeregten Zustand befindet. Bei der Chemilumineszenz erfolgt diese Anregung durch eine chemische Reaktion. Bei der in dieser Untersuchung angewandten ECL-Methode erfolgt diese Reaktion durch die von Peroxidase in Anwesenheit von Hydrogenperoxid katalysierte Oxidation von Luminol. Direkt nach der Oxidation befindet sich das Luminol in einem angeregten Zustand, der durch Lichtemission im Bereich der Wellenlänge 428 nm abklingt und detektiert werden kann.

2.2.2.2

WGE-Western Blot

Prinzip:

Da es sich bei dem verwendeten Glutenextrakt um ein inhomogenes Proteingemisch handelte, musste dieser zur Bestimmung der Antikörper gegen die Subfraktionen des Glutens aufgetrennt werden. Dies erfolgte durch elektrophoretische Trennung der Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese oder SDS-PAGE. Anschließend wurden die nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. In einem weiteren Schritt erfolgte die Inkubation der mit den Glutenproteinen beladenen Membran mit den verdünnten Seren. Die gebundenen Antikörper konnten dann in einem weiteren Schritt mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen werden. Die Detektion des Sekundärantikörpers erfolgte mittels verstärkter Chemilumineszenz (ECL). Schließlich wurde die Auswertung mittels digitalisierter Quantifizierung des spezifischen Signals mit dem Lumi Imager® durchgeführt.

Die Schritte des in dieser Arbeit angewandten Western Blot-Verfahrens zum Nachweis von Antikörpern gegen die Subfraktionen des Glutens werden im Folgenden im Detail beschrieben:

a) Der Aufbau der Gelapparatur erfolgte nach dem Protokoll der Firma Biorad. Der Abstand zwischen den beiden Glasplatten der Gelapparatur, somit der Geldicke, betragen 0,75 mm. Ein zwölfprozentiges Trenngel wurde mit einer Pipette blasenfrei in den Spalt zwischen den beiden Glasplatten gegossen und mit Wasser überschichtet. Die Polymerisationszeit betrug 45-60 Minuten. Nach dem Abgießen des Wassers wurde das fünfprozentige Sammelgel gegossen. Zum Ausformen von Sammeltaschen (Slots) wurde ein Gelkamm der Dicke 0,75 mm, was der Geldicke entspricht, benutzt. Die Polymerisationszeit betrug etwa 30 Minuten. Nach dem Polymerisationsvorgang wurde der Gelkamm entfernt und die geformten Sammeltaschen mit Wasser vorsichtig gespült. Das fertige Sammelgel enthielt somit eine schmale Sammeltasche für den 10 kDa Proteinleiter-Marker und eine breite Tasche für die Glutenprobe.

b) Die Konzentration des gelösten Glutens wurde dann auf 0,33 mg/ml verdünnt. Anschließend erfolgte eine Erhitzung des Proteingemisches auf 95°C für fünf Minuten. Die Gelapparatur für die Proteinelektrophorese (Mini-Protean 2) wurde als nächstes mit dem Laufpuffer gefüllt. Die Glutenprobe und der Protein-Marker wurden in die dafür vorgesehenen Geltaschen gefüllt. Die Protein-Gelelektrophorese erfolgte bei 180V und 109 mA bei einer Dauer von einer Stunde.

c) Danach wurde das Trenngel mit den Gluten-Proteinen von den Glasscheiben entfernt und zehn Minuten im Blotting Puffer inkubiert. In jeweils verschiedenen Gefäßen wurden vier Stücke Filterpapier und ein Stück Nitrozellulose in passender Größe ebenfalls im Blotting Puffer zehn Minuten lang inkubiert. Dann wurden die Filterpapiere, die NC-Membran und das Gel in vorgegebener Reihenfolge in die Mini-Trans-Blot-Apparatur sandwichartig eingebracht (**Abb. 2.6**). Der Elektrophorese-Tank wurde mit dem Transfer-Puffer gefüllt. Um der Hitzeentwicklung bei der Elektrophorese entgegenzuwirken, befand sich am inneren Rand des Elektrophoresetanks ein Plastikbehälter mit Eis. Die Transferelektrophorese (Blotting) erfolgte unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührer bei 100V und 250 mA bei einer Raumtemperatur von 4°C für eine Stunde.

d) Die aus dem Blotting-Sandwich herausgenommene NC-Membran wurde eine Minute lang im Wasser inkubiert. Um den Erfolg des Transfers der Proteine vom Gel auf die Membran zu überprüfen, wurde die Membran mit Ponceau S zwei Minuten lang eingefärbt. Dann konnte man die Verteilung der

10 kDa Leiter-Proteine mit einem Kugelschreiber einzeichnen, um später die Molekulargewichte der nachgewiesenen Gluten-Proteine ablesen zu können. Außerdem konnte die Membran in den Randbereichen genauer zugeschnitten werden. Die Membran wurde dann zwei Minuten im Wasser und anschließend in fünf Waschgängen von jeweils zwei Minuten Dauer im TBS-Puffer gewaschen. Der nachfolgende Blockvorgang der NC-Membran erfolgte unter Schütteln in einer fünfprozentigen Milchpulver-TBS-Lösung über Nacht (14-18 Stunden) bei 4°C.

e) Die geblockte Nitrozellulose-Membran wurde als nächstes aus dem Puffer genommen und in die Multiscreen Apparatur eingespannt (**Abb. 2.8**).

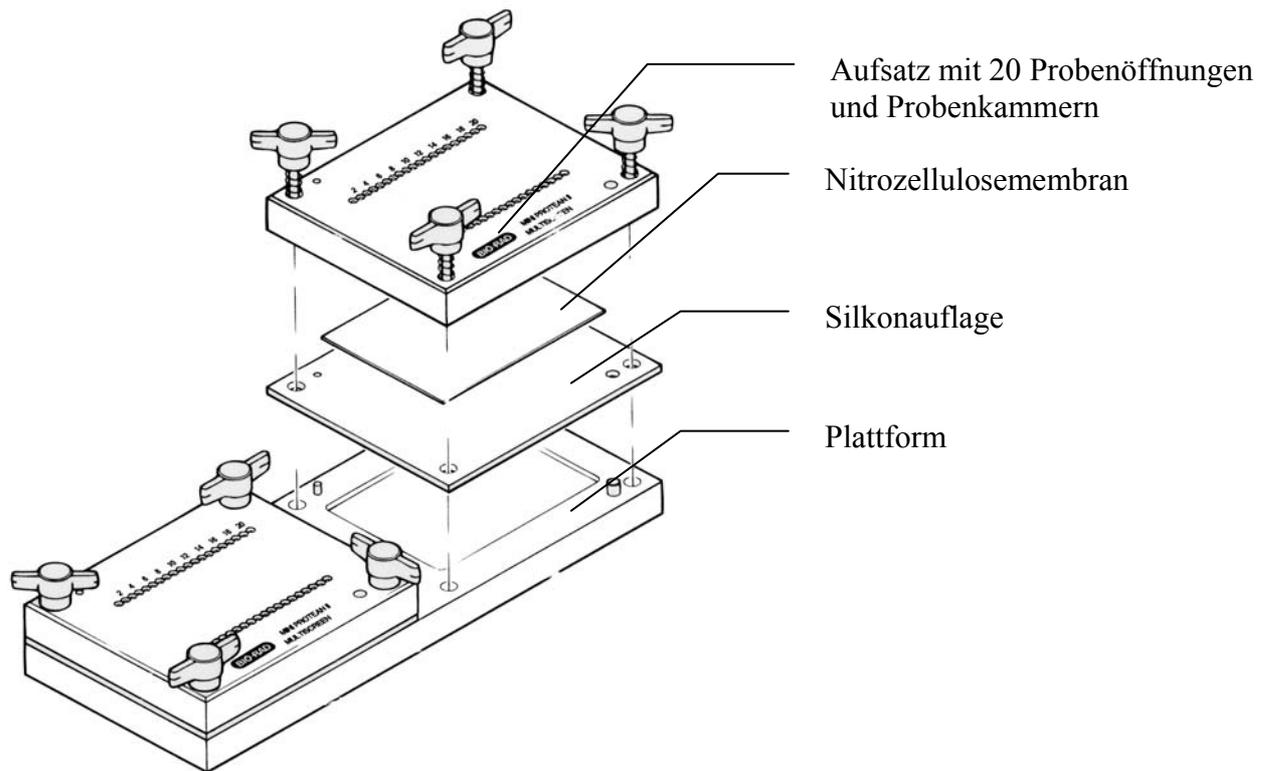


Abb. 2.8: Multiscreen Apparatur für Western Blot

f) Bei dieser Technik ist von großem Vorteil, dass eine Nitrozellulose-Membran für mehrere Serumproben verwendet werden kann ohne dass die Membran vorher in Stücke geschnitten werden muss. Eine Einheit der Multiscreen Apparatur enthält 20 Probenkammern mit einem Volumen von 500 μl in einer Kammer. Somit konnten auf jeder Membran maximal 20 Probenserien getestet werden. Die in einer fünfprozentigen Milchpulver-TBS-Lösung verdünnten Probenserien (1. Antikörper) wurden in die einzelnen Kammern der Multiscreen Apparatur gegeben und eine Stunde unter Schütteln bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfernung der Proben durch die Öffnungen der Multiscreen Apparatur und ein fünffacher Waschvorgang mit 500 μl pro Kammer und jeweils fünf Minuten Dauer mit dem TBS-Tween20-Waschpuffer.

g) In die Kammern wurde dann der 2. Antikörper (Anti-Human-Gesamt-IgG bzw. 2.AK für die entsprechenden Subklassen) in einer Verdünnung von 1:2000 in einer fünfprozentigen Milchpulver-TBS-Lösung mit jeweils 500 μl pro Kammer appliziert. Die Inkubationszeit betrug bei Zimmertemperatur unter Schütteln eine Stunde.

Anschließend erfolgte die Entfernung der Proben durch die Öffnungen des Multiscreen Apparatur und ein fünffacher Waschvorgang mit 500 µl pro Kammer und jeweils fünf Minuten Dauer mit dem TBS-Tween20-Waschpuffer.

h) Die Nitrozellulosemembran wurde danach aus der Multiscreen Apparatur herausgenommen und 30 Minuten lang im TBS-Tween20-Waschpuffer gewaschen. Nach dem Waschen erfolgte die Inkubation der Membran mit sechs Milliliter luminolhaltiger ECL-Lösung über eine Minute lang im Dunkeln. Die Membran wurde aus der Lösung genommen, in eine Lage Frischhaltefolie luftblasenfrei eingewickelt und zwischen zwei Glasscheiben im Lumi Imager platziert. Die Chemilumineszenz-aktiven Stellen (Gluten-Proteinbanden, an die 1. AK (Probenserum) und 2. AK (Antiserum) gebunden haben) wurden auf der Nitrozellulose-Membran mit der ECL-Methode detektiert, auf dem Monitor der Lumi Imager-Einheit in Originalgröße dargestellt und als eine unabhängige Datei gespeichert. Die Lichtexpositionszeiten der NC-Membran betragen drei bis zehn Minuten. Die Auswertung erfolgte mittels digitalisierter Quantifizierung des spezifischen Signals mit der Software des Lumi Imager® der Firma Boehringer.

2.2.2.3

WGE-Western Blot-Vorversuche

2.2.2.3.1

Standardserum

Die eigenen Vorversuche konzentrierten sich auf die Suche nach einem Standardserum, welches für die Auswertung der Ergebnisse des Western Blots notwendig war.

Das Standardserum sollte eine relativ starke Reaktion im Western Blot zeigen und prominente Banden aufweisen, die über mehrere Verdünnungsschritte darstellbar sind.

Auf der **Abbildung 2.9** sind Verdünnungsreihen von zwei Humanseren dargestellt, die eine Abnahme der Bandenstärke bei einem Anstieg der Verdünnung zeigen.

Die Spuren 1 bis 8 zeigen Serum 1 in den Verdünnungen 1:100, 1:250, 1:500 und 1:1000 jeweils in Doppelbestimmung. Die Spuren 9 bis 18 zeigen Serum 2 in den Verdünnungen 1:100, 1:250, 1:300, 1:500 und 1:1000 ebenfalls in Doppelbestimmung. Spur 9 ist eine Negativkontrolle (s.u.) und zeigt keinerlei Reaktion.

Bei den nachfolgenden Untersuchungen der Patienten- und Kontrollseren wurde auf jeder Nitrozellulose-Membran das Standardserum 2 in drei Verdünnungen (1:300, 1:500 und 1:1000) in Doppelbestimmung angewandt. Als Standardbande wurde die Bande bei 43 kDa gewählt. Auf die Extinktion dieser Bande wurden alle Ergebnisse kalibriert.

Die optimale Antigenkonzentration für Western Blot-Versuche wurde in zahlreichen Untersuchungen von Dr. F.W. Scott und seinen Mitarbeitern ermittelt und optimiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen standen bei der Ermittlung eines eigenen Western Blots zur Verfügung und wurden hier übernommen (MACFARLANE et al. 2003).

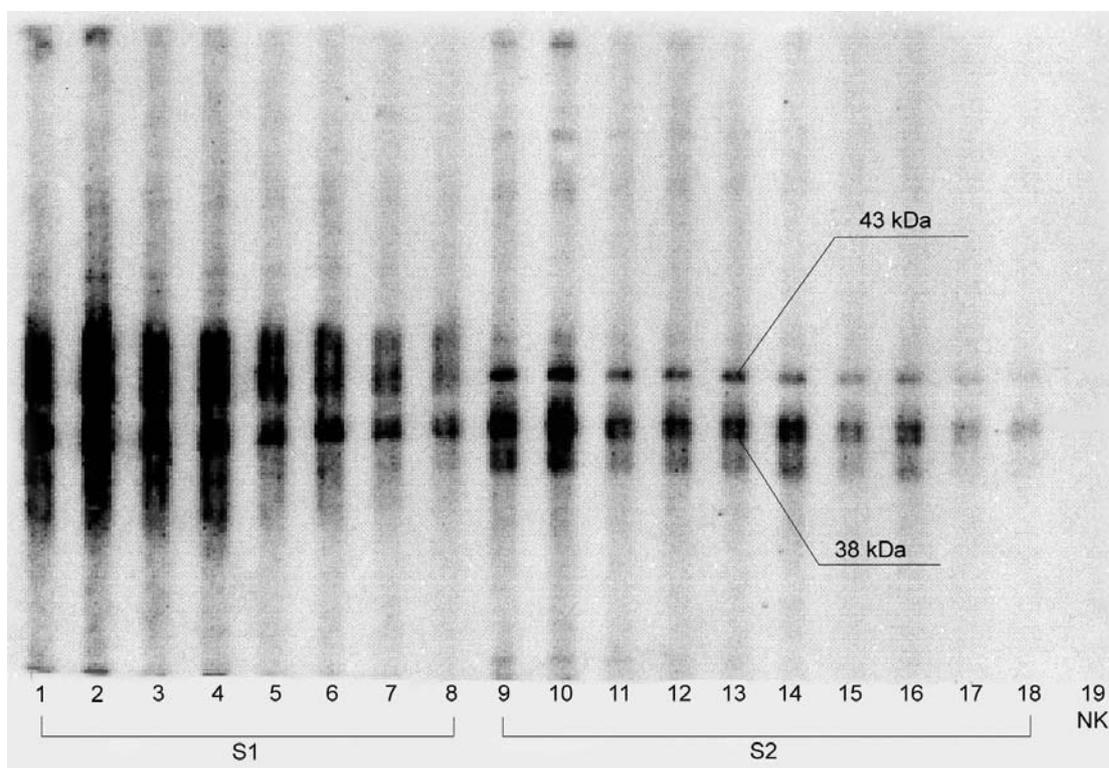


Abb. 2.9: Standardserumverdünnungsreihe (S1= Serum 1, S2= Serum 2, NK=Negativkontrolle)

Die Spuren 1 bis 8 zeigen Serum 1 in den Verdünnungen 1:100, 1:250, 1:500 und 1:1000 in Doppelbestimmung. Die Spuren 9 bis 18 zeigen Serum 2 in den Verdünnungen 1:100, 1:250, 1:300, 1:500 und 1:1000 ebenfalls in Doppelbestimmung. Spur 9 ist eine Negativkontrolle und zeigt keinerlei Reaktion.

2.2.2.3.2

Negativkontrolle

Um bei jedem Western Blot die Spezifität einer Reaktion zu zeigen, wurde immer eine sogenannte Negativkontrolle (NK) durchgeführt. Als Negativkontrolle diente eine Membranspur, auf der keine Inkubation des Antigens mit dem Humanserum durchgeführt wurde. Stattdessen erfolgte die Inkubation mit dem Puffer, der für die Verdünnung des 1. AK verwendet wurde.

Das Fehlen einer Reaktion auf der Höhe aller Banden des Weizen Glutens beweist die Spezifität des Antikörpernachweises im WGE-Western Blot.

Auf der Abbildung eines Western Blots ist eine Negativkontrolle immer als eine leere Spur zu sehen (**Abb. 2.9**)

2.2.2.3.3

Protein-Leiter

Eine Protein-Leiter (Protein-Ladder) stellt mehrere nach dem Molekulargewicht (z.B. 10-110 kDa) abgestufte Proteine dar. Der Abstand der Proteine ist bekannt und kann z.B. 10 kDa betragen (10 kDa-Protein-Leiter). Im Western Blot können mit Hilfe der angefärbten Proteine der Leiter die Molekulargewichte der zu untersuchenden Proteine auf einer NC-Membran ermittelt werden.

Bevor eine Nitrozellulosemembran mit dem 1. Antikörper in Kontakt kam, wurde sie mit dem Proteinfarbstoff Ponceau Rot angefärbt. Auf diese Weise wurden alle Proteine sichtbar. Die Proteine der Protein-Leiter wurden mit einem Kugelschreiber markiert. Der Farbstoff konnte ohne Rückstände ausgewaschen werden. Aufgrund der Markierungen war eine spätere Ablesung der Molekulargewichte nach allen Inkubationsschritten möglich.

Die **Abbildung 2.10** zeigt einen Western Blot (genaue Einteilung s.u.). Links auf der Abbildung sieht man die Markierungen der Protein-Leiter angefangen bei 20 kDa in 10 kDa-Schritten bis 120 kDa. Die Membranspur 19 ist eine Negativkontrolle und zeigt keine Reaktion gegen Gluten. Die Membranspur 18 zeigt eine typische Überreaktion, die ein Ausschlusskriterium für die Auswertung war und eine Wiederholung mit verdünntem Serum erforderte.

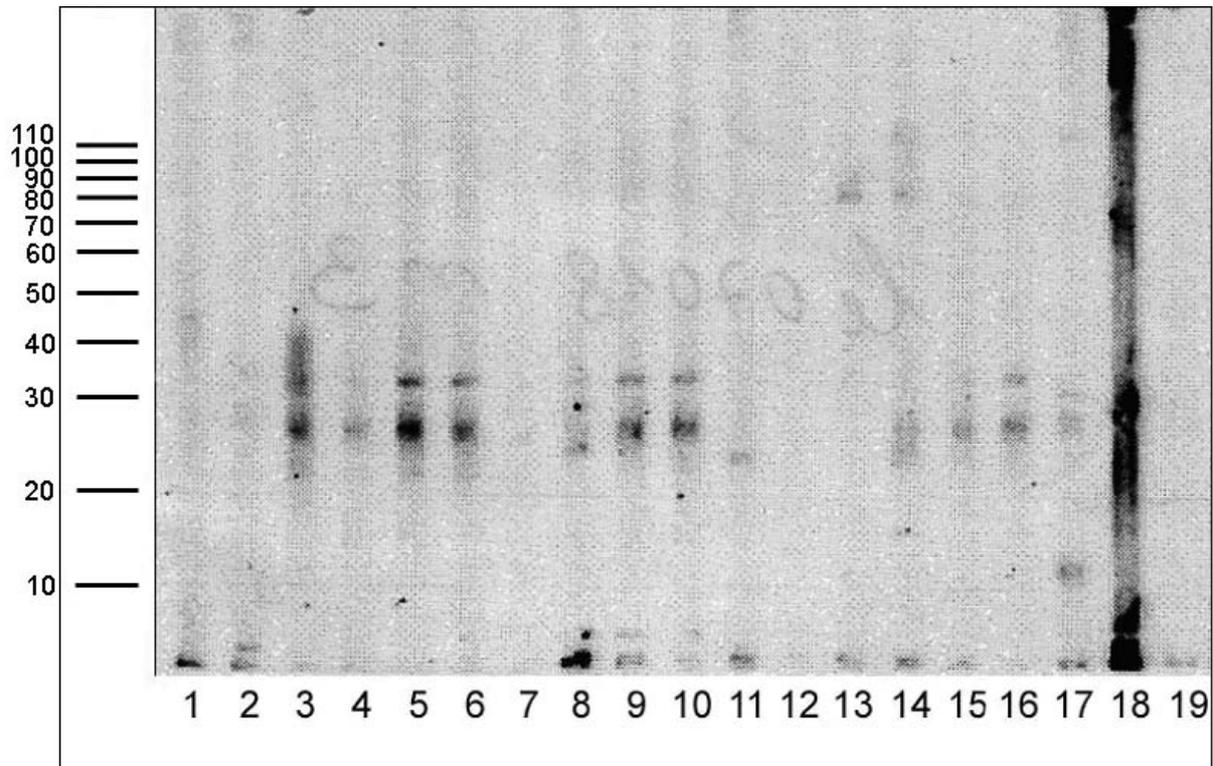


Abb. 2.10: Western Blot-Membran (ECL-Detektion). Die Abbildung zeigt links die Verteilung der Testproteine der Protein-Leiter: die Zuordnung des Molekulargewichtes der untersuchten Proteine erfolgte höhenabhängig im Bereich 10 bis 110 kDa in 10 kDa-Schritten. Die Membranspur 19 ist eine Negativkontrolle und zeigt keine Reaktion gegen Glutenproteine

2.2.3

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse sowohl für ELISA- als auch für Western Blot-Untersuchungen erfolgte mit dem zweiseitigen Student-t-Test für verteilungsunabhängige Stichproben. Die statistische Signifikanz lag bei $p < 0,05$.

3.

Ergebnisse

3.1

Ergebnisse WGE-ELISA

3.1.1

Gesamt-IgG-ELISA

Zum Vergleich der humoralen Immunantwort gegen Gluten wurde die Reaktivität von 41 Seren von frisch manifesten Patienten mit Typ-1-Diabetes und 55 Kontrollpersonen (Alters- und Geschlechtsverteilung s. **Tab. 2.1a**) im ELISA bestimmt. Die Verdünnung der Seren betrug 1:100.

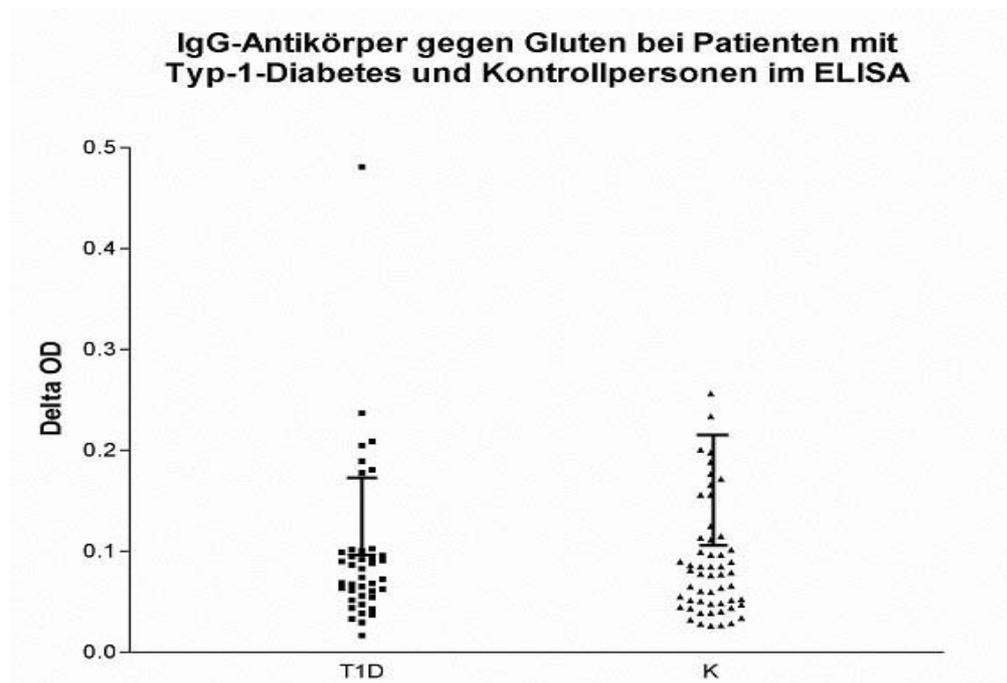


Abb. 3.1: Vergleich der Gesamt-IgG-Reaktivität bei Patienten mit Typ-1-Diabetes (T1D) (n=47) und Kontrollpersonen (K) (n=61) im ELISA. Als Background-Wert kam im Durchschnitt ein O.D.-Wert von $0,053 \pm 0,039$ zum Abzug. Der untere Punkt der vertikalen Linie gibt den Mittelwert pro Gruppe an. Die Höhe der Standardabweichung ist durch die Länge der Linie dargestellt

In der **Abbildung 3.1** sind die Reaktivitätswerte in den Seren der Patienten mit Typ-1-Diabetes und der Kontrollpersonen im ELISA und die dazugehörigen Mittelwerte mit Standardabweichungen graphisch dargestellt. In der statistischen Auswertung der Unterschiede in der Gesamt-IgG-Reaktivität im ELISA zwischen den beiden Gruppen mit dem Student-t-Test war das Ergebnis nicht statistisch signifikant ($p > 0,05$).

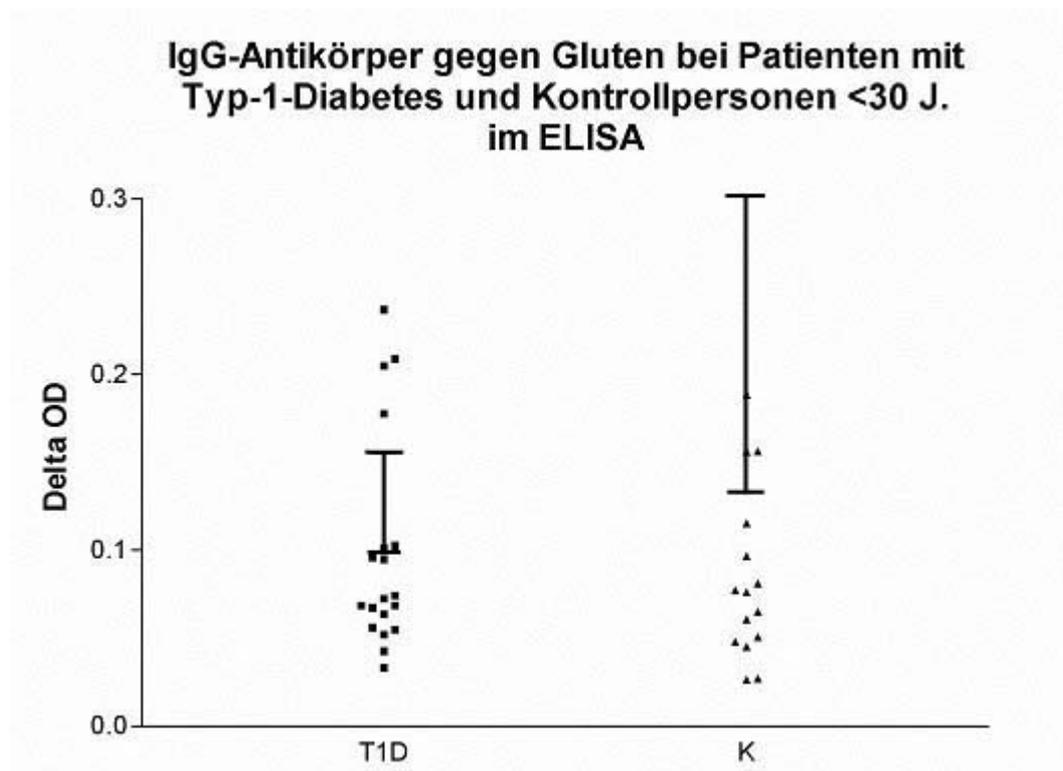


Abb. 3.2: Vergleich der Gesamt-IgG-Reaktivität bei Patienten mit Typ-1-Diabetes (T1D) <30 Jahren ($n=23$) und Kontrollpersonen (K) <30 Jahren ($n=19$) im ELISA. Als Background-Wert kam im Durchschnitt ein O.D.-Wert von $0,053 \pm 0,039$ zum Abzug. Der untere Punkt der vertikalen Linie gibt den Mittelwert pro Gruppe an. Die Höhe der Standardabweichung ist durch die Länge der Linie dargestellt

In der **Abbildung 3.2** sind die Reaktivitätswerte in der Gruppe der Patienten mit Typ-1-Diabetes und der Kontrollpersonen unter 30 Jahren und die dazugehörigen Mittelwerte mit Standardabweichungen graphisch dargestellt. In der statistischen Auswertung der Unterschiede in der Gesamt-IgG-Reaktivität im ELISA zwischen den Patienten mit Typ-1-Diabetes und der Kontrollgruppe mit dem Student-t-Test lag kein statistisch signifikantes Ergebnis vor ($p > 0,05$).

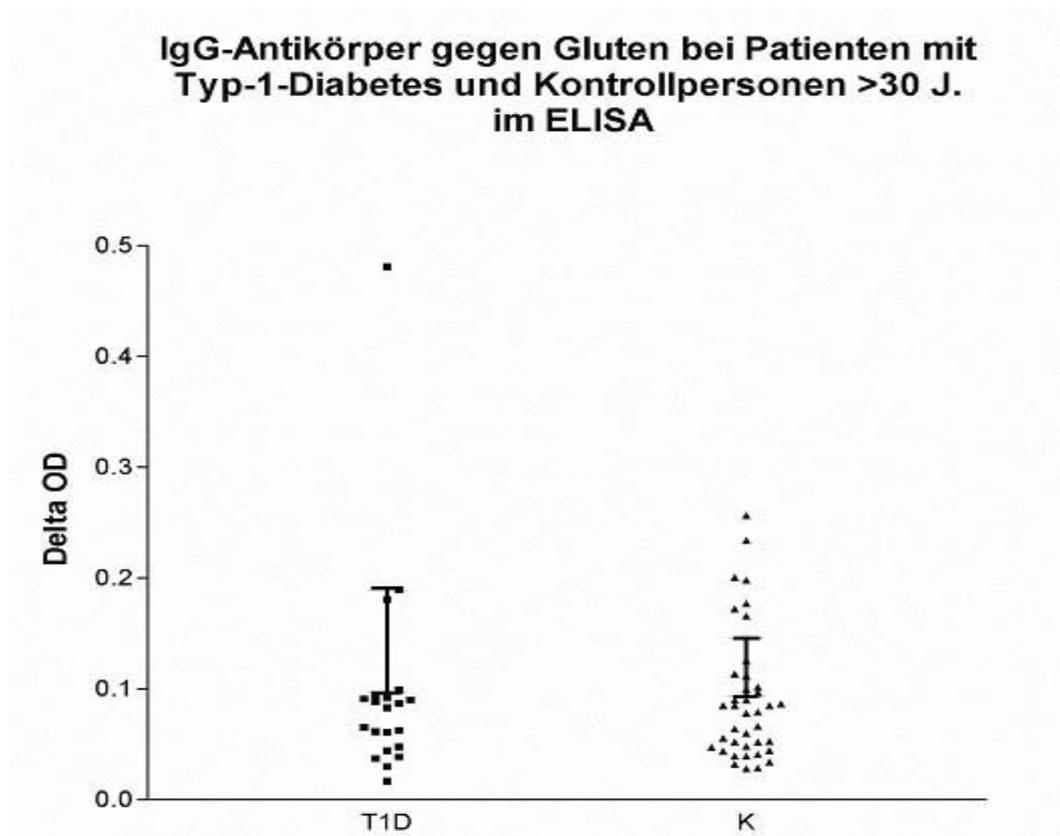


Abb. 3.3: Vergleich der Gesamt-IgG-Reaktivität bei Patienten mit Typ-1-Diabetes (T1D) >30 Jahren (n=24) und Kontrollpersonen (K) >30 Jahren (n=42) im ELISA. Als Background-Wert kam im Durchschnitt ein O.D.-Wert von $0,053 \pm 0,039$ zum Abzug. Der untere Punkt der vertikalen Linie gibt den Mittelwert pro Gruppe an. Die Höhe der Standardabweichung ist durch die Länge der Linie dargestellt

In der **Abbildung 3.3** sind die Reaktivitätswerte in der Gruppe der Patienten mit Typ-1-Diabetes und der Kontrollpersonen über 30 Jahre und die dazugehörigen Mittelwerte mit Standardabweichungen graphisch dargestellt. In der statistischen Auswertung der Unterschiede in der Gesamt-IgG-Reaktivität im ELISA zwischen der Gruppe der Diabetiker und der Kontrollgruppe mit dem Student-t-Test lag ebenfalls keine statistische Signifikanz vor ($p > 0,05$).

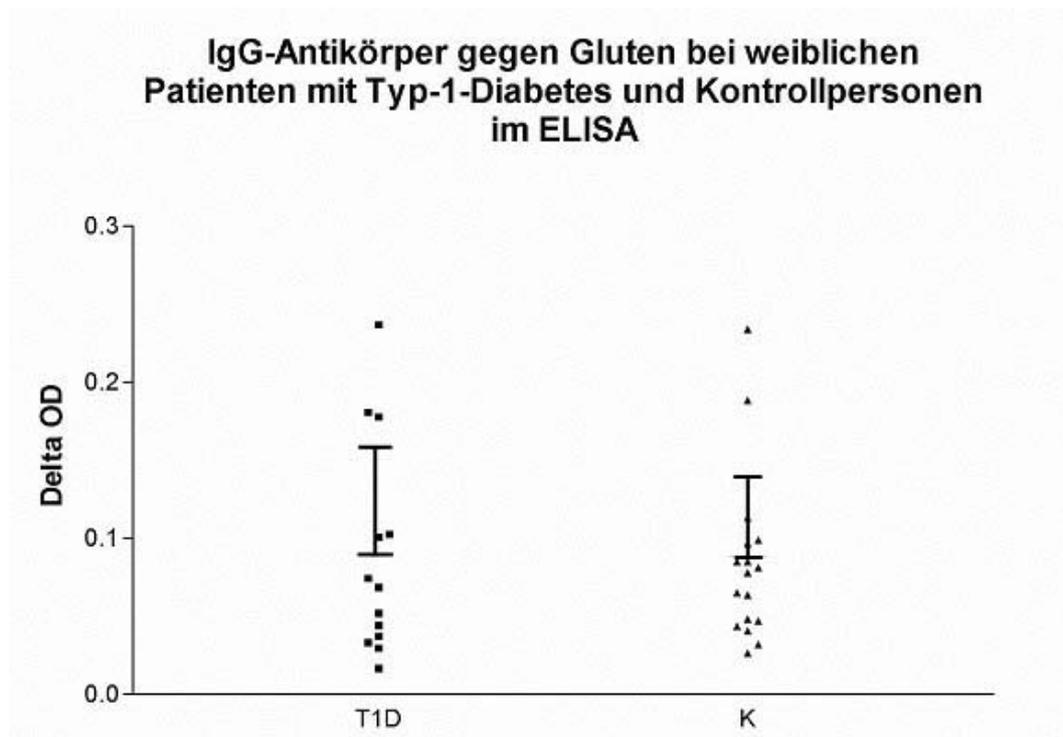


Abb. 3.4: Vergleich der Gesamt-IgG-Reaktivität bei weiblichen Patienten mit Typ-1-Diabetes (T1D) (n=16) und weiblichen Kontrollpersonen (K) (n=17) im ELISA. Als Background-Wert kam im Durchschnitt ein O.D.-Wert von $0,053 \pm 0,039$ zum Abzug. Der untere Punkt der vertikalen Linie gibt den Mittelwert pro Gruppe an. Die Höhe der Standardabweichung ist durch die Länge der Linie dargestellt

In der **Abbildung 3.4** sind die Reaktivitätswerte in der Gruppe der weiblichen Patienten mit Typ-1-Diabetes und der Kontrollpersonen sowie die dazugehörigen Mittelwerte mit Standardabweichungen graphisch dargestellt. In der statistischen Auswertung der Unterschiede in der Gesamt-IgG-Reaktivität im ELISA zwischen der Gruppe der Patienten mit Typ-1-Diabetes und der Kontrollgruppe mit dem Student-t-Test lag kein statistisch signifikantes Ergebnis vor ($p > 0,05$).

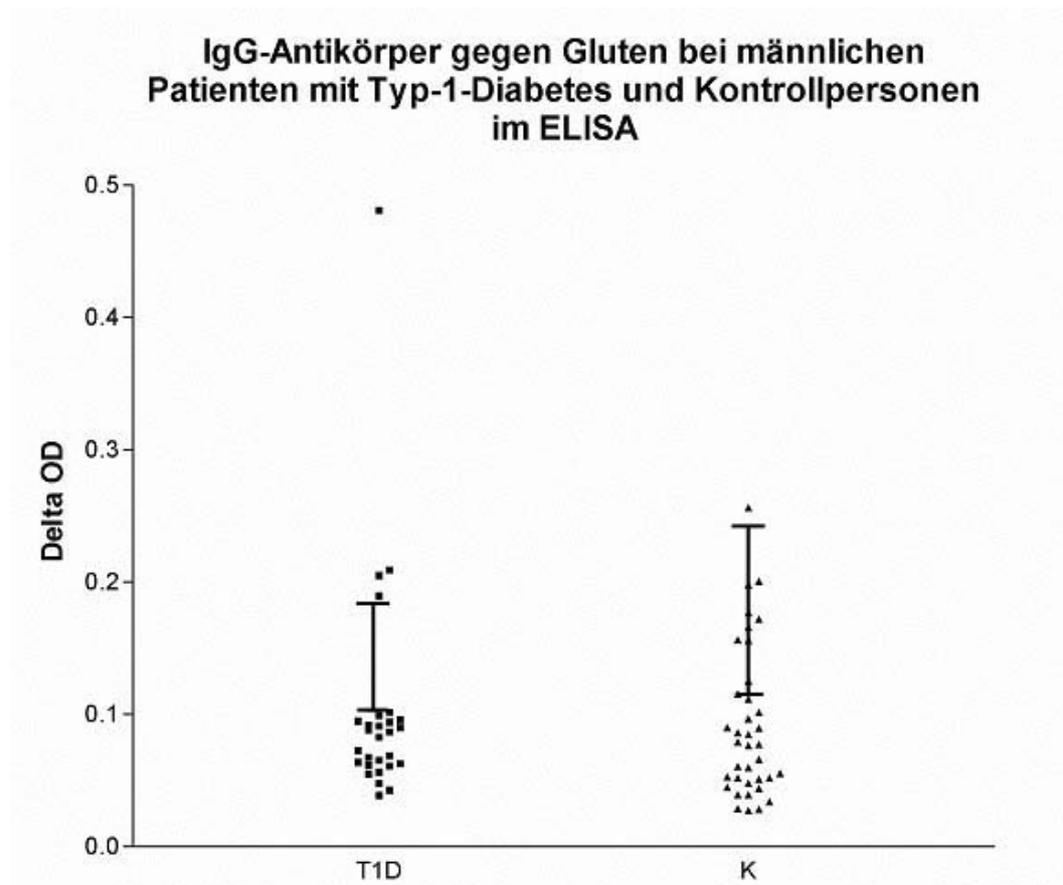


Abb. 3.5: Vergleich der Gesamt-IgG-Reaktivität bei männlichen Patienten mit Typ-1-Diabetes (T1D) (n=31) und männlichen Kontrollpersonen (K) (n=44) im ELISA. Als Background-Wert kam im Durchschnitt ein O.D.-Wert von $0,053 \pm 0,039$ zum Abzug. Der untere Punkt der vertikalen Linie gibt den Mittelwert pro Gruppe an. Die Höhe der Standardabweichung ist durch die Länge der Linie dargestellt

In der **Abbildung 3.5** sind die Reaktivitätswerte in der Gruppe der männlichen Patienten mit Typ-1-Diabetes und der Kontrollpersonen sowie die dazugehörigen Mittelwerte mit Standardabweichungen graphisch dargestellt. Auch in der statistischen Auswertung der Unterschiede in der Gesamt-IgG-Reaktivität im ELISA zwischen der Gruppe der Patienten mit Typ-1-Diabetes und der Kontrollgruppe mit dem Student-t-Test lag kein statistisch signifikantes Ergebnis vor ($p > 0,05$).

Da das Gluten, welches als Antigen im ELISA verwendet wurde, ein Proteingemisch darstellt, ist die Reaktivität der Seren ein Summeneffekt aus der IgG-Reaktivität gegen einzelne

Subfraktionen des Glutens. Aus diesem Grund wurde die Immunantwort gegen Gluten weiterhin im Western Blot untersucht.

Zusätzlich können sich Unterschiede bei den einzelnen IgG-Subklassen zeigen. Daher erfolgte auch die Bestimmung der Reaktivität der IgG-Subklassen gegen Gluten im ELISA.

3.1.2

IgG- Subklassen-ELISA

Zusätzlich zum Gesamt-IgG-ELISA wurden 20 ausgewählte Seren von frisch manifesten Diabetikern und 20 gematchte Seren von Kontrollpersonen im IgG-Subklassen-ELISA verwendet (Alters- und Geschlechtsverteilung siehe **Tab. 2.1 b**). Die Seren wurden auf die IgG-Subklassen 1, 2 und 4 gegen Gluten untersucht.

Die nachfolgenden Diagramme (**Abb. 3.6 a-c**) zeigen die Verteilung der Subklassenantikörper bei frisch manifesten Diabetikern und gesunden Kontrollpersonen. In der Auswertung mit dem Student-t-Test lag keine statistische Signifikanz vor ($p > 0,05$).

Ergänzend zum direkten Vergleich der Subklassen-Ergebnisse wurde noch das Verhältnis der Delta OD der IgG₁- zu IgG₂-Antikörperreaktivitäten im ELISA bzw. Delta OD der IgG₁ zur Summe aus IgG₂ und IgG₄ in der Gruppe der Patienten mit Typ-1-Diabetes und in der Kontrollgruppe verglichen, mit dem Ziel, ein eventuelles Überwiegen der jeweiligen Immunantwort besser darzustellen. Auch hier stellten sich keine signifikanten Unterschiede dar ($p > 0,05$).

Da sich von der Bestimmung von IgG₃ gegen Gluten keine zusätzlichen Informationen versprochen wurden, verzichteten wir auf die Bestimmung dieser IgG-Subklassen-Antikörpergruppe.

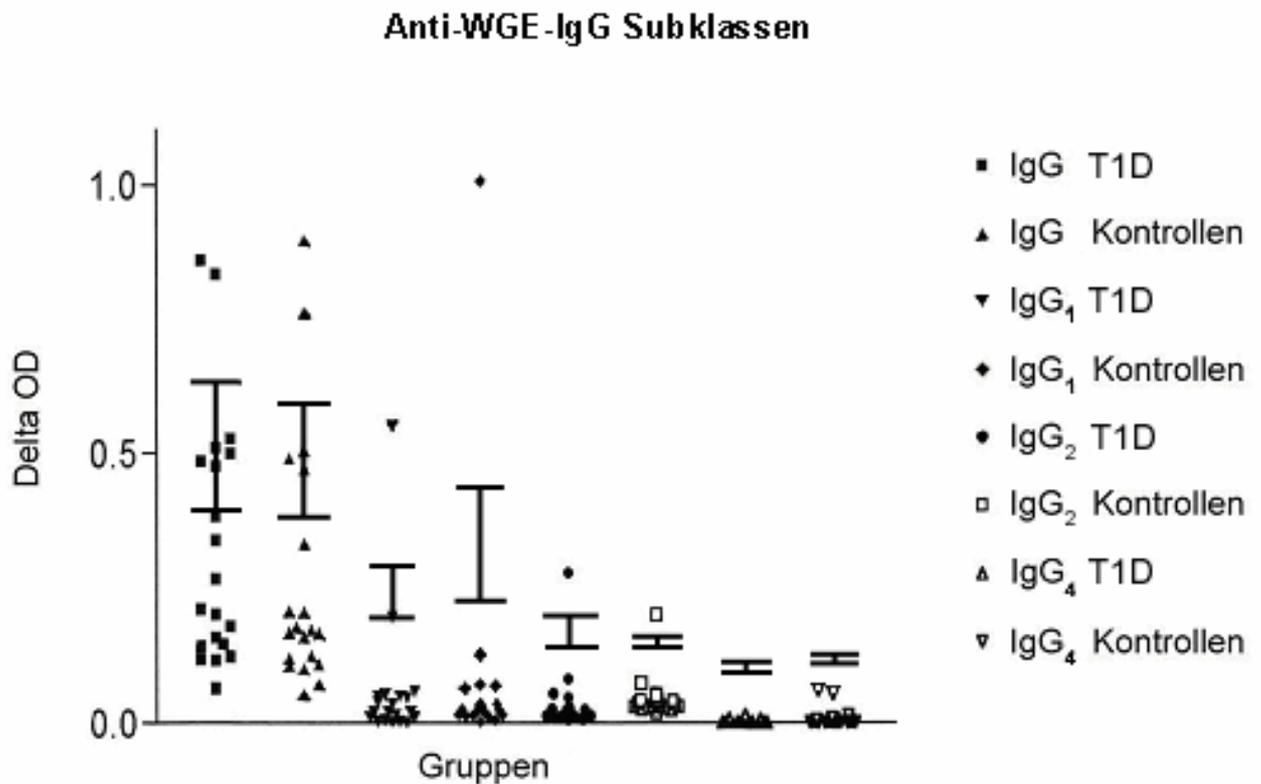


Abb. 3.6a: Subklassen-ELISA mit Verteilung der Einzelwerte in Delta optische Dichte. Das Diagramm zeigt die Verteilung der einzelnen IgG-Antikörpersubklassengruppen bei Patienten mit Typ-1-Diabetes (T1D) (n=20) und Kontrollen (K) (n=20). Der untere Punkt der vertikalen Linie gibt den Mittelwert pro Gruppe an. Die Höhe der Standardabweichung ist durch die Länge der Linie dargestellt. Es lag keine statistische Signifikanz im Student-t-Test für alle drei Subklassen vor (p=0,5 für IgG₁, p=0,3 für IgG₂ und p=0,3 für IgG₄). Als Background-Wert kam im Durchschnitt ein O.D.-Wert von $0,124 \pm 0,011$ zum Abzug

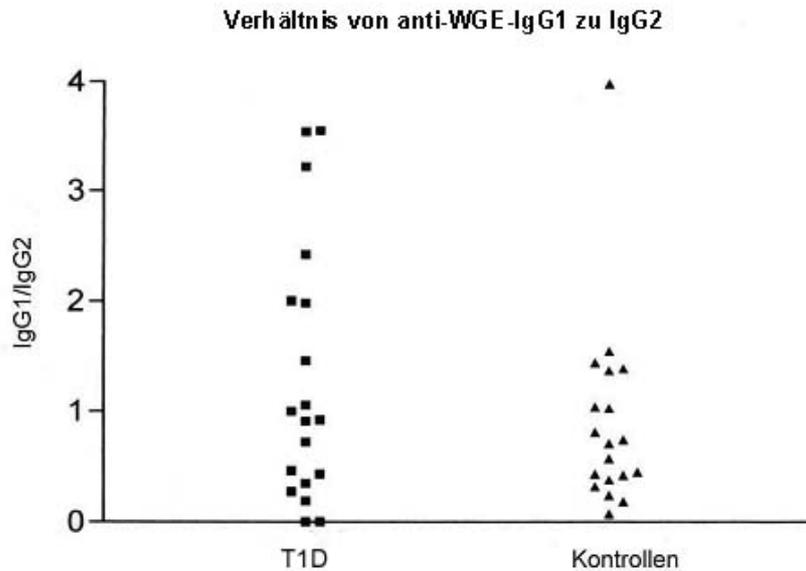


Abb. 3.6b: Subklassen-ELISA mit dem Verhältnis der Einzellwerte der IgG₁ - zu IgG₂ – Analyse in den Seren der Patienten mit Typ-1-Diabetes (T1D) (n=20) und der Kontrollpersonen (K) (n=20) (p=0,7). Als Background-Wert kam im Durchschnitt ein O.D.-Wert von $0,124 \pm 0,011$ zum Abzug

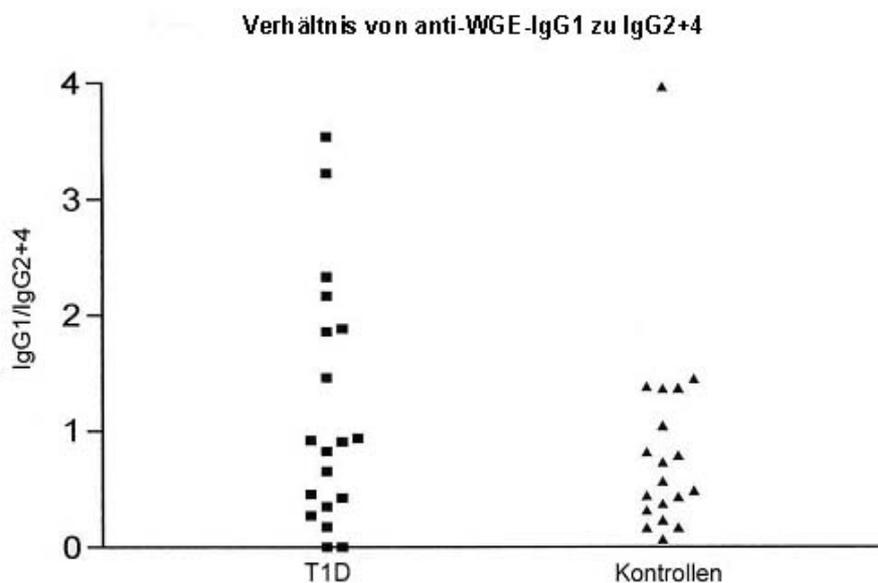


Abb. 3.6c: Subklassen-ELISA mit dem Verhältnis der Einzelwerte der Subklassen IgG₁ zur Summe aus IgG₂ und IgG₄ in den Seren der Patienten mit Typ-1-Diabetes (T1D) (n=20) und der Kontrollpersonen (K) (n=20)(p=0,5). Als Background-Wert kam im Durchschnitt ein O.D.-Wert von $0,124 \pm 0,011$ zum Abzug

3.2

Ergebnisse WGE-Western Blot

3.2.1

Western Blot

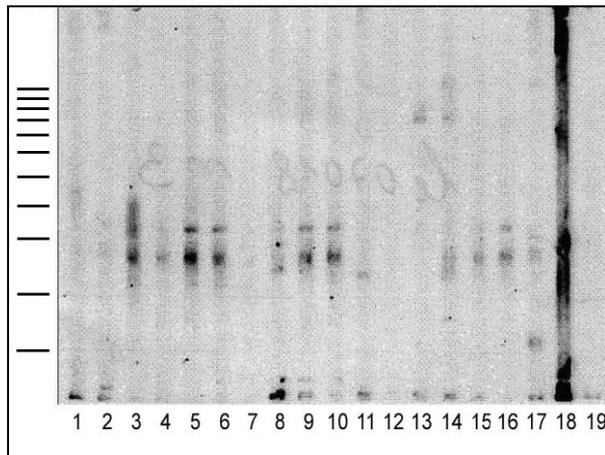
Durch einen Western Blot war es möglich, die humorale Immunantwort der Patienten mit Typ-1-Diabetes und der Kontrollen gegen die Subfraktionen des Glutens darzustellen.

Die **Abbildungen 3.7 bis 3.10** zeigen Western Blots (Originale), deren Ergebnisse weiter unten aufgeführt sind.

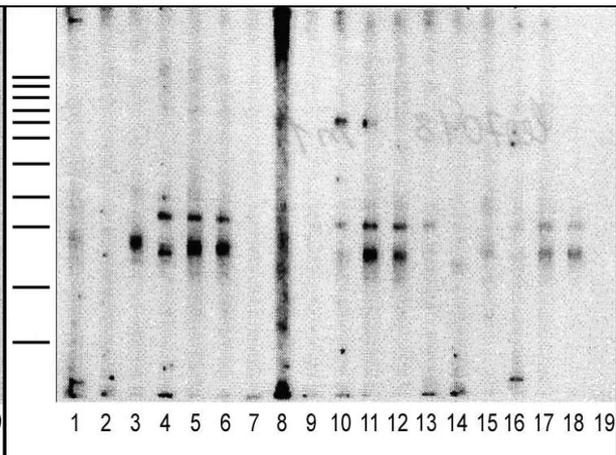
Jede Membranspur steht für ein Serum und trägt eine fortlaufende Nummer von 1 bis 19. Auf jeder Nitrozellulosemembran wurden 18 Serumproben untersucht. Außerdem wurde immer eine Negativkontrolle verwendet. Die **Tabellen 3.1 bis 3.4** zu jeder Abbildung zeigen die Serumverteilung auf der Nitrozellulosemembran. Seitlich befinden sich die Markierungen der 10 kDa Protein-Leiter von 20 kDa bis 120 kDa in 10 kDa-Schritten.

Es wurden 96 Seren von frisch manifesten Patienten mit Typ-1-Diabetes und 72 Seren von gesunden Kontrollpersonen im Alter von 18 bis 40 Jahren untersucht (s. **Tab. 2.1c**).

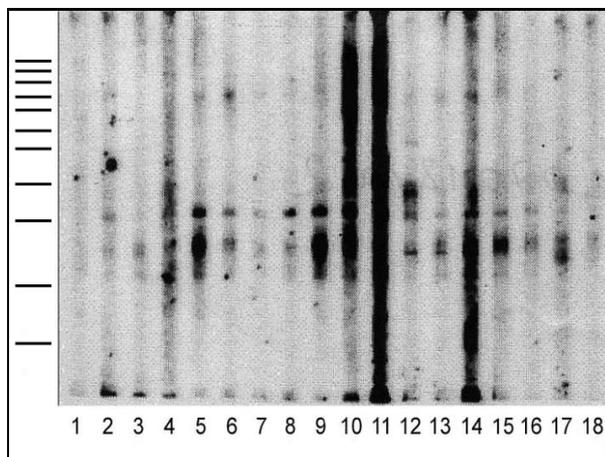
Membran 1



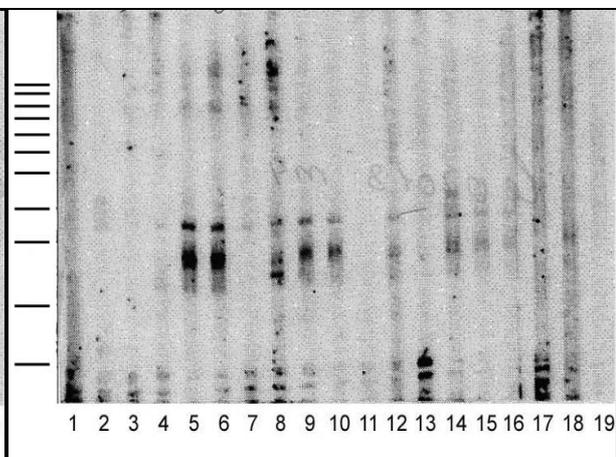
Membran 2



Membran 3



Membran 4

**Abb. 3.7 Western Blot Membranen 1-4.**

Auf der Membran 1 befindet sich das Standardserum auf den Membranspuren 5-6, 9-10 und 17-18 in den Verdünnungen 1:300, 1:500 und 1:1000.

Auf der Membran 2 befindet sich das Standardserum auf den Membranspuren 5-6, 11-12 und 17-18 in den oben angegebenen Verdünnungen.

Auf der Membran 3 befindet sich das Standardserum auf den Membranspuren 5-6, 8-9 und 15-16 in den oben angegebenen Verdünnungen.

Auf der Membran 2 befindet sich das Standardserum auf den Membranspuren 5-6, 9-10 und 15-16 in den oben angegebenen Verdünnungen.

Die Negativkontrolle befindet sich auf den Membranen 1,2 und 4 jeweils auf der Membranspur 19, auf der Membran 3 - auf der Spur 18.

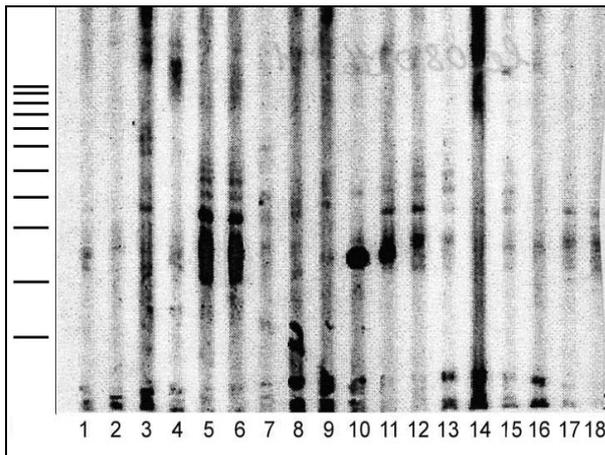
Auf den übrigen Spuren jeder Membran sind abwechselnd Seren von Patienten mit Typ-1-Diabetes und Kontrollpersonen verteilt.

Die genaue Verteilung der Proben auf den Membranen ist in der Tab. 3.1 angegeben

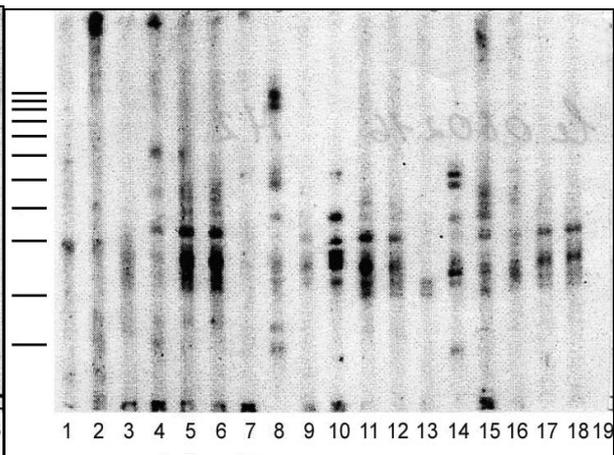
Membran 1		Membran 2		Membran 3		Membran 4	
Spur	Inhalt	Spur	Inhalt	Spur	Inhalt	Spur	Inhalt
1	T1D	1	T1D	1	T1D	1	T1D
2	K	2	K	2	K	2	K
3	T1D	3	T1D	3	T1D	3	T1D
4	K	4	K	4	K	4	K
5	S 1:300						
6	S 1:300						
7	T1D	7	T1D	7	T1D	7	T1D
8	K	8	K	8	S 1:500	8	K
9	S 1:500	9	T1D	9	S 1:500	9	S 1:500
10	S 1:500	10	K	10	K	10	S 1:500
11	T1D	11	S 1:500	11	T1D	11	T1D
12	K	12	S 1:500	12	K	12	K
13	T1D	13	T1D	13	T1D	13	T1D
14	K	14	K	14	K	14	K
15	T1D	15	T1D	15	S 1:1000	15	S 1:1000
16	K	16	K	16	S 1:1000	16	S 1:1000
17	S 1:1000	17	S 1:1000	17	T1D	17	T1D
18	S 1:1000	18	S 1:1000	18	NK	18	K
19	NK	19	NK			19	NK

Tab. 3.1: Die genaue Verteilung der Probenseren auf den Western Blot Membranen 1-4 (Abb. 3.7). T1D= Serum eines Patienten mit Typ-1-Diabetes, K= Serum einer Kontrollperson, NK= Negativkontrolle, S= Standardserum mit der entsprechenden Verdünnung

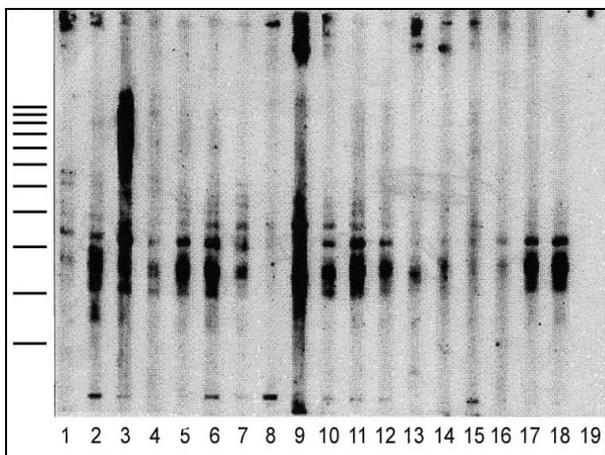
Membran 5



Membran 6



Membran 7



Membran 8

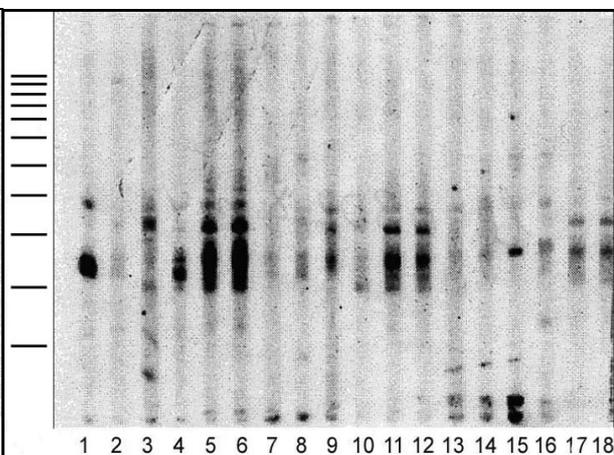


Abb. 3.8: Western Blot Membranen 5-8.

Auf den Membranen 5-8 befindet sich das Standardserum auf den Membranspuren 5-6, 11-12 und 17-18 in den Verdünnungen 1:300, 1:500 und 1:1000.

Die Negativkontrolle befindet sich auf den Membranen 1 und 4 jeweils auf der Membranspur 19, auf der Membran 2 und 3 – jeweils auf der Spur 1.

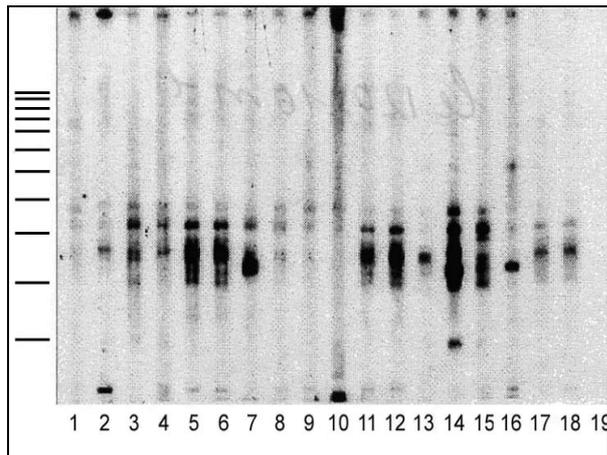
Auf den übrigen Spuren jeder Membran sind abwechselnd Seren von Patienten mit Typ-1-Diabetes und Kontrollpersonen verteilt.

Die genaue Verteilung der Proben auf den Membranen ist in der Tab. 3.2 angegeben

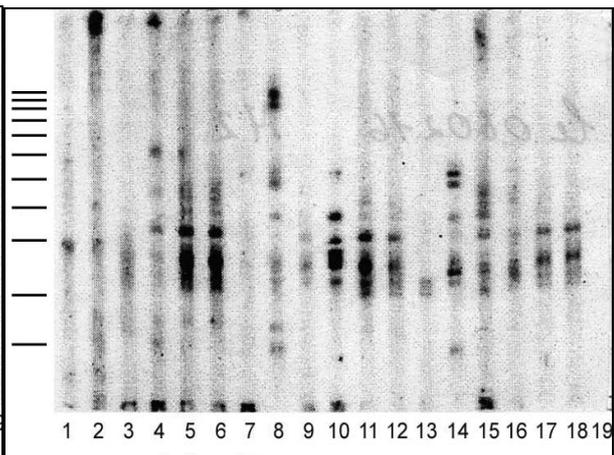
Membran 5		Membran 6		Membran 7		Membran 8	
Spur	Inhalt	Spur	Inhalt	Spur	Inhalt	Spur	Inhalt
1	NK	1	T1D	1	T1D	1	NK
2	K	2	K	2	K	2	K
3	T1D	3	T1D	3	T1D	3	T1D
4	K	4	K	4	K	4	K
5	S 1:300						
6	S 1:300						
7	T1D	7	T1D	7	T1D	7	T1D
8	K	8	K	8	K	8	K
9	T1D	9	T1D	9	T1D	9	T1D
10	K	10	K	10	K	10	K
11	S 1:500						
12	S 1:500						
13	T1D	13	T1D	13	T1D	13	T1D
14	K	14	K	14	K	14	K
15	T1D	15	T1D	15	T1D	15	T1D
16	K	16	K	16	K	16	K
17	S 1:1000						
18	S 1:1000						
		19	NK	19	NK		

Tab. 3.2: Die genaue Verteilung der Probenseren auf den Western Blot Membranen 5-8 (Abb. 3.8). T1D= Serum eines Patienten mit Typ-1-Diabetes, K= Serum einer Kontrollperson, NK= Negativkontrolle, S= Standardserum mit der entsprechenden Verdünnung

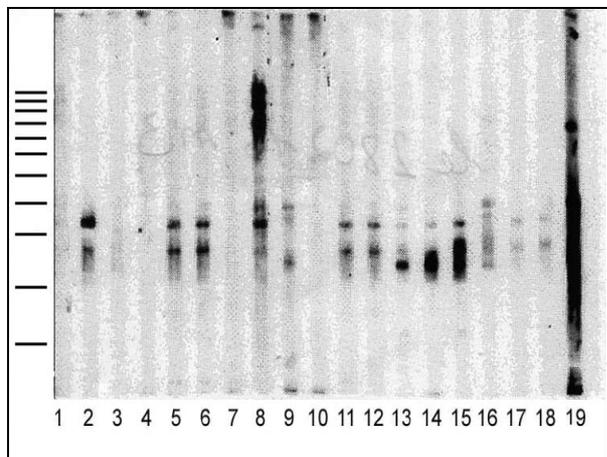
Membran 9



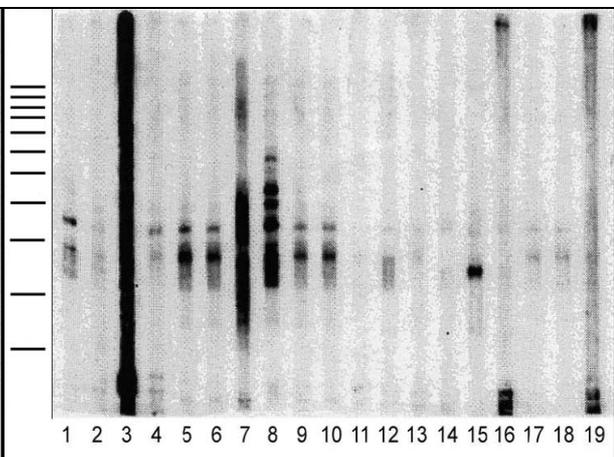
Membran10



Membran 11



Membran 12

**Abb. 3.9: Western Blot Membranen 9-12.**

Auf den Membranen 9-11 befindet sich das Standardserum auf den Membranspuren 5-6, 11-12 und 17-18 in den Verdünnungen 1:300, 1:500 und 1:1000. Auf der Membran 12 befindet sich das

Standardserum in den oben genannten Verdünnungen auf den Membranspuren 6-7, 12-13 und 17-18. Die Negativkontrolle befindet sich auf den Membranen 9 bis 11 jeweils auf der Membranspur 19, auf der Membran 12 – auf der Spur 1.

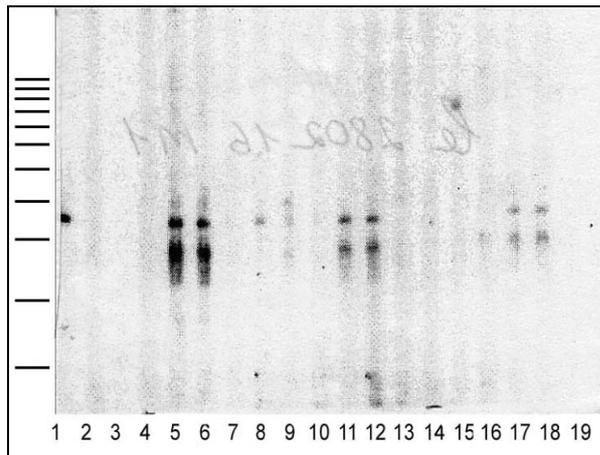
Auf den übrigen Spuren jeder Membran sind abwechselnd Seren von Patienten mit Typ-1-Diabetes und Kontrollpersonen verteilt.

Die genaue Verteilung der Proben auf den Membranen ist in der Tab. 3.3 angegeben

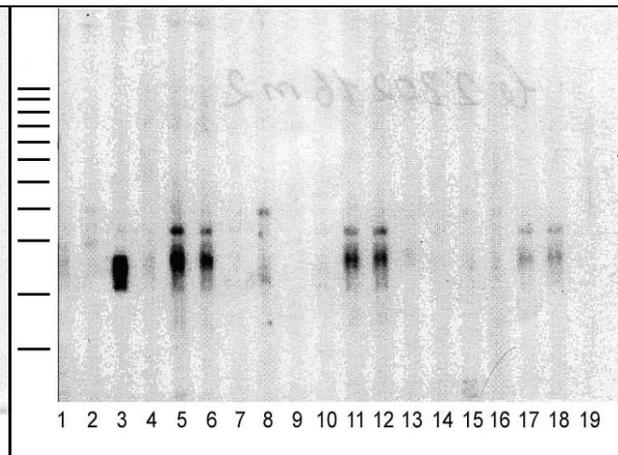
Membran 9		Membran 10		Membran 11		Membran 12	
Spur	Inhalt	Spur	Inhalt	Spur	Inhalt	Spur	Inhalt
1	T1D	1	T1D	1	T1D	1	NK
2	K	2	K	2	K	2	T1D
3	T1D	3	T1D	3	T1D	3	K
4	K	4	K	4	K	4	T1D
5	S 1:300	5	S 1:300	5	S 1:300	5	K
6	S 1:300	6	S 1:300	6	S 1:300	6	S 1:300
7	T1D	7	T1D	7	T1D	7	S 1:300
8	K	8	K	8	K	8	T1D
9	T1D	9	T1D	9	T1D	9	K
10	K	10	K	10	K	10	T1D
11	S 1:500	11	S 1:500	11	S 1:500	11	K
12	S 1:500	12	S 1:500	12	S 1:500	12	S 1:500
13	T1D	13	T1D	13	T1D	13	S 1:500
14	K	14	K	14	K	14	T1D
15	T1D	15	T1D	15	T1D	15	K
16	K	16	K	16	K	16	T1D
17	S 1:1000	17	S 1:1000	17	S 1:1000	17	S 1:1000
18	S 1:1000	18	S 1:1000	18	S 1:1000	18	S 1:1000
19	NK	19	NK	19	NK		

Tab. 3.3: Die genaue Verteilung der Probenseren auf den Western Blot Membranen 9-12 (Abb. 3.9). T1D= Serum eines Patienten mit Typ-1-Diabetes, K= Serum einer Kontrollperson, NK= Negativkontrolle, S= Standardserum mit der entsprechenden Verdünnung

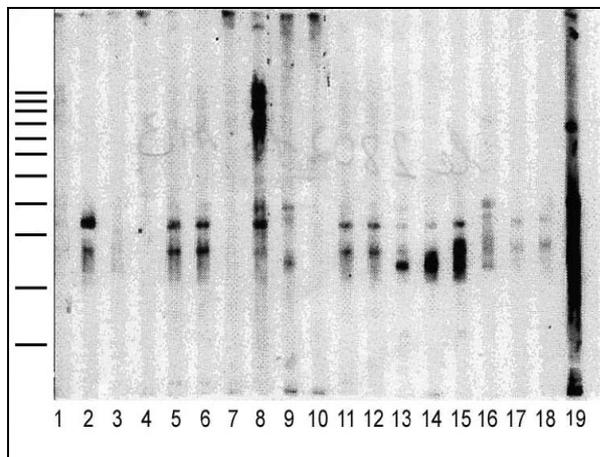
Membran 13



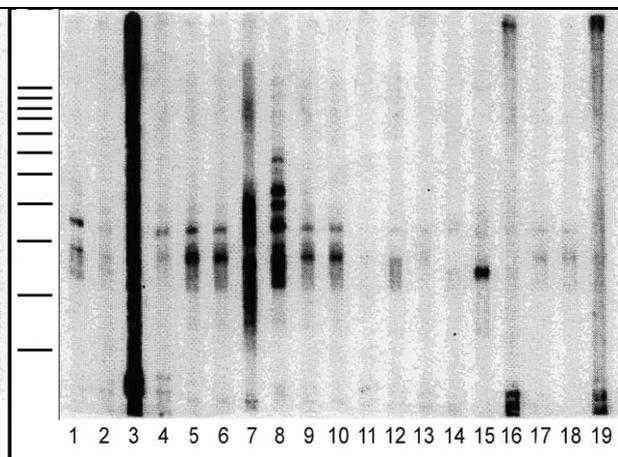
Membran14



Membran 15



Membran 16

**Abb. 3.10: Western Blot Membranen 13-16.**

Auf den Membranen 13-15 befindet sich das Standardserum auf den Membranspuren 5-6, 11-12 und 17-18 in den Verdünnungen 1:300, 1:500 und 1:1000. Auf der Membran 16 befindet sich das

Standardserum in den oben genannten Verdünnungen auf den Membranspuren 5-6, 9-10 und 17-18. Die Negativkontrolle befindet sich auf den Membranen 13 und 14 jeweils auf der Membranspur 19, auf der Membran 15 – auf der Spur 1 und auf der Membran 16 – auf der Spur 14. Auf den übrigen Spuren jeder Membran sind abwechselnd Seren von Patienten mit Typ-1-Diabetes und Kontrollpersonen verteilt. Die genaue Verteilung der Proben auf den Membranen ist in der Tab. 3.4 angegeben

Membran 13		Membran 14		Membran 15		Membran 16	
Spur	Inhalt	Spur	Inhalt	Spur	Inhalt	Spur	Inhalt
1	T1D	1	T1D	1	NK	1	T1D
2	K	2	K	2	K	2	K
3	T1D	3	T1D	3	T1D	3	T1D
4	K	4	K	4	K	4	K
5	S 1:300						
6	S 1:300						
7	T1D	7	T1D	7	T1D	7	T1D
8	K	8	K	8	K	8	K
9	T1D	9	T1D	9	T1D	9	S 1:500
10	K	10	K	10	K	10	S 1:500
11	S 1:500	11	S 1:500	11	S 1:500	11	T1D
12	S 1:500	12	S 1:500	12	S 1:500	12	K
13	T1D	13	T1D	13	T1D	13	T1D
14	K	14	K	14	K	14	NK
15	T1D	15	T1D	15	T1D	15	T1D
16	K	16	K	16	K	16	K
17	S 1:1000						
18	S 1:1000						
19	NK	19	NK	19	K	19	T1D

Tab. 3.4: Die genaue Verteilung der Probenseren auf den Western Blot Membranen 13-16 (Abb. 3.10). T1D= Serum eines Patienten mit Typ-1-Diabetes, K= Serum einer Kontrollperson, NK= Negativkontrolle, S= Standardserum mit der entsprechenden Verdünnung

3.2.2

Vergleich der Serumreaktivität bei Patienten mit Typ-1-Diabetes und Kontrollpersonen im Western Blot

Im Western Blot wurden Gesamt-IgG-Reaktionen der Seren von beiden aufgeführten Gruppen gegen einzelne Subfraktionen des Glutens untersucht und verglichen. Die Reaktivität der Seren ist auf den **Abbildungen 3.7-3.10** in Form von Banden zu sehen. Die Messung und Auswertung erfolgte mit der integrierten Software des Lumi Imager®.

Der Vergleich der Reaktionen gegen die einzelnen Subfraktionen des Glutens innerhalb eines Serums sowie der Seren untereinander war durch die Verwendung eines Standardserums möglich. Die Reaktion des Standardserums im Bereich von 43 kDa wurde im Auswertungsprogramm des Lumi Imager® als 1 eingegeben. Die Reaktion der Seren gegen Glutensubfraktionen wurde immer in Relation zur Reaktion des Standardserums bei 43 kDa in der Verdünnung 1:500 zu sehen, gesetzt und somit unabhängig von den einzelnen Membranbedingungen und untereinander vergleichbar gemacht.

3.2.2.1

Vergleich anhand der Anzahl der Reaktionsbanden

Bei den Diagrammen (**Abb. 3.11** und **Abb. 3.12**) handelt es sich um einen semiquantitativen Vergleich der beiden Gruppen (frisch manifeste Patienten mit Typ-1-Diabetes und gesunde Kontrollpersonen) im Alter von 18 bis 40 Jahren bezüglich der Aktivität der IgG-Antikörper im Serum gegen einzelne Gluten-Proteine, die sich im Western Blot als ECL-aktive Banden darstellen. Kleinster über dem Hintergrund gemessener Wert lag bei 0,043.

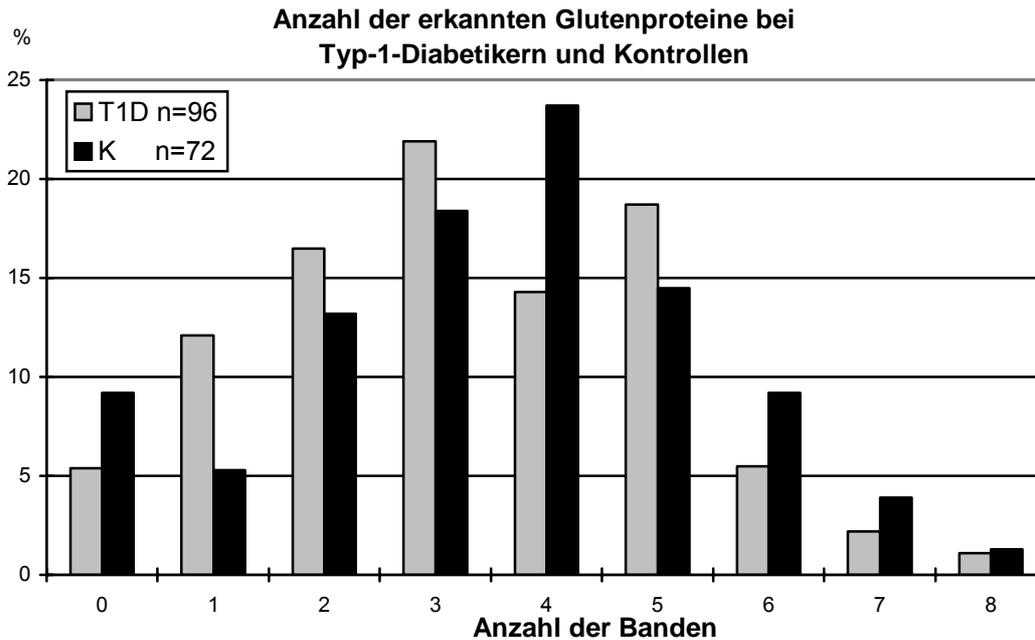


Abb. 3.11: Vergleich der IgG-Reaktivität gegen Gluten anhand der Anzahl der erkannten Proteine bei Patienten mit Typ-1-Diabetes (T1D) und Kontrollpersonen (K) im Western Blot. Angegeben sind die Mittelwerte (Balken)

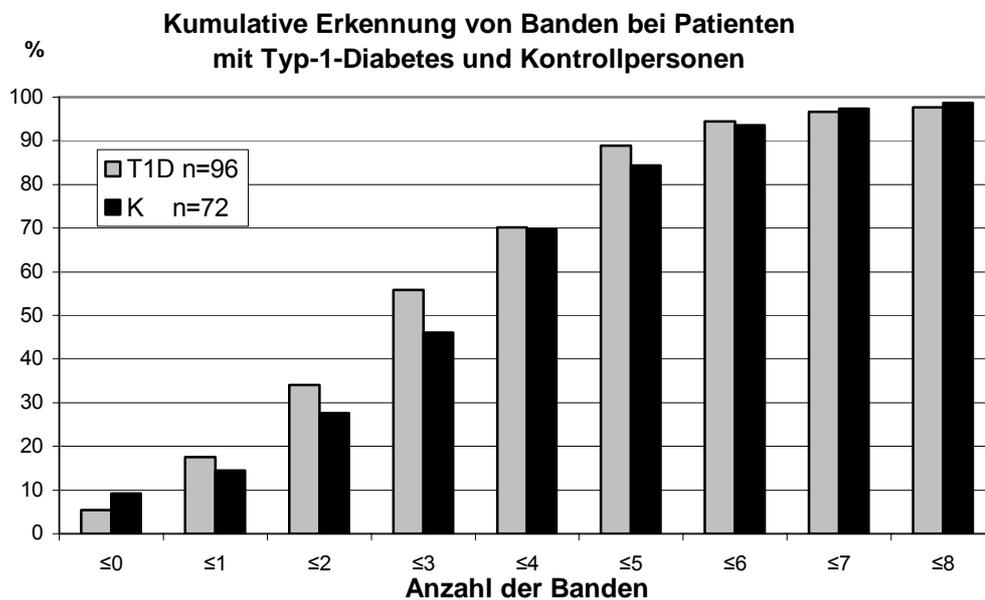


Abb. 3.12: Kumulative Bandenerkennung im Western Blot zum Vergleich der humoralen Immunantwort (IgG-Antikörper) bei Patienten mit Typ-1-Diabetes (T1D) und Kontrollpersonen (K). Angegeben sind die Mittelwerte (Balken)

Anhand der Vergleiche der Anzahl der erkannten Proteinbanden (**Abb. 3.11**) konnte keine richtungsweisende Tendenz nachgewiesen werden.

Auch bei dem Vergleich der kumulativen Erkennung von unterschiedlichen Banden (**Abb. 3.12**) ließen sich in beiden Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellen ($p > 0,05$).

3.2.2.2

Vergleich der Antikörperaktivität gegen einzelne Banden

Beim Vergleich der Antikörperreaktivität gegen einzelne Proteinbanden in beiden Gruppen waren geringe Unterschiede bei der Erkennung einzelner Banden zu verzeichnen (**Abb. 3.13**). Es lag aber in allen Fällen keine statistische Signifikanz vor ($p > 0,05$).

Auch der Vergleich innerhalb beider Altersgruppen (18 bis 29 und 30 bis 40 Jahre) sowie innerhalb der Geschlechtsgruppen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p > 0,05$ in allen Vergleichen, **Abb. 3.14-3.17**). Im Vergleich der männlichen Patienten mit Typ-1-Diabetes und Kontrollpersonen zeigten sich zwar größere Unterschiede im Bereich der Banden 38 kDa und 43 kDa, aber keine statistische Signifikanz ($p = 0,09$ und $p = 0,08$, **Abb. 3.16**).

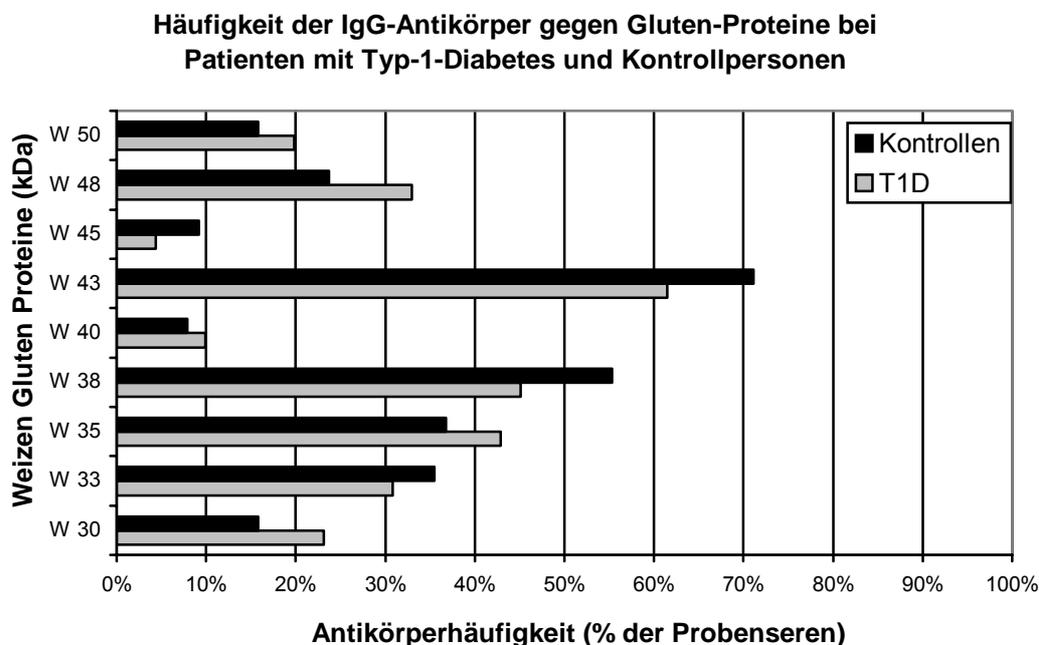


Abb. 3.13: Vergleich der IgG-Antikörperhäufigkeit gegen die Glutensubfraktionen bei Patienten mit Typ-1-Diabetes (T1D) und Kontrollpersonen (K). Angegeben sind die Mittelwerte (Balken)

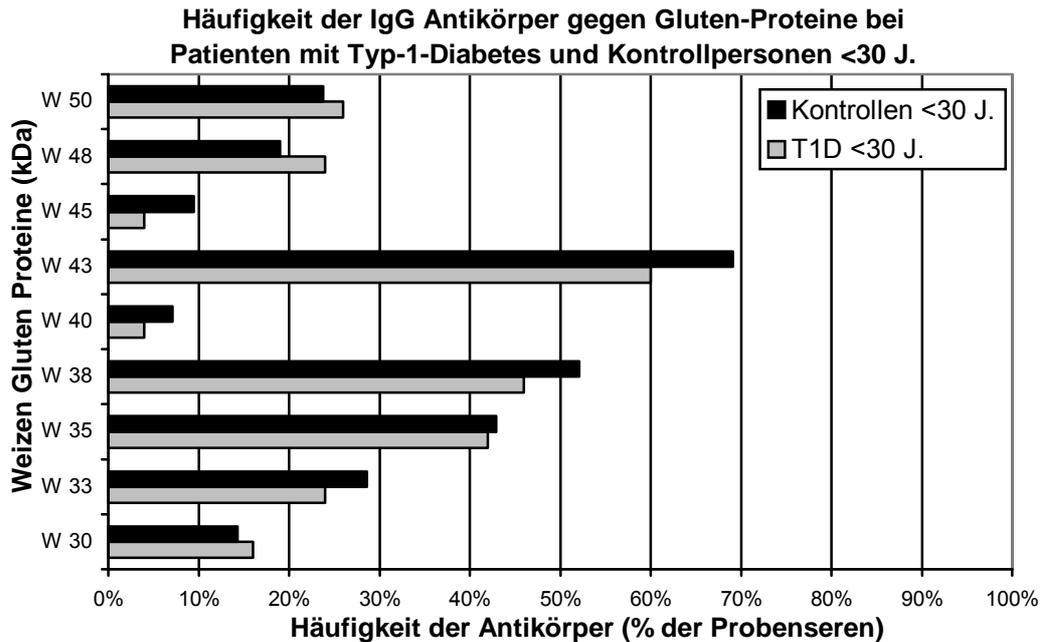


Abb. 3.14: Vergleich der IgG-Antikörperhäufigkeit gegen die Glutensubfraktionen bei Patienten mit Typ-1-Diabetes (T1D) ($n=52$) und Kontrollpersonen (K) <30J ($n=38$). Angegeben sind die Mittelwerte (Balken)

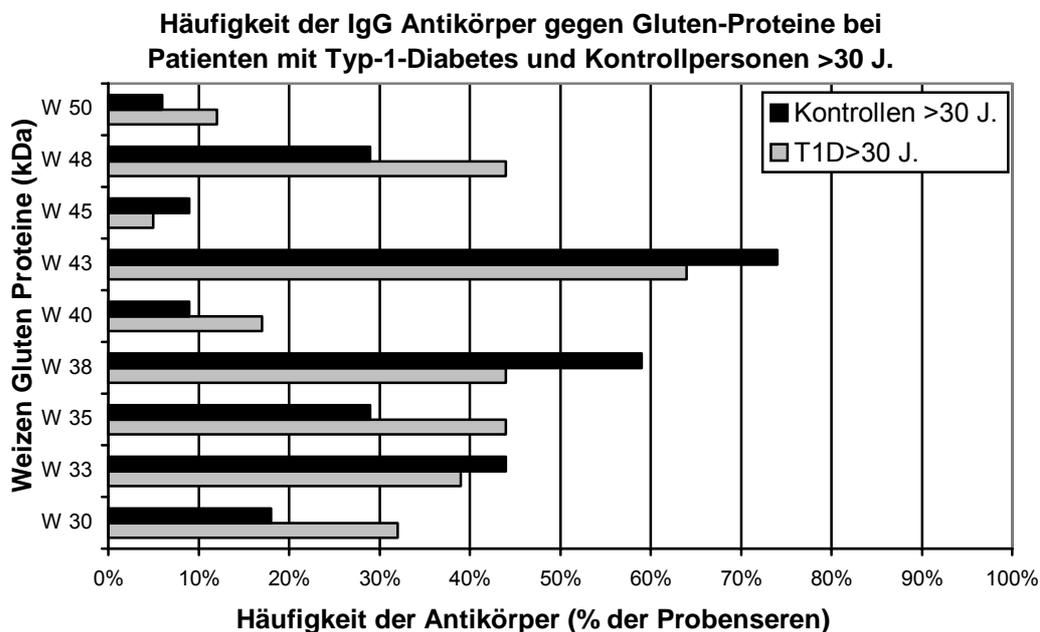


Abb. 3.15: Vergleich der IgG-Antikörperhäufigkeit gegen die Glutensubfraktionen bei Patienten mit Typ-1-Diabetes (T1D) ($n=44$) und Kontrollpersonen (K) >30J ($n=34$). Angegeben sind die Mittelwerte (Balken)

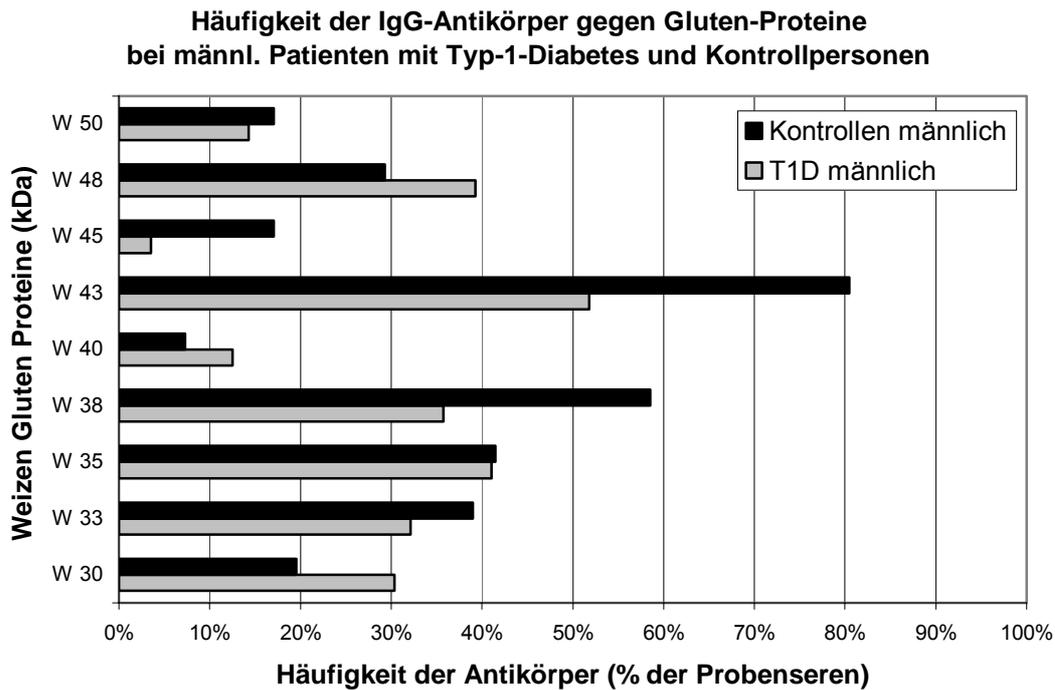


Abb. 3.16: Vergleich der IgG-Antikörperhäufigkeit gegen die Glutensubfraktionen bei männlichen Patienten mit Typ-1-Diabetes (T1D) (n=56) und Kontrollpersonen (K) (n=41). Angegeben sind die Mittelwerte (Balken)

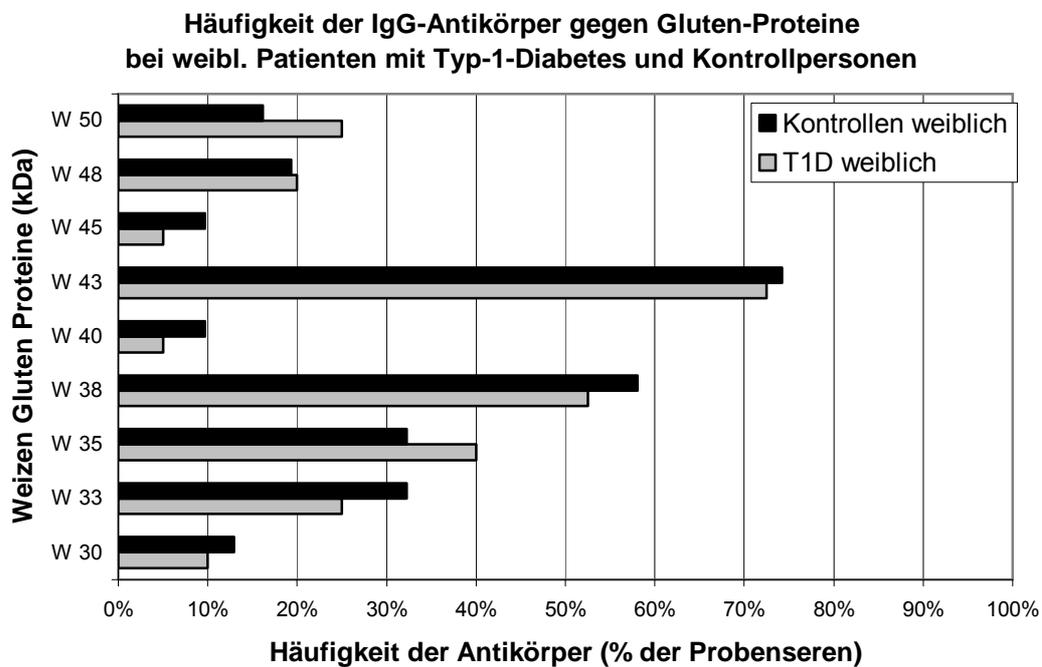


Abb. 3.17: Vergleich der IgG-Antikörperhäufigkeit gegen die Glutensubfraktionen bei weiblichen Patienten mit Typ-1-Diabetes (T1D) (n=40) und Kontrollpersonen (K) (n=31). Angegeben sind die Mittelwerte (Balken)

3.2.2.3

Vergleich anhand der durchschnittlichen IgG-Antikörper-Reaktivität (ECL-Aktivität)

Beim Vergleich der frisch manifesten Patienten mit Typ-1-Diabetes und der gesunden Kontrollpersonen (**Abb. 3.18**) bezüglich der im Lumi Imager bestimmten Stärke der Antikörperreaktivität mit einzelnen Banden zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

In der Altersgruppe >30 Jahre zeigte sich eine erhöhte IgG-Antikörperreaktivität in der Diabetiker-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe bei 43 kDa- und 35 kDa. Im Bereich 30 kDa, 33 kDa und 48 kDa stellte sich dagegen eine verstärkte Reaktion bei den Kontrollen dar (**Abb. 3.19**). In beiden Fällen lag im Student-t-Test aber keine statistische Signifikanz vor ($p > 0,05$).

Die **Abbildung 3.20** zeigt den Vergleich bei den Probanden im Alter unter 30 Jahren. Die IgG-Gesamtreaktivität ist im Bereich 40,43 und 48 kDa bei Diabetikern gegenüber den Kontrollpersonen statistisch signifikant erhöht ($p < 0,05$). Bei den Kontrollpersonen in dieser Altersgruppe ist eine höhere durchschnittliche Aktivität bei 33 und 48 kDa zu verzeichnen. Da in beiden Fällen $p > 0,05$ liegt, lag keine statistische Signifikanz vor (**Abb. 3.20**).

Insgesamt lagen somit geringe Unterschiede zwischen den beiden Gruppen vor, die aber keine richtungweisende Tendenz erkennen ließen.

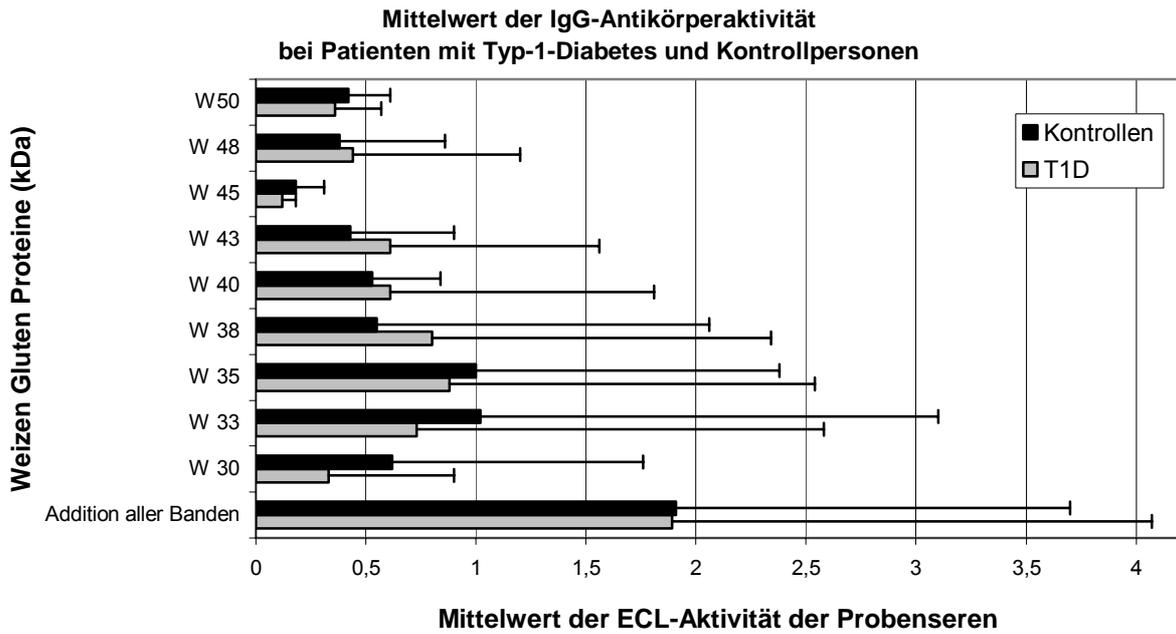


Abb. 3.18: Vergleich der Bandenintensität (ECL-Aktivität), die der IgG-Aktivität gegen Glutensubfraktionen bei Patienten mit Typ-1-Diabetes (T1D) und Kontrollpersonen (K) entspricht. Angegeben sind Mittelwerte (Balken) und Standardabweichung (waagerechte Linie)

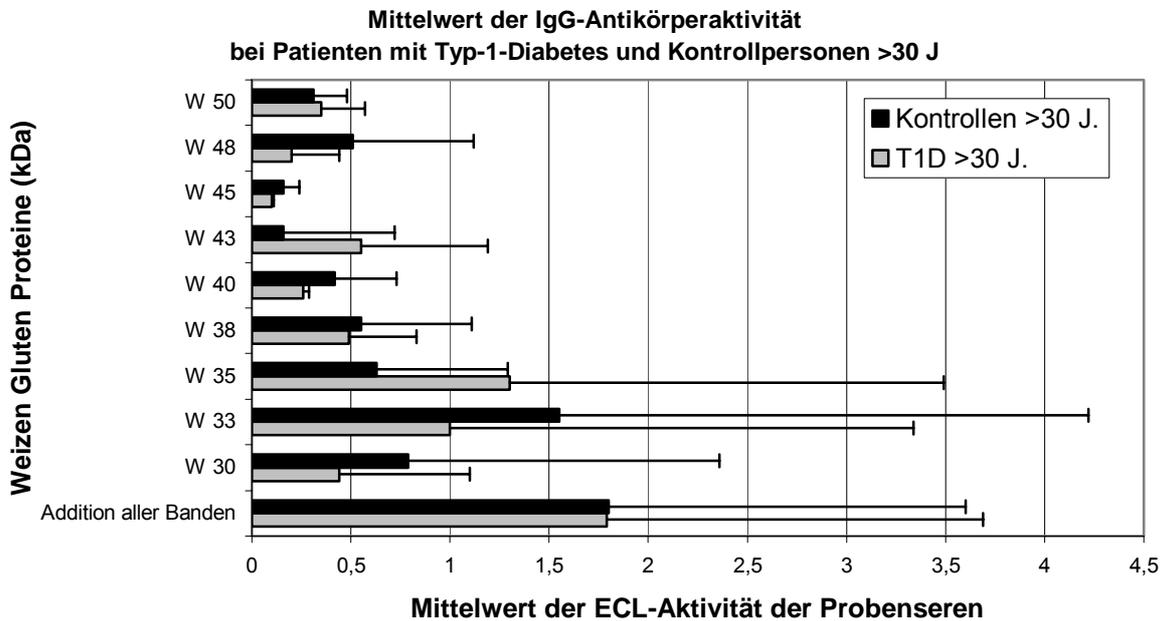


Abb. 3.19: Vergleich der Bandenintensität (ECL-Aktivität), die der IgG-Aktivität gegen Glutensubfraktionen bei Patienten mit Typ-1-Diabetes (T1D) und Kontrollen (K) >30J. entspricht. Angegeben sind Mittelwerte (Balken) und Standardabweichung (waagerechte Linie)

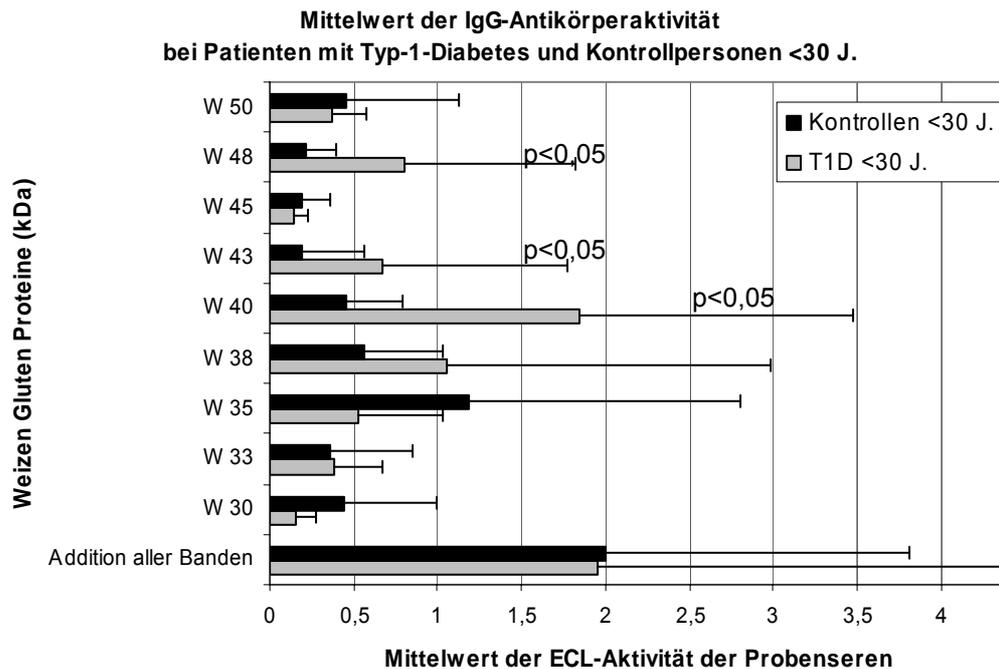


Abb. 3.20: Vergleich der Bandenintensität (ECL-Aktivität), die der IgG-Aktivität gegen Glutensubfraktionen bei Patienten mit Typ-1-Diabetes (T1D) und Kontrollen (K) <30J. entspricht. Angegeben sind Mittelwerte (Balken) und Standardabweichung (waagerechte Linie)

3.2.2.4

Verhältnis der IgG-Aktivität im Bereich 33 und 38 kDa zur Aktivität aller Banden

Es lagen außerdem Erkenntnisse vor, dass besonders im Bereich von 33-46 kDa Reaktivitätsunterschiede gegen Gluten bei Patienten mit Typ-1-Diabetes und Kontrollpersonen vorliegen (MACFARLANE et al. 2003). Aus diesem Grund wurde zusätzlich ein Vergleich der Verhältnisse der Reaktivität im Bereich 33 und 38 kDa zur Reaktivität aller Banden aufgestellt (**Abb. 3.21**). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student-t-Test. Auch hier zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede, weder zwischen den einzelnen Altersgruppen der Patienten mit Typ-1-Diabetes und Kontrollen, noch in der Gesamtgruppe ($p > 0,05$).

Verhältnis der IgG-Aktivität im Bereich 33+38 kDa
zur Aktivität aller Banden

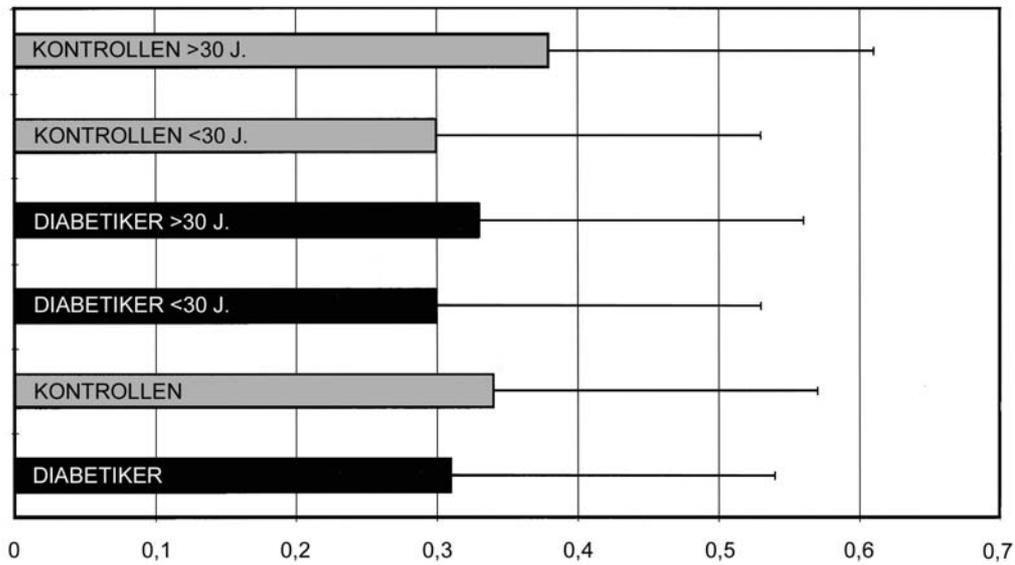


Abb. 3.21: Verhältnis der IgG-Aktivität gegen Gluten im Bereich 33 und 38 kDa zur IgG-Aktivität aller Banden bei Patienten mit Typ-1-Diabetes und Kontrollpersonen im Western Blot. Die Balken geben den Mittelwert pro Gruppe an

4.

Diskussion

4.1

Humorale Immunantwort gegen Gluten bei Patienten mit Typ-1-Diabetes

4.1.1

Das Vorliegen der Antikörper gegen den Nahrungsbestandteil Gluten ist beim Menschen nicht pathologisch

Serum-Antikörper gegen Gluten können nicht nur bei Zöliakie-Patienten und Menschen mit einer Überempfindlichkeit gegen Weizen nachgewiesen werden. Auch bei Gesunden liegt eine humorale Immunität gegen Weizen bzw. Gluten vor (PENTTILA et al. 1991, BARNES 1995). Durch die eigenen Analysen konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Sowohl bei Patienten mit Typ-1-Diabetes als auch bei Kontrollpersonen waren Antikörper gegen Gluten mit ELISA und Western Blot nachweisbar. Im Western Blot war ein individuelles Bandenprofil der Seren beider Gruppen zu erkennen (**Abb. 3.7-3.10**). Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Nahrungsmittelantikörper-Analysen überein (BLAZER et al. 1984, LA BROOY et al. 1986).

Auch BARNES und KEMENY betonen, dass IgG-Antikörper gegen Nahrungsantigene wie z.B. das Gluten auch bei Gesunden vorhanden sind und kein Hinweis oder gar diagnostisches Kriterium für Nahrungsmittelintoleranz oder Allergie sind (BARNES 1995, KEMENY et al. 1986).

RUMBO et al. zeigten 1998, dass Gluten-Antikörper bei Gesunden nicht nur im Serum, sondern auch in verschiedenen Körpersekreten zu finden sind (RUMBO et al. 1998).

Frühere Studien, die sich mit dem Nachweis von IgG-Antikörpern und insbesondere IgG 4-Antikörpern gegen Nahrungsantigene befasst haben, zeigten, dass diese IgG-Subklassen bei gesunden Kindern und Erwachsenen nachweisbar sind. Sie sind somit ebenfalls ein Teil der normalen Immunantwort (MERRET et al. 1983, HUSBY et al. 1985, BARNES et al. 1988).

BARNES et al. stellten dar, dass die humanen Seren jeweils spezifisch gegen eines der Nahrungsantigene (Gliadin, Casein oder Ovalbumin) sind und keine Kreuzreaktivität zeigen. Dies ist ein Hinweis auf die Spezifität der humoralen Immunantwort gegen ein Nahrungsantigen (BARNES et al. 1988).

Die zum Teil erhöhten Antikörpertiter gegen verschiedene Nahrungsantigene bei Zöliakie-Patienten werden mit einem erhöhten Antigentransport durch die gestörte Darmmukosa aufgrund erhöhter Permeabilität und nicht mit einer spezifischen Immunreaktion, die ätiopathogenetische Bedeutung haben könnte, erklärt (KEMENY et al. 1986). Auf ähnliche Weise könnten die eventuellen Unterschiede in der Reaktion der Patienten mit Typ-1-Diabetes und Gesunden bezüglich der Nahrungsantigene wie Milch und Gluten entstehen.

4.1.2

Keine Unterschiede in der humoralen Immunantwort gegen Gluten bei Patienten mit Typ-1-Diabetes und Kontrollpersonen im ELISA

Das Ziel dieser Arbeit war vorwiegend die Analyse der humoralen Immunantwort gegen Gluten bei frisch manifesten Patienten mit Typ-1-Diabetes und relevanten Kontrollpersonen. Die erste Methode, die zur Anwendung kam, war ein ELISA.

In dieser Arbeit wurden Seren von 47 frisch manifesten Patienten mit Typ-1-Diabetes und 61 gesunden Kontrollpersonen auf IgG-Antikörperreaktivität gegen Gluten untersucht und verglichen. Von den 47 Patienten mit Typ-1-Diabetes waren 16 weiblich und 31 männlich, in der Kontrollgruppe entsprechend 17 weiblich und 44 männlich. Die Gruppe der Patienten mit Typ-1-Diabetes bestand aus 23 Patienten unter 30 Jahren und 24 Patienten über 30 Jahren. Die Gruppe der Kontrollpersonen bestand aus 19 Personen unter 30 Jahren und 42 Personen über 30 Jahren (**Tab. 2.1.a**).

Die beiden Gruppen waren somit hinsichtlich der Geschlechts- und Altersverteilung gut gematcht, womit demographische Einflussfaktoren bei der Bewertung der einzelnen Ergebnisse minimiert werden konnten.

Trotz dieser exakten Auswahl der Seren konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) der IgG-Antikörper-Titer gegen Gluten zwischen den Patienten mit Typ-1-Diabetes und den Kontrollpersonen nachgewiesen werden.

Vorteile des ELISA-Verfahrens sind zum einen eine Anwendbarkeit bei hoher Probenanzahl, eine kurze Testdauer und eine hohe Sensitivität der Antikörperbindung. Zum anderen besteht auch die Möglichkeit, verschiedene Antikörpertypen und auch -subtypen zu determinieren.

Ein Nachteil der Methode ist, dass man zwischen Antikörpern hoher und niedriger Affinität nicht unterscheiden kann (KARJALAINEN et al. 1992). Affinitätsbestimmungen können mit einem heterogenen Proteingemisch wie Gluten nicht durchgeführt werden.

Einen anderen Aspekt stellen Idiotyp-Antikörper dar. So wurde vor kurzem eine Arbeit publiziert, die Antikörper gegen Nahrungsproteine bei Diabetikern und Kontrollpersonen untersucht. Dabei wurden 52 junge Patienten mit Typ-1-Diabetes im Alter von durchschnittlich 14,5 Jahren mit mittlerer Erkrankungsdauer von fünf Jahren und 41 gesunde altersgematchte Kontrollpersonen auf das Vorliegen von IgG- und IgA-Antikörpern gegen Kuhmilchproteine (bovines Serumalbumin und β -Lactoglobulin) und das Ovalbumin untersucht. Es zeigten sich signifikant höhere Antikörpertiter beider Klassen gegen alle drei Antigene in der Gruppe der Patienten mit Typ-1-Diabetes. Die sehr unterschiedlichen und zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse der Bestimmung der Antikörpertiter gegen Nahrungsantigene bei anderen Autoren erklären KOHNO et al. unter anderem mit dem Vorhandensein von Idiotyp-Antikörpern, die das ELISA-Ergebnis verfälschen können. Die Autoren weisen auch auf die geringe Sensitivität des üblichen ELISA-Verfahrens beim Nachweis von Serumantikörpern gegen Nahrungsantigene hin. Daher wurde von KOHNO et al. ein spezielles 300fach sensitiveres ELISA-Verfahren (so genannter immune-complex transfer enzyme immunoassay) angewandt (KOHNO et al. 2002). Außer in Sonderfällen kommen Idiotyp-Antikörper nur in niedriger Konzentration vor und sollten beim auf der Festphase vorliegenden Antigenüberschuss im ELISA kaum einen Störfaktor darstellen. Auch in unserer Studie könnte der Störfaktor Idiotyp-Antikörper eine Rolle gespielt haben.

In der vorliegenden Arbeit wurden nur Antikörper der Klasse IgG gegen Gluten bei Patienten mit Typ-1-Diabetes und Kontrollpersonen untersucht, da diese Antikörperklasse valide nachgewiesen werden kann und einen wichtigen Stellenwert im Rahmen der Immunbalance hat. Vermutlich hätten auch Antikörper der Klasse IgA gegen Gluten nachgewiesen werden können. Diese unterliegen aber starken Schwankungen und sind nicht immer valide in länger aufbewahrten Seren nachweisbar. Schwerpunkt unserer Arbeit war die Analyse der Antikörperreaktion gegen die einzelnen Subfraktionen des Glutens, welche nur mit höhertitrigen IgG-Antikörpern sicher durchführbar war.

Gluten ist ein Proteingemisch und so sind die Antikörpertiter Summenantworten gegen die einzelnen Glutensubfraktionen. Falls jedoch Unterschiede in der Immunantwort bestehen, gingen diese in der Summenreaktivität der Seren unter und waren somit nicht nachweisbar. Auch die einzelnen IgG-Subklassen blieben so unberücksichtigt.

So wurde es im zweiten Schritt dieser Arbeit notwendig, die humorale Immunantwort (IgG-Antikörper) gegen einzelne Gluten-Subfraktionen zu untersuchen, um Unterschiede in beiden Gruppen nachzuweisen.

4.1.3

Keine Unterschiede in der IgG-Subklassen-Analyse zwischen Patienten mit Typ-1-Diabetes und Kontrollpersonen

Die IgG-Immunantwort der Seren bei der oben beschriebenen Untersuchung ergibt sich aus der Reaktivität aller vier IgG-Subklassen. Daher war es wichtig die humorale Immunantwort gegen Gluten, bezogen auf einzelne IgG-Subklassen, zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurden jeweils 20 Seren von frisch manifesten Patienten mit Typ-1-Diabetes und Kontrollpersonen auf die IgG-Subklassen IgG₁, IgG₂ und IgG₄ untersucht. Der direkte Vergleich der IgG-Subklassen-Reaktivität im ELISA zeigte keine wesentlichen Unterschiede in den beiden Gruppen für alle untersuchten IgG-Subklassen.

Interessant war jedoch das Verhältnis der Subklassen zueinander, die mit unterschiedlichen Immunantwortqualitäten (Th1- oder Th2-Immunantwort) assoziiert sind. Besonders hervorzuheben war das Verhältnis IgG₁ zur Summe der ELISA-Reaktivität für IgG₂ und IgG₄. Dieser Vergleich zeigte ein leicht erhöhtes Verhältnis der IgG-Subklassen bei Patienten mit Typ-1-Diabetes im Vergleich zu Kontrollpersonen, aber keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,5$).

Die Unterschiede bei den IgG-Subklassen können Hinweise auf die Qualität der Immunantwort (Th1- oder Th 2-Reaktion) geben (KATZ et al. 1995). So gibt es bereits Hinweise auf einen möglichen Einfluss des Glutens auf die Th1-/Th2-Zytokinbalance im Sinne einer Immunmodulation (SCOTT et al. 1997, NILSEN et al. 1996).

Heute wird davon ausgegangen, dass die Th1-Immunantwort durch das Vorherrschen von Antikörpern der Subklassen IgG₁ und IgG₃ gegen ein spezifisches Antigen gekennzeichnet ist. Die Th2-Immunantwort beinhaltet andererseits einen vermehrten Anteil an IgG₂- und IgG₄-Reaktion (KALLMANN et al. 1997).

4.2

Spezifität der humoralen Immunantwort gegen Gluten im Western Blot

4.2.1

Nachweis von individuellen Bandenprofilen ist mit Western Blot möglich

Um die humorale Antwort gegen einzelne Subfraktionen des Glutens zu untersuchen und zu vergleichen wurde ein Verfahren gewählt, das eine Auftrennung eines Proteingemisches in einzelne Proteinsubfraktionen ermöglicht. Die Glutenauftrennung und der nachfolgende Nachweis der humoralen Immunantwort gegen Gluten waren mit Western Blot (SDS-PAGE und Immunoblot) möglich.

Das Immunoblotting, das für den Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosemembranen entwickelt wurde, existiert bereits seit über 20 Jahren (TOWBIN et al. 1979) und wurde bis heute ständig weiterentwickelt (ZÖLLER et al. 1991).

Die Auftrennung von Proteingemischen in einzelne Subfraktionen erfolgt zunächst mittels Elektrophorese in einem Polyacrylamidgel (SDS-PAGE in Anlehnung an LAEMMLI (1970)). Die mit Proteinen beladenen Membranen können nun zum Nachweis spezifischer Antikörper mit Seren inkubiert werden und in weiteren Schritten zu einer Darstellung der erkannten Proteine bearbeitet werden. Auch PFEIL et al. untersuchten 1990 wasserlösliche Anteile des Weizenmehls mittels SDS-PAGE-Technik und Immunelektrophorese in Bezug auf die humorale Immunantwort bei Weizenmehlallergikern. Dabei zeigte sich ein charakteristisches individuelles Bandenprofil der untersuchten Seren (PFEIL et al. 1990).

Die Technik des Western Blots bietet für die in unserer Studie bearbeitete Fragestellung folgende Vorteile:

1. Mit der Western Blot-Methode lassen sich IgG-Antikörper gegen mehr als ein Protein des Glutens nachweisen
2. Es kann außerdem ein individuelles Reaktionsprofil der Seren gegen einzelne Glutenproteine bestimmt werden.

Hierdurch wird neben quantitativen Unterschieden eine Aussage zu qualitativen Differenzen der humoralen Immunantwort gegen Gluten möglich.

4.2.2

Western Blot als Nachweismethode für die humorale Immunantwort gegen Glutenbestandteile und Interpretation der Western Blot Ergebnisse

In den Tiermodellen des Typ-1-Diabetes wurde der Nachweis der Diabetogenität des Glutens direkt geführt (HOORFAR et al. 1991, SCOTT 1994). Beim Menschen dagegen kann man eine mögliche Bedeutung eines Antigens zunächst nur indirekt durch Vergleiche der humoralen und zellulären Immunantworten bei Patienten und Gesunden untersuchen.

In dieser Arbeit wurden 96 Seren von frisch manifesten Patienten mit Typ-1-Diabetes und 72 Seren von gesunden Kontrollpersonen im Alter von 18 bis 40 Jahren untersucht. Davon waren in der Gruppe der Diabetiker 40 weibliche und 56 männliche Personen erfasst, in der Kontrollgruppe entsprechend 31 weibliche und 41 männliche Personen. In jeder Geschlechtsgruppe der beiden Hauptgruppen erfolgte die Unterteilung in zwei Altersgruppen: 18 bis 29 Jahre, die hier als <30-jährige gelten, und 30 bis 40 Jahre, die als >30-jährige gelten (siehe auch **Tab. 2.1b**).

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von F.W. Scott konnte ein Western Blot etabliert werden, mit dem es möglich war, IgG-Antikörper gegen verschiedene Subfraktionen des Glutens im Serum von Patienten nachzuweisen (Fraser W. Scott und Karolina Burghardt, Ottawa Health Research Institute, University of Ottawa, Kanada, 1999, unpublizierte Daten). Die ersten Untersuchungen der kanadischen Arbeitsgruppe bezogen sich auf Seren von Kindern und konnten zeigen, dass im Gesamt-IgG-Antikörpermuster gegen bestimmte Subfraktionen des Glutens Unterschiede zwischen frisch manifesten Diabetikern und relevanten Kontrollpersonen bestanden. Insgesamt wurden 23 an Typ-1-Diabetes erkrankte Kinder und 37 HLA-gematchte gesunde Kinder bezüglich der humoralen Immunantwort gegen Gluten untersucht. Es konnte eine statistisch signifikant erhöhte IgG-Reaktivität bei frisch manifesten Diabetikern für die Glutenproteine mit dem Molekulargewicht 33 kDa bis 46 kDa nachgewiesen werden (MACFARLANE et al. 2003).

Sowohl in dieser Arbeit, als auch in der Untersuchung von SCOTT und BURGHARDT ließ sich im Western Blot ein charakteristisches individuelles Bandenprofil für jedes Serum nachweisen (**Abb. 3.7-3.10**). Das Bandenmuster jedes Serums unterschied sich sowohl in der Anzahl, der Molekulargewichtszugehörigkeit und in der Absorptionsstärke der Banden.

Beim Vergleich beider Gruppen zeigten sich geringe Differenzen in der Anzahl von Banden (Bandenanzahl $>$ oder $=$ 1) und im Fehlen einer Reaktivität (Bandenanzahl $=$ 0). Es lagen mehr Seren der Kontrollpersonen vor, die keine IgG-Antikörper gegen Gluten enthielten als bei den Diabetikern. Dieser Unterschied war aber nicht signifikant.

Bei der Analyse der kumulativen Erkennung der Banden zeigte sich allerdings ein Ausgleich der oben genannten Unterschiede und ebenfalls keine statistische Signifikanz oder richtungweisende Tendenz. Dabei wurden zunächst weder die Verteilung der Banden nach Molekulargewichten noch die Bandenintensität berücksichtigt.

Als nächstes wurde die Häufigkeit der Reaktionsbanden mit ihren Molekulargewichten gegeneinander aufgestellt (**Abb. 3.13-3.17**). Die statistische Methode zum Signifikanznachweis war in dieser und allen nachfolgenden Vergleichen der Student-t-Test. Hier zeigte sich gleiche Häufigkeit der Reaktionsbanden bestimmter Molekulargewichte in beiden Gruppen. Dabei blieb die Bandenintensität unberücksichtigt.

Die Intensität der einzelnen Banden entspricht den Antikörperkonzentrationen gegen Glutensubfraktionen. In dieser Arbeit stellen relative Zahlen die Bandenintensität dar. Den Bezug stellte das Standardserum mit einem Bandenmuster und einer besonders gut und sicher erkennbaren Bande, der formal der Wert 1 zugeordnet wurde. Die **Abbildungen 3.18-3.20** zeigen die graphische Verteilung der Intensität der Banden in beiden Gruppen.

Zur genaueren Analyse wurde das Gesamtkollektiv in zwei Altersgruppen aufgeteilt. In der Gruppe der Patienten mit Typ-1-Diabetes und Kontrollpersonen älter als 30 Jahre lagen verstärkte Reaktionen bei den Patienten im Bereich 43 kDa und 35 kDa vor. Für die Bereiche 30, 33 und 35 kDa war eine höhere Reaktivität bei den Kontrollen zu verzeichnen. In drei Fällen lag ein statistisch signifikanter Unterschied in der Gruppe der „jüngeren“ Diabetiker gegenüber der Kontrollgruppe im Bereich der 40 kDa, 43 kDa und 48 kDa.

Das Verhältnis der jeweiligen Summe der Aktivität der 33 und 38 kDa Banden zur Summe der Aktivität aller Banden eines Serums zeigte keine nennenswerten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Hingegen wird in der oben vorgestellten Arbeit der kanadischen Arbeitsgruppe eine erhöhte Aktivität vor allem im Bereich der 33 und 38 kDa Banden nachgewiesen (MACFARLANE et al. 2003).

In der Untersuchung von SCOTT und BURGHARDT, die eine ähnliche Fragestellung behandelten, wurde ein direkter visueller Vergleich der Bandenmuster vorgenommen. Dies war dadurch möglich, dass Diabetiker- und Kontrollseren nicht abwechselnd auf einer

Membran, sondern auf getrennten Nitrozellulosemembranen plaziert wurden. Dabei ist aber von Nachteil, dass die im Vergleich stehenden Seren der Diabetiker und Kontrollpersonen möglicherweise unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt werden. Der Vorteil einer abwechselnden Serumverteilung wie in dieser Arbeit ist die Homogenität der Verteilung und damit besser vergleichbare Bedingungen für beide Gruppen.

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Untersuchungen ist auch das unterschiedliche Alter und die Herkunft der untersuchten Kollektive (in dieser Arbeit wurden Seren von erwachsenen Patienten aus Deutschland verwendet; in der Arbeit der kanadische Forschungsgruppe SCOTT und BURGHARDT dagegen Seren von Kindern aus Finnland. Es existiert noch eine Reihe von anderen Arbeiten, die die humorale Immunantwort gegen Weizenproteine untersuchen.

SKERRITT & UNDERWOOD untersuchten den komplexen Charakter der Bindung der Antikörper gegen Weizenproteine. In ihrer Studie im Jahre 1986 wiesen die Autoren mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen Weizenproteine die Sequenzhomologie der verschiedenen Gliadine sowie die Abhängigkeit der Antikörperbindung von der Antikörperkonzentration nach. So war bei hohen Antikörperkonzentrationen die Anzahl der Banden höher als bei niedrigen. Dies galt sowohl für Gliadine als auch für Glutenine (SKERRITT & UNDERWOOD 1986). Die Methode wurde später von vielen Autoren übernommen und z. T. weiterentwickelt (JOHNSON et al. 1990).

Aufgrund dieser Beziehung besteht eine Fehlerquelle für den Bandennachweis gegen einzelne Glutensubfraktionen. Bei einer fehlenden Bandenreaktion des Serums in einer bestimmten Verdünnung kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass bei geringerer Verdünnung ebenfalls keine Reaktion vorliegen würde. Somit könnten sich eventuelle Unterschiede zwischen Diabetikern und Kontrollpersonen in Abhängigkeit von der Serumverdünnung ergeben. In weiterführenden Arbeiten müssten geringere Verdünnungen eines Serums im Western Blot untersucht werden, was aber größerer Serummengen bedürfte. Weiterhin ergäbe sich dann als Fehlerquelle, dass eventuell zu hohe Antikörperkonzentrationen bei geringen Serumverdünnungen gehäuft zu Überreaktionen in der Western Blot Analyse führen. Auch wenn daher eine Krankheitsassoziation niedrigtitriger Glutenantikörper nicht ausgeschlossen werden kann, zeigen die vorgelegten Daten aber keine Diabetesassoziation für die mittel- und hochtitrigen Antikörpertypen.

PFEIL et al. führten eine Untersuchung der humoralen Antwort (IgG, IgG₄ und vor allem IgE) gegen wasserlösliche Anteile des Weizenmehls bei den allergischen Bäckern im Western Blot

durch. Über den Vergleich zu den Nichtallergikern wurden drei Hauptallergene identifiziert. Interessanterweise fanden die Autoren eine unterschiedliche Verteilung der Reaktivität der Seren abhängig von den untersuchten Antikörperklassen (PFEIL et al. 1990).

In einer Arbeit von SKERRITT et al. wurde die humorale Immunantwort gegen Getreideproteine im ELISA und Western Blot untersucht. In den vorhandenen Humanseren von Kindern und Erwachsenen mit Zöliakie zeigten sich im ELISA erhöhte Antikörper gegen Weizen. Wie in der vorliegenden Arbeit wurde auch hier die Spezifität der humoralen Immunantwort mit Western Blot untersucht. Auch hier wiesen die Gliadine und niedermolekularen Glutenine die höchste Bindungskapazität auf (Molekulargewicht 30-70 kDa) (SKERRITT et al. 1991).

Auch SANDIFORD et al. untersuchten die humorale Immunantwort gegen Weizenproteine bei Weizenmehlallergikern mit der Western Blot-Technik. Das Ziel war eine Analyse der humoralen Immunantwort gegen wasserunlösliche Weizenproteine. Die durchgeführte Untersuchung zeigte, dass die untersuchten Weizenproteine Allergene im Bereich der Molekulargewichte von 11 kDa bis 90 kDa enthielten (SANDIFORD et al. 1997). Das Vorgehen wurde in Anlehnung an LAEMMLI (1970) und Modifizierung durch SHEWRY et al. 1989 und TOWBIN et al. 1979 gewählt (SANDIFORD et al. 1997).

Nach Ansicht von ZÖLLER et al. ist bei Western Blot-Experimenten insbesondere eine Konstanz der äußeren Bedingungen wichtig (ZÖLLER et al. 1991). Daher wurde auch in vorliegender Arbeit besonderer Wert darauf gelegt, dass die Bedingungen bei der Durchführung der Experimente möglichst gleich sind. Dies war in erster Linie durch Verwenden der Multiscreen-Apparatur (**Abb. 2.8**) möglich. Dadurch konnte zum einen eine größere Anzahl von Seren unter gleichen Bedingungen in einem Experiment untersucht werden. Zum anderen war die Kontamination der einzelnen Nitrozelluloseabschnitte mit mehreren Serumproben minimiert.

Wie in den vorigen Abschnitten dargestellt, gibt es zahlreiche Arbeiten in denen die Western Blot Methode im Zusammenhang mit der humoralen Immunantwort gegen Weizenmehl angewandt wurde. Es gibt aber sehr bedeutende Unterschiede zu der hier vorliegenden Studie.

1. Viele der Untersuchungen sind tierexperimenteller Natur und nicht direkt auf den Menschen übertragbar.

2. Im Falle der Verwendung von menschlichen Seren handelte es sich um Zöliakie-Patienten oder Allergiker gegen Weizen-Mehl und nicht um Patienten mit Typ-1-Diabetes. Auch Untersuchungen von Zöliakie-Patienten sind in diesem Zusammenhang eher rar.
3. In keiner Studie wurde das Proteingemisch Gluten untersucht, sondern immer nur Fraktionen des Glutens. Diese waren aber oft mit diversen anderen Proteinen kombiniert.

Damit stellt unsere Studie zurzeit die einzige Untersuchung dar, die sich mit der humoralen Immunantwort gegen Gluten im Western Blot bei erwachsenen Patienten mit Typ-1-Diabetes beschäftigt. Es konnte weder im ELISA noch im spezifischen Western Blot eine Assoziation mit Typ-1-Diabetes nachgewiesen werden.

Das Patientengut bildeten frisch manifeste Patienten mit Typ-1-Diabetes. Das bedeutet, dass die klinische Phase der Erkrankung in der Regel maximal 30 Tage beträgt. In den späteren Erkrankungsphasen liegen möglicherweise verminderte Antikörpertiter gegen Gluten vor. Im Zusammenhang mit den Untersuchungen über die Assoziation zwischen Typ-1-Diabetes und Zöliakie wiesen CATASSI et al. im Jahre 1987 einen erhöhten Anti-Gliadin-Antikörper-(AGA)-Titer zur Zeit der Diabetes-Manifestation nach (CATASSI et al. 1987). Dabei lagen weder zöliakietytische Symptome noch eine Dünndarmatrophie vor. Später fielen die AGA-Titer ab. Es existieren allerdings auch gegensätzliche Angaben bezüglich der humoralen Antwort gegen Gliadin zur Zeit der Typ-1-Diabetes-Manifestation vor (SAVILAHTI et al. 1988, SAVILAHTI et al. 1999, BARERA et al. 1991). HUMMEL et al. weisen darauf hin, dass Antikörper-Muster in erster Linie in der präklinischen Phase des Typ-1-Diabetes variabel sind (HUMMEL et al. 2000), was mit prospektiven Studien erfasst werden kann.

Die untersuchten Seren in der vorliegenden Arbeit stammten von Erwachsenen im Alter von von 18 bis 40 Jahren. Um eventuelle Differenzen, die alters- und/oder geschlechtsassoziiert sind, aufzuzeigen, wurde eine Unterteilung in Geschlechts- und Altersgruppen vorgenommen. Aber auch zwischen diesen Gruppen konnten keine eindeutigen Unterschiede identifiziert werden. OKAHATA et al. und BARNES et al. konnte zeigen, dass die Antikörpertiter gegen Milch und Hühnereiweiß in den frühen Lebensjahren ansteigen, um dann mit zunehmendem Lebensalter kontinuierlich abzunehmen (OKAHATA et al. 1990, BARNES et al. 1993). Hierdurch konnte eindrucksvoll demonstriert werden, dass ein Matching hinsichtlich der Altersverteilung von menschlichen Seren zur Interpretation der Antikörpertiterergebnisse besonders wichtig ist (BARNES 1995).

4.3

Assoziation zwischen der Ätiopathogenese des Typ-1-Diabetes und Gluten

In dieser Arbeit wurde keine Assoziation der humoralen Immunantwort gegen Gluten mit Typ-1-Diabetes beobachtet. Die einzige Untersuchung über die zelluläre Immunantwort (T-Zellen) gegen Gluten bei Patienten mit Typ-1-Diabetes wurde von KLEMETTI et al. im Jahre 1998 durchgeführt: Hier wurde die Zöliakie durch den Nachweis von EMA (Endomysium-Antikörper) mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen. Das Patientenkollektiv waren ebenfalls frisch manifeste Patienten mit Typ-1-Diabetes. Die T-Zellen stammten aus dem peripheren Blut der Patienten. Es konnte eine verstärkte zelluläre Immunität gegen Gluten nachgewiesen werden, die T-Zell-Proliferation war aber insgesamt (auch in der Kontrollgruppe) niedrig. Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass Gluten keine oder keine wichtige Rolle in der Pathogenese des Typ-1-Diabetes zu spielen scheint. Diese Aussage ist kritisch zu bewerten, da zum einen die Anzahl der untersuchten Patienten ziemlich gering war und zum anderen die untersuchten Zellen aus dem peripheren Blut und nicht aus dem Darm oder Pankreas stammten. Die Autoren betonten, die Reaktivität der glutenspezifischen T-Zellen aus dem peripheren Blut sei nicht mit denen aus dem Dünndarm gleichzusetzen und gibt nicht unbedingt die tatsächliche Immunität gegen Gluten wieder.

Ein großer Nachteil dieser und vieler anderer Studien ist, dass die präklinische Phase des Typ-1-Diabetes gar nicht erfasst wird. Prospektive Studien, die Risiko-Kollektive für Typ-1-Diabetes regelmäßig erfassen, erlauben weitergehende Aussagen.

Eine große prospektive Studie, die sich umfassend mit den verschiedenen Aspekten der Typ-1-Diabetes-Pathogenese beschäftigt, ist die BABYDIAB-Studie. Im Rahmen dieser Studie soll bei Kindern mit einem hohen Diabetes-Risiko durch die Modifikation von Ernährungsbestandteilen wie Gluten, Vitamin D und Fischöl der Einfluss auf die Entstehung von Inselautoimmunität in den ersten drei Jahren geprüft werden (ZIEGLER & HUMMEL 2001).

Die ersten Ergebnisse einer solchen Studie liegen bereits vor. HUMMEL et al. untersuchten die Auswirkung einer glutenfreien Diät innerhalb eines Jahres bei sieben Kindern mit einem hohen Risiko für Typ-1-Diabetes. Damit sollte die präklinische Diabetesphase erfasst werden.

Es konnte zwar ein Abfall der Antigliadin-Antikörper (AGA) beobachtet werden. Die glutenfreie Diät beeinflusste den Titerverlauf der diabetesassoziierten Autoantikörper (in diesem Fall IAA, GADA und IA-2A) nicht. Damit unterstützen diese Ergebnisse nicht die Hypothese, dass Gluten eines der Auslöserantigene der Diabetespathogenese sein könnte. In der Studie wurde aber nicht getestet, ob eine totale, also seit der Geburt bestehende, Glutenrestriktion eine Auswirkung auf den Titerverlauf der Autoantikörper oder eine Verzögerung der Diabetesmanifestation haben kann (HUMMEL et al. 2002). Es müssen auch hier weitere Studienergebnisse mit größeren Kollektiven abgewartet werden.

5. Zusammenfassung

Zur Ätiopathogenese des Typ-1-Diabetes mellitus tragen sowohl genetische Faktoren als auch Umweltfaktoren bei. In den Tiermodellen des Typ-1-Diabetes konnte eine Ernährung mit Gluten als diabetogener Umweltfaktor nachgewiesen werden. Gluten ist ein Bestandteil der Weizenkleie und setzt sich aus vielen Proteinen zusammen. Da Weizenmehl und damit auch Gluten in weiten Teilen der Welt zu den wesentlichen Bestandteilen der menschlichen Nahrung gehören, kann möglicherweise auch beim Menschen ein Zusammenhang zwischen Glutenaufnahme und der Diabetesentwicklung bestehen. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die humorale Immunantwort gegen Gluten bei erwachsenen Patienten mit Typ-1-Diabetes im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen untersucht. Die Nachweismethoden waren ein ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) und ein Western Blot. Da Gluten ein Proteingemisch ist, konnte mittels ELISA die Immunantwort gegen einzelne Glutensubfraktionen nicht differenziert werden. Mit Western Blot erfolgte dann die Analyse der humoralen Immunantwort gegen einzelne Glutenproteine.

Im ELISA wurde die humorale Immunantwort gegen Gluten in 47 Seren von erwachsenen Patienten mit Typ-1-Diabetes und 61 Seren von alters- und geschlechtsgematchten Kontrollpersonen bestimmt. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied weder für die IgG-Antikörper noch für die IgG-Subklassen-Antikörper IgG₁, IgG₂ und IgG₄ nachgewiesen werden ($p > 0,05$). In einem weiteren Schritt wurde die humorale Immunantwort gegen Glutensubfraktionen im Western Blot bestimmt. Dabei wurden 96 Seren von erwachsenen Patienten mit Typ-1-Diabetes und 72 Seren von alters- und geschlechtsgematchten Kontrollpersonen untersucht. Es erfolgte sowohl ein Vergleich der Bandenanzahl als auch der Bandenintensität. Bis auf wenige Ausnahmen lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede der humoralen Immunantwort gegen Gluten bzw. Glutensubfraktionen vor ($p > 0,05$).

Mit unseren Ergebnissen kann die Assoziation zwischen Typ-1-Diabetes und Gluten auf der Ebene der humoralen Immunantwort nicht bestätigt werden. Die weitere Prüfung eines ätiopathogenetischen Zusammenhangs zwischen Typ-1-Diabetes und Gluten sollte daher auf die Untersuchung der zellulären Immunantwort gegen Gluten an größeren Kollektiven von Patienten mit Typ-1-Diabetes und gesunden Kontrollpersonen fokussieren. Aktuell durchgeführte Ernährungsstudien bei Kleinkindern werden möglicherweise eine Aussage zum Kausalzusammenhang zwischen Glutenaufnahme und der Entwicklung des Typ-1-Diabetes erlauben.

6.**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

Diab Med 15: 38-44

Akerblom HK & Knip M (1998)

Putative environmental factors in type 1 diabetes

Diabetes Metab Rev 14: 31-67

Akerblom HK & Knip M (1999)

Environmental factors in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus

Exp Clin Endocrinol Diabetes 107 Suppl.3

Anderson RP, Degano P, Godkin AJ, Jewell DP, Hill AVS (2000)

In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope

Nat Med 6: 337-342

Arentz-Hansen H, Körner R, Molberg O, Quarsten H, Vader W, Kooy YM, Lundin KE, Koning F, Roepstorff P, Sollid LM, McAdam SM (2000)

The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deaminated glutamine targeted by tissue transglutaminase

J Exp Med 191:603-612

Ashkenazi A & Baratz M (1992)

Malignancy complicated celiac disease

In: Bransky D, Rozen MF, Kagnoff MF, eds. Gluten-sensitive enteropathy. 1992: 1184-1193

- Atkinson MA, Winter We, Skordis N, Beppu H, Riley WE, Maclaren NK (1988)
Dietary protein restriction reduces the frequency and delays the onset of insulin dependent diabetes in DP-BB rats
Autoimmunity 2: 11-20
- Atkinson MA & MacLaren NK (1994)
The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus
N Eng J Med 331: 1428-1436
- Bach JF, Chatenoud L, Herbelin A, Gombert JM, Carnaud C (1997)
Autoimmune diabetes: how many steps for one disease?
Res Immunol 148: 281-370
- Bach JF & Mathis D (1997)
The NOD mouse
Res Immunol 148: 285-286
- Bach JF & Boitard C (1987)
Experimental models of type 1 diabetes
Pathol Immunopathol Res 304: 77-75
- Baker BS, Garioch JJ, Bokth S, Thomas H, Walker MM, Leonard JN, Fry L (1995)
Lack of proliferative response by gluten specific T-cells in the blood and gut of patients with dermatitis herpetiformis
J Autoimmunity 8: 561-574
- Banatvala JE, Bryant J, Schernthaner G, Borkenstein M, Schober E, Brown D, DeSilva LM, Menser MA, Silink M (1985)
Coxsackie B, mumps, rubella, and cytomegalovirus specific IgM responses in patients with juvenile onset insulin-dependent diabetes mellitus in Britain, Austria, and Australia
Lancet 22(1): 1409-1412

Barera G, Bianchi C, Calisti L, Cerruti F, Dammacco F, Frezza E, Illini MT, Mistura L, Pocecco M, Prisco F (1991)

Screening of diabetic children for coeliac disease with antigliadin antibodies and HLA typing
Arch Dis Child 66: 491-494

Barnes RMR, Johnson PM, Blears J, Harvey M, Finn R (1988)

Human Serum antibodies reactive with dietary proteins
Int Arch Allergy Immunol 87: 184-193

Barnes RMR, Barton PG, Doig JE, Finn R, Harvey MM, Johnson PM (1993)

Distribution of serum antibodies to wheat gliadin and bovine milk non-atopic healthy adults
J Clin Lab Immunol 12:175-178

Barnes RMR (1995)

IgG and IgA antibodies to dietary antigens in food allergy and intolerance
Clinical Allergy 25, Suppl.1:7-9

Barnett AH, Epp C, Leslie RDG, Pyke DA (1981)

Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs
Diabetologia 20: 87-93

Bingley PY, Bonifacio E, Ziegler AG, Schatz DA, Atkinson MA, Eisenbarth GS (2001)

Proposed guidelines on screening for risk of type 1 diabetes
Diabetes Care 24: 398

Bingley PY, Christie MR, Bonifacio E, Bonfanti R, Shattock M, Fonte MT, Bottazzo Gf, Gale EA (1994)

Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody relatives
Diabetes 43: 1304-1310

Bjarnason J, Marsh MN, Price A, Levi AJ, Peters TJ (1985)

Intestinal permeability in patients with coeliac disease and dermatitis herpetiformis
Gut 26: 1214-1219

- Blazer S, Naveh Y, Berant M, Merzbach D, Sperber S (1984)
Serum IgG antibodies to gliadin in children with celiac disease as measured by an immunofluorescence method
J Pediatr Gastroenterol Nutr 3: 205
- Bonifacio E, Ziegler AG, Hummel M, Dittler J, Lampasona V, Pastore MR, Bosi E (1998)
Gluten: is it also a determinant of islet autoimmunity?
Diabetes Metab Rev 24: 259-260
- Borch-Johnsen K, Mandrup-Poulsen T, Zachau-Christiansen B, Joner G, Christy M, Kastrup K, Nerup J (1984)
Relation between breast-feeding and incidence rates of insulin-dependent diabetes mellitus
Lancet 2: 1083-1086
- Buckley RH & Dees SC (1969)
Correlation of milk precipitates with IgA deficiency
New England J Med 281: 465-469
- Catassi C, Guerrieri A, Bartolotta E, Coppa GV, Giorgi PL (1987)
Antigliadin antibodies at onset of diabetes in children
Lancet 18(2): 158
- Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, Rossini M, Bordicchia F, Candela F, Coppa GV, Giorgi PL (1994)
Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg
Lancet 343: 200-203
- Catassi C, Ratsch K-M, Fabiani E, Ricci S, Vordicchia F, Pierdomenico R, Giorgi PL (1995)
High prevalence of undiagnosed coeliac disease in 5280 Italian students screened by antigliadin antibodies
Acta Paediatr Scand 84: 672-676

Catino M, Tumini S, Mezzetti A, Chiarelli (1998)

Coeliac disease and diabetes mellitus in children: a non casual association

Diabetes Nutr Metab 11: 296-302

Chirido FG, Rumbo M, Carabajal P, Castagnino N, Mavromatopoulos E, Cirincione V, Anon MC, Fossati CA (1999)

Analysis of Anti-Gliadin Antibodies by Immunoblot Analysis and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Gliadin Fractions As Antigens

J Ped Gastroenterol Nutr 29: 171-177

Cole SG & Kagnoff MF (1985)

Celiac disease

Annu Rev Nutr 5: 241

Coleman DL, Kuzava JE, Leiter EH (1990)

Effect of diet on the incidence of diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mice

Diabetes 39: 432-436

Colle E, Guttman RD, Seemayer T (1981)

Spontaneous diabetes mellitus syndrom in the rat. Association with the major histocompatibility complex

J Exp Med 154: 1237-1242

Collin P, Salmi J, Hällström O, Oksa H, Oksala H, Mäki M (1989)

High frequency of coeliac disease in adult patients with type-I diabetes

Scand J Gastroenterol 24:81-8

Couper J, Steele C, Beresford S, Powell T, McCaul K, Pollard A, Gellert S, Janulovski C, Harrison L, Colman P (1998)

Lack of association between breast-feeding or introduction of cows milk protein and the development of anti-islet autoimmunity (Abstract)

In: The Endocrine Society of Australia Proc 41st Annual Scientific Meeting, Perth 1998.

Coulter CL, Ed. Melbourne, Australia, The Endocrine Society of Australia, p. 120

Cronin CC & Schanahan F (1997)

Insulin-dependent diabetes mellitus and coeliac disease

Lancet 349: 1096-1097

Dahl-Jorgensen K, Joner G, Hanssen KF (1991)

Relationship between cow milk consumption and incidence of IDDM in childhood

Diabetes Care 14: 1081-1083

Dahlquist G, Blom L, Lonnberg G (1991)

The Swedish Childhood Diabetes Study-a multivariate analysis of risk determinants for diabetes in different age groups

Diabetologia 34: 757-762

Dahlquist GH, Savilahti E, Landin-Olsson M (1992)

An increased level of antibodies to β -lactoglobulin is a risk determinant for early onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus independent of islet cell antibodies and early introduction of cow milk

Diabetologia 35: 980-984

D'Alessio DJ (1992)

A case-control study of group B coxsackie IgM antibody prevalence and HLA-DR antigens in newly diagnosed cases of insulin-dependent diabetes mellitus

Am J Epidemiol 135: 1331-1338

Daneman D, Fishman L, Clarson C, Martin JM (1987)

Dietary triggers of insulin-dependent diabetes in the BB rat

Diabetes Res 5: 93-97

Davidson AGF & Bridges MA (1987)

Coeliac disease: a critical review of aetiology and pathogenesis

Clin Chim Acta 163: 1

De Vitis I, Ghirlanda G, Gasbarrini G (1996)

Prevalence of coeliac disease in type 1 diabetes: a multicentre study

Acta Paediatr Suppl 412: 56-57

Delovitch T & Sing B (1997)

The non-obese diabetic mouse as a model of autoimmune disease: immune dysregulation gets the NOD

Immunity 7: 727-738

Di Mario U, Dotta F, Crisa L, Anastasi E, Andreani D, Dib SA, Eisenbarth GS (1988)

Circulating anti-immunoglobulin antibodies in recent-onset type 1 diabetic patients

Diabetes 37: 462-466

Dittler GG, Seidel D, Schenker M, Ziegler AG (1998)

GADIA2-combi determination as first-line screening for improved prediction of type 1 diabetes in relatives

Diabetes 47: 592-597

Drell DW & Notkins AL (1987)

Multiple immunological abnormalities in patients with type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus

Diabetologia 30: 132-143

Dotta F & Eisenbarth GS (1989)

Type 1 diabetes mellitus: a predictable autoimmune disease with interindividual variation in the rate of beta cell destruction

Clin Immunol Immunopathol 50: 85-95

Duncan BB & Schmidt MI (2001)

Chronic activation of the innate immune system may underlie the metabolic syndrome

Sao Paulo Med J 3; 119: 122-127

Eckhardt W, Bellmann K, Kolb H (1999)

Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in β cells by environmental factors:
heavy metals

Biochem J 338: 695-700

Elliott RB & Martin JM (1984)

Dietary protein: a trigger of insulin-dependent diabetes in the BB rat?

Diabetologia 26: 297-299

Elliot RB, Reddy SN, Bibby NJ, Kida K (1988)

Dietary prevention of diabetes in the non-obese diabetic mouse

Diabetologia 31: 62-64

Elliott RB, Wasmuth HE, Hill J, Songini M, Bottazzo GF for Sardinian IDDM Study Groups
(1996)

Diabetes and cow milk

Lancet 348: 1657

EllisTM & Atkinson MA (1996)

Early infant diets and insulin-dependent diabetes

Lancet 347:1464-1465

Fasano A & Catassi C (2001)

Current approaches and treatment of celiac disease: an evolving spectrum

Gastroenterology 120: 636-651

Fava D, Leslie RDG, Pozzilli P (1994)

Relationship between dairy product consumption and incidence of IDDM in childhood in Italy

Diabetes Care 17: 1488-1490

Feighery C (1999)

Coeliac disease

BMJ 319: 236-239

Ferguson A (1977)

Immunogenicity of cow milk in man: influence of age and of disease on serum antibodies to cow's milk proteins

Ricerca in Clinica e in Laboratorio 7: 211-219

Foulis AK, McGill M, Farquharson MA, Hilton DA (1997)

A search for evidence of viral infection in pancreases of newly diagnosed patients with IDDM
Dabetologia 40: 53-61

Frisk G, Fohlman J, Kobbah M, Ewald U, Tuvema T, Diderholm H, Friman C (1985)

High frequency of coxsackie B virus-specific IgM in children developing type 1 diabetes during a period of high diabetes morbidity

J Med Virol 17: 219-227

Frisk G, Nilsson E, Tuvemo, Friman G, Diderholm (1992)

The possible role of coxsackie A and echo viruses in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus studied by IgM analysis

J Infect 24: 13-22

Funda PD, Kaas A, Bock T, Tlaskalova-Hogenova H, Buschard K (1999)

Gluten-free diet prevents diabetes in NOD mice

Diabetes Metab Res Rev 15: 323-327

Gadd S, Silink M, Ramanand Kamath K, Skeritt JH (1992)

Coexistence 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

Gamble DR, Kinsley MJ, Fitzgerald MG, Bolton R, Taylor KW (1969)

Viral antibodies in diabetes mellitus

BMJ 3: 627-630

Gerstein H (1994)

Cow milk exposure and type 1 diabetes mellitus

Diabetes Care 17: 13-19

Gjertsen HA, Sollid LM, Ek J, Thorsby E, Lundin KEA (1994)

T-cells from the peripheral blood of coeliac disease patients recognise gluten antigens when presented by HLA-DR, -DQ, or -DP molecules

Scand J Immunol 39: 567-574

Gonczi J, Skerritt JH, Mitchell JD (1992)

Differentiation of coeliac disease and other malabsorption diseases using specific serum antigliadin IgG subclass profiles and IgA1 levels

Int Arch Allergy Immunol 98: 377-385

Hammarstrom L & Smith CIE (1983)

HLA-A, B, C and DR antigens in IgA deficiency

Tissue Antigens 21: 75-79

Hanglow AC, Welsh CJ, Conn P, Coombs RR (1985)

Early rheumatoid-like synovial lesions in rabbits drinking cow milk. II. Antibody responses to bovine serum proteins

Int Arch Allergy Appl Immunol 78: 152-160

Harrison LC & Honeyman MC (1999)

Cow milk and type 1 diabetes. The feal debate is about mucosal immune function

Diabetes 48: 1501-1507

Hiemstra HS, Schloot NC, v.Veelen PA, Willemsen SJM, Franken KL, v. Rood JJ, de Vries RRP, Chaudhuri A, Behan PO, Drijfhout JW, Roep BO (2001)

Cytomegalovirus in autoimmunity: T cell crossreactivity to viral antigen and autoantigen glutamic acid decarboxylase

Proc Natl Acad Sci USA 98/7: 3988-3991

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

Honeyman MC, Coulson BS, Stone NL, Gellert SA, Goldwater PN, Steele CE, Couper JJ, Tait BD, Colman PG, Harrison LC (2000)

Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes

Diabetes 49(8): 1319-1324

Hoorfar J, Scott FW, Cloutier HE (1991)

Dietary plant materials and development of diabetes in the DP-BB rat

J Nutr 121: 908-916

Hoorfar J, Buschard K, Brogren C-H (1992)

Impact of dietary protein and fat source on the development of insulin-dependent diabetes in the BB rat

Diabetes Res 20: 33-41

Hoorfar J, Buschard K, Dagnaes-Hansen F (1993)

Prophylactic nutritional modification of diabetes in autoimmune non-obese diabetic (NOD) mice

Br J Nutr 69: 597-607

Hummel M, Bonifacio E, Stern M, Dittler J, Schimmel A, Ziegler A-G (2000)

Development of celiac disease-associated antibodies in offspring of parents with Type I Diabetes

Diabetologia 43: 1005-1011

Hummel M, Fuchtenbusch M, Schenker M, Ziegler AG (2000)

No major association of breast-feeding, vaccinations, and childhood viral diseases with early islet autoimmunity in the German BABYDIAB study

Diabetes Care 23: 969-974

Hummel M, Bonifacio E, Naserke HE, Ziegler AG (2002)

Elimination of dietary gluten does not reduce titers of type 1 diabetes-associated autoantibodies in high-risk subjects

Diabetes Care 25: 1111-1116

Husby S, Oxelius V-A, Teisner B, Jensenius JC, Svenhag S-E (1985)

Humoral immunity to dietary antigens in healthy adults

Int Arch Allergy Appl Immunol 77: 416-422

Hyöty H, Hiltunen M, Reunanen A, Leinikki P, Vesikari T, Lounamaa R, Tuomilehto J, Akerblom HK (1993)

Decline of mumps antibodies in Type 1 (insulin-dependent) diabetic children and a plateau in the rising incidence of Type 1 diabetes after introduction of the mumps-measles-rubella vaccine in Finland

Diabetologia 36: 1303-1308

Issa-Chergui B, Guttman RD, Seemayer TA, Kelley VE, Colle E (1988)

The effect of diet on the spontaneous insulin dependent diabetes syndrome in the rat

Diabetes Res 9: 81-86

Jensen K, Sollid LM, Scott H, Paulsen G, Kett K, Thorsby E, Lundin KE (1995)

Gliadin specific T-cell responses in peripheral blood of healthy individuals involve T-cells restricted by coeliac disease associated DQ2 heterodimer

Scand J Immunol 42: 166-170

Johnson RB, LaBrooy JT, Shearman DJC, Davidson GP (1985)

The effect of diet on systemic immune responses to wheat gliadin

Aust J Exp Biol Med Sci 63: 299

Johnson RB, LaBrooy JT, Skeritt JH (1990)

Antibody responses reveal differences in oral tolerance to wheat and maize grain protein fractions

Clin Exp Immunol 79: 135-140

Kallmann B, Hüther M, Tubes M, Feldkamp J, Bertrams J, Gries FA, Lampeter EF, Kolb H (1997)

Systemic bias of cytokines production towards cell-mediated immune regulation in IDDM and towards humoral immunity in Grave's disease

Diabetes 46: 237-243

Kaprio J, Tuomilehto J, Koskenvuo M, Romanow K, Reunanen A, Eriksson J, Stengard J, Desäniemi YA (1992)

Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland

Diabetologia 35: 1060-1067

Karjalainen J, Martin JM, Knip M, Ilonen J, Robinson BH, Savilahti E, Akerblom HK, Dosch H-M (1992)

A bovine albumine peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus

N Engl J Med 327: 302-30

Karlsson MGE, Lawesson SS, Ludvigsson J (2000)

Th1-like dominance in high first-degree relatives of type 1 diabetic patients

Diabetologia 43: 742-749

Katz JD, Benoist C, Mathis D (1995)

T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes

Science 268: 1185

Kemeny DM, Urbanek R, Amlott PL, Ciclitira PJ, Richards D, Lessof MH (1986)

Sub-class of IgG in allergic disease IgG sub-class antibodies and non-immediate food allergy

Clinical Allergy Vol. 16: 571-581

Kikutani H & Makino S (1992)

The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains

Adv Immunol 51: 285-322

Klemetti P, Savilahti E, Ilonen J, Akerblom HK, Vaarala O (1998)

T-cell reactivity to wheat gluten in patients with insulin dependent diabetes mellitus

Scand J Immunol 47: 48-53

Kohno T, Kobashiri Y, Sugie Y, Takai S, Watabe K, Kaino Y, Kida K (2002)

Antibodies to food antigens in Japanese patients with type 1 diabetes mellitus

Diabetes Res Clin Pract 55: 1-9

Kolb H (1987)

Mouse models of insulin dependent diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice

Diabetes Metab Rev 3: 751-758

Kolb H & Elliot RB (1994)

Increasing incidence of IDDM a consequence of improved hygiene?

Diabetologia 3: 729

Kolb H (1997)

Benign versus destructive insulinitis

Diabetes Metab Rev 13: 139

Kolb H (1999)

On the aetiopathogenesis of type 1 diabetes: key roles for innate immunity and dietary antigens?

Exp Clin Endocrinol Diabetes 107 Suppl 2

Kolb H & Pozzilli P (1999)

Cow milk and type 1 diabetes: the gut immune system deserves attention

Immunology Today 20: 108-110

Koletzko S, Burgin-Wolff A, Koletzko B, Knapp M, Burger W, Gruneklee D, Herz G, Ruch V, Thon A, Wendel U (1988)

Prevalence of coeliac disease in diabetic children and adolescents

Eur J Pediatr 148: 113-117

Kontiainen S, Schlenzka A, Koskimies S, Rilva A, Mäenpää J (1990)

Autoantibodies and autoimmune diseases in young diabetics

Diabetes Res 13: 151-156

Kostraba JN, Gay EC, Rewers M, Hamman RF (1992)

Nitrate levels in community drinking waters and risk of IDDM

Diabetes Care 15: 1505-1508

Krokowski M, Caillat-Zucman S, Timsit J, Larger E, Pehuet-Figoni M, Bach JF, Boitard C (1995)

Anti-bovine serum albumin antibodies: genetic heterogeneity and clinical relevance in adult-onset IDDM

Diabetes Care 18: 170-173

Kuitunen M, Savilahti E, Sarnesto A (1994)

Human α -lactalbumin and bovine β -lactoglobulin absorption in infants

Allergy 49: 354-360

Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Su KL, Ten S, Sanz M, Exley M, Wilson B, Porcelli S, Maclaren N (2002)

Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes

J Clin Invest 109: 131-140

LaBrooy JT, Hohmann AW, Davidson GP, Hetzel PAS, Johnson RB, Shearman DJC (1986)

Intestinal and serum antibody in coeliac disease: a comparison using ELISA

Clin Exp Immunol 66:661-668

Laemmli UK (1970)

Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4

Nature 1970: 680-685

Lampasona V, Bonfanti R, Bazzigoluppi E, Venerando A, Chiumello G, Bossi E, Bonifazio E (1999)

Antibodies to tissue transglutaminase C in type 1 diabetes

Diabetologia 42: 1195-1198

Lancaster-Smith MJ, Perrin J, Swarbrick ET, Wright JT (1974)

Coeliac disease and autoimmunity

Postgrad Med J 50: 45-48

Lefkowitz J, Schreiner GS, Cormier J, Handler ES, Driscoll HK, Greiner D, Mordes JP, Rossini AA (1990)

Prevention of diabetes in the BB rat by essential fatty acid deficiency: relationship between physiological and biochemical changes

J Exp Med 171: 729-743

Leslie RD, Pyke DA, Denman AM (1985)

Immunosuppressive therapy in diabetes [letter]

Lancet 1: 516

Like AA & Rossini AA (1976)

Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus

Science 193: 415-417

Like AA (1990)

Depletion of RT6.1+ T lymphocytes alone is insufficient to induce diabetes in diabetes-resistant BB/Wor rats

Am J Pathol 136: 565-574

Ludvigsson J, Heding L, Lieden G, Marner B, Lernmark A (1983)

Plasmapheresis in the initial treatment of insulin-dependent diabetes mellitus in children

Br Med J Clin Res 286: 176-178

- Lühder F, Schlosser M, Michaelis D, Ziegler B, Kohnert K-D, Ziegler M (1994)
No association between anti-bovine serum albumin antibodies and islet cell reactive
antivodies in newly diagnosed type 1 diabetic patients
Diab Res Clin Pract 26: 35-41
- Luppi P & Trucco M (1999)
Immunological models of type 1 diabetes
Horm Res 52: 1-10
- MacDonald TT, Bajaj-Elliot M, Pender SLF (1999)
T cells orchestrate intestinal mucosal shape and integrity
Immunol Today 20: 505-510
- MacFarlane AJ, Burghardt KM, Kelly J, Simell T, Simell O, Altosaar I, Scott FW (2003)
A type 1 diabetes-related protein from wheat (*Triticum aestivum*). cDNA clone of a wheat
storage globulin, Glb1, linked to islet damage
J Biol Chem 278: 54-63
- Mäki M, Hälström O, Huupponen T, Vesikari T, Visakorpi JK (1984)
Increased prevalence of coeliac disease in diabetes
Arch Dis Child 59: 739-742
- Mäki M & Collin P (1997)
Coeliac disease
Lancet 349: 1755-1759
- Mäki M, Sulkanen S, Collin P (1998)
Antibodies in relation to gluten intake
Dig Dis 16: 330-332
- Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Katagiri K (1981)
Effect of castration on the appearance of diabetes in NOD mouse
Jikken Dobutsu 30: 137-140

Malkani S, Nommpleggi D, Hansen JW, Greiner DL, Mordes JP, Rossini AA (1997)

Dietary cow milk protein does not alter the frequency of diabetes in the BB rat

Diabetes 46: 1133-1140

Malosse D, Perron H, Sasso A, Seigneurin JM (1992)

Correlation between milk and dairy product consumption and multiple sclerosis prevalence: a worldwide study

Neuroepidemiology 11: 304-312

Marliss EB (ed.) (1983)

The Juvenile Diabetes Foundation workshop on the spontaneously diabetic BB rat: its potential for insight into human juvenile diabetes

Meta Clin Exp 32 (Suppl. 1): 1-166

Merrett J, Burr ML, Merrett TG (1983)

A community survey of IgG 4 antibodies

Clin Allergy 13: 397-407

Mertens TH, Gruneklee D, Eggers HJ (1983)

Neutralizing antibodies against coxsackie viruses in patients with recent onset of type 1 diabetes

Eur J Pediatr 140: 293-294

Mowat AM & Weiner HL (1999)

Oral tolerance: basic mechanisms and clinical implications

In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J, eds. Mucosal Immunol 2nd edn. San Diego: Academic Press, pp.587-617

Mowat AM (2000)

Coeliac disease-a future for peptide therapy

Lancet 356: 270-271

Muntoni S, Cocco P, Ary G, Cucca F, Muntoni S (2000)

Nutritional factors and worldwide incidence of childhood type 1 diabetes

Am J Clin Nutr 71: 1525-1529

Muntoni S & Muntoni S (1999)

New insights into the epidemiology of type 1 diabetes in mediterranean countries

Diabetes Metab Res Rev 15: 133-140

Naji A, Silvers WK, Barker CF (1985)

Cell mediated immunity in type 1 (insulin-dependent) diabetes of man and the BB rat

In: Cruse JM, Lewis RE (ed.) *Concepts immunopathol.* Vol 2. Karger, Basel: 32-44

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

Nilsen EM, Gjertsen HA, Jensen K, Brandtzaeg P & Lundin KE (1996)

Gluten activation of peripheral blood T cells induces a Th0-like cytokine pattern in both: coeliac patients and controls

Clin Exp Immunol 103: 295-303

Norris JM & Scott FW (1990)

A meta analysis of infant diet and insulin-dependent diabetes mellitus: do biases play a role ?

Epidemiology 7: 87-92

Okahata H, Nishi Y, Mizoguchi N, Yumiba C, Fujii H, Ueda K (1990)

Development of serum dermatophagoides farinae-, ovalbumin- and lactalbuminspecific IgG₁, IgG₄, IgA and IgM in children with bronchial asthma, allergic rhinitis or atopic dermatitis

Clin Exp Allergy 20: 39-44

Oldstone MBA (1998)

Molecular mimicry and immune-mediated diseases

FASEB J 12:1255-1265

Olmos P, A`Hern R, Heaton DA, Millward BA, Risley D, Pyke DA, Leslie RD (1988)
The significance of the concordance rate for type 1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins

Diabetologia 31: 747-750

O`Mahony S, Barton JR, Crichton S, Ferguson A (1990)
Appraisal of gut lavage in the study of intestinal humoral immunity

Gut 31: 1341-1344

O`Mahony S, Vestey JP, Ferguson A (1990)
Similarities in intestinal humoral immunity in dermatitis herpetiformis without enteropathy and in coeliac disease

Lancet: 1487-1490

Onkamo P, Väänänen S, Karvonen M, Tuomilhetto J (1999)
Worldwide increase in incidence of type 1 diabetes – the analysis of the data on published incidende trends

Diabetologia 42: 1395-1403

Orchard TJ, Atchison RW, Becker D (1983)

Coxsackie infection and diabetes

Lancet 10: 631

Owerbach D & Gabbay KH (1996)

The search for IDDM susceptibility Genes. The next generation

Diabetes 45: 544-551

Page SR, Lloyd CA, Hill PG, Peacock I, Holmes GK (1994)

The prevalence of coeliac disease in adult diabetes mellitus

QJM 87: 631-637

Palmer P & McCulloch D (1991)

Prediction and prevention of IDDM

Diabetes 40: 943-947

Parslow RC, McKinney PA, Law GR, Staines A, Williams R, Bodansky HJ (1997)

Incidence of childhood IDDM in Yorkshire, northern England is associated with nitrate in drinking water: an ecological analysis

Diabetologia 40: 550-556

Payne WW (1954)

Coeliac disease and diabetes mellitus in the same patients

Gt Ormond Str J 8: 118

Penttila JA, Devery JM, Gibson CE, LaBrooy JT, Skeritt JH (1991)

Cellular and humoral responses in celiac disease. I Wheat protein fractions

Clin Chim Acta 204: 95-108

Pfeil T, Schwabl U, Ulmer WT, König W (1990)

Western Blot analysis of water-soluble wheat flour (*Triticum vulgare*) allergens

Int Arch Allergy Appl Immunol 91: 224-231

Prud'homme GJ, Colle E, Fuks A, Goldner-Sauve A, Guttmann RD (1985)

Cellular immune abnormalities and autoreactive T lymphocytes in insulin-dependent diabetes mellitus in rats

Immunology Today 6:160-162

Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D, Lazarus AH, Serreze DV, Leiter EH, Cyopick P, Danska JS, Delovitch TL (1993)

Interleukin-4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice

J Exp Med 178: 87-99

Roep BO (1996)

T-cell responses to autoantigens in IDDM. The search for the Holy Grail.

Diabetes 45: 1147-1156

Roep BO, Duinkerken G, Schreuder GM, Kolb H, de Vries RR, Martin S (1996)

HLA-associated inverse correlation between T cell and antibody responsiveness to islet autoantigen in recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus

Eur J Immunol 26: 1285-1289

Rumbo M, Chirido FG, Anon MC, Fossati CA (1998)

Detection and characterization of antibodies specific to food antigens (gliadin, ovalbumin and β -lactoglobulin) in human serum, saliva, colostrum and milk

Clin Exp Immunol 112: 453-458

Sandiford CP, Tatham AS, Fido R, Welch JA, Jones MG, Tee RD, Shewry PR, Taylor AJ (1997)

Identification of the major water/salt insoluble wheat proteins involved in cereal hypersensitivity

Clin Exp Allergy 27: 1120-1129

Sategna-Guidetti C, Grosso S, Pulitano R, Benaduce E, Dani F, Carta Q (1994)

Celiac disease and insulin-dependent diabetes mellitus: screening in adult population

Digest Dis Sci 39: 1633-1637

Saukkonen T, Savilahti E, Reijonen H, Ilonen J, Tuomilitho-Wolf, Akerblom HK (1996)

Coeliac disease: frequent occurrence after clinical onset of insulin-dependent diabetes mellitus. Childhood in Finland Study Group

Diabetic Med 13: 464-470

Saukkonen T, Virtanen SM, Karppinen M, Reijonen H, Ilonen J, Räsänen L, Akerblom HK, Savilahti E, the Childhood Diabetes in Finland Study Group (1998)

Significance of cow milk protein antibodies and risk factors for childhood IDDM: interactions with dietary cow milk intake and HLA-DQB1 genotype

Diabetologia 41: 72-78

Savilahti E, Perkkio M, Kalimo K, Viander M, Perkko M, Vainio E, Kalimo K, Reunala T (1983)

IgA antigliadin antibodies: a marker of mucosal damage in childhood coeliac disease

Lancet 1983: 320-322

Savilahti E, Akerblom HK, Tainio VM, Koskimies S (1988)

Children with newly-diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus have increased levels of cow milk antibodies

Diabetes Res 7: 137-140

Savilahti E, Örmälä T, Saukkonen T, Santini-Pohjavuori U, Kontele JM, Arato A, Ilonen J, Akerblom HK (1999)

Jejuna of patients with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) show signs of immune activation

Clin Exp Immunol 116: 70-77

Schenker M, Hummel M, Ferber K, Walter M, Keller E, Albert ED, Janka HU, Kastendieh C, Sorger M, Louwen F, Ziegler AG (1999)

Early expression and high prevalence of islet autoantibodies for DR 3/4 heterozygous and DR 4/4 homozygous offspring of parents with type I diabetes: The German BABYDIAB study

Diabetologia 42: 671-677

Schmid S & Ziegler AG (2001)

Prädiktion und Prävention des Typ-1-Diabetes

Dtsch Med Wschr 126: 593-596

Scott FW & Trick KD (1983)

Dietary modification of spontaneous diabetes in the BB Wistar rat

Proc Fed Biol Soc 26: 222

Scott FW, Mongeau R, Kardish M, Hatina G, Trick KD, Wojcinski Z (1985)

Diet can prevent diabetes in the BB rat

Diabetes 34: 1059-1062

Scott FW, Sarfar G, Cloutier HE (1988)

Diabetogenicity of various protein sources in the diet of the BB rat
Adv Exp Biol Med 246: 277-285

Scott FW (1988)

Dietary initiators and modifiers of BB rat diabetes: a summary and working hypothesis
In *Lessons From Animal Diabetes II, 2nd International Workshop*

Scott FW, Elliott RB, Kolb H (1989)

Diet and autoimmunity: prospects of prevention of type 1 diabetes
Diabetes Nutr Metab 2: 61-73

Scott FW (1990)

Cow's milk and insulin-dependent diabetes: is there a relationship?
Am J Clin Nutr 51: 489-491

Scott FW (1994)

Food, diabetes and immunology
In *Diet, Nutrition and Immunity*. Forse RA, Bell SJ, Blackburn GL, Kabbash LG
EDS. Boca Raton, CRC Press (1994): 73-95

Scott FW (1996a)

Food-induced autoimmune diabetes
Diabetes Metab Rev 12: 341-359

Scott FW (1996b)

Food-induced Type 1 Diabetes in the BB rat
Diabetes/Metab Rev 12: 341-359

Scott FW, Norris JM, Kolb H (1996)

Milk and type 1 diabetes: examining the evidence and broadening the focus
Diabetes Care 19: 379-383

Scott FW, Cloutier HE, Kleemann R, Wörz-Pagenstert U, Rowsell P, Modler HW, Kolb H (1997)

Potential Mechanisms by which certain foods promote or inhibit the development of spontaneous diabetes in the BB Rats

Diabetes 46: 589-598

Serrano-Rios M, Goday A, Larrad TM (1999)

Migrant populations and the incidence of type 1 diabetes mellitus: an overview of the literature with a focus on the spanish-heritage contries in Latin America

Diabetes Metab Res Rev 15: 113-132

Shewry PR, Parmar S, Field JM (1989)

Two dimensional electrophoresis of cereal prolamins: applications to biochemical and genetic analyses

Electrophoresis 9: 727-737

Sigurs N, Johansson C, Elfstrand P-O, Viander M, Lanner A (1993)

Prevalence of coeliac disease in diabetic children and adolescets in Sweden

Acta Paediatr Scand 82: 748-751

Sikora K, Anand BS, Truelove SC, Ciclitira PJ, Offord RE (1976)

Stimulation of lymphocytes from patiets with coeliac disease by substraction of gluten

Lancet: 389-391

Sjöberg K, Eriksson KF, Bredberg A, Wassmuth R, Eriksson S (1998)

Screening for coeliac disease in adult insulin-dependent diabetes mellitus

J Int Med 243: 133-140

Skeritt JH & Underwood PA (1986)

Specificity characteristics of monoclonal andtibodies to wheat grain storage proteins

Biochim Biophys Acta 874: 245-254

Skerritt JH, Devery JM, Pentilla JA, LaBrooy JT (1991)

Cellular and humoral responses in coeliac disease. 2. Protein extracts from different cereals
Clin Chim Acta 204: 109-122

Skyler JS, Lorenz TJ, Schwartz S, Eisenbarth GS, Einhorn D, Palmer JP, Marks JB, Greenbaum C, Saria EA, Byers V (1993)

Effects of an anti-CD5 immunoconjugate (CD5-plus) in recent onset type 1 diabetes mellitus: a preliminary investigation. The CD5 Diabetes Project Team

J Diabetes Complications 7: 224-232

Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E (1989)

Evidence for a primary association of coeliac disease to particular HLA-DQa/b heterodimer

J Exp Med 169: 345-350

Sollid LM & Thorsby E (1993)

HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis

Gastroenterology 105: 910

Srivastava MD, Srivastava A, Brouhard B, Sabeto R, Groh-Wargo S, Kubit J (1996)

Cytokines in human milk

Res Com Mol Path Pharm 93: 263-287

Thomas HE & Kay TW (2000)

Beta cell destruction in the development of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse

Diabetes Metab Res Rev 16: 251-261

Tillil H & Kobberling J (1987)

Age-corrected empirical genetic risk estimates for first-degree relatives of IDDM patients

Diabetes 36: 93-99

Tisch R, Wang B, Serreze DV (1999)

Induction of glutamic acid decarboxylase 65-specific Th 2 cells and suppression of autoimmune diabetes at late stages of disease is epitope dependent

J Immunol. 163: 1178-1187

Todd JA, Bell JI, Mc Devitt HO (1987)

HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus

Nature 329: 599-604

Towbin H, Satchelin T, Gordon J (1979)

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications

Proc Natl Acad Sci USA 76: 4350-4

Tuvemo T, Dahlquist G, Frisk G, Blom L, Friman G, Landin-Olsson M, Diderholm H (1989)

The Swedish childhood diabetes study III: IgM against coxsackie B viruses in newly diagnosed type 1 (insulin-dependent) diabetic children-no evidence of increased antibody frequency

Diabetologia 32: 745-747

Vaarala O, Paronen J, Otonkoski T, Akerblom HK (1998)

Cow milk formula feeding induces antibodies to insulin in children-a link between cow milk and insulin-dependent diabetes mellitus?

Scand J Immunology 47: 131-135

Vaarala O, Knip M, Paronen J, Hämäläinen AM, Muona P, Väättäinen M, Ilonen J, Simell O, Akerblom HK (1999)

Cow milk formula feeding induces primary immunization to insulin in infants at genetic risk for type 1 diabetes

Diabetes 48: 1389-1394

Ventura A, Neri E, Ughi C, Leopaldi A, Citta A, Not T (2000)

Gluten-dependent diabetes-related and thyroid-related autoantibodies in patients with celiac disease

J Pediatr 137: 263-265

Verge CF, Howard NJ, Rowley NJ, Mackay IR, Zimmet PZ, Egan M, Hulinska M, Hulinsky J, Silverstrini RA, Kamath S (1994)

Anti-glutamate and other antibodies at onset of childhood IDDM: a population-based study

Diabetologia 37: 1113-1120

Vialettes B, Schmitt N, Hirn M, Hermitte L, Kaplanski S, Farnarier C, Mattei Zevacco C, Simonin G, Vague P (1991)

The soluble receptor of interleukin 2 is not a serum marker of the autoimmune activity in type 1 diabetes mellitus

Autoimmunity 11: 53-59

Virtanen SM, Jaakkola L, Räsänen L, Ylönen K, Aro A, Lounamaa R, Akerblom HK, Tuomilehto J (1994)

Nitrate and nitrite intake and the risk for type 1 diabetes in Finnish children

Diabetic Med 11: 656-662

Visacorpi JK (1969)

Diabetes and coeliac disease

Lancet 2: 1192

Walsh CH, Cooper BT, Wright AD, Malins JM, Cooke WT (1978)

Diabetes mellitus and coeliac disease: a clinical study

QJMed 47: 89-100

Wasmuth HW & Kolb H (2000)

Cow milk and immune mediated diabetes

Proceedings of the Nutrition Society 59: 1-7

Wolf E, Spencer KM, Gudword AG (1983)

The genetic susceptibility of type 1 (insulin dependent) diabetes: analysis of the HLA-DR association

Diabetologia 24: 224-230

Yilmaz MT, Devrim AS, Biyal F, Satman I, Arioglu E, Dinccag N, Karsidag, Ozden I, Gurel N, Sipahioglu F (1993)

Immunoprotection in spontaneous remission of type 1 diabetes: long-term follow-up results

Diabetes Res Clin Pract 19: 151-162

Yoon JW (1995)

A new look at viruses in type 1 diabetes

Diabetes Metab Rev 11: 83-107

Yoon JW & Jun HS (2001)

Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus

Ann NY Acad Sci: 201-211

Ziegler AG, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E (1999)

Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes. The 2-year analysis of the German BABYDIAB study

Diabetes 48: 460-468

Ziegler AG & Bonifacio E (2000)

No inverse relationship between total IgE levels and islet autoimmunity in children of parents with type 1 diabetes

Diabetes Care 23: 1205-1206

Ziegler AG & Hummel M (2001)

Entstehung des Typ-1-Diabetes. Die ersten Lebensjahre sind entscheidend. Ergebnisse der deutschen Multicenterstudie BABYDIAB

Dt Ärztebl 98: 1260-1265

Zimmer KP (2001)

Klinische Bedeutung nichtklassischer Zöliakieformen

Dt Ärztebl 98: 2574-2578

Zöller L, Burkard S, Schäfer H (1991)

Validity of Western Immunoblot band patterns in the serodiagnosis of Lyme Borreliosis

J Clin Microbiol 29: 174-182

EURODIAB ACE Study Group (2000)

Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe

Lancet 355: 873-876

Dank

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Professor Dr. Hubert Kolb für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken. Für seine ständige Hilfsbereitschaft bei den verschiedenen Fragestellungen gilt ein weiterer Dank Herrn Dr. Hermann Wasmuth.

Ich möchte auch Frau Karolina Burghardt vom Ottawa Health Research Institute, University of Ottawa, Kanada für die Zusammenarbeit und sehr wertvolle praktische Hinweise, die eine Schlüsselrolle bei der Durchführung meiner Experimente gespielt haben, danken.

Vielen Dank an die Mitarbeiter der Forschungsgruppe von Professor Dr. Hubert Kolb am Deutschen Diabetes-Forschungsinstitut der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Sie standen mir täglich mit Rat und Tat zur Seite. Ohne deren Hilfe wäre der experimentelle Teil meiner Arbeit nicht möglich.

Ich möchte auch meinen Eltern Elisabeth und Waldemar Kempf für ihre Unterstützung danken.

Zu guter Letzt danke ich meinem Mann Hermann Weisedel für seine wertvolle Hilfe in Fragen der Textverarbeitung und äußerer Gestaltung und für seine ständige Unterstützung.

Lebenslauf

NAME	Kempf Helene
GEBURSDATUM	25.07.1973
GEBURTSORT	Nowokusnezsk
ELTERN	Waldemar Kempf und Elisabeth Kempf, geb. Lieder
FAMILIENSTAND	verheiratet
NATIONALITÄT	deutsch
SCHULBILDUNG	
1980-1983	Grundschule in Nowokusnezsk, Russland
1983-1990	Mittelschule in Anapa, Russland
5/1991	Ausreise in die BRD als Spätaussiedlerin
1991-1992	Stipendiatin der Otto Benecke Stiftung e.V. Intensivsprachkurs in Anrath
1992-1993	Sonderlehrgang zur Erlangung deutscher Hochschulreife im Eichendorff Kolleg Geilenkirchen
12/1993	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

HOCHSCHULAUSBILDUNG

4/1994	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
3/1996	Ärztliche Vorprüfung
3/1997	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
9/1999	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2000	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Seit 1/1998

Doktorandin am Diabetes-Forschungsinstitut an der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Arbeitsgruppe Immunologie unter Leitung von
Professor Dr. Hubert Kolb

BERUFLICHE ANSTELLUNGEN

1/2001- 6/2002

Ärztin im Praktikum
Augenklinik des Klinikums Dortmund gGmbH
unter Leitung von Priv.-Doz. Dr. T.Böker

Seit 7/2002

Fortsetzung der Tätigkeit in der Augenklinik des
Klinikums Dortmund als Assistenzärztin