

Technische Universität München
Department für Lebensmittel und Ernährung
Lehrstuhl für Ernährungslehre

***Immunphänomene bei den assoziierten Erkrankungen Typ 1
Diabetes und Zöliakie und Strategien zur Prävention des
autoimmunen Diabetes im Tiermodell***

Sandra Schmid

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Haushalts- und Ernährungswissenschaften
(Dr. oec. troph.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil.
Johann Bauer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. (komm.) Dr. med. Günther Wolfram, em.
2. apl. Prof. Dr. med., Dr. med. habil. Anette-G. Ziegler,
Ludwig-Maximilians Universität München

Die Dissertation wurde am 06.05.2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 18.07.2002 angenommen.

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. G. Wolfram möchte ich herzlich danken, dass er als mein Doktorvater die Durchführung dieser Dissertation ermöglichte und mich in der Phase der Fertigstellung mit wertvollen Hinweisen unterstützte.

Mein besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. Anette-G. Ziegler für die Überlassung des Themas und die zahlreichen Anregungen, die das Voranschreiten und die Fertigstellung dieser Arbeit gefördert haben. Danken möchte ich ihr vor allem für die freundschaftliche und begeisterte Zusammenarbeit und ihren persönlichen Einsatz, der mir u.a. den Besuch von nationalen und internationalen Kongressen, den Auslandsaufenthalt im Labor von Dr. Bart Roep, Niederlande, und das Verfassen der im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Publikationen ermöglicht hat.

Herrn Dr. Ezio Bonifacio möchte ich ganz herzlich für seine Unterstützung bei der Planung und der praktischen Durchführung der Projekte danken. Seine Unterstützung bei der Verwirklichung der Projekte sowie die gemeinsame Diskussion der Ergebnisse waren immer sehr motivierend für mich und haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Dr. Michael Hummel, der diese Arbeit während der gesamten Arbeitsphase und Fertigstellung betreut hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Durch zahlreiche Diskussionen mit ihm wurde mir der schnelle Einstieg in die Immunologie des Typ 1 Diabetes und der Zöliakie ermöglicht und durch ihn lernte ich vor allem auch die klinische Seite der beiden Erkrankungen kennen.

Bei Frau Annette Knopff möchte ich mich besonders für die Einführung in die immunologischen Testverfahren und die Unterstützung bei all meinen Projekten bedanken. Frau Dipl. oec. troph. Kerstin Koczvara danke ich ganz herzlich für ihre freundschaftliche Unterstützung und Mitarbeit beim Mäuseprojekt und Frau Dr. rer. nat. Heike Naserke danke ich für die wertvollen Tipps bei der Durchführung verschiedenster Labor-Techniken und Computer-Anwendungen. Und nicht zuletzt gilt im Laborteam Herrn Mike Schenker mein besonderer Dank für die Verwaltung des Datenwustes, die Mäuse-Blutabnahmen sowie für seinen Einsatz bei der INCO-Studie.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. med. Martin Füchtenbusch für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des INCO-Projektes.

Herrn PD Dr. Oliver Schnell und Frau Dr. oec. troph. Daniela Muhr-Becker danke ich für die Überlassung der von ihnen organisierten Blutproben und Daten von Patienten der Ambulanz des Städtischen Krankenhauses München-Schwabing.

Mein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mich von Anfang an bei diesem Vorhaben unterstützt und mir dadurch die Durchführung dieser Arbeit überhaupt ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Problemstellung	1
1.2.	Grundlagen	5
2.	Studienpopulation und Methodik	17
2.1.	Studienpopulation zur Untersuchung der zellulären und humoralen Immunität bei den assoziierten Erkrankungen Typ 1 Diabetes und Zöliakie	17
2.1.1.	Kinder der BABYDIAB-Studie als Untersuchungsgruppe für die Analyse der Immunantwort gegen Tetanus Toxoid (TT)	17
2.1.2.	Untersuchungsgruppen für die Analyse von Zöliakie-assoziierten Antikörpern	20
2.2.	Methoden zur Untersuchung der humoralen und zellulären Immunität bei den assoziierten Erkrankungen Typ 1 Diabetes und Zöliakie	23
2.2.1.	Analyse der Immunantwort gegen Tetanus Toxoid	23
2.2.1.1.	Bestimmung von Tetanus-Antikörper-Isotypen	23
2.2.1.2.	Bestimmung des Zytokinprofils peripherer Lymphozyten	24
2.2.2.	Analyse von Zöliakie-assoziierten Antikörpern	25
2.2.2.1.	Bestimmung von tissue-Transglutaminase C (tTGC)-Autoantikörpern	25
2.2.2.2.	Bestimmung von Endomysium-Autoantikörpern der Klasse IgA	27
2.3.	Tiermaterial und Methoden zur Untersuchung des Einflusses einer Nahrungsmodulation auf die Entwicklung eines autoimmunen Diabetes bei der NOD-Maus	28
2.3.1.	Studiendesign	28
2.3.1.1.	Beschreibung der Versuchstiere	28
2.3.1.2.	Beschreibung der Nahrungszusammensetzung	29
2.3.1.3.	Beschreibung des Versuchsablaufs	33

2.3.2. Untersuchungsparameter	33
2.3.2.1. Bestimmung der Diabetes-Prävalenz durch Nachweis von Uringlukose	33
2.3.2.2. Analyse des Inselzell-Autoimmunität	33
2.3.2.3. Bestimmung von Gliadin-Antikörpern der Klasse IgA und IgG	35
2.4. Statistik	36
3. Ergebnisse	37
3.1. Analyse der Immunantwort gegen Tetanus Toxoid	37
3.1.1. Analyse der humoralen Immunantwort gegen Tetanus Toxoid	37
3.1.2. Analyse der humoralen und zellulären Immunantwort gegen Tetanus Toxoid	48
3.2. Analyse der Zöliakie-assoziierten Antikörper	54
3.2.1. Bestimmung der Normbereiche für die kombinierte und Einzeltestung der tTGCA	54
3.2.2. Zöliakie-assoziierte Antikörper bei Personen mit Langzeit-Typ 1 Diabetes mit und ohne kardiale autonome Neuropathie (KAN)	58
3.2.3. Zöliakie-assoziierte Antikörper bei erstgradigen Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes	60
3.3. Primärprävention des autoimmunen Diabetes bei der NOD-Maus	69
3.3.1. Analyse der Nährstoff- und Vitamin-Zufuhr	69
3.3.2. Analyse des Einflusses der Nahrungsmodulation auf die Diabetes-Entwicklung	71
3.3.3. Analyse des Einflusses der Nahrungsmodulation auf die Inselzell-Autoimmunität	77
3.3.3.1. Insulin-Autoantikörper und Diabetes-Entwicklung	77
3.3.3.2. Insulin-Autoantikörper Isotypen und Diabetes-Entwicklung	86
3.3.4. Analyse des Einflusses der Nahrungsmodulation auf die Bildung von Gliadin-Antikörpern	93

4.	Diskussion	95
4.1.	Analyse der Immunantwort gegen Tetanus Toxoid	95
4.1.1.	Humorale Immunantwort gegen Tetanus Toxoid	96
4.1.2.	Humorale und zelluläre Immunantwort gegen Tetanus Toxoid	98
4.2.	Analyse der Zöliakie-assoziierten Antikörper	99
4.2.1.	Zöliakie-assoziierte Antikörper bei Personen mit Langzeit-Typ 1 Diabetes	100
4.2.2.	Zöliakie-assoziierte Antikörper bei Personen der Münchner Familienstudie	101
4.3.	Primärprävention des autoimmunen Diabetes bei der NOD-Maus	105
4.3.1.	Präventive Wirkung der glutenfreien Ernährung im Vergleich zu anderen Nahrungsfaktoren auf die Entwicklung eines Autoimmunen Diabetes im Tiermodell	105
4.3.2.	Präventive Wirkung der glutenfreien Ernährung im Vergleich zu anderen Nahrungsfaktoren auf die Inselzell-Autoimmunität	109
4.3.3.	Einfluss der Nahrungsmodulation auf die Bildung von Gliadin-Antikörpern	112
4.4.	Ausblick	113
5.	Zusammenfassung	114
6.	Literaturverzeichnis	118

Abkürzungsverzeichnis

AGA	Anti-Gliadin Antikörper
Ak	Antikörper
Anti-TT	Antikörper gegen Tetanus Toxoid
BSA	bovines Serum-Albumin
Combi-tTGCA	kombinierter Test zur Bestimmung der Transglutaminase-Antikörper
Cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute
DHA	Docosahexaensäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EPA	Eicosapentaensäure
GADA	Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase
HLA	Human leukocyte antigen
IAA	Insulinautoantikörper
IA-2A	Antikörper gegen die Tyrosinphosphatase IA-2
ICA	zytoplasmatische Inselzellantikörper
IFN γ	Interferon γ
Insel-AutoAk+	Inselzell-Autoantikörper positiv
Insel-AutoAK-	Inselzell-Autoantikörper negativ
IL-4, IL-13	Interleukin 4 bzw. 13
KAN	kardiale autonome Neuropathie
LC-PUFA	langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren
mAK	monoklonaler Antikörper
NOD-Maus	non obeses diabetic Maus
OD	optische Dichte
PBL	periphere Blut-Lymphozyten
RIA	Radio-Immuno-Assay
rpm	Umdrehungen pro Minute
Th1, Th2-Zellen	T Helfer 1 bzw. T-Helfer 2 Zellen
TT	Tetanus Toxoid
tTGC	Gewebetransglutaminase C
tTGCA	Antikörper gegen die Gewebetransglutaminase C
ZT	Zimmertemperatur

1. Einleitung

1.1. Problemstellung

Typ 1 Diabetes und Zöliakie sind zwei gehäuft gemeinsam auftretende Autoimmunerkrankungen. Während die Prävalenz des Typ 1 Diabetes und der Zöliakie in Deutschland jeweils bei ca. 0,3% liegt, haben etwa 5% der Personen mit Typ 1 Diabetes zusätzlich eine Zöliakie (Cronin, 1997; Not, 2001). Auch bei Klein-Kindern von Eltern mit Typ 1 Diabetes, eine Diabetes-Risikogruppe, wurde eine höhere Prävalenz der Zöliakie, vor allem der silenten Form, beobachtet (Hummel, 2000).

Vermutet wird, dass das gehäuft gemeinsame Auftreten von Typ 1 Diabetes und Zöliakie vor allem durch das HLA-Allel DR3, DQA*0501, DQB*0201 bedingt ist, mit dem beide Erkrankungen assoziiert sind. Aber auch vergleichbare pathogenetische Mechanismen werden diskutiert. So werden in der Entstehung beider Erkrankungen sowohl zelluläre als auch humorale Störungen des Immunsystems beobachtet (Atkinson, 2001; Schuppan, 2000; Bottazzo, 1985; Hummel, 1996; Bach, 1994). Auf T-Zell Ebene wird vor allem ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zellen mit dominierender Th1- Antwort mit der Entwicklung der Anti- β -Zell-Autoimmunität und der Zöliakie-assoziierten Autoimmunität in Verbindung gebracht (Eisenbarth, 1996; Wicker, 1986; Haskins, 1996; Schuppan, 2000). Aber auch B-Zellen scheinen in den Autoimmunprozess involviert zu sein, da sowohl vor Ausbruch des Typ 1 Diabetes als auch der Zöliakie Krankheits-assoziierte Antikörper im Blut der Patienten nachweisbar sind. So ist die Erkrankung des Typ 1 Diabetes bis zu 12 Jahre vor Ausbruch durch das Auftreten der Antikörper ICA (Inselzell-Antikörper), IAA (Insulin-Autoantikörper), GADA (Glutaminsäuredecarboxylase-Antikörper) und IA-2A (Antikörper gegen die Tyrosinphosphatase IA2) gekennzeichnet (Ziegler, 1999). Eine hoch spezifische Autoantikörperantwort gegen die Gewebe-Transglutaminase (tTGC), das zentrale Autoantigen der Endomysiumantikörper, und eine Antikörperantwort gegen Gliadin hingegen ist charakteristisch für die Zöliakie (Dieterich, 1997). Durch das Vorhandensein dieser Antikörper ist es möglich, die Erkrankungen Typ 1 Diabetes und Zöliakie frühzeitig zu diagnostizieren und rechtzeitig zu behandeln. Das frühzeitige Ergreifen therapeutischer Maßnahmen hat den Vorteil, dass sowohl Akut- als auch Spätkomplikationen vermieden werden können.

Neben Parallelen in der Immunantwort ist bei beiden Erkrankungen die meist sehr frühe Manifestation schon im Kindes- bzw. Jugendalter gemeinsam. Dies lässt vermuten, dass Faktoren, die schon sehr früh im Leben auf das Immunsystem einwirken, verantwortlich für den Defekt des Immunsystems sind. Als Auslöser der Zöliakie konnte vor längerer Zeit das in Getreide enthaltene Klebereiweiß (=Gluten) identifiziert werden. Auch beim Typ 1 Diabetes wird Gluten als möglicher Trigger des Autoimmunprozesses diskutiert (Bonifacio, 1998).

Trotz der bisher erlangten Erkenntnisse sind viele Fragen im Hinblick auf die Entstehung und Assoziation der beiden Erkrankungen noch offen. Im einzelnen sollten durch diese Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist bei Personen mit den Autoimmunerkrankungen Typ 1 Diabetes und Zöliakie die Immunantwort generell verändert? Oder ist die Immunantwort nur gegen Krankheitsspezifische, d.h. Insel-Antigene bzw. Zöliakie-assoziierte Antigene, verändert?

Um diese Frage zu beantworten wurde die Immunantwort gegen Tetanus Toxoid bei Klein-Kindern von Eltern mit Typ 1 Diabetes untersucht, die im Rahmen der BABYDIAB-Studie von Geburt an verfolgt wurden. Die Untersuchung der Immunantwort gegen Impfantigene stellt ein sehr hilfreiches Modell dar, Immunreaktionen zu charakterisieren, da Impfungen sehr früh im Leben erfolgen und dadurch eine frühe Herausforderung des Immunsystems sind. Die TT-Impfung erfolgt gewöhnlich gemäß nationaler Impfempfehlungen im Alter von 3, 4 und 5 Monaten und als Booster-Impfung im Alter von 18 Monaten, wodurch der Impfstatus in einer großen Anzahl von Kindern vergleichbar ist. Für diese Untersuchung wurden aus folgenden Gründen die Kinder der BABYDIAB-Studie als Untersuchungsgruppe gewählt: im Rahmen der BABYDIAB-Studie werden Klein-Kinder von Müttern und/oder Vätern mit Typ 1 Diabetes prospektiv von Geburt an auf das Vorliegen von Insel-Autoantikörpern und Zöliakie-assoziierte Antikörper untersucht. Von allen Kindern werden bei Geburt, im Alter von 9 Monaten und 2, 5, 8 und 11 Jahren Blutproben gesammelt. Dadurch ist der zeitliche Abstand zwischen Blutabnahme und TT-Impfung und somit die Immunantwort gegen TT bei allen Kindern vergleichbar. Um die Frage zu beantworten, ob frühe Inselzell-Autoimmunität oder Zöliakie-assoziierte Autoimmunität mit einer generell

veränderten Immunantwort assoziiert ist, wurden alle Kinder der BABYDIAB-Studie mit beginnender Inselzell-Autoimmunität im Alter von 9 Monaten (n=15) und alle Kinder mit beginnender Inselzell-Autoimmunität im Alter von 2 Jahren (n=21) sowie alle Kinder mit bioptisch gesicherter Zöliakie (n=8) in die Untersuchung miteinbezogen. Des weiteren war es möglich ein Kontrollkollektiv mit Insel-Autoantikörper negativen BABYDIAB-Kindern (n=73) zu bilden, das bezüglich des HLA-Diabetes-Risiko Genotyps gematcht war.

2. Spielt die Zöliakie bei der mit Langzeit-Typ 1 Diabetes einhergehenden Komplikation der autonomen Neuropathie eine Rolle? Das heißt, ist die autonome Neuropathie mitunter eine atypische Form der Zöliakie, die häufiger bei Personen im Erwachsenenalter beobachtet werden kann, und keine diabetische Neuropathie?

Für diese Untersuchung wurde ein Kollektiv von 141 Personen mit Langzeit-Typ 1 Diabetes gewählt, das bezüglich des Vorliegens einer autonomen Neuropathie charakterisiert war. Durch die Bestimmung der Zöliakie-spezifischen tTGC-Antikörper sollte ermittelt werden, ob Personen mit Langzeit-Typ 1 Diabetes und autonomer Neuropathie häufiger Zöliakie-assoziierte Autoimmunmarker aufweisen als Personen mit Langzeit-Typ 1 Diabetes ohne autonome Neuropathie.

3. Ist die bei Klein-Kindern von Vätern oder Müttern mit Typ 1 Diabetes beobachtete höhere Prävalenz der Zöliakie-assoziierten Antikörper generell bei Verwandten ersten Grades, also unabhängig vom verwandtschaftlichen Verhältnis und vom Alter, beobachtbar? Ist die Prävalenz der Zöliakie-assoziierten Antikörper bei Personen mit Insel-Autoantikörpern erhöht?

Diese Fragestellungen sollten durch die Bestimmung der tTGCA bei einem Kollektiv der Münchner Familienstudie (n=1013) beantwortet werden. Die Münchner Familienstudie untersucht seit 1989 bei erstgradigen Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes das Auftreten von Inselzell-Autoimmunität. Sie unterscheidet sich von der BABYDIAB-Studie darin, dass nicht nur bei Kindern sondern auch bei Eltern und Geschwistern von Personen mit Typ 1 Diabetes Insel-Autoantikörper untersucht werden. Des weiteren untersucht die Münchner Familienstudie im Vergleich zur BABYDIAB-Studie Personen nicht prospektiv von Geburt an, sondern schließt Personen jeglichen Alters ein.

4. Ist im Tiermodell das in der Nahrung enthaltene Gluten mit einem erhöhten Risiko verbunden, einen Autoimmundiabetes bzw. Diabetes-assoziierte

Antikörper zu entwickeln? Spielen die mit der Zöliakie assoziierten Gliadin-Antikörper bei der Entwicklung des Autoimmundiabetes eine Rolle?

Durch einen Fütterungsversuch bei NOD-Mäusen, dem klassischen Tiermodell für den autoimmunen Diabetes, sollte der Einfluss einer glutenfreien Versuchsnahrung auf das Diabetes-Risiko, die Bildung von Insulin-Autoantikörpern und Gliadin-Antikörpern untersucht werden. Vergleichend zu der glutenfreien Ernährung wurde der präventive Einfluss zweier weiterer Nahrungsfaktoren, nämlich einer Fischöl- bzw. Vitamin D3 Supplementierung, auf die Entwicklung des Autoimmundiabetes bei der NOD-Maus untersucht.

Insgesamt sollte diese Arbeit zu neuen Erkenntnissen in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes und der Zöliakie führen und dadurch zur Entwicklung eines Studienkonzeptes zur Primärprävention des Typ 1 Diabetes beitragen.

1.2. Grundlagen

Typ 1 Diabetes und Zöliakie

Typ 1 Diabetes ist eine multifaktorielle Autoimmunerkrankung, die aus der selektiven Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen im Pankreas resultiert. Dabei verläuft die immunologische Zerstörung der β -Zellen über viele Jahre symptomlos, bis die β -Zellmasse und dementsprechend die Insulinsekretion nicht mehr ausreicht, die Glukosehomöostase aufrechtzuerhalten. Man weiß heute, dass die Entstehung der Krankheit zu einem großen Teil auf genetischer Determination beruht. Da jedoch die genetische Veranlagung nicht in jedem Fall zur Entwicklung des Typ 1 Diabetes führt, wird vermutet, dass zusätzliche Auslöser das Krankheitsgeschehen in Gang setzen. Vor allem Umweltfaktoren wie virale Infektionen oder Ernährungsfaktoren werden als Auslöser bzw. Trigger des Typ 1 Diabetes diskutiert.

Zöliakie ist ebenfalls eine Autoimmunerkrankung, deren Symptome in den typischen Fällen aus der Zottenatrophie der Dünndarmmucosa resultieren und sich in Durchfällen, Gewichtsverlust, Malabsorption mit Steatorrhoe und Vitaminmangelsymptomen manifestiert. Das klinische Spektrum der Zöliakie hat sich in den letzten Jahrzehnten jedoch verändert. Aufgrund der verfeinerten Antikörperdiagnostik werden vermehrt Zöliakieerkrankungen ohne eindeutige gastrointestinale Symptome festgestellt. Dabei handelt es sich zum Teil um silente Verlaufsformen oder um atypische Formen der Zöliakie, zu denen unter anderem neurologische Symptome, wie z.B. periphere Neuropathien, Myopathie und zerebrale Ataxie zählen (Hadjivassiliou, 1996; Luostarinen, 1999; Usai, 1997; Burk, 2001; Polizzi, 2000). Bei der Erkrankung der Zöliakie wird ein komplexes Zusammenspiel von genetischen und Umweltfaktoren in der Krankheitsentstehung angenommen. Obwohl bei der Zöliakie der Auslöser der Erkrankung, das Gluten und verwandte Getreidefraktionen, bekannt ist, sind auch bei dieser Erkrankung die pathogenetischen Mechanismen noch nicht vollständig erforscht.

Sowohl für den Typ 1 Diabetes als auch für die Zöliakie existieren gute Behandlungsmöglichkeiten, die trotz einiger Einschränkungen ein weitestgehend normales Leben ermöglichen und Akutkomplikationen minimieren. Beide Erkrankungsformen bergen jedoch ein hohes Risiko an Spätkomplikationen.

Personen mit Typ 1 Diabetes sind bei ungenügender Diabeteseinstellung und abhängig vom sonstigen Risikoprofil sowohl mikro- als auch makroangiopathie- und neuropathiegefährdet. Auch Personen mit nicht behandelter Zöliakie haben ein höheres Risiko für neurologische Erkrankungen. Als Ursache dafür wird unter anderem ein Vitaminmangel (Vitamin B12, E, D, Folsäure, Pyridoxin) vermutet, da die nicht behandelte Form der Zöliakie, gekennzeichnet durch Zotten-Atrophie und Krypten-Hyperplasie der Dünndarmschleimhaut, zu einer mangelnden Resorption essentieller Nährstoffe führen kann (Cooke, 1984; Luostarinen, 1999). Weitere Sekundärkomplikationen der nichtbehandelten Zöliakie sind Eisenmangel-Anämie, Osteoporose, Wachstumsstörungen sowie ein erhöhtes Malignomrisiko. Eine neuere Untersuchung zeigte des weiteren, dass Personen mit klinisch silenter Zöliakie, die über lange Zeit nicht erkannt und behandelt wird, eine höhere Prävalenz des Typ 1 Diabetes und anderer Autoimmunerkrankungen aufweisen (Ventura, 1999).

Pathogenese des Typ 1 Diabetes und der Zöliakie

Bedeutung des HLA-Typs in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes und der Zöliakie

Die Bereitschaft, einen Typ 1 Diabetes zu entwickeln, ist erblich. So haben Kinder von Vätern oder Müttern mit Typ 1 Diabetes ein Risiko von ca. 5%, Typ 1 Diabetes zu entwickeln. Im Vergleich dazu beträgt die Prävalenz des Typ 1 Diabetes in der Normalbevölkerung etwa 0,3%. Die genetische Prädisposition für einen Typ 1 Diabetes ist polygen. Mindestens 18 verschiedene Genorte wurden bislang identifiziert, die mit Typ 1 Diabetes assoziiert sind (Davies, 1994). Das auf Chromosom 6p liegende, den HLA-Komplex codierende Gen IDDM1 macht ca. 50% der genetischen Determination aus. Weitere prädisponierende Genorte sind der IDDM2-Locus (Insulingenpolymorphismus) sowie der IDDM3-Locus auf Chromosom 15q26. Eine HLA-Typisierung bei erwachsenen Personen mit Typ 1 Diabetes zeigte, dass die HLA-Genotypen DR*03/04 (DQB1*57non-Asp) und DR*04/04 (DQB1*57non-Asp) mit einem sehr hohen Risiko assoziiert sind, an Typ 1 Diabetes zu erkranken. Kinder Typ 1 diabetischer Eltern mit diesen risikoreichen HLA-Genotypen haben bereits innerhalb der ersten fünf Lebensjahre ein kumulatives Risiko von knapp 20% Insel-Autoantikörper zu entwickeln. Im

Vergleich dazu entwickeln nur 2,7 Prozent der Kinder ohne diese Genotypen Insel-Autoantikörper (Ziegler, 1999).

Die Konkordanzrate für Zöliakie liegt bei erstgradigen Verwandten von Personen mit Zöliakie zwischen 8 und 18% und erreicht bei eineiigen Zwillingen 70% (Schuppan, 2000). Auch die Erkrankung der Zöliakie ist mit verschiedenen Genorten assoziiert. Die genetische Prädisposition der Zöliakie beruht vorwiegend auf das Vorhandensein des HLA-DQ2 bzw. HLA-DQ8 Allels. So sind mehr als 95% der Patienten entweder heterozygot DR*03 (DQ2) bzw. DR*05 und DR*07 (DQ2) (Sollid, 1989). Neuere Studien zeigen, dass die Zöliakie auch mit Genen auf Chromosom 15q26 und Chromosom 5q und möglicherweise auch auf 11q assoziiert ist (Houlston, 1997; Greco, 1998).

Gemeinsame Genorte, die mit den beiden Erkrankungen Typ 1 Diabetes und Zöliakie assoziiert sind, sind somit HLA-DR3 DQ2 sowie das IDDM3 Gen auf Chromosom 15q26.

Bedeutung der T-Zellen in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes und der Zöliakie

Die eigentliche Zerstörung der β -Zellen scheint das Ergebnis zellulärer Ereignisse zu sein, bei denen T-Zellen die entscheidende Rolle spielen. Diese Annahme beruht auf Experimente im Tiermodell, die zeigen, dass die Erkrankung des Diabetes durch T-Zell-Transfer von einem diabetischen auf ein nicht-diabetisches Tier übertragen werden kann (Bendelac, 1987). Anscheinend sind beide T-Zell Subpopulationen, CD8+ und CD4+ Zellen, für die Entstehung eines Typ 1 Diabetes nötig (Katz, 1993; Serreze, 1994; Wicker, 1986; Wicker, 1994). Die Zelltransfer-Experimente im Tiermodell zeigten jedoch, dass CD4+ T-Zellen sehr viel effizienter Diabetes übertragen können als CD8+ T-Zellen (Haskins, 1990). Dies führt zu der Annahme, dass CD4+ T-Zellen die maßgeblichen Effektor-Zellen bei der Zerstörung der Beta-Zellen des Pankreas sind. CD4+ T-Zellen können auf Grund der Produktion von Zytokinen nach Antigenstimulation unterschieden werden. Eine überwiegende Produktion der Zytokine IFN γ , TNF- α und IL1 β entspricht einer Th1-Antwort, die mit der zellulären Immunität assoziiert ist. Eine überwiegende Produktion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 ist mit einer Th2-Immunantwort assoziiert (Mosmann, 1989; De Carli, 1994). Diese Zytokine sind vor allem in die Abläufe der humoralen Immunantwort involviert.

Bislang geben vor allem Untersuchungen der non obese diabetic (NOD-) Maus, das klassische Tiermodell für den autoimmunen Diabetes, Auskunft über die

Pathogenese des Autoimmundiabetes. In diesem Tiermodell werden zwei verschiedene Phasen der Insulitis beobachtet. Das frühe Stadium der Insulitis wird als benigne Insulitis bezeichnet, bei der das Zytokin IL-4 überwiegt und die β -Zellen intakt bleiben. Als Spätstadium des Autoimmunprozesses wird eine destruktive Insulitis vermutet, bei der eine Veränderung des Zytokinprofils von CD4+ Zellen in Richtung Th1-Immunantwort festgestellt werden konnte. Es wird angenommen, dass diese veränderte Immunantwort zur Zerstörung der β -Zellen mit anschließender Diabetesmanifestation führt (Katz, 1995; Kolb, 1997; Wegmann, 1994; Shimada, 1996). Aber auch in-vitro Untersuchungen von menschlichem Zellmaterial geben Hinweis auf ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zellen mit dominierender Th1- Antwort bei Personen mit Inselzell-Autoimmunität (Eisenbarth, 1996; Haskins, 1996).

Auch bei der Zöliakie ist für die eigentliche Zerstörung der Dünndarmmucosa ein Überwiegen der Th1-Immunität verantwortlich. Nach einem von Schuppan (2000) aufgestellten Modell kommt es bei Patienten mit Zöliakie aufgrund eines Permeabilitätsdefekts der Dünndarmmucosa zu einer vermehrten Gluten-Aufnahme in die Lamina propria. Durch das Enzym Gewebetransglutaminase C wird das Protein Gluten in seiner Struktur verändert, wodurch Neopeptide entstehen. Diese werden unter anderem durch Makrophagen als Antigen präsentiert. Dadurch stimulierte T-Zellen sezernieren unter anderem das Th1-Zytokin TNF, wodurch intestinale Fibroblasten zur Freisetzung von Matrix-Metalloproteinasen angeregt werden, die wiederum zur Zerstörung der Dünndarmmucosa führen (Schuppan, 2000; Pender, 1997).

Nicht ausreichend erforscht ist jedoch, ob die veränderte Immun-Antwort gegen Diabetes- bzw. Zöliakie-assoziierte Antigene generell, also auch gegen nicht Krankheits-spezifische Antigene, beobachtet werden kann.

Bedeutung von Umweltfaktoren in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes und der Zöliakie

Da der Autoimmunprozess beim Typ 1 Diabetes meist schon sehr früh im Leben beginnt, wird vermutet, dass vor allem Umweltfaktoren, die in den ersten beiden Lebensjahren einwirken, für den Defekt des Immunsystems und die Entstehung des Typ 1 Diabetes verantwortlich sind. Eine Reihe von Umweltfaktoren werden als mögliche Auslöser bzw. Modulatoren des Autoimmunprozesses diskutiert, unter anderem Impfungen und Stillgewohnheiten. Während einige

Fallkontrollstudien einen Zusammenhang sowohl für die Länge und Häufigkeit des Stillens bzw. der Gabe von Kuhmilchproteinen als auch für bestimmte Impfungen (Masern, Mumps, Röteln, BCG) mit der Diabetesmanifestation beschrieben haben (Borch-Johnson, 1984; Dahlquist, 1999; Elliott, 1998; Hyöty, 1993; Pozzili, 1997), zeigten die Ergebnisse dreier prospektiver Studien keinen Zusammenhang der Umweltfaktoren Impfungen, Stillhäufigkeit und Stilldauer mit der Entstehung von Autoimmunität (Hummel, 2000b; Couper, 1999; Graves, 1999; Norris, 1996). Auch enterovirale Virusinfektionen, vor allem das Coxsackie-Virus, werden mit der Entstehung der Inselzell-Autoimmunität in Verbindung gebracht (Roivainen, 1998). Dabei wird vermutet, dass die Ähnlichkeit von Virus-Protein-Bestandteilen mit Bestandteilen des in β -Zellen vorkommenden Enzyms GAD zu einer Kreuzreaktivität führt, wodurch sich die Immunreaktion gegen Fremdprotein auf körpereigene Proteine ausweitet (Tian, 1994). Bislang konnte jedoch keiner der genannten Umweltfaktoren eindeutig als Auslöser oder Beschleuniger des Typ 1 Diabetes identifiziert werden.

Im Gegensatz zum Typ 1 Diabetes ist der auslösende Umweltfaktor der Zöliakie, nämlich das in Getreide vorkommende Protein Gluten, bekannt. Die Zufuhr von glutenhaltiger Nahrung wird allerdings auch als möglicher Auslöser bzw. Trigger des Typ 1 Diabetes und anderer Autoimmunerkrankungen diskutiert (Pocecco, 1995; Bonifacio, 1998). Diese Annahme ist durch ein Tierexperiment begründet, das von einer Abnahme der Diabetes-Inzidenz durch glutenfreie Ernährung berichtet (Funda, 1999). Aber auch epidemiologische Untersuchungen weisen auf einen Zusammenhang der Glutenexposition und Diabetesentstehung hin: bei gemeinsamem Auftreten der Zöliakie und anderer Autoimmunerkrankungen wird die Zöliakie meist nach den anderen Autoimmunerkrankungen, also auch nach dem Typ 1 Diabetes, diagnostiziert und mit glutenfreier Ernährung behandelt (Cronin, 1997; Lepore, 1996; Corazza, 1995; Collin, 1994). Hingegen scheint eine frühzeitige Diagnose und Behandlung der Zöliakie mit glutenfreier Ernährung den Krankheitsverlauf anderer Autoimmunerkrankungen positiv zu beeinflussen. Denn die Prävalenz anderer Autoimmunerkrankungen ist vor allem bei Personen mit klinisch silenter Zöliakie, die über lange Zeit nicht diagnostiziert wird, erhöht (Ventura, 1999). Andere Studien berichten sogar über eine Abnahme von Autoantikörpern durch glutenfreie Ernährung nach Diagnose der Zöliakie, auch eine Abnahme von Insel-Autoantikörpern durch glutenfreie Ernährung konnte beobachtet werden (Ventura, 2000; Wortsman, 1994).

Immundiagnostik des Typ 1 Diabetes und der Zöliakie

Aufgrund der Schwierigkeiten von T-Zell Assays spielen sowohl beim Typ 1 Diabetes als auch bei der Zöliakie die von B-Zellen produzierten Antikörper eine wichtige Rolle in der Früherkennung und Differentialdiagnose. Die Antikörper-Untersuchungen haben aber auch dazu beigetragen, die Entstehungsphase der Diabetes-assoziierten Autoimmunität zu charakterisieren.

Bereits viele Jahre vor Ausbruch des Typ 1 Diabetes, d.h. vor dem Auftreten von klinischen Symptomen der Hyperglykämie, treten bei Betroffenen Insel-Autoantikörper auf. Diese Insel-Autoantikörper sind sehr spezifisch für den Diabetes und können in Venen- oder Kapillarblut mit sensitiven und international standardisierten Testmethoden gemessen werden. Derzeit gibt es vier Insel-Autoantikörper, die für die Diagnostik und Prädiktion des Typ 1 Diabetes bereits etabliert sind: zytoplasmatische Inselzell-Antikörper (ICA), Insulin-Autoantikörper (IAA), Glutamatdecarboxylase-Antikörper (GADA) und Antikörper gegen die Tyrosinphosphatase IA-2 (IA-2A). Dabei handelt es sich bei den Autoantigenen GAD und IA-2 um Enzyme, die u.a. in den Inselzellen des Pankreas vorkommen. ICA sind Antikörper, die sich gegen Bestandteile der Inselzellen, unter anderem also auch gegen GAD und IA-2, richten. Der Nachweis der ICA erfolgt mittels Immunofluoreszenz auf Gefrierschnitten des humanen Pankreas. Die wesentlichen Nachteile dieser Bestimmung ist die teilweise schlechte Qualität der Pankreasschnitte und die subjektive Auswertung des Tests am Mikroskop. Aus diesem Grund wird die Bestimmung der ICA meist durch die kombinierte Testung von IAA und GADA oder IA-2A, die mittels RIA gemessen werden, ersetzt.

Insel-Autoantikörper treten bei Personen, die später im Leben an Typ 1 Diabetes erkranken, häufig bereits in den ersten beiden Lebensjahren auf. Meistens sind bei Kindern Antikörper, die sich gegen das körpereigene Insulin richten, die ersten detektierbaren Antikörper und gehen der Entwicklung weiterer Antikörper voraus. Nur in wenigen Fällen sind GADA alleine als erste Antikörper im Kindesalter messbar (Ziegler, 1999). Diese Beobachtung spricht dafür, dass Insulin ein wichtiges, wenn nicht sogar das primäre Antigen in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes darstellt. Aus diesem Grund sollte die Bestimmung der IAA Bestandteil des Antikörper-Screenings bei Kindern sein. Eine Ausweitung der IAA-Antwort auf die Antigene GAD und IA-2 wird bei Kindern, die später an Typ 1 Diabetes erkranken, beobachtet. Diese Ausweitung, auch als spreading bezeichnet, scheint notwendig für das Fortschreiten der Insulinitis zum manifesten Diabetes zu sein,

denn ausschließlich Personen mit mehr als einem Insel-Autoantikörper entwickeln später Typ 1 Diabetes (Ziegler, 1999). Das am häufigsten beobachtete Schema des Immun-spreadings ist zunächst eine Antikörperantwort gegen Insulin, dann gegen GAD und zuletzt gegen IA-2 (Naserke, 1998b).

Die Bedeutung der Anzahl und des Alters bei Auftreten der Antikörper für die Entwicklung des Typ 1 Diabetes wird durch die Ergebnisse der am Institut für Diabetesforschung durchgeführten prospektiven BABYDIAB-Studie aufgezeigt: Kinder, die schon ab dem Alter von 9 Monaten mehr als einen persistierenden Insel-Autoantikörper aufweisen, haben ein kumulatives Risiko von 100%, bis zum 5. Lebensjahr Typ 1 Diabetes zu entwickeln. Auch Kinder, die ab dem Alter von 2 Jahren persistierende Antikörper aufweisen, haben ein hohes Typ 1 Diabetes-Risiko. So entwickelten – per Life-table-Analyse - 27% dieser Kinder bis zum 5. Lebensjahr Typ 1 Diabetes (Naserke, 2001). Sind hingegen im Alter von 2 Jahren alle drei Insel-Autoantikörper negativ, war das Diabetesrisiko bis zum zehnten Lebensjahr nahezu 0 Prozent (Ziegler, 1999).

Die Untersuchung von Antikörpern zum Nachweis oder Ausschluss der Zöliakie wird schon seit den 60er-Jahren durchgeführt. Bislang wurden beim Menschen Antikörper gegen drei verschiedene Zöliakie-assoziierte Antigene detektiert: Antikörper der Klassen IgA und IgG gegen das in Getreide enthaltene Gliadin (AGA), Antikörper der Klasse IgA gegen das Endomysium (EMA), ein feines Bindegewebsgeflecht der glatten Muskulatur und Antikörper gegen das Enzym Gewebe-Transglutaminase C (tTGCA) der Klassen IgA und IgG.

Bis Dieterich (1997) die Gewebe-Transglutaminase C als zentrales, wenn nicht sogar einziges Zöliakie-assoziiertes Autoantigen des Endomysiums identifiziert hatten, wurden vor allem IgA Endomysium-Antikörper als serologische Marker für die Zöliakie verwendet. Diese sind den Anti-Gliadin-Antikörpern in ihrer Spezifität weit überlegen. Der Nachteil des Zöliakiescreenings mit Endomysium-Antikörpern liegt in der aufwendigen Durchführung des Tests und der schwierigen Untersucher-abhängigen Auswertung der Testergebnisse, die nur von einem erfahrenen Labor durchgeführt werden sollte (Ladinser, 1994). Die Verfügbarkeit der humanen rekombinanten tTGC ermöglicht eine einfachere Durchführung des Screenings mittels ELISA oder RIA (Lampasona, 1999; Sardy, 1999; Seissler, 1999a). In mehreren Studien wurde die Krankheits-Spezifität und -Sensitivität der tTGCA untersucht (Seissler, 1999a). Die tTGCA sind dabei in ihrer Sensitivität und Spezifität den Endomysium-Antikörpern überlegen. Antikörper der Klasse IgG

werden in der Zöliakiediagnostik generell als weniger spezifisch eingestuft als Antikörper der Klasse IgA (Dieterich, 1997), konnten jedoch in einer von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchung als sehr sensitiv beurteilt werden (Hummel, 2000a). Da mit der Erkrankung der Zöliakie das Risiko eines angeborenen IgA-Mangels assoziiert ist (Collin, 1992), sollte generell bei tTGCA-IgA negativen Risiko-Personen nicht auf die Messung der IgG-spezifischen Antikörper gegen tTGC verzichtet werden.

Die Früherkennung beider Erkrankungen ist sinnvoll, da dadurch Akut- und Spätkomplikationen vermieden werden können. Durch die Immundiagnostik ist es möglich, das Risiko für eine Erkrankung früh zu erkennen, die betroffenen Personen auf die Symptome des Diabetes hinzuweisen und krankhafte Veränderungen der Glucosehomöostase schon im Frühstadium durch entsprechende Funktionstests, z.B. durch den oralen Glucosetoleranztest, zu erkennen. Durch eine sich anschließende adäquate Behandlung kann eine Stoffwechsellentgleisung verhindert werden. Eine Antikörper-Testung zur Früherkennung des Typ 1 Diabetes sollte allerdings vor allem im Kontext von Studien, die sich z.B. mit der Untersuchung der Pathogenese und Prävention des Diabetes beschäftigen, erfolgen. Eine individuelle Betreuung und fachkundige Beratung der belasteten Familien ist dabei entscheidend.

Bei der Zöliakie ist ein Antikörper-Screening von Risiko-Populationen vor allem für das Erkennen der silenten, symptomarmen Formen von Bedeutung. Durch die rechtzeitige Behandlung der Zöliakie mit glutenfreier Nahrung ist es möglich, den bereits genannten Spätfolgen einer nicht behandelten Zöliakie vorzubeugen. Aufgrund des gehäuft gemeinsamen Auftretens der Zöliakie und des Typ 1 Diabetes wird allgemein bei Patienten mit Typ 1 Diabetes ein Screening Zöliakie-assoziiierter Antikörper empfohlen. Da erstgradige Verwandte von Personen mit Typ 1 Diabetes ein erhöhtes Risiko haben, selber an Typ 1 Diabetes zu erkranken, (Atkinson, 1994; Ziegler, 1999) könnte diese Population auch ein erhöhtes Zöliakie-Risiko haben. Eine erhöhte Prävalenz der Zöliakie-assoziierten Antikörper wurde bereits bei Kleinkindern von Vätern und Müttern mit Typ 1 Diabetes beschrieben (Hummel, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob auch ältere Personen mit erstgradigen diabetischen Verwandten, unabhängig vom verwandtschaftlichen Verhältnis, ein erhöhtes Zöliakie-Risiko aufweisen.

Prävention des Typ 1 Diabetes

Studien zur Prävention des Typ 1 Diabetes beim Menschen

Weltweit wurden bereits verschiedene Studien zur Sekundär- und Tertiärprävention des Typ 1 Diabetes durchgeführt. Diese Studien haben das Ziel, bei Personen mit Insel-Autoantikörpern die klinische Manifestation des Typ 1 Diabetes zu verhindern bzw. bei Personen mit bereits manifestem Typ 1 Diabetes die Schwere des Krankheitsverlaufs, die Menge der noch erhaltenen Rest-Insulinsekretion und die Stoffwechseleinstellung positiv zu beeinflussen. Einer der ersten Nachweise einer erfolgreichen Immunintervention am Menschen konnte vor vielen Jahren mit dem Immunsuppressivum Cyclosporin A erreicht werden (Lipton, 1990; Skyler, 1987). Auf Grund von unerwünschten Nebenwirkungen - insbesondere der Nephrotoxizität - hat das Medikament allerdings keinen Platz in der Standardtherapie des Typ 1 Diabetes gefunden. Andere Maßnahmen zur Sekundär- bzw. Tertiärprävention, wie z.B. die parenterale Gabe von Insulin bei Inselzell-Antikörper positiven Personen (Schatz, 1996) zeigten keine Wirkung bzw. sind noch nicht abgeschlossen.

Primärpräventive Strategien hingegen greifen bereits vor dem Auftreten von Krankheitsmarkern oder humoralen Immunmarkern ein, d.h. sie wollen die Entwicklung der Inselzell-Autoimmunität im frühen Kindesalter und des Typ 1 Diabetes verhindern. Bisläng ist es noch nicht gelungen, solche Maßnahmen für den Menschen zu entwickeln (Rabinovitch, 1998; Schatz, 2000). Weltweit gibt es nur eine Studie zur Primärprävention des Typ 1 Diabetes bei Menschen. In dieser finnischen Studie wird der Einfluss von Kuhmilch-Eiweiß auf die Entstehung von Insel-Autoantikörpern untersucht (Akerblom, 1999).

Die NOD-Maus als Modell für den Typ 1 Diabetes

Im Tiermodell konnte bereits durch unterschiedliche präventive Maßnahmen, unter anderem durch die Modulation von Ernährungsfaktoren, ein Ausbruch des autoimmunen Diabetes verhindert werden. Das klassische Tiermodell für Untersuchungen zur Pathogenese, Therapie und Prävention des Typ 1 Diabetes ist die non-obese diabetic Maus (NOD-Maus). Vor allem die weiblichen Tiere dieses Inzucht-Stammes entwickeln mit einer Inzidenz von ca. 80% spontan einen autoimmunen Diabetes, der in seiner Pathogenese Ähnlichkeit mit dem humanen Typ 1 Diabetes hat. So sind auch bei den NOD-Mäusen meistens vor Ausbruch

des Diabetes Insulin-Autoantikörper messbar und die Inselzellen der Pankreas zeigen die auch für den humanen Typ 1 Diabetes typische Infiltration mit Lymphozyten, die als Insulitis bezeichnet wird (Yu, 2000; Abiru, 2001). Die IAA-Verläufe bei der NOD-Maus sind sogar mit den IAA-Verläufen prädiabetischer Kinder vergleichbar. So waren die murinen IAA häufig schon im Alter von 8-16 Wochen detektierbar und zeigten eine starke Assoziation mit einer späteren Diabetes-Entwicklung (Yu, 2000). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass im Vergleich dazu die Messung von Antikörpern gegen die beim humanen Typ 1 Diabetes identifizierten Autoantigene GAD und IA-2 bei der NOD-Maus als sehr unspezifisch eingestuft werden muss (Bonifacio, 2001).

Meistens wurde bei den bisherigen Untersuchungen bei der NOD-Maus ausschließlich der Einfluss einer Präventionsmaßnahme auf die Diabetes-Inzidenz untersucht. Deshalb war das Ziel dieser Studie, den präventiven Einfluss von Nahrungsfaktoren auf die Diabetes-Inzidenz und das Autoimmungeschehen bei der NOD-Maus zu untersuchen und mit Hilfe dieser Ergebnisse Strategien zur Primärprävention des Typ 1 Diabetes zu entwickeln.

Prävention des Diabetes durch eine Modulation der Ernährung

Sowohl bei NOD-Mäusen und BB-Ratten, die ebenfalls ein Tiermodell für den humanen Typ 1 Diabetes darstellen, konnte gezeigt werden, dass Nahrungsbestandteile in der Pathogenese des Diabetes eine Rolle spielen. Durch hydrolisierte Nahrungen auf Casein-Basis konnte die Diabetes-Inzidenz bei den Tieren verringert werden (Scott, 1990; Coleman, 1990; Elliott, 1988). Vor allem pflanzliche Proteine aus Weizen bzw. der Sojabohne werden als diabetogen diskutiert (Scott, 1990; Hoorfar, 1993; Scott, 1988; Scott, 1996). Des weiteren berichteten Coleman et al. (1990), dass der diabetogene Nahrungsfaktor im Chloroform-Methanol-Extrakt der Getreidenahrung enthalten ist. Sowohl α - als auch γ -Gliadine, die als immunoreaktive Proteine der Zöliakie charakterisiert wurden, können durch Chloroform-Methanol Extraktion vom Weizen-Endosperm isoliert werden (Rocher, 1995). Die Vermutung, dass Gliadin als Bestandteil des Glutens Einfluss auf die Entwicklung des Autoimmundiabetes bei der NOD-Maus hat, konnte durch die Ergebnisse eines Fütterungsversuchs von Funda (1999) bestätigt werden. Er konnte durch eine glutenfreie Ernährung der NOD-Tiere eine signifikante Verringerung der Diabetesinzidenz im Vergleich zu Kontrolltieren erzielen. Diese Beobachtungen aus Tierversuchen sowie die bereits erwähnten

Ergebnisse epidemiologischer Untersuchungen zum gemeinsamen Vorkommen von Zöliakie und Typ 1 Diabetes beim Menschen lassen einen präventiven Effekt der glutenfreien Ernährung im Hinblick auf die Entwicklung des Typ 1 Diabetes vermuten.

Auch andere Nahrungsfaktoren, die immunmodulatorische Wirkungen haben, wurden bereits im Tiermodell auf ihre präventive Wirkung getestet.

Den in Fischöl enthaltenen n-3 Fettsäuren (Eicosapentaen- und Docosahexaensäure) wird eine antiinflammatorische Wirkung zugesprochen, die bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes möglicherweise von Bedeutung ist. Es konnte gezeigt werden, dass eine tägliche Supplementierung von n-3 Fettsäuren zu einer verminderten Synthese von IL-1alpha, IL-1beta und TNF, zur Zunahme der Suppressor-T-Zellen und Abnahme der T-Helfer-Zellen sowie zu einer verminderten Expression von HLA Klasse II Molekülen auf aktivierten Monozyten führt (Molvig, 1991; Meydani, 1993; Hughes, 2000). Des Weiteren sind proinflammatorische Prostaglandine, die durch den Umbau der Arachidonsäure mit Hilfe der vor allem in Makrophagen und Monozyten vorkommenden Cyclooxygenase Prostaglandin Synthase 2 (PGS₂/COX-2) gebildet werden, Modulatoren der Immunantwort. So beeinflusst PGE₂ das Profil der sezernierten Zytokine von humanen T-Zellen und fördert in vitro die Sekretion von Zytokinen, die der Th2-Immunantwort zugeordnet werden (Snijdwint, 1993; Hilkens, 1996). Dies erscheint zunächst eher als protektiv im Hinblick auf die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes. Litherland konnte jedoch zeigen, dass Patienten mit Typ 1 Diabetes und Patienten mit Insulin-Autoantikörpern eine erhöhte Expression der PGS₂ in Makrophagen aufweisen, die zu einem Defekt der Antigen-präsentierenden Zellen und der IL-2 vermittelten Aktivierung der T-Zellen führt (1999). Durch eine Reduktion der PGS₂-Expression in Makrophagen der NOD-Maus konnte eine signifikant verminderte Diabetesinzidenz erzielt werden (Litherland, 1999). Eine Verringerung der Inzidenz konnte auch durch eine Verminderung der aus der Arachidonsäure gebildeten Prostaglandine durch eine kompetitive Hemmung des Enzymsystems infolge einer Veränderung der Fettsäurezusammensetzung erreicht werden.

Ein weiterer Nahrungsbestandteil mit immunmodulatorischer Wirkung ist die aktive Form des Vitamin D, das 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. So konnte in vitro die Proliferation von Effektor T-Zellen und Produktion von IL-2, IFN γ und TNF α gehemmt werden und gleichzeitig die Aktivität von Supressor-Zellen gesteigert

werden (Manolagas, 1990; Walters, 1992). Beide Wirkungen sind für die Prävention des autoimmunen Zerstörungsprozesses ideal geeignet. Im Tierversuch bei der NOD-Maus führte eine Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D3 zur Verhinderung der Manifestation eines Autoimmundiabetes (Mathieu, 1994). Dabei konnte beobachtet werden, dass die mit 1,25-Dihydroxyvitamin D3 behandelten Tiere eine normale Aktivität der Supressorzellen aufwiesen, unbehandelte NOD-Mäuse jedoch kaum eine Aktivität der Supressorzellen zeigten. Diese Immunsuppression war nur von kurzer Dauer. Dies bedeutet, dass eine Verabreichung des Vitamins über längere Zeit notwendig ist, um den Autoimmunprozess zu unterbinden. Der Vorteil liegt jedoch im Vergleich zu Cyclosporin A, eine weitere immunmodulatorische Substanz mit ähnlich präventiver Wirkung (Hess, 1983), darin, dass bei der klinischen Anwendung die Immunsuppression bei Auftreten von Infektionen durch Absetzen des Medikaments sehr schnell gestoppt werden kann.

In anderen Untersuchungen des Tiermodells führte eine Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D3 zur Reduktion einer lymphozytären Infiltration der Inseln im Pankreas (Mathieu, 1992) und zur Hemmung einer Cyclophosphamid-induzierten, bzw. Dexamethason-induzierten Apoptose (Casteels, 1998). Darüber hinaus gibt es auch Untersuchungen im humanen Umfeld, die dafür sprechen, dass eine Vitamin D-Prophylaxe bei Kleinkindern zur Reduktion eines Diabetesrisikos führt (The Eurodiab Substudy 2 Study Group, 1999; Hyppönen, 2001) und dass Patienten mit Typ 1 Diabetes erniedrigte 1,25 Vitamin D3-Spiegel aufweisen (Baumgartel, 1992).

Stene et al. (2000) zeigten in einer retrospektiven Untersuchung beim Menschen, dass die Einnahme von Vitamin D und n-3 Fettsäuren in Form von Lebertran während der Schwangerschaft mit einem vermindertem Typ 1 Diabetes Risiko der Nachkommen assoziiert ist. Unklar ist, ob die präventive Wirkung auf Vitamin D oder Fischöl oder die Kombination der beiden Substanzen zurückzuführen ist.

2. Studienpopulation und Methodik

2.1. Studienpopulation zur Untersuchung der zellulären und humoralen Immunität bei den assoziierten Erkrankungen Typ 1 Diabetes und Zöliakie

2.1.1. Kinder der BABYDIAB-Studie als Untersuchungsgruppe für die Analyse der Immunantwort gegen Tetanus Toxoid (TT)

Das Untersuchungsmaterial für die Bestimmung der IgG-spezifischen Antikörper Subklassen-Antwort gegen TT stammte aus der BABYDIAB Studienpopulation. BABYDIAB ist eine prospektive Studie, die bei mehr als 1500 Nachkommen von Müttern oder Vätern mit Typ 1 Diabetes von Geburt an die Bildung von Insel-Autoantikörpern untersucht. Dieses Kollektiv wurde zur Untersuchung der Anti-TT Antwort gewählt, da bei allen Kindern regelmäßige Blutabnahmen zu festgelegten Altersstufen durchgeführt werden, nämlich bei Geburt und im Alter von 9 Monaten, 2, 5, 8 und 11 Jahren. Bei allen Kindern der BABYDIAB-Studie werden aus jeder vorhandenen Blutprobe Autoantikörper gegen Insulin, GAD, IA-2 und Inselzellen bestimmt und im Alter von 2 Jahren eine HLA-Typisierung durchgeführt. Die TT-Impfung erfolgt ebenfalls bei den meisten Kindern, gemäß der nationalen Impfempfehlung, zu vorgegebenen Altersstufen, d.h. im Alter von 3, 4, 5 und als Booster-Impfung im Alter von 18 Monaten. Dadurch sind die zeitlichen Abstände der Blutabnahme zur TT-Impfung bei den Kindern der BABYDIAB Studie sehr ähnlich und eine vergleichende Untersuchung der Immunantwort gegen TT möglich.

Die humorale Immunantwort gegen TT wurde bei allen 15 Kindern der BABYDIAB Studie untersucht, die im Alter von 9 Monaten persistierende Insel-Autoantikörper hatten und somit schon vor der TT-Booster-Impfung Inselzell-Autoimmunität entwickelt hatten. Des weiteren wurden alle 21 Kinder, die im Alter von 9 Monaten keine Insel-Autoantikörper hatten, jedoch im Alter von 2 Jahren persistierende Insel-Autoantikörper entwickelten, untersucht (Tab. 1). 16 der Insel-Autoantikörper positiven Kinder hatten den Diabetes-Hochrisiko-Genotyp *HLA DRB1* 03 DQB1*0201/DRB1*04 DQB1*0302* (DR3/4) oder *HLA DRB1* 04 DQB1*0302/DRB1*04 DQB1*0302* (DR4/4). Um eine mögliche HLA-Assoziation der Immunantwort gegen Impfantigen zu untersuchen, wurde die humorale

Immunantwort gegen TT zusätzlich bei Insel-Autoantikörper negativen Kindern mit (n = 42) und ohne (n = 31) diese Genotypen untersucht.

Des Weiteren wurde die Antikörperantwort gegen TT bei allen acht Kindern der BABYDIAB – Studie gemessen, bei denen die Diagnose einer Zöliakie gestellt wurde. Zwei der Kinder hatten den Zöliakie -Risikogenotyp *DR3/3, DQA1*0501 DQB1*02* (DR 3/3), ein Kind hatte den Diabetes-Risikogenotyp DR 3/4. Fünf Kinder hatten persistierende Zöliakie-assoziierte Autoantikörper im Alter von zwei Jahren, drei Kinder entwickelten persistierende Zöliakie-assoziierte Autoantikörper im Alter von fünf Jahren (Tab. 1). Alle acht Kinder hatten keine Insel-Autoantikörper.

Die Impfung gegen Tetanus erfolgte bei 7 Kindern (3 Kinder mit Insel-Autoantikörpern und 4 Insel-Autoantikörper negative Kinder) zusammen mit der Impfung gegen Diphtherie im Alter von 3, 4, 5 und 18 Monaten, bei den restlichen Kindern zu den gleichen Zeitpunkten als DTP Impfung. Antikörper gegen TT wurden in der 9 Monats- und 2 Jahres-Probe bestimmt. Von 23 Kindern stand nicht genügend Serum zur Verfügung, so dass die Bestimmung der Antikörper in der 9 Monats-Probe bei 16 Kindern (davon 5 Insel-Autoantikörper positive Kinder und 2 Kinder mit Zöliakie) bzw. in der 2 Jahresprobe bei 7 Kindern (davon 4 Insel-Autoantikörper positive) nicht möglich war.

Eine Korrelation der Antikörper-Subklassenantwort gegen TT mit der T-Zellantwort gegen TT erfolgte bei 31 Kindern der BABYDIAB-Studie. Da die Abnahme von Blutproben zur Lymphozyten – Isolation aus logistischen Gründen nicht bei allen Kindern der BABYDIAB-Studie möglich ist, wurden von 31 Kindern zu einem späteren Zeitpunkt heparinisierte Blutproben zur Isolation von T-Zellen und Bestimmung der Anti-TT- Antikörpersubklassen gesammelt. Alle Personen waren gegen DTP geimpft. Das mediane Alter des Kollektivs betrug zum Zeitpunkt der Untersuchung 7,3 Jahre. 24 Kinder hatten zu diesem Zeitpunkt Insel-Autoantikörper und 7 Kinder hatten einen Typ 1 Diabetes.

Tab 1: Alter bei Auftreten der Insel- bzw. Zöliakie-Autoantikörper, Antikörperstatus, Alter bei Diabetes- bzw. Zöliakiemanifestation, Genotyp und Impfstatus der Kinder mit Insel-Autoantikörpern

	Erste Auto-Ak positive Probe	Erste Insel-Auto-Antikörper*	Gesamte Insel-Auto-Antikörper*	Erste Zöliakie-Antikörper	Alter bei Manifest. (Jahre)	HLA-DR-Typ	Impfungen †
1	9 Monate	IAA	IAA, GADA, IA2A		7,1 (DM)	11/16	DT
2	9 Monate	IAA	IAA, GADA			01/03	DTP
3	9 Monate	IAA	IAA, GADA			01/03	DTP
4	9 Monate	IAA	IAA, GADA, IA2A			04/04	DTP
5	9 Monate	IAA	IAA, GADA, IA2A			04/04	DTP
6	9 Monate	IAA	IAA, GADA, IA2A			04/01	DTP
7	9 Monate	IAA	IAA, GADA			04/01	DTP
8	9 Monate	IAA	IAA, GADA			NT	DTP
9	9 Monate	IAA	IAA, GADA, IA2A		3,8 (DM)	04/04	DTP
10	9 Monate	IAA	IAA, IA2A			03/04	DTP
11	9 Monate	GADA	IAA, GADA, IA2A			03/04	DTP
12	9 Monate	IAA, GADA	IAA, GADA, IA2A		1,3 (DM)	04/09	DTP
13	9 Monate	IAA, GADA	IAA, GADA, IA2A			08/08	DTP
14	9 Monate	IAA, GADA, IA2A	IAA, GADA, IA2A		2,2 (DM)	01/03	DTP
15	9 Monate	IAA, GADA, IA2A	IAA, GADA, IA2A		3,7 (DM)	01/04	DTP
16	2 Jahre	IAA	IAA, GADA, IA2A		3,9 (DM)	11/12	DTP
17	2 Jahre	IAA	IAA, ICA ‡		4,9 (DM)	01/01	DTP
18	2 Jahre	IAA	IAA			04/04	DTP
19	2 Jahre	IAA	IAA			15/02	DTP
20	2 Jahre	IAA	IAA, GADA, IA2A		8,8 (DM)	03/04	DT
21	2 Jahre	IAA	IAA, GADA			03/04	DTP
22	2 Jahre	IAA	IAA, GADA, IA2A			04/01	DTP
23	2 Jahre	IAA	IAA, GADA, IA2A		3,3 (DM)	03/04	DTP
24	2 Jahre	GADA	GADA			03/03	DTP
25	2 Jahre	GADA	GADA			04/01	DTP
26	2 Jahre	IAA, GADA	IAA, GADA, IA2A			03/04	DTP
27	2 Jahre	IAA, GADA	IAA, GADA, IA2A			04/04	DTP
28	2 Jahre	IAA, GADA	IAA, GADA, IA2A			01/03	DTP
29	2 Jahre	IAA, GADA	IAA, GADA			03/04	DTP
30	2 Jahre	IAA, GADA	IAA, GADA			04/04	DTP
31	2 Jahre	IAA, IA2A	IAA, GADA, IA2A		7,3 (DM)	04/11	DTP
32	2 Jahre	IAA, IA2A	IAA, GADA, IA2A		8,5 (DM)	04/04	DT
33	2 Jahre	IAA, GADA, IA2A	IAA, GADA, IA2A			03/04	DTP
34	2 Jahre	IAA, GADA, IA2A	IAA, GADA, IA2A			04/07	DTP
35	2 Jahre	IAA, GADA, IA2A	IAA, GADA, IA2A		4,1 (DM)	04/01	DTP
36	2 Jahre	IAA, GADA, IA2A	IAA, GADA, IA2A		1,8 (DM)	03/04	DTP
37	2 Jahre			tTG, EMA	2,3 (Zöl)	03/13	DTP
38	2 Jahre			tTG, EMA	2,7 (Zöl)	03/04	DTP
39	2 Jahre			tTG, EMA	5,5 (Zöl)	03/03	DTP
40	2 Jahre			tTG, EMA	6,0 (Zöl)	04/13	DT
41	2 Jahre			tTG, EMA	3,9 (Zöl)	03/15	DTP
42	5 Jahre			tTG, EMA	9,0 (Zöl)	03/16	DTP
43	5 Jahre			tTG, EMA	9,0 (Zöl)	03/16	DTP
44	5 Jahre			tTG, EMA	6,8 (Zöl)	04/13	DTP

*Erste Antikörper geben den oder die Diabetes-assoziierten Autoantikörper an, die in der ersten Autoantikörper positiven Probe detektiert wurden; Gesamte Antikörper geben die Autoantikörper an, die in allen getesteten Proben detektiert werden konnten

† DTP bedeutet Impfung gegen Diphtherie, Tetanus und Pertusis, andere Impfungen sind nicht aufgelistet

‡ ICA wird nur angezeigt, wenn GADA oder IA2A nicht detektiert wurden.

2.1.2. Untersuchungsgruppen für die Analyse von Zöliakie-assoziierten Antikörpern

Kontroll-Personen

Zur Berechnung der Normbereiche für die kombinierte Messung von tTGCA-IgA und tTGCA-IgG (tTGCA- Combi) und die getrennte Bestimmung von tTGCA-IgA und tTGCA-IgG wurde ein Kollektiv von gesunden Personen getestet, die keine erstgradigen Verwandten mit Typ 1 Diabetes bzw. Zöliakie haben und keine Symptome der Zöliakie zeigen. Insgesamt wurden 230 Personen im mittleren Alter von $24,4 \pm 16,2$ Jahren (Range: 0,3-57,0 Jahre) mit dem tTGCA-IgA/IgG Combi-Assay getestet, 239 Personen im mittleren Alter von $23,7 \pm 16,3$ Jahren (Range: 0,3-57,0 Jahre) mit dem tTGCA-IgA Assay und 266 Personen im mittleren Alter von $24,4 \pm 16,1$ Jahren (Range: 0,3-57,0 Jahre) mit dem tTGCA-IgG Assay getestet.

Personen mit Langzeit-Typ 1 Diabetes

Um die Prävalenz von Zöliakie-assoziierten Antikörpern bzw. einer silenten Form der Zöliakie und deren Assoziation mit der autonomen Neuropathie bei Patienten mit Langzeit- Typ 1 Diabetes zu untersuchen, wurden Serumproben von 141 Patienten mit Langzeit- Typ 1 Diabetes der Diabetesambulanz des Krankenhauses München-Schwabing mit dem kombinierten tTGCA-IgA/IgG Assay getestet (mediane Dauer der Diabeteserkrankung: 17,1 Jahre; Range: 5,0-54,0 Jahre). Serumproben von Patienten, die im Combi-Assay Werte $> 1,7$ Units hatten, wurden einzeln auf tTGCA-IgA und tTGCA-IgG getestet.

Alle Patienten waren von Muhr-Becker auf das Vorliegen einer kardialen autonomen Neuropathie (KAN) voruntersucht (1998). Zur Beurteilung der kardialen autonomen Funktion wurden vier EKG-gestützte Funktionstests sowie der Orthostase-Test herangezogen. Waren zwei der fünf untersuchten Funktionstests nach den altersentsprechenden Normwerten pathologisch, wurde die Diagnose der kardialen autonomen Neuropathie gestellt. Dies war bei 58/141 Patienten der Fall. Bei Patienten mit klinischen Symptomen einer diabetischen Gastroparese ($n = 28$) wurde zusätzlich die Magenentleerungszeit voruntersucht (Strian und Haselbeck, 1998). Von den untersuchten Patienten (5 KAN positive und 11 KAN negative) zeigten 16 eine verzögerte Magenentleerungszeit.

Erstgradige Verwandte von Personen mit Typ 1 Diabetes – Die Münchner Familienstudie

Im Rahmen der Münchner Familienstudie werden seit 1989 erstgradige Verwandte von Personen mit Typ 1 Diabetes auf das Vorliegen von Insel-Autoantikörpern untersucht. Im Vergleich zur BABYDIAB-Studie, die ausschließlich Kinder diabetischer Eltern von Geburt an untersucht, werden in der Münchner Familienstudie neben Kindern auch Eltern und Geschwister von Personen mit Typ 1 Diabetes unterschiedlicher Altersklassen untersucht. Durch die Bestimmung der Zöliakie-Antikörper in diesem Kollektiv konnte deshalb untersucht werden, ob Zöliakie-assoziierte Antikörper nur im frühen Kindesalter oder auch bei älteren Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes detektiert werden können und ob das verwandtschaftliche Verhältnis der untersuchten Person zur Person mit Typ 1 Diabetes einen Einfluss auf die Entwicklung der Zöliakie-assoziierten Antikörper hat. Das Auftreten von Zöliakie-assoziierten und Diabetes-assoziierten Autoantikörpern wurde bei 1013 erstgradigen Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes untersucht. Von den 1013 untersuchten Personen hatten 94 Personen mindestens einen persistierenden Insel-Autoantikörper. Von den 94 Insel-Autoantikörper positiven Personen entwickelten 34 im Verlauf der Nachuntersuchungen eine Typ 1 Diabetes (Tab. 2). Jeweils die letzte verfügbare Blutprobe wurde mit dem tTGCA-Combi Assay getestet. Lag der dabei ermittelte Wert $> 1,7$ U, wurde aus der entsprechenden Blutprobe getrennt tTGCA-IgA und tTGCA-IgG bestimmt. Mit tTGCA-IgA positiven Personen wurde, soweit möglich, Kontakt aufgenommen und eine neue Serumprobe zur Untersuchung der tTGCA angefordert. Aus Proben mit positiven tTGCA-IgA wurden im Labor von Prof. Stern, Tübingen, EMA (IgA) bestimmt.

Tab. 2: Durchschnittliches Alter und Verwandtschaftsverhältnis der untersuchten Personen zur Person mit Typ 1 Diabetes und Anzahl der Personen mit Diabetes-assoziierten Antikörpern bzw. Typ 1 Diabetes (T1D).

	Geschwister von Personen mit T1D	Kinder von Personen mit T1D	Eltern von Personen mit T1D
Gesamtzahl der untersuchten Personen	622	123	268
Alter (MW \pm SD)	18,9 \pm 11,5	13,5 \pm 7,5	46,9 \pm 10,7
Bereich	1,0 - 67,9	1,3 - 37,0	24,2 - 87,8
Anzahl der Personen mit Insel-Ak	32	56	6
Anzahl der Insel-Ak+ Pers. mit Progression zum T1D	14	17	3

2.2. Methoden zur Untersuchung der humoralen und zellulären Immunität bei den assoziierten Erkrankungen Typ 1 Diabetes und Zöliakie

2.2.1. Analyse der Immunantwort gegen Tetanus Toxoid

2.2.1.1. Bestimmung von Tetanus-Antikörper-Isotypen

Die Tetanus-Isotypen Antikörper werden mittels ELISA unter Verwendung eines WHO-Standardserums gemessen (NIBSC: code SSI-TE-3; Sesardic, 1993). Zunächst werden 125 µl TT per Reagenzgefäß (TT 3500 LF/ml, Chiron-Behring, Marburg, Deutschland) in einer Konzentration von 0,5 LF/ml in PBS (147mM NaCl, 1,5mM KCl, 2,7mM KH₂PO₄, 81mM Na₂HPO₄, pH 7,4) auf eine ELISA-Platte (Plate Maxisorb F96, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Dann werden die Platten gewaschen (3x, PBS + 0,05% Tween) und anschließend mit PBST + 0,1% Gelatine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) für 1h bei Raumtemperatur blockiert (200 µl/Reagenzgefäß). Nach erneutem Waschen (3x mit PBST) wird das Testserum in einer Verdünnung von 1:800 (für IgG1) und 1:400 (für IgG2 und IgG4) in PBST bzw. das WHO-Standardserum in einer Verdünnung von 1:1600, 1:6400, 1:25600 und 1:102400 (in PBST) in die Reagenzgefäße gegeben (100 µl) und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen der Platte (3x mit PBST) werden die monoklonalen Anti-Isotypen-Antikörper IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 (Cat.No. 35052D, 35072D, 35082D, 35092D, Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1/1000 dazugegeben (100 µl/Reagenzgefäß) und für 2h inkubiert. Danach werden die Platten 3x mit PBST gewaschen, dann 100 µl/Reagenzgefäß Streptavidin-HRP-Konjugat (Pharmingen) in einer Verdünnung von 1/1000 hinzugefügt, eine Stunde inkubiert, gewaschen, und Substrat (ABTS, Sigma A-1888, 100µl) addiert. Nach ca. 8 min wird die Farbreaktion mit 1 N H₂SO₄ (100 µl) gestoppt und die Platte in einem ELISA-reader (MR 600, Microplate Reader, Dynatech) bei E405 gelesen. Die optische Dichte (OD) der Probe in nicht mit Antigen beschichteten Reagenzgefäßen (mediane OD = 0,33; range 0,31-0,35) wird von der OD der Probe in mit Antigen beschichteten Reagenzgefäßen subtrahiert. Die Ergebnisse der IgG1 spezifischen Anti-TT Ergebnisse werden mit 2 multipliziert, da das Serum für diese Bestimmung im Vergleich zu den anderen Subklassen zweifach höher verdünnt wird. Die Ergebnisse zeigten für alle Subklassen eine Population mit Normalverteilung und für die Subklassen IgG1,

IgG2 und IgG4 eine zweite Population mit höheren Werten. Die Positivitätsgrenze wurde durch die jeweils obere Grenze der normalverteilten Subklassenergebnisse definiert, die für IgG1 bei 0,3, für IgG2 bei 0,25, für IgG3 bei 0,15 und für IgG4 bei 0,10 liegt.

2.2.1.2. Bestimmung des Zytokinprofils peripherer Lymphozyten

Aus heparinisiertem, venösem Vollblut werden zunächst nach Abnahme des Plasmas die peripheren Blutlymphozyten (PBL) durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll isoliert. Das Blut wird hierfür mit Medium (RPMI 1640/Glutamax I [Life Technologies, Paisley, GB] + 1% Penicillin, Streptomycin, Life Technologies + 5% humanes Serum Bio Whittaker, Europe) im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Überschichtung des Ficolls (Ficoll -Paque, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) mit Blut erfolgt im Verhältnis 1:2. Nach Zentrifugation bei 1600 rpm für 25 min werden die Zellen vom Ficoll abgenommen zweimal mit Medium gewaschen.

Die Analyse der Zytokinprofils peripherer Lymphozyten erfolgt mittels der Elispot-Technik in einem Triplet-Ansatz (3 Reagenzgefäße/Zytokin und Antigen). $3,5 \times 10^6$ Zellen pro Reagenzgefäß werden in 1 ml Medium (RPMI 1640 + 1% Penicillin, Streptomycin + 5% humanes Serum) für 48 h bei 37°C, 5%CO₂ in einer Platte mit 48 Reagenzgefäßen (Multiwell Tissue Culture Plate, Becton Dickinson, New Jersey, USA) mit Tetanus Toxoid (TT) (Statens Serum Institut, Denmark) in einer Konzentration von 7,5 Lf/ml stimuliert. Als Negativ-Kontrolle werden Reagenzgefäße mit der gleichen Konzentration von Zellen in Medium mitgeführt, die nicht mit Antigen versetzt werden. Zur Weiterführung des Tests wird eine 96-well Elispot-Platte (U-CyTech, Utrecht, Niederlande) mit einem Zytokin-spezifischen monoklonalen Antikörper (mAk) (U-CyTech) in einer Konzentration von 1:100 in PBS (154 mmol/l NaCl, 1,4 mmol/l Phosphat) beschichtet. Die Platte wird über Nacht bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag 5 mal mit PBS + 0,05% Tween 20 (PBST) gewaschen und 1 h bei 37°C mit 200 µl PBS + 1% BSA pro Reagenzgefäß inkubiert („Post-Coating“). Die Lösung wird nach Inkubation verworfen. Nach Inkubation der Zellen werden die nicht-adhärenenten Zellen aus der Kultur-Platte entnommen, 5 min bei ZT zentrifugiert (1500 rpm) und in 37°C warmem Medium (RPMI 1640 + 1% Penicillin, Streptomycin + 2% humanes Serum) aufgenommen (Zellkonzentration: $10^5/100$ µl Medium). Die Zellen werden in die mit dem mAk beschichtete Platte überführt (100µl) und 4 h bei 37°C, 5%CO₂

inkubiert. Die von den Zellen produzierten Zytokine binden an den zytokinspezifischen mAk. Nach der Inkubation wird die Zelllösung verworfen und die verbleibenden Zellen durch Zugabe von 200 µl/Reagenzgefäß kaltem deionisiertem Wasser und Inkubation der Platte (15 min) auf schmelzendem Eis (0°C) lysiert. Anschließend wird die Platte 10-mal mit PBST gewaschen. Die Flächen, an die das sezernierte Zytokin gebunden wurde, werden mit einer Kombination von biotiniertem Anti-Zytokin-Detector-Antikörper (U-CyTech, Konzentration in PBS 1:100, Inkubation 1h bei 37°C, 5%CO₂, anschließend Platte 5-mal mit PBST waschen) und Enzym-markiertem Anti-Biotin-Antikörper (U-CyTech, GABA, Konzentration in PBS 1:50, Inkubation 1h bei 37°C und 5%CO₂) detektiert. Nach der Inkubation wird die Platte erneut 5 -mal mit PBST gewaschen. Als letzter Schritt wird pro Reagenzgefäß 30 µl einer Substratmischung (U-CyTech) zugegeben, die vom Enzym umgesetzt wird, und die Platte 10-15 min bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert, wodurch die Anzahl der Zytokin-sezernierenden Zellen sichtbar wird. Die Reaktion wird durch Spülen der Platte mit destilliertem Wasser gestoppt und der Test mit einem Inversions-Mikroskop (Labovert, Leitz, Wetzlar) ausgewertet. Die Anzahl der „Spots“ der Kontroll-Reagenzgefäße, die bei allen untersuchten Personen <10 / 500 000 Zellen betrug, wird von der Anzahl der „Spots“ in mit TT-stimulierten Reagenzgefäßen abgezogen.

2.2.2. Analyse von Zöliakie-assoziierten Antikörpern

2.2.2.1. Bestimmung von tissue-Transglutaminase C (tTGC)-Autoantikörpern

Autoantikörper gegen die tTGC werden mittels eines Radioliganden-Bindungs-Assays (RBA) bestimmt. Die Klonierung humaner tTGC erfolgt aus der RNA humaner Pankreaszellen (Bazzigaluppi E et al., 1999). Die cDNA wird im pGEM-T-easy Vector (Promega, Madison, WI, USA) unter Kontrolle des SP6 Promotors kloniert (V. Lampasona, Hospital San Raffaele, Mailand, Italien). Die tTGC wird in vitro auf Eis mit Hilfe eines kommerziellen Kits (TNT[®] SP6 Coupled Reticulocyte Lysate Kit, Promega) in Anwesenheit radioaktiv markiertem Methionins (³⁵S) (Amersham, UK) und unter Einsatz von 6 µl cDNA transkribiert und translatiert. Nach Inkubation des fertigen Ansatzes für 2 Stunden bei 30°C wird die Probe in 100 µl TBST-Puffer (150 mmol/l NaCl, 1% Tween 20, 50 mmol/l TRIS-HCl, pH 7,4) aufgenommen. Die Abtrennung von freiem, nicht in das Antigen eingebautem ³⁵S-

Methionin erfolgt über Massengewichtssäulen (NAP-5; Pharmacia, Uppsala, Schweden).

Kombinierte Testung von humanen tTGCA- IgA und IgG

Alle Testschritte werden auf Eis durchgeführt. Pro Testserum werden in Duplikaten jeweils 2 µl des unverdünnten Serums mit 15000 cpm radioaktiv markierter tTGC in 25 µl TBST in Rundbodenröhrchen angesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Isolation des von Antikörpern gebundenen markierten Antigens werden 1 mg / Röhrchen Protein-A Sepharose (Pharmacia) in TBST über Nacht gequollen, am nächsten Tag 4 µl / Röhrchen Anti-IgA kovalent gebundene Agarose-beads (Sigma-Aldrich) hinzugegeben, gewaschen und in 50 µl TBST / Röhrchen gelöst zu den Proben gegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei 4°C rüttelnd werden die Proben 4 mal gewaschen (1,8 ml TBST pro Röhrchen, 5 min Zentrifugation bei 2100 rpm) und das Pellet anschliessend in 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Optifluor, Canberra Packard, Meriden, CT, USA) gelöst. Die gebundene Radioaktivität wird in einem Liquid-Szintillationscounter (1219 Rackbeta, Wallac, UK) gemessen, ausgedrückt als gemessene Radioaktivität in Zerfällen pro Minute (cpm). Bei jedem Versuchsansatz werden ein tTGCA-Negativ-Serum und 8 Verdünnungen eines tTGCA-Positiv-Serums zur Erstellung einer Standardkurve mitgeführt, mit deren Hilfe der Antikörpertiter der Proben (in Units) berechnet werden kann (Software des Top Count, Packard). Folgende Verdünnungsstufen des tTGCA-Positiv Serums mit Negativ Serum werden verwendet: 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048. Den Messwerten (cpm) des Negativ-Serums werden 0 Units und der 1:16 Verdünnung des Positiv-Serums 150 Units zugeteilt. Um die Sensitivität des kombinierten Assays zu prüfen, wurde aus jeweils einem Serum, das ausschließlich tTGCA-IgA positiv ist und einem Serum das ausschließlich tTGCA-IgG positiv ist, eine Verdünnungsreihe mit Negativ-Serum erstellt. Diese Verdünnungen wurden getrennt für tTGCA-IgA und tTGCA-IgG getestet und jeweils die Verdünnungsstufe mit einem am Cut-off liegenden Titer ermittelt. Diese wird bei jedem Combi-Assay als Qualitätskontrolle mitgetestet.

Einzeltestung von humanen tTGCA- IgA und tTGCA-IgG

Die Einzeltestung der IgA und IgG- Antikörper gegen tTGC erfolgt nach dem gleichen Testprinzip wie die kombinierte Testung. Sie unterscheidet sich nur in der

alleinigen Verwendung von 4 µl / Röhrchen Anti-IgA kovalent gebundenen Agarose-beads gelöst in 50 µl TBST / Röhrchen zur Bindung der Immunkomplexe bei der Messung der tTGCA-IgA und der alleinigen Verwendung von 1,5 mg / Röhrchen über Nacht gequollener Protein-A Sepharose gelöst in 50 µl TBST / Röhrchen zur Bindung der Immunkomplexe bei der Messung der tTGCA-IgG.

2.2.2.2. Bestimmung von humanen Endomysium-Autoantikörpern IgA

Die Bestimmung der Endomysium-Antikörper der Klasse IgA erfolgte im Labor von Prof. Stern, Universitäts-Kinderklinik Tübingen mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen indirekten Immunofluoreszenz-Kits (Euroimmun, Gross Grönau, Deutschland). Für die Bestimmung werden Darm-Gewebeschnitte von Primaten verwendet. Auf Reagenzträger werden jeweils 25 µl mit Phosphatpuffer (pH 7,2) verdünnte (1:5) Serumproben pipettiert, die mit den Darmgefrierschnitten beschichteten Objektträger (BIOCHIPS) in den so entstandenen Tropfen eingetaucht und 30 Minuten inkubiert. Die Objektträger werden anschließend mit Phosphatpuffer gewaschen. Die Reagenzträger werden mit je 20 µl Antiserum (Fluor-Isothiocyanat - markiertes Anti-Human-IgA der Ziege, 1:5 verdünnt mit PBS-Tween) beschichtet und die Biochips in den so entstandenen Tropfen auf den Reagenzträgern eingetaucht. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wird der Objektträger abgespült und mit Phosphatpuffer gewaschen, danach mit Phosphatgepuffertem Glycerin (pH 8,4) eingedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Bei einem positiven Befund ist das extrazelluläre Bindegewebe der Dünndarmmukosa deutlich grün gefärbt sichtbar. Positive Seren werden mit PBS-Puffer austitriert und die Endpunkttiter in Units angegeben. Der Grenzwert für Positivität liegt bei 1:5 (Stern, 1996).

2.3. Tiermaterial und Methoden zur Untersuchung des Einflusses einer Nahrungsmodulation auf die Entwicklung eines autoimmunen Diabetes bei der NOD-Maus

2.3.1. Studiendesign

2.3.1.1. Beschreibung der Versuchstiere

Um den Einfluss des Glutens im Vergleich zu anderen Nahrungsfaktoren auf die Entwicklung des autoimmunen Diabetes bei der NOD-Maus zu untersuchen, wurden 8 Gruppen mit jeweils 12 weiblichen NOD Tieren gebildet, die mit unterschiedlichem Futter ernährt wurden. Die in diese Präventionsstudie eingeschlossenen NOD Mäuse stammen aus einer Zucht des Instituts für Diabetesforschung, München. Die Elterntiere wurden ursprünglich von Taconics (Germantown, NY) bezogen.

Die Ernährungsmodulation bestand aus einer glutenfreien Ernährung im Vergleich zu einer Vitamin D-Supplementierung und einer Supplementierung mit n-3 Fettsäuren. Es wurde jeweils ein Futter hergestellt, das hinsichtlich einem der drei Ernährungs-Faktoren verändert war, sowie ein Futter, in dem alle drei Faktoren kombiniert verändert wurden. Da sich eine Modifizierung der Nahrungszusammensetzung auch auf den Gehalt anderer Nährstoffe auswirkte, wurde zu jeder Nahrung eine Kontroll-Nahrung entwickelt, die dem Nährstoffgehalt der Versuchsnahrung vergleichbar war (Firma Altromin, Lage, Deutschland).

Die Muttertiere wurden während der Schwangerschaft und Stillzeit mit dem kombinierten Futter (glutenfrei + Vitamin D- + Fischölsupplementierung) ernährt. Alle weiblichen Nachkommen, die aus einem Wurf der so behandelten Muttertiere stammten, wurden im Alter von $21,9 \pm 2,8$ Tagen gleichmäßig auf folgende Untersuchungsgruppen verteilt:

- Glutenfreie Gruppe und Kontrollgruppe
- Fischölgruppe und Kontrollgruppe
- Vitamin D Gruppe und Kontrollgruppe
- Gruppe mit kombiniertem Futter

Zusätzlich wurde eine Gruppe mit weiblichen Nachkommen gebildet, deren Elterntiere während des Zuchtvorgangs und die Nachkommen selbst mit der herkömmlichen Standard-Nahrung (Glutenhaltig, ohne Vitamin D- und Fischöl-

Supplementierung) ernährt wurden. Diese Gruppe diente somit als Kontrollgruppe für die gesamte Ernährungsintervention (Abb. 1).

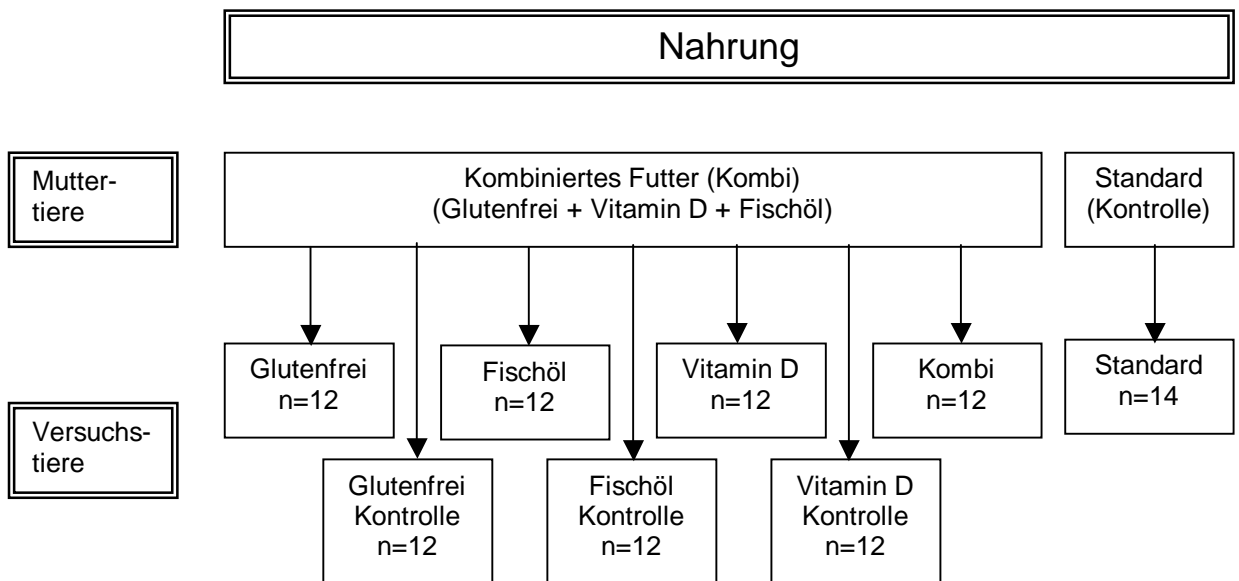


Abb. 1: Behandlungsschema und Gruppeneinteilung der Muttertiere und der Versuchstiere

Da neben der Ernährung auch von anderen Umweltfaktoren berichtet wird, die einen signifikanten Einfluss auf die Diabetes-Inzidenz bei NOD-Mäusen haben (Pozzilli, 1993), wurden alle Tiere unter den gleichen Bedingungen (Flüssigkeitszufuhr, Sterilität) gehalten.

2.3.1.2. Beschreibung der Nahrungszusammensetzung

Ausgehend von den Empfehlungen des American Institute of Nutrition zur Zusammensetzung des Futters für Nagetiere in Laborhaltung (Reeves, 1993) wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Altromin (Lage, Deutschland) die Versuchsnahrungen konzipiert. Dabei blieb in allen Versuchsnahrungen der Anteil von Sojaprotein und Milcheiweiß unverändert, da eine diabetogene Wirkung dieser Rohstoffe diskutiert wird und ein möglicher präventiver Effekt eines spezifischen Nahrungsbestandteils sonst nicht eindeutig nachweisbar wäre.

Glutenfreie Nahrung und Kontrollnahrung

Die glutenfreie Nahrung wurde durch Austausch aller glutenhaltigen Rohstoffe durch Maisstärke als Kohlenhydratträger hergestellt. Als Eiweißträger wurde Geflügelfleischmehl eingesetzt. Durch den Austausch der Rohstoffe kam es zu einem höheren Kohlenhydrat- und damit verbundenen Energiegehalt des Futters. Aus diesem Grund wurde ein Kontrollfutter mit glutenhaltigem Getreide konzipiert, das dem Nährstoffgehalt des glutenfreien Futters entspricht.

Nahrung mit Fischöl-Supplementierung und Kontrollnahrung

Diese Nahrung wurde durch Zugabe einer Fettsäuren-Mischung (Henry Lamotte GmbH, Bremen, Deutschland) zur Standard-Nahrung produziert, die überwiegend n-3 Fettsäuren enthält. Der Gesamtgehalt an n-3 Fettsäuren im Futter betrug dadurch 30609 mg/kg, der Anteil von EPA und DHA 28343 mg/kg und der Linolensäure-Anteil 2266 mg/kg. Der n-6 Fettsäuren-Gehalt war 14907,75 mg/kg und der Gesamtfettgehalt 135609,1 mg/kg. Das Verhältnis von n-3 zu n-6 Fettsäuren betrug 2:1. Als Kontrollnahrung wurde ein Futter hergestellt, das dem Fett- und Energiegehalt der Versuchsnahrung entspricht, aber ein n-3 zu n-6 Fettsäuren-Verhältnis von 1:7 hat.

Nahrung mit Vitamin D-Supplementierung und Kontrollnahrung

Die Herstellung der mit Vitamin D3 supplementierten Nahrung erfolgte durch Zugabe von 2000 I.E./kg Vitamin D3 im Vergleich zu einem Gehalt von 600 I.E./kg Vitamin D3 der Standardnahrung. Da der Nährstoffgehalt ansonsten unverändert blieb, wurde die normale Standardnahrung als Kontroll-Diät verwendet.

Glutenfreie Nahrung mit Vitamin D- und Fischöl Supplementierung

Zur Herstellung dieser Nahrung wurde der glutenfreien Nahrung 2000 I.E./kg Vitamin D3 zugegeben und der Anteil der n-3 Fettsäuren durch Zugabe der Fettsäurenmischung auf 30468,35 mg/kg erhöht. Das Verhältnis von n-3 zu n-6 Fettsäuren betrug somit 2:1.

Der Nährstoffgehalt, Vitamin D3 Gehalt sowie die Fettsäurezusammensetzung ist in Tab. 3 dargestellt. In Tab. 4 sind die Rohstoffe aufgeführt, die zur Herstellung der Versuchsnahrungen verwendet wurden.

Alle Nahrungen wurden aus Haltbarkeitsgründen bei -20° gelagert und in kleinen Portionen aufgetaut. Um die durchschnittliche tägliche Nahrungs-Aufnahme der Tiere zu ermitteln, wurde der Verbrauch des Futters pro Käfig zweimal wöchentlich durch Abwiegen der Ausgangs- und Restmenge bestimmt und durch die Anzahl der Tiere im Käfig geteilt.

Tab. 3: Nährstoffgehalt, Vitamin D - Gehalt und Fettsäurezusammensetzung der Versuchs- und Kontrollnahrungen.

	Glutenfrei	Glutenfrei Kontrolle	Fischöl	Fischöl- Kontrolle	Vitamin D	Vitamin D Kontrolle =Standard	Kombi
Energie (kcal/kg)	3151	2919	3071	3092	2473	2474	3042
Eiweiß (mg/kg)	186915	180182	174086	173654	185648	185688	186308
Kohlen- hydrate (mg/kg)	511088	491384	316350	315707	371198	371258	268934
Fett (mg/kg)							
Gesamt	38925	38603	135609	138477	38220	38231	138271
C 18:2	10962	17688	13062	68297	13382	13382	11862
C 18:3	1525	2432	2266	9391	1834	1834	2125
C 20:4	546	546	1846	546	546	546	1846
C 20:5	243	243	20843	243	243	243	20843
C 22:6	-	-	7500	-	-	-	7500
n-3:n-6	1:6,5	1:7	2:1	1:7	1:7	1:7	2:1
Vitamin D3 (I.E./kg)	600	600	600	600	2000	600	2000

Tab. 4: Verwendete Rohstoffe für die Versuchs- und Kontrollnahrungen

	Glutenfrei	Glutenfrei Kontrolle	Fischöl	Fischöl- Kontrolle	Vitamin D	Standard	Kombi
Saccharose	-	+	-	-	-	-	-
Casein	-	+	-	-	-	-	-
Mais- stärke	+	-	-	-	-	-	+
Weizenkleie	-	-	+	+	+	+	-
Weizennach- mehl	-	+	+	+	+	+	-
Weizen	-	+	+	+	+	+	-
Mais	-	-	+	+	+	+	-
Gerste	-	-	+	+	+	+	-
Geflügel- fleischmehl	+	+	-	-	-	-	+
Sojaschrot	+	+	+	+	+	+	+
Fischöl	-	-	+	-	-	-	+
Cellulose- pulver	+	+	-	-	-	-	+
Fischmehl	+	+	+	+	+	+	+
Sojaöl	+	+	+	+	+	+	+
Milchpulver	+	+	+	+	+	+	+
Grünmehl	+	+	+	+	+	+	+
Mineral- stoffe	+	+	+	+	+	+	+
Vitamine	+	+	+	+	+	+	+
Spuren- elemente	+	+	+	+	+	+	+

2.3.1.3. Beschreibung des Versuchsablaufs

Zur Bestimmung der Diabetes-Inzidenz wurden die Tiere ab der 10. Lebenswoche bis zum Alter von 32 Wochen (Versuchsende) dreimal wöchentlich auf das Vorliegen einer Glukosurie getestet. Blutabnahmen zur Bestimmung der Insulin-Autoantikörper erfolgten im Alter von 10 und 18 Wochen aus der Augenvene (Plexus venorum) und bei Diabetesmanifestation bzw. bei Versuchsende während der Präparation des Tieres aus der Vena cava. Gliadin-Antikörper der Klasse IgA und IgG wurden im Alter von 10 Wochen bestimmt. Bei allen Tieren wurde zum Zeitpunkt der Tötung das Pankreas entnommen und zur späteren histologischen Untersuchung in Bouinscher Lösung (35% Formaldehyd, Krankenhausapotheke München-Schwabing) aufbewahrt.

2.3.2. Untersuchungsparameter

2.3.2.1. Bestimmung der Diabetes-Prävalenz durch Nachweis von Uringlukose

Die Messung der Uringlukose erfolgte mit Hilfe von Teststäbchen (Diabur Test 5000, Roche). Bei positivem Befund (Uringlukose > 5,5 mmol/l) wurde die Diagnose des Diabetes durch die Messung der Blutglukose mit dem Messgerät Glucometer Elite, Bayer, Leverkusen (positiv > 250 mg/dl) bestätigt.

2.3.2.2. Analyse der Inselzell-Autoimmunität

Bestimmung von murinen Insulin-Autoantikörpern

Die Bestimmung der Insulin-Autoantikörper (IAA) basiert auf einem Radioliganden-Bindungs Assay (Williams, 1997; Naserke, 1998), der für die Bestimmung der Autoantikörper in Mäuseseren modifiziert wurde. Alle Testschritte werden auf Eis durchgeführt. Pro Testserum werden in 4 Rundbodenröhrchen jeweils 5 µl des unverdünnten murinen Serums pipettiert. Ein Duplikat wird mit 25 µl / Röhrchen in TBT-Puffer (50 mmol/l Tris, 1% Tween 20, pH 8,0) gelöstem, nicht-radioaktiv markiertem Insulin (H-Insulin 100, Hoechst, Frankfurt, Deutschland) inhibiert, dem zweiten Duplikat wird ausschließlich TBT (25 µl / Röhrchen) zugegeben und somit nicht inhibiert. Anschließend wird allen Röhrchen 22000 cpm ¹²⁵I-markiertes humanes Insulin (Hoechst) in 25 µl TBT zugegeben. Die Ansätze werden für 72 Stunden bei 4°C inkubiert. Am Vorabend der Weiterbearbeitung werden 2 mg

Protein-A-Sepharose pro Probe bei 4 °C in TBT-Puffer vorgequollen, am nächsten Tag mit 4 µl Protein-G-Sepharose (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden) pro Probe gemischt und einmal mit TBT gewaschen. Das Sepharosegemisch (50 µl / Röhrchen) wird zu den Proben gegeben und während einer einstündigen Inkubation bei 4 °C auf einem leicht rotierenden Mixer präzipitieren die Antigen-Antikörperkomplexe. Es folgen vier Waschschriffe mit je 1,8 µl TBT/Röhrchen und fünf Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 2100 rpm. Nach dem vierten Absaugvorgang wird die Radioaktivität der Präzipitate in einem Gammacounter (Cobra II, Canberra Packard) gemessen. Die Messergebnisse werden ausgedrückt als gemessene Radioaktivität in Zerfällen pro Minute (cpm). Die Werte wurden durch folgende Formel berechnet und als µUnits / ml Serum ausgedrückt:

(Arithmetisches Mittel der nicht inhibierten Proben [cpm] - arithmetisches Mittel der inhibierten Proben [cpm]) / Menge der pro Röhrchen eingesetzten Radioaktivität
 [cpm] x 1,159 x 200

Bestimmung von murinen IgG-spezifischen Subklassen-Antikörpern gegen Insulin
 Der von Bonifacio (1999) beschriebene Subklassentest wurde für die Durchführung mit Mäuseseren modifiziert. Es wird ein Testformat verwendet, das analog zu dem beschriebenen Mikroassay für murine Insulinantikörper abläuft. Sepharose-Streptavidin-Beads (10 µl / Röhrchen, Zymed, San Francisco, USA) werden zunächst 3x mit eiskaltem PBS (50 mmol/l Phosphatpuffer, 150 mmol/l NaCl, pH 7,4) gewaschen, und daraufhin mit biotinierten monoklonalen Anti-Maus- Subklassenantikörpern (5 µl / Röhrchen, Biotin-anti-mouse IgG1 [A85-1], IgG2a^b [Igh-1b], IgG2b [R12-3], Pharmingen) über Nacht bei 4°C rotierend in PBS beschichtet. Anschließend werden die beschichteten Sepharose-Beads einmal mit eiskaltem PBS und zweimal mit eiskaltem TBT (50 mmol/l Tris, 1% Tween 20, pH=8) gewaschen. Die mit biotinierten monoklonalen Anti-Maus-Subklassenantikörpern beschichteten Sepharose-Streptavidin-Beads werden anstelle der Protein-A/G-Sepharosemischung zur Präzipitation der Antigen-Antikörperkomplexe verwendet. Zur Bestimmung des Backgrounds wird für jedes

Test-Serum ein humaner Anti-IgE Antikörper verwendet (Pharmingen). Für die Messung der Subklassentiter werden 2,5 µl der Probenseren unverdünnt eingesetzt. Die Formel für die Berechnung der Menge an gebundenem Insulin pro ml Mäuseserum in mU lautet für die Subklassenantikörper:

$$\frac{(\text{Subklassenspezifischer IgG-Messwert (cpm)} - \text{probenspezifischer anti-Mensch-IgE-Messwert (cpm)})}{\text{Menge der pro Röhren eingesetzten Radioaktivität (cpm)}} \times 1,159 \times 400$$

2.3.2.3. Bestimmung von Anti-Gliadin Antikörpern der Klasse IgA und IgG

Murine Antigliadin-Antikörper der Klasse IgA und IgG werden mittels ELISA bestimmt. Hierfür werden mit Gliadin beschichtete Reagenzgefäße (Euroimmun, Groß Grönau) verwendet. Je 100 µl des 1:200 mit PBST (147mM NaCl; 1,5mM KCl; 2,7mM KH₂PO₄; 81mM Na₂HPO₄; pH 7,4; 0,05, % Tween) verdünnten Testserums und 100 µl PBST als Blindwert werden in Duplikation in die Reagenzgefäße pipettiert und bei Raumtemperatur 60 Minuten inkubiert. Die Reagenzgefäße werden anschließend entleert und 3 x mit 200 µl PBST gewaschen. Je 100 µl der monoklonalen Anti-Maus-IgA- [C10-1] bzw. Anti-Maus-IgG1 [A85-1] Antikörpers (Pharmingen) werden in einer Verdünnung von 1/1000 dazugegeben (100 µl/Reagenzgefäß) und für 2h bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach werden die Platten 3x mit PBST gewaschen, dann 100 µl/Reagenzgefäß Streptavidin-HRP-Konjugat (Pharmingen) in einer Verdünnung von 1/1000 hinzugefügt (Pharmingen), eine Stunde inkubiert, gewaschen, und 100 µl Substrat (ABTS, Sigma A-1888) addiert. Nach ca. 8 min wird die Farbreaktion mit 1 N H₂SO₄ (100 µl) gestoppt und die Platte in einem ELISA-reader (MR 600, Microplate Reader, Dynatech) bei E405 gelesen.

2.4. Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet. Unterschiede wurden bei einem p-Wert $<0,05$ als signifikant eingestuft.

Analyse der Immunantwort gegen Tetanus Toxoid

Zum Vergleich der Antikörper-Titer zwischen den Untersuchungsgruppen wurde der Mann Whitney U Test angewandt. Der Vergleich der Antikörper-Titer zu verschiedenen Zeitpunkten (9 Monate vs 2 Jahre) wurde mit Hilfe des gepaarten Wilcoxon Tests durchgeführt. Die Korrelation zwischen Anti-TT IgG Subklassen-Titern und Zytokinen (Elispot-Assay) wurde durch den Spearman`s nicht-parametrischen Korrelations-Koeffizienten bestimmt. Für den Vergleich der Prävalenz der Antikörper-responder zwischen den Gruppen wurde Fishers exact test verwendet. Diese Analysen wurden auch in den Untergruppen mit den Risikogenotypen DR3/4 oder DR 4/4 durchgeführt.

Analyse der Zöliakie-assoziierten Antikörper

Normbereiche für die tTGCA-Assays wurden mittels der 99. Percentile bzw. über den Mittelwert + 3x Standardabweichung berechnet. Die Verteilung der bei den Kontrollkollektiven ermittelten tTGCA-Titer wurde mit dem nicht-parametrischen Test nach Kolmogorov-Smirnov auf Normalverteilung getestet. Zum Vergleich der Antikörper-Titer zwischen den Untersuchungsgruppen wurde der Mann Whitney U Test angewandt, der Vergleich von Häufigkeiten wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests durchgeführt.

Analyse der Primärprävention des autoimmunen Diabetes bei der NOD-Maus

Die Analyse des kumulativen Diabetes-Risikos und der medianen diabetesfreien Überlebenszeit erfolgte durch die Überlebenskurve nach Kaplan-Meier. Konfidenz-Intervalle wurden mit folgender Formel berechnet: Kumulatives Diabetesrisiko \pm (1,96 x Standardfehler). Die Korrelation der IAA-Titer mit dem Alter der Diabetesmanifestation sowie der Gesamt IAA-Antwort mit der IgG Subklassen Antikörperantwort erfolgte durch die lineare Regressionsanalyse.

3. Ergebnisse

3.1. Analyse der Immunantwort gegen Tetanus Toxoid

Durch die Bestimmung der Immunantwort gegen TT sollte untersucht werden, ob bei Kindern mit Inselzell- bzw. Zöliakie-assoziiierter Autoimmunität eine generell veränderte Immunantwort, also auch gegen das Impfantigen TT, zu beobachten ist.

3.1.1. Analyse der humoralen Immunantwort gegen Tetanus Toxoid (TT)

IgG-spezifische Subklassen gegen TT

Die Analyse der humoralen Immunantwort gegen TT erfolgte bei 117 Kindern der BABYDIAB-Studie. Die IgG-spezifische Subklassen-Antwort gegen TT wurde im Alter von 9 Monaten (nach der initialen TT-Impfung) und im Alter von 2 Jahren (nach der TT-Booster-Impfung) bestimmt. Im Alter von 9 Monaten hatten 54% der Kinder positive Anti-TT Antikörpertiter, im Alter von 2 Jahren, also nach der Booster-Impfung, stieg die Prävalenz auf 74%. Im Alter von 9 Monaten war IgG1 die dominante Anti-TT Subklasse, IgG2 und IgG4 Anti-TT wurden nur bei wenigen Kindern und mit niedrigen Titern gemessen. Nach der Booster Impfung zeigten die Kinder im Alter von 2 Jahren ein verändertes Subklassenprofil. Die IgG1 Titer waren nahezu unverändert, die IgG2 Anti-TT Titer stiegen leicht an und die IgG4 Anti-TT Titer stiegen signifikant an ($p < 0,001$; Abb. 2). IgG3 Anti-TT Antikörper wurden weder im Alter von 9 Monaten noch im Alter von 2 Jahren detektiert.

Nach der Booster-Impfung, im Alter von 2 Jahren, korrelierten die IgG2 und IgG4 Anti-TT Titer stark miteinander ($r = 0,78$; $p < 0,0001$; Abb. 3A), wohingegen die IgG1 Anti-TT Titer nur geringfügig mit IgG2 Anti-TT ($r = 0,45$; $p < 0,001$; Abb. 3B) und mit IgG4 Anti-TT ($r = 0,39$; $p < 0,001$; Abb. 3C) korrelierten.

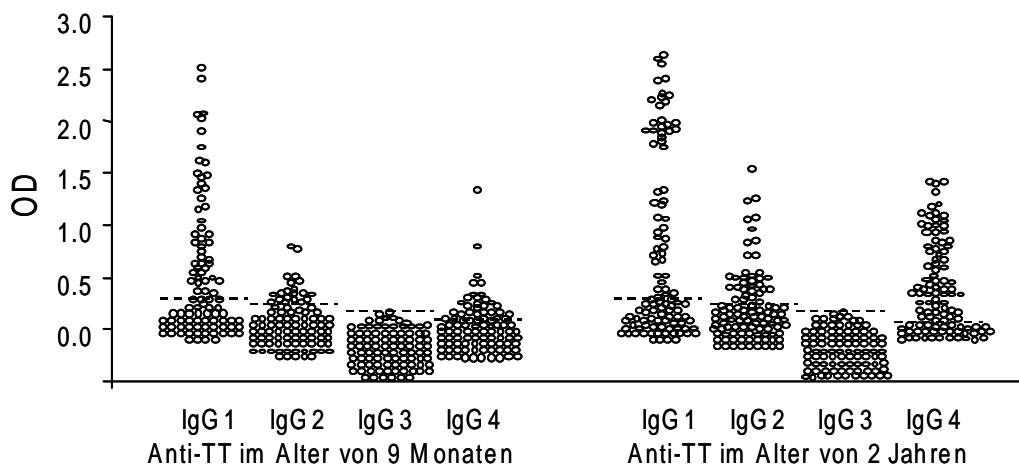


Abb 2: Anti-TT Antikörper Subklassen Titer ausgedrückt als korrigierte optische Dichte bei Kindern der BABYDIAB Studie im Alter von 9 Monaten und 2 Jahren nach der DT(P)-Impfung im Alter von 3, 4, 5, und 18 Monaten.

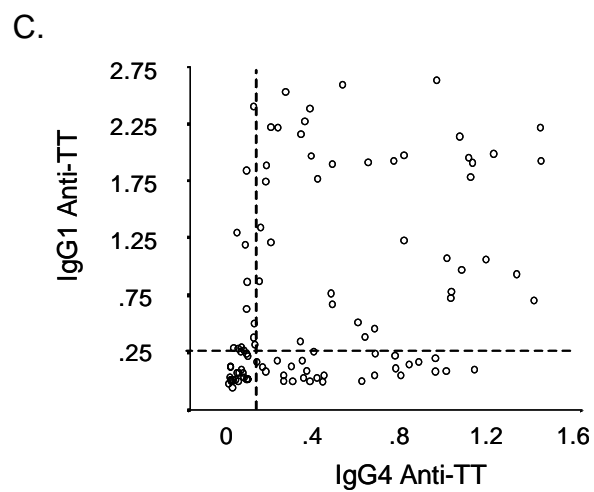
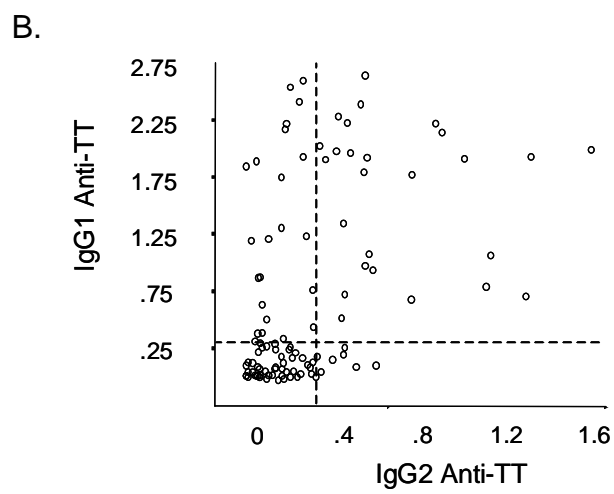
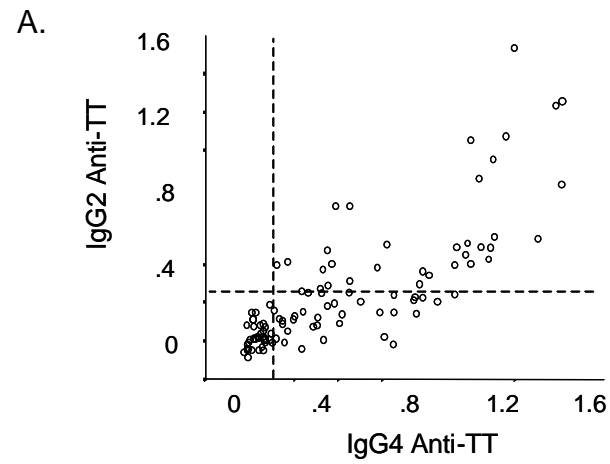


Abb 3: Korrelation zwischen Anti-TT IgG2 und Anti-TT IgG4 (A), Anti-TT IgG1 und Anti-TT IgG2 (B) und Anti-TT IgG1 und Anti-TT IgG4 Titern (cOD) (C) bei Kindern der BABYDIAB Studie im Alter von 2 Jahren. Die gestrichelten Linien zeigen die Grenzwerte für die Antikörper-Subklassen an.

Um den Einfluss des HLA-Klasse II Genotyps auf die Anti-TT Subklassenantwort zu untersuchen, wurden bei Insel-Autoantikörper negativen Kindern mit und ohne Diabetes-Risiko HLA-Genotyp die Anti-TT Subklassentiter bestimmt. Es konnte dabei kein signifikanter Unterschied in der Immunantwort gegen TT bezüglich des HLA-Klasse II Genotyps der Kinder festgestellt werden (Tab. 5).

Tab. 5: Anti-TT Antikörper Subklassen Titer (Median und Bereich) vor (Alter 9 Monate) bzw. nach (Alter 2 Jahre) der TT-Booster-Impfung bei Insel-Autoantikörper negativen Kindern in Abhängigkeit des HLA-Genotyps.

	Anti-TT im Alter von 9 Monaten			Anti-TT im Alter von 2 Jahren		
	Anti-TT IgG1	Anti-TT IgG2	Anti-TT IgG4	Anti-TT IgG1	Anti-TT IgG2	Anti-TT IgG4
<i>Grenzwerte</i>	>0,3	>0,25	>0,1	>0,3	>0,25	>0,1
<i>Diabetes-Risikogenotypen * (n=42)</i>						
Median	0,36	0,17	0,05	0,25	0,14	0,27
Bereich	0-2,40	0-0,50	0-0,51	0-2,63	0-1,26	0-1,42
<i>Andere Genotypen (n=31)</i>						
Median	0,22	0,15	0,04	0,20	0,16	0,33
Bereich	0,01-2,5	0,02-0,77	0-0,79	0-2,59	0-1,54	0-1,31

* Diabetes-Risikogenotypen: HLA DRB1*03 DQB1*0201 / DRB1*04 DQB1*0302 (DR3/4) oder HLA DRB1*04 DQB1*0302 / DRB1*04 DQB1*0302 (DR4/4)

IgG-spezifische Subklassen gegen TT in Abhängigkeit der Inselzell-Autoimmunität

Um die Abhängigkeit der Subklassenantwort gegen TT von der Inselzell-Autoimmunität zu untersuchen, wurden die Anti-TT Titer in drei verschiedenen Gruppen gemessen. Gruppe 1 sind alle Kinder der BABYDIAB-Studie, die bereits im Alter von 9 Monaten und von da an persistierend Insel-Autoantikörper hatten. Gruppe 2 sind alle Kinder der BABYDIAB-Studie, die im Alter von 9 Monaten keine Insel-Autoantikörper hatten, jedoch ab dem Alter von 2 Jahren persistierend Insel-Autoantikörper bildeten. Gruppe 3 sind Kinder, die weder im Alter von 9 Monaten noch im Alter von 2 Jahren Insel-Autoantikörper hatten, und deshalb als Insel-Autoantikörper negative Kinder bezeichnet werden.

Im Alter von 9 Monaten war die Anti-TT Antwort bei den Kindern aller drei Gruppen vorwiegend durch die Subklasse IgG1 dominiert. Es konnte kein Einfluss der Inselzell-Autoimmunität auf die IgG Subklassenantwort gegen TT beobachtet werden (Abb. 4).

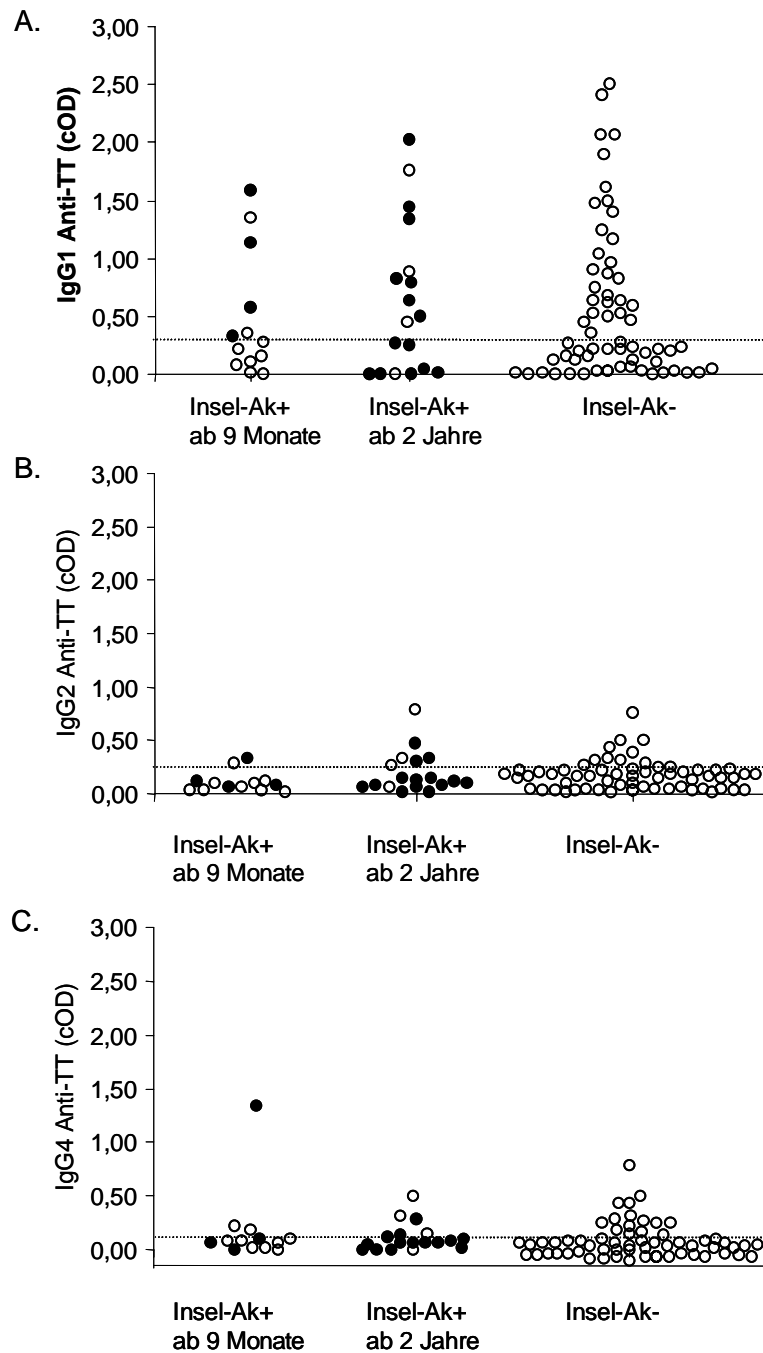


Abb. 4: IgG1, IgG2 und IgG4 Anti-TT Antikörper (cOD) bei Kindern der BABYDIAB Studie im Alter von 9 Monaten (bei 13 Kindern, die erstmals im Alter von 9 Monaten und dann persistierend Insel-Ak+ waren, 18 Kindern, die erst ab dem Alter von 2 Jahren persistierend Insel-Ak+ waren und 63 Kindern, die sowohl im Alter von 9 Monaten als auch 2 Jahren Insel-Ak- waren). Kinder mit mehreren Insel-Ak (Insulin, GAD, oder IA-2) sind durch die gefüllten Kreise dargestellt.

Nach der Booster-Impfung (im Alter von 2 Jahren) zeigten jedoch die Kinder, die schon im Alter von 9 Monaten und von da an persistierend Insel-Autoantikörper hatten, eine signifikant niedrigere Anti-TT Antwort (Abb. 5). Vor allem der Anstieg der IgG4 Anti-TT Titer nach der Booster-Impfung konnte bei diesen Kindern nicht beobachtet werden (Abb. 5C). Der mediane Anti-TT IgG4 Titer (cOD) betrug in der Gruppe der Kinder mit Insel-Autoantikörper im Alter von 9 Monaten 0,07 und war somit signifikant niedriger als in der Gruppe der Kinder, die erst im Alter von 2 Jahren Insel-Autoantikörper hatten (mediane cOD 0,34; $p < 0,01$) und der Gruppe der Insel-Autoantikörper negativen Kinder (mediane cOD 0,31; $p = 0,02$). Des Weiteren wurde in der Gruppe der Kinder mit früher Inselzell-Autoimmunität eine schwächere IgG2 Anti-TT Antwort detektiert ($p < 0,001$ vs. Kinder mit Insel-AutoAk im Alter von 2 Jahren und $p < 0,01$ vs. Insel-AutoAk negative Kinder; Abb. 5B). Auch die IgG1 Anti-TT Titer waren in dieser Gruppe niedrig (Abb. 5A). Insgesamt hatten nur 2 von 11 (18%) Kindern, die ab dem Alter von 9 Monaten Insel-Autoantikörper hatten, eine positive IgG4 und/oder IgG2 Anti-TT Antwort, im Vergleich zu 18 von 22 (82%) der Kinder mit Insel-Autoantikörpern ab dem Alter von 2 Jahren ($p < 0,001$) und 50 von 70 (71%) Insel-Autoantikörper negativen Kindern ($p < 0,01$). Von den vier Kindern, die im Alter von 9 Monaten schon multiple Insel-Autoantikörper hatten, hatte keines IgG2 oder IgG4 Anti-TT Antikörper und nur ein Kind zeigte eine schwache IgG1 Anti-TT Antwort.

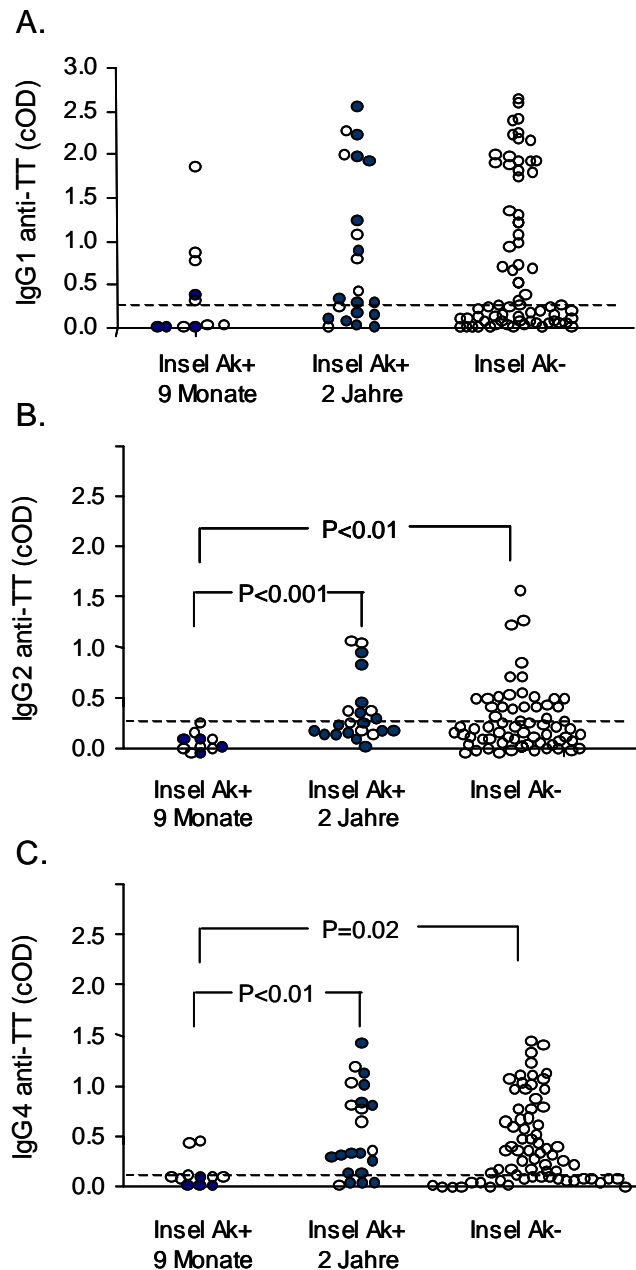


Abb. 5: IgG1, IgG2 und IgG4 Anti-TT Antikörper (cOD) bei Kindern der BABYDIAB Studie im Alter von 2 Jahren (bei 11 Kindern, die erstmals im Alter von 9 Monaten und dann persistierend Insel-Ak+ waren, 22 Kindern, die ab dem Alter von 2 Jahren persistierend Insel-Ak+ waren und 70 Kindern, die sowohl im Alter von 9 Monaten als auch 2 Jahren Insel-Ak- waren). Kinder mit mehreren Insel-Ak (Insulin, GAD, oder IA-2) sind durch die gefüllten Kreise dargestellt.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die beobachtete verminderte Immunantwort gegen TT in der Gruppe der Kinder, die seit dem 9. Lebensmonat persistierende Insel-Autoantikörper haben, durch den HLA-Klasse II Genotyp beeinflusst wird. Dazu wurden die Anti-TT Titer nur von den Kindern der drei Gruppen verglichen, die den Diabetes-assoziierten HLA-Genotyp DR3/4 bzw. DR4/4 tragen. Die in Abb. 6 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass auch dann die Kinder, die schon ab dem 9. Lebensmonat Insel-Autoantikörper haben, im Vergleich zu den Kindern, die erst ab dem 2. Lebensjahr Insel-Autoantikörper oder gar keine Insel-Autoantikörper entwickelten, signifikant verringerte IgG2 ($p < 0,01$; Abb. 6B) und IgG4 ($p < 0,05$; Abb. 6C) Anti-TT Antikörper aufweisen. Die verringerte Anti-TT Immunantwort der Kinder mit sehr früher Inselzell-Autoimmunität ist folglich unabhängig vom HLA-Klasse II Genotyp zu beobachten.

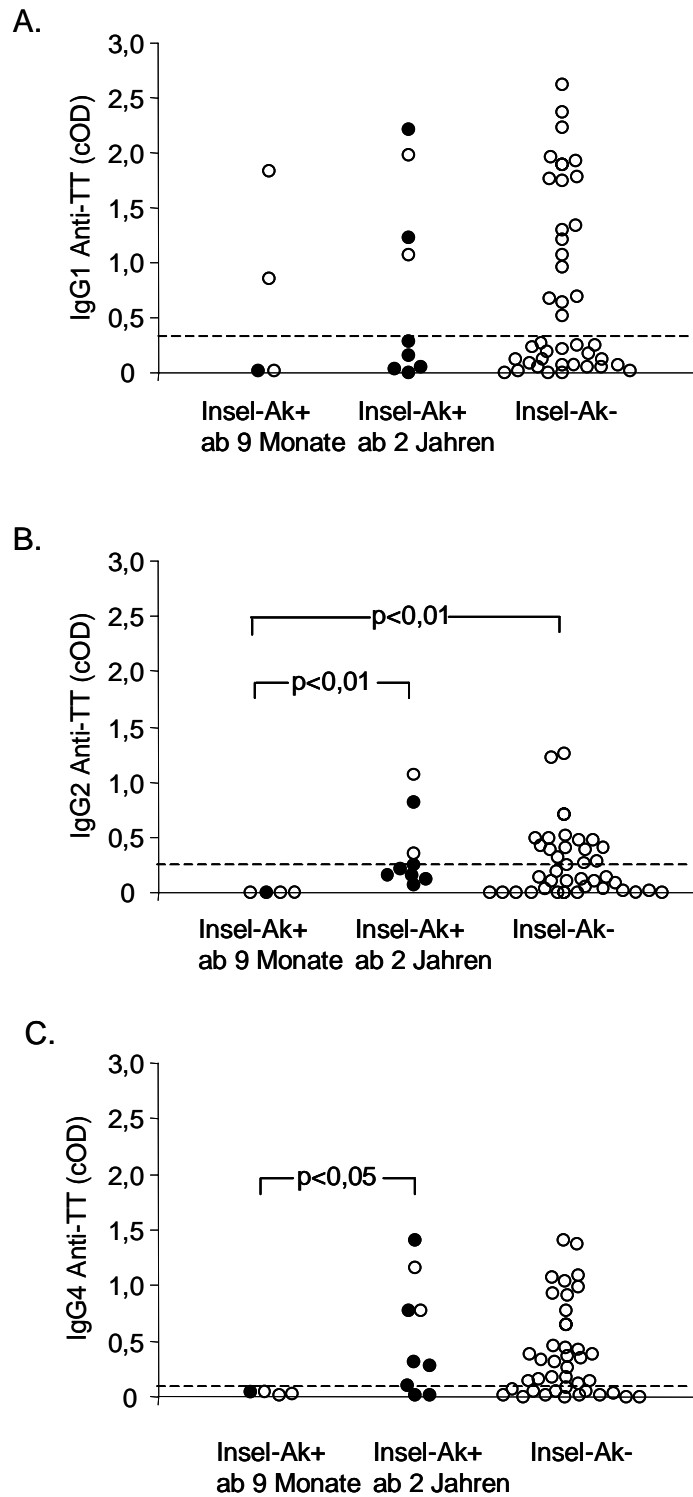


Abb. 6: IgG1, IgG2 und IgG4 Anti-TT Antikörper (cOD) bei Kindern der BABYDIAB Studie mit dem HLA-Genotyp DR3/4 bzw. DR4/4 im Alter von 2 Jahren (bei 4 Kindern, die erstmals im Alter von 9 Monaten und dann persistierend Insel-Ak+ waren, 9 Kindern, die ab dem Alter von 2 Jahren persistierend Insel-Ak+ waren und 40 Kindern, die sowohl im Alter von 9 Monaten als auch 2 Jahren Insel-Ak- waren). Kinder mit mehreren Insel-Ak (Insulin, GAD, oder IA-2) sind durch die gefüllten Kreise dargestellt.

IgG-spezifische Subklassenantwort gegen TT in Abhängigkeit der Zöliakie-assoziierten Autoimmunität

Um die Abhängigkeit der Subklassenantwort gegen TT von der Zöliakie-assoziierten Autoimmunität zu untersuchen, wurden die Anti-TT Subklassentiter bei Kindern der BABYDIAB-Studie gemessen, bei denen das Vorliegen einer Zöliakie bioptisch gesichert war. Alle acht Kinder entwickelten Zöliakie-assoziierte Antikörper erst nach dem 2. Lebensjahr, also nach der TT-Booster-Impfung. Sowohl im Alter von 9 Monaten (vor der TT-Booster-Impfung) als auch im Alter von 2 Jahren (nach der TT-Booster-Impfung) war die Anti-TT Subklassenantwort der Kinder mit Zöliakie mit der Immunantwort der Insel-Autoantikörper negativen Kinder vergleichbar (Tab. 6). Während auch bei Kindern mit Zöliakie die Immunantwort im Alter von 9 Monaten durch Anti-TT IgG1 dominiert war, zeigten die Kinder einen Anstieg der Anti-TT IgG2 und Anti-TT IgG4-Titer nach der TT-Booster-Impfung.

Tab. 6: Anti-TT Antikörper Subklassen-Titer (Median und Bereich) vor (Alter 9 Monate) bzw. nach (Alter 2 Jahre) der TT-Booster-Impfung bei Kindern mit Zöliakie im Vergleich zu Insel-Autoantikörper negativen Kindern.

	Anti-TT im Alter von 9 Monaten			Anti-TT im Alter von 2 Jahren		
	Anti-TT IgG1	Anti-TT IgG2	Anti-TT IgG4	Anti-TT IgG1	Anti-TT IgG2	Anti-TT IgG4
<i>Grenzwert</i>	>0,3	>0,25	>0,1	>0,3	>0,25	>0,1
<i>Kinder mit Zöliakie (n=8)</i>						
Median	0,29	0,07	0	0,4	0,12	0,55
Bereich	0,11-1,21	0,06-0,11	0-0,09	0,16-2,67	0,04-0,65	0-1,1
<i>Kinder ohne Insel-Ak (n=73)</i>						
Median	0,23	0,17	0,04	0,25	0,14	0,31
Bereich	0-2,5	0,01-0,77	0-0,79	0-2,63	0-1,54	0-1,42

3.1.2. Analyse der humoralen und zellulären Immunantwort gegen TT

Durch die vergleichende Analyse der zellulären und humoralen Immunantwort gegen TT sollte untersucht werden, ob die verminderte humorale Anti-TT Immunantwort nach der Booster-Impfung bei Kindern, die schon ab dem 9. Lebensmonat persistierend Insel-Autoantikörper haben, mit einer verminderten Anti-TT IL-4 Antwort korreliert. Dafür wurde sowohl das Zytokinprofil (IL-4, IL-13 und IFN γ) TT-stimulierter Lymphozyten als auch die Anti-TT IgG-Subklassenantwort bei 31 Kindern der BABYDIAB-Studie untersucht.

Anti-TT Zytokinprofil

Die Bestimmung des Zytokinprofils erfolgte mittels der ELISpot-Technik. Dabei zeigten zehn Personen eine relativ hohe IL-4 und IL-13 Antwort gegen TT (9/10 Personen zeigten auch eine IFN γ Antwort), 9 Personen hatten eine ausschließliche IFN γ Antwort und 12 hatten eine geringe oder gar keine IFN γ , IL-4 und IL-13 Antwort gegen TT.

Die IL-4 und IL-13 Antwort der untersuchten Personen korrelierten nur in sehr geringem Maße mit der IFN γ Antwort ($r = 0,55$; $p < 0,01$; Abb. 7A bzw. $r = 0,56$; $p < 0,01$; Abb. 7B). Im Vergleich dazu konnte eine starke Korrelation zwischen IL-4 und IL-13 sezernierenden Zellen beobachtet werden ($r = 0,8$; $p < 0,0001$; Abb. 7C).

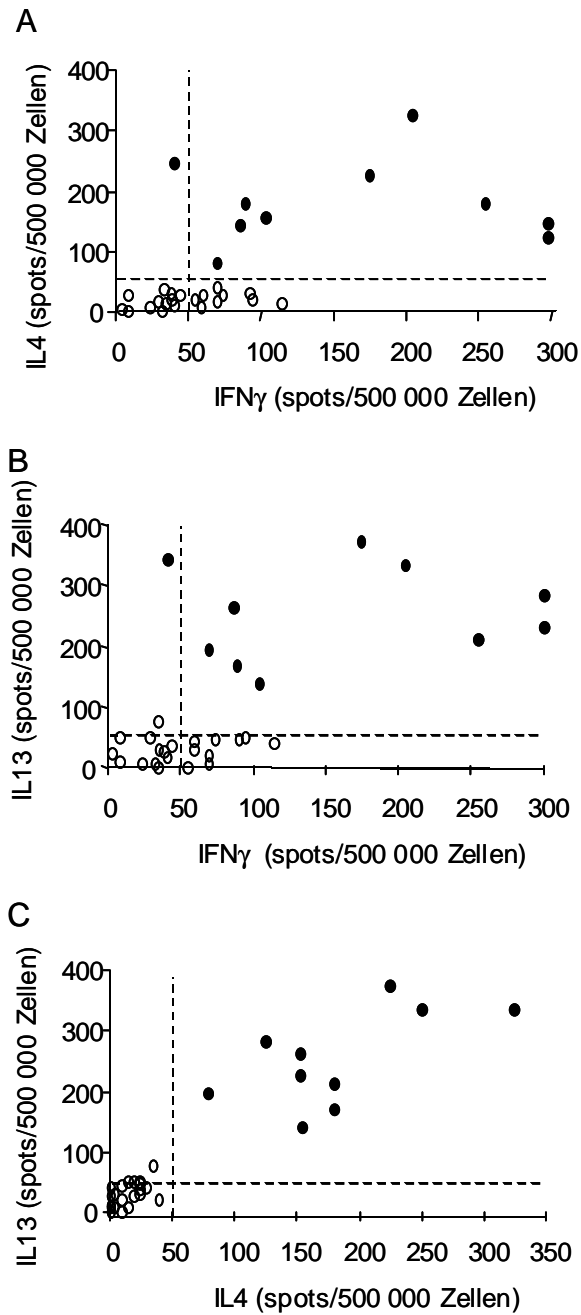


Abb. 7: Korrelation der IFN γ mit der IL-4 (A) und IL-13 Sekretion (B) bzw. der IL-4 und IL-13 Sekretion (C) der PBL nach TT Stimulation. Die gestrichelte Linie (50 spots/500000 Zellen) stellt die Detektionsgrenze des Assays dar. Personen mit einer starken IL-4 und IL-13 Antwort sind durch gefüllte Kreise dargestellt.

Korrelation des Anti-TT IgG-Subklassen- und Zytokinprofils

Die IgG4 Anti-TT Titer korrelierten kaum mit der IFN γ Antwort ($r = 0,1$; Abb. 8A). Im Vergleich dazu korrelierten die IgG4 Anti-TT Titer signifikant mit der IL-4 Antwort ($r = 0,55$; $p < 0,002$; Abb. 8B) und IL-13 Antwort ($r = 0,52$; $p < 0,005$; Abb. 8C) gegen TT. Die IgG2 Anti-TT Titer korrelierten ebenfalls mit IL-4 ($r = 0,61$; $p < 0,001$) und IL-13 ($r = 0,47$; $p < 0,01$) und nicht mit IFN γ ($r = 0,1$). Dahingegen korrelierten die IgG1 Anti-TT Titer nicht mit der Zytokinantwort.

Dem entsprechend waren IgG2 und IgG4 Anti-TT Antikörper-Titer signifikant höher bei Personen mit starker IL-4 und IL-13 Anti-TT Antwort (Abb. 9B und 9C) als bei Personen mit ausschließlicher IFN γ Antwort ($p < 0,05$ und $p < 0,01$) oder Personen mit schwacher oder fehlender Zytokin-Antwort ($p < 0,05$ und $p < 0,02$). Anti-TT Antikörper waren bei allen 10 Personen nachweisbar, die eine starke IL-4 und IL-13 Anti-TT Antwort hatten. Im Vergleich dazu hatten nur 11 von 21 Personen mit schwacher IL-4/IL-13 Anti-TT Antwort detektierbare Anti-TT Antikörper ($p < 0,01$). Bis auf eine Person waren bei allen Personen mit starker IL-4/IL-13 Anti-TT Antwort Anti-TT IgG4 Antikörper nachweisbar, wohingegen nur 10 von 21 Personen mit schwacher IL-4 Anti-TT Antwort IgG4 Anti-TT Antikörper hatten ($p < 0,05$). Anti-TT IgG2 Antikörper konnten nur bei Personen mit starker IL-4/IL-13 Anti-TT Antwort detektiert werden ($p < 0,01$ vs. Personen mit schwacher IL-4/IL-13 Anti-TT Antwort).

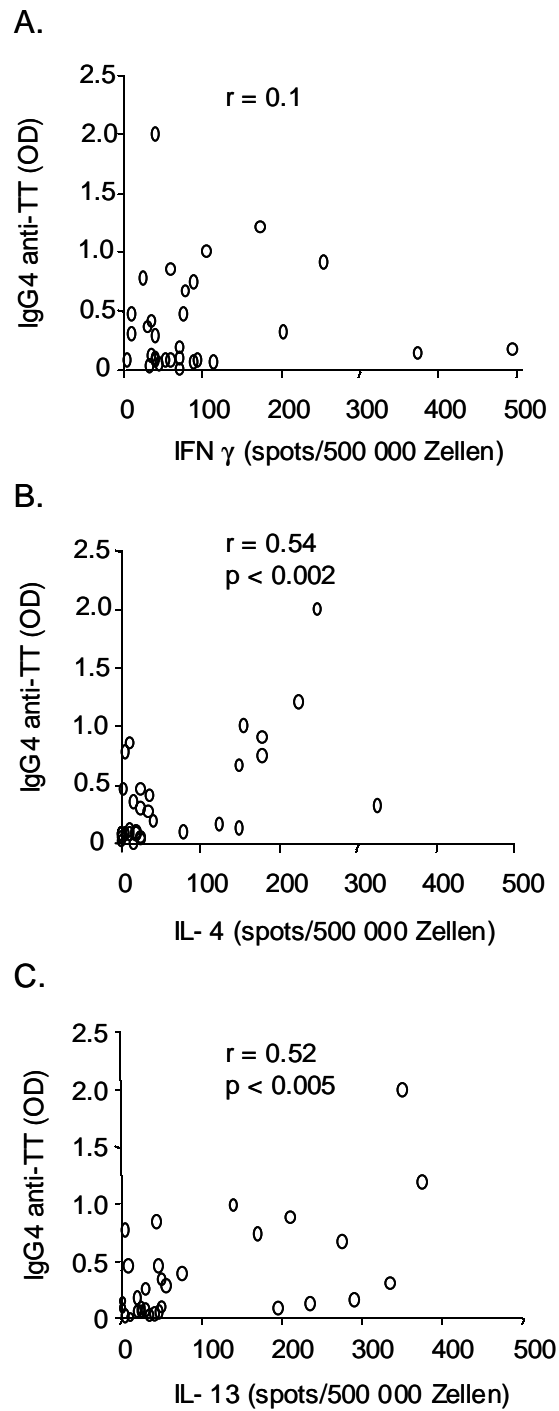
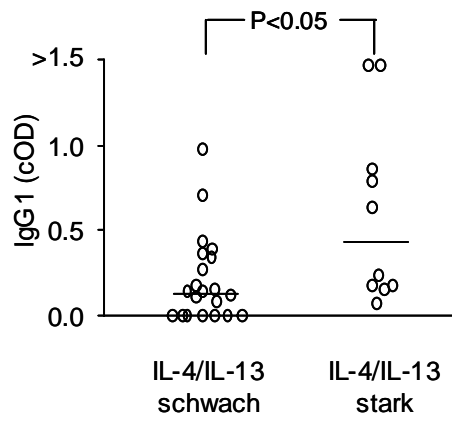
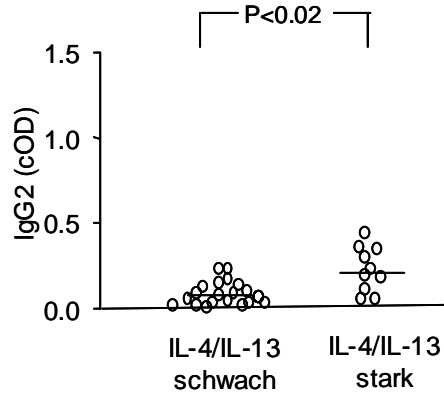


Abb. 8: Korrelation von Anti-TT IgG4 (cOD) mit der IFN γ - (A), IL-4 (B), und IL-13 (C) Antwort von TT-stimulierten PBL. Die Zytokinantwort ist in spots/500000 Zellen angegeben.

A. IgG1 anti-TT



B. IgG2 anti-TT



C. IgG4 anti-TT

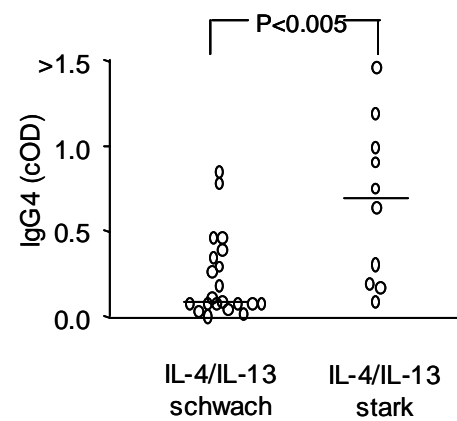


Abb. 9: Anti-TT IgG1 (A), IgG2 (B) und IgG4 (C) (cOD) bei Personen mit starker (n=10) und schwacher (n=21) IL-4 und IL-13 PBL Antwort gegen TT.

Zusammenfassend zeigt die Untersuchung der Immunantwort gegen TT folgende Ergebnisse:

1. Kinder mit persistierenden Insel-Autoantikörpern ab dem 9. Lebensmonat haben eine verringerte humorale Immunantwort gegen TT nach der TT-Booster-Impfung. Vor allem der bei den Kindern, die erst ab dem 2. Lebensjahr Insel-Autoantikörper haben, bzw. bei den Insel-Autoantikörper negativen Kindern beobachtete Anstieg von Anti-TT IgG2 bzw. Anti-TT IgG4 nach der Booster-Impfung konnte bei diesen Kindern nicht beobachtet werden.
2. Es konnte kein Einfluss der Zöliakie-assoziierten Autoimmunität auf die humorale Immunantwort gegen TT beobachtet werden.
3. Die vergleichende Untersuchung der zellulären und humoralen Immunantwort gegen TT zeigte eine starke Korrelation der IL-4 bzw. IL-13, nicht aber der IFN γ Antwort, mit der Anti-TT IgG2 und IgG4-Antwort. Bei Kindern mit starker IL-4 bzw. IL-13 Immunantwort konnte insgesamt eine stärkere Anti-TT IgG1, IgG2 und IgG4 Antwort beobachtet werden.

3.2. Analyse der Zöliakie-assoziierten Antikörper

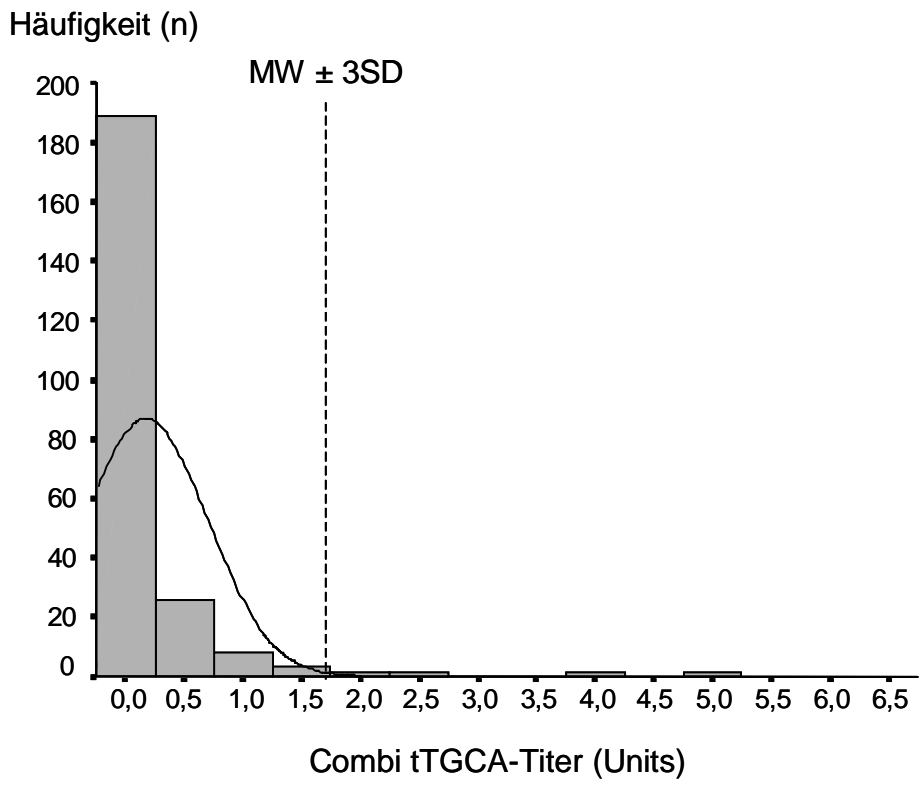
3.2.1. Bestimmung der Normbereiche für die kombinierte und Einzeltestung der tTGCA

Um die Normbereiche für die kombinierte und Einzeltestung von tTGCA-IgA und tTGCA-IgG zu definieren, wurden Seren von Kontrollpersonen kombiniert und einzeln auf tTGCA-IgA und IgG getestet. In Tab. 7 sind Median, Bereich, Mittelwert + 3 SD und die 99. Percentile der dabei ermittelten Werte dargestellt. Die Häufigkeitsverteilungen der durch die Einzel- und kombinierte Messung erzielten Ergebnisse ist in Abb. 10 A-C dargestellt. Die statistische Analyse ergab, dass alle drei Stichproben normalverteilt waren. Der Grenzwert für Positivität wurde für die Einzeltestung von tTGCA-IgA und tTGCA-IgG als 99. Percentile definiert. Bei der kombinierten Testung wurde anstelle der 99. Percentile (3,6 Units) ein niedrigerer Grenzwert definiert (MW + 3SD; 1,7 Units), um dadurch möglichst alle tTGCA-IgA oder IgG positiven Personen zu erfassen.

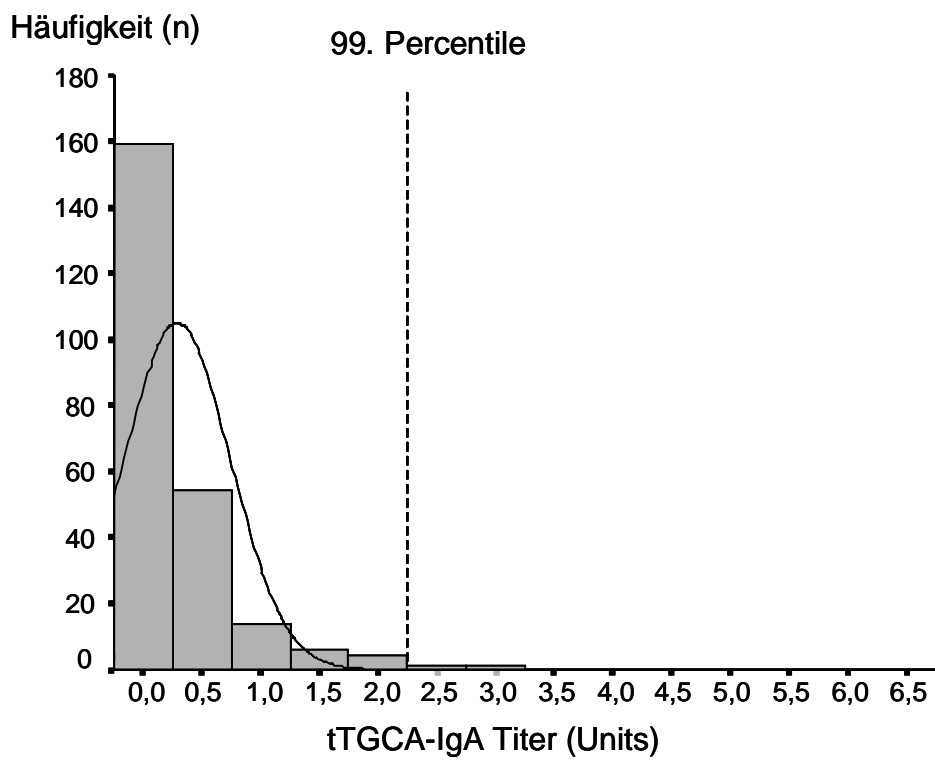
Tab. 7: Median, Bereich, Mittelwert \pm 3 Standardabweichungen (MW + 3SD) und 99. Percentile der getrennt und kombiniert auf tTGCA-IgA und tTGCA-IgG untersuchten Kontroll-Seren.

	Kombinierte Testung (n=230)	Einzeltestung tTGCA-IgA (n=239)	Einzeltestung tTGCA-IgG (n=266)
Median (Units)	0	0,1	0
Bereich (Units)	0-4,9	0-2,9	0-6,6
MW + 3SD (Units)	0,2 + 3x0,5 1,7	0,3 + 3x0,5 1,8	0,4 + 3x0,8 2,8
99. Percentile (Units)	3,6	2,3	3,2

A)



B)



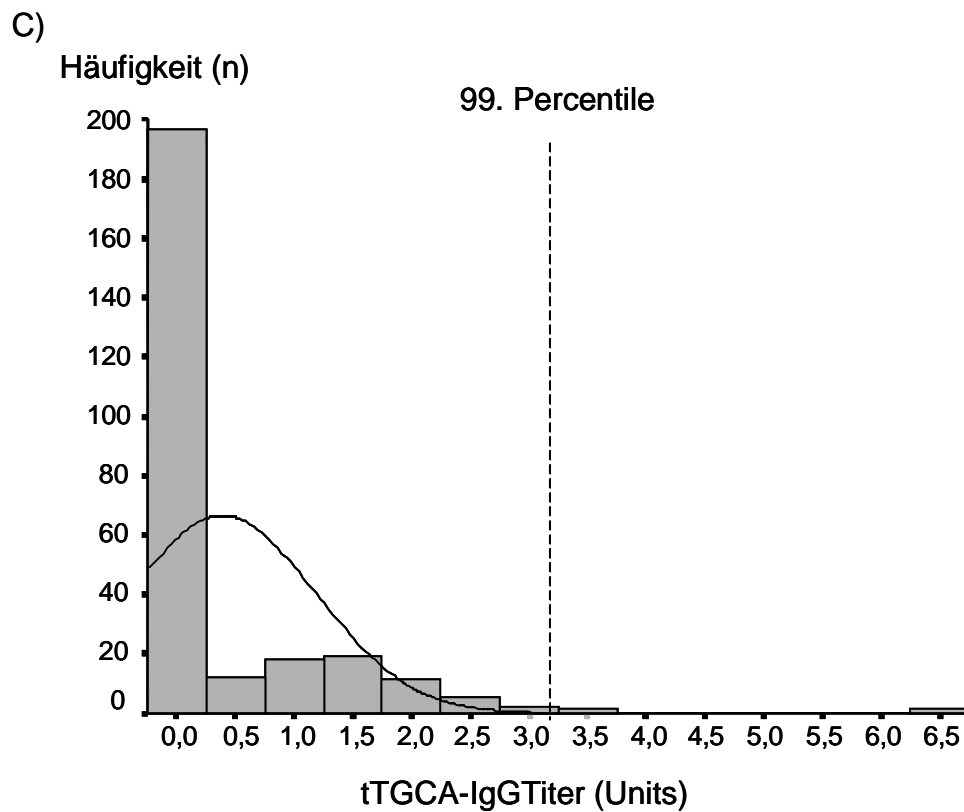


Abb. 10: Häufigkeitsverteilung der kombiniert getesteten tTGCA-IgA/IgG-Titer bei 230 untersuchten Kontrollpersonen (A), der einzeln getesteten tTGCA-IgA Titer bei 239 Kontrollpersonen (B) und der einzeln getesteten tTGCA-IgG Titer bei 266 Kontrollpersonen (C).

Um die Sensitivität des kombinierten Tests zu prüfen, wurde aus jeweils einem Serum, das ausschließlich tTGCA-IgA positiv ist und einem Serum das ausschließlich tTGCA-IgG positiv ist, eine Verdünnungsreihe mit Negativ-Serum erstellt. Diese Verdünnungen wurden sowohl einzeln als auch kombiniert für tTGCA-IgA und tTGCA-IgG getestet (Tab. 8).

Tab 8: tTGCA-Titer der Verdünnungsreihe eines ausschließlich tTGCA-IgA positiven Serums und ausschließlich tTGCA-IgG positiven Serums in der kombinierten und Einzeltestung.

Verdünnung	IgA positives Serum		IgG positives Serum	
	Titer im IgA-Test (positiv >2,3 U)	Titer im Combi-Test (positiv >1,7 U)	Titer im IgG-Test (positiv >3,2 U)	Titer im Combi-Test (positiv >1,7 U)
Unverdünnt	31,2	14,1	150,0	150,0
1:2	11,0	7,6	136,0	72,7
1:4	4,1	3,7	35,4	25,7
1:8	1,7	1,2	14,7	11,4
1:16	0	0,9	6,8	4,5
1:32	0	0,9	2,1	1,4
1:64	0	0,7	0	0,6

Als Qualitätskontrolle wurde in jedem durchgeführten Combi-Test für die IgA-Sensitivität des Combi-Tests die 1:4 Verdünnung des IgA positiven Serums und für die IgG-Sensitivität des Tests die 1:16 Verdünnung des IgG positiven Serums mitgetestet.

3.2.2. Zöliakie-assoziierte Antikörper bei Personen mit Langzeit- Typ 1 Diabetes mit und ohne kardiale autonome Neuropathie (KAN)

Um einen potentiellen Zusammenhang von Zöliakie-assoziiierter Autoimmunität und diabetischer Neuropathie zu untersuchen, wurden bei 141 Patienten mit Langzeit- Typ 1 Diabetes tTGCA-IgA und IgG bestimmt. Alle 141 Patienten waren auf das Vorliegen einer kardialen autonomen Neuropathie, 28/141 Patienten waren auf das Vorliegen einer Gastroparese untersucht.

Prävalenz der tTGC-Antikörper

Die Prävalenz der positiven tTGCA-IgA Titer betrug in der Gruppe der 141 untersuchten Personen mit Langzeit-Typ 1 Diabetes 6,4%. Erhöhte tTGCA- IgA-Titer konnten bei 3/56 (5,4%) Patienten mit und bei 6/85 (7,1%) Patienten ohne kardiale autonome Neuropathie festgestellt werden (Tab. 9). Nur einer der 9 Patienten mit positiven tTGCA-IgA hatte klinische Symptome einer diabetischen Gastroparese und eine verlängerte Magenentleerungszeit.

Die Prävalenz der tTGCA-IgG aller 141 untersuchten Personen betrug 10,6% und war deutlich höher als die tTGCA-IgA Prävalenz des gesamten Kollektivs. Es konnten bei 4/56 (7,1%) Personen mit und bei 11/85 (12,9%) Personen ohne kardiale autonome Neuropathie positive tTGCA-IgG Titer detektiert werden (Tab.9). Positive tTGCA-IgG Titer wurden bei 4/16 (25%) Personen mit verzögerter Magenentleerungszeit im Vergleich zu 2/12 (16,7%) Personen mit normaler Magenentleerungszeit festgestellt.

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der tTGCA-IgA- bzw. tTGCA-IgG-Prävalenz zwischen Personen mit Langzeit-Typ 1 Diabetes und kardialer autonomer Neuropathie bzw. Gastroparese und Personen mit Langzeit-Typ 1 Diabetes ohne kardiale autonome Neuropathie bzw. Gastroparese beobachtet werden.

Tab. 9: Zöliakie-assoziierte Antikörper und Biopsie-Ergebnisse bei 205 Patienten mit Langzeit-Typ 1 Diabetes mit und ohne kardiale autonome Neuropathie und/oder diabetische Gastroparese.

	Kardiale autonome Neuropathie		Gastroparese	
	Positiv (n=56)	Negativ (n=85)	Positiv (n=16)	Negativ (n=12)
tTGCA-IgA positiv	n = 3 5,4%	n = 6 7,1%	n = 1 6,3%	n = 0 0%
tTGCA-IgG positiv	n = 4 7,1%	n = 11 12,9%	n = 4 25,0%	n = 2 16,7%
EMA positiv	n = 2 3,6%	n = 3 3,5%	n = 1 6,3%	n = 0 0%
Biopsie positiv (n)	1/1	1/1	-	-

Gemeinsames Auftreten von tTGCA-IgA und tTGCA-IgG

Acht von neun tTGCA-IgA positiven Patienten hatten auch positive tTGCA-IgG Titer. Im Vergleich dazu waren 7/15 tTGCA-IgG positive Patienten tTGCA-IgA negativ. Um zu überprüfen, ob bei den Personen mit ausschließlich tTGCA-IgG positiven Titern ein mit der Erkrankung der Zöliakie assoziierter IgA-Mangel vorliegt, wurde bei diesen 7 Personen der IgA-Titer im Serum bestimmt. Keiner der ausschließlich tTGCA-IgG positiven Patienten hatte einen IgA-Mangel.

Prävalenz der Endomysium-Antikörper der Klasse IgA und Biopsieergebnisse

Endomysium-Antikörper, die bei allen Personen mit positiven tTGCA-IgA oder positiven tTGCA-IgG bestimmt wurden, konnten bei fünf Personen detektiert werden.

Bei einem Patienten mit kardialer autonomer Neuropathie und positiven tTGCA-IgA und EMA wurde eine Dünndarmbiopsie durchgeführt und die Diagnose einer Zöliakie gestellt. Dieser Patient ernährte sich nach Diagnosestellung glutenfrei und wurde drei Jahre später erneut auf das Vorliegen einer kardialen autonomen

Neuropathie und tTGCA-IgA bzw. IgG untersucht. Die tTGCA Titer waren deutlich gefallen aber es war keine Verbesserung bezüglich der kardialen autonomen Neuropathie eingetreten. Des weiteren wurde eine Patientin mit persistierenden positiven tTGCA-IgA und EMA ohne kardiale autonome Neuropathie biopsiert und die Diagnose einer Zöliakie gestellt.

3.2.3. Zöliakie-assoziierte Antikörper bei erstgradigen Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes

Ziel dieser Untersuchung war herauszufinden, ob die bei Klein-Kindern von Vätern oder Müttern mit Typ 1 Diabetes beobachtete höhere Prävalenz der Zöliakie-assoziierten Antikörper generell bei Verwandten ersten Grades, also unabhängig vom verwandtschaftlichen Verhältnis und vom Alter, beobachtbar ist. Ein weiteres Ziel der tTGCA-Bestimmung bei Personen der Münchner Familienstudie war zu untersuchen, ob Personen mit Insel-Autoantikörpern eine höhere Prävalenz der tTGCA aufweisen als Personen ohne Insel-Autoantikörper.

Prävalenz von tTGCA-IgA, tTGCA-IgG und IgA-Mangel

Die Prävalenz von tTGCA-IgA $>2,3$ Units betrug bei 1005 untersuchten erstgradigen Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes 2,3%, die Prävalenz der tTGCA-IgG $>3,1$ Units betrug bei 1013 untersuchten Personen 7,8%.

Acht von 23 Personen hatten positive tTGCA-IgA Titer in Abwesenheit von tTGCA-IgG. Dabei hatten sieben Personen tTGCA-IgA Titer $< 6,0$ Units, eine Person hatte einen tTGCA-IgA Titer von 40,3 Units. Alle acht Personen hatten keine Endomysium-Antikörper (Tab. 10).

Positive tTGCA-IgG wurden bei 64/79 Personen in Abwesenheit von tTGCA-IgA detektiert. 46 Personen hatten dabei tTGCA-IgG Titer $<10,0$ Units, 18 Personen hatten tTGCA-IgG Titer $\geq 10,0$ Units. Alle 18 Personen mit tTGCA-IgG ≥ 10 Units und negativen tTGCA-IgA Titern wurden auf das Vorliegen eines IgA-Mangels untersucht. Bei zwei Personen wurde ein IgA-Mangel diagnostiziert.

Prävalenz der tTGCA-IgA bei der Nachuntersuchung

Von 13 der 23 Personen mit positiven tTGCA-IgA Titern wurden die tTGCA-Antikörper in einer zweiten Blutprobe nachuntersucht (Tab. 10). Von den 13 nachuntersuchten Personen hatten 7 Personen bei der Erstuntersuchung tTGCA-IgA Titer <5,0 Units und 6 Personen tTGCA-IgA Titer >5,0 Units. Bei 5/6 Personen mit tTGCA-IgA Titern >5,0 Units konnten die positiven tTGCA-IgA Titer bestätigt werden. Im Vergleich dazu hatte nur eine Person mit einem tTGCA-Titer <5,0 Units persistierende Antikörper, bei 6/7 Personen mit tTGCA-Titern <5,0 Units waren zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung keine tTGCA detektierbar.

Prävalenz der Endomysium-Antikörper der Klasse IgA

Endomysium-Antikörper wurden bei allen Personen mit positiven tTGCA-IgA untersucht. 5/23 Personen mit positiven tTGCA-IgA waren auch EMA-positiv. In Tab. 10 sind die positiven tTGCA-IgA Titer den tTGCA-IgG Titern und EMA-Ergebnissen gegenübergestellt. Dies macht deutlich, dass EMA vorwiegend bei Personen mit hohen tTGCA-IgA Titern detektiert werden können.

Tab. 10: Verwandtschaftsverhältnis zur Person mit Typ 1 Diabetes, Alter, Insel-Autoantikörper-Status bzw. Progression zum Typ 1 Diabetes, tTGCA-Titer und EMA-Ergebnisse sowie Ergebnis der Nachuntersuchung von tTGCA-IgA bei Personen mit positiven tTGCA-IgA Titern.

Grenze für Positivität: tTGCA-IgA \geq 2,4 Units; tTGCA-IgG \geq 3,2 Units

	Verwandtschaft ¹	Alter (Jahre)	Insel-Ak ² DM	tTGCA-IgA Titer (Units)	tTGCA-IgG Titer (Units)	EMA	Nachuntersuchung tTGCA-IgA
1	Geschwister	20,1	-	2,7	2,3	-	
2	Eltern	41,5	-	2,7	7,4	-	
3	Eltern	87,8	-	2,9	10,0	-	
4	Eltern	51,6	-	3,2	5,8	-	-
5	Geschwister	1,9	IAA, ICA, DM	3,2	3,0	-	
6	Geschwister	8,7	-	3,4	0	-	+
7	Kind	8,8	-	3,4	15,5	-	-
8	Geschwister	17,9	-	3,7	15,7	-	-
9	Kind	23,7	IAA,GADA,IA2A, DM	3,8	18,9	-	-
10	Eltern	53,7	-	3,9	12,3	-	-
11	Geschwister	8,5	-	4,1	3,2	-	
12	Geschwister	10,4	-	4,1	0	-	
13	Geschwister	21,0	-	4,2	11,1	-	-
14	Geschwister	13,8	-	4,5	1,7	-	
15	Geschwister	1,3	-	5,3	0	-	-
16	Geschwister	22,1	-	5,7	0	-	+
17	Eltern	57,9	-	9,7	23,9	+	+
18	Geschwister	8,9	-	12,0	5,1	-	+
19	Geschwister	10,3	-	40,3	2,6	-	
20	Geschwister	12,9	-	93,9	10,1	+	+
21	Kind	6,6	-	123,4	11,1	+	
22	Geschwister	35,0	-	139,9	100,7	+	+
23	Kind	3,7	IAA,GADA,IA2A	150,0	150,0	+	

1 Verwandtschaftliches Verhältnis zur Person mit Typ 1 Diabetes

2 ICA wird nur angezeigt, wenn GADA oder IA2A nicht detektiert wurden. Bei beiden Personen mit Progression zum Typ 1 Diabetes fand die tTGCA-Messung zum Zeitpunkt der Manifestation statt.

Prävalenz der tTGCA in Abhängigkeit des Alters und des Verwandtschaftsverhältnisses

Die tTGCA-IgA bzw. IgG Prävalenz in Abhängigkeit des Alters der untersuchten Personen ist in Abb. 11A dargestellt. Die Häufigkeit von positiven tTGCA-IgA und tTGCA-IgG war hinsichtlich des Alters der untersuchten Personen nicht signifikant unterschiedlich. Im Alter bis zu 15 Jahre konnten bei 12/339 (3,5%) Personen tTGCA-IgA und bei 23/345 (6,7%) Personen tTGCA-IgG detektiert werden. Im Vergleich dazu wurden bei Personen älter als 15 Jahre positive tTGCA-IgA bei 11/642 (1,7%) und positive tTGCA-IgG bei 51/644 Personen (7,9%) gemessen.

Die Häufigkeit der positiven tTGCA war hinsichtlich des Verwandtschaftsverhältnisses der untersuchten Personen zur Person mit Typ 1 Diabetes nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 11B). Von den 622 untersuchten Geschwistern waren 14 (2,2%) tTGCA-IgA und 46 (7,4%) tTGCA-IgG positiv. Die Anzahl der Kinder von Eltern mit Typ 1 Diabetes mit positiven tTGCA-IgA betrug 4/115 (3,2%) und mit positiven tTGCA-IgG 10/123 (7,9%). Von den 268 untersuchten Eltern von Kindern mit Typ 1 Diabetes hatten 5 (1,9%) positive tTGCA-IgA und 23 (8,6%) positive tTGCA-IgG.

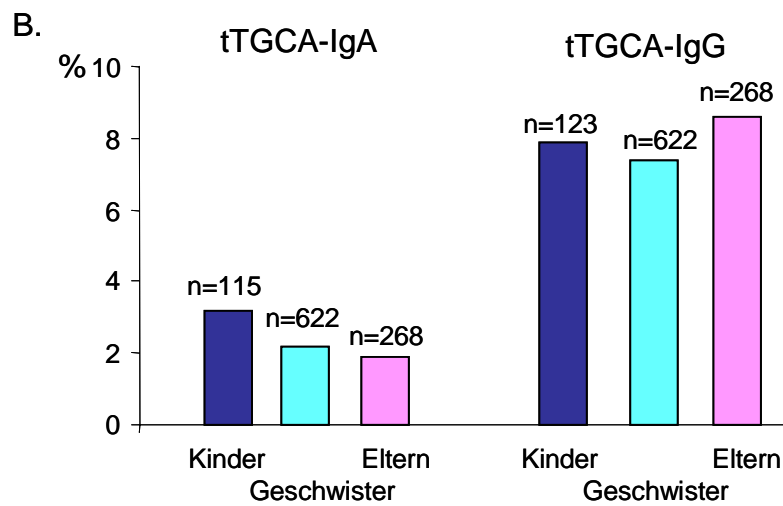
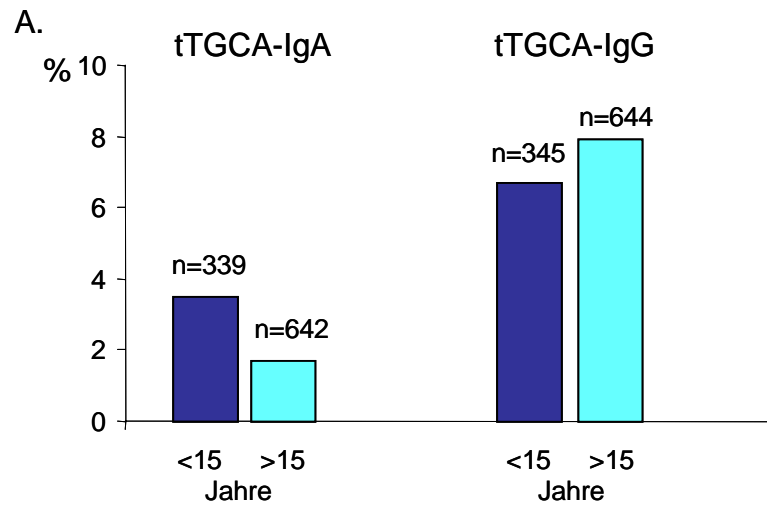


Abb. 11: Häufigkeit der positiven tTGCA-IgA bzw. tTGCA-IgG (in %) bei erstgradigen Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes in Abhängigkeit des Alters (A) und in Abhängigkeit des verwandtschaftlichen Verhältnisses zur Person mit Typ 1 Diabetes (B).

Prävalenz der tTGCA-IgA und tTGCA-IgG in Abhängigkeit der Inselzell-Autoimmunität

Von den 1013 untersuchten Personen hatten insgesamt 94 (9,3%) persistierende Insel-Autoantikörper. Davon hatten 28 Personen einen, 35 Personen zwei und 31 Personen drei persistierende Insel-Autoantikörper. Von den 94 Insel-Autoantikörper positiven Personen entwickelten 34 Personen im Verlauf der Nachuntersuchungen einen Typ 1 Diabetes. Der Vergleich der tTGCA-Antikörpertiter zwischen erstgradigen Verwandten mit Diabetes-assoziierten Antikörpern und erstgradigen Verwandten ohne Diabetes-assoziierte Antikörper zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Prävalenz von tTGCA-IgA bzw. tTGCA-IgG (Tab. 11).

Auch bezüglich der Titerhöhe von tTGCA-IgA bzw. tTGCA-IgG konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Personen mit und Personen ohne Insel-Autoantikörper festgestellt werden (Abb. 12 und Abb. 13). Der Median der tTGCA-IgA Titer betrug in der Gruppe der Insel-Autoantikörper negativen Personen 0 Units (Range: 0-139,9 Units) und in der Gruppe der Insel-Autoantikörper positiven Personen 0,2 Units (Range: 0-150,0 Units). Der Median der tTGCA-IgG Titer betrug sowohl bei den Insel-Autoantikörper negativen Personen (Range: 0,1-100,7 Units) als auch bei den Insel-Autoantikörper positiven Personen (Range: 0,1-150,0 Units) 0,1 Units.

Tab. 11: Positive tTGCA-IgA und tTGCA-IgG Titer des Gesamtkollektivs und der Teilkollektive aufgeteilt in Personen mit bzw. ohne persistierende positive Insel-Autoantikörper

	Positive tTGCA-IgA Titer	Positive tTGCA-IgG Titer
Gesamtkollektiv	23/1005 (2,3%)	79/1013 (7,8%)
Insel-Autoantikörper negative Personen	20/913 (2,2%)	73/919 (7,9%)
Insel-Autoantikörper positive Personen	3/92 (3,2%)	6/94 (6,4%)

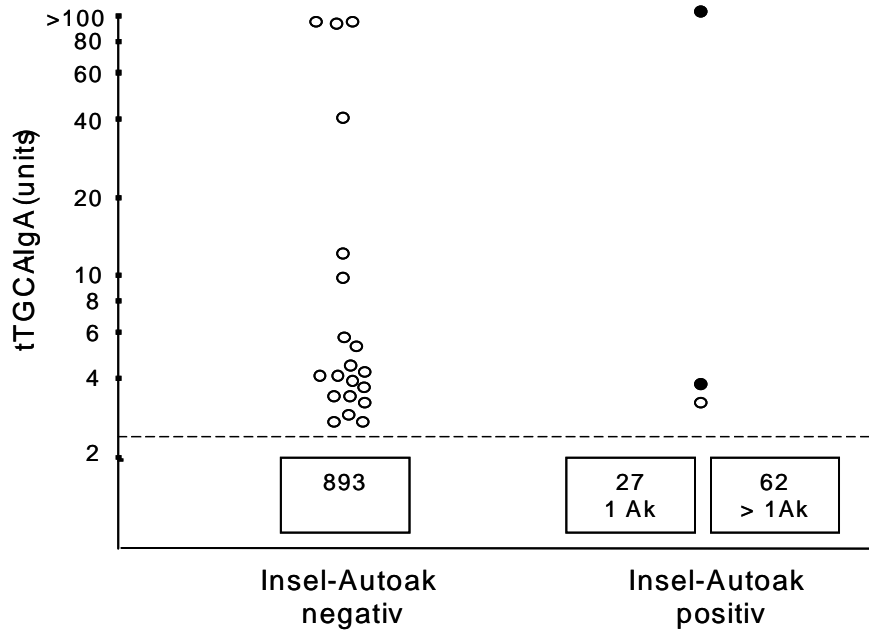


Abb. 12: Positive tTGCA-IgA Titer bei 20 von 913 Insel-Autoantikörper negativen Personen und 3 von 92 Personen mit Insel-Autoantikörpern. Personen mit multiplen Insel-Autoantikörpern sind durch die ausgefüllten Kreise dargestellt.

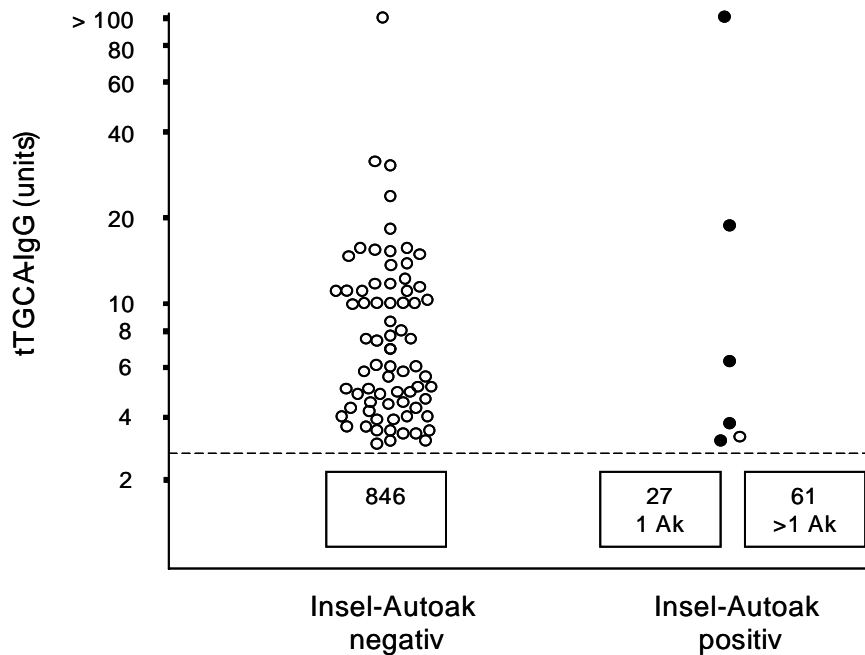


Abb. 13: Positive tTGCA-IgG Titer bei 73 von 919 Insel-Autoantikörper negativen Personen und 6 von 94 Personen mit Insel-Autoantikörpern. Personen mit multiplen Insel-Autoantikörpern sind durch die ausgefüllten Kreise dargestellt.

Verteilung der tTGCA-Antikörper in Abhängigkeit von Art und Anzahl der Insel-Autoantikörper

Es konnte bei den untersuchten Personen kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von positiven tTGCA und der Art oder Anzahl von Insel-Autoantikörpern festgestellt werden (Tab. 12).

Tab. 12: Verteilung der Diabetes-assoziierten und Zöliakie-assoziierten Autoimmunität bei 1016 erstgradigen Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes (darunter 34 Personen mit Progression zum Typ 1 Diabetes)

Insel-Autoak	Positive tTGCA-IgA Titer	Positive tTGCA-IgG Titer
Keine	23/1005 (2,3%)	79/1013 (7,8%)
Einen Insel-Autoak	1/28 (3,6%)	1/28 (3,6%)
IAA	1/3	0/3
IA-2A	0/2	0/2
GADA	0/23	1/23
Zwei Insel-Autoak	0/34 (0%)	2/35 (5,7%)
IAA, GADA	0/24	1/24
IAA, IA-2A	0/2	0/2
IA-2A, GADA	0/8	1/9
Drei Insel-Autoak	2/30 (6,7%)	3/31 (9,7%)
IAA, GADA, IA-2A		

Verteilung der tTGCA-Antikörper in Abhängigkeit der Diabetesmanifestation

Von den Personen mit Diabetes-assoziierten Antikörpern und Progression zum Typ 1 Diabetes waren 2/33 (6,1%) tTGCA-IgA positiv im Vergleich zu 1/59 (1,7%) Insel-Autoantikörper positiven Personen ohne Typ 1 Diabetes und 23/1005 (2,3%) Insel-Autoantikörper negativen Personen. tTGCA-IgG positiv waren 4/34 (11,8%) Personen mit Progression zum Typ 1 Diabetes im Vergleich zu 2/60 (3,3%) Insel-Autoantikörper positiven Personen ohne Typ 1 Diabetes und 79/1013 (7,8%) Insel-Autoantikörper negativen Personen. Die positiven tTGCA-Titer wurden hierbei

jeweils in der Blutprobe zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation bzw. kurze Zeit nach Diabetesmanifestation gemessen.

Zusammenfassend zeigt die Untersuchung der Zöliakie-assoziierten Antikörper bei erstgradigen Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes folgende Ergebnisse:

1. Bei Betrachtung des Gesamt-Kollektivs konnte eine tTGCA-IgA Prävalenz von 2,3% und eine tTGCA-IgG Prävalenz von 7,8% beobachtet werden.
2. Es konnte kein signifikanter Einfluss des Alters oder des verwandtschaftlichen Verhältnisses auf die tTGCA-Prävalenz beobachtet werden.
3. Die Ergebnisse zeigen keine erhöhte tTGCA-IgA bzw. IgG Prävalenz bei Personen mit Insel-Autoantikörpern im Vergleich zu Personen ohne Insel-Autoantikörpern. Die tTGCA-Prävalenz war nicht abhängig von Art oder Anzahl der Insel-Autoantikörper. Insel-Autoantikörper positive Personen mit Progression zum Typ 1 Diabetes hatten zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation tendenziell häufiger positive tTGCA-IgA bzw. tTGCA-IgG Titer.

3.3. Primärprävention des autoimmunen Diabetes bei der NOD-Maus

In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob das in der Nahrung enthaltene Gluten mit einem erhöhten Risiko der NOD-Mäuse verbunden ist, einen Autoimmundiabetes bzw. Diabetes-assoziierte Antikörper zu entwickeln. Vergleichend zu der glutenfreien Ernährung wurde der präventive Einfluss zweier weiterer Nahrungsfaktoren, nämlich einer Fischöl- bzw. Vitamin D3 Supplementierung, auf die Entwicklung des Autoimmundiabetes bei der NOD-Maus untersucht.

3.3.1. Analyse der Nährstoff- und Vitamin-Zufuhr

Durch die Analyse der Nährstoff- und Vitamin-Zufuhr der acht Behandlungsgruppen sollte der Einfluss der unterschiedlichen Nährstoffzusammensetzungen der Versuchsnahrungen auf die tägliche Nährstoff-Aufnahme untersucht werden. Dabei sollte insbesondere die Zufuhr der potentiell präventiv wirksamen Nahrungsbestandteile, Fischöl und Vitamin D3, ermittelt werden. Die durchschnittliche tägliche Aufnahme von Nährstoffen und Vitaminen der NOD-Mäuse wurde aus dem Nahrungsverbrauch pro Käfig und der Zahl der Tiere pro Käfig ermittelt (Tab. 13). Die tägliche Energie- und Fettzufuhr war in der Fischöl- und Kombi-(Fischöl+Glutenfrei+Vitamin D)-Gruppe bzw. in der mit Sojaöl supplementiertem Futter ernährten Fischöl-Kontrollgruppe höher als in den anderen Gruppen. Bei der Glutenfrei-Gruppe bzw. Glutenfrei-Kontrollgruppe konnte im Vergleich zu den anderen Gruppen eine höhere Kohlenhydratzufuhr und gleichzeitig geringere Eiweißzufuhr beobachtet werden. Die tägliche Vitamin D3-Zufuhr betrug in der Vitamin D-Gruppe und der Kombi-Gruppe 6,9 bzw. 7,3 I.E. im Vergleich zu 2,0 I.E. in der Kontroll-Gruppe. Die tägliche Aufnahme von n-3 Fettsäuren betrug in der Fischöl- und in der Kombi-Gruppe 126,8 mg bzw. 110,9 mg im Vergleich zu 32,3 mg in der Fischöl-Kontrollgruppe und 6,9 in der mit Standardnahrung gefütterten Kontroll-Gruppe.

Tab. 13: Durchschnittliche tägliche Energie-, Nährstoff- und Vitamin D3 Aufnahme der NOD-Mäuse in Abhängigkeit der zugeführten Nahrung.

	Gluten- frei	Gluten- frei Kontr	Fischöl	Fischöl- Kontrolle	VitD	VitD Kontr.	Kombi	Kontrolle
Täglicher Verzehr (g)	3,18	2,88	4,14	3,35	3,43	3,22	3,64	3,32
Energie (kcal/kg)	10,0	8,4	12,7	10,4	8,5	8,0	11,1	8,2
Eiweiß (mg)	594,4	518,9	720,7	581,7	636,8	597,9	678,2	616,5
Kohlen- hydrate (mg)	1625,3	1415,2	1309,7	1057,6	1273,2	1195,5	978,9	1232,6
Fett (mg)								
Gesamt	123,8	111,2	561,4	463,9	131,1	123,1	503,3	126,9
C 18:2	34,9	50,9	54,1	228,8	45,9	43,1	43,2	44,4
C 18:3	4,8	7,0	9,4	31,5	6,3	5,9	7,7	6,1
C 20:4	1,7	1,6	7,6	1,8	1,9	1,8	6,7	1,8
C 20:5	0,8	0,7	86,3	0,8	0,8	0,8	75,9	0,8
C 22:6	-	-	31,1	-	-	-	27,3	-
n-3:n-6	1:6,5	1:7	2:1	1:7	1:7	1:7	2:1	1:7
Vitamin D3 (I.E.)	1,9	1,7	2,5	2,0	6,9	1,9	7,3	2,0

3.3.2. Analyse des Einflusses der Nahrungsmodulation auf die Diabetes-Entwicklung

Glutenfreie Ernährung

Durch die Ernährung der Zuchttiere während der Schwangerschaft und Stillzeit mit der Kombination von glutenfreiem Futter mit Fischöl- und Vitamin D3 Supplementierung und die glutenfreie Ernährung der Nachkommen konnte eine signifikante Verringerung des kumulativen Diabetes-Risikos erzielt werden. So betrug das kumulative Diabetes-Risiko in der Glutenfrei-Gruppe bis zum beobachteten Alter von 32 Wochen 45,5% (Konfidenz-Intervall: 16,1-74,9) im Vergleich zu 85,7% (Konfidenz-Intervall: 44,4-98,4; $p < 0,05$; Abb. 14, Tab. 14) bei den mit der Standardnahrung gefütterten Kontroll-Tieren (Kontrolle). Ein glutenfrei ernährtes Tier verstarb im Alter von 18 Wochen während der Blutabnahme. Des Weiteren konnte durch diese Behandlung die diabetesfreie Überlebenszeit bei den glutenfrei ernährten Tieren (Median: 31,7 Wochen) im Vergleich zu den mit Standardnahrung gefütterten Tieren (Kontrolle; Median: 20,7 Wochen, $p < 0,05$) erhöht werden (Tab. 14). Der Beobachtungszeitraum betrug dabei ebenfalls 32 Wochen.

Die Tiere der Glutenfrei-Kontroll Gruppe, deren Muttertiere zwar während der Schwangerschaft und Stillzeit mit dem kombinierten Futter ernährt wurden, die Nachkommen selber jedoch ein glutenhaltiges Kontroll-Futter erhielten, zeigten im Vergleich zur Kontrolle kein signifikant verringertes kumulatives Diabetes-Risiko (kumulatives Diabetes-Risiko von 66,7%, Konfidenz-Intervall: 40,0-93,4; Abb. 14, Tab. 14). Die mediane diabetesfreie Überlebenszeit betrug in dieser Gruppe 29,3 Wochen.

In der Gruppe der Tiere, die während des gesamten Beobachtungszeitraumes zusätzlich zur glutenfreien Nahrung auch höhere Mengen an Fischöl und Vitamin D3 erhielten (Kombi-Gruppe), betrug das kumulative Diabetes-Risiko 71,4% (Konfidenz-Intervall: 44,4-98,4; diabetesfreie Überlebenszeit: 21,6 Wochen, Abb. 14, Tab. 14). Durch diese Behandlung konnte im Vergleich zu den mit Standardnahrung gefütterten Tieren der Kontrollgruppe keine signifikante Verringerung des kumulativen Diabetes-Risikos und keine signifikante Verlängerung der diabetesfreien Überlebenszeit erreicht werden.

Tiere ohne Diabetes (%)

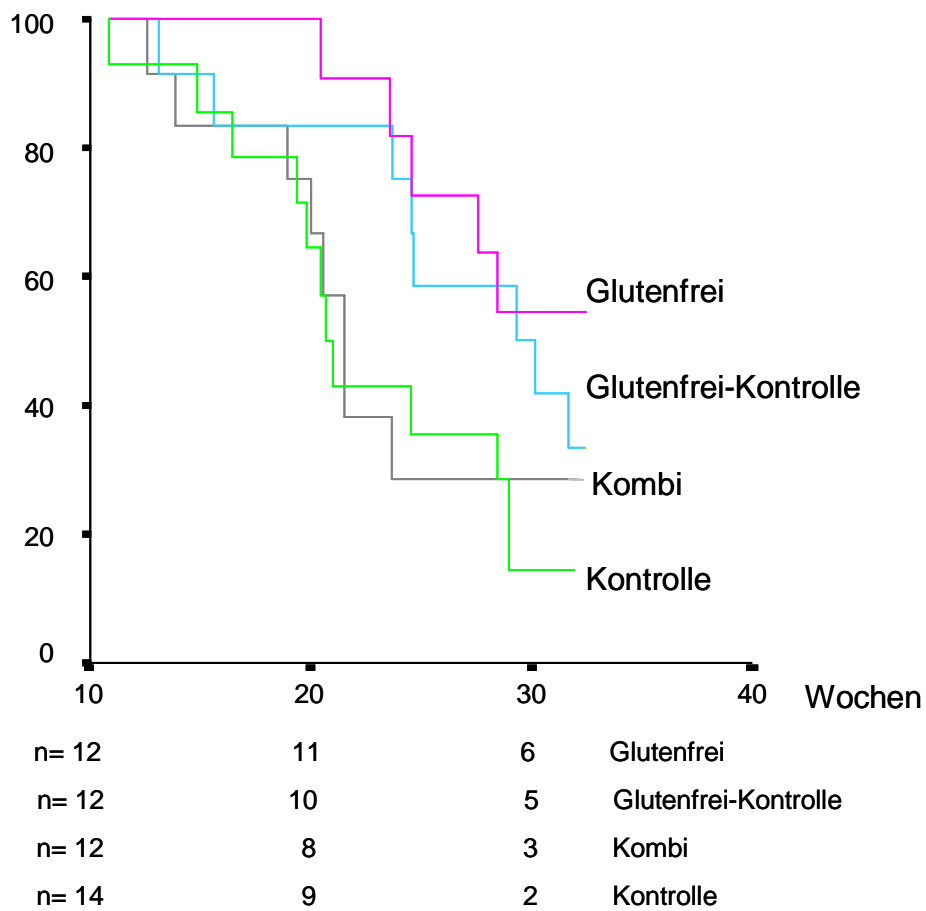


Abb. 14: Diabetesfreie Überlebensanalyse von 12 glutenfrei ernährten Nachkommen (Glutenfrei), 12 mit glutenhaltigem Futter ernährten Nachkommen (Glutenfrei-Kontrolle), 12 mit kombiniertem Futter ernährten Nachkommen (Kombi) und 14 mit Standard-Nahrung gefütterten Kontrolltieren (Kontrolle). Das kumulative Diabetesrisiko war in der Glutenfrei-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle signifikant geringer ($p < 0,05$).

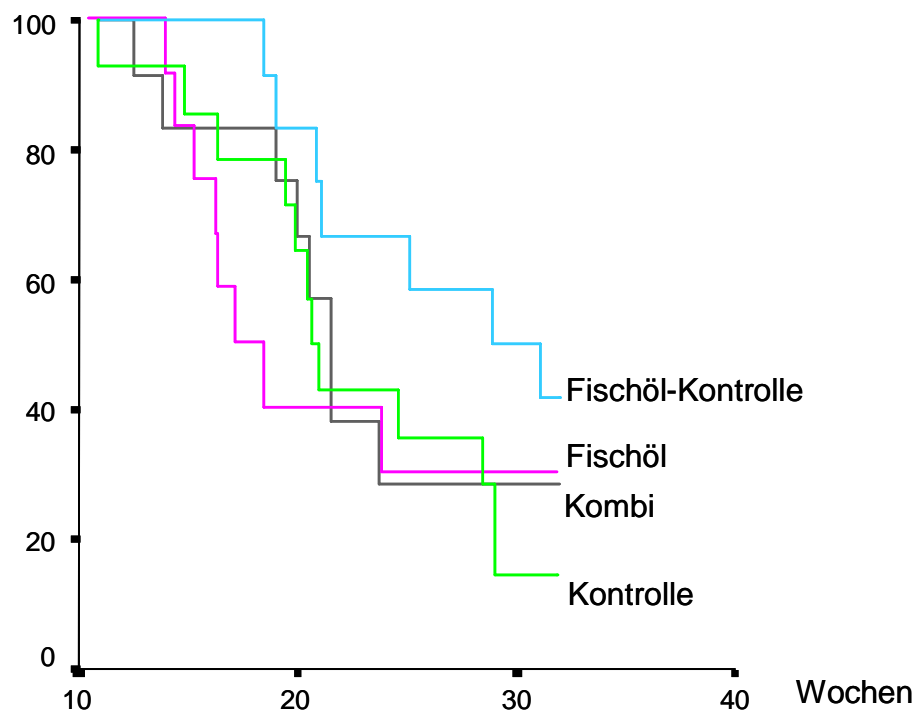
Fischöl

Die Ernährung der Tiere während Schwangerschaft und Stillzeit mit dem kombinierten Futter und nach der Stillzeit mit Fischöl-supplementiertem Futter (Fischöl-Gruppe) hatte im Vergleich zur Kontroll-Gruppe keinen signifikanten Einfluss auf das kumulative Diabetes-Risiko (70,0%; Konfidenz-Intervall: 42,6-97,4 vs. 85,7%, Abb. 15, Tab. 14). Die mediane diabetesfreie Überlebenszeit betrug in der Fischölgruppe 17,6 Wochen im Vergleich zu 20,7 Wochen in der mit Standardnahrung gefütterten Kontroll-Gruppe. Ein Tier der Fischölgruppe verstarb im Alter von 18 Wochen während der Blutabnahme.

Die Ergebnisse der Fischöl-Gruppe sind vergleichbar mit den Ergebnissen der Tiere, die mit dem kombinierten Futter ernährt wurden (Kombi-Gruppe, kumulatives Diabetes-Risiko: 71,4%, Konfidenz-Intervall: 44,4-98,4; mediane diabetesfreie Überlebenszeit: 21,6 Wochen, Abb. 15, Tab. 14). Ein Tier der Kombi-Gruppe verstarb im Alter von 20 Wochen aus unbekanntem Grund.

Die Tiere, die mit Sojaöhlhaltigem Futter ernährt wurden (Fischöl-Kontrolle), hatten im Vergleich zur Fischöl-Gruppe ein tendenziell geringeres kumulatives Diabetes-Risiko von 58,3% (Konfidenz-Intervall: 30,5-86,1) und eine tendenziell längere mediane diabetesfreie Überlebenszeit von 28,9 Wochen.

Tiere ohne Diabetes (%)



n= 12	4	3	Fischöl
n= 12	10	6	Fischöl-Kontrolle
n= 12	8	3	Kombi
n= 14	9	2	Kontrolle

Abb. 15: Diabetesfreie Überlebensanalyse von 12 mit Fischöhlhaltigem Futter ernährten Nachkommen (Fischöl), 12 mit Sojaöhlhaltigem Futter ernährten Nachkommen (Fischöl-Kontrolle), 12 mit kombiniertem Futter ernährten Nachkommen (Kombi) und 14 mit Standard-Nahrung gefütterten Kontrolltieren (Kontrolle).

Vitamin D3

Die Ernährung der Nachkommen mit Vitamin D3 supplementiertem Futter (Vitamin D) zeigt im Vergleich zu den Nachkommen, die eine geringere Konzentration von Vitamin D3 aufnahmen (Vitamin D Kontrolle), keinen Einfluss auf die Entwicklung eines autoimmunen Diabetes (kumulatives Diabetes-Risiko: 66,7%, Konfidenz-Intervall: 40,0-93,4 vs. 66,7%, Konfidenz-Intervall: 40,0-93,4, mediane Überlebenszeit: 22,0 vs. 25,0 Wochen, Abb. 16, Tab. 14). Sie ist auch vergleichbar mit dem kumulativen Diabetes-Risiko der mit kombiniertem Futter ernährten Nachkommen (Kombi) und mit den Kontrolltieren (Kontrolle).

Tiere ohne Diabetes (%)

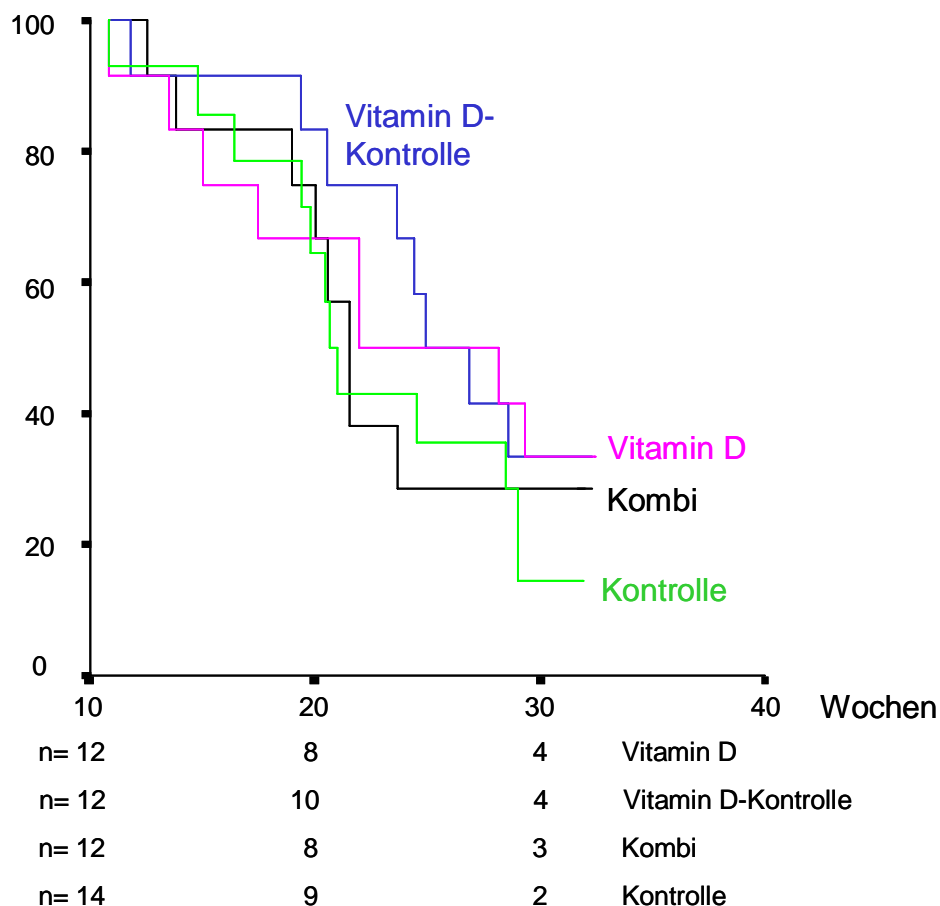


Abb. 16: Diabetesfreie Überlebensanalyse von 12 mit Vitamin D3 supplementiertem Futter ernährten Nachkommen (Vitamin D), 12 mit Vitamin D-Kontroll-Futter ernährten Nachkommen (Vitamin D Kontrolle), 12 mit kombiniertem Futter ernährten Nachkommen (Kombi) und 14 mit Standard-Nahrung gefütterten Kontrolltieren (Kontrolle).

Tab. 14: Kumulatives Diabetesrisiko (%) und diabetesfreie Überlebenszeit (Median) von NOD-Mäusen während eines Beobachtungszeitraumes von 32 Wochen in Abhängigkeit der zugeführten Nahrung.

	Kumulatives Diabetesrisiko (bis zum Alter von 32 Wochen)		Diabetesfreie Überlebenszeit
	%	Konfidenz- Intervall (95%)	Median (Wochen)
Kontrolle	85,7	67,3-100,0	20,7
Glutenfrei	45,5	16,1-74,9	31,7
Glutenfrei- Kontrolle	66,7	40,0-93,4	29,3
Fischöl	70,0	42,6-97,4	17,6
Fischöl-Kontrolle (Sojaöl)	58,3	30,5-86,1	28,9
Vitamin D	66,7	40,0-93,4	22,0
Vitamin D Kontrolle	66,7	40,0-93,4	25,0
Kombi (VitD+ Glutenfrei+Fischöl)	71,4	44,4-98,4	21,6

3.3.3. Analyse des Einflusses der Nahrungsmodulation auf die Inselzell-Autoimmunität

3.3.3.1. Insulin-Autoantikörper und Diabetes-Entwicklung

Durch die Bestimmung der Insulin-Autoantikörper (IAA) sollte der Einfluss der Nahrungsmodulation auf die Bildung von Diabetes-assoziierten Autoantikörpern untersucht werden. Die Bestimmung der IAA erfolgte aus Blutproben, die im Alter von 10 und 18 Wochen und bei Diabetesmanifestation bzw. Versuchsende (32 Wochen) abgenommen wurden.

In Tab. 15 ist die Anzahl der IAA positiven Tiere je Gruppe in Abhängigkeit des Zeitpunktes des ersten Auftretens der IAA aufgeführt. Dabei werden Tiere mit Diabetes-Progression von Tieren unterschieden, die bis zum Alter von 32 Wochen keinen Diabetes entwickelten. Bei den Tieren aller Behandlungs-Gruppen konnten unterschiedliche Antikörperverläufe beobachtet werden. Ein Teil der diabetischen Tiere zeigte bereits im Alter von 10 Wochen positive IAA-Titer. Bis auf die Vitamin D-Gruppe konnten in allen Behandlungsgruppen auch Tiere mit negativen IAA-Titern im Alter von 10 Wochen und positiven IAA-Titern im Alter von 18 Wochen beobachtet werden. Bei wenigen Tieren mit Diabetes-Entwicklung in der Fischöl-Gruppe, Vitamin D-Gruppe und Vitamin D-Kontrollgruppe erreichten die IAA-Titer erst zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation positive Werte. In allen Gruppen konnten Tiere beobachtet werden, die im Verlauf der Untersuchung Diabetes entwickelten aber zu keinem der gemessenen Zeitpunkte IAA-positiv waren. In allen Gruppen, die mit verändertem Futter behandelten wurden, waren im Vergleich zu der mit Standardnahrung gefütterten Kontrollgruppe auch Tiere mit positiven IAA-Titern zu beobachten, die bis zum Alter von 32 Wochen keinen Diabetes entwickelten.

Bei 8/11 (73%) diabetischen mit Standardnahrung ernährten Kontrolltieren konnten zu mindestens einem Untersuchungs-Zeitpunkt positive IAA-Titer nachgewiesen werden. Alle fünf Tiere (100%) der Kontroll-Gruppe, die im Alter von 10 Wochen IAA-positiv waren, entwickelten einen Diabetes. Drei von fünf (60%) IAA-negative Kontroll-Tiere entwickelten einen Diabetes.

Vor allem die Tiere der Glutenfrei-Gruppe und der Fischöl-Kontrollgruppe zeigten im Vergleich zu den mit herkömmlicher Standardnahrung gefütterten Kontroll-

Tieren ein verändertes Bild der IAA-Positivität diabetischer Tiere. Zwar zeigten alle drei Gruppen eine vergleichbare Häufigkeit der diabetischen Tiere mit positiven IAA-Titern. So waren insgesamt 80% der diabetischen Tiere der Glutenfrei-Gruppe, 86% der diabetischen Tiere der Fischöl-Kontrollgruppe und 73% der diabetischen Tiere der Kontroll-Gruppe IAA-positiv. Die diabetischen Tiere der Glutenfrei-Gruppe und Fischöl-Kontrollgruppe entwickelten jedoch im Vergleich zur Kontroll-Gruppe häufiger erst im Alter von 18 Wochen positive IAA-Titer. So betrug die Anzahl der Mäuse mit Diabetesentwicklung und positiven IAA-Titern im Alter von 10 Wochen in der Glutenfrei-Gruppe 20% und in der Fischöl-Kontrollgruppe 29% im Vergleich zu 46% in der Kontroll-Gruppe. Dagegen entwickelten 60% der diabetischen Tiere der Glutenfrei-Gruppe und 57% der Tiere der Fischöl-Kontrollgruppe IAA im Alter von 18 Wochen (vs. 27% in der Kontroll-Gruppe).

Auch die Häufigkeit der Tiere, die im Verlauf der Untersuchung keinen Diabetes entwickelten und im Alter von 10 Wochen IAA positiv waren, war in der Glutenfrei-Gruppe verändert. Die Häufigkeit der glutenfrei ernährten Tiere ohne Diabetes mit positiven IAA im Alter von 10 Wochen betrug 50% im Vergleich zu 0% in der Kontrollgruppe.

Tab. 15: Anzahl der NOD-Mäuse mit und ohne Diabetes, die im Alter von 10 Wochen, im Alter von 18 Wochen, bei Diabetesmanifestation oder keine Insulin-Autoantikörper während des Beobachtungszeitraumes bildeten.

	IAA+ im Alter von 10 Wochen	IAA+ im Alter von 18 Wochen und IAA- bei 10 Wochen	Ausschließl. IAA+ bei Diabetes-Manifestation	Insgesamt IAA positiv	Insgesamt IAA negativ
Kontrolle mit Diabetes (n=11)	5 (46%)	3 (27%)	0	8 (73%)	3 (27%)
ohne Diabetes (n=2)	0	0	0	0	2 (100%)
Glutenfrei mit Diabetes (n=5)	1 (20%)	3 (60%)	0	4 (80%)	1 (20%)
ohne Diabetes (n=6)	3 (50%)	1 (17%)	0	4 (67%)	2 (33%)
Glutenfrei-Kontr. mit Diabetes (n=8)	4 (50%)	1 (12,5%)	0	5 (62,5%)	3 (37,5%)
ohne Diabetes (n=4)	1 (25%)	2 (50%)	0	3 (75%)	1 (25%)
Fischöl mit Diabetes (n=8)	5 (62,5%)	1 (12,5%)	1 (12,5%)	7 (87,5%)	1 (12,5%)
ohne Diabetes (n=3)	0	2 (67%)	0	2 (67%)	1 (33%)
Fischöl-Kontr. mit Diabetes (n=7)	2 (29%)	4 (57%)	0	6 (86%)	1 (14%)
ohne Diabetes (n=5)	1 (20%)	1 (20%)	0	2 (40%)	3 (60%)
Vitamin D mit Diabetes (n=8)	4 (50%)	0	2 (25%)	6 (75%)	2 (25%)
ohne Diabetes (n=4)	2 (50%)	0	0	2 (50%)	2 (50%)
Vitamin D Kontr. mit Diabetes (n=8)	2 (25%)	3 (37,5%)	1 (12,5%)	6 (75%)	2 (25%)
ohne Diabetes (n=4)	2 (50%)	2 (50%)	0	4 (100%)	0
Kombi mit Diabetes (n=8)	3 (37,5%)	3 (37,5%)	0	6 (75%)	2 (25%)
ohne Diabetes (n=3)	0	3 (100%)	0	3 (100%)	0

Der zeitliche Verlauf der Insulin-Autoantikörper und der Titerhöhe ist für die einzelnen Tiere, geordnet nach Behandlungsgruppen, in Abb. 17 dargestellt. Unterschiede im Verlauf der IAA-Titer, die auf die jeweils verabreichte Nahrung zurückführbar sein könnten, sind vor allem bei den glutenfrei ernährten Tieren zu beobachten. Während die nicht-diabetischen NOD-Mäuse der mit Standardnahrung gefütterten Kontroll-Gruppe zu allen gemessenen Zeitpunkten negative IAA-Titer und die der anderen Gruppen nur schwach positive IAA-Titer aufweisen, haben zwei glutenfrei ernährte nicht-diabetische Tiere im Alter von 10 Wochen hoch positive IAA-Titer, die im Verlauf der Untersuchung negativ wurden. Ein Vergleich der IAA-Titer zwischen Tieren mit und ohne Diabetesentwicklung zeigt, dass vergleichbar hohe IAA-Titer im Alter von 10 Wochen bei den Tieren anderer Gruppen mit einer Diabetes-Progression in Zusammenhang stehen (Abb. 18). Auch im Alter von 18 Wochen sind im allgemeinen bei Tieren mit Diabetesentwicklung höhere IAA-Titer messbar als bei nicht-diabetischen Tiere.

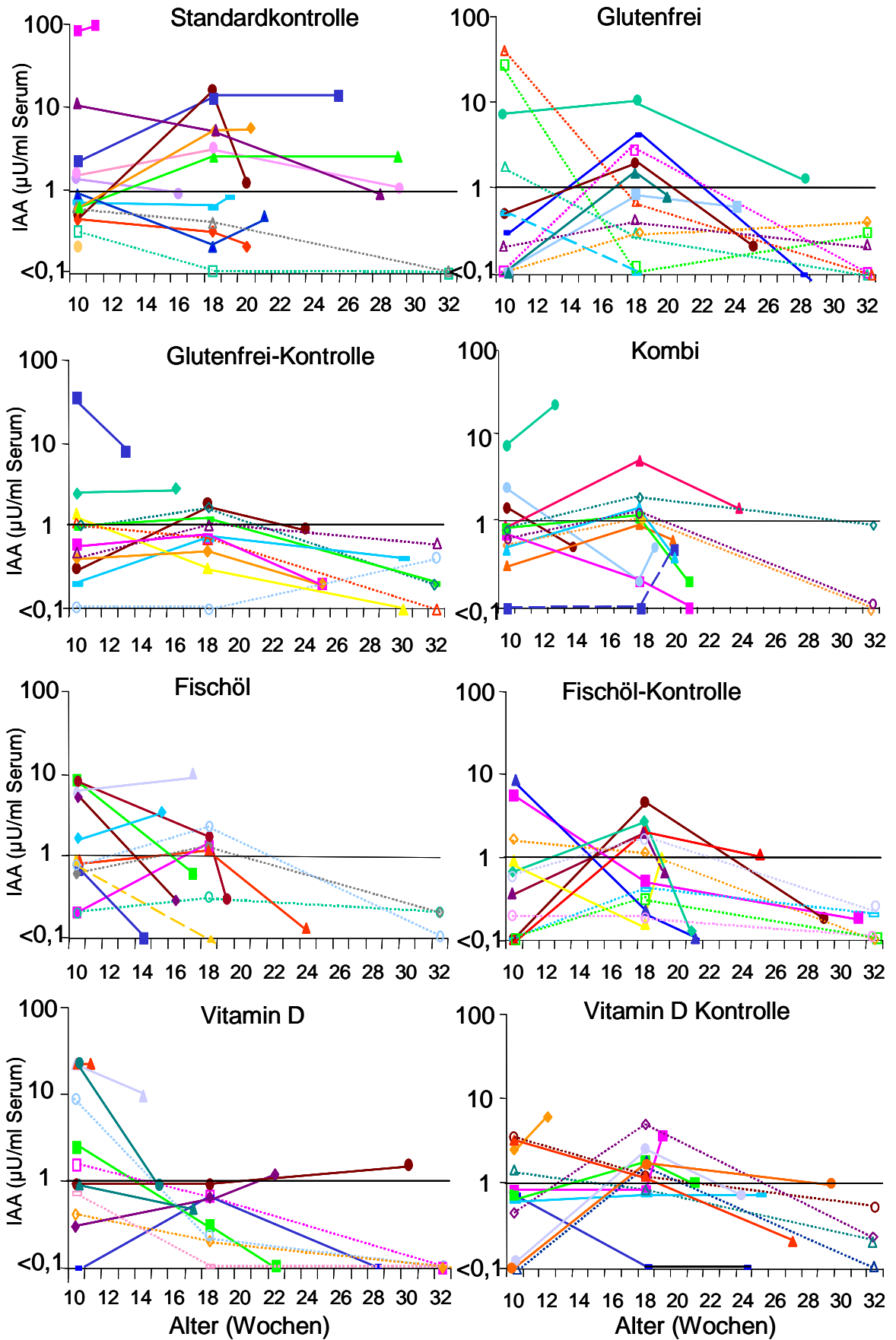
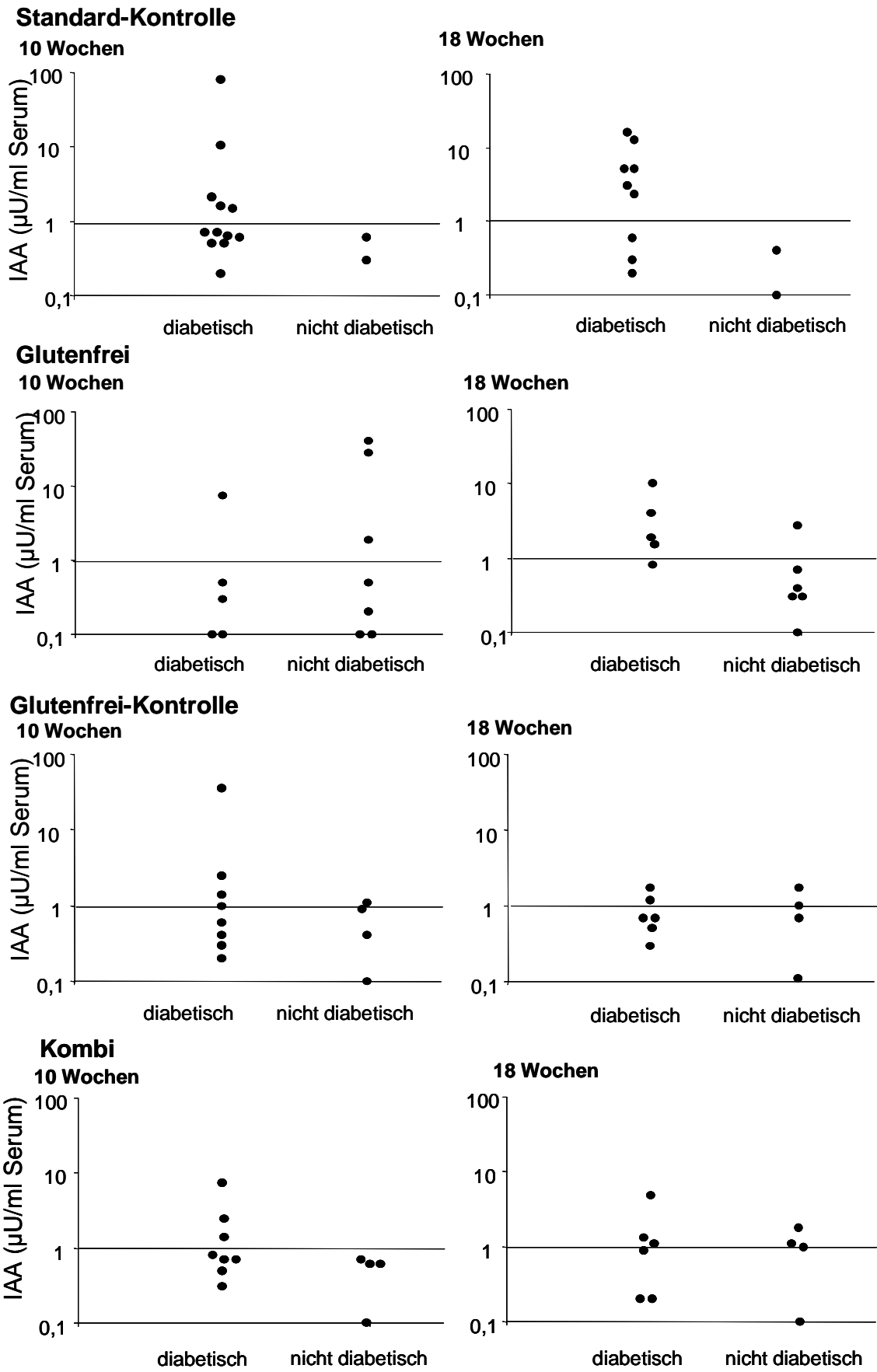
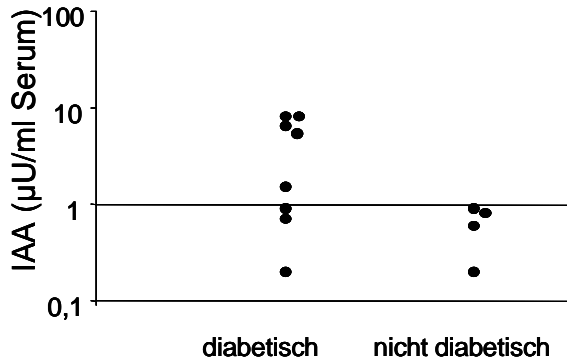


Abb. 17: Verlauf der IAA ($\mu\text{U/ml}$ Serum) aller untersuchten NOD-Mäuse. Nicht-diabetische Tiere sind durch gepunktete Linien, diabetische Tiere mit durchgezogenen Linien dargestellt; nicht diabetische Tiere, die vor Versuchsende verstorben sind, sind durch gestrichelte Linien dargestellt.

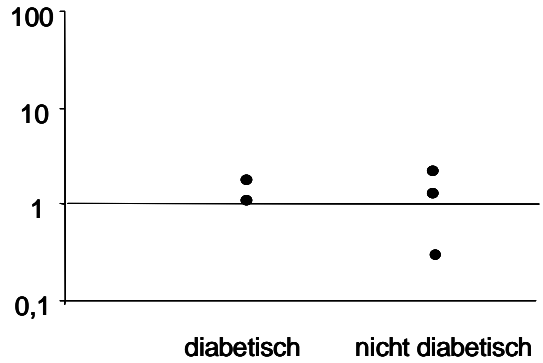


Fischöl

10 Wochen

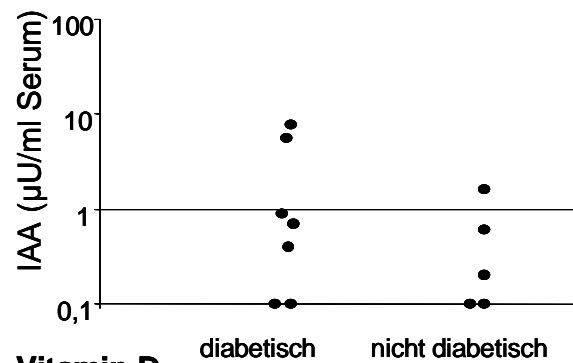


18 Wochen

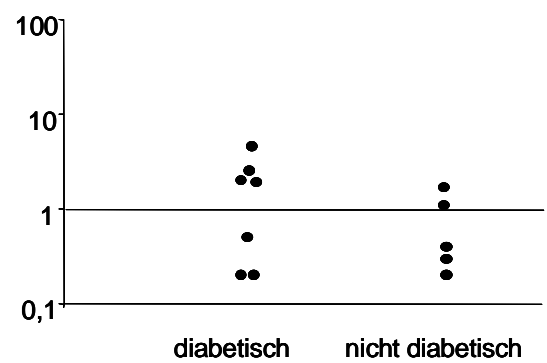


Fischöl-Kontrolle

10 Wochen

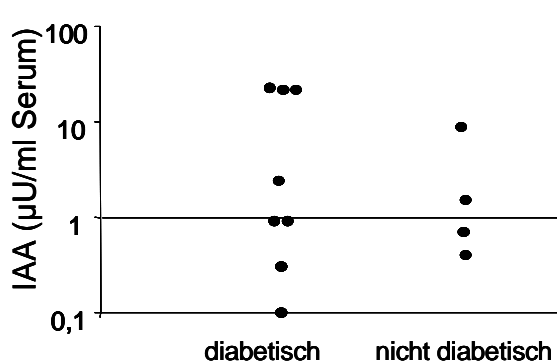


18 Wochen

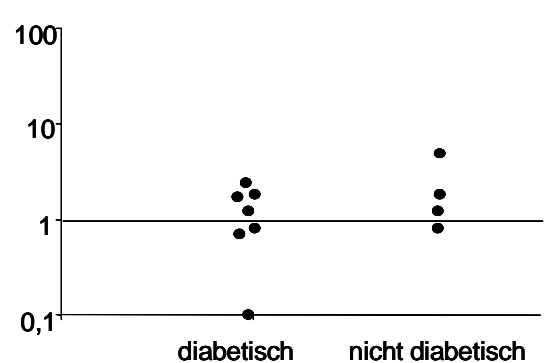


Vitamin D

10 Wochen

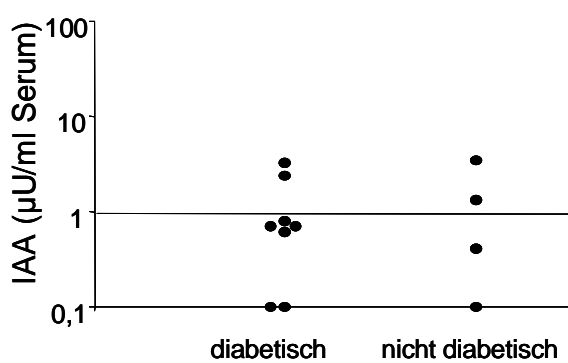


18 Wochen



Vitamin D Kontrolle

10 Wochen



18 Wochen

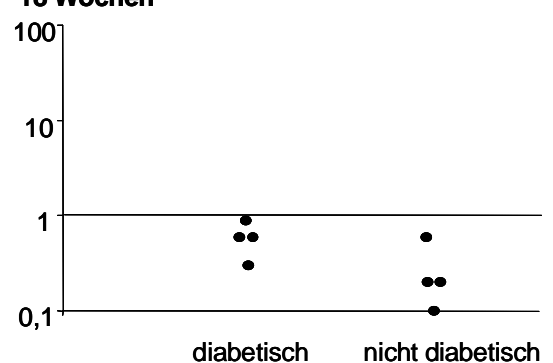


Abb. 18: IAA-Titer bei NOD-Mäusen im Alter von 10 und 18 Wochen. Die Ergebnisse sind, nach Behandlungs-Gruppen geordnet, in Abhängigkeit der Diabetes-Entwicklung während des 32wöchigen Beobachtungszeitraumes dargestellt.

In Abb. 19A ist die Korrelation der IAA-Titer im Alter von 10 Wochen mit dem Alter der Diabetes-Manifestation aller Mäuse der Versuchs- und Kontrollgruppen dargestellt, die bis zum Alter von 32 Wochen einen Diabetes entwickelten. Hohe IAA-Titer im Alter von 10 Wochen korrelieren invers mit dem Alter der Diabetesmanifestation ($p < 0,01$). Diabetische Tiere, die im Alter von 10 Wochen IAA-Titer $> 10,0 \mu\text{U/ml}$ Serum hatten, entwickelten fast immer einen Autoimmundiabetes bevor sie das Alter von 16 Wochen erreichten. Im Vergleich dazu sind in Abb. 19B die IAA-Titer aller Mäuse im Alter von 10 Wochen dargestellt, die bis zum Alter von 32 Wochen keinen Diabetes entwickelten. Nur die zwei glutenfrei ernährten Tiere ohne Diabetes hatten im Alter von 10 Wochen IAA-Titer $> 10,0 \mu\text{U/ml}$ Serum.

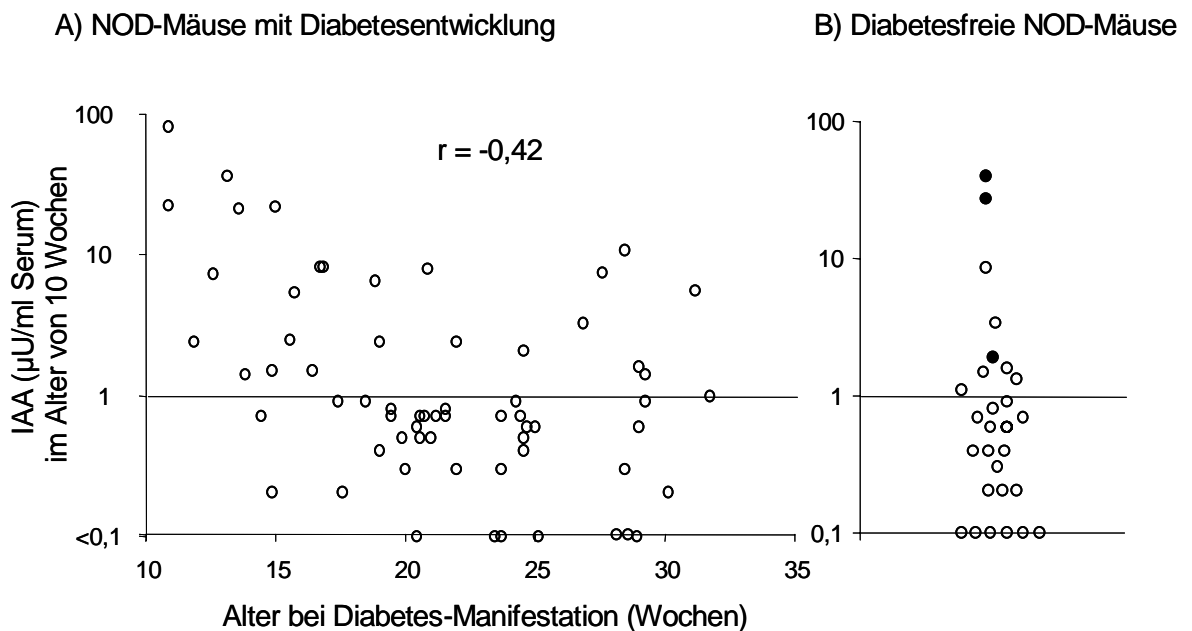


Abb.19: A) Korrelation der IAA-Titer im Alter von 10 Wochen mit dem Alter der Diabetes-Manifestation bei NOD-Tieren der Kontroll- und Versuchsgruppen, die bis zum Alter von 32 Wochen einen Autoimmundiabetes entwickelten. B) IAA-Titer bei NOD-Tieren der Kontroll- und Versuchsgruppen, die bis zum Alter von 32 Wochen keinen Autoimmundiabetes entwickelten. Die schwarz ausgefüllten Kreise stellen die drei glutenfrei ernährten Mäuse mit positiven IAA-Titern dar.

Auch Abb. 20 zeigt, dass Mäuse, die bereits im Alter von 10 Wochen positive IAA-Titer aufweisen, eine schnellere Diabetes-Progression und ein höheres kumulatives Diabetes-Risiko aufweisen als Tiere, die im Alter von 10 Wochen IAA-negativ sind. Die Anzahl der Tiere, die im Alter von 10 Wochen positive IAA-Titer hatten und bis zur 16. Lebenswoche einen Diabetes entwickelten war signifikant höher als bei den Tieren, die im Alter von 10 Wochen negative IAA-Titer hatten ($p < 0,001$). Das kumulative Diabetesrisiko im Alter von 16 Wochen betrug bei den Tieren, die im Alter von 10 Wochen IAA-positiv waren 31,4% (Konfidenz-Intervall: 16,0-46,8%) im Vergleich zu 3,2% (Konfidenz-Intervall: 0-7,5%) bei den Tieren, die im Alter von 10 Wochen IAA-negativ waren.

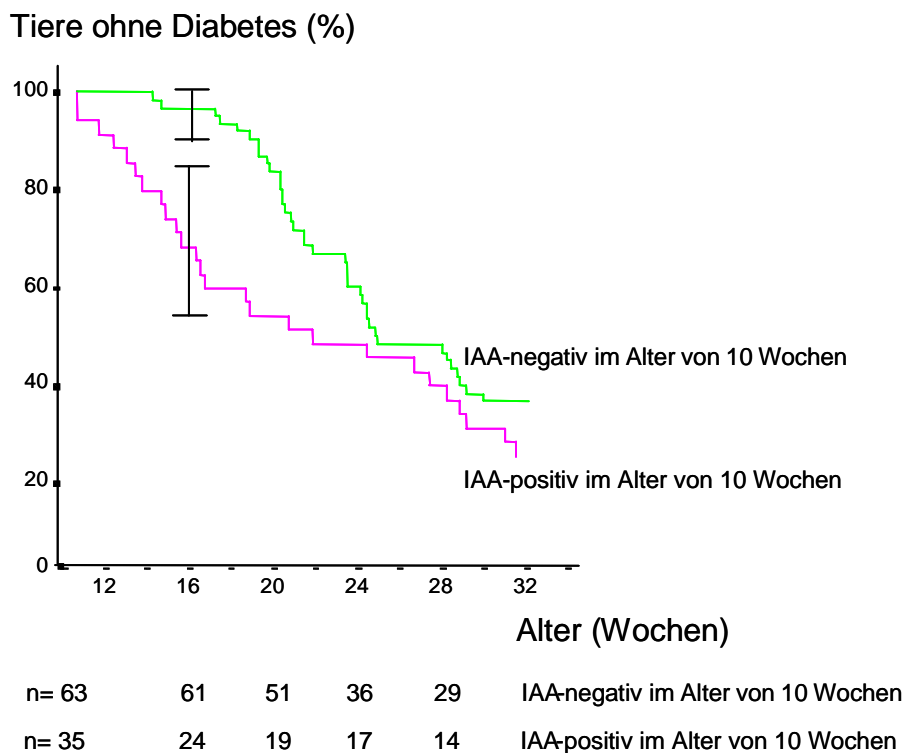


Abb.20: Diabetesfreie Überlebensanalyse von 63 NOD-Mäusen, die im Alter von 10 Wochen IAA-negativ waren und 35 NOD-Mäusen, die im Alter von 10 Wochen IAA-positiv waren. Im Alter von 16 Wochen war die Anzahl der Tiere ohne Diabetes signifikant höher in der Gruppe der Tiere, die im Alter von 10 Wochen IAA-negativ waren ($p < 0,001$).

3.3.3.2. Insulin-Autoantikörper Isotypen und Diabetes-Entwicklung

Um die IAA Antwort näher zu charakterisieren, wurden zusätzlich die IAA-Subklassen IgG1, IgG2a und IgG2b untersucht. Die Ergebnisse der IAA-Subklassen Titer im Alter von 10 und 18 Wochen sowie bei Versuchende sind in Abb. 21 A-C für alle Tiere dargestellt. Bei allen Untersuchungsgruppen war die Immunantwort zu allen gemessenen Zeitpunkten durch die Subklassen IgG1 und auch IgG2b dominiert. Vor allem im Alter von 10 Wochen waren die gemessenen IgG2a Titer in allen untersuchten Gruppen niedriger. Die Gesamt-IAA Titer korrelierten für alle gemessenen Proben stark mit den IgG1 - und IgG2b-Titern der untersuchten Tiere ($r=0,77$ bzw. $r=0,79$; $p<0,01$).

Um den Anteil einer Subklasse an der Gesamt-IAA Antwort der einzelnen Tiere deutlicher darzustellen, wurden die Subklassen-Titer als prozentualer Anteil am Gesamt-IAA Titer ausgedrückt (Abb. 22 A-C). Auffällig ist dabei erneut die Glutenfrei-Gruppe. Im Alter von 10 Wochen war der prozentuale Anteil von IgG2a an der Gesamt-IAA Antwort bei allen glutenfrei ernährten IAA-positiven Tiere $<3\%$. Die IAA-Antwort der drei glutenfrei ernährten nicht-diabetischen Tiere mit positiven Gesamt-IAA Titern im Alter von 10 Wochen bestand nahezu zu 100% aus einer IgG1-Antwort.

Bei Betrachtung des prozentualen Anteils von IgG1, IgG2a bzw. IgG2b am Gesamt-IAA Titer ist in allen Gruppen zum Zeitpunkt von 18 Wochen ein tendenzieller Anstieg des prozentualen IAA-IgG2a Anteils beobachtbar (Abb. 18A, 18B, 18C). Dieser Anstieg war auch in der Glutenfrei-Gruppe beobachtbar, allerdings nur bei Tieren, die später Diabetes entwickelten.

Positive IAA und IAA-Subklassentiter wurden zum Zeitpunkt des Versuchsendes nur bei diabetischen Tieren detektiert. Im Vergleich zum Alter von 10 Wochen konnten zu diesem Zeitpunkt einige Tiere mit einem sehr hohen prozentualen IgG2a-Anteil an der Gesamt-IAA Antwort beobachtet werden.

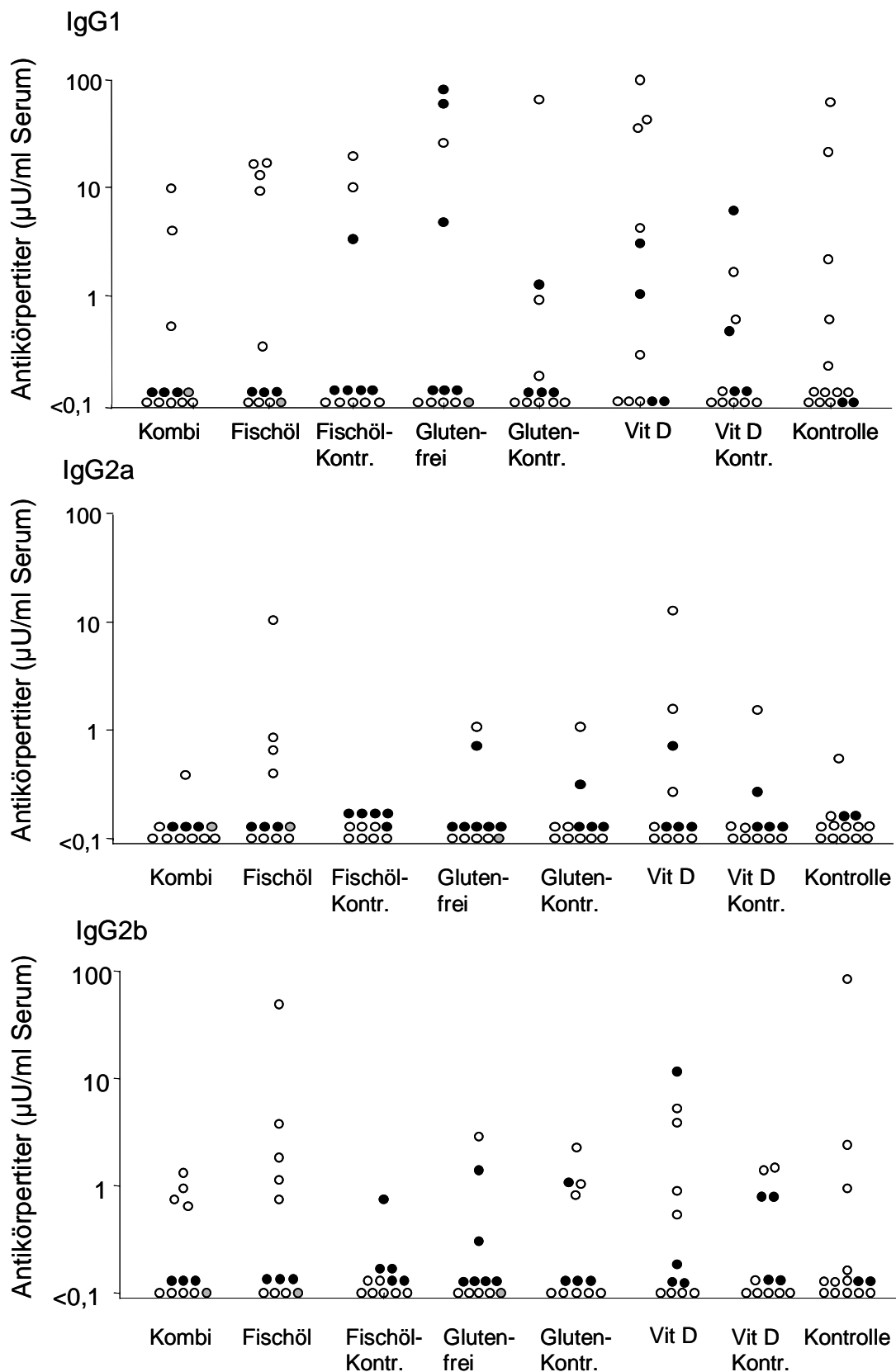


Abb. 21A: IgG1, IgG2a und IgG2b (µU/ml Serum) bei allen untersuchten NOD-Mäusen im Alter von 10 Wochen. Nicht-diabetische Tiere sind durch schwarze Punkte, diabetische Tiere durch nicht ausgefüllte Kreise und aus anderem Grund verstorbene Tiere durch graue Punkte dargestellt.

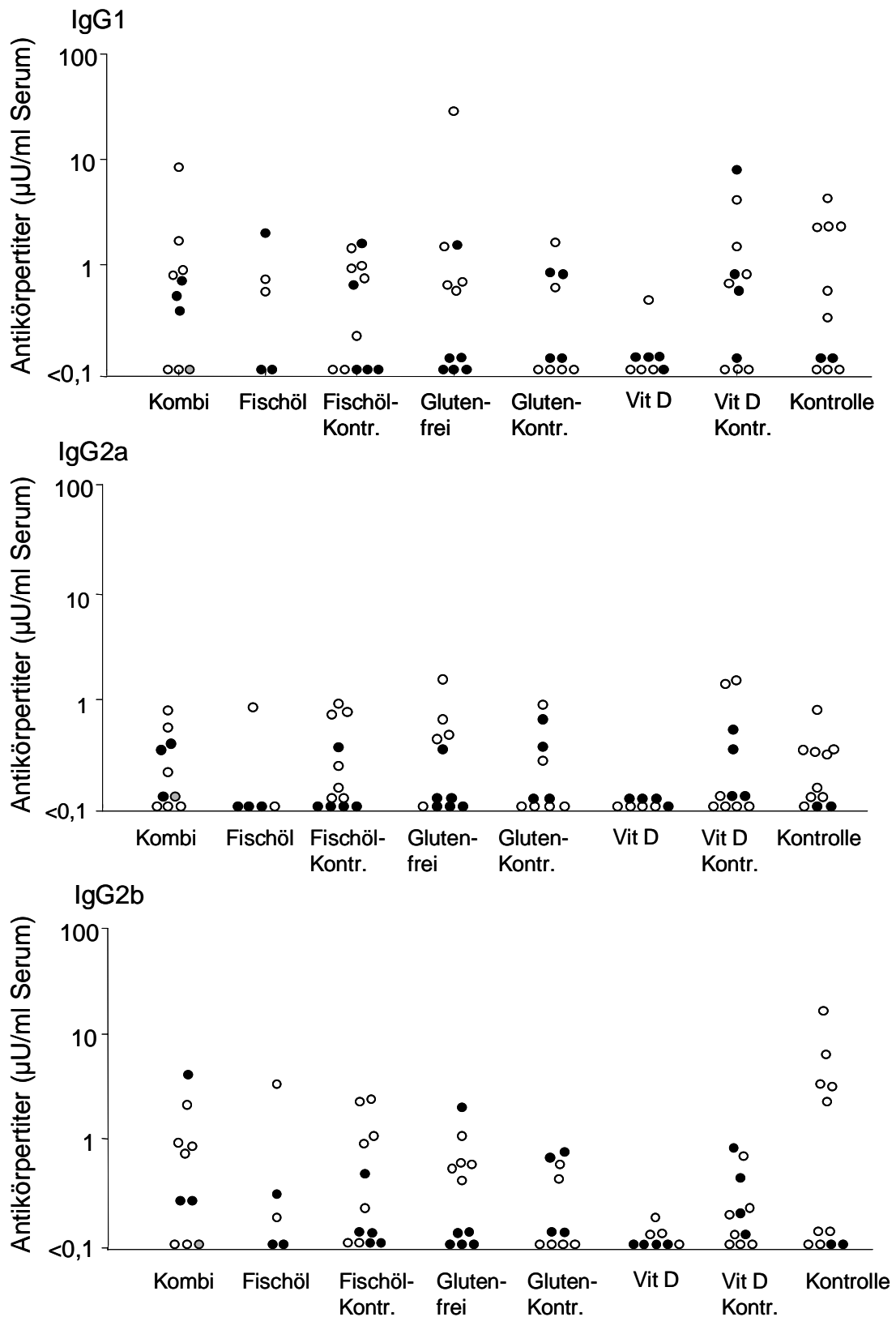


Abb. 21B: IgG1, IgG2a und IgG2b ($\mu\text{U/ml Serum}$) bei allen untersuchten NOD-Mäusen im Alter von 18 Wochen. Nicht-diabetische Tiere sind durch schwarze Punkte, diabetische Tiere durch nicht ausgefüllte Kreise und aus anderem Grund verstorbene Tiere durch graue Punkte dargestellt.

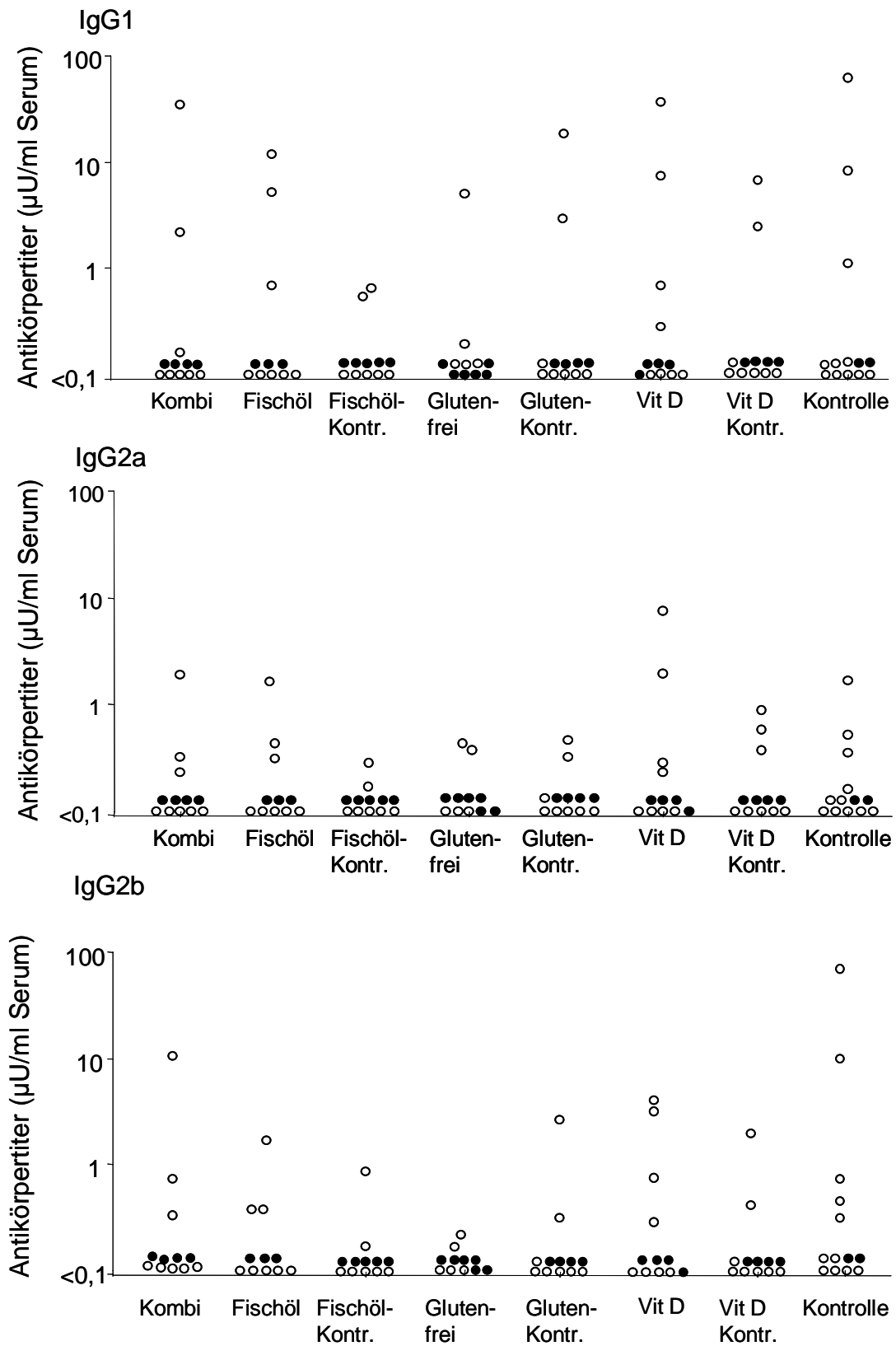


Abb. 21C: IgG1, IgG2a und IgG2b (μU/ml Serum) bei allen untersuchten NOD-Mäusen bei Diabetesmanifestation bzw. bei Versuchsende. Nicht-diabetische Tiere sind durch schwarze Punkte, diabetische Tiere durch nicht ausgefüllte Kreise dargestellt.

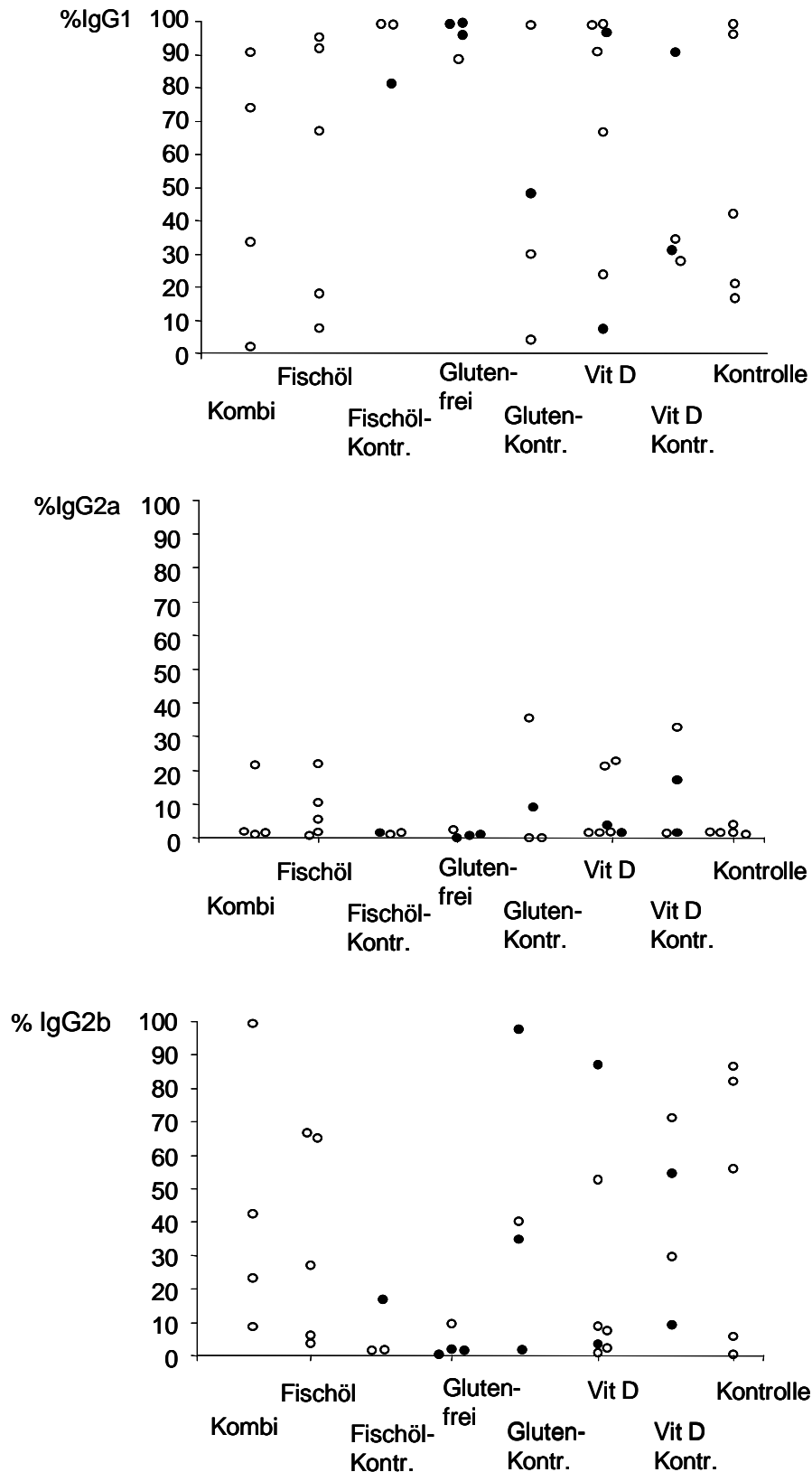


Abb. 22A: Prozentualer Anteil von IgG1, IgG2a und IgG2b an der Gesamt IAA-Antwort bei NOD-Mäusen mit positiven IAA-Titern im Alter von 10 Wochen. Nicht-diabetische Tiere sind durch schwarze Punkte, diabetische Tiere durch nicht ausgefüllte Kreise dargestellt.

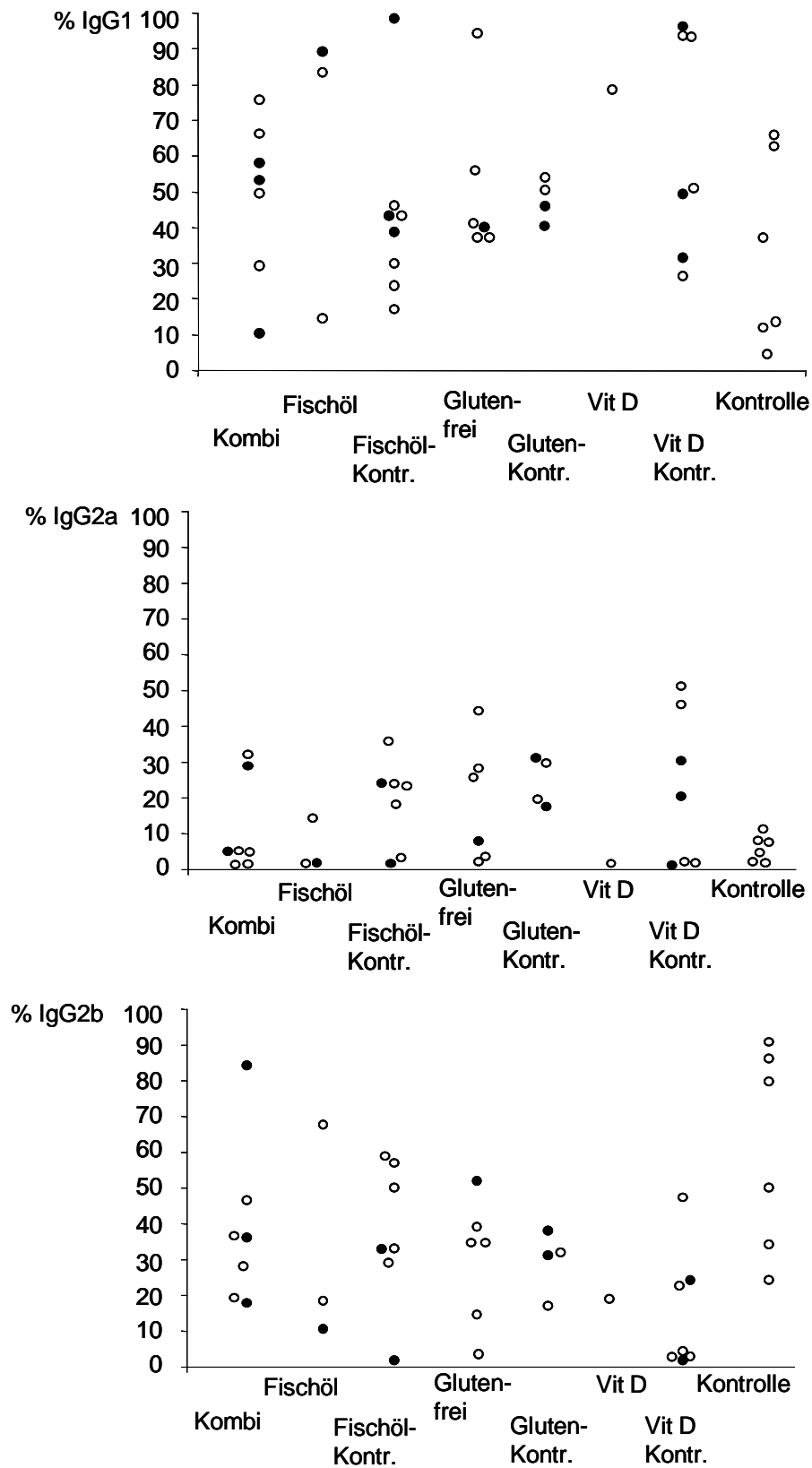


Abb. 22B: Prozentualer Anteil von IgG1, IgG2a und IgG2b an der Gesamt IAA-Antwort bei NOD-Mäusen mit positiven IAA-Titern im Alter von 18 Wochen. Nicht-

diabetische Tiere sind durch schwarze Punkte, diabetische Tiere durch nicht ausgefüllte Kreise dargestellt.

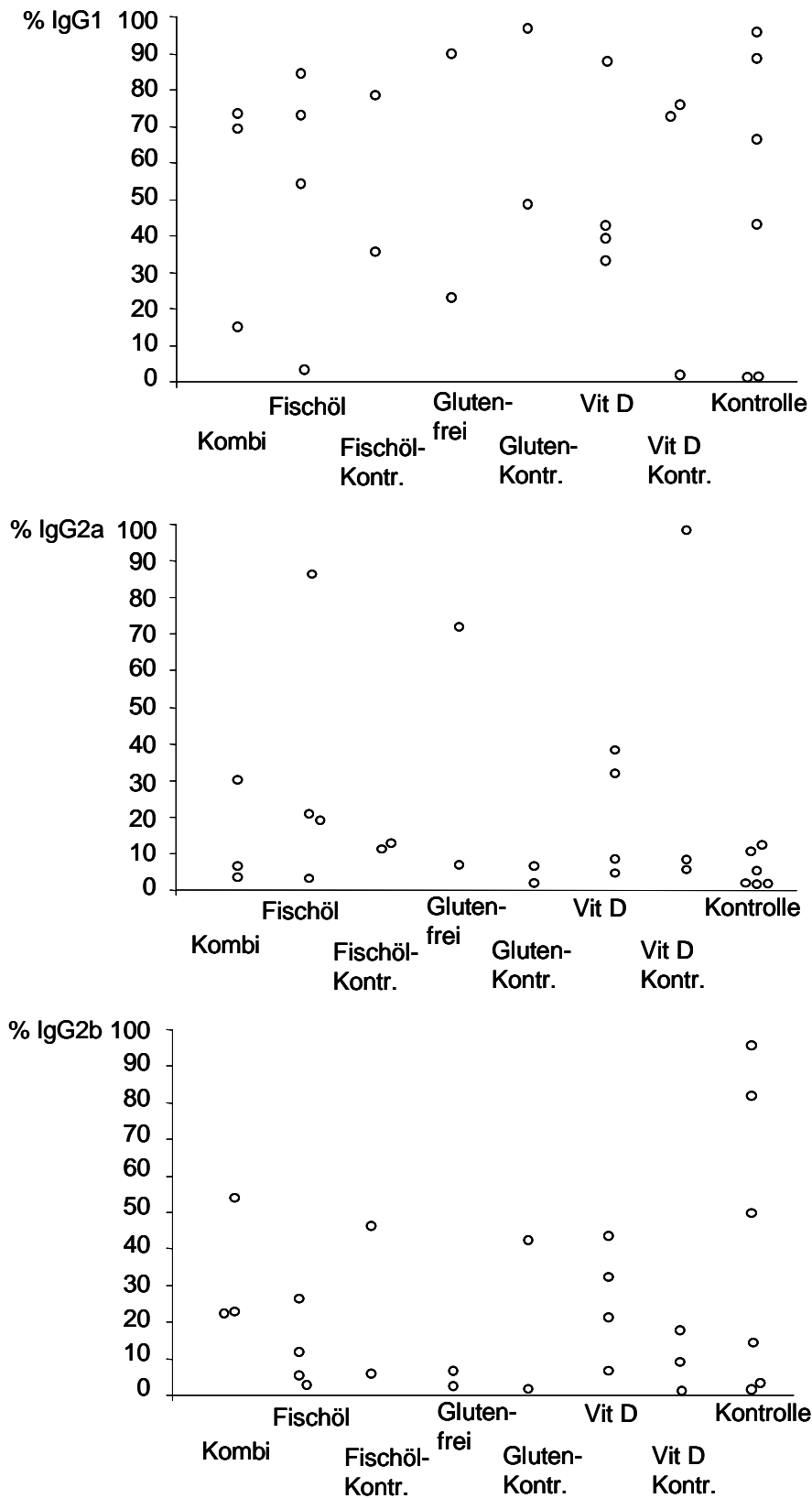


Abb. 22C: Prozentualer Anteil von IgG1, IgG2a und IgG2b an der Gesamt IAA-Antwort bei NOD-Mäusen mit positiven IAA-Titern bei Diabetesmanifestation.

3.3.4. Analyse des Einflusses der Nahrungsmodulation auf die Bildung von Gliadin-Antikörpern

Durch die Bestimmung der Gliadin-Antikörper (IgA und IgG) sollte untersucht werden, ob NOD-Mäuse eine mit dem Mensch vergleichbare Immunantwort gegen Zöliakie-assoziierte Antigene aufweisen.

Im Alter von 10 Wochen konnten bei keinem der Tiere positive Gliadin-Antikörper der Klasse IgA detektiert werden. Die Gliadin-Antikörper der Klasse IgG sind in Abb. 23 dargestellt. Die Tiere der Glutenfrei-Gruppe zeigten nur sehr geringe Anti-Gliadin-IgG Titer. In allen anderen Gruppen, die mit glutenhaltigem Futter behandelt wurden, konnten Gliadin-Antikörper-Titer beobachtet werden, die höher als die Titer der Glutenfrei-Gruppe waren. Hohe Anti-Gliadin-IgG Titer konnten sowohl bei diabetischen Tieren als auch bei Tieren detektiert werden, die bis zum Alter von 32 Wochen keinen Diabetes entwickelten.

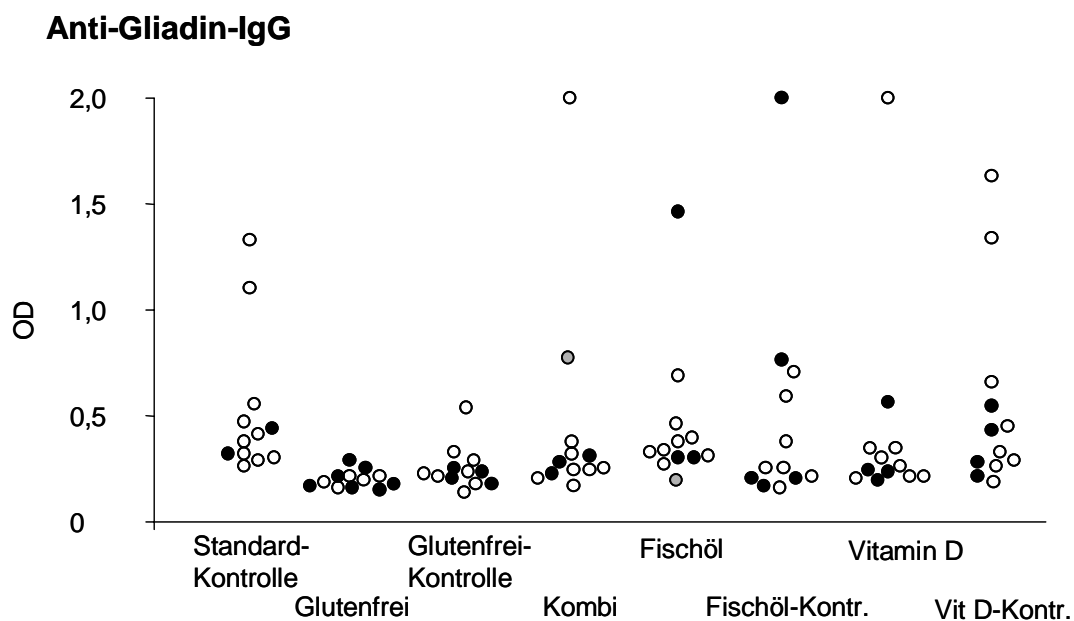


Abb. 23: Anti-Gliadin-IgG Titer (OD) der NOD-Mäuse im Alter von 10 Wochen. Nicht-diabetische Tiere sind durch schwarze Punkte, diabetische Tiere durch nicht ausgefüllte Kreise dargestellt.

Zusammenfassend zeigt die Nahrungsmodulation bei NOD-Mäusen folgende Ergebnisse:

1. Durch die lebenslange glutenfreie Ernährung der NOD-Mäuse konnte das kumulative Diabetesrisiko signifikant verringert und die mediane diabetesfreie Überlebenszeit signifikant verlängert werden. Dieser Effekt konnte durch eine Vitamin D3- bzw. Fischöl-Supplementierung nicht erreicht werden.
2. Durch die lebenslange glutenfreie Ernährung der NOD-Mäuse war es jedoch nicht möglich, die Bildung von Insulin-Autoantikörpern zu verhindern. So hatten auch glutenfrei ernährte Mäuse im Alter von 10 Wochen positive IAA-Titer. Diese standen jedoch im Vergleich zu den Tieren anderer Gruppen nicht mit einer schnellen Diabetes-Progression in Zusammenhang.
3. Die Analyse der IAA-Subklassenantwort zeigte, dass die frühe Immunantwort gegen Insulin vorwiegend durch die Subklassen IgG1 und zum Teil auch IgG2b dominiert ist. Mit zunehmendem Alter der Mäuse kommt es zu einem tendenziellen Anstieg des prozentualen Anteils von IgG2a an der Gesamt-IAA-Antwort. Auffällig war der hohe prozentuale Anteil von IgG1 bei IAA-positiven Tieren der Glutenfrei-Gruppe, die bis zum Alter von 32 Wochen keinen Diabetes entwickelten.
4. In allen mit glutenhaltigem Futter behandelten Gruppen konnten Tiere beobachtet werden, die im Vergleich zur Glutenfrei-Gruppe höhere Gliadin-Antikörper der Klasse IgG bildeten. Diese waren sowohl bei Tieren mit als auch bei Tieren ohne Diabetes-Entwicklung detektierbar.

4. Diskussion

4.1. Analyse der Immunantwort gegen Tetanus Toxoid

Bei den assoziierten Erkrankungen Typ 1 Diabetes und Zöliakie spielen T-Zellen in der Krankheitsentstehung eine wichtige Rolle. Beim Typ 1 Diabetes konnten Erkenntnisse über eine veränderte zelluläre Immunantwort, die zur Zerstörung der pankreatischen β -Zellen und anschließender Diabetesmanifestation führt, vor allem durch Tierexperimente gewonnen werden. Dabei wurde ein Dominieren der $IFN\gamma$ Immunantwort gegen Inselzell-Antigene (Katz, 1995; Liblau, 1995; Pilstrom, 1995) beobachtet, das von einer verminderten Aktivität regulatorischer Mechanismen und einer verringerten IL-4 Immunantwort begleitet wird (Gombert, 1996; Cameron, 1998). Unklar ist bislang, ob diese beobachtete Störung der Immunantwort gegen Inselzell-Antigene zu einer generell veränderten Immunantwort, also auch gegen nicht Inselzell-spezifische Antigene, führt. Auf eine generell verminderte IL-4 Immunantwort bei Menschen mit Typ 1 Diabetes weist bislang die Beobachtung hin, dass Personen mit Typ 1 Diabetes oder Inselzell-Autoimmunität eine geringere Allergie-Prävalenz aufweisen (Douek, 1999; Olesen, 2001). Auch bei Personen mit Zöliakie spielt das von T-Zellen produzierte Th1-Zytokin TNF eine zentrale Rolle bei der Zerstörung der Dünndarmmucosa (Schuppan, 2000).

Um zu untersuchen, ob bei Personen mit Diabetes- oder Zöliakie-assoziiierter Autoimmunität die Immunantwort generell verändert ist, wurde bei 109 Kindern der BABYDIAB-Studie die Immunantwort gegen das bakterielle Antigen Tetanus Toxoid mittels Antigen-spezifischer Antikörpersubklassen bestimmt. Antikörpersubklassen stellen im Mausmodell bereits eine indirekte Methode zur Bestimmung des T-Zell Phänotyps dar, da bei der Maus die Zytokin-abhängige Bildung von Antikörpersubklassen nachgewiesen werden konnte (Snapper, 1987; Snapper, 1995; Finkelman, 1990). Im Gegensatz dazu ist beim Menschen die zytokinabhängige Produktion von Antikörpersubklassen bislang noch nicht genau definiert. Durch Untersuchungen anderer Erkrankungen wird allerdings angenommen, dass beim Menschen die Bildung von IgG4 und/oder IgE Antikörpern durch die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 gefördert wird (Lundgren, 1989; Ishizaka, 1990; Nusslein, 1991; King, 1993). Um die Zytokinabhängigkeit der Antikörper-Subklassenbildung zu untersuchen, wurden in einem kleineren

Kollektiv der BABYDIAB-Studie sowohl die Anti-TT Subklassenantwort als auch das Zytokinprofil TT-stimulierter T-Zellen untersucht.

4.1.1. Humorale Immunantwort gegen Tetanus Toxoid

Unsere Untersuchung zeigte, dass die Antikörper-Antwort gegen TT im Alter von 9 Monaten, also nach der initialen TT-Impfung, generell durch eine Anti-TT IgG1 Antwort charakterisiert ist, und dass im Alter von 2 Jahren, nach der Booster-Impfung, zusätzlich Anti-TT IgG4 und in geringerem Maße auch Anti-TT IgG2 gebildet werden. Kinder ohne Insel-Autoantikörper zeigten diese Subklassen-Antwort unabhängig von ihrem HLA-Genotyp. Diese spezifische Antikörpersubklassen-Antwort wurde bereits mehrfach für Tetanus Toxoid (Soo, 1989; Ruths, 1991; Devey, 1985) und für andere Protein-Antigene wie Ovalbumin (Lim, 1994) und Keyhole limpet hemocyanin (Bird, 1990; Falconer, 1992) beschrieben.

Die Anti-TT Antwort bei Kindern mit Insel-Autoantikörpern war jedoch abhängig vom Alter, in dem die Kinder Insel-Autoantikörper entwickelten, und damit möglicherweise von der bestehenden Inselzell-Autoimmunität zum Zeitpunkt der Booster-Impfung. Kinder, die im Alter von 9 Monaten Insel-Autoantikörper entwickelten, zeigten nach der Booster-Impfung, unabhängig von ihrem HLA-Genotyp, keine Anti-TT IgG4 und Anti-TT IgG2 Antwort, und hatten entweder kaum detektierbare TT-Antikörper oder nur geringe Titer an Anti-TT IgG1. Im Vergleich dazu zeigten Kinder, die im Alter von 9 Monaten Insel-Autoantikörper negativ waren, jedoch im Alter von 2 Jahren Insel-Autoantikörper entwickelten, keine veränderte Anti-TT Subklassen-Antwort. Auch die Kinder mit Zöliakie, bei denen Zöliakie-assoziierte Antikörper ebenfalls erst im bzw. nach dem 2 Lebensjahr detektiert wurden, zeigten keine veränderte Anti-TT Subklassen-Antwort. Die Immunantwort dieser Kinder war fast immer durch die Bildung von Anti-TT IgG4 nach der Booster-Impfung gekennzeichnet.

Die verringerte Antikörperantwort bei Kindern mit früher Inselzell-Autoimmunität (persistierende Insel-Autoantikörper ab dem 9. Lebensmonat) wurde vor allem für IgG2 und IgG4 und nur nach der Booster-Impfung beobachtet. Ursächlich dafür könnte eine nicht stattfindende Verschiebung der zunächst IgG1-dominierenden Immunantwort zur IgG2- und IgG4- Immunantwort nach der Booster-Impfung sein. Denkbar wäre aber auch ein Defekt der Produktion von IgG2 bzw. IgG4 nach der

TT-Booster-Impfung. Unklar ist, ob es sich bei der verringerten IgG2- und IgG4-Antwort um eine angeborene oder eine durch die Inselzell-Autoimmunität erworbene Störung der Immunantwort handelt.

In Zusammenhang mit der veränderten Subklassenantwort bei Kindern mit früher Inselzell-Autoimmunität steht vermutlich eine veränderte Anti-TT Zytokinantwort der Kinder. Die zytokinabhängige Bildung von Antikörper-Subklassen wurde bereits in verschiedenen Studien untersucht. Kitani (1993) und Punnonen (1994) zeigten, dass die Bildung der Antikörper-Subklasse IgG4 sehr stark durch die Zytokine IL-4 und IL-13 angeregt wird. Da bei der Bestimmung der Anti-TT Antikörper-Subklassen eine starke Korrelation zwischen der Anti-TT IgG2 und IgG4 Immunantwort beobachtet werden konnte, wird vermutet, dass die gleichen Faktoren für die Produktion der beiden Isotypen verantwortlich sind. Für eine IL-4 abhängige Bildung der Subklassen IgG2 und IgG4 spricht des weiteren, dass nicht oder nur in geringer Anzahl detektierbare IgG2 und IgG4-Titer bei der Lyme-Borreliose beobachtet werden, deren Antigen-spezifische Immunantwort IFN γ dominiert ist (Widhe, 1998). Auch Sousa (1998) berichtet von einer ausschließlichen IgG1 Antwort bei der IFN γ dominierenden Immunantwort gegen Tuberkulose und einer IgG2 Antwort bei der IL-4 dominierenden Immunantwort gegen Lepra-Erreger. In einer von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchung der Immunantwort gegen das IFN γ induzierende Röteln-Virus wurden vor allem Röteln-spezifische IgG1 und kaum IgG2 und IgG4 Antikörper detektiert (Schmid, in press). Dies weist ebenfalls darauf hin, dass die Bildung von IgG4 nicht IFN γ vermittelt ist. Des weiteren konnten wir bei dieser Untersuchung, im Vergleich zur Anti-TT Antwort, keinen Unterschied in der Antikörper-Subklassen Antwort gegen das Röteln-Virus im Hinblick auf die Inselzell-Autoimmunität beobachten. Das bedeutet, dass Kinder mit persistierenden Insel-Autoantikörpern im Alter von 9 Monaten keine Störung der IFN γ dominierten Immunantwort gegen das Rötelnvirus aufweisen. All diese Befunde lassen vermuten, dass es sich bei der beobachteten veränderten Anti-TT Subklassenantwort bei Kindern mit früher Inselzell-Autoimmunität um einen zum Zeitpunkt der Booster-Impfung bestehenden Defekt der mit IL-4 assoziierten Antikörper-Antwort gegen das Impfantigen handelt.

4.1.2. Humorale und zelluläre Immunantwort gegen TT

Um die Zytokinabhängigkeit der Anti-TT Subklassenantwort zu prüfen, untersuchten wir die IgG-spezifische Subklassen-Antwort und das Zytokinprofil von in vitro stimulierten PBL gegen TT. Die Bestimmung des Zytokinprofils erfolgte dabei mittels der ELISpot-Technik. Die quantitative Analyse von Zytokinen nach in vitro Stimulation der Zellen ist sehr stark abhängig von der Sensitivität und Reliabilität der angewandten Methode. So spiegelt die Bestimmung der Zytokinspezifischen mRNA oder der intrazellulären Zytokine nicht unbedingt die Menge der tatsächlich sezernierten Zytokine wider, die mittels der ELISpot-Technik erfasst werden können (Mo, 1995; Howell, 1991). Auch die Anwendung der ELISA-Methode zur Bestimmung des Zytokinprofils scheint weniger sensitiv als die Methode des ELISpots zu sein (Ewen, 2001; Tanguay, 1994). Ein weiterer Vorteil der ELISpot-Technik ist die Möglichkeit, antigenspezifische Zellen auch in geringerer Frequenz zu detektieren (Kabilan, 1990; Alleva, 2001). Dies ist vor allem für die Untersuchung von autoreaktiven T-Zellen im humanen Typ 1 Diabetes von Bedeutung, die bisher aufgrund der sehr niedrigen Frequenz Insel-Antigenspezifischer T-Zellen im peripheren Blut wenig standardisiert ist (Atkinson, 2000). Erste Erfahrungen der Anwendung der Elispot-Methode beim humanen Diabetes wurden vor allem im Labor von Herrn Dr. B. Roep, Leiden (Niederlande) gesammelt. Im Rahmen einer Kooperation mit Herrn Dr. B. Roep wurde die ELISpot-Technik in unserem Labor eingeführt.

Durch die ELISpot-Technik war es möglich, die Sekretion der Zytokine IL-13, IL-4 und IFN γ TT-stimulierter Zellen des peripheren Blutes zu detektieren. Wie erwartet konnte eine starke Korrelation der antiinflammatorischen (Th2-) Zytokine IL-13 und IL-4 durch Stimulation der PBL mit TT beobachtet werden, beide Zytokine korrelierten jedoch nicht mit IFN γ , das der Th1-Immunität zugeordnet wird. Diese Untersuchung zeigte außerdem, dass die IL-4 und IL-13 Immunantwort gegen TT stark mit der Anti-TT IgG2 und Anti-TT IgG4 Antwort korreliert, nicht aber die IFN γ Anti-TT-Antwort. Des Weiteren konnten bei Personen mit einer starken IL-4 und IL-13 T-Zellantwort signifikant höhere Anti-TT IgG1, IgG2 und vor allem IgG4 Titer detektiert werden. Dieses Ergebnis stimmt mit einer bereits berichteten verstärkten Antikörper-Produktion durch die Zytokine IL-4 und IL-13 und einer von IL-4 abhängigen Produktion von IgG4 überein (Lundgren, 1989; Ishizaka, 1990; Nusslein, 1991; King, 1993).

Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse die Vermutung, dass die bei Kindern mit persistierenden Insel-Autoantikörpern ab dem 9. Lebensmonat verringerte Anti-TT IgG2 und IgG4 Immunantwort nach der Booster-Impfung durch eine verringerte IL-4 Antwort der T-Zellen bedingt ist. Dies weist darauf hin, dass bei Kindern mit früher Inselzell-Autoimmunität eine generelle Veränderung der Immunantwort zu beobachten ist, die durch eine Einschränkung der IL-4 vermittelten Immunantwort gekennzeichnet ist. Diese Ergebnisse zeigen auch, dass die Untersuchung der Immunantwort gegen Tetanus Toxoid dazu geeignet ist, Störungen der Immunantwort zu detektieren, die durch frühe Inselzell-Autoimmunität bedingt sind. Die Bestimmung der Antikörpersubklassen sowie der T-Zellantwort gegen Tetanus Toxoid stellt somit einen neuen Immunmarker dar, der bei Personen mit erhöhtem Diabetes-Risiko angewandt werden kann.

4.2. Analyse der Zöliakie-assoziierten Antikörper

Sowohl beim Typ 1 Diabetes als auch bei der Zöliakie spielen Krankheits-assoziierte (Auto-) Antikörper eine wichtige Rolle in der Früherkennung und Differentialdiagnose der Erkrankungen. Durch die Bestimmung der sehr sensitiven und spezifischen tTGC-Antikörper ist es möglich, Risiko-Populationen auf das Vorliegen von Zöliakie-assoziiierter Autoimmunität zu screenen. Aufgrund des gehäuft gemeinsamen Auftretens von Typ 1 Diabetes und Zöliakie findet der tTGCA-Test bei Personen mit Typ 1 Diabetes immer häufiger Anwendung. Der Test ermöglicht dabei die Diagnose der bei Personen mit Typ 1 Diabetes häufig auftretenden sogenannten „silenten“, symptomarmen Verlaufsform der Zöliakie.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Kollektive durch die Bestimmung der tTGCA auf das Vorliegen Zöliakie-assoziiierter Autoimmunität gescreent. Die Bestimmung der tTGCA erfolgte dabei durch einen Radio-Immuno-Assay (RIA). Untersuchungen zur Sensitivität des RIA zeigten, dass zur Bestimmung von tTGCA die Sensitivität und Spezifität des RIA dem des ELISA überlegen ist (Lampasona, 1998; Bazzigaluppi, 1999). Durch die in einem Testansatz kombinierte Messung von tTGCA-IgA und tTGCA-IgG kann die Sensitivität der IgG-Klasse und Spezifität der IgA-Klasse verbunden werden. Mit Hilfe des kombinierten Tests ist es möglich, auch Personen mit Zöliakie und IgA-Mangel, eine mit Zöliakie assoziierte Erkrankung, zu identifizieren. Hinzu kommt, dass dieser Test einfach in der Durchführung und Beurteilung ist. Aus diesen Gründen

erscheint die kombinierte Bestimmung der tTGCA-IgA und tTGCA-IgG als geeignete Screening-Methode großer Populationen. Der von Bazzigaluppi et al. (1999) entwickelte Combi-tTGCA Test wurde in Kooperation mit der Mailänder Arbeitsgruppe unter Leitung von Herrn Dr. Ezio Bonifacio in unserem Labor eingeführt.

4.2.1. Zöliakie-assoziierte Antikörper bei Personen mit Langzeit-Typ 1 Diabetes

Sowohl bei Patienten mit Typ 1 Diabetes als auch bei Patienten mit Zöliakie ist die Prävalenz neurologischer Erkrankungen erhöht. Vor allem bei Patienten mit Langzeit-Typ 1 Diabetes tritt die Neuropathie als Sekundärkomplikation des Typ 1 Diabetes auf. Als Ursache der neurologischen Erkrankungen bei Personen mit Zöliakie wird unter anderem die ungenügende Resorption essentieller Nährstoffe und ein daraus resultierender Vitaminmangel (Vitamin B12, E, D, Folsäure, Pyridoxin) vermutet (Cooke, 1984; Luostarinen, 1999). Deshalb ist die Entstehung neurologischer Erkrankungen vor allem bei Patienten mit stiller Zöliakie, die über lange Zeit nicht behandelt wird, vorstellbar. Ziel der Bestimmung der tTGCA bei Personen mit Langzeit-Typ 1 Diabetes war zu untersuchen, ob die bei Personen mit Langzeit-Typ 1 Diabetes auftretende autonome Neuropathie Folge einer unbehandelten Zöliakie und nicht des Typ 1 Diabetes ist.

Die Prävalenz der IgA spezifischen Antikörper gegen die tTGC betrug bei Patienten mit kardialer autonomer Neuropathie 5,4% und 7,1% bei Patienten ohne kardiale autonome Neuropathie. Die Prävalenz der IgG spezifischen Antikörper betrug 7,1% bei Patienten mit und 12,9% bei Patienten ohne kardiale autonome Neuropathie. Diese Zahlen entsprechen der Prävalenz Zöliakie-assoziiierter Antikörper bei Personen mit Typ 1 Diabetes (Cronin 1997, Not 2001, Seissler 1999b). Sie weisen jedoch nicht auf einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer stillen Zöliakie und kardialen autonomen Neuropathie hin. Da auch die tTGCA-Prävalenz bei Patienten mit und ohne diabetische Gastroparese, eine weitere Form der autonomen Neuropathie, nicht unterschiedlich war, lässt sich kein Zusammenhang zwischen einer unbehandelten Zöliakie und einer Gastroparese bei Personen mit Langzeit-Typ 1 Diabetes nachweisen.

Dennoch ist aufgrund der höheren Zöliakie-Prävalenz generell ein Screening der Zöliakie-assoziierten Antikörper bei Patienten mit Typ 1 Diabetes empfehlenswert. Das Ziel des Screenings ist dabei der frühzeitige Beginn der diätetischen Therapie der Zöliakie um sekundäre Beschwerden wie Wachstumsretardierung, Eisenmangelanämie und Osteoporose zu vermeiden und die Entwicklung weiterer Autoimmunerkrankungen zu verhindern (Ventura, 2000; Wortman, 1994).

4.2.2. Zöliakie-assoziierte Antikörper bei Personen der Münchner Familienstudie

Erstgradige Verwandte von Personen mit Typ 1 Diabetes haben im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ein erhöhtes Risiko, selber an Typ 1 Diabetes zu erkranken. Da die Assoziation des Typ 1 Diabetes und der Zöliakie teilweise auf genetische Faktoren zurückzuführen ist, ist anzunehmen, dass erstgradige Verwandte von Personen mit Typ 1 Diabetes auch ein erhöhtes Zöliakie-Risiko haben. Eine erhöhte Zöliakie-Prävalenz wurde bereits bei Kindern von Eltern mit Typ 1 Diabetes beobachtet (Hummel, 2000; Williams, 2001), wohingegen Jäger diesen Befund nicht bestätigten konnte (2001).

Ein Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob die Prävalenz Zöliakie-assoziiierter Autoimmunität bei erstgradigen Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes vom Verwandtschaftsverhältnis zur diabetischen Person bzw. vom Alter der untersuchten Person abhängig ist. Auch das gemeinsame Auftreten von Zöliakie-assoziierten und Diabetes-assoziierten Auto-Antikörpern sollte untersucht werden. Diese Fragestellungen sollten bei einem Kollektiv der Münchner Familienstudie beantwortet werden, die bei erstgradigen Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes das Auftreten von Inselzell-Autoimmunität untersucht. Sie unterscheidet sich von der BABYDIAB-Studie darin, dass nicht nur bei Kindern sondern auch bei Eltern und Geschwistern von Personen mit Typ 1 Diabetes Insel-Autoantikörper untersucht werden. Dadurch war dieses Kollektiv für die oben genannte Fragestellung gut geeignet.

Für das Gesamtkollektiv der erstgradigen Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes konnte eine erhöhte tTGCA-IgA-Prävalenz von 2,3% und tTGCA-IgG-Prävalenz von 7,8% ermittelt werden. Endomysium-Antikörper, die nur bei positivem tTGCA-IgA Befund getestet wurden, konnten bei 5/23 Personen (0,5% des Gesamtkollektivs) detektiert werden. Im Hinblick auf das Alter und das Verwandtschaftsverhältnis der untersuchten Personen zur Person mit Typ 1

Diabetes wurde kein signifikanter Unterschied der Häufigkeit positiver tTGCA festgestellt. Auch bei Personen mit Insel-Autoantikörpern war die Prävalenz der tTGCA-IgA und tTGCA-IgG nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu Personen ohne Insel-Autoantikörper. Insel-Autoantikörper positive Personen mit Progression zum Typ 1 Diabetes hatten jedoch zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation tendenziell häufiger positive tTGCA-IgA bzw. tTGCA-IgG-Titer als Insel-Autoantikörper positive Personen ohne Diabetes.

Da bei erstgradigen Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes, unabhängig vom Alter und vom Verwandtschaftsverhältnis, vorwiegend die tTGCA-IgG Prävalenz erhöht ist, ist zu überlegen, ob es sich bei diesen Personen um eine Autoimmunität gegen Transglutaminase handelt, die nicht mit der typischen Form der Zöliakie assoziiert ist. Eine Hypothese von Schuppan (2000) ist, dass die tTGC nicht nur bei der Pathogenese der Zöliakie sondern auch bei anderen Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Eine Freisetzung der ubiquitär vorkommenden intrazellulären tTGC wird durch Infektionen, Entzündungen oder metabolischen Stress getriggert. Das Enzym tTGC kann nicht nur Gliadine in ihrer Struktur verändern, sondern auch durch Kreuzreaktivität bzw. Deamidierung andere (Auto-) Antigene zu Neoantigenen verändern. Vorstellbar ist dies z.B. für Bakterien, Viren, Nahrungsproteine oder körpereigene Proteine. Aufgrund der bei erstgradigen Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes vorhandenen genetischen Prädisposition für eine Autoimmunerkrankung, z.B. in Form von HLA-Molekülen, könnte die Präsentation des Neoantigens durch Antigen-präsentierende Zellen ermöglicht werden. Es wird angenommen, dass T-Zellen diese Neoantigene als Fremdartigene erkennen, was zur Zerstörung von Gewebe oder Auto-Antikörperproduktion führt.

Wie bereits auch in anderen Untersuchungen beobachtet, hat die Inselzell-Autoimmunität keinen Einfluss auf die tTGCA-Prävalenz (Williams, 2001; Hummel, 2000; Meloni, 1999), jedoch können positive tTGCA-IgG besonders häufig zum Zeitpunkt der Diabetes-Manifestation gemessen werden (Williams, 2001; Lampasona, 1999). Eine Untersuchung von Lampasona zeigte (1999), dass dabei tTGCA-IgG häufiger mit HLA DRB1*04 (Diabetes-Risiko-Allel) und weniger mit dem Zöliakie-Risiko-Allel HLA DRB1*03 korrespondierten. Diese Beobachtung und die Abwesenheit von tTGCA-IgA und EMA, die sehr spezifisch für das Vorliegen einer Zöliakie sind, lässt auch hier vermuten, dass es sich nicht um einen mit der Zöliakie assoziierten Immunprozess handelt. Vorstellbar wäre, dass

das HLA DRB1*04 Allel während der Zerstörung der β -Zellen die Präsentation der in Inselzellen exprimierten tTGC durch Antigen präsentierende Zellen unterstützt. tTGCA-IgG in Abwesenheit von tTGCA-IgA bzw. EMA ohne vorliegenden IgA-Mangel könnten folglich ein generelles Zeichen des autoimmunen Zerstörungsprozesses der β -Zellen darstellen.

Um die Bedeutung der tTGCA-IgG Titer bei Diabetesmanifestation zu untersuchen, ist eine Nachuntersuchung der Personen mit Progression zum Typ 1 Diabetes vorgesehen. Dabei soll zum einen geklärt werden, ob es sich hierbei, wie bereits von Lampasona (1999) beschrieben, um transiente Antikörper handelt. Zum anderen soll auch prospektiv untersucht werden, ob die Zöliakie-assoziierte Autoimmunität bei Personen mit Inselzellautoimmunität häufiger erst nach Manifestation des Typ 1 Diabetes auftritt und ob, so wie von Collin (1989) berichtet, eine Beziehung zwischen der Diabetesdauer und dem Auftreten einer Zöliakie besteht.

Die Prävalenz der Endomysium-Antikörper in der von uns gescreenten Population ist vergleichbar mit Ergebnissen von Saukkonen (2001) und Jäger (2001), die keinen Unterschied der EMA-Prävalenz bei erstgradigen Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes im Vergleich zur Normalbevölkerung feststellen konnten. Sie ist allerdings geringer als von Hummel (2000) und kürzlich erst von Williams (2001) beschrieben. Ein direkter Vergleich mit Ergebnissen anderer Untersuchungen ist jedoch aufgrund der unterschiedlichen Testmethoden und der unterschiedlichen Percentilen, die durch die Untersuchung von Kontrollgruppen als Grenzwert für die Antikörperpositivität verwendet werden, schwierig. Mögliche Gründe für die niedrigeren EMA-Prävalenz sollen dennoch diskutiert werden. Zum einen könnte das von uns ausgewählte Screeningverfahren, das die Bestimmung der EMA ausschließlich bei Personen mit positiven tTGCA-IgA vorsieht, ursächlich für eine geringere Detektion der EMA sein. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass etwa 18% der EMA-positiven Personen durch dieses Screeningverfahren nicht erkannt werden (Pilgram, Dissertation 2000). Durch die Anwendung der kombinierten Testung von tTGCA-IgA und tTGCA-IgG war es jedoch möglich, bei zwei tTGCA-IgG-positiven Personen mit negativen tTGCA-IgA Titern einen IgA-Mangel zu identifizieren.

In der hier beschriebenen Untersuchung wurden auch einige Personen mit positiven tTGCA-IgA detektiert, die keine Endomysium-Antikörper aufwiesen. Verlaufsuntersuchungen an Zöliakie-Patienten zeigen, dass die mittels Radio-

Immuno-Assay gemessenen tTGCA-IgA früher detektiert und unter glutenfreier Ernährung länger messbar sind als die mittels Immunofluoreszenz gemessenen EMA (nicht veröffentlichte Daten). Somit zeigen die bei drei Personen beobachteten persistierenden tTGCA-IgA in Abwesenheit von EMA vermutlich das Vorliegen einer latenten Zöliakie an, die jedoch nur durch eine Dünndarm-Biopsie eindeutig diagnostizierbar ist. Eine weitere Beobachtung der Antikörperwerte, vor allem der EMA, ist bei diesen Personen anzuraten.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchung, dass erstgradige Verwandte von Personen mit Typ 1 Diabetes unabhängig von ihrem Alter und dem verwandtschaftlichen Verhältnis eine erhöhte Prävalenz der tTGCA-IgA und -IgG aufweisen. Deshalb ist generell ein Screening der tTGCA bei erstgradigen Verwandten von Personen anzuraten.

4.3. Primärprävention des autoimmunen Diabetes bei der NOD-Maus

Das in Getreide enthaltene Gluten ist als Auslöser der Zöliakie bereits bekannt. Aufgrund einer Reihe von epidemiologischen Untersuchungsergebnissen (Cronin, 1997; Lepore, 1996; Corazza, 1995; Collin, 1994; Ventura, 1999) wird diskutiert, dass Gluten auch in der Entstehung des Typ 1 Diabetes eine Rolle spielt. Deshalb sollte untersucht werden, ob durch die Elimination von Gluten aus der Nahrung die Entstehung von Inselzell-Autoimmunität und Autoimmundiabetes bei der NOD-Maus verhindert werden kann. Der Effekt der glutenfreien Ernährung wurde im Vergleich zu anderen Nahrungsmodulationen, nämlich einer Vitamin D- bzw. Fischöl-Supplementierung untersucht.

4.3.1. Präventive Wirkung der glutenfreien Ernährung im Vergleich zu anderen Nahrungsfaktoren auf die Entwicklung eines autoimmunen Diabetes im Tiermodell

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die glutenfreie Ernährung der Tiere ein signifikante Verringerung des kumulativen Diabetes-Risikos erzielt werden. Dieses betrug bei den während der Schwangerschaft und dann von Geburt an glutenfrei ernährten Tieren während einer Beobachtungszeit von 32 Wochen 45,5%. Im Vergleich dazu betrug das kumulative Diabetes-Risiko in der Kontrollgruppe, die Standardfutter während des ganzen Versuchs erhielt (Kontroll-Gruppe) 85,7%. Dabei konnte eine signifikante Verlängerung der medianen diabetesfreien Überlebenszeit von 20,7 Wochen in der Kontrollgruppe auf 31,7 Wochen in der Gruppe der von Geburt an glutenfrei ernährten Tiere beobachtet werden. Auch Funda (1999) konnte einen ähnlichen Effekt durch die glutenfreie Ernährung der Zuchttiere während der Schwangerschaft und Stillzeit sowie der NOD-Mäuse ab dem Zeitpunkt der Geburt beobachten. Im Vergleich dazu zeigten Untersuchungen von Elliott (1988) und Coleman (1990) an NOD-Mäusen keinen wesentlichen Anstieg der Diabetes-Inzidenz durch eine Zugabe von Gluten zu einer hydrolisierten Nahrung auf Casein-Basis. Erwähnenswert ist dabei, dass bei der Untersuchung von Elliott auch die Kontrolltiere, die mit normalem, nicht hydrolisiertem getreidehaltigem Futter behandelt wurden, ein sehr niedriges Diabetes-Risiko von 30% zeigten (das Diabetes-Risiko der Kontrolltiere betrug in

unserer Untersuchung 85,7%). In der Untersuchung von Coleman wurde die glutenhaltige Nahrung den Tieren erst ab dem Alter von 4-5 Wochen gefüttert. Möglich ist, dass dadurch die „sensible“ Phase verpasst wurde, in der die Entwicklung des Autoimmundiabetes durch Umwelt- und Ernährungsfaktoren beeinflusst wird.

Als eine Kontrolle zu den lebenslang glutenfrei ernährten Tiere wurde eine Gruppe von Tieren gebildet, die zwar während der Schwangerschaft und Stillzeit mit glutenfreiem Kombifutter, jedoch nach der Stillzeit (Alter der Mäuse: 3 Wochen) mit glutenhaltiger Nahrung ernährt wurde. Die Tiere dieser Gruppe zeigten kein signifikant geringeres kumulatives Diabetesrisiko im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Tiere, die ab der Zeugung mit glutenhaltigem Futter ernährt wurden). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die glutenfreie Ernährung der Tiere während Schwangerschaft und Stillzeit bis zum Alter von 3 Wochen nicht ausreichend ist, die Entwicklung des autoimmunen Diabetes zu verhindern.

Die Fragen, wie lange die Tiere nach der Geburt glutenfrei ernährt werden müssen, um den präventiven Effekt zu erzielen bzw. ob für die Prävention des Autoimmundiabetes eine glutenfreie Ernährung der Muttertiere während der Schwangerschaft und Stillzeit notwendig ist, konnten durch diese Untersuchung noch nicht eindeutig beantwortet werden und sind Gegenstand eines geplanten Nachfolgeprojektes.

Im Vergleich zur glutenfreien Ernährung zeigte die Behandlung mit Fischöl keinen signifikanten protektiven Einfluss auf die Diabetes-Entwicklung bei der NOD-Maus. So betrug das kumulative Diabetes-Risiko in der Gruppe der Tiere mit Fischölsupplementiertem Futter 70,0% im Vergleich zu 85,7% bei den mit Standard-Nahrung gefütterten Kontrolltieren. Die mediane diabetesfreie Überlebenszeit war bei beiden Gruppen vergleichbar (17,6 vs. 20,7 Wochen). Ähnliche Daten wurden auch durch die lebenslange Behandlung der Tiere mit dem Fischölhaltigen kombinierten Futter erzielt (kumulatives Diabetes-Risiko 71,4%; mediane diabetesfreie Überlebenszeit: 21,6 Wochen). Linn (1989) berichtet hingegen von einer Untersuchung des LDSTZ-D-Tiermodells (low-dose of streptozocin-induced diabetes), bei der durch Fischöl-Supplementierung Veränderungen des Immunsystems erzielt wurden, die das Ausmaß der Insulitis verringern konnten. Das dabei verwendete Futter hatte einen Fischölgehalt von 20% der Gesamtenergie. Im Vergleich dazu betrug der prozentuale Anteil des Fischöls am

Gesamtenergiegehalt des Futters bei unserer Untersuchung 8,6% (im Vergleich zu 0,8% des Kontrollfutters). Die Konzentration der n-3 Fettsäuren bzw. der Quotient von n-3:n-6 Fettsäuren ist sicherlich ausschlaggebend für die Beeinflussung von Komponenten des Immunsystems. Die von uns verwendete Konzentration war niedriger als von Linn et al. beschrieben (1989), wenngleich wir eine Veränderung der n-3:n-6 Fettsäurezusammensetzung von 1:7 in der Kontrollgruppe auf 2:1 in den mit Fischöl behandelten Gruppen durchführten. Zugleich muss aber auch bedacht werden, dass der Verschiebung der Fettsäurezusammensetzung zu Gunsten der n-3 Fettsäuren Grenzen gesetzt sind, da der Quotient Einfluss auf die neuronale Entwicklung und das Körpergewicht der Nachkommen hat (Amusquivar, 2000; Wainwright, 1997).

Eine weitere Untersuchung zur präventiven Wirkung von Fischöl auf die Entwicklung des autoimmunen Diabetes wurde von Hoorfar et al. (1992) beschrieben. Diese ist allerdings nicht unmittelbar vergleichbar mit unserer Untersuchung, da die Grundlage der Versuchsnahrung eine hydrolisierte Nahrung bildete, die schon zuvor im Tiermodell als protektiv im Hinblick auf die Entwicklung des Diabetes beschrieben wurde (Scott, 1983; Elliott, 1984). Der Anteil der n-3 Fettsäuren, bezogen auf das Gewicht der Nahrung, betrug dabei 4,25% (im Vergleich dazu setzten wir 3% des Gesamtgewichts an n-3 Fettsäuren ein). Die Behandlung der Tiere mit dieser Nahrung führte im Vergleich zur einer Behandlung der Tiere mit hydrolysierte Nahrung ohne Fischöl-Zusatz nicht zu einer weiteren Verringerung der Diabetes-Inzidenz.

Eine Ursache für die ausbleibende präventive Wirkung der Fischöl-Supplementierung könnte die geringe Stabilität der n-3 Fettsäuren gegen Oxidation unter Lagerbedingungen sein. Die Stabilität von kommerziell hergestellter Fischölnahrung für Labortiere wurde von Lytle untersucht (1992). Dabei führte eine 45tägige Lagerung der Fischölnahrung im Gefrierschrank nach einer viertägigen Lagerung bei Zimmertemperatur nicht zu einer signifikanten Veränderung der Fettsäurezusammensetzung. Das von uns verwendete Futter wurde sofort nach Ankunft in kleinen Portionen bei -20°C tiefgefroren. Aus diesem Grund vermuten wir, dass das Fischöl unter den beschriebenen Bedingungen stabil war.

Auch durch die Vitamin D₃-Supplementierung war es nicht möglich, die Entwicklung des Autoimmundiabetes bei der NOD-Maus signifikant zu

beeinflussen. Das kumulative Diabetes-Risiko betrug sowohl bei den Vitamin D-reich ernährten Mäusen als auch bei den Tieren, die nach der Trennung von den Muttertieren mit der normalen, Vitamin D-ärmeren Standardnahrung gefüttert wurden, 66,7%. Das von uns verwendete Futter hatte eine Vitamin D₃ Konzentration von 2000 I.E./kg im Vergleich zu einer Konzentration von 600 I.E./kg des Kontroll-Futters. Die tägliche Zufuhr von Vitamin D₃ betrug somit in unserer Untersuchung bei den Versuchstieren durchschnittlich 6,9 I.E. und bei den Kontrolltieren 1,9 I.E. Diese Zufuhr war offensichtlich nicht ausreichend, um den autoimmunen Zerstörungsprozess der β -Zellen zu verhindern.

Im Vergleich dazu berichtet Mathieu (1994) von einer Senkung der Diabetes-Inzidenz von 56% in der Kontrollgruppe auf 8% in der Versuchsgruppe durch die Zufuhr von 2000 I.E./kg Futter und einer zusätzlichen intraperitonealen Gabe von 1,25(OH)₂D₃ in einer Konzentration von 5 μ g/kg Körpergewicht jeden zweiten Tag. Die Behandlung der Tiere mit 1,25 (OH)₂D₃ hatte allerdings eine Kalzämie und eine Erhöhung des Osteocalcins zur Folge. Teilweise konnte eine Abnahme des Kalziumgehalts der Knochen um 50% beobachtet werden, die bei einem Tier zu einer Spontanfraktur des Femur führte.

Unsere Untersuchung hatte als Ziel, die präventive Wirkung von Vitamin D₃ in einer Konzentration zu untersuchen, die nebenwirkungsfrei und dadurch auch auf den Menschen, vor allem auf Kleinkinder, übertragbar ist. Die momentane Empfehlung der täglichen Vitamin D-Supplementierung zusätzlich zur Säuglingsernährung beträgt in Deutschland bei reifgeborenen Säuglingen 500 I.E. Vitamin D₃ während des ersten Lebensjahres zur Rachitis-Prophylaxe. Häufig wird diese Empfehlung auch noch für das zweite Lebensjahr gegeben. Um Nebenwirkungen, wie z.B. eine Nephrocalcinose zu vermeiden, sollten nicht mehr als 1000 I.E. Vitamin D₃ täglich supplementiert werden (Kruse, 1995). Ob mit dieser vertretbaren Dosis eine Prävention des humanen Typ 1 Diabetes erzielt werden kann, sollte im Rahmen einer Pilotstudie untersucht werden.

Durch die Kombination der drei Nahrungsfaktoren (glutenfrei, Vitamin D und Fischöl-Supplementierung) war es nicht möglich, das kumulative Diabetes-Risiko der Tiere signifikant zu verringern. Dieses betrug 66,7% und war damit etwas höher als bei den mit ausschließlich glutenfreier Nahrung behandelten Tiere und vergleichbar mit den ausschließlich mit Fischöl oder Vitamin D behandelten Gruppe sowie der Glutenfrei-Kontroll- und Vitamin D-Kontroll-Gruppe. Erwartet

hätten wir einen ähnlichen oder sogar stärkeren protektiven Einfluss der kombinierten Diät auf die Entwicklung des autoimmunen Diabetes im Vergleich zur glutenfrei ernährten Gruppe. Unklar ist, ob einer der zusätzlichen Faktoren die präventive Wirkung der glutenfreien Ernährung vermindert hat.

4.3.2. Präventive Wirkung der glutenfreien Ernährung im Vergleich zu anderen Nahrungsfaktoren auf die Inselzell-Autoimmunität

Dieses Projekt hatte nicht nur als Ziel, den Einfluss einer veränderten Ernährung auf die Entwicklung eines Autoimmundiabetes bei der NOD-Maus zu untersuchen. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob eine Ernährungsmodulation Einfluss auf die Inselzell-Autoimmunität hat. Bei den in dieser Arbeit beschriebenen NOD-Mäusen wurden IAA im Alter von 10 und 18 Wochen und bei Versuchende (32 Wochen) bzw. Diabetes-Manifestation mittels Radioliganden-Bindungs Assay bestimmt. Im Rahmen eines internationalen Workshops wurde diese Methode zur Bestimmung von Insulin-Autoantikörpern im Vergleich zur ELISA-Methode als sehr sensitiv beurteilt (Bonifacio, 2001). Durch die zusätzliche Bestimmung der Insulin-Autoantikörper Subklassenantwort sollte der Phänotyp der Immunantwort überprüft werden. Die Bestimmung von Antikörper-Subklassen zur Charakterisierung der Immunantwort stellt bei der NOD-Maus bereits eine etablierte Methode dar, da bei der Maus die Zytokin-abhängige Bildung von Antikörpersubklassen nachgewiesen werden konnte (Snapper, 1987; Snapper, 1995; Finkelman, 1990).

Insulin-Autoantikörper

In der (mit Standardnahrung ernährten) Kontrollgruppe entwickelten 12 von 14 Tieren einen Autoimmundiabetes, von 11 diabetischen Tieren waren Blutproben für die IAA-Bestimmung verfügbar. Alle fünf Tiere (100%), die im Alter von 10 Wochen IAA-positiv waren, entwickelten einen Diabetes. Bei 8/11 (73%) diabetischen Kontrolltieren konnten zu mindestens einem Untersuchungs-Zeitpunkt positive IAA-Titer nachgewiesen werden. Drei von fünf Tieren (60%) ohne IAA entwickelten einen Diabetes. Abiru (2001) berichtet von ähnlichen Ergebnissen bei unbehandelten NOD-Mäusen. So hatten die von ihm untersuchten Tiere, die bis zur achten Lebenswoche IAA entwickelten, ebenfalls

ein höheres Risiko (90%), einen Diabetes zu entwickeln. Bei Tieren mit positiven IAA im Alter von 12 bzw. 16 Wochen betrug das Diabetes-Risiko 70%, und auch er konnte beobachten, dass ca. 40% der IAA-negativen Tiere einen Diabetes entwickelten. Im Vergleich zu den Ergebnissen von Abiru (2001) und Yu (2000) waren sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den Interventionsgruppen nicht alle Tiere zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation IAA-negativ. Bei vier untersuchten Tieren (Fischöl-Gruppe, Vitamin D-Gruppe, Vitamin D-Kontrollgruppe) waren positive IAA-Titer sogar erst zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation nachweisbar. Diese Beobachtungen widersprechen der Hypothese, dass der Verlust von IAA zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation mit dem Verlust der β -Zellmasse assoziiert ist (Abiru, 2001).

Das geringere kumulative Diabetes-Risiko in der Glutenfrei-Gruppe war nicht mit geringeren oder negativen IAA-Titern der Tiere dieser Gruppe assoziiert. Die Gruppe der glutenfrei ernährten Tiere zeigte jedoch ein verändertes Ergebnis für die IAA-Titer. Im Alter von 10 Wochen waren bei vier NOD-Mäusen positive IAA-Titer detektierbar. Davon entwickelten drei Mäuse im Verlauf der Untersuchung keinen Diabetes. Zwei dieser Mäuse hatten IAA-Titer $>10 \mu\text{U/ml}$ Serum. Titer in dieser Höhe wurden insgesamt in allen Gruppen bei 7/98 Mäusen gemessen, wobei die fünf mit glutenhaltigem Futter ernährten Tiere bis zur 16. Lebenswoche einen Diabetes entwickelten. Bei den drei glutenfrei ernährten Diabetesfreien Tiere mit positiven IAA-Titern im Alter von 10 Wochen fielen die IAA-Titer bis zur 18. Lebenswoche auf negative Werte ab. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass durch die glutenfreie Ernährung ein noch unbekannter Mechanismus bei Tieren trotz hoher IAA-Titer die Manifestation des Diabetes verhindert bzw. verzögert. Auch bei der Fischöl-Kontrollgruppe, der Vitamin D-Gruppe, der Vitamin D-Kontrollgruppe und der Glutenfrei-Kontrollgruppe konnte im Alter von 10 Wochen ein bzw. zwei Tiere mit positiven IAA-Titern beobachtet werden, die im Verlauf der Untersuchung keinen Diabetes entwickelten. Die Titer lagen dabei aber meist nur leicht über dem Grenzwert für Positivität. Es ist anzumerken, dass auch diese Tiere während den ersten 3 Lebenswochen kein Gluten erhalten hatten.

Insulin-Autoantikörper Isotypen

Durch die Bestimmung von Antikörpersubklassen ist es möglich, den Phänotyp der Immunantwort näher zu charakterisieren. Bei NOD-Mäusen wird eine

Produktion von IgG1, IgG2b und IgE dem Th2-Phänotyp und die Bildung von IgG2a dem Th1-Phänotyp zugeordnet. Bislang durchgeführte Untersuchungen des IAA-Subklassenprofils bei NOD-Mäusen zeigten, dass die spontane IAA-Antwort vorwiegend von den Subklassen IgG1 und IgE dominiert ist (Abiru, 2001; Koczwara, 2000). Dies weist auf ein Überwiegen der Th2-Immunantwort hin. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch Untersuchungen der zellulären Immunität in NOD-Mäusen, die darauf hindeuten, dass das frühe Stadium der Insulinitis Th2-dominiert und aus diesem Grunde nicht destruktiv ist (Wegmann, 1994; Shimada, 1996). Kurz vor der Diabetesmanifestation konnten Shimada et al. (1996) eine Veränderung des Zytokinprofils von CD4+ Zellen in Richtung Th1-Immunantwort feststellen. Das bisher beobachtete „Verschwinden“ der IAA zum Zeitpunkt der Diabetes-Manifestation wurde als Ende der Th2-Dominanz gedeutet. Die Untersuchung der IAA-Subklassen zeigte in allen Gruppen eine starke IgG1 und auch IgG2b-Antwort und nur eine sehr geringe IgG2a-Antwort der IAA-positiven Tieren im Alter von 10 Wochen und ist dadurch vergleichbar mit den oben erwähnten Ergebnissen. Es konnte allerdings im Verlauf der Untersuchung (von der 10. bis zur 18. Woche) in allen Gruppen ein Anstieg des prozentualen Anteils von IgG2a an der Gesamt-IAA-Antwort beobachtet werden. Und nahezu alle Tiere, die zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation positive IAA-Titer hatten, zeigten im Vergleich zu vorhergehenden Werten einen Anstieg des prozentualen IgG2a-Anteils. Dieser Anstieg unterstützt die Beobachtung der Veränderung des Zytokinprofils vor oder zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation.

Beim Vergleich des Subklassenprofils der einzelnen Interventions- und Kontroll-Gruppen ist vor allem im Alter von 10 Wochen ein Unterschied erkennbar. Bei den IAA-positiven Tieren der Glutenfrei- und der Fischöl-Kontrollgruppe ist im Alter von 10 Wochen fast ausschließlich IgG1 detektierbar, der Anteil von IgG2a und IgG2b liegt unter 3%. Interessanterweise war das kumulative Diabetes-Risiko der Glutenfrei-Gruppe signifikant und das der Fischölkontroll-Gruppe tendenziell geringer als bei der Kontroll-Gruppe. Vor allem die drei IAA-positiven Tiere der Glutenfrei-Gruppe, die keinen Diabetes entwickelten, bildeten nahezu zu 100% IgG1. Dies deutet auf eine starke Dominanz der „protektiven“ Th2-Immunität bei diesen Mäusen hin.

Durch eine zusätzliche Untersuchung der von Lymphozyten der Milz sezernierten Zytokine nach Stimulation mit Insulin könnte die Immunantwort der untersuchten Tiere näher charakterisiert werden. Dieses Zell-Material wurde im Rahmen dieser

Untersuchung gesammelt und eingefroren und steht für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

4.3.3. Einfluss der Nahrungsmodulation auf die Bildung von Gliadin-Antikörpern

Gliadine stellen eine Proteinfraction des Glutens dar und sind bekannte Trigger der Zöliakie. Bei nahezu jedem unbehandelten Patienten mit Zöliakie lässt sich eine Immunreaktivität gegen Gliadin in Form von Gliadin-Antikörpern detektieren. Auch bei Mäusen wurden bereits Gliadin-Antikörper im Zusammenhang mit der Erforschung der Zöliakie gemessen, jedoch noch nie bei NOD-Mäusen (Troncone, 1991; Troncone, 1994; Rossi, 1999).

Da durch eine Elimination von Gluten aus der Nahrung das Diabetes-Risiko verringert werden konnte, und dadurch Gliadin auch als möglicher Trigger des Autoimmundiabetes bei der NOD-Maus vermutet wird, sollte untersucht werden, ob bei NOD-Mäusen generell eine Immunantwort gegen das orale Antigen Gliadin zu beobachten ist. Zur Bestimmung der Gliadin-Antikörper in der Maus wurde das beim Menschen bereits etablierte ELISA-Testverfahren angewandt. Wie erwartet zeigten die glutenfrei ernährten Tiere nur sehr geringe Gliadin-Antikörper-Titer, die als negativ zu werten sind. Dagegen konnten in den mit glutenhaltigem Futter ernährten Gruppen Tiere mit hohen Gliadin-Antikörper-Titern beobachtet werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass es sich bei dem in Getreide enthaltenen Gliadin um eine stark immunogene Substanz handelt. Dieser Befund und die Tatsache, dass Darmmucosa-assoziierte Lymphozyten in Pankreasschnitten von NOD-Mäusen nachgewiesen werden konnten, lässt vermuten, dass das Darm-assoziierte Immunsystem bei der Entwicklung des Diabetes in der NOD-Maus eine Rolle spielt (Hänninen, 1996).

Um die Rolle des Gliadins in der Entstehung des Autoimmundiabetes bei der NOD-Maus näher zu spezifizieren, sind weitere Untersuchungen geplant. Dabei soll zum einen der Einfluss des Alters bei Glutenexposition, der Dauer der Glutenexposition und der Menge des zugeführten Gliadins auf das Diabetes-Risiko, die Inselzell-Autoimmunität und die Bildung von Gliadin-Antikörpern bei der NOD-Maus untersucht werden. Aber auch Untersuchungen des Darm-assoziierten Immunsystems sind für die Aufklärung der pathogenetischen Mechanismen unerlässlich.

4.4. Ausblick: Bedeutung der Ergebnisse für präventive Strategien beim Menschen

Auf der Basis der hier erhobenen Ergebnisse und der Ergebnisse der unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Ziegler durchgeführten BABYDIAB-Studie wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Pilot-Studie zur Primärprävention des Typ 1 Diabetes konzipiert und initiiert. Ziel dieser Studie ist, bei einem ausgewählten Hochrisikokollektiv die Entwicklung von Insel-Autoantikörpern im frühen Kindesalter und des Typ 1 Diabetes durch eine Ernährungsintervention zu verhindern.

Die Tatsache, dass die Glutenelimination bei der NOD-Maus zur Verzögerung und Verringerung des kumulativen Diabetesrisikos führt, sowie die Ergebnisse verschiedener epidemiologischer Untersuchungen, die auf Gluten als möglichen Trigger der beiden Autoimmunerkrankungen Zöliakie und Typ 1 Diabetes hinweisen, wurden bei der Konzeption der Interventionsstudie berücksichtigt. In die Studie werden Kinder mit einem Elternteil bzw. Geschwister mit Typ 1 Diabetes und den Diabetes-assoziierten HLA Risikogenotypen *DR3/4*, *DQB1*57non-Asp* oder *DR4/4*, *DQB1*57non-Asp* sowie Kinder mit dem HLA Genotyp *DR3/3*, *DQA1*0501*, *DQB1*02*, der mit der Bildung Zöliakie-spezifischer Antikörper assoziiert ist, eingeschlossen. Bei diesen Kindern wird eine Elimination von Gluten in der Ernährung während der ersten 12 Lebensmonate durchgeführt. Im Rahmen dieser Studie soll zum einen der Einfluss dieser Ernährungsmodulation auf die Diabetes-assoziierte Autoimmunität untersucht werden. Da diese Arbeit zeigte, dass erstgradige Verwandte von Personen mit Typ 1 Diabetes eine erhöhte Prävalenz Zöliakie-assoziiierter Antikörper aufweisen, soll auch der Einfluss der veränderten Ernährung auf die Entwicklung von Zöliakie-assoziiierter Autoimmunität untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Die Autoimmun-Erkrankungen Typ 1 Diabetes und Zöliakie sind in ihrer Pathogenese und auch in den Ursachen, die für ihr gehäuft gemeinsames Auftreten verantwortlich sind, bis heute noch nicht ausreichend erforscht. Dadurch besteht bislang keine Möglichkeit, die Erkrankungen durch Interventionsmaßnahmen erfolgreich zu verhindern. Das Ziel dieser Arbeit war deshalb, durch die Untersuchung der humoralen und zellulären Immunantwort den Autoimmunprozess des Typ 1 Diabetes und der Zöliakie und insbesondere die Assoziation der beiden Erkrankungen näher zu charakterisieren.

Zunächst wurden grundlegende Immunphänomene der initialen Phase des Prä-Typ 1 Diabetes und der Zöliakie analysiert, indem bei Klein-Kindern von Eltern mit Typ 1 Diabetes der Einfluss von Inselzell- und Zöliakie-assoziiierter Autoimmunität auf die humorale und zelluläre Immun-Reaktion gegen das nicht krankheitsspezifische Antigen Tetanus Toxoid, welches routinemäßig im Kleinkindalter geimpft wird, untersucht wurde.

Durch die Messung von Antikörpern gegen das Zöliakie-assoziierte Antigen Gewebe-Transglutaminase C wurde untersucht, ob die Zöliakie-assoziierte Autoimmunität bei der mit Langzeit-Typ 1 Diabetes einhergehenden Komplikation der autonomen Neuropathie eine Rolle spielt. Des Weiteren wurde die Prävalenz der Zöliakie-assoziierten Autoimmunität und deren Einfluss auf die Entwicklung von Inselzell-Autoimmunität bei erstgradigen Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes bestimmt.

Im nächsten Schritt wurde im Tiermodell des Typ 1 Diabetes, der NOD-Maus, untersucht, welche Rolle das in Getreide enthaltene Gluten im Vergleich zu anderen Ernährungsfaktoren bei der Entstehung des autoimmunen Diabetes spielt. Dabei wurde der Einfluss einer veränderten Ernährung sowohl auf das Diabetes-Risiko als auch auf die Inselzell-Autoimmunität und die Bildung von Gliadin-Antikörpern bestimmt.

Aufbauend auf die Ergebnisse der Arbeit wurden grundsätzlich neue Ansätze zur Prävention des Typ 1 Diabetes erarbeitet.

Es ergaben sich folgende Befunde:

- 1.) Zur Klärung der Frage, ob bei Menschen mit Typ 1 Diabetes und Zöliakie die initiale Immunantwort generell verändert ist, wurde ein Kollektiv prospektiv

verfolgter Kinder von Eltern mit Typ 1 Diabetes hinsichtlich ihrer humoralen und zellulären Immunantwort gegen Tetanus Toxoid untersucht. Die Analyse der Anti-TT Subklassenantwort zeigte, dass die frühe Inselzell-Autoimmunität (persistierende Antikörper ab dem 9. Lebensmonat) die Immunantwort gegen TT beeinflusst. So hatten Kinder mit früher Inselzell-Autoimmunität signifikant geringere Anti-TT IgG2 und IgG4-Titer nach der Booster-Impfung als Kinder, die erst ab dem Alter von 2 Jahren persistierende Insel-Autoantikörper oder Zöliakie-assoziierte Antikörper entwickelten oder Insel-Autoantikörper negative Kinder. Durch die vergleichende Analyse der zellulären und humoralen Immunantwort gegen TT konnte gezeigt werden, dass die verminderte Subklassenantwort bei Kindern mit früher Inselzell-Autoimmunität mit einem veränderten Zytokinprofil Antigen-spezifischer T-Zellen zusammenhängt. Diese Untersuchung zeigte, dass Personen mit einer starken IL-4 bzw. IL-13 Immunantwort gegen TT signifikant höhere Anti-TT IgG4 Titer aufweisen und dass die IL-4 Antwort mit der IgG4-Antwort gegen TT korreliert. Folglich kann man davon ausgehen, dass die verminderte Produktion von Anti-TT IgG4 bei Kindern mit früher Inselzell-Autoimmunität durch eine verminderte IL-4 Immunantwort gegen TT bedingt ist. Diese Befunde deuten auf eine durch frühe Inselzell-Autoimmunität verursachte generelle Einschränkung der IL-4 vermittelten Immunantwort hin, die sich nicht nur gegen Diabetes-assoziierte Antigene sondern auch gegen Impfantigene richtet. Die Bestimmung der Immunantwort gegen TT stellt somit einen neuen Immunmarker dar, der Auskunft über eine durch Inselzell-Autoimmunität bedingte generelle Störung der Immunantwort gibt.

- 2.) Die Untersuchung der Transglutaminase C - Antikörper bei 141 Patienten mit Langzeit-Typ 1 Diabetes zeigte eine erhöhte Prävalenz der tTGCA-IgA (6,4%) und tTGCA-IgG (10,6%) in dieser Population verglichen mit Werten, die für die Normalbevölkerung beschrieben werden. Dieses Ergebnis spiegelt das hohe Zöliakie-Risiko bei Personen mit Typ 1 Diabetes wider. Die Prävalenz der tTGCA war dabei vergleichbar bei Patienten mit Langzeit-Typ 1 Diabetes und kardialer autonomer Neuropathie bzw. diabetischer Gastroparese und bei Patienten mit Langzeit-Typ 1 Diabetes ohne autonome Neuropathie. Es ist folglich davon auszugehen, dass eine unbehandelte Zöliakie nur sehr selten die Ursache für eine autonome Neuropathie bei Patienten mit Typ 1 Diabetes ist.

3.) Die Untersuchung der tTGCA bei 1013 erstgradigen Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes führte zu folgenden neuen Erkenntnissen: erstgradige Verwandte von Personen mit Typ 1 Diabetes zeigen eine erhöhte Prävalenz der tTGCA-IgA (2,3%) und der tTGCA-IgG (7,8%), die unabhängig vom Alter oder verwandtschaftlichen Verhältnis der untersuchten Personen zur Person mit Typ 1 Diabetes beobachtet werden kann. Auch das Vorhandensein von Insel-Autoantikörpern hatte keinen Einfluss auf die tTGCA-Prävalenz. Aus diesem Grund ist generell bei allen erstgradigen Verwandten von Personen mit Typ 1 Diabetes ein Zöliakie-Screening empfehlenswert.

4.) Die lebenslange glutenfreie Ernährung der NOD-Mäuse führte im Vergleich zur glutenhaltigen Standard-Ernährung der Tiere zu einer signifikanten Verringerung des kumulativen Diabetes-Risikos von 85,7% auf 45,5% und zu einer signifikanten Verlängerung der medianen diabetesfreien Überlebenszeit von 20,7 auf 31,7 Wochen. Die Zugabe von Vitamin D und Fischöl zeigte dagegen in der von uns angewandten Dosierung keinen Einfluss auf die Entwicklung eines Autoimmundiabetes bei der NOD-Maus.

Das geringere kumulative Diabetes-Risiko der Tiere in der Glutenfrei-Gruppe war jedoch nicht mit geringeren oder negativen IAA-Titern der Tiere assoziiert. So konnten auch bei glutenfrei ernährten Tieren im Alter von 10 Wochen positive IAA detektiert werden. Im Vergleich zu den Tieren der anderen Behandlungs- bzw. Kontrollgruppen waren diese jedoch nicht mit einer schnellen Diabetes-Progression assoziiert. Das bedeutet, dass durch die glutenfreie Ernährung ein bislang unbekannter Mechanismus bei Tieren trotz hoher IAA-Titer die Manifestation des Diabetes verhindert bzw. verzögert.

Die Analyse der IAA-Subklassen zeigte bei den Tieren aller Gruppen ein Dominieren von Th2 vermittelten IgG1 bzw. IgG2b-Antikörpern bei der frühen Immunantwort gegen Insulin. Besonders auffällig war der hohe prozentuale IAA-IgG1-Anteil im Alter von 10 Wochen bei den glutenfrei ernährten Mäusen, die im Verlauf keinen Diabetes entwickelten. Insgesamt konnte bei den diabetischen Tieren aller Gruppen mit zunehmendem Alter ein Anstieg der IgG2a Isotypen beobachtet werden, die Zeichen der destruktiven Th1-Immunantwort sind. Diese Ergebnisse sind konsistent mit Ergebnissen von Untersuchungen der zellulären Immunität in NOD-Mäusen, die darauf hindeuten, dass im frühen Stadium der Insulitis die Th2-Immunität dominiert

und vor bzw. bei Diabetesmanifestation eine Veränderung des Zytokinprofils von CD4+ Zellen in Richtung Th1-Immunantwort stattfindet.

Bei einem Teil der nicht glutenfrei ernährten NOD-Mäuse wurden Gliadin-Antikörper der Klasse IgG detektiert, die im Vergleich zu den Titern der glutenfrei ernährten Mäuse deutlich erhöht waren. Dieser Befund zeigt, dass es sich bei Gliadin um eine stark immunogene Substanz handelt, und weist auf eine Beteiligung des Darm-assoziierten Immunsystems an der Entstehung des Autoimmundiabetes bei der NOD-Maus hin.

Die hier erhobenen Ergebnisse bildeten die Basis für die Entwicklung eines Studienkonzepts zur Primärprävention des Typ 1 Diabetes beim Menschen. In dieser Studie werden Kinder von Eltern mit Typ 1 Diabetes, die Träger des Diabetes-Risikogenotyps DR 3/4 bzw. DR 4/4 oder des Zöliakie-Risikogenotyps DR 3/3 sind, während des ersten Lebensjahres glutenfrei ernährt. Dieses Studienkonzept wurde u.a. aus folgenden Gründen gewählt:

- Die Untersuchung der Immunantwort gegen Insel-Autoantigene und Impfantigene bei Prädiabetikern zeigte, dass eine Störung der Immunantwort meist schon sehr früh im Leben auftritt. Deshalb muss eine primärpräventive Interventionsmaßnahme sehr früh im Leben der Hochrisiko-Kinder stattfinden.
- Aufgrund des im Tierversuch erzielten protektiven Effektes der glutenfreien Ernährung wird diese Ernährungsmodulation auch bei Kindern mit hohem Diabetes-Risiko angewandt.
- Da diese Arbeit zeigte, dass erstgradige Verwandte von Personen mit Typ 1 Diabetes eine erhöhte Prävalenz der tTGCA und Zöliakie aufweisen, wird im Rahmen dieses Projektes der potentiell protektive Effekt der glutenfreien Ernährung nicht nur auf die Diabetes-assoziierte sondern auch auf die Zöliakie-assoziierte Autoimmunität untersucht.
- Als weiterer Marker zur Bewertung des Erfolges der Ernährungsintervention soll bei allen Kindern die Immunantwort gegen TT untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

Abiru N, Yu L, Dongmei M, Maniatis AK, Liu E, Moriyama H, Eisenbarth GS: Transient Insulin Autoantibody Expression Independent of Development of Diabetes: Comparison of NOD and NOR strains. *Journal of Autoimmunity* 17:1-6, 2001

Akerblom HJ, Virtanen SM, Hämäläinen et al: Modulation of the appearance of diabetes associated autoantibodies in the nutritional prevention of type 1 diabetes (TRIGR) project. 4th immunology of Diabetes Society Congress, Abstract book, p. 123, 1999

Alleva DG, Crowe PD, Jin L, Kwok WW, Ling N, Gottschalk M, Conlon PJ, Gottlieb PA, Putnam AL, Gaur A: A disease-associated cellular immune response in type 1 diabetics to an immunodominant epitope of insulin. *J Clin Invest* 107:173-180, 2001

Amusquivar E, Ruperez FJ, Barbas C, Herrera E: Low arachidonic acid rather than alpha-tocopherol is responsible for the delayed postnatal development in offspring of rats fed fish oil instead of olive oil during pregnancy and lactation. *J Nutr* 130:2855-2865, 2000

Atkinson MA, Honeyman M, Peakman M, Roep B: T-Cell markers in Type I diabetes: progress, prospects and realistic expectations. *Diabetologia* 43(6): 819-20, 2000

Atkinson MA, Eisenbarth GS: Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358: 221-229, 2001

Atkinson MA, MacLaren NK: The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 331: 1428-1436, 1994

Bach JF: Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev* 15(4): 516-542, 1994

Baumgartl HJ, Standl E, Schmidt-Gayk H, Kolb HJ, Janka HU, Ziegler AG: Changes of Vitamin D3 serum concentrations at the onset of immune-mediated type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetes Research* 16:145-148, 1992.

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

Bendelac A, Carnaud C, Boitard C, Bach JF: Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *J Exp Med* 166:823-832, 1987

Bird P, Calvert JE, Amlot PL: Distinctive development of IgG4 subclass antibodies in the primary and secondary response to keyhole limpet haemocyanin in man. *Immunology* 69:355-360, 1990

Bonifacio E, Atkinson M, Eisenbarth G, Serreze D, Kay TWH, Lee-Chan E, Singh B: International Workshop on Lessons From Animal Models for Human Type 1 Diabetes. Identification of Insulin but Not Glutamic Acid Decarboxylase or IA-2 as Specific Autoantigens of Humoral Autoimmunity in Nonobese Diabetic Mice. *Diabetes* 50:2451-2458, 2001

Bonifacio E, Ziegler AG, Hummel M, Dittler J, Lampasona V, Pastore MR, Bosi E: Gluten: is it also a determinant of islet autoimmunity? *Diabetes Metab Rev* 24: 259-260, 1998

Borch-Johnson K, Mandrup-Poulsen T, Zachau-Christiansen B et al: Relation between breast feeding and incidence rate of insulin-dependent diabetes mellitus: a hypothesis. *Lancet* ii: 1083-1086, 1984

Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, MacKay EH, Swift PG, Gamble DR: In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N Engl J Med* 313(6): 353-360, 1985

Burk K, Bosch S, Muller CA, Melms A, Zuhlke C, Stern M, Besenthal I, Skalej M, Ruck P, Ferber S, Klockgether T, Dichgans J: Sporadic cerebellar ataxia associated with gluten sensitivity. *Brain* 124: 1013-1019, 2001

Cameron MJ, Meagher C, Delovitch TL: Failure in immune regulation begets IDDM in NOD mice. *Diabetes Metab Rev* 14:177-185, 1998

Casteels K, Waer M, Bouillon R, Dpovere J, Valckx D, Laureys J, Mathieu C: 1,25-dihydroxy D3 restores sensitivity to cyclophosphamide-induced apoptosis in NOD mice and protects against diabetes. *Clin Exp Immunol* 112:181, 1998

Coleman DL, Kuzava JE, Leiter EH: Effect of diet on incidence of diabetes in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 39: 432-436, 1990

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

Collin P, Salmi J, Hällström O, Oksa H, Oksala H, Mäki M, Reunala T: High frequency of celiac disease in adult patients with type 1 diabetes. *Scand J Gastroenterol* 24:81-84, 1989

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

Cooke WT, Holmes GKT: Neurological and psychiatric complications. In: *Coeliac disease*. London: Churchill Livingstone (pp 197-213), 1984

Couper JJ, Steele C, Beresford S et al: Lack of association between duration of breast feeding or introduction of cow's milk and development of islet autoimmunity. *Diabetes* 48:2145-2149, 1999

Corazza G, Andreani M, Venturo N, Bernardi M, Tosti A, Gasbarrini G: Celiac disease and alopecia areata: report of a new association. *Gastroenterology* 109: 1333-37, 1995

Cronin CC, Shanahan F. Insulin-dependent diabetes mellitus and coeliac disease. *Lancet* 349:1096-1097, 1997

Dahlquist GG, Patterson C, Soltesz G: Perinatal risk factors for childhood type 1 diabetes in Europe. *Diabetes Care* 22:1698-1072, 1999

Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, Copeman JB, Cordell HJ, Pritchard LE, Reed PW, Gough SCL, Jenkins SC, Palmer SM, Balfour KM, Rowe B, Farall M, Barnett AH, Bain SC, Todd JA: A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* 371:130-136, 1994

De Carli M et al: Human Th1 and Th2 cells: functional properties, regulation of development and role in autoimmunity. *Autoimmunity* 18: 301-308, 1994

Devey ME, Bleasdale KM, French MA, Harrison G: The IgG4 subclass is associated with a low affinity antibody response to tetanus toxoid in man. *Immunology* 55:565-567, 1985

Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Med* 3:797-801, 1997

Douek IF, Leech NJ, Gillmor HA, Bingley PJ, Gale EA: Children with type-1 diabetes and their unaffected siblings have fewer symptoms of asthma. *Lancet* 353:1850, 1999

Eisenbarth GS: Primer immunology/autoimmunity. In: *Type 1 Diabetes: Molecular, Cellular and Clinical Immunology*. Eisenbarth GS, Lafferty KJ, Eds. New York, Oxford University Press, 1996, p. 3-18

Elliott RB, Bibby NK, McGregor M, Pilcher CC: Childhood vaccines and the aetiology of type 1 diabetes. *Horm Res* 50:117, 1998

Elliott RB, Maritn JM: Dietary protein: a trigger of insulin-dependent diabetes in the BB rat? *Diabetologia* 26:297-299, 1984

Elliott RB, Reddy SN, Bibby NJ, Kida K: Dietary prevention of diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia* 31: 62-64, 1988

Ewen C, Baca-Estrada ME: Evaluation of Interleukin-4 Concentration by ELISA is influenced by the consumption of IL-4 by cultured cells. *Journal of Interferon and cytokine Research* 21: 39-43, 2001

Falconer AE, Friedmann PS, Bird P, Calvert JE: Abnormal immunoglobulin G subclass production in response to keyhole limpet haemocyanin in atopic patients. *Clin Exp Immunol* 89:495-499, 1992

Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, Urban Jr JF, Beckmann MP, Park LS, Schooley KA, Coffman RL, Mosmann TR, Paul WE: Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol* 8:303-333, 1990

Funda DP, Kaas A, Troels B, Tlaskalová-Hogenová H, Buschard K: Gluten-free Diet Prevents Diabetes in NOD Mice. *Diabetes Metab Res Rev* 15:323-327, 1999

Gombert JM, Herbelin A, Tancrede-Bohin E, Dy M, Chatenoud L, Carnaud C, Bach JF: Early defect of immunoregulatory T cells in autoimmune diabetes. *C. R. Acad. Sci. III* 319:125-129, 1996

Graves PM, Barriga KJ, Norris JM et al: Lack of association between early childhood immunizations and beta-cell autoimmunity. *Diabetes Care* 22:1694-1697, 1999

Greco L, Corazza G, Babron MC, Clot F, Fulchignoni-Lataud MC, Percopo S, Zavattari P, Bouguerra F, Dib C, Tosi R, Troncone R, Ventura A: Genome search in celiac disease. *Am J Hum Genet* 62:669-675, 1998

Hadjivassiliou M, Gibson A, Davies-Jones GAB, Lobo A, Stephenson TJ, Milford-Ward A. Does cryptic gluten sensitivity play a part in neurological illness? *Lancet* 347(10):369-371, 1996

Hänninen A, Salmi M, Simell O, Jalkanen S: Mucosa-associated (beta 7-integrin high) lymphocytes accumulate early in the pancreas of NOD mice and show aberrant recirculation behavior. *Diabetes* 45:1173-1180, 1996

Haskins K, McDuffie M: Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet-specific T cell clone. *Science* 249:1433-1436, 1990

Haskins K, Wegmann D: Diabetogenic T-cell clons. *Diabetes* 45:1299-1305, 1996

Hess AD, Donnerberg AD, Tutschka PJ, Santos G: Effects of cyclosporin A on human lymphocyte response in vitro. *J Immunol* 130:717-721, 1983

Hilkens CM, Snijders A, Vermeulen H, van der Meide PH, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Accessory cell-derived IL-12 and prostaglandin E2 determine the IFN-gamma level of activated human CD4+ T cells. *J Immunol* 156(5):1722-27, 1996

Hoorfar J, Buschard K, Dagnes-Hansen P: Prophylactic nutritional modification of the incidence of diabetes in autoimmune non-obese diabetic (NOD) mice. *Br J Nutr* 69:597-607, 1993

Hoorfar J, Buschard K, Brogren CH: Impact of Dietary Protein and Fat Source on the Development of Insulin-dependent diabetes in the BB rat. *Diabetes Research* 20: 33-41, 1992

Houlston RS, Tomlinson IPM, Ford D, Seal S, Marossy AM, Ferguson A, Holmes GKT, Hosie KB, Howdle PD, Jewell DP, Godkin A, Kerr GD, Kumar P, Logan RFA, Lova AHG, Johnston S, Marsh MN, Mitton S, O Donoghue D, Roberts A, Walker-Smith JA, Stratton MF. Linkage analysis of candidate regions for celiac disease genes. *Hum Mol Genet* 6: 1335-1339, 1997

Howell WM, Warren CJ, Cook NJ, Cawley MI, Smith JL: Detection of IL-2 at mRNA and protein levels in synovial infiltrates from inflammatory arthropathies using biotinylated oligonucleotide probes in situ. *Clin Exp Immunol* 86: 393-398, 1991

Hughes DA, Pinder AC: N-3 polyunsaturated fatty acids inhibit the antigen-presenting function of human monocytes. *Am J Clin Nutr* 171 [Suppl]:357S-360S, 2000

Hummel M, Bonifacio E, Stern M, Dittler J, Schimmel A, Ziegler AG: Development of celiac disease-associated antibodies in offspring of parents with type 1 diabetes. *Diabetologia* 43:1005-1011, 2000a

Hummel M, Durinovic-Bello I, Ziegler AG: Relation between Cellular and Humoral Immunity to Islet Cell Antigens in Type 1 Diabetes. *Journal of Autoimmunity* 9:427-430, 1996

Hummel M, Füchtenbusch M, Schenker M, Ziegler AG: No major association of breast feeding, vaccination and common childhood viral disease with early islet autoimmunity in the German BABY-DIAB study. *Diabetes Care* 23:969-974, 2000b

Hyöty H, Hiltunen M, Reunanen A et al: The childhood in Finland study group: Decline of mumps antibodies in type 1 (insulin-dependent) diabetic children and a plateau in the rising incidence of type 1 diabetes after introduction of the mumps-measles-rubella vaccine in Finland. *Diabetologia* 36:1303-1308, 1993

Hyppönen E, Läärä E, Reunanen A, Järvelin MR, Virtanen SM: Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 358:1500-1503, 2001

Ishizaka A, Sakiyama Y, Nakanishi M, Tomizawa K, Oshika E, Kojima K, Taguchi Y, Kandil E, Matsumoto S: The inductive effect of interleukin-4 on IgG4 and IgE synthesis in human peripheral blood lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 79:392-396, 1990

Jäger C, Hatzigeorgaki E, Petzoldt R, Bretzel RG: Comparative analysis of organ-specific autoantibodies and celiac disease-associated antibodies in type 1 diabetic patients, their first-degree relatives, and healthy control subjects. *Diabetes Care* 24:27-32, 2001

Kabilan L, Andersson G, Lolli F, Ekre HP, Olsson T, Troye-Blomberg M: Detection of intracellular expression and secretion of interferon-gamma at the single-cell level after activation of human T cells with tetanus toxoid in vitro. *Eur J Immunol* 20(5):1085-1089, 1990

Katz JD, Benoist C, Mathis D: Major histocompatibility complex class I molecules are required for the development of insulinitis in nonobese diabetic mice. *Eur J Immunol* 23:3358-3360, 1993

Katz JD, Benoist C, Mathis D: T helper cell subsets in insulin dependent diabetes. *Science* 268:1185, 1995

King CL, Nutman TB: 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, 1993

Kitani A, Strober W: Regulation of C gamma subclass germ-line transcripts in human peripheral blood B cells. *J Immunol* 151:3478-3488, 1993

Koczwara K: Charakterisierung der humoralen Immunantwort im Tiermodell des Typ 1 Diabetes nach Immunisierungen mit diabetesassoziierten Antigenen. Diplomarbeit an der Justus-Liebig-Universität Gießen, 2000

Kolb H: Benign versus destructive insulinitis. *Diabetes Metab Rev* 13:139, 1997

Kruse K: Vitamin-D-Prophylaxe bei Kindern. *DMW* 49:1717, 1995

Ladinser B, Rossipal E, Pittschieler K. Endomysium antibodies in coeliac disease: an improved method. *Gut* 35:776-778, 1994

Lampasona V, Bazzigaluppi E, Barera G, Bonifacio E. Tissue transglutaminase and combined screening for coeliac disease and type 1 diabetes associated antibodies. *Lancet* 352:1192-1193, 1998

Lampasona V, Bonfanti R, Bazzigaluppi E, Venerando A, Chiumello G, Bosi E, Bonifacio E: Antibodies to tissue transglutaminase C in type 1 diabetes. *Diabetologia* 42:1195-1198, 1999

Lepore L, Martellosi S, Pennesi M et al.: Prevalence of celiac disease in patients with juvenile chronic arthritis. *J Pediatr* 129:1311-13, 1996

Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO: Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol. Today* 16:34-38, 1995

Lim PL, Lua YL: Occurrence of IgG subclass antibodies to ovalbumin, avidin, and pneumococcal polysaccharide in children. *Int Arch Allergy Immunol* 104:137-143, 1994

Linn T, Noke M, Woehrlle M, Kloer HU, Hammes HP, Litzlbauer D, Bretzel RG, Federlin K: Fish Oil-Enriched Diet and Reduction of Low-Dose Streptozocin-Induced Hyperglycemia – Inhibition of Macrophage Activation. *Diabetes* 38: 1402-11, 1989

Lipton R, LaPorte RE, Becker DJ, Dorman JS, Orchard TJ, Atchison J, Drash AL: Cyclosporin therapy for prevention and cure of IDDM. Epidemiological perspective of benefits and risks. *Diabetes Care* 13: 776-784, 1990

Litherland SA, Xie XT, Hutson AD, Wasserfall C, Whittaker DS, She JX, Hofig A; Dennis MA, Fuller K, Cook R, Schatz D, Moldawer LL, Clare-Salzler MJ. Aberrant prostaglandin synthase 2 expression defines an antigen-presenting cell defect for insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 104:515-523, 1999

Lundgren M, Persson U, Lansson P, Magnusson C, Smith CIE, Hammarstrom L, Severinson E: Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells: *Eur J Immunol* 19:1311-1315, 1989

Luostarinen L, Pirttila T, Collin P: Coeliac disease presenting with neurological disorders. *Eur Neurol* 42(3):132-135, 1999

Lytle JS, Lytle TF, Newmark HL, Deschner EE: Stability of a commercially prepared fish oil (omega 3 fatty acid) laboratory rodent diet. *Nutr Cancer* 17:187-194, 1992

Manolagas SC, Hustmeyer FG, Yu XP: Immuno-modulating properties of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Kidney Int* 38[Suppl 29]: S9-S16, 1990

Mathieu C, Laureys J, Sobis H, Vandeputte M, Waer M, Bouillon R: 1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents insulinitis in NOD mice. *Diabetes* 41:1491-1495, 1992

Mathieu C, Waer M, Laureys J, Rutgeerts O, Bouillon R: Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Diabetologia* 37: 552-558, 1994

Meloni G, Dore A, Fanciulli G, Tanda F, Bottazzo GF: Subclinical celiac disease in schoolchildren from northern Sardinia. *Lancet* 353:37, 1999

Meydani SN, Lichtenstein AH, Cornwall S, Meydani M, Goldin BR, Rasmussen H, Dinarello CA, Schaefer EJ: Immunologic effects of National Cholesterol Education Panel Step-2 diets with and without fish-derived n-3 fatty acid enrichment. *J Clin Invest* 92:105-103, 1993

Mo XY, Sarawar SR, Doherty PC: Induction of cytokines in mice with parainfluenza pneumonia. *J Virol* 69: 1288-1291, 1995

Molvig J, Pociot F, Worsaae H, Wogensen D, Baek L, Christensen P, Mandrup-Poulsen T, Andersen K, Madsen P, Dyerberg J, Nerup J: Dietary supplementation with n-3-polyunsaturated fatty acids decreases mononuclear cell proliferation and interleukine-1beta content but not monokine secretion in healthy and insulin-dependent diabetic individuals. *Scand J Immunol* 34:399-410, 1991

Mosmann TR, Coffman RL: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7: 145-173, 1989

Muhr-Becker D, Ziegler AG, Druschky A, Wolfram G, Haslbeck M, Neundörfer B, Standl E, Schnell O. Evidence for specific autoimmunity against sympathetic and parasympathetic nervous tissues in type 1 diabetes mellitus and the relation to cardiac autonomic dysfunction. *Diabetic Medicine* 15:467-472, 1998

Naserke HE, Bonifacio E, Ziegler AG: Prevalence, characteristics and diabetes risk associated with transient maternally acquired islet antibodies and persistent islet antibodies in offspring of parents with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4826-4833, 2001

Naserke HE, Ziegler AG, Lampasona V, Bonifacio E: Early development and spreading of autoantibodies to epitopes of IA-2 and their association with progression to type 1 diabetes. *J Immunology* 161: 6963-6969, 1998

Norris JM, Beaty B, Klingensmith G et al: Lack of association between early exposure to cow`s milk protein and beta-cell autoimmunity. *Diabetes autoimmunity study in the young. JAMA* 276:609-614, 1996

Not T, Tommasini A, Tonini G, Buratti E, Pocecco M, Tortul C, Valussi M, Crichiutti G, Berti I, Trevisiol C, Azzoni E, Neri E, Torre G, Martellosi S, Soban M, Lenhardt A, Cattin L, Ventura A. Undiagnosed coeliac disease and risk of autoimmune disorders in subjects with Type I diabetes mellitus. *Diabetologia* 44:151-155, 2001

Nusslein HG, Winter M, Trag T, Kalden JR: Interleukin-4 induced IgG subclass and IgE secretion by mononuclear cells from atopic donors. *Int Arcg Allergy Appl Immunol* 95:257-260, 1991

Olesen AB, Juul S, Birkebaek N, Thestrup-Pedersen K: Association between atopic dermatitis and insulin-dependent diabetes mellitus: a case-control study. *Lancet* 357:1749-1752, 2001

Pender SL, Tickle SP, Docherty AJ, Howie D, Wathen NC, McDonald TT: A major role of matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. *J Immunol* 158:1582-1590, 1997

Pilgram J: Früherkennung der Autoimmunerkrankungen Typ 1 Diabetes und Zöliakie in Risikopopulationen. Dissertation an der TU München, 2000

Pilstrom B, Bjork L, Bohme J: Demonstration of a Th1 cytokine profile in the late phase of NOD insulinitis. *Cytokine* 7:806-814, 1995

Pocecco M, Ventura A: Coeliac disease and insulin-dependent diabetes mellitus: a causal association? *Acta Paediatr* 84:1432-1433, 1995

Polizzi A, Finocchiaro M, Parano E, Pavone P, Musumeci S: Recurrent peripheral neuropathy in a girl with celiac disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68: 104-105, 2000

Pozzili P on behalf of the IMDIAB Group: BCG vaccine in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 349:1520-1521, 1997

Pozzili P, Signore A, Williams AJ, Beales PE: NOD mouse colonies around the world – recent facts and figures. *Immunol Today* 14:193-196, 1993

Punnonen J, de Vries JE: IL-13 induced proliferation, Ig isotype switching, and Ig synthesis by immature human fetal B cells. *J Immunol* 152:1094-1102, 1994

Rabinovitch A: Roles of cytokines in IDDM pathogenesis and islet β -cell destruction. *Diabetes Rev* 1: 215-240, 1993

Rabinovitch A, Skyler JS: Prevention of type 1 diabetes. *Med Clin North Am* 82: 739-755, 1998

Reddy S, Bibby NJ, Swinney C, Barrow G, Elliott RB: A combined casein-free-nicotinamide diet prevents diabetes in the NOD mouse with minimum insulinitis. *Diabetes Res Clin Pract* 29: 83-92, 1995

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC: AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr* 123:1939-1951, 1993

Rocher A, Soriano F, Molina E, Gonzalez-Limas G, Mendez E: Characterization of distinct alpha- and gamma-type gliadins and low molecular weight components from wheat endosperm as coeliac immunoreactive proteins. *Biochim Biophys Acta* 1247: 143-148, 1995

Roivainen M, Knip M, Hyoty H, Kulmala P, Hiltunen M, Vahasalo P, Hovi T, Akerblom HK: Several different enterovirus serotypes can be associated with prediabetic autoimmune episodes and onset of overt IDDM. *Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. J Med Virol* 56:74-78, 1998

Roll U, Christie MR, Fuchtenbusch M, Payton MA, Hawkes CJ, Ziegler AG. Perinatal autoimmunity in offspring of diabetic parents. The German Multicenter BABY-DIAB study: detection of humoral immune responses to islet antigens in early childhood. *Diabetes* 45(7):967-73, 1996

Rossi M, Maurano F, Caputo N, Auricchio S, Sette A, Capparelli R, Troncone R: Intravenous or intranasal administration of gliadin is able to down-regulate the specific immune response in mice. *Scand J Immunol* 50:177-82, 1999

Ruths S, Driedijk PC, Weening RS, Out TA: ELISA procedures for the measurement of IgG subclass antibodies to bacterial antigens. *J Immunol Methods* 140:67-78, 1991

Sardy M, Odenthal U, Karpati S, Paulsson M, Smyth N: Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy. *Clin Chem* 45:2142-2149, 1999

Saukkonen T, Illonen J, Akerblom HK, Savilahti E: Prevalence of coeliac disease in siblings of patients with Type 1 diabetes is related to the prevalence of DQB1*02 allele. *Diabetologia* 44:1051-1053, 2001

Schatz D, Krischer J, Skyler J: Now is the time to prevent type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 494-522, 2000

Schatz DA, Rogers DG, Brouhard BH: Prevention of insulin-dependent diabetes mellitus: an overview of three trials. *Cleve Clin J Med* 63: 270-274, 1996

Schenker M, Hummel M, Ferber K, Walter M, Keller E, Albert ED, Janka HU, Kastendiek C, Sorger M, Louwen F, Ziegler AG: Early expression and high prevalence of islet autoantibodies for DR3/4 heterozygous and DR4/4 homozygous offspring of parents with Type I diabetes: the German BABYDIAB study. *Diabetologia* 42:671-677, 1999

Schmid S, Molteni A, Füchtenbusch M, Naserke HE, Ziegler AG, Bonifacio E: Reduced IL-4 associated antibody responses to vaccine in early pre-diabetes. *Diabetologia*, in press

Schuppan D: Current Concepts of Celiac Disease Pathogenesis. *Gastroenterology* 119: 234-242, 2000

Schuppan D, Hahn EG: Celiac Disease and its Link to type 1 diabetes mellitus. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*: 14(1): 597-605, 2001

Scott FW: Food-induced Type 1 diabetes in the BB rats. *Diabetes Metab Rev* 12: 341-359, 1996

Scott FW, Marliss EB: Conference summary: Diet as an environmental factor in development of insulin-dependent diabetes mellitus. *Can J Physiol Pharmacol* 69:311-319, 1990

Scott FW, Sarwar G, Cloutier HE: Diabetogenicity of various protein sources in the diet of BB rats. *Adv Exp Med Biol* 246:277-285, 1988

Scott FW, Trick RD: Dietary modifications of spontaneous diabetes in BB Wistar rats. *Proc Dan Fed Biol Soc* 26:222, 1983

Seissler J, Borns S, Wohlrab U, Morgenthaler NG, Mothes T, Boehm BO, Scherbaum WA. Antibodies to human recombinant tissue transglutaminase:

Evidence for a high diagnostic sensitivity for coeliac disease. *Horm Metab Research* 31: 375-379, 1999a

Seissler J, Schott M, Boms S, Wohlrab U, Ostendorf B, Morgenthaler NB, Scherbaum WA. Autoantibodies to tissue transglutaminase identify silent coeliac disease in type 1 diabetes. *Diabetologia* 42:1441-1442, 1999b

Serreze DV, Leiter EH, Christianson GJ, Greiner D, Roopenian DC: Major histocompatibility complex I deficient NOD-B2m null mice are diabetes and insulinitis resistant. *Diabetes* 43:505-509, 1994

Sesardic D, Wong MY, Gaines Das RE, Corbel MJ: COLLABORATIVE STUDY, The First International Standard for Antitetanus Immunoglobulin, Human; Pharmaceutical Evaluation and International Collaborative Study. *Biologicals* 21:67-75, 1993

Shimada A, Charlton B, Taylor-Edwards C, Fathman CG: Beta-cell destruction may be a late consequence of the autoimmune process in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 45: 1063-1067, 1996

Skyler JS: Immune intervention studies in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 3: 1017-1035, 1987

Snapper CM, Mond JJ: Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching. *Immunol. Today* 14:15-17, 1995

Snapper CM, Paul WE: Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236:944-947, 1987

Snijdewint FG, Kalinski P, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML: Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *J Immunol* 150(12):5321-5329, 1993

Sollid L, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E: Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ- α/β heterodimer. *J Exp Med* 169:345-350, 1989

Soo Kim J, Jun Kim S, Jin Shin K, Han Hwang P, Chul Cho S: Changes of tetanus specific IgG, IgM and IgG subclasses after DPT vaccination. *Yonsei Medical Journal* 30:158-163, 1989

Sousa AO, Henry S, Maroja FM, Lee FK, Brum L, Singh M, Lagrange PH, Aucouturier P: IgG subclass distribution of antibody responses to protein and polysaccharide mycobacterial antigens in leprosy and tuberculosis patients. *Clin Exp Immunol* 111:48-55, 1998

Stene LC, Ulriksen J, Magnus P, Joner G: Use of cod liver oil during pregnancy associated with lower risk of Type 1 diabetes in the offspring. *Diabetologia* 43: 1093-98, 2000

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

Strian F, Haslbeck M. Neurologische Erkrankungen. In: Mehnert H, Standl E, Usadel KH eds. *Diabetologie in Klinik und Praxis*, 4. edn. Stuttgart: Thieme, 1998; 471

Tanguay S, Killion JJ: Direct comparison of ELISPOT and ELISA-based assays for detection of individual cytokine-secreting cells. *Lymphokine Cytokine Res* 13: 259-263, 1994

The Eurodiab Substudy 2 Study Group. Vitamin D supplement in early childhood and risk for Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 42: 51-54, 1999

Tian J, Lehmann PV, Kaufman DL: T cell cross-reactivity between coxsackievirus and glutamatdecarboxylase is associated with a murine diabetes susceptibility allele. *J Exp Med* 180:1979-1984, 1994

Troncone R, Caputo N, Zibella A, Moliterno G, Maiuri L, Auricchio S: Effects of gluten enriched diet on the small intestinal mucosa of normal mice and mice with graft versus host reaction. *Gut* 35: 779-82, 1994

Troncone R, Ferguson A: Animal model of gluten induced enteropathy in mice. *Gut* 32:871-75, 1991

Usai P, Usai Satta P, Lai M, Corda MG, Piras E, Calcara C, Boy MF, Morelli A, Balestrieri A, Bassotti G. Autonomic dysfunction and upper digestive functional disorders in untreated adult coeliac disease. *Eur J Clin Invest* 27(12):1009-1015, 1997

Ventura A, Magazzu G, Greco L, and the SIGEP study group. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 117:297-303, 1999

Ventura A, Neri E, Ughi C, Leopaldi A, Citta A, Not T: Gluten-dependent diabetes-related and thyroid-related autoantibodies in patients with celiac disease. *J Pediatr* 137:263-5, 2000

Visakorpi JK: Die Diagnostik der Zöliakie. In: *Annales Nestle*, Vol.51/2, Schweiz: Les Presses de la Venoge, S. 47-54, 1993

Wainwright PE, Xing HC, Mutsaers L, McCutcheon K, Kyle D: Arachidonic acid offsets the effects on mouse brain and behaviour of a diet with a low (n-6):(n-3) ratio and very high levels of docosahexaenoic acid. *J Nutr* 127:184-193, 1997

Walters MR: Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocrine Res* 13:719-764, 1992

Wegmann DR, Gill RG, Norbury-Glaser M, Schloot N, Daniel D: Analysis of the spontaneous T cell response to insulin in NOD mice. *J Autoimmun* 7(6):833-43, 1994

Wicker LS, Leiter EH, Todd JA, Renjilian RJ, Peterson E, Fischer PA, Podolin PL, Zijlstra M, Jaenisch R, Peterson LB: b2-microglobulin deficient NOD mice do not develop insulinitis or diabetes. *Diabetes* 43:500-504, 1994

Wicker LS, Miller BJ, Mullen Y: Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes* 35(8):855-860,1986

Widhe M, Ekerfelt C, Forsberg P, Bergstrom S, Ernerudt J: IgG subclasses in Lyme borreliosis: a study of specific IgG subclass distribution in an interferon-gamma-predominated disease. *Scand J Immunol* 47:575-581, 1998

Williams AJK, Norcross AJ, Lock RJ, Unsworth DJU, Gale EAM, Bingley PJ: The high prevalence of autoantibodies to tissue transglutaminase in first-degree relatives of patients with type 1 diabetes is not associated with islet autoimmunity. *Diabetes Care* 24:504-509, 2001

Wortsman J, Kumar V: Idiopathic hypoparathyroidism co-existing with celiac disease: immunologic studies. *Am J Med Sci* 307:420-27, 1994

Yu L, Robles DT, Abiru N, Kaur P, Rewers M, Kelemen K, Eisenbarth GS: Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: Evidence for early determination of subsequent diabetes. *PNAS* 97:1701-1706, 2000

Ziegler AG, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E: Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes* 48:460-481, 1999

Vorveröffentlichungen

Originalarbeiten:

Schmid S, Schnell O, Bonifacio E, Ziegler AG, Hummel M: Silent celiac disease is not a cause of autonomic neuropathy in patients with type 1 diabetes.

Diabetic medicine 18: 686-687, 2001

Schmid S, Ziegler AG: Prädiktion und Prävention des Typ 1 Diabetes.

Deutsche Medizinische Wochenschrift 126: 593-596, 2001

Schmid S, Molteni A, Füchtenbusch M, Naserke HE, Ziegler AG, Bonifacio E: Reduced IL-4 associated antibody responses to vaccine in early pre-diabetes.

Diabetologia, in press

Abstracts:

Schmid S, Molteni A, Bonifacio E, Ziegler AG: Antibody- and T-cell response to tetanus toxoid in islet antibody positive and negative offspring of parents with type 1 diabetes.

Clin Immunol 99: 157, 2001

Schmid S, Molteni A, Bonifacio E, Ziegler AG: Antibody- and T-cell response to tetanus toxoid in islet antibody positive and negative offspring of parents with type 1 diabetes.

Diabetes und Stoffwechsel 10 (Suppl.1): 74, 2001

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Sandra Schmid

geboren am 13. Dezember 1971 in Laupheim

ledig

Karl-Mathes-Str. 2

82008 Unterhaching

Ausbildung und berufliche Tätigkeit

1978-1982 Grundschule in Maselheim

1982-1991 Gymnasium in Ochsenhausen

1991-1993 Ausbildung zur Diätassistentin, Berufsfachschule Ulm

1993-1998 Studium der Ökotrophologie an der TU München-Weihenstephan

1997-2000 Freiberufliche Tätigkeit als Ernährungsberaterin im Optifast-Zentrum,
München

1998-1999 Ernährungsberaterin am Krankenhaus der Barmherzigen Brüder,
München

seit 10/1999 Doktorandin am Institut für Diabetesforschung, München

München, 05.05.2002