

Aus dem **Deutschen Diabetes Forschungsinstitut**
Leibniz-Institut an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Auf'm Hennekamp 65, 40221 Düsseldorf
Direktor: Univ. Prof. Dr. W. A. Scherbaum

Isotypantikörper gegen die Gewebstransglutaminase
(tTG) bei Patienten mit
manifester und silenter Zöliakie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Jaron Schilling

2004

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

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

Referent: Priv.-Doz. Seißler

Korreferent: Prof. Dr. Althaus

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Definition und Klinik der Zöliakie	1
1.2. Pathogenese der Zöliakie	4
1.2.1. Genetische Prädisposition	5
1.2.2. Zelluläre Immunität	5
1.2.3. Autoantikörper	7
1.2.4. Reaktivität der Dünndarmschleimhaut	9
1.3. Die Rolle der Gewebstransglutaminase bei der Zöliakie	9
2. Zielstellung	11
3. Material und Methoden	12
3.1. Reagenzien	12
3.2. Verbrauchsmaterialien und Geräte	13
3.3. Lösungen / Puffer	14
3.4. Patienten	15
3.5. Herstellung von rekombinanter Gewebstransglutaminase	16
3.6. Nachweis der IgA tTG-Antikörper	16
3.7. Nachweis der IgG tTG-Antikörper	17
3.8. Berechnung der Antikörpertiter	17
3.9. Nachweis des Isotyps und der Subklassen der tTG-Antikörper	18
3.10. Statistik	19
4. Ergebnisse	20
4.1. Bestimmung der Grenzwerte der Subklassen- und Isotypassays	20
4.2. Gewebstransglutaminase Antikörper bei Patienten mit manifester Zöliakie	20
4.2.1. IgA tTG-Antikörper bei Patienten mit manifester Zöliakie	20
4.2.2. Korrelation der IgA tTG-Antikörper mit dem Alter	22

4.2.3.	IgG und IgE tTG-Antikörper bei Patienten mit manifester Zöliakie	23
4.2.4.	Korrelation der tTG-Isotypantikörper	27
4.3.	Gewebsstransglutaminase Antikörper bei Patienten mit silenter Zöliakie	28
4.3.1.	IgA tTG-Antikörper bei Patienten mit silenter Zöliakie	28
4.3.2.	Korrelation der IgA tTG-Antikörper mit dem Alter	29
4.3.3.	IgG und IgE tTG-Antikörper bei Patienten mit silenter Zöliakie	31
4.3.4.	Korrelation der tTG-Isotypantikörper	33
4.3.5.	Korrelation der tTG-Isotypantikörper mit dem Dünndarmbefund	34
4.4.	Vergleich der Isotypantikörper gegen tTG bei Patienten mit manifester und silenter Zöliakie	35
4.4.1.	Prävalenz der Isotypantikörper	35
4.4.2.	Titer der Isotypantikörper	35
4.4.3.	Korrelation zwischen den IgA1 und IgA2 tTG-Antikörpern	40
4.4.4.	Korrelation zwischen den IgA1 und den IgG1 tTG-Antikörpern	41
5.	Diskussion	43
6.	Zusammenfassung	49
7.	Abkürzungsverzeichnis	50
8.	Literaturverzeichnis	52
9.	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	65
10.	Danksagung	69
	Selbstständigkeitserklärung	70
	Lebenslauf	71

1. Einleitung

1.1. Definition und Klinik der Zöliakie

Die Zöliakie, auch glutensensitive Enteropathie genannt, ist eine immunologische Erkrankung des Dünndarms, bei der es bei genetisch prädisponierten Individuen zu einer Überempfindlichkeitsreaktion gegen den Nahrungsbestandteil Gliadin auftritt. Die Zöliakieinzidenz liegt in einigen europäischen Ländern bei bis zu 1:300 und manifestiert sich am häufigsten im Kindesalter ab dem zweiten Lebensjahr. Eine kürzlich in Dresden erschienene Studie belegt, dass die Zöliakie in Deutschland mit einer Prävalenz von bis zu 1:600 vorkommt und damit weitaus häufiger auftritt, als dies bisher angenommen wurde (Henker 2002).

Ausgelöst wird die Zöliakie durch die Aufnahme von Nahrungsmitteln, die bestimmte Prolamine enthalten. Prolamine sind alkohollösliche Proteinfractionen, die in Weizen, Roggen, Gerste und Hafer enthalten sind. Das wichtigste toxische Prolamin ist das im Weizenkleberprotein Gluten enthaltene Gliadin. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass bestimmte glutaminreiche Aminosäuresequenzen im Gliadin durch die Stimulation pathogener T-Lymphozyten den Krankheitsprozess initiieren können. Bei Zöliakiepatienten kommt es durch Zufuhr von Gliadin zu einer entzündlichen Reaktion der Dünndarmschleimhaut. Histologisch lassen sich nach der Einteilung von Marsh vier verschiedene Stadien unterteilen (Marsh 1992). Im ersten Stadium sind vermehrt intraepitheliale Lymphozyten (IEL) (>40 Lymphozyten pro 100 Epithelzellen) bei ansonsten normaler Dünndarmschleimhaut nachweisbar. Es folgt das hyperplastische Stadium (Stadium 2), bei dem > 40 IEL und eine Kryptenhyperplasie, aber keine Zottenverplumpung auftritt. Das destruktive Stadium ist charakterisiert durch vermehrte IEL, Kryptenhyperplasie und Zottenatrophie (Stadium 3). Im letzten Stadium findet man eine komplette Zottenatrophie ohne Kryptenhyperplasie und oft normalen IEL (Stadium 4).

Bei florider Zöliakie mit ausgeprägten Dünndarmveränderungen klagen die Patienten typischerweise über Diarrhö/Steatorrhö und nahrungsabhängige Bauchschmerzen. Bei längerem Verlauf treten Symptome der Malabsorption hinzu wie z.B. Anämie durch Eisen- oder Folsäuremangel, Osteoporose, Wachstumsstörung und Fertilitätsstörungen (Zilbauer 2002). Um die Diagnose einer Zöliakie zu standardisieren, wurden im Jahr 1990 die ESPGAN – Kriterien (= European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition) aufgestellt.

Nach diesen Kriterien müssen bei unbehandelten Patienten charakteristische Biopsiebefunde vorliegen (vermehrte intraepitheliale Lymphozyten, Kryptenhyperplasie, Zottenatrophie). Durch Entzug des Nahrungsbestandteils Gliadin muss es zu einer Rückbildung der klinischen und histologischen Befunde kommen. Eine zusätzliche serologische Bestimmung von Autoantikörpern (siehe Punkt 1.2.3.) kann die Diagnose unterstützen, reicht aber allein für eine Diagnose nicht aus. Bei einer gesicherten Zöliakie ist die konsequente Einhaltung einer glutenfreien Ernährung die einzig mögliche Therapie (Weberhofer 2002). Hierunter kommt es zu einer vollständigen Regeneration der Dünndarmschleimhaut und Gesundung der betroffenen Patienten.

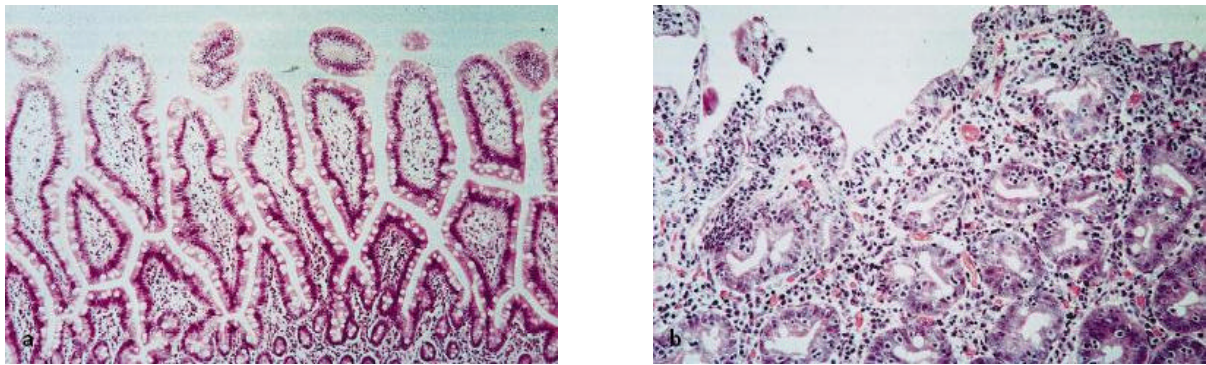


Abb. 1: Normale Duodenalschleimhaut (links) und Befund bei einer floriden Zöliakie (Zottenatrophie, vermehrte intraepitheliale Lymphozyten) (rechts) (Bilder aus Zimmer 1999)

Neben der Klassifikation nach histologischen Kriterien wird die Zöliakie zusätzlich nach der klinischen Präsentation unterteilt. Die silente Zöliakie ist charakterisiert durch das Fehlen klinischer Symptome wie Durchfall, Gewichtsverlust etc. bei veränderter Dünndarmmukosa. Biopsien weisen bei dieser Form vermehrt intraepitheliale Lymphozyten (IEL) auf und die Mukosaveränderungen reichen von partieller Atrophie bis hin zur vollständig flachen Mukosa. Trotz nachhaltiger Mukosaveränderung kommt es bei Patienten mit silenter Zöliakie nicht zur Ausbildung klinisch relevanter gastrointestinaler Symptome (Kordonouri 2000).

Als weitere Variante wird die sogenannte potenzielle Zöliakie angesehen. Bei dieser Zöliakieform ist zu einem bestimmten Zeitpunkt keine Dünndarmmukosaveränderung durch Biopsie nachweisbar. Es kann sich aber zu einem späteren Biopsiezeitpunkt nachträglich eine Zottenatrophie ausbilden. Klinisch sind solche Patienten dementsprechend symptomfrei. Weitere Kriterien sind ein positives Endomysiumantikörperscreening, viele intraepitheliale

Lymphozyten, darunter auch viele mit positivem $\gamma\delta$ - T-Zellrezeptor, Zeichen aktivierter mukosaler Immunität, wie z.B. die Expression von CD25 und B7 von mononuklearen Zellen der Lamina propria, verstärkte Expression von MHC Klasse II Molekülen und Adhäsionsmolekülen auf Epithelzellen der Lamina propria (Troncone 1996). Eine besondere Variante der Zöliakie ist die Dermatitis herpetiformis, eine Hauterkrankung, die in Form von gruppierten, juckenden Bläschen und Papeln bevorzugt bei älteren Kindern auftritt. Diese Patienten haben häufig keine abdominellen Symptome, die Hauterscheinungen sind aber unter einer gliadinfreien Diät reversibel (Ventura 1999; Koop 2000). Kommt es zur Ausprägung von intestinalen Symptomen sind in bis zu 80% dieser Fälle in der Dünndarmbiopsie Schleimhautveränderungen in Form einer Zottenatrophie beschrieben worden (Koop 2000).

Probleme bei der Diagnostik und der Therapie der Zöliakie können vor allem bei den Patienten auftreten, die nicht die klassischen Zeichen einer manifesten Erkrankung aufweisen. Epidemiologische Studien in Europa und Nordamerika haben zeigen können, dass ein Großteil der Patienten mit Zöliakie an einer oligosymptomatischen Form leidet oder sogar asymptomatisch sind. Durch Screeninguntersuchungen mit Zöliakie-spezifischen Autoantikörpern konnten bei Kindern und Jugendlichen positive Endomysium-Antikörper (EMA) in 97,3% in Südeuropa und 71% in Mittel- und Nordeuropa nachgewiesen werden (Grodzinsky 1996; Bazzigaluppi 1999). Bei Nachuntersuchungen bei Antikörper-positiven Personen fanden sich in 14% typische Schleimhautveränderungen, in keinem Falle oligosymptomatische Erkrankungen und in 100% klinisch asymptomatische Patienten (Grodzinsky 1996). Es besteht somit eine sehr hohe Dunkelziffer, so dass die Zöliakieerkrankung weit häufiger auftritt als früher angenommen. Einschränkend muss betont werden, dass bis heute die Konsequenzen eines positiven Antikörperbefundes nicht klar sind. Insbesondere ist der natürliche Verlauf – denkbar wäre eine spontanen Ausheilung, die Entwicklung von typischen Zöliakiesymptomen, aber auch das Auftreten von MALT Lymphomen bei ansonsten asymptomatischen Fällen – bisher unbekannt. Dies hat dazu geführt, dass von den meisten Autoren Antikörperuntersuchungen bei Risikopersonen befürwortet werden (Grodzinsky 1996; Schuppan 2000; Spiekeroetter 2002; Zilbauer 2002).

Die Zöliakierkrankung ist häufig assoziiert mit weiteren Autoimmunerkrankungen. Bei Patienten mit Typ 1 Diabetes wurde bei Kindern und Jugendlichen eine Prävalenz der Zöliakie von 2,0-8,5% und bei Erwachsenen von 1,6-5,4% beschrieben (Holmes 2001). Hashimoto's Thyreoiditis, Sjögren Syndrom, M. Addison, rheumatoide Arthritis, perniziöse

Anämie, autoimmune Hepatitis sind weitere mit einer Zöliakie assoziierten Erkrankungen (Tab. 1). Als Ursachen für das verstärkte Auftreten einer Zöliakie bei Autoimmunerkrankungen werden gemeinsame genetische Faktoren und eine gestörte Immunregulation vermutet (Jaeger 2001; Not 2001). Eine besonders hohe Erkrankungshäufigkeit ist bei Patienten mit selektivem IgA Mangel zu verzeichnen. Diese Patienten weisen im Gegensatz zur Normalbevölkerung eine 10-15 fach höhere Wahrscheinlichkeit auf eine Zöliakie zu entwickeln. (Cataldo 2000).

Erkrankung	Häufigkeit einer	
	manifesten Zöliakie	silenten Zöliakie
Typ 1 Diabetes	2,0-8,5%	4,4-6,3%
Hashimoto Thyreoiditis	2,0-4,8%	4,4%
M. Addison	0,1-7,3%	5,2%
Perniziöse Anämie	0,2%	n.u.
Autoimmune Hepatitis	1,1-4,0%	n.u.

Tab. 1: Assoziation verschiedener Autoimmunerkrankungen mit einer manifesten und silenten Zöliakie (Daten aus Savilahti 1997; Talal 1997; Volta 1997; Sategna-Guidetti 1998; Ventura 1999; Kordonouri 2000; Aktay 2001; Holmes 2001; Meloni 2001; Not 2001; Sategna-Guidetti 2001; O`Leary 2002; Spiekerkoetter 2002; Valentino 2002) n.u. = nicht untersucht.

1.2. Pathogenese der Zöliakie

Die Pathogenese der Zöliakie beinhaltet ein komplexes Zusammenspiel zwischen exogenen Einflüssen, genetischen und immunologischen Faktoren und der Regulation lokaler Entzündungsmechanismen. Auslöser ist die Zufuhr von Gliadin, in deren Folge bei entsprechend disponierten Patienten eine zytotoxische Immunreaktion auftritt. Durch die lokale Freisetzung von Entzündungsmediatoren und den Mukosaschaden kommt es zur

Aktivierung von Enterozyten, die ihrerseits immunmodulierend auf den Krankheitsprozess einwirken können.

1.2.1. Genetische Prädisposition

Das bevorzugte Auftreten der Zöliakie in Familien, in denen bereits ein Mitglied an einer Zöliakie erkrankt ist, und die hohe Konkordanz bei eineiigen Zwillingen (75%) weist auf eine starke genetische Prädisposition der Erkrankung hin. Die wichtigste Assoziation besteht zu bestimmten HLA (Human-Leukocyte-Antigen) -Molekülen, die an der Präsentation von Antigenen auf antigenpräsentierenden Zellen beteiligt sind. Bei mehr als 90% der Zöliakiepatienten finden sich die HLA Allele DQA1*0501 DQB1*0201 und DQA1*0301 DQB1*302, die die HLA Klasse II Moleküle DQ2 und DQ8 kodieren (Nilsen 1995; Arentz-Hansen 2000; van de Waal 2000). Es wird vermutet, dass an diese HLA Moleküle ganz bestimmte Gliadinpeptide binden können, die von autoreaktiven T-Lymphozyten erkannt werden. Diese Hypothese wird durch Experimente unterstützt, die zeigen konnten, dass HLA DQ2 und HLA DQ8 Moleküle besonders gut Peptide binden kann, die Glutaminsäure enthalten. Auf diese Weise kann erklärt werden, warum Personen mit HLA DQ2 und DQ8 ein besonders hohes Risiko tragen, an einer Zöliakie zu erkranken. Da die Prävalenz von HLA DQ2 und DQ8 auch in der Normalbevölkerung relativ hoch ist, wird vermutet, dass andere Gene und Umweltfaktoren an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt sind.

1.2.2. Zelluläre Immunität

Vorraussetzung für die Entwicklung einer zellulären Immunität ist die Aktivierung von Lymphozyten durch Antigen-präsentierende Zellen (APC). Im Falle der Zöliakie konnte gezeigt werden, dass nach der Aufnahme von gliadinhaltiger Nahrung geringe Mengen des Proteins durch Enterozyten des Darms aufgenommen, prozessiert und an der Zelloberfläche präsentiert werden (van de Wal 2000). Eine alternative Erklärung wäre, dass durch Mikrotraumen oder durch eine unspezifische Entzündung des Dünndarms die als Barriere fungierende Epithelschicht des Darms passager gestört wird. Gliadin könnte dann in die Darmschleimhaut eindringen und von dort ansässigen Makrophagen oder dendritischen Zellen prozessiert werden (Monteleone 2001; Salvati 2002). In Biopsiematerial von Patienten wurde

eine Infiltration der Lamina propria durch CD4+ T-Helfer (Th) Lymphozyten, CD8+ zytotoxischen T-Zellen, B-Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten und Makrophagen nachgewiesen (Marsh 1992). Bei isolierten humanen T-Zelllinien konnte eine Reaktivität mit Gliadin Peptiden nachgewiesen werden (Nilsen 1995; Kontakou 1995, Arentz-Hansen 2000; Monteleone 2001). Dies bestätigt die zentrale Rolle von Gliadin an der Pathogenese der Zöliakie. Th-Zellen differenzieren in Abhängigkeit von der Stimulation durch APC entweder in die proinflammatorisch wirkenden Th1-Zellen, die durch die Sekretion der Zytokine IL-2 und IFN- γ charakterisiert sind oder in Th-2 Zellen, die IL-4, IL-10 oder IL-13 sezernieren und Hilfe bei der Produktion von Antikörpern geben (Kjerrulf 1998; MacDonald 2001). Da sich die Th1 und die Th2 Zellen gegenseitig hemmen, ist die Balance zwischen beiden Populationen bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen (z.B. rheumatoide Arthritis, Typ 1 Diabetes) von zentraler Bedeutung für die Entwicklung bzw. das Fortschreiten einer entzündlichen, zytotoxischen Immunreaktion (Th1-dominiert) oder einer eher nicht-zytotoxisch wirkenden Immunantwort (Th2-dominiert) (Kolb 1997). Neben der zellulär vermittelten Zytotoxizität wird auch ein indirekter Effekt von Entzündungsmediatoren auf Darmepithelzellen und der Darmfibroblasten diskutiert.

Zytokinanalysen auf Protein- und mRNA-Ebene konnten bei unbehandelten Zöliakiepatienten eine vermehrte Produktion von IFN- γ und TNF- α durch intestinale Lymphozyten zeigen (Carol 1998; Monteleone 2001). Sowohl IFN- γ wie auch TNF- α können direkt und indirekt destruktiv auf Dünndarmepithelzellen wirken. Nach Zugabe von INF- γ konnte in Gewebekulturen eine Schädigung von humanen Enterozyten nachgewiesen werden (Przemioslo 1995). TNF- α stimuliert die Sekretion von Matrix Metalloproteinasen (MMP) aus intestinalen Fibroblasten, die durch Abbau von Bindegewebe zur Schleimhautdestruktion beitragen (Pender 1997; Daum 1999). Darüber hinaus können Zytokine (z.B. IL-15, IL-18; IFN- α), die von aktivierten APC sezerniert werden und vermehrt bei Zöliakiepatienten im Dünndarm exprimiert werden, zu einer Ausbildung von Epitheldefekten der Dünndarmschleimhaut beitragen (Kontakou 1995; Maiuri 2000; Monteleone 2001; Salvati 2002).

1.2.3. Autoantikörper

Im Rahmen der Entwicklung einer Zöliakie kommt es in Serum zum Auftreten von spezifischen Autoantikörpern, die gegen verschiedener Zielantigene gerichtet sind. Die bis heute wichtigsten Marker sind die Antikörper gegen Endomysium, eine die glatte Muskulatur umgebende bindegewebige Schicht, und die Gliadinantikörper (Schuppan 1998; Lock 1999, Teesalu 2001). Dabei ist der Nachweis von Antikörpern der Immunglobulinklasse A (IgA) von besonderer diagnostischer Bedeutung. Endomysium Antikörper (EMA) der IgA Klasse, detektiert durch einen indirekten Immunfluoreszenztest (IFL) mit Ösophagus- oder Nabelschnurgewebe, wurden bei 90-100% der Patienten mit manifester Zöliakie beschrieben (Victoria 2001). IgA Gliadinantikörper sind in 80-90% der Fälle nachweisbar. Aufgrund der deutlich höheren Spezifität der IgA EMA (bis zu 90-100%) im Vergleich zu den IgA Gliadinantikörpern (85-95%) stellen die EMA den bis heute bevorzugten Antikörpernachweis dar (Victoria 1999; Kordonouri 2000; Kumar 2001; Victoria 2001). Aufgrund der extrem hohen diagnostischen Sensitivität und Spezifität der EMA wurden diese Antikörper in zahlreichen Studien als Screeningmarker zur Detektion von Personen mit potenzieller oder stiller Zöliakie verwendet (Grodzinsky 1996; Not 2001).

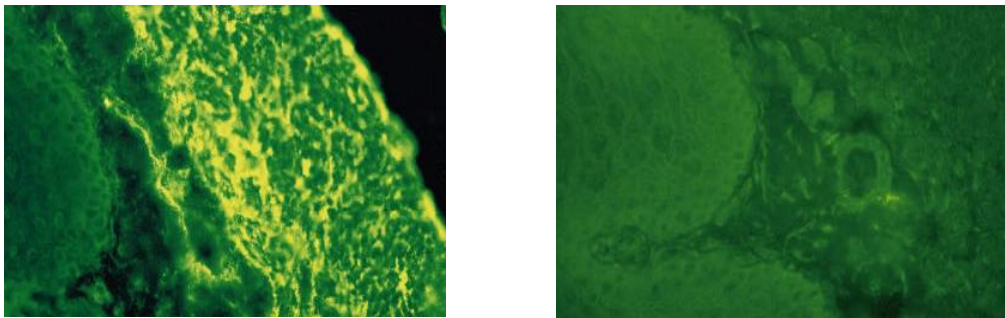


Abb. 2: Nachweis von Endomysium-Antikörpern (EMA) durch indirekten Immunfluoreszenztest. Dargestellt ist ein positiver (links) und ein negativer Befund (rechts). (Bilder aus Zimmer 1999)

Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass durch den Verzicht auf eine glutenfreie Diät bei Zöliakiepatienten auch die EMA-Spiegel anstiegen. Durch erneute Aufnahme der Diät fielen die EMA Titer auch wieder ab (Dietrich 1998; Kumar 2001). Demnach korrelieren die EMA Spiegel mit der Aktivität der Erkrankung, weshalb die EMA ein wichtiges Werkzeug für die Evaluierung der Compliance von Patienten unter Behandlung mit glutenfreier Diät darstellen (Dietrich 1998).

Aufgrund des hohen diagnostischen Nutzens der EMA war es von besonderer Bedeutung das Zielantigen dieser Antikörperspezifität zu identifizieren. Im Jahr 1997 wurde von der Arbeitsgruppe Schuppan gezeigt, dass die EMA mit dem Enzym Gewebstransglutaminase (tTG) reagieren (Dietrich 1997). Diese Befunde wurden mittlerweile von zahlreichen Arbeitsgruppen bestätigt (Brusco 1999; Kordonouri 2000; Victoria 2001; Piper 2002). Durch die Verfügbarkeit gereinigten Antigens konnten sensitive und spezifische Enzym-linked Immunosorbent Assays (ELISA) und Radioligandenassays (RLA) entwickelt werden, die den Antikörpernachweis wesentlich vereinfacht haben (Dietrich 1998; Seissler 1999; Bonamico 2001; Victoria 2001). Als Substrat wurde aus Meerschweinchenleber oder anderen Geweben extrahierte tTG oder rekombinantes Antigen eingesetzt (Dietrich 1998; Victoria 2001). Mit beiden Verfahren wurde eine sehr gute Korrelation mit dem klassischen EMA-Test beschrieben. So war die Sensitivität des ELISA mit 95-100% gleich der des EMA-Tests. Die Spezifität, die beim EMA Test ebenfalls 100% betrug, lag beim ELISA bei 94-95% (Dietrich 1998, Victoria 2001). Als möglicher Grund hierfür wurde diskutiert, dass möglicherweise kontaminierende Proteine im Meerschweinchenleberextrakt die Spezifität reduzieren. Diese Erklärung wurde durch Experimente mit Verwendung von humanen rekombinanten Antigenen unterstützt. In zwei Studien, in denen mit rekombinanten, radioaktiv markierten tTG ein RLA aufgebaut worden ist, konnte eine Sensitivität von 97-100% bei einer Spezifität von 91-99% erzielt werden (Bazzigaluppi 1999; Seissler 1999; Hoffenberg 2000; Bonamico 2001). Im direkten Vergleich mit den EMA waren die RLA teilweise sogar sensitiver bei vergleichbarer Spezifität (Williams 1999). Die Eignung von ELISAs wie auch RLAs als primäre Screeningmethode für die Identifizierung von a- oder oligosymptomatischen Patienten mit potenzieller oder silenter Zöliakie wurde mittlerweile in mehreren Studien bestätigt (Bazzigaluppi 1999; Seissler 2001). Es ist deshalb zu vermuten, dass ELISAs und Radioligandenassays in naher Zukunft die Bestimmung der EMA für Routineuntersuchungen ablösen werden. Hierdurch können die durch die Testmethode (IFL) verursachten Probleme bei der Standardisierung (semiquantitative Ergebnisse, Abhängigkeit von der Güte des verwendeten Gewebes, Subjektivität der Testauswertung) überwunden werden. Außerdem können die Kosten reduziert werden.

1.2.4. Reaktivität der Dünndarmschleimhaut

Neben der durch die infiltrierenden immunkompetenten Zellen direkt vermittelten Schädigung des Dünndarmepithels, ist das Verhalten der Darmepithel- und Bindegewebszellen von entscheidender Bedeutung für den Ablauf der Entzündungsreaktion (Schuppan 2000). So konnte in einem speziellen dreidimensionalen Kollagengel Model nachgewiesen werden, dass sich subepitheliale Fibroblasten über die Produktion von TGF- β T84-Darmepithelzellen von ihrer erst unorganisierten, kuboiden Form in eine organisierte, säulenförmige und differenzierte Form transformieren konnten (Halttunen 1996). Weitere Untersuchungen konnten demonstrieren, dass bei der Zöliakie in diesen Mechanismus eingegriffen wird, woraus letztendlich die Zottenatrophie und Kryptzellhyperplasie resultiert. Bei diesem Prozess könnten die Autoantikörper gegen tTG vom Typ IgA auch eine wichtige Rolle spielen. TGF- β , welches von Fibroblasten in seiner inaktiven Form gebildet wird, kann von tTG an die Extrazellulärmatrix gebunden und in seine aktive Form überführt werden. Die tTG-Autoantikörper vom Typ IgA sind in der Lage, über eine Blockierung der tTG in diesen Mechanismus einzugreifen (Halttunen 1999). Dadurch wird die lokale Aktivität von TGF- β vermindert, wodurch es zur fehlenden Differenzierung des Dünndarmepithels kommt. Durch die verminderte Aktivierung von TGF- β wird gleichzeitig in die Regulierung von MMP eingegriffen, die bei vermehrter Aktivität die Mukosaschädigung verstärken können (Halttunen 1999, Schuppan 2000).

1.3. Die Rolle der Gewebstransglutaminase bei der Zöliakie

Zur Familie der Transglutaminasen werden intrazellulär (z.B. Keratinozyten-Transglutaminase, epidermale Transglutaminase, Gewebstransglutaminase) und extrazellulär lokalisierten Transglutaminasen (z.B. Faktor XIII) gezählt. Transglutaminasen katalysieren die Ca^{++} -abhängige posttranslationale Modifikation von Proteinen an den Aminosäuren Glutamin und Lysin (Sollid 1997; Piacentini 1999). Die gewebständige Transglutaminase (tTG) ist ubiquitär im Magen-Darm-Trakt z.B. in Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen exprimiert. In gesundem Gewebe befindet sich die tTG intrazellulär, wird aber durch Zellschäden an den extrazellulären Raum abgegeben (Kordonouri 2000). Das Enzym spielt eine Rolle bei der Wundheilung (Vernetzung von extrazellulären Matrixproteinen) und der Induktion von Apoptose (Umbau von Strukturproteinen und Verhinderung der

Freisetzung von intrazellulären Antigenen) bei stark geschädigten Zellen (Piacentini 1999). Die Gewebstransglutaminase (tTG) katalysiert die Verknüpfung zwischen den γ -Carboxylgruppe der Aminosäure Glutamin mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins. Für das Verständnis der Rolle der tTG an der Pathogenese der Zöliakie sind zwei Mechanismen von großer Bedeutung.

Erstens konnte gezeigt werden, dass das an Glutamin reiche Gliadin ein Substrat für tTG darstellt. Gewebstransglutaminase katalysiert die Desaminidierung von Gliadinpeptiden und überführt hierbei in bestimmten Aminosäurepositionen Glutamin in Glutaminsäure. Dies hat zur Folge, dass bestimmte Peptidfragmente, die neu generierten Glutaminsäurereste aufweisen, besonders gut an HLA DQ2 und DQ8 binden können und von APC präsentiert werden. Bei Patienten mit klassischer Zöliakie konnte die Reaktivität von T-Lymphozyten gegen diese Neopeptide nachgewiesen werden (Kontakou 1995; Arentz-Hansen 2000; van de Wal 2000).

Zweitens konnte, wie unter Punkt 1.2.3. dargestellt ist, nachgewiesen werden, dass tTG selbst autoantigene Eigenschaften aufweist. Der Mechanismus, durch den der durch Gliadinaufnahme induzierte Immunprozess vom Gliadin auf ein körpereigenes Enzym übergreift, ist bis heute unbekannt. Diskutiert wird die Möglichkeit, dass bei der Desaminidierung von Gliadin tTG-Gliadin Quervernetzungen auftreten und anschließend die APCs Peptide beider Proteine kopräsentieren. Auf diese Weise könnten die APCs von gliadinreaktiven T-Zellen aktiviert werden und anschließend naive tTG-reaktive T-Zellen stimulieren. Eine direkte pathogene Bedeutung der Autoantikörper gegen tTG ist noch unklar.

2. Zielstellung

Die Zöliakie entsteht aufgrund einer Unverträglichkeit gegen Gliadin. Im Rahmen der Entzündungsreaktion entwickelt sich eine Autoimmunreaktion gegen das Enzym Gewebs-Transglutaminase. IgA und IgG Autoantikörper gegen tTG sind hochspezifische und sensitive Marker für das Vorliegen einer manifesten oder silenten Zöliakie. Ziel der vorliegenden Studie war es zu untersuchen, welche Anti-tTG Isotypantikörper bei Patienten mit manifester und silenter Zöliakie auftreten. Analysiert werden sollte das Muster der IgA Subklassen und die Antikörperreaktivität von IgG1 und IgG4 Immunglobulinen, die als indirekte Marker für das Vorliegen einer proinflammatorischen T-Helfer 1 Immunreaktion (IgG1) oder einer antiinflammatorisch T-Helfer 2 dominierten Immunantwort (IgG4) fungieren können. Desweiteren sollte getestet werden, ob neben IgA und IgG tTG-Antikörpern auch Antikörper vom IgE Isotyp bei der Zöliakie auftreten.

Für die Studie wurden neue Nachweismethoden für IgA1, IgA2, IgG1, IgG4 und IgE tTG-Antikörper etabliert, mit denen eine quantitative Bestimmung der Antikörpertiter möglich wird. Untersucht wurden Patienten mit bioptisch gesicherter manifester Zöliakie und asymptotische Typ 1 Diabetiker, bei denen positive tTG-Antikörper nachgewiesen worden sind.

In der Studie sollte erstmals die Verteilung der Isotyp tTG-Antikörper bei Patienten in verschiedenen Stadien der Zöliakie zu untersuchen. Geprüft werden sollte, ob die Kenntnis der Isotypimmunantwort Rückschlüsse auf das immunologische Geschehen ermöglicht und hierdurch ggf. die Diagnostik der Zöliakie verbessert werden kann.

3. Material und Methoden

3.1. Reagenzien

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH / Braunschweig:

[³⁵S]-Methionin

Protein A Sepharose CL4B

Protein G Sepharose

BECKHAM / Fullerton (USA):

Ready Solv HP (Scintillationsflüssigkeit)

PIERCE / Illinois (USA):

Immobilized Neutravidin Biotin

MERCK / Darmstadt:

Ethanol 20%

Natriumchlorid

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)

PHARMINGEN / Hamburg:

Anti-Human IgG₁-Biotin; Klon: G17-1

Anti-Human IgG₄, -Biotin; Klon: JDC-14

Anti-Human IgE,-Biotin; Klon: G7-26

SERVA / Heidelberg:

Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)

SIGMA / St. Louis (USA):

Anti-Human IgA Agarose

Benzamidin

Methionin

Phenylmethansulfonsäureflorid (PMSF)

Triton X-100 (t-Octylphenoxyethoxyethanol)

SOUTHERN BIOTECHNOLOGY ASSOCIATES, Inc (USA):

Anti-Human IgA₁-Biotin, Klon: B3506B4

Anti-Human IgA₂-Biotin, Klon: A9604D2

3.2. Verbrauchsmaterialien und Geräte

BECTON DICKINSON (USA):

Polypropylene round-bottom tube (14ml)

BIOZYM / Oldendorf:

Pipettenspitzen klar: 0,5-1000 µl

BRAND / Wertheim:

12 Kanal Transferpipetten

EPPENDORF / Hamburg:

Combitipp plus 1,0 ml, 2,5ml

Unichannel – Pipette

8- Kanal Multichannel Pipette

Pipetten 'Reference' 0,5-10µl, 50-200µl, 100-1000µl

FRIMONT / Milan (I):

Automatische Eismaschine (Scotsman AF-20)

GREINER / Nürtingen:

96-well Mikrotiterplatten

HERAEUS – CHRIST GmbH / Osterode:

Zentrifuge 0-6000 U/min

IKA / Wilmington (USA):

MS2 Minishaker 0- 2500 U/min

LABCOR PRODUCTS / Karlsruhe:

Pufferwannen

LABSYSTEMS / Frankfurt:

8-Kanal Multipipette (Finnpipette), 50-300µl

MILLIPORE / Bedford (USA):

Multiscreen Assay System (96-well Filtrationsplatten, Unterplatten, Vakuum Waschsystem, Punch-System)

MLW / Freital:

Rüttler

PACKARD (USA):

'Topcount' Microplate Scintillation & Luminescence Counter

SARSTEDT / Nümbrecht:

Pipettenspitzen gelb: 10-100µl, blau: 100-1000µl

SARTORIUS / Göttingen:

Feinwaage (MC1, Research RC210 P)

3.3. Lösungen / Puffer

Puffer für Radioimmunoassay (RIA):

Puffer A:

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

Puffer B:

20 mM Tris; 150 mM NaCl; 5 mM Methionin; 5 mM Benzamidin; 2 mM EDTA;

1 mM PMSF; 0,5% Triton X-100; pH 7,4

3.4. Patienten

Untersucht wurden 30 Patienten mit symptomatischer, manifester Zöliakie, deren Diagnose durch Dünndarmbiopsie bestätigt worden ist. Die zweite Patientengruppe war an einem Typ 1 Diabetes erkrankt und hatte keine Symptome einer Zöliakie. Durch den Nachweis von positiven tTG-Antikörpern, die im Rahmen einer Screeninguntersuchung detektiert worden waren, bestand bei diesen Patienten der dringende Verdacht auf eine silente Zöliakie. Obwohl nur ein Teil der Patienten einer Gastroskopie und Dünndarmbiopsie zugestimmt haben, um die Diagnose zu bestätigen, wird diese Gruppe in der vorliegenden Arbeit als Patienten mit silenter Zöliakie bezeichnet. Als Kontrollgruppe dienten 58 gesunde Blutspender. In der Tabelle 1 sind die demographischen Daten der Patienten und Kontrollen aufgeführt. Die Serumproben wurden nach der Blutabnahme aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Alle untersuchten Patienten bzw. ihre Eltern wurden über die Studie informiert und gaben ihre schriftliche Zustimmung. Die Studie wurde von den Ethikkommission genehmigt.

	Anzahl	Alter in Jahren	mittleres Alter in Jahren	Geschlecht Männlich / weiblich	
Manifeste Zöliakie	30	6 - 72	$20,2 \pm 15,2$	12	18
Silente Zöliakie	22	3 - 19	$11,3 \pm 4,9$	9	13
Blutspender	58	8 - 40	$27,3 \pm 9,0$	23	35

Tab. 2: Charakterisierung der untersuchten Patientengruppen

3.5. Herstellung von rekombinanter Gewebstransglutaminase

Für die Produktion und die Markierung mit [³⁵S]-Methionin der rekombinanten, humanen tTG wurde ein in vitro Transkriptions/Translations System (TNT Coupled Reticulocyte Lysate Kit) verwendet (Promega). Der humane full length tTG cDNA Klon, kloniert in den SP64 (Poly-A) Vektor, stand aus vorangehenden Untersuchungen zur Verfügung (Seissler 1999). 1 µg cDNA wurde mit 1 µl SP6-Polymerase, 25 µl TNT Rabbit Reticulocyte Lysate, 2 µl TNT Reaction Buffer, 1 µl 1mM Methionin-freies Aminosäurengemisch, 3 µl [³⁵S]-Methionin (10mCi/ml, 1000Ci/mmol) und 1 µl RNasin Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl) vermischt, auf 50 µl mit Nuklease-freiem H₂O verdünnt und über einen Zeitraum von 90 Minuten bei 30°C in einem Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Markierungsrate bestimmt. Dafür wurde 1 µl des Gemisches auf ein Filterpapier pipettiert und mit 40 ml 10%iger Trichloressigsäure bei 65°C für 10 min präzipitiert. Nach einem Waschschrift wurde das Filterpapier bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend die Aktivität der markierten tTG in einem Beta-Counter gemessen. Die tTG-Proben wurden aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

3.6. Nachweis der IgA tTG-Antikörper

Mittels eines Radiobinding Assay wurde der Titer der tTG IgA Antikörper in den Seren ermittelt. Zunächst wurden 96-Well Mikrotiterplatten mit 200 µl Puffer B für eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert. Nach dem Abkippen des Puffers wurden 5 µl des Testserum pro well pipettiert. Es folgte die Zugabe von [³⁵S]-Methionin markierter tTG (40 µl pro Well, entsprechend 15.000 cpm tTG) und die Inkubation über Nacht bei 4°C auf einem Rüttler. Jetzt erfolgte die Pipettierung von je 20 µl Anti-Human IgA Agarose (50% V/V). Nach zwei Stunden Inkubation bei 4°C auf dem Schüttler wurden die Proben mit einer 8-Kanal Multipipette auf eine 96-Well Filtrationsplatte überführt und anschließend mit einem Vakuumsystem 15-mal mit Puffer B gewaschen. Nachdem die Filtrationsplatten getrocknet waren, wurde zur Bestimmung der gebundenen Aktivität 20 µl Szintillationsflüssigkeit pro Well hinzugegeben. Es folgte die Messung in einem 96-Well Beta-Counter. Alle Serumproben wurden im Doppelansatz gemessen. Auf jeder Platte wurde ein positives und ein negatives Referenzserum mitgeführt.

3.7. Nachweis der IgG tTG-Antikörper

IgG tTG-Antikörper wurden, wie oben für die IgA Antikörper beschrieben, nachgewiesen. Der Unterschied bestand in der Zugabe von 20 µl Protein A Sepharose (50% V/V) (PAS-Assay) nach der Inkubationsphase von Serum und markierter tTG. In einigen Seren wurde zur Kontrolle der Antikörperbindung eine Adsorption mit 20 µl Protein G Sepharose (50% V/V) (PGS-Assay) durchgeführt. Das Überführen in die Filtrationsplatte, das Waschen und das Messen der Proben wurde entsprechend dem IgA Assay durchgeführt. Alle Serumproben wurden im Doppelansatz gemessen. Auf jeder Platte wurde ein positives und ein negatives Referenzserum mitgeführt.

3.8. Berechnung der Antikörpertiter

Die Titer der Gesamt-IgA und -IgG (PAS-Assay) tTG-Antikörper wurden in Units anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{(\text{cpm [Testserum]} - \text{cpm [Negativkontrolle]})}{(\text{cpm [Positivkontrolle]} - \text{cpm [Negativkontrolle]})} \times 100 = \text{tTG-Units}$$

Der Schwellenwert für positive IgA bzw. IgG (PAS-Assay) tTG-Antikörper wurde in einer vorangehenden Studie durch die Testung von 574 gesunden Kontrollpersonen mittels ROC-Plot Analyse bestimmt. Für die IgA tTG-Antikörper liegt der Grenzwert bei 8,3 Units und für die IgG tTG-Antikörper bei 7,9 Units. Bei Anwendung dieser Werte konnte eine diagnostische Sensitivität des IgA- und des IgG-Assays von 95,6% bei einer Spezifität von 99,5% bzw. 99,3% erzielt werden (Seissler 1999). Für den PGS-Assay wurde der Grenzwert als Mittelwert + 3 Standardabweichungen der normalen Kontrollseren berechnet.

3.9. Nachweis des Isotyps und der Subklassen der tTG-Antikörper

Für den Nachweis von tTG IgE Antikörpern und der IgA1, IgA2, IgG1 und IgG4 tTG-Antikörpersubklassen wurden jeweils ein Radiobinding Assay neu aufgebaut. Hierzu wurden ebenfalls 96-Well Mikrititerplatten und 96-Well Filtrationsplatten verwendet. Der Nachweis der Isotyp- und Subklassenantikörper gelingt durch die Zugabe von biotinylierten spezifischen Anti-Human Antikörpern und der Bindung an Neutravidin Agarose. Zunächst wurden die 96-Well Mikrotiterplatten mit 200 μ l Puffer B pro well eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert. Danach wurde jeweils 5 μ l Serum in Doppelansatz pipettiert und 40 μ l [³⁵S]-Methionin markierte tTG (15.000 cpm pro well) hinzugefügt. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C auf einem Rüttler inkubiert. Es folgte die Zusetzung der spezifischen Anti-Human Isotyp Antikörper in folgender Form:

Antikörper	Pipettiermenge / Well
Anti-Human IgA1	5 μ l
Anti-Human IgA2	5 μ l
Anti-Human IgG1	0.8 μ l
Anti-Human IgG4	0.4 μ l
Anti-Human IgE	1 μ l

Tab. 3: Pipettiermenge der Isotyp Antikörper pro Well

Nach 2 Std. wurde 50 μ l Neutravidin Agarose (50% V/V) pro Well pipettiert. Anschließend wurde die Platte für weitere 2 Std. bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Proben mit einer 8-Kanal Multipipette auf mit 200 μ l vorgewaschene 96-Well Filtrationsplatten (Porengröße 1.2 μ m) überführt und mit Zuhilfenahme eines Vakuumsystems 15-mal mit jeweils 250 μ l Puffer B gewaschen. Nachdem die Platten getrocknet waren, hatten sich die mit Neutravidin Agarose gebildeten Immunkomplexe auf der Membran abgelagert. Zur Messung der gebundenen Radioaktivität wurde 20 μ l Szintillationsflüssigkeit pro Well hinzugegeben und die Aktivität direkt auf der Platte in einem 96-Well Beta-Counter gemessen. In jedem Testansatz wurde als Kontrolle ein positives und ein negatives Standardserum mitgeführt. Aus den 58 Seren von gesunden Kontrollpersonen wurde der

Grenzwert für einen positiven Befund berechnet. Werte, gemessen in cpm, größer als der Mittelwert + 3 Standardabweichungen wurde als positiv gewertet.

3.10. Statistik

Die Antikörpertiter sind als Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Unterschiede in der Häufigkeit der Antikörper zwischen den einzelnen Patientengruppen wurden mit dem Fischer's Exact Test analysiert. Der Vergleich der Autoantikörpertiter wurde mit ANOVA durchgeführt. Ein p Wert < 0,05 wurde als signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1. Bestimmung der Grenzwerte der Subklassen- und Isotypassays

Die Seren der 58 gesunden Normalpersonen wurden für die Ermittlung der Grenzwerte für die einzelnen Assays verwendet. Für die IgA1, IgA2, IgG1, IgG4 und IgE tTG-Antikörperassays fand sich eine mittlere Bindung von 461 ± 172 cpm, 409 ± 144 cpm, 763 ± 127 cpm, 194 ± 108 cpm und 271 ± 80 cpm. Hieraus wurden die folgenden Grenzwerte berechnet:

IgA1 tTG-Antikörper:	977 cpm
IgA2 tTG-Antikörper:	841 cpm
IgG1 tTG-Antikörper:	1144 cpm
IgG4 tTG-Antikörper:	518 cpm
IgE tTG-Antikörper:	511 cpm

Unter Verwendung dieser Kriterien war jeweils 1 Serum eines Kontrollpatienten positiv für IgA1, IgA2, IgG4 und IgE Antikörper. IgG1 tTG Antikörper waren alle negativ. Für die Gesamt-IgA und -IgG (PAS-Assay) tTG-Antikörper Assays wurden die in vorangehenden Studien bestimmten Grenzwerte von 8,3 und 7,9 Units übernommen.

4.2. Gewebstransglutaminase Antikörper bei Patienten mit manifester Zöliakie

4.2.1 IgA tTG-Antikörper bei Patienten mit manifester Zöliakie

Insgesamt wurden 30 Seren von Patienten mit bioptisch gesicherter Zöliakie untersucht. Bei allen Seren konnten im konventionellen Gesamt-IgA Assay tTG-Antikörper nachgewiesen werden. In diesem Kollektiv fanden sich bei 27 (90%) Patienten tTG Antikörper der IgA1 Subklasse. Nur 12 (40%) Patienten hatten positive IgA2 Antikörper ($p < 0,001$). Deutliche Unterschiede konnten bei den Antikörpertitern der IgA Subklassen beobachtet werden. Die mittleren Antikörpertiter, gemessen als cpm gebundene Radioaktivität, lagen bei den IgA1 tTG-Antikörpern signifikant höher (2281 ± 1298 cpm) als bei den IgA2 Antikörpern (1009 ± 664 cpm) ($p < 0,001$) (Tab. 5). Zwischen den Geschlechtern ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Antikörperprävalenz und den Antikörpertitern nachweisen (Tab. 4 und 5).

Patienten	Anzahl	Prävalenz der IgA tTG-Antikörper		
		IgA	IgA1	IgA2
Gesamt	30	30 (100%)	27* (90,0%)	12 (40,0%)
Weiblich	18	18 (100%)	17 (94,4%)	6 (33,3%)
Männlich	12	12 (100%)	10 (83,3%)	6 (50%)

Tab. 4: Prävalenz der IgA tTG-Antikörper bei Patienten mit manifester Zöliakie
*p < 0,001 versus IgA2

Patienten	Anzahl	Titer der tTG-Antikörper		
		IgA (Units)	IgA1 (cpm)	IgA2 (cpm)
Gesamt	30	65 ± 28	2281 ± 1298*	1009 ± 664
	Median:	63	1865	750
Weiblich	18	66 ± 28	2048 ± 1035*	803 ± 313
	Median:	63	1638	750
Männlich	12	63 ± 30	2630 ± 1601*	1317 ± 915
	Median:	64	2264	946

Tab. 5: Titer der IgA tTG-Antikörper bei Patienten mit manifester Zöliakie
*p < 0,001 versus IgA2

4.2.2. Korrelation der IgA tTG-Antikörper mit dem Alter

Das Alter der untersuchten Patienten lag zwischen 6 und 72 Jahren. Um Unterschiede zwischen Kindern bzw. Jugendlichen und Erwachsenen zu erfassen, wurde das Patientenkollektiv in zwei Gruppen unterteilt (Altersgrenze 18 Jahre). Weder in der Prävalenz der IgA1 und IgA2 tTG-Antikörper noch in der Höhe der Antikörperspiegel waren signifikante Unterschiede zwischen Erwachsenen und Kindern zu beobachten (Tab. 6 und 7).

Altersgruppen	Anzahl	Prävalenz der tTG-Antikörper		
		IgA	IgA1	IgA2
1-18 Jahre	19	19 (100%)	17 * (89,4%)	8 (42,1%)
> 18 Jahre	11	11 (100%)	10** (90,9)	4 (36,4%)

Tab. 6: Prävalenz der IgA tTG-Antikörper in Abhängigkeit vom Alter

*p < 0,006, ** p < 0,03 versus IgA2

Altersgruppen	Anzahl	Titer der tTG-Antikörper		
		IgA (Units)	IgA1 (cpm)	IgA2 (cpm)
1-18 Jahre	19	63 ± 29	2103 ± 1082*	1071 ± 750
> 18 Jahre	11	69 ± 28	2587 ± 1616*	901 ± 495

Tab. 7: Antikörpertiter der IgA tTG-Antikörper in Abhängigkeit vom Alter

*p < 0,001 versus IgA2

4.2.3. IgG und IgE tTG-Antikörper bei Patienten mit manifester Zöliakie

Die Bestimmung der Gesamt-IgG tTG-Antikörper, gemessen mit der konventionellen Methode (PAS-Assay), erbrachte bei 29 (96,6%) Seren ein positives Ergebnis. IgG1 tTG-Antikörper waren aber nur bei 17 (56,6%) Patienten detektierbar und kein Patient hatte Antikörper der IgG4 Subklasse ($p < 0,01$ versus Gesamt-IgG). Die Analyse der IgE Antikörper erbrachte bei 3 (10,3%) Patienten ein positives Ergebnis (Tab. 8).

Der Vergleich der Befunde zwischen den Gesamt-IgG tTG-Antikörpern mit den IgG1 und IgG4 Antikörpern zeigt deutliche Unterschiede. Um diese Diskrepanz aufzuklären, wurde bei 15 Patienten die Adsorption der Immunkomplexe an Protein A Sepharose (starke Bindung von IgG, schwache Bindung von IgA) mit der Adsorption an Protein G Sepharose (starke Bindung von IgG, keine Bindung von IgA) verglichen. Der Antikörpernachweis konnte nur bei 7 von 15 Seren, bei denen ein positives Signal mit PAS-Assay gemessen worden war, unter Verwendung von Protein G Sepharose bestätigt werden. Es fand sich aber eine sehr gute Korrelation der Befunde beim Vergleich der Ergebnisse zwischen den Assays mit Protein G Sepharose und Anti-IgG1-Neutravidin. Dies weist darauf hin, dass entgegen der gängigen Annahme die schwache Bindung von IgA an Protein A Sepharose bei Patienten mit hochtitrigen IgA Antikörpern ausreicht, um einen falsch positiven IgG Antikörpernachweis zu erhalten (Tab. 9).

Patienten	Anzahl	Prävalenz der tTG Isotypantikörper		
		IgG1	IgG4	IgE
Gesamt	30	17* (56,6%)	0	3 (10%)
Weiblich	18	10** (55,5%)	0	1 (5,5 %)
Männlich	12	7 (58,3%)	0	2 (16,6%)

Tab. 8: Prävalenz der IgG1, IgG4 und IgE tTG-Antikörper bei Zöliakiepatienten
* $p < 0,001$, ** $p < 0,003$ versus IgG4 und IgE

Probanden	Präzipitation mit		
	Protein A Sephrose	Protein G Sephrose	Anti-IgG1/ Neutravidin
<hr/>			
Manifeste Zöliakie			
1	4400	1584	1396
2	900	389	898
3	3428	840	3891
4	3144	304	891
5	3224	1643	1221
6	3348	980	1352
7	948	297	737
8	1063	291	997
9	3704	773	998
10	1216	200	955
11	1214	1390	2162
12	3112	348	919
13	3044	729	1120
14	4120	1214	1263
15	3936	604	760
<hr/>			
Normalseren			
1	155	136	751
2	234	148	795
3	278	240	755
4	185	184	758
5	317	298	851
<hr/>			

Tab. 9: Korrelation der Befunde bei der Adsorption der Immunkomplexe mit Protein A Sepharose, Protein G Sepharose oder Anti-IgG1/Neutravidin. Dargestellt ist die gebundene Aktivität in cpm. Werte, die nach unseren Kriterien eine positive Antikörperbindung anzeigen, sind fett gedruckt.

Bei den IgG tTG-Antikörper positiven Personen konnten hohe Spiegel für die IgG1 Antikörpern (1319 ± 666 cpm) nachgewiesen werden. Dem gegenüber waren nur sehr niedrige Antikörpertiter für die IgG4 und IgE tTG-Antikörper detektierbar (178 ± 77 cpm und 320 ± 155 cpm) (Tab. 10). Signifikante Unterschiede hinsichtlich des Alters fanden sich nicht (Tab. 11 und 12). Die Untersuchung der Assoziation der IgG Subklassenantikörper mit dem Geschlecht erbrachte ebenfalls keine signifikante Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Probanden/Probandinnen (Tab. 8 und 10).

Patienten	Anzahl	Titer der tTG-Antikörper (cpm)		
		IgG1	IgG4	IgE
Gesamt	30	$1319 \pm 666^*$	178 ± 77	320 ± 155
	Median:	1204	160	270
Weiblich	18	$1161 \pm 358^*$	170 ± 78	285 ± 100
	Median:	1187	149	243
Männlich	12	$1556 \pm 932^*$	189 ± 76	371 ± 208
	Median:	1206	167	279

Tab. 10: Titer der IgG1, IgG4 und IgE tTG-Antikörper bei Patienten mit manifester Zöliakie
 *p < 0,001 versus IgG4 und IgE

Altersgruppen	Anzahl	Prävalenz der tTG-Antikörper		
		IgG1	IgG4	IgE
1-18 Jahre	19	12* (63,2%)	0	1 (5,3%)
> 18 Jahre	11	6 (54,5%)	0	2 (18,2%)

Tab. 11: Prävalenz der IgG1, IgG4 und IgE tTG-Antikörper in Abhängigkeit vom Alter
*p < 0,001 versus IgG4 und IgE

Altersgruppen	Anzahl	Titer der tTG-Isotypantikörper (cpm)		
		IgG1	IgG4	IgE
1-18 Jahre	19	1298 ± 511*	179 ± 77	307 ± 121
> 18 Jahre	11	1369 ± 900*	175 ± 80	342 ± 206

Tab. 12: Korrelation der Titer der IgG1, IgG4 und IgE tTG-Antikörper mit dem Alter
*p < 0,001 versus IgG4 und IgE

4.2.4. Korrelation der tTG-Isotypantikörper

IgA1 war der häufigste Isotyp der tTG-Antikörper (90%) bei Patienten mit manifester Zöliakie. In 7 Fällen konnten nur IgA1 Antikörper nachgewiesen. Dem gegenüber waren alle Patienten mit IgA2 Antikörper auch IgA1 Antikörper positiv. IgG1 und IgE Antikörper wurden ebenfalls nur bei Patienten mit IgA1 Antikörpern gefunden. In 10 IgG1-positiven Fällen waren neben den IgA1 Antikörpern auch die IgA2 Antikörper positiv. Nur 2 Seren zeigten gleichzeitig Antikörper der Subklassen IgA1, IgA2, IgG1 und IgE.

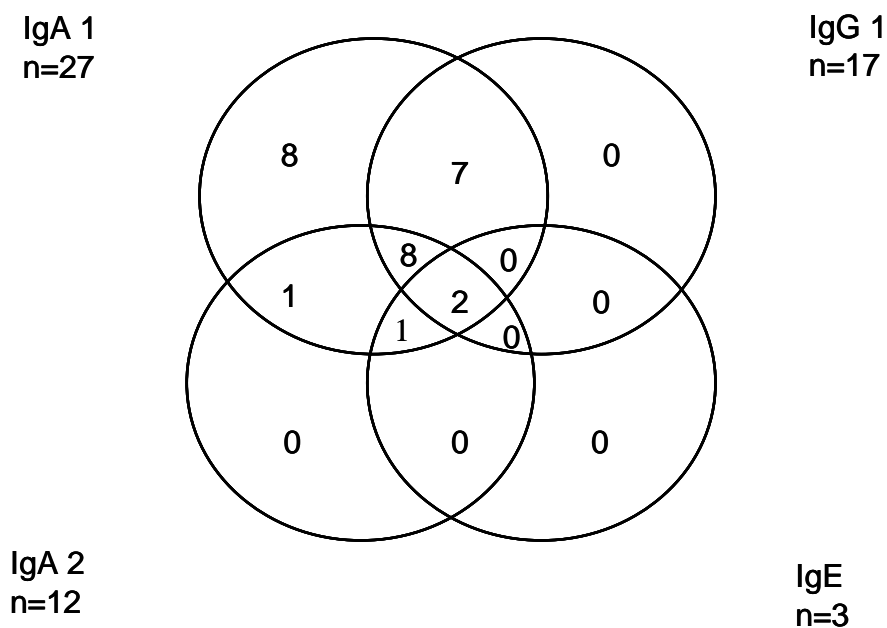


Abb. 3: Korrelation der IgA1, IgA2, IgG1 und IgE tTG-Antikörper bei Patienten mit manifester Zöliakie

4.3. Gewebstransglutaminase Antikörper bei Patienten mit silenter Zöliakie

4.3.1. IgA tTG-Antikörper bei Patienten mit silenter Zöliakie

In der Gruppe der 22 Patienten mit silenter Zöliakie waren definitionsgemäß alle Personen Gesamt-IgA tTG-Antikörper positiv. Die IgA1 tTG-Antikörper waren bei 20 (90,1%) Patienten nachweisbar. Nur 7 (31,8%) Seren waren IgA2 Antikörper positiv. Die Prävalenz der IgA1 tTG-Antikörper war somit signifikant höher im Vergleich zu den IgA2 Antikörpern ($p < 0,001$). Wie bei den Patienten mit manifester Zöliakie waren deutlich höhere Titer für die IgA1 Antikörper (2858 ± 1079 cpm) im Vergleich zu den IgA2 tTG-Antikörpern (717 ± 347 cpm) zu verzeichnen ($p < 0,001$). Die Antikörperprävalenz und die Antikörpertiter waren bei weiblichen und männlichen Patienten ähnlich (Tab. 13 und 14).

Patienten	Anzahl	Prävalenz der tTG-Antikörper		
		IgA	IgA1	IgA2
Gesamt	22	22 (100%)	20* (90,1%)	7 (31,8%)
Weiblich	13	13 (100%)	12** (92,3%)	5 (38,5%)
Männlich	9	9 (100%)	8** (88,8%)	2 (22,2%)

Tab. 13: Prävalenz der IgA tTG Antikörper bei Patienten mit silenter Zöliakie

* $p < 0,001$, ** $p < 0,02$ versus IgA2

Patienten	Anzahl	tTG-Antikörpertiter		
		IgA (Units)	IgA1 (cpm)	IgA2 (cpm)
Gesamt	22	76 ± 32	2858 ± 1079*	717 ± 347
	Median:	85	2960	627
Weiblich	13	78 ± 30	2740 ± 1106*	792 ± 390
	Median:	87	2636	803
Männlich	9	72 ± 33	3029 ± 1081*	608 ± 254
	Median:	83	3044	507

Tab. 14: Titer der IgA tTG-Antikörper bei Patienten mit silenter Zöliakie

*p < 0,001 versus IgA2

4.3.2. Korrelation der IgA tTG-Antikörper mit dem Alter

Das Alter der Patienten mit silenter Zöliakie lag zwischen 3 und 19 Jahren. Für die Auswertung des möglichen Einflusses des Alters auf die tTG-Antikörper wurden die Patienten in zwei Altersgruppen unterteilt. Die Prävalenz der IgA tTG-Antikörper war in beiden Gruppen ähnlich (Tab. 15). Die Antikörpertiter der Gesamt-IgA tTG-Antikörper war bei den kleinen Kindern (Alter 3-10 Jahre) etwas niedriger im Vergleich zu den älteren Kindern (Alter > 10 Jahre) (69 versus 80 Units). Diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.

Altersgruppen	Anzahl	Prävalenz der tTG-Antikörper		
		IgA	IgA1	IgA2
1-10 Jahre	9	9 (100%)	8* (88,8%)	2 (22,2%)
> 10 Jahre	13	13 (100%)	12** (92,2%)	2 (22,2%)

Tab. 15: Korrelation der IgA tTG-Antikörper mit dem Alter bei Patienten mit silenter Zöliakie

*p < 0,001, **p < 0,02 versus IgA2

Altersgruppen	Anzahl	tTG-Antikörpertiter		
		IgA (Units)	IgA1 (cpm)	IgA2 (cpm)
1-10 Jahre	9	69 ± 33	2767 ± 1133*	683 ± 364
> 10 Jahre	13	80 ± 30	2922 ± 1083*	740 ± 347

Tab. 16: Korrelation der Titer der IgA tTG-Antikörper mit dem Alter der Patienten mit silenter Zöliakie

*p < 0,001 versus IgA2

4.3.3. IgG und IgE tTG-Antikörper bei Patienten mit silenter Zöliakie

Bei den Patienten mit silenter Zöliakie hatten 4 (18,2%) Patienten IgG1 Antikörper und je ein (4,5%) Patient IgG4 bzw. IgE Antikörper (Tab. 17). Eine positive Assoziation zwischen einzelnen Isotypantikörpern und dem Geschlecht bestand nicht. Die Titer der IgG1 Antikörper (890 ± 373 cpm) waren deutlich niedriger als die IgA1 Antikörper (2858 ± 1079 cpm) ($p < 0,001$) und waren vergleichbar mit den IgA2 tTG-Antikörperspiegeln (717 ± 347 cpm) (Tab. 18). Die Prävalenzen der IgG1, IgG4 und IgE Antikörper zeigten keine signifikante Korrelation zum Geschlecht (Tab. 17). Interessant war, dass positive IgG1 tTG-Antikörper ausschließlich bei Kindern auftraten, die jünger als 10 Jahre alt waren (Tab. 19 und 20).

Patienten	Anzahl	Prävalenz der tTG-Antikörper		
		IgG1	IgG4	IgE
gesamt	22	4 (18,2%)	1 (4,5%)	1 (4,5%)
weiblich	13	3 (23,0%)	1 (7,7%)	1 (7,7%)
Männlich	9	1 (11,1%)	0	0

Tab. 17: Prävalenz der IgG1, IgG4 und IgE tTG-Antikörper bei Patienten mit silenter Zöliakie

Patienten	Anzahl	Titer der tTG Antikörpertiter		
		IgG1 (cpm)	IgG4 (cpm)	IgE (cpm)
Gesamt	22	890 ± 373*	257 ± 155	320 ± 98
	Median:	776	151	296
Weiblich	13	905 ± 419*	325 ± 155	359 ± 106
	Median:	745	364	355
Männlich	9	869 ± 319*	158 ± 94	264 ± 48
	Median:	791	125	257

Tab. 18: Titer der IgG1, IgG4 und IgE Isotypantikörper bei Patienten mit silenter Zöliakie
*p < 0,01 versus IgG4 und IgE

Altersgruppen	Anzahl	Prävalenz der tTG-Isotypantikörper		
		IgG1	IgG4	IgE
1-10 Jahre	9	4 (44,4%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)
> 10 Jahre	13	0	0	0

Tab. 19: Prävalenz der IgG1, IgG4 und IgE tTG-Antikörper in Abhängigkeit vom Alter

Altersgruppen	Anzahl	Titer der tTG-Isotypantikörper		
		IgG1	IgG4	IgE
1-10 Jahre	9	1122 ± 450*	243 ± 164	330 ± 131
> 10 Jahre	13	730 ± 202*	266 ± 155	313 ± 73

Tab. 20: Korrelation der Titer der Isotypantikörper mit dem Alter bei Patienten mit silenter Zöliakie

*p < 0,01 versus IgG4 und IgE

4.3.4. Korrelation der tTG-Isotypantikörper

Der dominante Isotyp waren auch bei den Patienten mit silenter Zöliakie die IgA1 Antikörper, die allein in 10 der 22 Patienten auftraten. In allen IgA2 oder IgG1 positiven Fällen waren gleichzeitig die IgA1 Antikörper nachweisbar. Sechs Patienten hatten nur IgA1 und IgA2 Antikörper. Dem gegenüber war in allen IgG1 Antikörper positiven Seren gleichzeitig IgA1 nachweisbar. IgG4 war nur in einem Serum positiv, das gleichzeitig IgA1, IgG1 und IgE Antikörper aufwies.

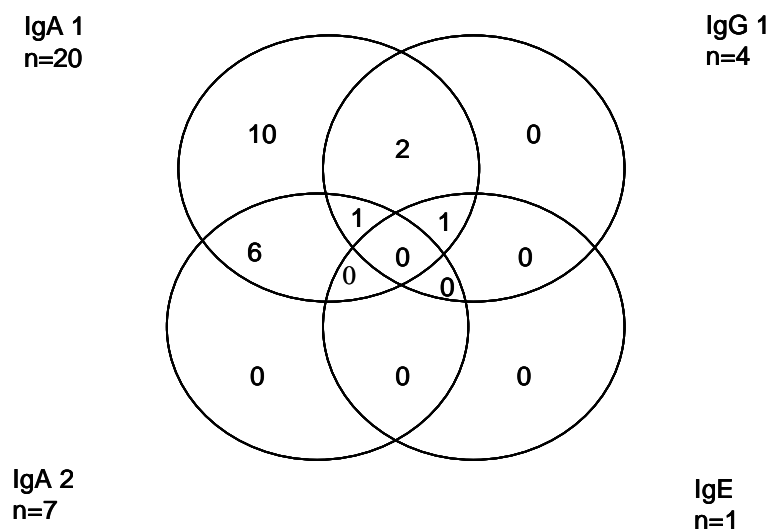


Abb. 4: Korrelation der Isotypantikörper bei Patienten mit silenter Zöliakie

4.3.5. Korrelation der tTG-Isotypantikörper mit dem Dünndarmbiopsiefund

Bei insgesamt 12 der 22 Typ 1 Diabetiker mit positiven IgA tTG-Antikörpern konnte eine Gastroskopie und eine Dünndarmbiopsie durchgeführt werden. Bei 11 der 12 Patienten wurden vom Pathologen Zöliakie-typische Dünndarmveränderungen beschrieben, die, obwohl die Patienten klinisch asymptomatisch waren, vom Auftreten vermehrter intraepithelialer Lymphozyten (Marsh 1) bis zur Zottenatrophie (Marsh 3) reichten. Tabelle 21 zeigt die Assoziation der Isotypantikörper mit dem Grad der Schleimhautveränderungen. Bei Patienten, die IgA1 tTG-Antikörper positiv waren, fanden sich unterschiedliche Stadien von Marsh 0 bis Marsh 3. IgA2 und IgG1 tTG-Antikörper waren mit deutlichen Dünndarmveränderungen assoziiert. Hier konnten bei allen Patienten pathologische Schleimhautbefunde in den Stadien 2 und 3 nachgewiesen werden.

TTG-Antikörper	Anzahl	Dünndarmbiopsiefund				
		Marsh 0	Marsh 1	Marsh 2	Marsh 3	Marsh 4
IgA1	12	1	1	4	6	0
IgA2	4	0	0	1	3	0
IgG1	4	0	0	1	3	0

Tab. 21: Assoziation der tTG-Isotypantikörper mit dem Befund der Dünndarmbiopsie bei Patienten mit Verdacht auf silente Zöliakie

4.4. Vergleich der Isotypantikörper gegen tTG bei Patienten mit manifester und silenter Zöliakie

Da die Formation von Antikörpern die Regulation einer Immunantwort reflektieren kann, wurde geprüft, ob Unterschiede in der Häufigkeit der Antikörper, im Antikörpertiter und der Isotypverteilung zwischen den Patienten mit manifester und silenter Zöliakie auftreten. Wegen der geringen Prävalenz der IgG4 und IgE Antikörper wurden in diese Analyse nur die IgA1, IgA2 und IgG1 Antikörper aufgenommen.

4.4.1. Prävalenz der tTG-Antikörper

Ein Vergleich der Häufigkeit der einzelnen Subklassen- und Isotypantikörper zeigt, dass die IgA1 und IgA2 tTG Antikörper bei Patienten mit manifester und silenter Zöliakie ähnlich häufig nachweisbar waren. Die Prävalenz der IgG1 Antikörper zeigte deutliche Unterschiede zwischen beiden Kollektiven. Während IgG1 tTG-Antikörper bei 57% der Patienten mit manifester Zöliakie nachweisbar waren, fand sich ein positiver IgG1 tTG Antikörperbefund nur bei 18% der Patienten mit silenter Zöliakie ($p < 0,01$).

4.4.2. Titer der tTG-Antikörper

Um Unterschiede im Antikörpertiter zwischen den Patienten mit manifester und silenter Zöliakie zu erfassen, wurden zunächst die Gesamt-IgA Antikörperspiegel miteinander verglichen. Wie in Abb.5 dargestellt ist, war die Spannweite der tTG-Antikörper in beiden Patientengruppen etwa gleich. Die Mittelwerte der IgA Antikörper waren bei den Patienten mit manifester Zöliakie (65 ± 28 Units) nicht signifikant niedriger im Vergleich zu den Patienten mit silenter Erkrankung (76 ± 32 Units).

Ein direkter Vergleich der Antikörpertiter für die verschiedenen Isotypen ist in den folgenden Abbildungen für beide Patientenkollektive dargestellt. Zusätzlich wurden zur besseren Veranschaulichung die Messwerte der Kontrollseren für jeden Isotypantikörper aufgeführt. Die markierte Linie stellt den jeweiligen Schwellenwert für den betreffenden Isotypantikörper dar. In der Gesamtpopulation waren die mittleren IgA1 tTG-Antikörpertiter bei Patienten mit silenter Zöliakie signifikant höher als bei Patienten mit manifester

Erkrankung (2281 ± 1298 cpm versus 2858 ± 1079 cpm) ($p < 0,001$). Demgegenüber waren die Spiegel der IgA2 und der IgG1 tTG-Antikörper bei den Patienten mit manifester und silenter Zöliakie nicht signifikant unterschiedlich (IgA2: 1009 ± 664 cpm versus 717 ± 347 cpm; IgG1: 1319 ± 666 cpm versus 890 ± 373 cpm). Werden die Antikörpertiter nur bei den Patienten betrachtet, die nach unserer Definition positive Subklassen- und Isotypantikörper aufwiesen, so zeigt sich ein ähnliches Bild. Die Spiegel der IgA1 tTG Antikörper sind höher bei den Patienten mit silenter Erkrankung (3071 ± 875 cpm) im Vergleich zu den Patienten mit manifester Zöliakie (2457 ± 1246 cpm) ($p < 0,05$). Die IgA2 und IgG1 Antikörper sind in beiden Populationen ähnlich hoch (IgA2: 1571 ± 750 cpm versus 1121 ± 271 cpm; IgG1: 1665 ± 704 cpm versus 1534 ± 311 cpm).

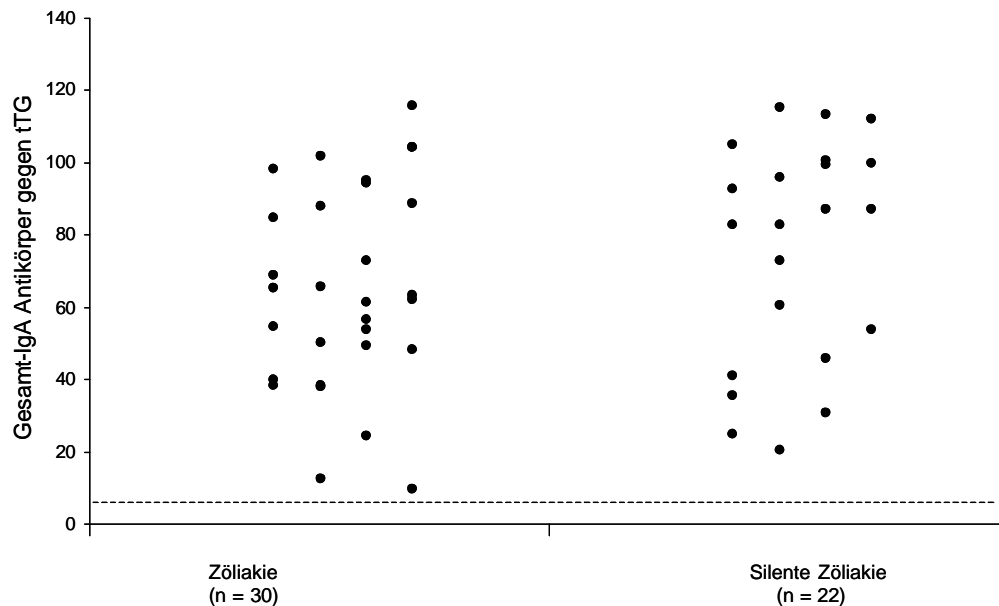


Abb. 5: Titer der Gesamt-IgA tTG-Antikörper in den Patientengruppen

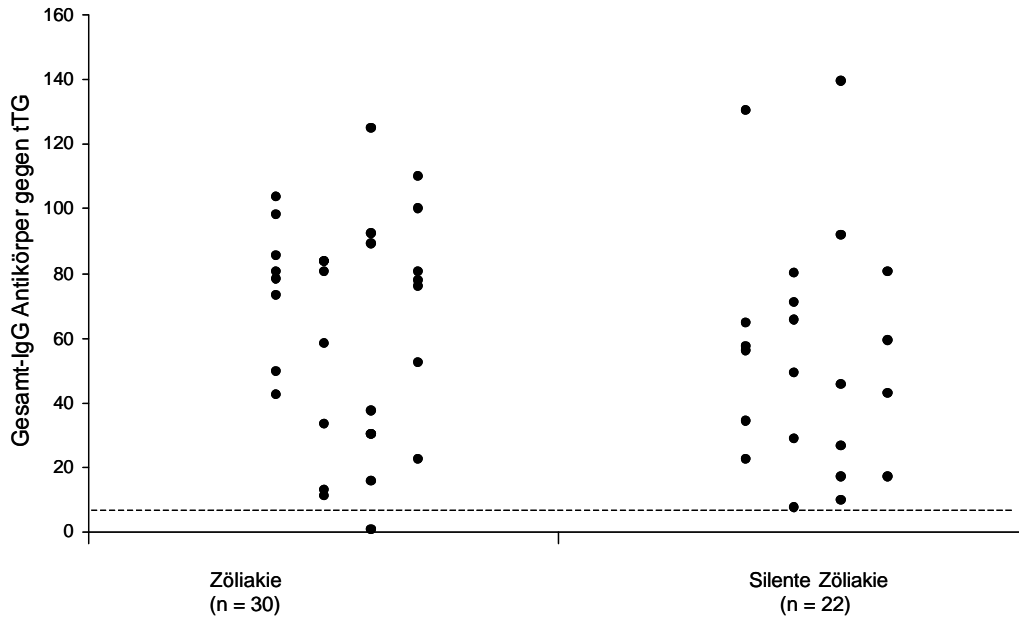


Abb. 6: Titer der Gesamt-IgG tTG-Antikörper in den Patientengruppen

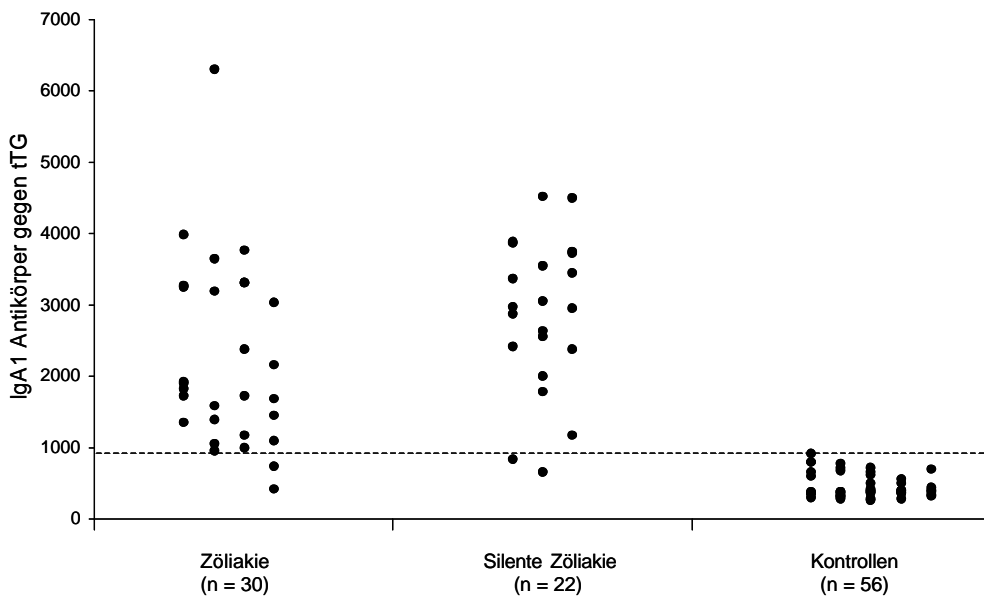


Abb. 7: Titer der IgA1 Antikörper in den verschiedenen Probandengruppen

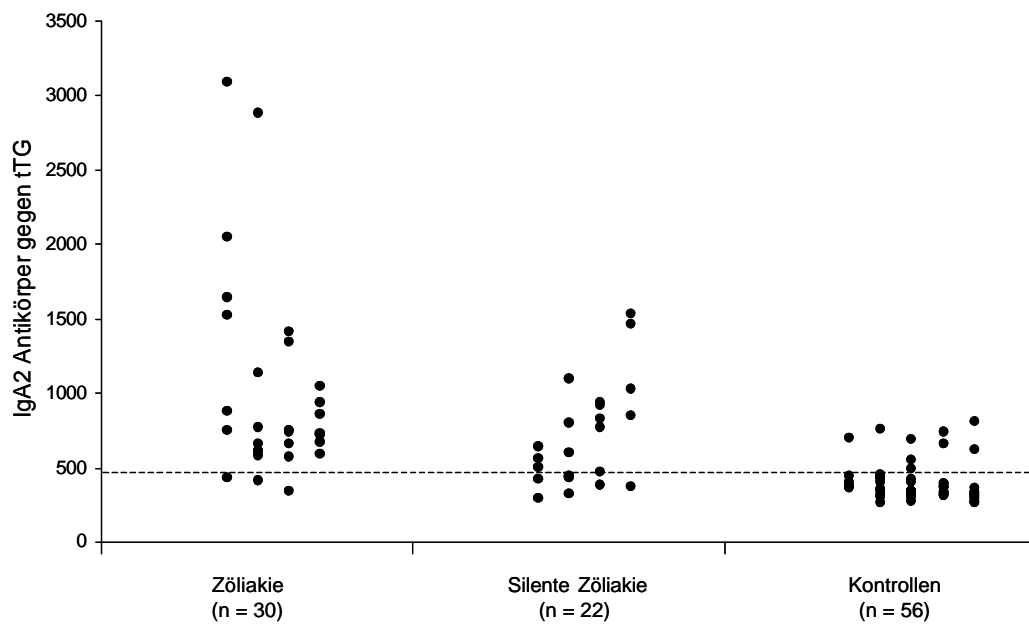


Abb. 8: Titer der IgA2 Antikörper in den verschiedenen Probandengruppen

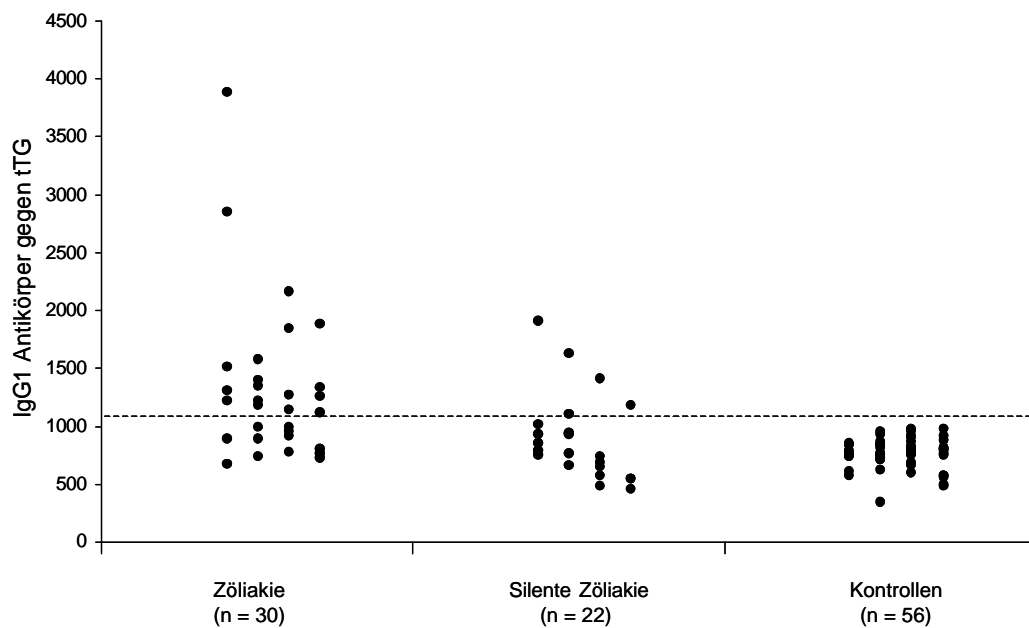


Abb. 9: Titer der IgG1 Antikörper in den verschiedenen Probandengruppen

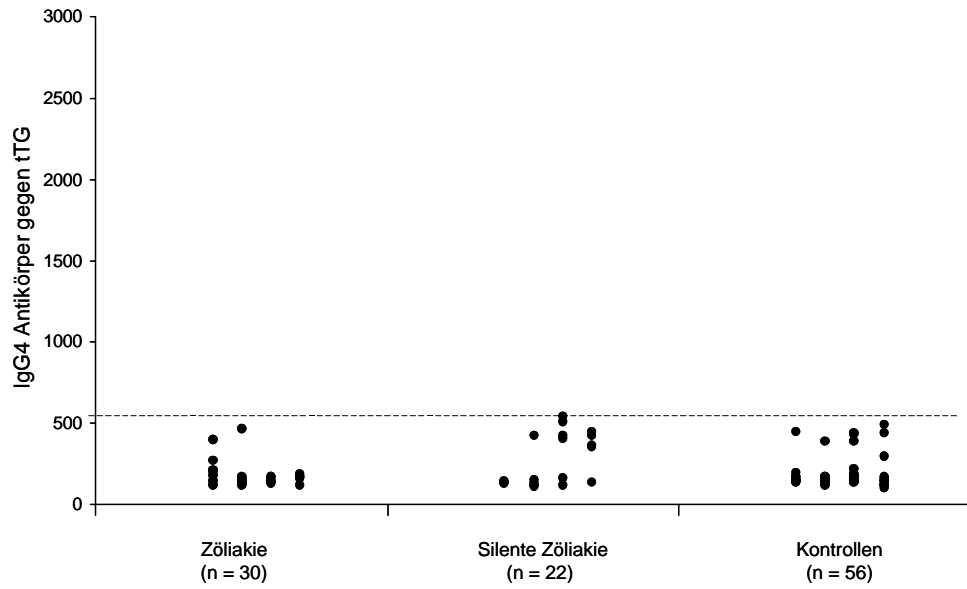


Abb. 10: Titer der IgG4 Antikörper in den verschiedenen Probandengruppen

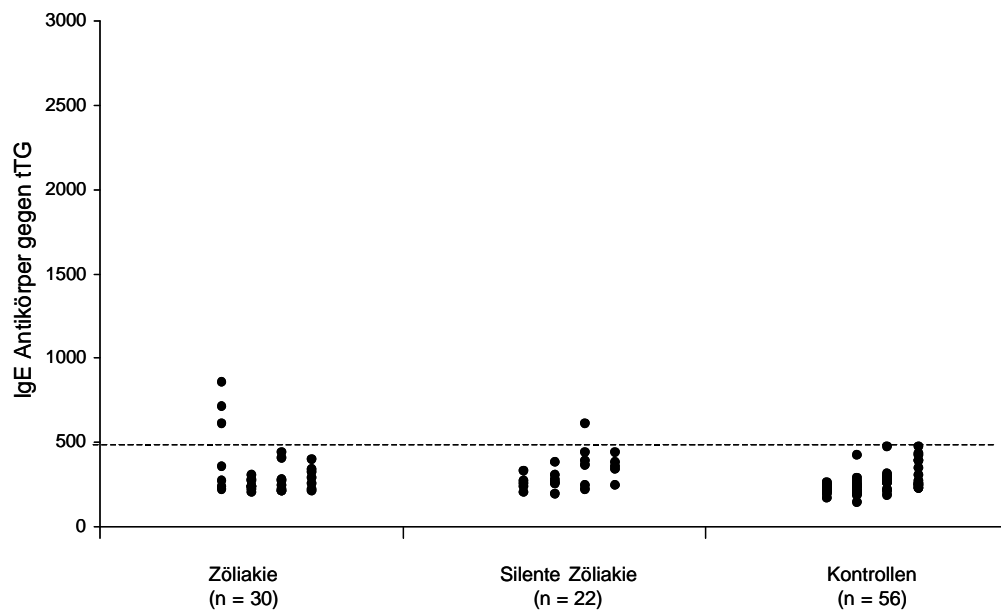


Abb. 11: Titer der IgE Antikörper in den verschiedenen Probandengruppen

4.4.3. Korrelation zwischen den IgA1 und IgA2 tTG-Antikörpern

Der Vergleich der individuellen Titer der IgA1 und IgA2 Antikörper zeigt, dass bei den Patienten mit manifester Zöliakie die Titer der IgA2 tTG-Antikörper nur bei einem Patient höher waren als die IgA1 tTG-Antikörper. Die Titer der IgA2 tTG-Antikörper bei den Patienten mit silenter Zöliakie in allen Fällen niedriger als die der IgA1 tTG-Antikörper. In den Abbildungen 10 und 11 sind wegen der besseren Übersicht nur die Fälle aufgetragen, bei denen sowohl IgA1 wie IgA2 tTG-Antikörper positiv waren.

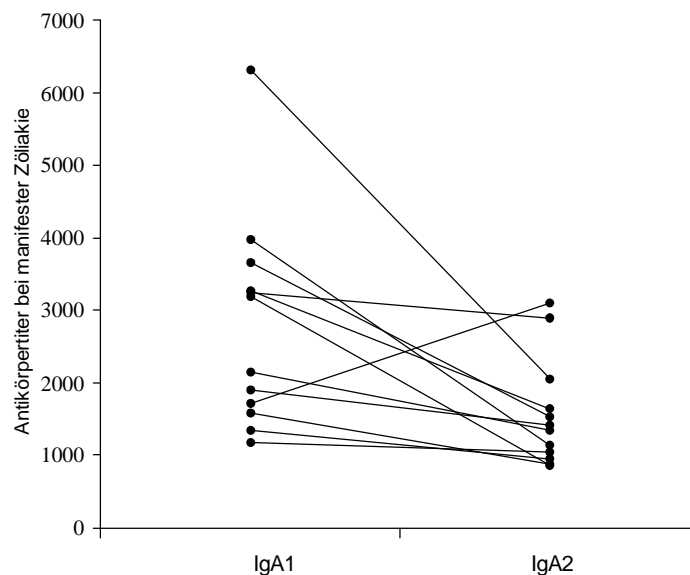


Abb. 12: Korrelation der individuellen Titer der IgA1 und IgA2 tTG-Antikörper bei Patienten mit manifester Zöliakie

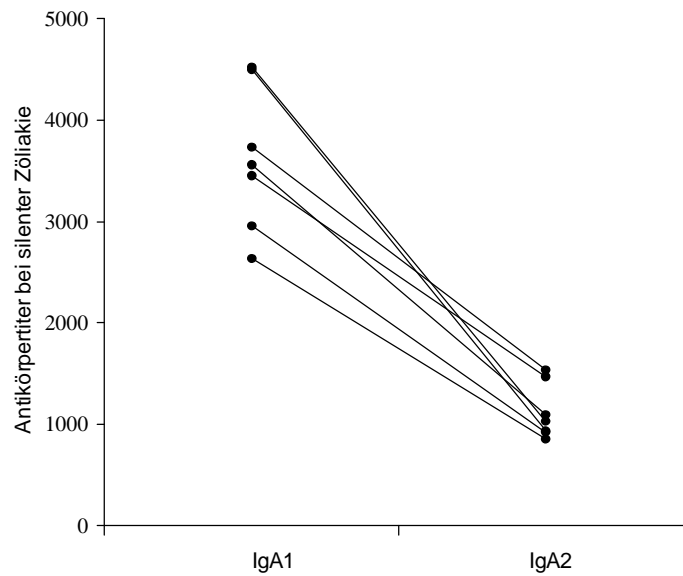


Abb. 13: Korrelation der individuellen Titer der IgA1 und IgA2 tTG-Antikörper bei Patienten mit silenter Zöliakie

4.4.4. Korrelation zwischen den IgA1 und IgG1 tTG-Antikörpern

Der Vergleich der individuellen Titer der IgA1 und IgG1 Antikörper zeigt, dass bei den Patienten mit manifester Zöliakie die Titer der IgG1 tTG-Antikörper in nur zwei Fällen höher waren als die Titer der IgA1 tTG-Antikörper. Der Titer der IgG1 tTG-Antikörper war nur bei einem Patienten mit silenter Zöliakie höher als der Titer der IgA1 tTG-Antikörper. In den Abbildungen 12 und 13 sind wegen der besseren Übersicht nur die Fälle aufgetragen, bei denen sowohl die IgA1 wie die IgG1 tTG-Antikörper positiv waren.

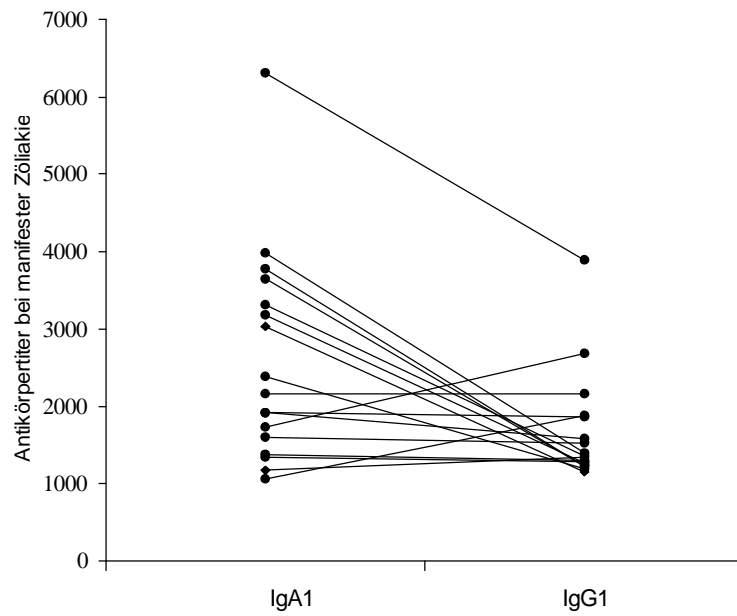


Abb. 14: Korrelation der individuellen Titer der IgA1 und IgG1 tTG-Antikörper bei Patienten mit manifester Zöliakie

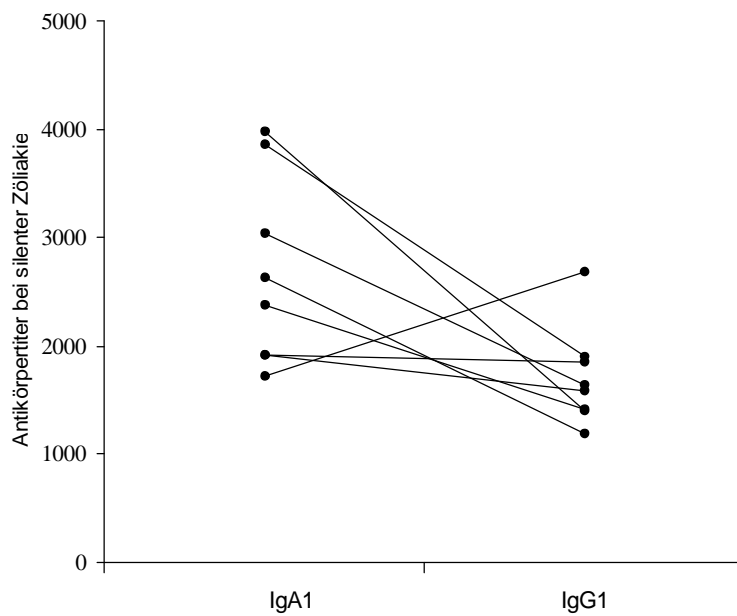


Abb. 15: Korrelation der individuellen Titer der IgA1 und IgG1 tTG-Antikörper bei Patienten mit silenster Zöliakie

5. Diskussion

Autoantikörper gegen das Enzym Gewebstransglutaminase (tTG) sind neue serologische Marker für eine manifeste und silente Zöliakie, die in ihrer Spezifität und Sensitivität mit den Endomysiumantikörpern vergleichbar sind. In der vorliegenden Arbeit wurden neue Assays für den spezifischen Nachweis von Isotyp Autoantikörpern gegen tTG aufgebaut und deren Wertigkeit in verschiedenen Patientenkollektiven untersucht. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass bei Patienten mit Zöliakie tTG-Antikörper verschiedener IgA und IgG Subklassen auftreten. Da die Antikörperverteilung bei Patienten mit manifester und silenter Zöliakie unterschiedlich war, könnte die Differenzierung der tTG-Isotypantikörper einen wertvollen indirekten Marker für die Stärke der Dünndarminflammation darstellen.

Die Formation von Antikörpern eines bestimmten Isotyps oder einer Subklasse wird durch das Milieu mitbestimmt, in dem die naiven B-Zellen stimuliert werden. Dies kann von der Art des Antigens, den kostimulierenden Molekülen auf den Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und den Zytokinen, die bei der APC und T-Helfer-Zell Interaktion produziert werden, moduliert werden (Stavnezer 2000). Das lokale Milieu des Darms begünstigt die Entwicklung von IgA Isotypantikörpern durch die lokale T-Zell abhängige Sekretion von IL-4, IL-10, IL-13 und TGF- β in den lymphoiden Geweben (Elson 1979; Coffman 1989; Schultz 1991).

Die Untersuchung der humoralen Immunität gegen tTG erbrachte bei 100% der Patienten mit manifester und silenter Zöliakie den positiven Nachweis von IgA Autoantikörpern. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit zahlreichen anderen Studien, die zeigen konnten, dass IgA Endomysium Antikörper bzw. IgA tTG-Antikörper den dominierenden Isotyp der Immunantwort bei der Zöliakie darstellen (Dietrich 1998; Seissler 1999; Williams 1999).

Beim Menschen werden die Serum-IgA Isotypantikörper anhand ihrer biochemischen Grundstruktur in zwei Subklassen unterteilt. Im Vergleich zum IgA1 fehlt in der Hinge-Region des IgA2 eine aus dreizehn Aminosäuren bestehende Sequenz. In dieser Region enthält IgA1 zwischen drei und fünf zusätzliche O-glykolysierte Regionen. Zusätzlich enthält IgA1 zwei N-glykolysierte Seitenketten und zwar an den Positionen CH2 (Asn263) und CH3 (Asn459). Alle Allotypen vom IgA2 besitzen zwei zusätzliche N-Glykolysierungen an den Positionen CH1 (Asn166) und in CH2 (Asn337) (Rifai 2000). Es wird vermutet, dass die Unterschiede in der Glykosylierung die biologischen Eigenschaften der Antikörper beeinflussen. Die Serumkonzentrationen von der IgA1 und IgA2 Subklassen unterscheiden sich normalerweise deutlich. Die Serum-IgA bestehen zu 90% aus IgA1 Antikörper und nur

zu 10% werden IgA2 Antikörper produziert. Bei lokaler Produktion von IgA in der Schleimhaut wird eine dritte Sorte, das sogenannte sekretorische IgA, produziert. Nach der Aktivierung IgA produzierender Plasmazellen kann das IgA durch mukosale epitheliale Zellen transportiert und durch eine sogenannte J-Kette zu IgA-Dimeren oder -Polymeren verbunden werden, die auf der Schleimhaut sezerniert werden und der lokalen Abwehr dienen (Corthesy 1999; Mesteck 1999; Hocini 2000; Langford 2002). Diese sind im Serum nicht oder nur in sehr geringer Konzentration nachweisbar und waren deshalb nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchung.

In der vorliegenden Studie wurde erstmals die Verteilung der tTG-Autoantikörper hinsichtlich der zwei verschiedenen Subklassen der Serum-IgA bei Patienten mit manifester und silenter Zöliakie analysiert. Die IgA1 Antikörper stellten in beiden Patientengruppen den klar dominanten Isotyp der tTG-Antikörper dar (90%), wohingegen die IgA2 tTG-Antikörper zu einem deutlich geringeren Prozentsatz (32-40%) nachweisbar waren. Interessant war, dass bei den IgA2 tTG-Antikörper positiven Patienten in allen Fällen auch die IgA1 Antikörper nachweisbar waren. Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit einer Arbeit von Osman und Mitarbeitern, die IgA1-Endomysium-Antikörper in 26 von 26 und IgA2-Endomysium-Antikörper in nur 4 von 26 EmA-positiven Seren beschrieben haben (Osman 1996). Isotypantikörper von IgE Typ, die vor allem bei Antigenkontakt in der Haut und Schleimhaut induziert werden, waren bei nur 10% der Patienten nachweisbar und sind deshalb bei der Zöliakie nur von untergeordneter Bedeutung.

Die chemischen Unterschiede zwischen IgA1 und IgA2 lassen auf verschiedene Eigenschaften und Funktionen dieser Isotypantikörper in vivo schließen. Ein deutlicher Unterschied der Serum IgA Antikörper ist die viel schnellere hepatische Elimination von IgA2, die durch die höhere Affinität der N-glykolysierten Seitenketten des IgA2 an einen auf Hepatozyten exprimierten Asialoglykoprotein-bindenden Rezeptor vermittelt wird (Rifai 2000, Van Egmond 2001). Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass bei der Autoimmunreaktion gegen tTG im Dünndarms vorwiegend IgA1 Antikörper produziert werden und nur bei einer Untergruppe zusätzlich IgA2 tTG-Antikörper positiv werden. Auch bei anderen entzündlichen Darmerkrankungen wie der Colitis ulcerosa und dem M. Crohn, bei denen eine vermehrte Produktion von Autoantikörpern des IgA Isotyps nachgewiesen werden konnte (Kazemi-Shirazi 2002), wurde ein Überwiegen von IgA1 im Vergleich zur IgA2 Antikörpern beschrieben (Thoree 2002).

Hinweise auf die Regulation der Immunantwort bezüglich der IgA Subklassenantikörper ergaben Studien bei Knock-out Mäusen und in vitro Untersuchungen mit humanen

dendritischen Zellen. IL-4 und IFN- γ -Rezeptor Knock-out Mäuse zeigten eine verminderte IgA Immunantwort nach oraler Immunisierung (Vajdy 1995; Kjerrulf 1998). Dem gegenüber konnte bei IFN- γ Knock-out Mäusen eine vermehrte Th2 Immunantwort und eine starke IgA Produktion beobachtet werden (Yamamoto 1996; VanCott 1996). Bei Doppel-Knock-out Mäusen war eine Reduktion sowohl der Th1 wie der Th2 Immunantwort gegen lösliche Antigene beobachtet werden (Kjerrulf 1998). Andere Studien konnten bei diesen Mäusen eine starke Immunantwort zeigen, wenn partikuläre Antigen eingesetzt wurden (Yamamoto 1996). Dies führte zur Hypothese, dass die mukosale IgA Immunantwort stark von der Regulation der Th Zellen und von der Art des zugeführten Antigens abhängig ist.

Beim Menschen ist bekannt, dass CD40 aktivierte naive B-Zellen IgA bei Anwesenheit von IL-10 und TGF- β produzieren (Defrance 1992). IgA1 wird hierbei durch die Kombination von IL-10 und TGF- β oder Aktivierung von CD40 vermittelt. Die Produktion von IgA2 wird durch IL-10, TGF- β und Aktivierung von CD40 begünstigt (Islam 1991; Kitani 1994; Dubois 1999). Fayette und Mitarbeiter konnten darüber hinaus eine wichtige Rolle von humanen dendritischen Zellen bei der Aktivierung naiver B-Zellen, dem Immunglobulin Switch und der Ausreifung in Plasmazellen belegen (Pan 2001). In in vitro Untersuchungen waren allein die dendritischen Zellen in Kombination mit IL-10 und einer Aktivierung von CD40 (mit und ohne TGF- β) in der Lage, in B-Zellen die Sekretion von IgA2 Immunglobulinen zu induzieren (Fayette 1997). Da in unserer Untersuchung 40% der Seren von Patienten mit manifester Zöliakie IgA2 tTG-Antikörper positiv waren, ist eine Beteiligung von aktivierten dendritischen Zellen an der Pathogenese der Zöliakie zu vermuten. Die Beobachtung, dass Antikörper gegen tTG über die Neutralisation von tTG die Aktivität von TGF- β verringern (Esposito 2002), könnte zu einer vermehrten Produktion von IgA2 tTG-Antikörpern beitragen. Wird die oben erwähnte schnellere hepatische Elimination von IgA2 zusätzlich in Betracht gezogen (Rifai 2000), so kann vermutet werden, dass in vivo die Produktion von IgA2 tTG-Antikörpern weit höher ist, als die letztendlich im Plasma gemessenen Werte widerspiegeln. Die Untersuchung der genauen Bedeutung der IgA Subklassen tTG-Antikörper für die Zöliakie muss weiteren Studien vorbehalten bleiben. Da keine Unterschiede hinsichtlich des Geschlecht, des Alters und der Antikörpertiter zu verzeichnen waren, bleibt die Ursache für die beobachteten serologischen Unterschiede unklar. Besonders interessant wäre es in weiteren Studien die Assoziation der IgA Subklassenantikörper mit lokalen Zytokinexpressionsmustern zu untersuchen, um direkte Hinweise auf den Mechanismus des IgA Subklassenswitch zu erhalten.

In Abhängigkeit von der Art des Antigens, des Aktivierungsgrades immunkompetenter Zellen und der lokalen Entzündungsreaktion kann die Immunantwort im Darm so reguliert werden, dass die Produktion von spezifischen IgG Antikörpern induziert wird. Da IgG Antikörper z.B. durch die Bindung von Komplement die lokale Schleimhautinflammation verstärken könnten, war es besonders interessant die Prävalenz von tTG-IgG Isotypantikörper zu analysieren. Die Bestimmung der IgG tTG-Antikörper erbrachte zunächst im Vergleich mit den IgG1 und IgG4 Antikörpern ein überraschendes Bild. Während 96,6% der Patienten mit manifester Zöliakie positive tTG-Antikörper im Gesamt IgG-Assay aufwies, waren nur 56,6% der Seren IgG1 tTG-Antikörper positiv und kein Serum hatte IgG4 Antikörper. Diese Diskrepanz könnte durch das Auftreten von IgG2 oder IgG3 Antikörpern oder eine verminderte Sensitivität der Subklassenassays erklärt werden. In einer Untergruppe der Gesamt IgG positiven, IgG1 tTG-Antikörper negativen Seren war aber keine Reaktivität von IgG2 und IgG3 tTG-Antikörpern nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurden in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung von IgG1 und IgG4 Subklassenantikörpern die gleichen biotinylierten Anti-human Antikörper und Neutravidin-Agarose eingesetzt, mit denen bei Typ 1 Diabetikern ein hoch sensibler und spezifischer Nachweis von IgG1 und IgG4 Autoantikörpern gegen IA-2, einem wichtigen Antigen beim Typ 1 Diabetes, gelungen war (Seissler 2002). Da hierdurch ein Problem mit der Testspezifität und Testsensitivität weitgehend ausgeschlossen werden konnte, wurde die Frage gestellt, ob bei der Immunpräzipitation mit Protein A-Sepharose eine Kreuzreaktivität auftritt. Tatsächlich konnte bei den gleichen Seren teilweise eine sehr hohe Bindung im Assay mit Protein A Sepharose detektiert werden, während mit Protein G Sepharose klar negative Resultate gemessen wurden. Da überdies die IgG1 tTG-Antikörper nur mit positiven Antikörpern im Protein G Assay assoziiert waren, ist zu vermuten, dass die bekannte schwache Bindung von IgA an Protein A Sepharose ausreicht, um falsch positive Werte für IgG vorzutäuschen. Alle bisher publizierten Studien, die einen Radioligandenassay zum Nachweis von IgG tTG-Antikörpern angewendet haben und eine hohe Prävalenz der IgG tTG-Antikörper (96-98% bei Patienten mit manifester Zöliakie und in 3,5-33% bei Personen mit erhöhtem Zöliakierisiko) beschrieben haben, scheinen die wahre Prävalenz dieser Isotypantikörper bei weitem überschätzt zu haben (Lampasona 1999; Bazzigaluppi 1999; Seissler 1999; Hummel 2000; Bilbao 2002). Insofern liefert die vorliegende Arbeit wichtige Daten über die tatsächliche Prävalenz von IgG tTG-Antikörpern bei Patienten mit Zöliakie.

Obwohl bei Autoimmunerkrankungen des Menschen die Abhängigkeit des Immunglobulinswitch vom Zytokinmilieu noch nicht genau geklärt ist, sprechen die positiven

IgG1 Antikörper bei Fehlen oder niedriger Prävalenz von IgG4 Antikörpern für ein Th1 gesteuertes Immungeschehen. Bei der Lyme Borreliose, die zu einem überwiegenden Stimulation von Th1-Zellen führt (Forsberg 1995), konnte eine Dominanz von IgG1 und IgG3 Antikörpern bei sehr niedrigen IgG2 Titern und negativen IgG4 Antikörpern beobachtet werden (Lundgren 1989, Widhe 1998). Diese Studien wurden allgemein so interpretiert, dass beim Menschen IFN- γ den Switch zu IgG1 und IgG3 ermöglicht, während unter dem Einfluß von IL-4 vornehmlich IgG4 Antikörper produziert werden. Bei Wurminfektionen konnte in vitro und in vivo eine überwiegende Produktion von spezifischen IgG4 und IgE Antikörpern nachgewiesen werden (King 1993; Yazdanbakhsh 1995). Auch bei der Infektion mit der Nematode *Brugia* oder *Wuchereria*, die zur Entwicklung einer lymphatischen Filariose führt, konnte eine starke Th2 dominierte Immunantwort mit Überwiegen von IgE und IgG4 gegen verschiedene rekombinante Antigene nachgewiesen werden (Mahanty 1992; Kurniawan 1993; Yazdanbakhsh 1995). Untersuchungen der Assoziation verschiedener Autoimmunerkrankungen mit den Isotyp- und Subklassenmuster spezifischer Autoantikörper erbrachte ein ähnliches Bild. Bei Patienten mit M. Basedow, dem M. Wegener und dem Typ 1 Diabetes war jeweils eine heterogene Autoantikörperreaktion mit verschiedenen Isotypen (IgA, IgG und IgE) und Subklassen (IgG1-4) nachweisbar (Esnault 1991; Dozio 1994; Guo 1997; Couper 1998; Petersen 1999). Allerdings zeigten mehrere Studien beim Typ 1 Diabetes eine deutliche Dominanz des IgG1 Isotyps der Autoantikörper gegen die Antigene Insulin, Glutaminsäure Decarboxylase und Tyrosinphosphatase IA-2 (Füchtenbusch 2000; Hawa 2000) . Bei Prädiabetikern waren ebenfalls die IgG1 Autoantikörper die dominanten Antikörper, was die Hypothese einer vorwiegend Th1 dominierten Immunantwort bei der Diabetesentwicklung unterstützt (Kallan 1997, Couper 1998, Bonifacio 1999; Kallmann 1999; Seissler 2002). Bei Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis waren ebenfalls vorwiegend IgG1 Antikörper nachweisbar (Guo 1997). Diese Daten lassen vermuten, dass die Analyse der Isotyp- und Subklassenverteilung spezifischer Autoantikörper auch beim Menschen Rückschlüsse hinsichtlich der Aktivierung/Regulation der T-Zellantwort zulässt. Eine Th1 Immunantwort ist assoziiert mit einer zytotoxischen und zytodestruktiven Immunantwort. Die erhöhte Expression der proinflammatorischen Zytokine INF- α , INF- γ und IL-18 bei Patienten mit aktiver Zöliakie (Monteleone 2001; Salvati 2002) könnte die Entwicklung von IgG1 Antikörper begünstigen.

Im direkten Vergleich der Patienten mit manifester Zöliakie waren bei Patienten mit silenter Zöliakie deutlich weniger häufig IgG1 tTG-Antikörper nachweisbar. Darüber hinaus wurde in

der vorliegenden Studie eine Assoziation einer höhergradigen Schleimhautveränderung in der Dünndarmbiopsie (Marsh 3 und 4) mit dem Auftreten von IgG1 tTG-Antikörpern beobachtet. Dies könnte so interpretiert werden, dass bei symptomatischer Zöliakie autoreaktive Th1-Zellen dominieren, während bei Patienten mit silenter Erkrankung Th-2 Zellen überwiegen, die weniger inflammatorisch wirken. Es wäre denkbar, dass in einem frühen Stadium der Entwicklung einer Zöliakie das lokale Zytokinmilieu des Darmes eine Th2 Immunreaktion begünstigt, die nur zu einer begrenzten Entzündungsreaktion führt. Erst wenn zusätzliche proinflammatorische Triggerfaktoren auftreten, wird das Gleichgewicht in Richtung Th1 verschoben. Th-1 Zellen können dann durch die Sekretion von IFN- γ und TNF- α sowohl direkt als auch indirekt durch die Aktivierung von APCs (Makrophagen, dendritische Zellen) die Entzündungsreaktion der Darmschleimhaut steigern. Außerdem könnte spekuliert werden, dass IgG1 Antikörper über die Aktivierung von Komplement oder die Induktion einer Antikörper-abhängigen zytotoxischen Immunreaktion direkt am Inflammationsprozess beteiligt sind. Zur Abklärung dieser Hypothesen müssen weitere Analysen der Antikörperreaktivitäten und prospektive Verlaufsstudien folgen.

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Assays zum Nachweis von tTG-Antikörper der IgA und IgG Subklasse etabliert, mit denen erstmals die Isotypverteilung bei der Zöliakie untersucht werden konnte. Bei Patienten mit manifester und silenter Zöliakie waren die IgA1 Antikörper der dominante Isotyp. Deutliche Unterschiede waren in der Prävalenz der IgG1 tTG Antikörper zu verzeichnen. Da das Auftreten der IgG1 tTG-Antikörper bei Patienten mit silenter Zöliakie mit der Stärke der Dünndarmveränderungen assoziiert war, könnten diese einen indirekte Marker für die Aktivierung inflammatorischer T-Zellen darstellen. Die Bestimmung der tTG Isotypantikörper könnte somit eine einfache Methode darstellen, Patienten mit silenter Erkrankung und schwergradigen inflammatorischen Reaktionen frühzeitig zu erkennen. Der prädiktive Wert der IgG1 tTG-Antikörper muss allerdings in prospektiven Studien weiter geklärt werden.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Verteilung und die Bedeutung der Immunglobulin Subklassen und Isotypen der Autoantikörper gegen das Enzym Gewebstransglutaminase (tTG) bei Patienten mit verschiedenen Formen der Zöliakie zu untersuchen.

Getestet wurden 30 Seren von Patienten mit manifester Zöliakie (Alter 6-72 Jahre) und 22 Seren von tTG-Antikörper positiven, asymptomatischen Personen, die als Patienten mit silenter Zöliakie eingestuft wurden (Alter 3-19 Jahre). 58 Seren von gesunden Blutspendern dienten als Kontrolle. Die IgA1, IgA2, IgG1, IgG4 und IgE Antikörper gegen tTG wurden in Subklassen- und Isotyp- spezifischen Radioimmunoassays bestimmt.

Unter den 30 Patienten mit manifester Erkrankung waren bei 27 (90,0%) IgA1 und bei 12 (40,0%) IgA2 Antikörper nachweisbar. Ähnlich hohe Prävalenzen fanden sich bei den Patienten mit silenter Zöliakie (90,1% und 31,8%). In beiden Populationen waren bei allem IgA2 Antikörper positiven Personen auch IgA1 tTG-Antikörper positiv. IgE und IgG4 tTG-Antikörper konnten nur bei sehr wenigen Patienten mit manifester Zöliakie (4,5-10%) und silenter Zöliakie (0-4,5%) nachgewiesen werden. Deutliche Unterschiede fanden sich in der Verteilung der IgG1 Antikörper. IgG1 tTG Antikörper waren bei 56,6% der Patienten mit manifester Zöliakie, aber nur bei 18,4% der Patienten mit silenter Erkrankung positiv ($p < 0,01$). In der Gruppe der Patienten mit silenter Erkrankung war eine positive Korrelation zwischen den IgA2 und IgG1 tTG-Antikörpern und hochgradigen Schleimhautveränderungen in der Dünndarmbiopsie (Marsh 2 und 3) nachweisbar.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit erstmals gezeigt werden, daß IgA1 den dominanten Isotyp der tTG-Antikörper bei Zöliakiepatienten darstellt. IgG1 tTG-Antikörper treten häufiger bei Patienten mit manifester Erkrankung auf und sind, bei Patienten mit silenter Zöliakie, assoziiert mit der Stärke der Schädigung der Dünndarmschleimhaut. Dies könnte eine inflammatorische, Th1-dominierte Immunantwort anzeigen. Aus den Ergebnissen läßt sich schließen, dass die Bestimmung von IgG1 Antikörpern bei tTG-Antikörper positiven Patienten mit silenter Zöliakie als Marker zur Unterscheidung zwischen Individuen mit einem hohen und einem niedrigem Risiko der Entwicklung einer manifesten Erkrankung herangezogen werden kann. Hiermit könnte ein Beitrag zur Verbesserung der Frühdiagnostik der Zöliakie geleistet werden.

7. Abkürzungsverzeichnis

APC = **A**ntigen **P**resenting **C**ell

Ca ⁺⁺ = **C**alcium

cpm = **c**ounts **p**er **m**inute

EDTA = **E**thylendiamin-**T**etraessigsäure

ELISA = **E**nzym-**l**inked **I**mmunosorbent **A**ssay

EMA = **E**ndomysium-**A**ntikörper

ESPGAN – Kriterien (= **E**uropean **S**ociety of **P**ediatric **G**astroenterology and **N**utrition)

HLA = **H**uman **L**eukocyte **A**ntigen

IEL = **i**ntraepitheliale **L**ymphozyten

IFL = **I**mmun**f**luoreszenz

IFN = **I**nter**f**eron

IgA = **I**mmunglobulin **A**

IgG = **I**mmunglobulin **G**

IgE = **I**mmunglobulin **E**

IgA1 = **I**mmunglobulin **A1**

IgA2 = **I**mmunglobulin **A2**

IgG1 = **I**mmunglobulin **G1**

IgG4 = **I**mmunglobulin **G4**

IL = **I**nterleukin

M. xxxx = **M**orbus xxxx

MALT = **M**ucosa **A**ssociated **L**ymphatic **T**issue

MHC = **M**ajor **H**istocompatibility **C**omplex

MMP = **M**atrix **M**etalloproteinasen

PAS Assay = **P**rotein **A** **S**epharose Assay

PGS Assay = **P**rotein **G** **S**epharose Assay

PMSF = **P**henylmethansulfonsäureflorid

RIA = **R**adioimmunoassay

RNA = **R**ibonucleinacid

RLA = **R**adioligandenassay

Th-Zellen = **T**-helper-Zellen

TNF = **T**umor **N**ecrotic **F**actor

TGF = **T**umor **G**rowth **F**actor

tTG = **t**issue **T**ransglutaminas

8. Literaturverzeichnis

1. Aktay A.N., Lee P.C., Kumar V., Parton E., Wyatt D.T., Werlin S.L. 2001. The prevalence and clinical characteristics of celiac disease in juvenile diabetes in Wisconsin. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 33: 462-465
2. Arentz-Hansen H., Körner R., Molberg, Quarsten H., Vader W., Kooy Y., Lundin K.E.A., Koning F., Roepstorff P., Sollid L.M., McAdam S.N. 2000. The intestinal cell response to α -gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med* 191: 603-612
3. Bazzigaluppi E., Lampasona V., Barera G., Venerando A., Bianchi C., Chiumello G., Bonifacio E., Bosi E. 1999. Comparison of tissue transglutaminase-specific antibody assays with established antibody measurements for coeliac disease. *J Autoimmun* 12: 51-56
4. Bilbao J.R., Victoria J.C., Oritz L., Corrales A., Hualde I., Preciado E., Castano L. 2002. Immunoglobulin G autoantibodies against tissue-transglutaminase. A sensitive, cost-effective assay for the screening of celiac disease. *Autoimmunity* 35: 255-259
5. Bonamico M., Tiberti C., Picarelli A., Mariani P., Rossi D., Cipoletta E., Greco M., Tola M., Sabatella L., Carabba B., Magliocca F., Strisciuglio P., Mario U. 2001. Radioimmunoassay to detect antitransglutaminase autoantibodies is the most sensitive and specific screening method for coeliac disease. *Am J Gastroenterol* 96: 1536-1540
6. Bonifacio E., Scirpoli M., Kredel K., Füchtenbusch M., Ziegler A. 1999. Early autoantibody responses in prediabetes are IgG1 dominated and suggest antigen-specific regulation. *J Immunol* 163: 525-532
7. Brusco G., Muzi P., Ciccocioppo R., Biagi F., Cifone M. G., Corazza G. R. 1999. Transglutaminase and coeliac disease: endomysial reactivity and small bowel expression. *Clin Exp Immunol* 118: 371-375

8. Carol M., Lambrechts A., Van Gossum A., Libin M., Goldman M., Mascart-Lemone F. 1998 Spontaneous secretion of interferon γ and interleukin 4 by human intraepithelial and lamina propria gut lymphocytes. *Gut* 42: 643-649
9. Cataldo F., Lio D., Marino V., Picarelli A., Ventura A., Corazza G.R., the working groups on celiac disease of SIGEP and Club del Tenue 2000. IgG1 antiendomysium and IgG antitissue transglutaminase (anti-tTG) antibodies in coeliac patients with selective IgA deficiency. *Gut* 47: 366-369
10. Coffman R.L., Lebman D.A., Shrader B. 1989. Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated B lymphocytes. *J Exp Med* 170: 1039-1044
11. Corthesy B, Spertini F. 1999. Secretory immunoglobulin A: From mucosal protection to vaccine development. *Biol Chem* 380: 1251-1262
12. Couper J.J., Harrison L.C., Aldis J.J., Colman P.G., Honeyman M.C., Ferrante A. 1998. IgG subclass antibodies to glutamic acid decarboxylase and risk for progression to clinical insulin-dependent diabetes. *Hum Immunol* 59: 493-499
13. Daum S., Bauer U., Foss H.D., Schuppan D., Stein H., Riecken E.O., Ullrich R. 1999. Increased expression of mRNA for metalloproteinases-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease. *Gut* 44: 17-25
14. Defrance T., Vanbervliet B., Briere F., Durand I., Rousset F., Banchereau J. 1992. Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated native human B cells to secrete immunoglobulin A. *J Exp Med* 175:671-682
15. Dietrich W., Ethnis T., Bauer M., Donner P., Volta U., Riecken E.O., Schuppan D. 1997. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 3: 797-801

16. Dietrich W., Laag E., Schöpfer H., Volta U., Ferguson A., Gillett H., Riecken E.O., Schuppan D. 1998. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology* 113: 1317-1321
17. Dozio N., Belloni C., Girardi A.M., Genovese S., Sodoyez J.C., Bottazzo G.F., Pozza G., Bosi E. 1994. Heterogeneous IgG subclass distribution of islet cell antibodies. *J Autoimmun* 7: 45-53
18. Dubois B., Bridon J.M., Fayette J., Barthelemy C., Banchereau J., Caux C., Briere F. 1999. Dendritic cells directly modulate B cell growth and differentiation. *J Leukoc Biol* 66: 224-230
19. Elson C.O., Heck J.A., Strober W. 1979. T-cell regulation of murine IgA synthesis. *J Exp Med* 149: 632-643
20. Esnault V.L., Jayne D.R., Weetman A.P., Lockwood C.M. 1991. IgG subclass distribution and relative functional affinity of anti-myeloperoxidase antibodies in systemic vasculitis at presentation and during follow-up. *Immunology* 74: 714-718
21. Esposito C., Paparo F., Caputo I., Rossi M., Maglio M., Sblattero D., Not T., Porta R., Auricchio S., Marzari R., Troncone R. 2002. Anti-tissue transglutaminase antibodies from coeliac patients inhibit transglutaminase activity both in vitro and in situ. *Gut* 51: 177-181
22. Füchtenbusch M., Kredel K., Bonifacio E., Schnell O., Ziegler A.G. 2000. Exposure to Exogenous Insulin Promotes IgG1 and the T-Helper 2-Associated IgG4 Responses to Insulin but Not to Other Islet Autoantigens. *Diabetes* 49: 918-925
23. Fayette J., Dubois B., Vandenabeele S., Bridon J.-M., Vanbervliet B., Durand I., Banchereau J., Caux C., Briere F. 1997. Human Dendritic Cells Skew Isotype Switching of CD40-activated Naive B Cells towards IgA₁ and IgA₂. *J Exp Med* 11: 1909-1918
24. Forsberg P., Ernerudh J., Ekerfelt C., Roberg M., Vrethem M., Bergstrom S. 1995. The outer surface proteins of Lyme disease borrelia spirochetes stimulate T cells to secrete

interferone-gamma (IFN-gamma): diagnostic and pathogenic implications. *Clin Exp Immunol* 101: 453-460

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

26. Guo J., Jaume J.C., Rapoport B., McLachlan S.M. 1997. Recombinant thyroid peroxidase-specific fab converted to immunoglobulin G (IgG) molecules: Evidence for thyroid cell damage by IgG1, but not IgG4, autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 925-931

27. Halttunen T., Mäki M. 1999. Serum immunoglobulin A from patients with celiac disease inhibits human T84 intestinal crypt epithelial cell differentiation. *Gastroenterology* 116: 566-572

28. Halttunen T., Marttinen A., Rantala I., Kainulainen H., Mäki M. 1996. Fibroblasts and transforming growth factor β induce organization and differentiation of T84 human epithelial cells. *Gastroenterology* 111: 1252-1262

29. Hawa M.I., Fava D., Medici F., Deng Y., Notkins A.L., de Mattia G., Leslie R.D.G. 2000. Antibodies to IA-2 and GAD65 in type 1 and type 2 diabetes: isotype restriction and polyclonality. *Diabetes Care* 23: 228-233

30. Henker J., Losel A., Conrad K., Hirsch T., Leupold W. 2002. Prävalenz der asymptomatischen Zöliakie bei Kindern und Erwachsenen in der Region Dresden. *Dtsch Med Wochenschr* 127: 1511-1515

31. Hocini H., Iscaki S., Bouvet J., Kazatchkine M., Belec L. 2000. An Elisa method to measure total and specific human secretory IgA subclasses based on selective degradation by IgA1-protease. *J Immunol Methods* 235: 53-60

32. Hoffenberg E.J., Bao F., Eisenbarth G.S., Uhlborn C., Haas J.E., Sokol R.J., Rewers M. 2000. Transglutaminase antibodies in children with a genetic risk for celiac disease. *J Pediatr* 137: 356-360

33. Holmes G. 2001. Coeliac disease and type 1 diabetes mellitus – the case for screening. *Diabet Med* 18: 169-177
34. Holmes, G. 2001. Potential and latent coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13: 1057-1060
35. 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 1 diabetes. *Diabetologia* 43: 1005-1011
36. Islam K.B., Nilsson L., Sideras P. Hammarstrom L., Smith C.I. 1991. TGF-beta induces germ-line transcripts of both IgA subclasses in human B lymphocytes. *Int Immunol* 3: 1099-1106
37. Jaeger C., Hatziagelaki E., Petzoldt R., Bretzel R.G. 2001. Comparative analysis of organ-specific autoantibodies and celiac disease-associated antibodies in type 1 diabetic patients, their first-degree relatives, and healthy control studies. *Diabetes Care* 24: 27-32
38. Kazemi-Shirazi L., Gasche C.H., Natter S., Gangl A., Smolen J., Spitzbauer S., Valent P., Kraft D., Valenta R. 2002. IgA autoreactivity: a feature common to inflammatory bowel and connective tissue diseases. *Clin Exp Immunol* 128: 102-109
39. Kallan A.A., Duinkerken G., de Jong R., van den Elsen P., Hutton J.C., Martin S., Roep B.O., de Vries R.R. 1997. Th1-like cytokine production profile and individual specific alterations in TCRBV-gene usage of T cells from newly diagnosed type 1 diabetes patients after stimulation with beta-cell antigens. *J Autoimmun* 10: 589-598
40. Kallmann B.A., Lampeter E.F., Hanifi-Moghaddam P., Hawa M., Leslie R.D., Kolb H. 1999. Cytokine secretion patterns in twins discordant for type 1 diabetes. *Diabetologia* 42: 1080-1085
41. King C.L., Nutman T.B. 1993. IgE and IgG subclass regulation by IL-4 and IFN-gamma in human helminth infections. Assessment by B cell precursor frequencies. *J Immunol* 151: 458-465

42. Kitani A, Strober W. 1994. Differential regulation of C alpha 1 and C alpha 2 germ-line and mature mRNA transcripts in human peripheral blood B cells. *J Immunol* 1994 153:1466-1477
43. Kjerrulf M., Grdic D., Kopf M., Lycke N. 1998. Induction of gut mucosal immune responses: Importance of genetic background and Th1/Th2 cross-regulation. *Scand J Immunol* 47: 401-407
44. Kolb H. 1997. Benign versus destructive insulinitis. *Diabetes Metab Rev* 13: 139-146
45. Kontakou M., Przemioslo R.T., Sturgess R.P., Limb G.A., Ellis H.J., Day P., Ciclitira P.J. 1995. Cytokine mRNA expression in the mucosa of treated coeliac patients after wheat peptide challenge. *Gut* 37: 52-57
46. Koop I., Ilchman R., Izzi L., Adragna A., Koop H., Barthelmes H. 2000. Detection of autoantibodies against tissue transglutaminase in patients with celiac disease and dermatitis herpetiformis. *Am J Gastroenterol* 95: 2009-2014
47. Kordonouri O., Dietrich W., Schuppan D., Weber G., Müller C., Sarioglu N., Becker M., Danne T. 2000. Autoantibodies to tissue transglutaminase are sensitive serological parameters for detecting silent coeliac disease in patients with type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 17: 441-444
48. Kumar V., Jarzabek-Chorzelska M., Sulej J., Rajadhyaksha M., Jablonska S. 2001. Tissue transglutaminase and endomysial antibodies-diagnostic markers of gluten-sensitive enteropathy in dermatitis herpetiformis. *Clin Immunol* 98: 378-382
49. Kurniawan A., Yazdanbakhsh M., van Ree R., Aalberse R., Selkirk M.E., Partono F., Maizels R.M. 1993. Differential expression of IgE and IgG4 specific antibody responses in asymptomatic and chronic human filariasis. *J Immunol* 150: 3941-3950

50. Lampasona V., Bonfanti R., Bazzigaluppi E., Venerando A., Chiumello G., Bosi E., Bonifacio E. 1999. Antibodies to tissue transglutaminase C in type 1 diabetes. *Diabetologia* 42: 1195-1198
51. Langford T., Housley M., Boes M., Chen J., Kagnoff M., Gillin F., Eckmann L. 2002. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp.. *Infect Immun* 70: 11-18
52. Lock R.J., Gilmour E.M., Unsworth D.J. 1999. Anti-tissue transglutaminase, anti-endomysium and anti-R1-reticulin autoantibodies-the antibody trinity of celiac disease. *Clin Exp Immunol* 116: 258-262
53. Lundgren M., Persson U., Larsson P., Magnusson C., Smith C.I., Hammarstrom L., Severinson E. 1989. Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells. *Eur J Immunol* 19: 1311-1315
54. MacDonald T.T., Monteleone G., 2001. IL-12 and Th1 immune responses in human Peyer's patches. *Trends Immunol* 22: 244-247
55. Mahanty S., Abrams J.S., King C.L., Limaye A.P., Nutman T.B. 1992. Parallel regulation of IL-4 and IL-5 in human helminth infections. *J Immunol* 148: 3567-3571
56. Maiuri L., Ciacci C., Auricchio S., Brown V., Quarantino S., Londei M. 2000. Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology* 119: 996-1006
57. Marsh N., 1992. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* 102: 330-354
58. Mesteck J., Russell M., Elson C. 1999. Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. *Gut* 44: 2-5

59. Meloni G.F., Tomasi P.A., Bertocelli A., Fanciulli G., Delitala G., Meloni T. 2001. Prevalence of silent celiac disease in patients with autoimmune thyroiditis from northern Sardinia. *J Endocrinol Invest* 24: 298-302
60. Monteleone G., Pender S.L.F., Alstead E., Häuer A. C., Lionnetti P., MacDonald T.T. 2001. Role of interferone α in promoting T helper cell type 1 responses in the small intestine in coeliac disease. *Gut* 48: 425-429
61. Nilsen E.M., Lundin K.E.A., Krajci P., Scott H., Sollid L.M., Brandtzaeg P. 1995. Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon γ . *Gut* 37: 766-776
62. Not T., Tommasini A., Tonini G., Buratti E., Pocecco M., Tortul C., Valussi M., Cricchiutti G., Berti. I., Trevisiol C., Azzoni E., Neri E., Torre G., Martelossi S., Soban M., Lenhardt A., Cattin L., Ventura A. 2001. Undiagnosed coeliac disease and risk for autoimmune disorders in subjects with type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 44: 151-155
63. O'Leary C., Walsh C.H., Wieneke P., O'Regan P., Buckley B., O'Halloran D.J., Ferriss J.B., Quigley E.M., Annis P., Shanahan F., Cronin C.C. 2002. Coeliac disease and autoimmune Addison's disease: a clinical pitfall. *QJM* 95: 79-82
64. Osman A.A., Richter T., Stern M., Mothes T. 1996. The IgA subclass distributions of endomysium and gliadin antibodies in human sera are different. *Clin Chim Acta* 255: 142-152
65. Pan Q., Petit-Frere C., Dai S., Huang P., Morton H.C., Brandtzaeg P., Hammarström L. 2001. Regulation of switching and production of IgA in human B cells in donors with duplicated $\alpha 1$ genes. *Eur J Immunol* 31: 3622-3630
66. Pender S.L., Tickle S.P., Docherty A.J., Howie D., Wathen N.C., MacDonald T.T. 1997. A major role for matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. *J Immunol* 158: 1582-90
67. Petersen J.S., Kulmala P., Clausen J.T., Knip M., Dyrberg T. 1999. Progression to type 1 diabetes is associated with a change in the immunoglobulin isotype profile of autoantibody to

glutamic acid decarboxylase (GAD65). Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Clin Immunol* 90: 276-281

68. Piacentini M., Colizzi V. 1999. Tissue transglutaminase: apoptosis versus autoimmunity. *Immunol Today* 20: 130-134

69. Piper J.L., Gray G.M., Khosla C. 2002. High selectivity of human tissue transglutaminase for immunoactive gliadin peptides: Implications for celiac sprue. *Biochemistry* 41: 386-393

70. Przemioslo R.T., Lundin K.E., Sollid L.M., Nelufer J., Ciclitira P.J. 1995. Histological changes in small bowel mucosa induced by gliadin sensitive T lymphocytes can be blocked by anti-interferon gamma antibody. *Gut* 36: 874-879

71. Rifai A., Fadden K., Morrison S., Chintalacharuvu K. 2000. The N-glycans determine the differential blood clearance and hepatic uptake of human immunoglobulin IgA1 and IgA2 isotypes. *J Exp Med* 191: 2171-2182

72. Salvati V.M., MacDonald T.T., Bajaj-Elliott M., Borelli M., Staiano A., Auricchio S., Troncone R., Monteleone G. 2002. Interleukin 18 and associated markers of T helper cell type 1 activity in coeliac disease. *Gut* 50 : 186-190

73. Sategna-Guidetti C., Bruno M., Mazza E., Carlino A., Predebon S., Tagliabue M., Brossa C. 1998. Autoimmune thyroid diseases and coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 10: 927 -931

74. Sategna-Giudetti C., Solerio E., Scaglione N., Aimo G., Mengozzi G. 2001. Duration of gluten exposure in adult celiac disease does not correlate with the risk for autoimmune disorders. *Gut* 49: 502-505

75. Savilahti E., Omala T., Arato A., Hacesek G., Holm K., Klemola T., Nemeth A., Maki M., Reunala T. 1997. Density of gamma/delta+ T cells in the jejunal epithelium of patients with celiac disease and dermatitis herpetiformis is increased with age. *Clin Exp Immunol* 109: 464-467

76. Schultz C.L., Coffman R.L. 1991. Control of isotype switching by T cells and cytokines. *Curr Opin Immunol* 3: 350-354
77. Schuppan D. 2000. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology* 119: 234-242
78. Schuppan D., Dietrich W., Riecken E. 1998. Exposing gliadin as a tasty food for lymphocytes. *Nat Med* 4: 667-667
79. Seissler J., Boms S., Wohlrab U., Morgenthaler N.G., Mothes T., Boehm B.O., Scherbaum W.A. 1999. Antibodies to human recombinant tissue transglutaminase measured by radioligand assay: Evidence for high diagnostic sensitivity for coeliac disease. *Horm Metab Res* 31: 375-379
80. Seissler J., Eikamp K., Schott M., Scherbaum W.A., DENIS Study Group 2002. IA-2 autoantibodies restricted to the IgG4 subclass are associated with protection from type 1 diabetes. *Horm Metab Res* 34: 186-191
81. Seissler J., Wohlrab U., Wuensche C., Scherbaum W.A., Boehm B.O. 2001. Autoantibodies from patients with celiac disease recognize distinct functional domains of the autoantigen tissue transglutaminase. *Clin Exp Immunol* 125: 216-221
82. Sollid L.M., Molberg, McAdam S., Lundin K.E.A. 1997. Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase-guilt by association? *Gut* 41: 851-852
83. Spiekerkoetter U., Seissler J., Wendel U. 2002. General screening for celiac disease is advisable in children with type 1 diabetes. *Horm Metab Res* 34: 192-195
84. Stavnezer J. 2000. Molecular processes that regulate class switching. *Curr Top Microbiol Immunol* 245: 127-168
85. Talal A.H., Murray J.A., Goeken J.A., Sivitz W.I. 1997. Celiac disease in an adult population with insulin-dependent diabetes mellitus: use of endomysial antibody testing. *Am J Gastroenterol* 92: 1280-1284

86. Teesalu K., Uibo O., Kalkkinen N., Janmey P., Uibo R. 2001. Increased levels of IgA antibodies against desmin in children with coeliac disease. *Int Arch Allergy Immunol* 126: 157-166
87. Thoree V., Golby S., Boursier L., Hackett M., Dunn-Walters D., Sanderson J., Spencer J. 2002. Related IgA1 and IgG producing cells in blood and diseased mucosa in ulcerative colitis. *Gut* 51: 44-50
88. Troncone R., Greco L., Mayer M., Paparo F., Caputo N., Micillo M., Mugione P., Auricchio S. 1996. Latent and potential coeliac disease. *Acta Paediatr Suppl* 412: 10-14
89. Vajdy M., Kosco-Vilbois M.H., Kopf M., Kohler G., Lycke N. 1995. Impaired mucosal immune responses in interleukin 4-targeted mice. *J Exp Med* 181: 41-53
90. Valentino R., Savastano S., Maglio M., Paparo F., Ferrara F., Dorato M., Lombardi G., Troncone R. 2002. Markers of potential coeliac disease in patients with Hashimoto thyroiditis. *Eur J Endocrinol* 146: 479-483
91. Van Cott J.L., Staats H.F., Pascual D.W., Roberts M., Chatfield S.N., Yamamoto M., Coste M., Carter P.B., Kiyono H., McGhee J.R. 1996. Regulation of mucosal and systemic antibody responses by T helper cell subsets, macrophages, and derived cytokines following oral immunizations with live recombinant Salmonella. *J Immunol* 156:1504-1514
92. Van de Waal, Kooy, van Veelen, et al. 2000. Coeliac disease: it takes three to tango! *Gut* 46: 734-737
93. Van Egmond M., Damen C.A., van Spriel A.B., Vidarsson G., van Garderen E., van de Winkel J.G.J. 2001. IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol* 22: 205-211
94. Ventura A., Magazzu G., Greco L. 1999. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 117: 297-303

95. Victoria J.C., Arrieta A., Ortiz L., Ayesta A. 2001. Antibodies to human tissue transglutaminase for the diagnosis of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 33: 349–350
96. Victoria J.C., Arrieta A., Arranz C., Ayesta A., Sojo A., Maruri N., Garcia-Masdevall M.D. 1999. Antibodies to gliadin, endoymsium, and tissue transglutaminase for the diagnosis of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 29: 571-574
97. Volta U., De Franceschi L., Molinaro N., Tetta C., Bianchi F.B. 1997. Organ-specific autoantibodies in coeliac disease: do they represent an epiphenomenon or the expression of associated autoimmune disorders? *Ital J Gastroenterol Hepatol* 29: 18-21
98. Williams A.J., Annis P., Lock R.J., Unsworth D.J., Gale E.A., Bingley P.J. 1999. Evaluation of a high-throughput second antibody radiobinding assay for measuring IgA antibodies to human tissue transglutaminase. *J Immunol Methods* 228: 81-85
99. Weberhofer C. 2002. Ernährungstherapie bei Zöliakie. *Aktuel Ernaehr Med* 27: 281-184
100. Widhe M., Ekerfelt C., Forsberg P., Bergstrom S., Ernerudh J. 1998. IgG subclasses in Lyme borreliosis: a study of specific IgG subclass distribution in an interferon-gamma-predominated disease. *Scand J Immunol* 47: 575-581
101. Williams A., Annis P., Lock R., Unsworth D., Gale E., Bingley P. 1999. Evaluation of a high-throughput second antibody radiobinding assay for measuring IgA antibodies to human tissue transglutaminase. *J Immunol Methods* 228: 81-85
102. Yamamoto M., Vancott J.L., Okahashi N., Marinaro M., Kiyono H., Fujihashi K., Jackson R.J., Chatfield S.N., Bluethmann H., McGhee J.R. 1996. The role of Th1 and Th2 cells for mucosal IgA responses. *Ann N Y Acad Sci* 778: 64-71
103. Yazdanbakhsh M., Paxton W.A., Brandenburg A., Van Ree R., Lens M., Partono F., Maizels R.M., Selkirk M.E. 1995. Differential antibody isotype reactivity to specific antigens in human lymphatic filariasis: gp15/400 preferentially induces immunoglobulin E (IgE), IgG4, and IgG2. *Infect Immun* 63: 3772-3779

104. Zilbauer M., Zimmer K. P. 2002. Zöliakie: Mosaiksteine der Pathogenese. *Aktuel Ernähr Med* 27: 277-280

105. Zimmer K. P. 1999 Zöliakie. *Monatsschr Kinderheilkd* 147: 60-72

9. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

	Seite
9.1. Tabellenverzeichnis	
1. Assoziation verschiedener Autoimmunerkrankungen mit einer manifesten und silenten Zöliakie (Daten aus Savilahti 1997; Sategna-Guidetti 1994; Talal 1997; Volta 1998; Aktay 2000; Holmes 2001; Ventura 1999; Not 2001; Meloni 2001; Kordonouri 2000; Spiekerkoetter 2002; O`Leary 2002) n.u. = nicht untersucht.	4
2. Charakterisierung der untersuchten Patientengruppen	15
3. Pipettiermenge der Isotyp Antikörper pro Well	18
4. Prävalenz der IgA tTG-Antikörper bei Patienten mit manifester Zöliakie *p < 0,001 versus IgA2	21
5. Titer der IgA tTG-Antikörper bei Patienten mit manifester Zöliakie *p < 0,001 versus IgA2	21
6. Prävalenz der IgA tTG-Antikörper in Abhängigkeit vom Alter *p < 0,006, ** p < 0,03 versus IgA2	22
7. Antikörpertiter der IgA tTG-Antikörper in Abhängigkeit vom Alter *p < 0,001 versus IgA2	22
8. Prävalenz der IgG1, IgG4 und IgE tTG-Antikörper bei Zöliakiepatienten *p < 0,001, **p < 0,003 versus IgG4 und IgE	23
9. Korrelation der Befunde bei der Adsorption der Immunkomplexe mit Protein A Sephrose, Protein G Sepharose oder Anti-IgG1/Neutravidin. Dargestellt ist die gebundene Aktivität in cpm. Werte, die nach unseren Kriterien eine positive Antikörperbindung anzeigen, sind fett gedruckt.	24

10. Titer der IgG1, IgG4 und IgE tTG-Antikörper bei Patienten mit manifester Zöliakie *p < 0,001 versus IgG4 und IgE	25
11. Prävalenz der IgG1, IgG4 und IgE tTG-Antikörper in Abhängigkeit vom Alter *p < 0,001 versus IgG4 und IgE	26
12. Korrelation der Titer der IgG1, IgG4 und IgE tTG-Antikörper mit dem Alter *p < 0,001 versus IgG4 und IgE	26
13. Prävalenz der IgA tTG Antikörper bei Patienten mit silenter Zöliakie *p < 0,001, **p < 0,02 versus IgA2	28
14. Titer der IgA tTG-Antikörper bei Patienten mit silenter Zöliakie *p < 0,001 versus IgA2	29
15. Korrelation der IgA tTG-Antikörper mit dem Alter bei Patienten mit silenter Zöliakie *p < 0,001, **p < 0,02 versus IgA2	30
16. Korrelation der Titer der IgA tTG-Antikörper mit dem Alter der Patienten mit silenter Zöliakie *p < 0,001 versus IgA2	30
17. Prävalenz der IgG1, IgG4 und IgE tTG-Antikörper bei Patienten mit silenter Zöliakie	31
18. Titer der IgG1, IgG4 und IgE Isotypantikörper bei Patienten mit silenter Zöliakie *p < 0,01 versus IgG4 und IgE	32
19. Prävalenz der IgG1, IgG4 und IgE tTG-Antikörper in Abhängigkeit vom Alter	32
20. Korrelation der Titer der Isotypantikörper mit dem Alter bei Patienten mit silenter Zöliakie *p < 0,01 versus IgG4 und IgE	33
21. Assoziation der tTG-Isotypantikörper mit dem Befund der Dünndarmbiopsie	

bei Patienten mit Verdacht auf silente Zöliakie 34

9.2. Abbildungsverzeichnis

1. Normale Duodenalschleimhaut und Befund bei einer floriden Zöliakie (Zottenatrophie, vermehrte intraepitheliale Lymphozyten) (Bilder aus Zimmer 1999)	2
2. Nachweis von Endomysium-Antikörpern (EMA) durch indirekten Immunfluoreszenztest. Dargestellt ist ein positiver (links) und ein negativer Befund (rechts). (Bilder aus Zimmer 1999)	7
3. Korrelation der IgA1, IgA2, IgG1 und IgE tTG-Antikörper bei Patienten mit manifester Zöliakie	27
4. Korrelation der Isotypantikörper bei Patienten mit silenter Zöliakie	33
5. Titer der Gesamt-IgA tTG-Antikörper in den Patientengruppen	36
6. Titer der Gesamt-IgG tTG-Antikörper in der Patientengruppen	37
7. Titer der IgA1 Antikörper in den verschiedenen Probandengruppen	37
8. Titer der IgA2 Antikörper in den verschiedenen Probandengruppen	38
9. Titer der IgG1 Antikörper in den verschiedenen Probandengruppen	38
10. Titer der IgG4 Antikörper in den verschiedenen Probandengruppen	39
11. Titer der IgE Antikörper in den verschiedenen Probandengruppen	39
12. Korrelation der individuellen Titer der IgA1 und IgA2 tTG-Antikörper bei Patienten mit manifester Zöliakie	40

13. Korrelation der individuellen Titer der IgA1 und IgA2 tTG-Antikörper bei Patienten mit silenter Zöliakie	41
14. Korrelation der individuellen Titer der IgA1 und IgG1 tTG-Antikörper bei Patienten mit manifester Zöliakie	42
15. Korrelation der individuellen Titer der IgA1 und IgG1 tTG-Antikörper bei Patienten mit silenter Zöliakie	42

Danksagung

Für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und der kontinuierlichen Unterstützung danke ich Herrn Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Jochen Seissler für die großartige Betreuung meiner Arbeit und die ständige wissenschaftliche Beratung und Unterstützung.

Frau Ulrike Wohrab, Frau Melanie Glucken, Frau Cordula Wünsche sowie Frau Dr. Monika Herten möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit und Hilfestellung im Labor danken.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Schriftenverzeichnis angeführten Quellen benutzt und sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, als solche kenntlich gemacht. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche gekennzeichnet.

Düsseldorf, den 03.08.2003

Jaron Schilling

Lebenslauf

Name: Schilling
Vorname: Jaron
geboren am: 08. April 1978
in: Darmstadt
Familienstand: ledig
Wohnort: Lichtenvoorderstraße 22
41564 Kaarst

Schulbildung: 1988-1997 Georg-Büchner-Gymnasium, Kaarst
Abitur mit Leistungsfächern Biologie und Mathematik

Hochschulstudium: seit Wintersemester 1997 an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Fachrichtung Humanmedizin

Examen: Physikum, August 1999
1. Staatsexamen, August 2000
2. Staatsexamen, März 2003
3. Staatsexamen, Mai 2004

Berufliche Weiterbildung: Seit September 2004 Assistenzarzt im Fach Augenheilkunde am
Universitätsklinikum Essen

Düsseldorf, den 16.01.2005

Jaron Schilling

Isotypantikörper gegen die Gewebstransglutaminase (tTG) bei Patienten mit manifester und silenter Zöliakie

vorgelegt von Jaron Schilling

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Verteilung und die Bedeutung der Immunglobulin Subklassen und Isotypen der Autoantikörper gegen das Enzym Gewebstransglutaminase (tTG) bei Patienten mit verschiedenen Formen der Zöliakie zu untersuchen.

Getestet wurden 30 Seren von Patienten mit manifester Zöliakie (Alter 6-72 Jahre) und 22 Seren von tTG-Antikörper positiven, asymptomatischen Personen, die als Patienten mit silenter Zöliakie eingestuft wurden (Alter 3-19 Jahre). 58 Seren von gesunden Blutspendern dienten als Kontrolle. Die IgA1 (Immunglobulin A1), IgA2, IgG1, IgG4 und IgE Antikörper gegen tTG wurden in Subklassen- und Isotyp-spezifischen Radioimmunoassays bestimmt.

Unter den 30 Patienten mit manifester Erkrankung waren bei 27 (90,0%) IgA1 und bei 12 (40,0%) IgA2 Antikörper nachweisbar. Ähnlich hohe Prävalenzen fanden sich bei den Patienten mit silenter Zöliakie (90,1% und 31,8%). In beiden Populationen waren bei allem IgA2 Antikörper positiven Personen auch IgA1 tTG-Antikörper positiv. IgE und IgG4 tTG-Antikörper konnten nur bei sehr wenigen Patienten mit manifester Zöliakie (4,5-10%) und silenter Zöliakie (0-4,5%) nachgewiesen werden. Deutliche Unterschiede fanden sich in der Verteilung der IgG1 Antikörper. IgG1 tTG Antikörper waren bei 56,6% der Patienten mit manifester Zöliakie, aber nur bei 18,4% der Patienten mit silenter Erkrankung positiv ($p < 0,01$). In der Gruppe der Patienten mit silenter Erkrankung war eine positive Korrelation zwischen den IgA2 und IgG1 tTG-Antikörpern und hochgradigen Schleimhautveränderungen in der Dünndarmbiopsie (Marsh 2 und 3) nachweisbar.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit erstmals gezeigt werden, daß IgA1 den dominanten Isotyp der tTG-Antikörper bei Zöliakiepatienten darstellt. IgG1 tTG-Antikörper treten häufiger bei Patienten mit manifester Erkrankung auf und sind, bei Patienten mit silenter Zöliakie, assoziiert mit der Stärke der Schädigung der Dünndarmschleimhaut. Dies könnte eine inflammatorische, Th1-dominierte Immunantwort anzeigen. Aus den Ergebnissen läßt sich schließen, dass die Bestimmung von IgG1 Antikörpern bei tTG-Antikörper positiven Patienten mit silenter Zöliakie als Marker zur Unterscheidung zwischen Individuen mit einem hohen und einem niedrigem Risiko der Entwicklung einer manifesten Erkrankung herangezogen werden kann. Hiermit könnte ein Beitrag zur Verbesserung der Frühdiagnostik der Zöliakie geleistet werden.