

Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Guido Adler
Schwerpunkt Endokrinologie, Diabetes und Stoffwechsel
Prof. Dr. med. Bernhard O. Böhm

**IgG - tTG - Immunantwort bei Typ 1 Diabetes
unter Zöliakie**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Timo Knoche
Böblingen

2010

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Otto Böhm

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Kern

Tag der Promotion: 22.04.10

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Definition der Zöliakie	1
1.2 Historie	2
1.3 Epidemiologie und Pathogenese der Zöliakie	4
1.4 Formen der Zöliakie	8
1.5 Zöliakie und andere Erkrankungen	12
1.6 Fragestellung	16
2. Material und Methodik	17
2.1 Reagenzien, Lösungen und Puffer	17
2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
2.3 Patientenseren	20
2.4 Titerbestimmung	21
2.4.1 Bestimmung des tTG-IgA Titers	21
2.4.2 Bestimmung des tTG-IgG Titers	29
3. Ergebnisse	30
3.1 Ermittlung des tTG-IgA Titers	30
3.2 Ermittlung des tTG-IgG Titers	32
3.3 direkter Vergleich von tTG-IgG zu tTG-IgA Titer	34
3.4 Rechnerischer Vergleich der Titer / Statistische Ergebnisse	38

4. Diskussion	43
5. Zusammenfassung	52
6. Literaturverzeichnis	53
Anhang	

Abkürzungsverzeichnis

AGA	Antikörper gegen Gliadin
APC	Antigene Presenting Cell
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
DR, DQ	HLA-Genloci auf dem Chromosom 6
DZG	Deutsche Zöliakie Gesellschaft e.V.
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EmA	Endomysium-Antikörper
ESPGHAN	European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition
GFD	Gluten Free Diet, glutenfreie Diät
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HLA	Human Leukocyte Antigene
IFN	Interferone
IgA	Immunglobulin vom Typ A
IgE	Immunglobulin vom Typ E
IgG	Immunglobulin vom Typ G
IgM	Immunglobulin vom Typ M
IL	Interleukine
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
MMP	Matrix Metalloproteinasen
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PBS	Phosphate Buffered Saline
TGF	Tumor Growth Factor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Necrose Factor
tTG	Tissue Transglutaminase, Gewebetransglutaminase
tTG-Ak	Antikörper gegen das Enzym Gewebetransglutaminase
U	Units; arbiträre, willkürliche Einheit

1. Einleitung

1.1 Definition der Zöliakie

Die Zöliakie, auch als glutensensitive Enteropathie, bzw. im Erwachsenenalter als einheimische Sprue bezeichnet, ist eine durch Gliadin, einem Bestandteil des Gluten, getriggerte entzündliche Erkrankung des Dünndarms. Bei genetisch prädisponierten Menschen (90 % HLA-DQ2, 10 % HLA-DQ8 (DZG 2008)) tritt beim Verzehr von in Weizen, Roggen und Gerste vorkommenden Prolaminen (alkoholische Proteine, die reich an Glutaminen und Prolinen sind) eine Reihe von histologisch pathologischen Veränderungen in der Schleimhaut des Dünndarms auf. Darunter fällt die Zunahme der intraepithelialen Lymphozyten und Plasmazellen in der Lamina propria, die teils vollständige Zottenatrophie und die Hyperplasie der Krypten. Die dadurch resultierende Malabsorption wichtiger Bestandteile der Nahrung wie Kalzium, Glucose etc. kann zu einer ausgeprägten Mangelernährung mit all ihren Folgen, wie beispielsweise Gewichtsabnahme oder als Begleiterkrankung Osteoporose oder starke Hypoglycämien bei Typ 1 Diabetikern führen. Früher als man noch von einer Prävalenz von 1:10.000 ausging, benannte man die Zöliakie als eine Krankheit mit überschaubaren Symptomen wie Diarrhö, Steatorrhöe (Fettstuhl), Blähungen und Gewichtsverlust. Mittlerweile, nachdem von einer Prävalenz von 1:100 – 1:500 ausgegangen wird, erweitern sich die Symptome der Zöliakie oder der mit Zöliakie assoziierten Symptome deutlich. Abdominale Blutungen, Lethargie, Antriebslosigkeit, Erregbarkeit oder Depressionen, menstruale Abnormitäten und Entwicklungsstörungen bei Kindern treten in Verbindung mit der Erkrankung Zöliakie auf.

Bei der Zöliakie spielen sowohl exogene als auch genetische und immunologische Faktoren eine Rolle. Die Transglutaminase des Gewebes (tTG), ein die Glutaminreste des Gliadin im Bereich der Schleimhaut veränderndes Enzym, ist eines der Hauptziele der Autoimmunreaktion bei dieser Erkrankung. Das Auftreten von Transglutaminase-Antikörpern (tTG-Ak), früher als Endomysium-Antikörper (EmA) IgA oder IgG bezeichnet, ist der Marker für die ablaufende entzündliche Reaktion (Dayer und Délèze 2002). Weiterhin sind Antikörper gegen Gliadin (AGA) selbst nachweisbar.

1.2 Historie

Der Name Zöliakie ist abgeleitet von „koilia“, die bauchige Krankheit und wurde erstmals von Arataeus von Kappadozien im 2. Jahrhundert nach Christus beschrieben. Samuel Gee lieferte 1888 erstmals umfassende Beschreibungen der Zöliakiemerkmale. 1924 stellte Haas die Korrelation zwischen der Ernährung und der Pathogenese der Krankheit fest, indem er eine strenge Bananendiät als Heilmethode beschrieb.

Der Holländer Karel Dicke wies in Zusammenarbeit mit Van der Kamer den Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Weizenprodukten und der Malabsorption von Fett bei Zöliakiepatienten nach, denn während des 2. Weltkrieges herrschte unter anderem in Holland Brotmangel. In dieser Zeit verbesserten sich die Symptome der Zöliakiepatienten, da kein Gluten zugeführt wurde. Die Symptome verschlechterten sich in der Zeit nach dem Krieg, nachdem die Versorgung mit Brot wieder besser wurde. 1950 veröffentlichte Dicke diese Beobachtung in seiner Doktorarbeit.

Die ersten serologischen Tests wurden 1953 nach dem Aufkommen der Biopsie der Darmschleimhaut 1950 in Basel entwickelt (Hadziselimovic und Bürgin-Wolff 2001; Keller 2003).

Die ersten Formulierungen der diagnostischen Kriterien wurden 1969 in Interlaken von der ESPGHAN (European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition) aufgestellt.

Diese beinhalteten:

- Flache Dünndarmmukosa unter glutenhaltiger Kost (1. Biopsie)
- Besserung der klinischen Symptome unter glutenfreier Diät
- Klare Besserung der Dünndarmmukosa unter glutenfreier Diät (2. Biopsie)
- Klinischer und histologischer Rückschlag unter Glutenbelastung (3. Biopsie)

Heutzutage wird die Diagnose der Zöliakie gemäß den 2. ESPGHAN-Kriterien nach der Revision 1990 durchgeführt.

Diese sind:

- Eindeutige Histologie bei der 1. Biopsie
- Klare Besserung klinischer Symptome unter glutenfreier Diät

- Kontrollbiopsie indiziert bei zweifelhaftem klinischem Erfolg unter glutenfreier Diät
- Glutenbelastung mit Biopsie indiziert bei:
 - Zweifel an der Initialdiagnose
 - Diagnose im Alter von <2 Jahren
 - Wunsch des Patienten
- Stellenwert der AGA und EmA: nicht alleinige Basis für die Diagnose Zöliakie

Das Autoantigen der Zöliakie, die Gewebetransglutaminase tTG, wurde 1997 in Berlin entdeckt. Die Antikörper (IgA, IgG) gegen dieses Enzym und gegen Endomysium werden heute diagnostisch genutzt (Keller 2001).

1.3 Epidemiologie und Pathogenese der Zöliakie

Innerhalb eines Landes schwankt die Prävalenz bezogen auf die Region nur schwach. Die Erkrankung scheint aber wie andere chronische immun-medierte Krankheiten, z. B. Diabetes mellitus Typ 1 sehr häufig vorzukommen (Catassi, Fabiani et al. 1996). Im Ländervergleich ist die Prävalenz sehr unterschiedlich. Außerdem muss unterschieden werden, ob die Diagnose aufgrund der klinischen Symptome oder mit Hilfe von Screeningverfahren gestellt wurde. Denn aufgrund der serologischen Tests ergeben sich heute höhere Prävalenzen als noch vor ein paar Jahren, da die unterschiedlichen klinischen Formen der Zöliakie inzwischen besser erkannt und definiert werden können. Man spricht dabei von dem „Eisbergphänomen“ (Mäki und Collin 1997) (vgl. 1.4 Formen der Zöliakie). In Deutschland beträgt die Prävalenz im Jahr 2003 demnach 1:500, weltweit 1:266 (vgl. Abb. 1) (Keller 2003). Laut DZG aus 2009 konnte durch diese Screeningverfahren gezeigt werden, dass die Prävalenz der Zöliakie mit 1:100 bis 1:500 deutlich höher liegt als bislang angenommen. Nur ein kleiner Teil (ca. 10 %) der Betroffenen weist typische Symptome auf, bei den meisten liegen nur wenige oder atypische Beschwerden vor. Eine Vielzahl ist sogar völlig beschwerdefrei (DZG 2009).

Wie bereits erwähnt, spielen exogene, genetische und immunologische Faktoren bei der Entstehung der Zöliakie eine Rolle. Essenziell für die Ausprägung der Zöliakie ist der intestinale Kontakt mit Prolaminen und Glutaminen aus in der Nahrung vorkommenden Proteinen in Weizen, Roggen und Gerste. Die Peptide dieser prolinreichen Proteine werden im Darm durch pankreatische oder intestinale Bürstensaumproteasen in freie Aminosäuren oder kleinere Di-, Tri-, oder Tetrapeptide aufgespalten. Die gegenwärtige Vorstellung geht davon aus, dass besonders die längeren Peptidteile für die Aktivierung der krankheitsvermittelnden mukosalen T-Zellen verantwortlich sind. Die Aktivierung ist umso ergiebiger, je mehr dieser Peptide durch die Gewebetransglutaminase tTG modifiziert wurden, da durch diese wesentlich mehr negativ geladene Peptidreste entstehen, welche eine besondere Affinität zu den T-Zellen und der T-Zell-vermittelten Immunantwort, bei genetisch anfälligen Patienten aufweisen. Genetisch anfällig sind, wie bereits in der Definition der Zöliakie erwähnt, Personen mit Risikogenen auf der HLA-Klasse II DQ Unterregion auf dem

Chromosom 6. Die Aufgaben der Klassen I und II umfassen die Aktivierung der Immunantwort, die Klasse III die Aktivierung des Komplementsystems. Die diagnostische Bedeutung liegt darin, dass bestimmte Assoziationen zwischen bestimmten Allelen einzelner Loci des HLA-Systems und bestimmten Krankheiten bestehen können. Das Risiko an Zöliakie zu erkranken ist im Vergleich zu Nicht-Genträgern für B8-Träger 11-mal, für DR3-Träger 10,8-mal, für DR7 Träger 11,9-mal, für DR3 + DR7-Träger 52,1-mal und für DR2-Träger 36,4-mal erhöht (Hagemann 2008). Das durch diese Gene codierte Molekül ist ein, auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen befindliches Dimer und findet sich bei über 90% der Zöliakiepatienten (Sollid 1993), allerdings lässt es sich auch bei 20-30% der Gesamtbevölkerung in Nordeuropa finden. Dies lässt den Schluss zu, dass die Erkrankung auch mit anderen Genvariablen außer HLA-DQ2 assoziiert sein kann. Die wenigen Patienten, die kein HLA-DQ2-Heterodimer aufweisen können, sind oft HLA-DR4 und HLA-DQ8 positiv. Bei diesen wird angenommen, dass das HLA-DQ8-Molekül für den Ausbruch der Krankheit verantwortlich ist. Peptid-Fragmente von Gluten werden sowohl von HLA-DQ2 als auch von HLA-DQ8-Molekülen auf den T-Zellen erkannt (Hansson 1999, Kagnoff 2004).

Das DQ2 Heterodimer wird durch die Gene DQB1*02 und DQA1*05 und das DQ8 Heterodimer durch DQB1*0302 und DQA1*03 codiert. Ein kleiner Teil der Patienten (ca. 1%) besitzt weder DQ2 noch DQ8. Diese Individuen tragen entweder nur DQB1*02 oder nur DQA1*05. Dabei hat die Gendosis erhebliche Auswirkung auf die Anfälligkeit für diese Erkrankung. Homozygote Patienten, die DQB1*02 und DQA1*05 in cis-Stellung auf beiden Chromosomen tragen, haben ein erhöhtes Erkrankungsrisiko.

Im HLA Komplex, in der „immungenetischen Steuerzentrale“, werden über ein äußerst polymorphes System von Antigenrezeptoren immunologische Reaktionen qualitativ und quantitativ gesteuert (Bertrams 1993). Bei autoimmunen Krankheiten wurden auch ein Kontrollverlust über autoreaktive T- und B-Zellen, die Antigenpersistenz, das Vorhandensein von unbekanntem Erregern und die Bildung von Neoantigenen diskutiert (Pichler, Peter et al. 1996).

Im Falle der Zöliakie konnte 2006 bei Kindern mit Typ 1 Diabetes festgestellt werden, dass das Risiko an Zöliakie zu erkranken nicht nur von den oben erwähnten Genen modifiziert wird, sondern auch von einem anderen Gen innerhalb des Histokompatibilitätskomplexes, dem TNF-308A (Sumnik, Cinek et al.

2006). Neueste Untersuchungen von 2008 zeigen, dass sich mehrere Allele die genetisch bedingte Anfälligkeit für beide Krankheiten Typ 1 Diabetes und Zöliakie teilen. Smyth et al. fanden allerdings auch 21 Nicht-HLA assoziierte Genloci für Typ 1 Diabetes und 11 Nicht-HLA assoziierte Genloci für Zöliakie. Sie identifizierten 3 Zöliakiegenloci, die mit der Erkrankung Typ 1 Diabetes assoziiert werden und 2 Typ 1 Diabetesgenloci, die mit der Erkrankung Zöliakie in Verbindung gebracht werden (Smyth, Plagnol et al. 2008). Wie bereits erwähnt, führt das Vorhandensein dieser Gene zur Ausprägung von bestimmten Oberflächenmolekülen auf antigenpräsentierenden Zellen. Nachdem Gluten dem Körper zugeführt wurde und von pankreatischen oder intestinalen Bürstensaumproteasen in freie Aminosäuren oder kleinere Di-, Tri-, oder Tetrapeptide aufgespalten wurde, gelangen diese Fragmente durch das Darmepithel und die Basalzellschicht in subepitheliale Bindegewebschichten. Dort kann es zu mehreren immunologischen Abläufen kommen. Dabei führt eine intestinale Infektion oder Erosion zu der inflammatorischen TH1- und humoralen TH2-Immunantwort. Die Gewebeerstörung basiert vermutlich auf einer überschießenden Reaktion der Metalloproteinasen ohne Aktivierung ihrer Inhibitoren. Normalerweise gelangen die Peptidfragmente durch das Epithel, werden von den APC's aufgenommen und von den T-Lymphozyten präsentiert. Die APC's wandern in die regionalen Lymphknoten und lösen im Normalfall keine Aktivierung des Immunsystems aus. Im Falle der Zöliakie sind die mukosalen APC's durch das Vorhandensein einer Entzündung bereits aktiviert und erlangen durch den Kontakt mit dem Antigen die Fähigkeit, CD4+ -T-Zellen der Lamina propria zu aktivieren. Diese sezernieren daraufhin vermehrt TH1-Zytokine wie TNF- α oder IFN- γ . Diese Zytokine könnten zum einen die Schleimhaut direkt schädigen oder weitere Mechanismen aktivieren. Zum Beispiel werden durch diese proinflammatorischen Zytokine aktivierter TH1-Zellen die Bindegewebszellen der Lamina propria angeregt, vermehrt Matrix Metalloproteinasen zu produzieren, jedoch ohne die Inhibitoren dieser Proteinasenproduktion zu aktivieren. Daher kommt es zu einer Destruktion des Gewebes durch Bindegewebsauflösung (Hansson 1999, Collin, Kaukinen et al. 2002). Die humorale Antwort basiert ebenfalls auf der Präsentation der Peptidfragmente auf den APC's. Diese werden TH2-Zellen präsentiert, was eine Ko-Stimulation der B-Zelle ermöglicht. Einerseits gehen die B-Zellen eine

Interaktion mit der TH2-Zelle ein, andererseits wird durch Zytokinsekernierung der TH2-Zellen von IL-4 und IL-5 die B-Zelle befördert, sich in eine antikörperproduzierende Plasmazelle zu umzuwandeln (Hansson 1999).

Die Rolle der tTG liegt vermutlich darin, dass tTG mehrere Immunreaktionen initiiert, die letztendlich gegen Gliadin und gegen tTG, als Autoantigen gerichtet ist. In der Phase der Entzündung ist es zum einen möglich, dass freies Gliadin eindringt, zum anderen liegt durch die Zellzerstörung lokal freies tTG vor. Die tTG zerlegt mittels Desaminierung Gliadin in kleinere, vorwiegend negativ-geladene Peptide, die eine besondere Affinität zu den auf den APC's befindlichen Heterodimeren HLA-DQ8 und HLA-DQ2 aufweisen (siehe oben). Dadurch werden die, sich nur in der Lamina propria befindlichen spezifischen Zöliakie-T-Zellen aktiviert und lösen eine gegen Gliadin und seine Fragmente gerichtete Immunreaktion aus (Arentz-Hansen et al 2000).

1.4 Formen der Zöliakie, Diagnose der Zöliakie

Man unterscheidet verschiedene klinische Formen der Zöliakie. Die symptomatische, die stille und die latente Form. Die symptomatische oder auch aktive Zöliakie beschreibt die klassische Form der Zöliakie wie in 1.1 dargestellt. Die stille Form der Zöliakie erfasst Patienten, die, obwohl sie keine klinisch erkennbaren Malabsorptionen oder Mangelerscheinungen aufweisen, das Phänomen der Zottenatrophie besitzen. In Erscheinung treten diese vor allem im Rahmen von Untersuchungen sogenannter Risikogruppen (siehe 1.5 Zöliakie und andere Erkrankungen). Die latente Zöliakie ist die Form, bei der sich ohne Ernährungsumstellung die Dünndarmmukosa von einer normalen Form in eine atrophierte Form verwandelt und bei GFD wieder normalisiert (Keller 2001).

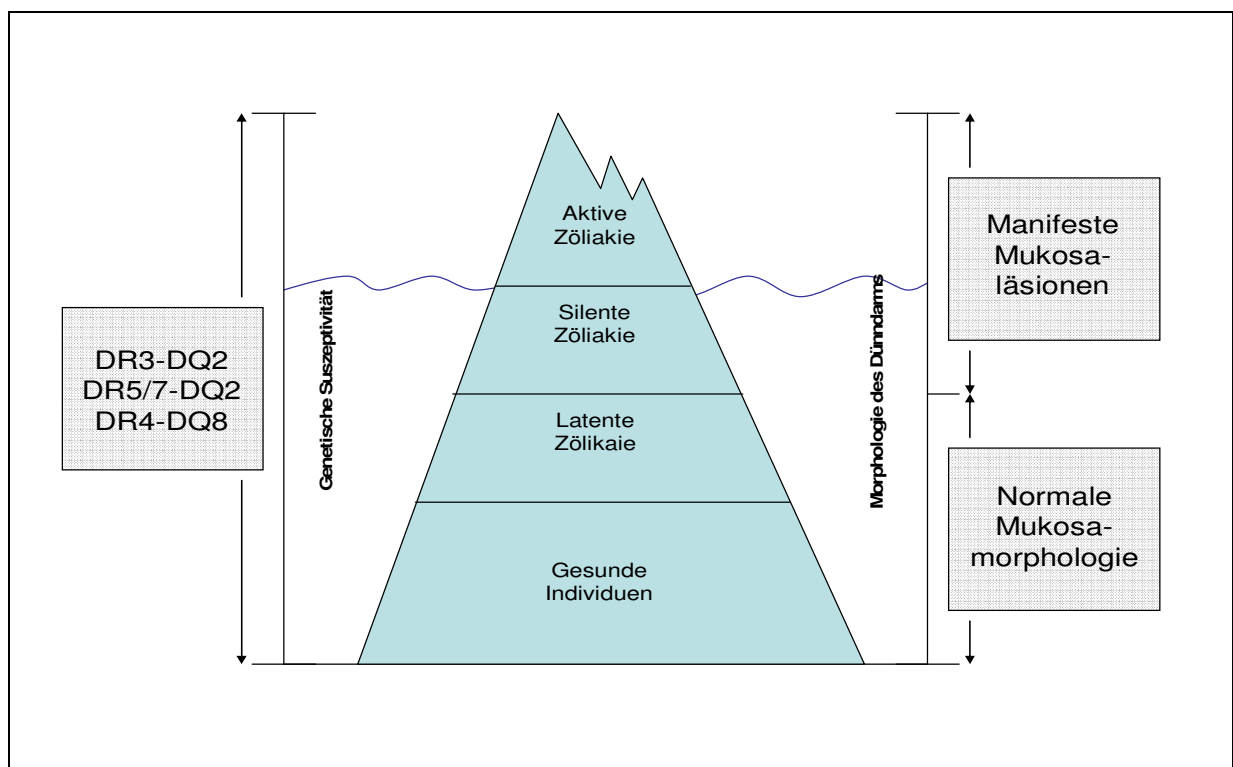


Abbildung 1: Der Zöliakie-Eisberg und das Spektrum der Glutensensibilität (nach Mäki und Collin 1997); DR, DQ = HLA-Genloci auf dem Chromosom 6

Da die Zöliakie ein sehr heterogenes Krankheitsbild mit unterschiedlichen Verlaufsformen darstellt, bedarf es einer Vereinheitlichung der Begrifflichkeiten. 2005 veröffentlichten Hohlmeier W. et al eine Stellungnahme einer

Expertengruppe der DZG. Dabei werden 8 Verlaufsformen und ihre Definitionen beschrieben:

1. Die klassische Zöliakie, auch symptomatische oder klinisch typische Zöliakie, definiert das Vollbild der Erkrankung mit den typischen Symptomen wie Diarrhö, Blähungen, Koliken, Erbrechen und Gewichtsverlust. Die Serologie ist eindeutig positiv bezüglich Antikörper gegen das Enzym tTG. Die Duodenalhistologie weist die eindeutigen, für die Zöliakie typischen Befunde auf. Durch Einhaltung einer GFD zeigt sich eine rasche Besserung.

2. Die mono- oder oligosymptomatische Zöliakie beschreibt die Verlaufsform bei der nur eine, diskrete Symptomatik wie Eisenmangel (-anämie) oder Kleinwuchs zu beschreiben ist. Die serologischen, wie histologischen Befunde der Patienten zeigen jedoch wie bei der klassischen Form charakteristische Zeichen. Die Empfehlung liegt auch hier bei der Einhaltung einer lebenslangen GFD.

3. Die stumme oder auch silente bzw. asymptomatische Form der Zöliakie ist relativ häufig und wird, wie bereits von Keller 2001 beschrieben (s.o.), eher im Rahmen von Zufallsbefunden während anderer Screening-Untersuchungen diagnostiziert. Bei den sonst allgemein beschwerdefreien Patienten können serologisch wie histologisch eindeutig Zöliakie-Zeichen festgestellt werden. Nach Einhaltung einer GFD klingen diese ab. Meist wird den Patienten erst dadurch bewusst, dass eine Befindlichkeitsstörung vorhanden war. Eine langfristige bzw. lebenslange GFD erweist sich als sinnvoll, kann jedoch im Einzelfall diskutiert werden. Es sollten in beiden Fällen Verlaufskontrollen stattfinden, um eine eventuelle Mangelernährung aufzudecken und therapieren zu können.

4. Die atypische Zöliakie weist vorwiegend extraintestinale Symptome auf. Auch hier sind serologisch und histologisch typische Veränderungen nachzuweisen. Die schwer zu diagnostizierende Erkrankungsform hat ein uncharakteristisches Erscheinungsbild und wird oftmals differenzialdiagnostisch nicht mit einbezogen. Diesen Patienten kann teilweise mit einer Ernährungsumstellung geholfen werden, daher sollte dieser Form besonderes Augenmerk gelten, um früh eine Diagnose stellen zu können.

5. Die latente Form der Zöliakie weist unter glutenhaltiger Kost weder histologisch noch serologisch Auffälligkeiten auf, allerdings kann sich durch vermehrte Aufnahme von Gliadin eine Zöliakie manifestieren. Diese klingt unter Einhaltung einer GFD wieder ab. Einige Patienten wiesen in der Vergangenheit bereits

Zöliakiezeichen auf, die sich nach GFD auch besserten. Diese Gruppe sollte regelmäßig bei glutenhaltiger Kost kontrolliert werden, ob sich Beschwerdebild, Antikörper-Titer und Histologie entsprechend verändern. In diesen Fällen wäre auch hier eine lebenslange GFD indiziert.

6. Die potenzielle Zöliakie definiert z. B. erstgradige Verwandte von Zöliakiepatienten, die keine oder nur geringe Zöliakie-Zeichen aufweisen. Es können erhöhte Antikörpertiter auftreten, allerdings ohne den dazugehörigen histologisch pathologischen Befund. Bei diesen Patienten tritt die manifeste Zöliakie erst nach längerem oder verstärktem Glutenkonsum und/oder weiteren Auslösefaktoren wie Infektionen in Erscheinung. Erst dann bedarf es einer GFD und einer regelmäßigen Verlaufskontrolle.

7. Die transiente Form der Zöliakie beschreibt die wenigen Fälle, bei denen Kinder im frühen Kindesalter (vor dem 2. Lebensjahr) mit eindeutigen Zöliakie-Zeichen diagnostiziert wurden, über Jahre hinweg glutenfrei ernährt wurden und dann, nach Umstellung auf glutenhaltige Kost, beschwerdefrei blieben. Sowohl serologisch als auch histologisch sind die Patienten dann unauffällig. Allerdings können diese Patienten später wieder durch allergische oder infektiöse Erkrankungen als Ursache eine Zöliakie entwickeln.

8. Die refraktäre Zöliakie beschreibt die Krankheitsform bei der, bei Patienten mit langem Krankheitsverlauf und eindeutigen Serologie und Histologienachweisen, die GFD keine Besserung hervorbringt. Diese Form wird abermals in 2 Subtypen unterteilt: Typ 1 mit normaler Population intraepithelialer Lymphozyten und Typ 2 mit aberanten oder prämaligen intraepithelialen Lymphozyten. Die Behandlung dieser Form erfolgt mit Prednisolon oder Budesonid. Die Prognose für die refraktäre Zöliakie Typ 1 ist deutlich besser als die für die refraktäre Zöliakie Typ 2.

Zwar werden die serologischen Tests immer zuverlässiger, aber dennoch reichen sie nicht aus, um die Krankheit Zöliakie eindeutig zu diagnostizieren. Die Diagnose Zöliakie zieht eine lebenslange strenge Diät nach sich, unabhängig des Lebensalters. Daher ist ein eindeutiger histologischer Befund immer noch die Grundlage der Diagnostik. Die histologischen Proben werden heutzutage meist mittels einer Oesophagogastroduodenoskopie gewonnen. Diese hat gegenüber der früher üblichen Saugbiopsie den Vorteil, dass die Dünndarmschleimhaut direkt

begutachtet werden kann. Dabei werden von verschiedenen Stellen vom Bulbus duodeni bis zum oberen Jejunum Proben entnommen. Danach werden die Proben durch den Pathologen beurteilt. Laut DZG sollte die Beurteilung nach den modifizierten Marsh-Kriterien nach Oberhuber erfolgen. Man unterscheidet dabei 3 Haupttypen: den infiltrativen Typ I, mit einer Erhöhung der intraepithelialen Lymphozytenzahl ($> 30/100$ Epithelzellen) und normaler Schleimhautarchitektur, den hyperplastischen Typ II, mit einer Kryptenhyperplasie, erhöhten intraepithelialen Lymphozyten und unauffälligen Zottenrelief und den destruktiven Typ III mit 3 Subtypen a bis c, der eine Zottenverplumpung bzw. Abflachung, Kryptenhyperplasie, erhöhte intraepitheliale Lymphozyten und entzündliches Infiltrat in der Lamina propria aufweist (DZG 2009).

1.5 Zöliakie und andere Erkrankungen

Das Diagnose der Krankheit Zöliakie und der Begleitkrankheiten ist durch die Serologie sehr erleichtert worden. Zu den häufigsten Begleiterkrankungen zählen die Dermatitis herpetiformis Duhring, die Laktoseintoleranz und die Osteoporose. Außerdem können einige Probleme aus dem gynäkologischen Bereich auftreten. Zu den autoimmunen Begleiterkrankungen gehören Diabetes Typ 1, Schilddrüsenerkrankungen und Erkrankungen der Leber. Als Komplikation der Zöliakie ist die gehäufte Malignomentstehung zu nennen.

Die Dermatitis herpetiformis Duhring, eine durch Bläschen charakterisierte Hautkrankheit, ist das klassische Beispiel der nicht-gastrointestinalen Manifestation der Zöliakie mit granulärer IgA Ablagerung an unberührter Haut. Die stark juckende Hauterkrankung mit Prädilektionsstellen an Gesäß, den Knien, den Ellenbogen, sowie der behaarten Kopfhaut ist stets mit einer Zöliakie assoziiert (DZG 2009). 75% der Patienten mit Dermatitis herpetiformis weisen eine Dünndarm-Zottenatrophie mit hyperplastischen Krypten auf. Dermatitis herpetiformis Duhring und Zöliakie teilen sich den HLA-DQ2-positiven HLA-Haplotyp als Risikomerkmak, und beide Krankheiten können innerhalb einer Familie auftreten. Die Dermatitis herpetiformis Duhring kann eher als eine Manifestation an der Haut, statt als Begleitkrankheit der Zöliakie angesehen werden (Mäki und Collin 1997). Die granulären IgA-Ablagerungen in der Haut werden mittels einer Hautprobe diagnostiziert. Dabei wird die Hautprobe unter strengen Transportbedingungen in ein Speziallabor gesandt und dort mittels direkter Immunfluoreszenz bestimmt. Therapiert werden Patienten mit Dermatitis herpetiformis Duhring mit niedrig dosiertem Dapson als Antiinfektiva. Eine externe, kutane Therapie bleibt meist ohne Erfolg. Mittels GFD allerdings kann die Dapsondosis deutlich reduziert, teilweise ganz abgesetzt werden.

Bei der Laktoseintoleranz kommt folgender Mechanismus zum Tragen: Die Laktase befindet sich im Bürstensaum des Dünndarmepithels. Dort wird Laktose als Disaccharid in die Monosaccharide Galactose und Glucose gespalten. Infolge der Schleimhautschädigung im Darm wird weniger Enzym zu Spaltung produziert. Die Patienten sind daher nicht in der Lage Lactose ausreichend zu spalten. Dies wird als sekundäre Laktoseintoleranz bezeichnet. Nach GFD und

Lactoseabstinenz regeneriert sich die Darmschleimhaut und auch die Enzymproduktion normalisiert sich. Dies kann allerdings, abhängig von der Heilungszeit des Darms, eine jahrelange lactosearme bzw. lactosefreie Kost bedeuten. Bei der primären Lactoseintoleranz liegt ein Gendefekt vor. Dadurch vermindert sich kontinuierlich die Laktaseaktivität ab dem 4./5. Lebensjahr. Wenn sich die Symptome wie Blähungen, Bauchschmerzen und Durchfälle trotz strenger Einhaltung der GFD nicht bessern, sollte ein H₂-Exhalationstest durchgeführt werden. Dadurch wird zwar nicht zwischen primärer und sekundärer Laktoseintoleranz unterschieden, die primäre kann dann allerdings durch eine entsprechende Gentestung gesichert werden. Ist bei beiden Fällen eine laktosefreie bzw. laktosearme Kost indiziert, sollte strikt auf die Kalziumversorgung der Patienten geachtet werden, da sich gezeigt hat, dass Patienten mit Laktoseintoleranz eine verminderte Knochendichte aufweisen (DZG 2009).

Ca. 20 – 50% der neu diagnostizierten Zöliakiepatienten weisen eine Osteopenie bis Osteoporose auf. Dabei scheinen 2 Mechanismen zum Tragen zu kommen. Erstens die Malabsorption, d. h. die Unfähigkeit Kalzium aufzunehmen und zweitens die Präsenz einer Entzündung mit all ihren Mediatoren. Durch diese Mediatoren werden Osteoklasten zur Aktivität animiert. Wichtig bei dieser Begleiterkrankung ist die frühzeitige Diagnose, da im frühen Kindesalter die Mangelercheinungen besser therapiert werden können. So können Dichtewerte im Knochen von nicht Zöliakie-Patienten erreicht werden. Das Auftreten von Osteoporose beim Zöliakiepatienten wird durch einige Risikofaktoren beeinflusst. So sind häufige Diätfehler, persistierende Zottenatrophie, Laktoseintoleranz und vermindertes Körpergewicht und, wie oben erwähnt, die späte Diagnosestellung, zu nennen. So ist auch bei diesen Patienten auf eine geregelte Kalziumzufuhr bei strenger Diät zu achten. Bei Laktoseintoleranz muss demnach kontrolliert Kalzium zugeführt werden, z. B. mit kalziumhaltigem Mineralwasser. Gegebenenfalls muss Kalzium zusätzlich supplementiert werden (DZG 2009, Bianchi und Bardella 2008).

Aus der Gynäkologie werden einige Probleme in Verbindung mit Zöliakie gebracht. Es kommt ein verzögerter Eintritt in die Menarche, bei älteren Frauen ein vorzeitiger Eintritt der Menopause vor. Bezüglich der Fertilität treten bei Frauen mit unbehandelter Zöliakie vermehrt Probleme auf. Ebenfalls wird beim Mann eine verminderte Gonadenfunktion diskutiert. Behandelte Zöliakiepatienten bringen

vorwiegend normalgewichtige Kinder zur Welt, während Kinder unbehandelter Zöliakiepatienten oft untergewichtig geboren werden. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit einer strikten Einhaltung der GFD. Eine eindeutige Stellungnahme bzw. Richtlinie für die Betreuung schwangerer Zöliakiepatienten gibt es allerdings nicht (DZG 2009).

Einige Autoimmunkrankheiten, die den HLA DR3-DQ2 Haplotyp als Risikomerkmale tragen, scheinen stärker mit der Zöliakie verknüpft zu sein. Dazu zählen Diabetes Typ 1, autoimmune Schilddrüsenerkrankungen oder die autoimmune Hepatitis. 5% der Zöliakiepatienten haben Diabetes Typ 1 und ca. 5-8,3% der Diabetes Typ 1 Patienten weisen Zöliakie-Antikörper auf. Darunter finden sich auch Patienten mit eindeutigen histologischen Befunden. In über 90% der Fälle tritt zuerst die Diabetes auf, die Zöliakie manifestiert sich erst später. In den wenigen Fällen, in denen die Zöliakie zuerst auftritt, erscheint die Diabeteserkrankung besonders schwer. Außerdem zeigen sich in diesen Fällen besonders gehäuft auch andere Immunkrankheiten. Eine langfristige wiederholte Testung der Patienten auf Zöliakie-Antikörper ist wichtig, da bei vielen Diabetes-Patienten sich erhöhte Titer erst spät zeigen, obwohl bereits eine Zöliakie besteht. Außerdem kann es vorkommen, dass obwohl erhöhte Titerwerte vorliegen, sich keine oder nur geringe Schleimhautveränderungen zeigen. Diese Form der latenten Zöliakie geht meist in eine manifeste Form über. In jedem Fall ist eine Verlaufskontrolle von Typ 1-Diabetikern zu empfehlen. (Gillett, Gillett et al 2001, DZG 2009, Valerio, Maiuri et al 2002).

Etwa 8% der Zöliakiepatienten haben eine autoimmune Schilddrüsenerkrankung und bei etwa 1% der Patienten mit einer autoimmunen Schilddrüsenerkrankung wie z. B. der Hashimoto-Thyreoiditis oder Morbus Basedow besteht eine Zöliakie.

Bei unbehandelten Zöliakiepatienten ist es nicht selten, dass sich erhöhte „Leberwerte“ feststellen lassen. Im Umkehrschluss bedeutet dies für Patienten mit unklarer Ursache erhöhter Transaminasen, in die Differenzialdiagnostik eine Zöliakieserologie mit einzubeziehen. Bei 5-10% dieser unklaren Fälle konnte eine Zöliakie nachgewiesen werden. Bei Zöliakiepatienten mit erhöhten Leberwerten normalisierten sich diese bei 95% innerhalb eines Jahres bei Einhaltung einer GFD. Interessanterweise können bei Lebererkrankungen die Transglutaminase-Antikörper erhöht sein, obwohl keine Zöliakie vorliegt. In diesen Fällen liegen die

Endomysium-Antikörper im Normbereich und auch die Dudenalbiopsie zeigt ein unauffälliges Bild.

Patienten mit einem selektiven IgA-Mangel weisen ein 10-fach höheres Risiko auf, an Zöliakie zu erkranken. Das Sjögren-Syndrom, Haarausfall, die Addison Krankheit sind weitere Störungen, bei denen eine Verbindung zur Zöliakie möglich ist.

Das Dünndarmlymphomrisiko ist bei Patienten, bei denen die Zöliakie erst im Erwachsenenalter diagnostiziert wird, am Größten. Auch Pharynx- und Ösophaguskrebs kann bei Zöliakiepatienten vermehrt gefunden werden. Neueste Untersuchungen von 2004 zeigen allerdings, dass nur ein mäßig erhöhtes Tumorrisiko besteht, und dass sich durch Einhaltung einer strikten GFD eine Angleichung des Risikos an die Gesamtbevölkerung innerhalb von 5-10 Jahren ergibt (Mäki und Collin 1997, DZG 2009).

1.6 Fragestellung

Mit der Einführung der serologischen Diagnostik und der Entdeckung der Antikörper stieg die Prävalenz rapide an. Es wurde klar, dass die mittels Biopsie erfassten Zöliakiepatienten nur die Spitze eines Eisbergs darstellen. Die Nachteile der Gewebetests, des Endomysium- und Retikulintests sind die hohen Kosten und das begrenzte Angebot an Substrat, das aus dem Affenösophagus gewonnen werden muss. Zudem benötigt man für die Durchführung dieser Tests eigens geschultes Personal, da die Tests technisch sehr aufwendig sind. (Mäki und Collin 1997). Nachdem das Antigen tTG identifiziert worden war, konnten spezifische Testbestecke zum quantitativen Nachweis der Antikörper entwickelt werden. Durch Tests wie den Elisa wurde nicht nur die Erstdiagnostik, sondern auch die Folgediagnostik und Kontrolldiagnostik erleichtert. Die gängigen Tests benutzen das Antigen tTG, um IgA und IgG Antikörper nachzuweisen.

In dieser Arbeit wurde auf die Verteilung von IgA und IgG Anti-tTG-AK im Kontext Typ 1 Diabetes fokussiert. Dabei soll geprüft werden, ob die Ergebnisse eventuell Rückschlüsse auf das immunologische Geschehen ermöglichen und ob daraus eine Verbesserung der Diagnostik zu gewinnen ist.

2. Material und Methodik

2.1 Reagenzien, Lösungen und Puffer

Celikey®IgG PharmaciaDiagnostics (Sweden Diagnostics (Germany) GmbH)

Tissue Transglutaminase (human, recombinant) IgG Antibody Assay für in vitro Diagnostik

- Mikrotiterstreifen (17996) beschichtet mit humanem, rekombinatem tTG Antigen
- 6 tTG (IgG)-Antikörper Standardlösungen in den Konzentrationen 0 – 3 – 7 – 16 – 40 - 100 U/ml in PBS mit BSA 0,095% (w/v) Natriumazid
- 1 Positiv-Kontrolle mit BSA, 0,095% (w/v) Natriumazid, Detergens und Humanserum in PBS
- 1 Negativ-Kontrolle mit BSA, 0,095% (w/v) Natriumazid, Detergens und Humanserum in PBS
- Waschpufferkonzentrat 20x PBS-Konzentrat mit 0,095% (w/v) Natriumazid und Detergens
- Probenpuffer mit BSA, 0,095% (w/v) Natriumazid und Detergens, gelb eingefärbt
- IgG-Konjugat, Anti-human-IgG-Peroxidase, rot eingefärbt
- Enzymsubstrat TMB (3, 3', 5, 5', Tetramethylbenzidin)
- Stopplösung, 0,5 M H₂SO₄, farblos

Celikey® PharmaciaDiagnostics (Sweden Diagnostics (Germany) GmbH)
Tissue Transglutaminase (human, recombinant) IgA Antibody Assay für in vitro
Diagnostik

- Mikrotiterstreifen (18196) beschichtet mit humanem, rekombinatem tTG Antigen
- 6 tTG (IgA)-Antikörper Standardlösungen in den Konzentrationen 0-3-7-16-40-100 U/ml in PBS mit BSA 0.095% (w/v) Natriumazid
- 1 Positiv-Kontrolle mit BSA, 0,095% (w/v) Natriumazid, Detergens und Humanserum in PBS
- 1 Negativ-Kontrolle mit BSA, 0,095% (w/v) Natriumazid, Detergens und Humanserum in PBS
- Waschpufferkonzentrat 20x PBS-Konzentrat mit 0,095% (w/v) Natriumazid und Detergens
- Probenpuffer mit BSA, 0,095% (w/v) Natriumazid und Detergens, gelb eingefärbt
- IgA-Konjugat, Anti-human-IgA-Peroxidase, rot eingefärbt
- Enzymsubstrat TMB (3, 3', 5, 5', Tetramethylbenzidin)
- Stopplösung, 0,5 M H₂SO₄ , farblos

2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Eppendorf – Hamburg

- Pipette Reference
- Multipipette Multipipette plus
- Combitipp 1,0 ml, 2,5 ml, 5,0 ml

Sarstedt – Nümbrecht

- Pipetierspitzen gelb 10 – 100 μ l
- Pipetierspitzen blau 100 – 1000 μ l

Vortex

- Rüttler Genie

Ampuwa

- Destilliertes Wasser

SLT

- Spectra Mikrotiterplattenmessgerät

Epson

- LX-400 Drucker

Sonstiges

- herkömmlicher Personal Computer, MS Word 2003, MS Excel 2003
- Synelisa Software Ver. 3.2 Juli 1995
- Statistikprogramme Winstat und PASW Statistics 18

2.3 Patientenseren

Verwendet wurden Patientenseren, für die bereits IgA-Titer vorlagen. Ausgewählt wurden diejenigen Seren, die einen höheren IgA-Titer als 8 U/ml aufwiesen, um grenzwertig positive Seren (Graubereich) zu umgehen. Aus einer Grundgesamtheit von 803 Typ 1 Diabetespatienten wurden 73 IgA positive Seren von 44 weiblichen und 26 männlichen Patienten für die Bestimmung der IgA und IgG Titer ausgewählt. Bei 3 Proben konnte das Geschlecht nicht zugeordnet werden. Das Alter der Patienten erstreckt sich von 4 bis 84 Jahre.

25 der Patienten wiesen einen IgA Titer von größer als 100 U/ml auf. Die Seren dieser Patienten wurden mit den entsprechenden Verdünnungen weiter untersucht, um die Antikörpertiter zu quantifizieren.

Tabelle 1: Populationsübersicht, N=Anzahl

	Anzahl				Alter
	N	Männlich	Weiblich	Unbekannt	Spannweite
Studie 1	59	20	38	1	4 – 84
Studie 2	14	6	6	2	11 – 83

2.4 Titerbestimmung

Bei der Bestimmung der Titer wird die Basiseinheit U für „Units“ verwendet. Derzeit gibt es noch kein Verfahren, die Menge der Antikörper direkt zu quantifizieren. Die serologischen Untersuchungen beruhen auf einem indirekten „Sichtbarmachen“ der Antikörper in Form eines Farbumschlags, der photometrisch gemessen und zur Mengenbestimmung herangezogen werden kann. Folglich greift man zu willkürlichen Einheiten (arbitrary units), um die Ergebnisse besser vergleichen zu können.

2.4.1 Bestimmung des tTG-IgA Titers

Zur individuellen qualitativen und quantitativen Bestimmung von tTG IgA-Antikörpern im Serum wurde ein indirekter, nicht kompetitiver Enzym-Immunoassay verwendet. Dieser benutzt in der Festphase humanes, rekombinantes tTG-Antigen.

2.4.1.1 Verdünnung der Patientenseren

Da bei einigen Seren in der Verdünnung 1:100 kein eindeutiger Zahlenwert ermittelt werden konnte, weil die Extinktion über dem höchsten Standard und damit außerhalb des Messbereichs liegt, bedarf es der Verdünnung der Proben, um rechnerisch einen Zahlenwert zu erhalten. Dazu wurde 10 µl Serum mit 1000 µl Probenpuffer in einem Eppendorfgefäß zusammengeführt und unter Verschluss ein paar Sekunden auf einem Rüttler gemischt. Diese Probe wurde so lange mit Probenpuffer weiter verdünnt, bis die gewünschten Verdünnungen 1:300, 1:400 und 1:1000 erreicht wurden.

2.4.1.2 Durchführung

Zunächst wurden 75 ml PBS-Waschpuffer-Konzentrat mit 1425 ml destilliertem Wasser versetzt. Diese Lösung diente dem Auswaschen der Assay-Kavitäten.

Es wurden die Standards, die Positiv- und Negativ-Kontrollen, sowie die Patientenserum in Doppelbestimmungen ausgewählt.

Vor dem ersten Reaktionsschritt wurden die Kavitäten des Assays einmal mit 300 µl des Waschpuffers gefüllt, 20 Sekunden stehen gelassen und dann wieder geleert. Danach pipettierte man 100 µl der Standards, der Kontrollen und der jeweiligen verdünnten Proben in die entsprechenden Kavitäten.

In der Inkubationszeit von 30 Minuten fand die erste Reaktion zwischen den im Patientenserum vorhandenen spezifischen tTG-IgA-Antikörpern und dem Antigen des Assays statt. Danach entfernte man die Reagenzien mittels Ausklopfen auf saugfähigen Einmaltüchern und wusch sie 3x aus, indem man wiederholt 300 µl Waschpuffer in jede Kavität applizierte, diesen 20 Sekunden einwirken lässt und dann ausklopfte.

Für den zweiten Reaktionsschritt wurde 100 µl des Konjugat, dem enzymmarkierenden zweiten Antikörper, der Anti-human-IgA-Peroxidase, in die Kavitäten eingebracht. Dieses Konjugat verband sich zu einem enzymmarkierenden Konjugat-Antikörper-Antigen-Komplex. Nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit entfernte man erneut die Reagenzien aus den Kavitäten und wusch sie 3x mit PBS-Waschpuffer aus (s.o.). Danach wurden 100 µl Enzymsubstrat, 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin, in jede Kavität pipettiert und 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. In dieser Zeit setzte der enzymmarkierende Konjugat-Antikörper-Antigen-Komplex das Substrat in Form eines Farbumschlags von rot nach gelb um, wobei die Farbentwicklung abhängig von der im Komplex gebundenen Konjugatmenge und damit von der proportionalen gesuchten Antikörpermenge ist. Diese Reaktion wurde dann mit 50 µl H₂SO₄ in jeder Kavität gestoppt.

Die optischen Dichten wurden 30 Minuten nach dem Abstoppen mittels eines Mikrotiterplattenphotometers bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt.

Die Ergebnisse der Verdünnungen wurden dann entsprechend ihres Verdünnungsfaktors multipliziert.

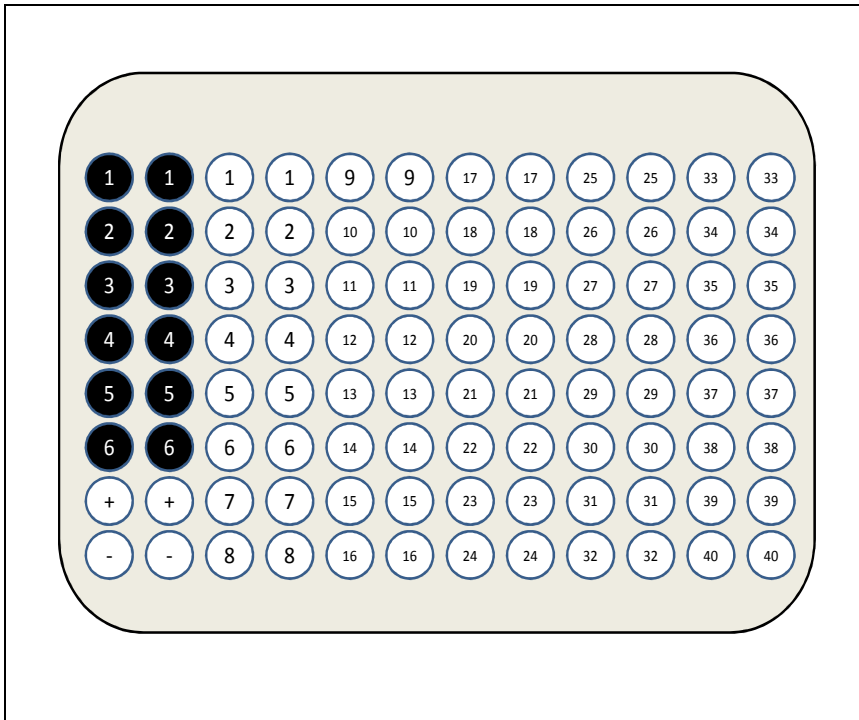


Abbildung 2: Pipettierschema

Standards: schwarz

Kontrollen: weiß +/-

Patienten: weiß, nummeriert

2.4.1.3 Graphische Darstellung des Versuchablaufs

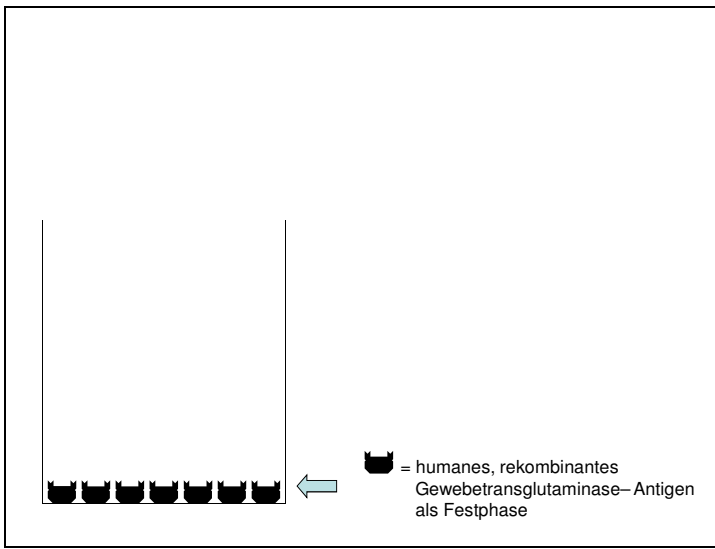


Abbildung 3: Versuchsaufbau schematisch 1 von 10

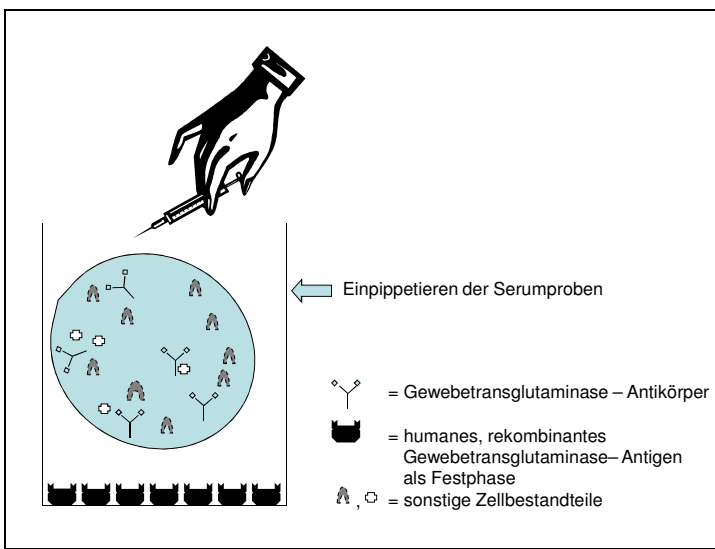


Abbildung 4: Versuchsaufbau schematisch 2 von 10

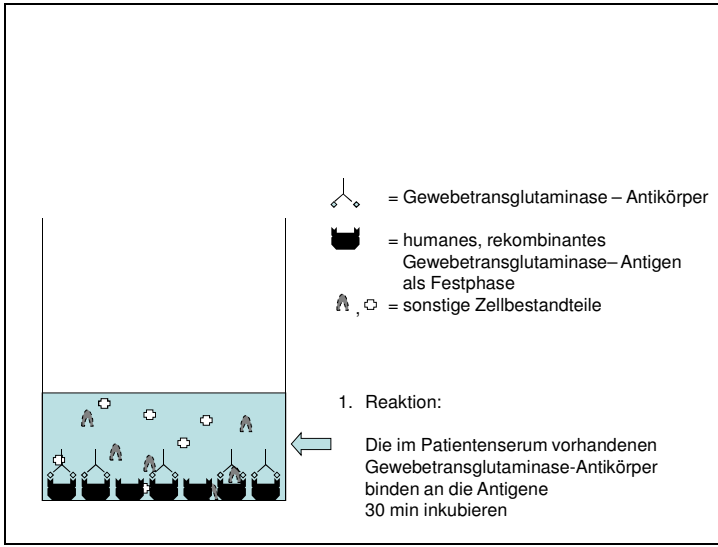


Abbildung 5: Versuchsaufbau schematisch 3 von 10

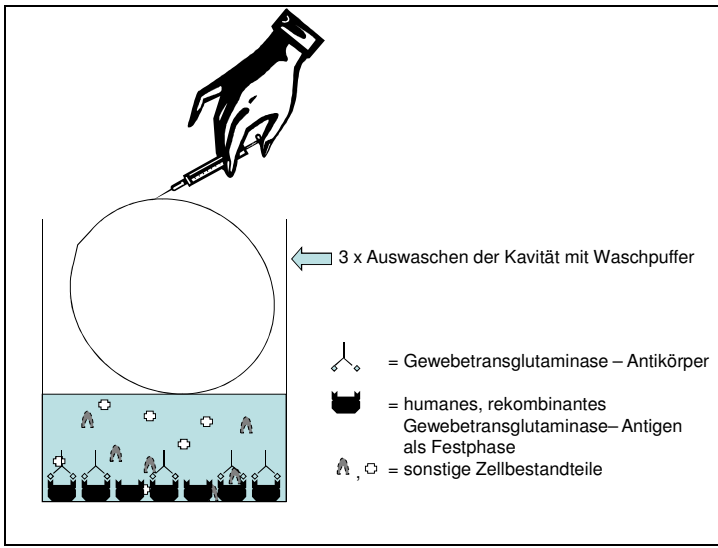


Abbildung 6: Versuchsaufbau schematisch 4 von 10

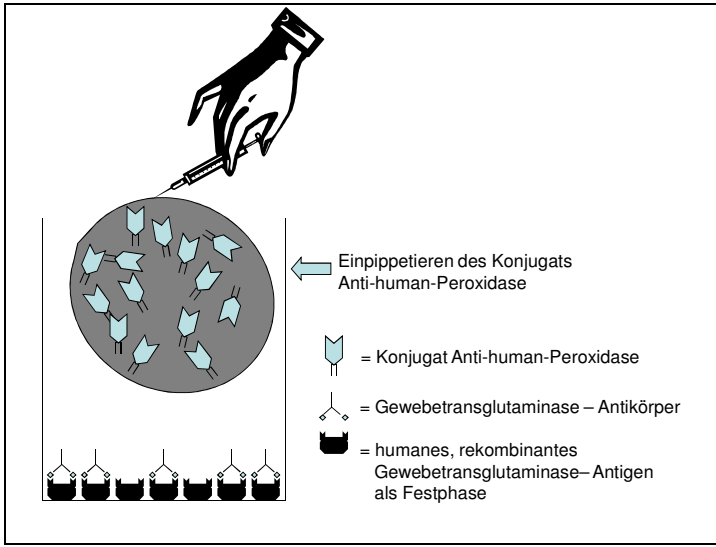


Abbildung 7: Versuchsaufbau schematisch 5 von 10

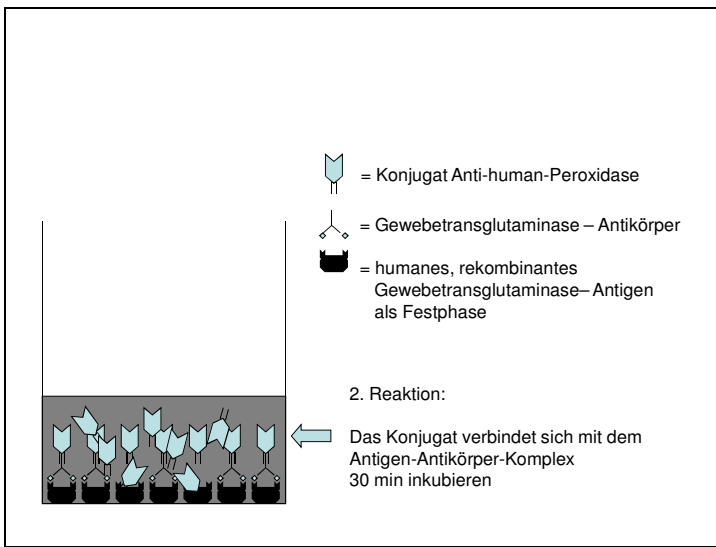


Abbildung 8: Versuchsaufbau schematisch 6 von 10

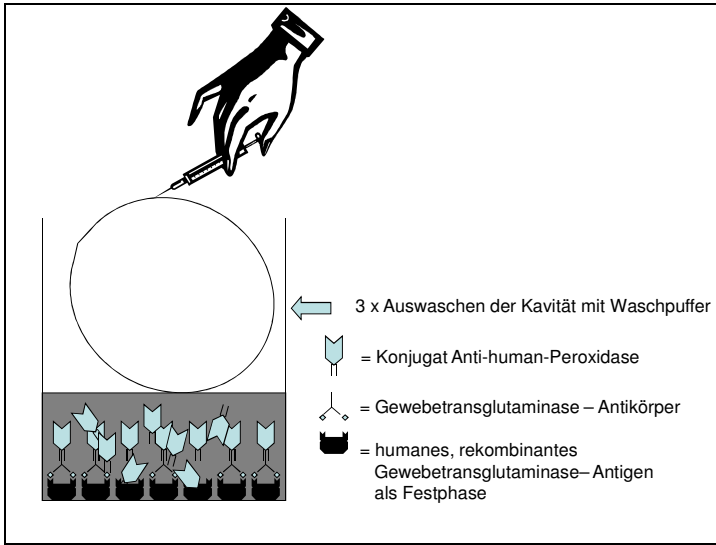


Abbildung 9: Versuchsaufbau schematisch 7 von 10

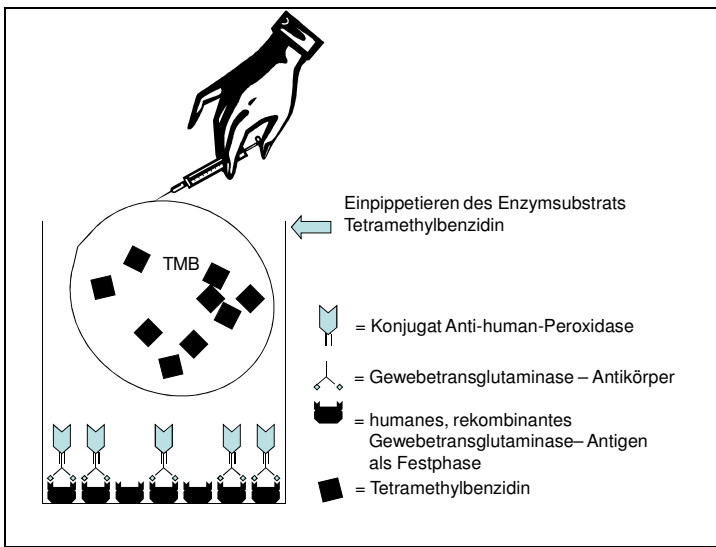


Abbildung 10: Versuchsaufbau schematisch 8 von 10, TMB= Tetramethylbenzidin

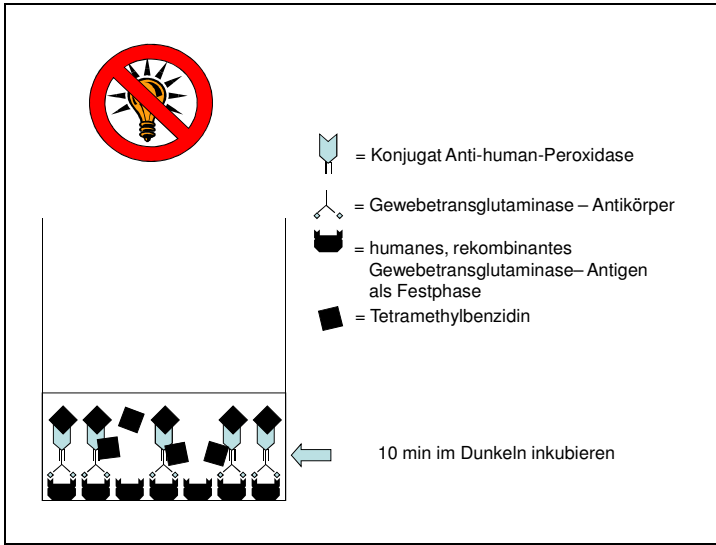


Abbildung 11: Versuchsaufbau schematisch 9 von 10

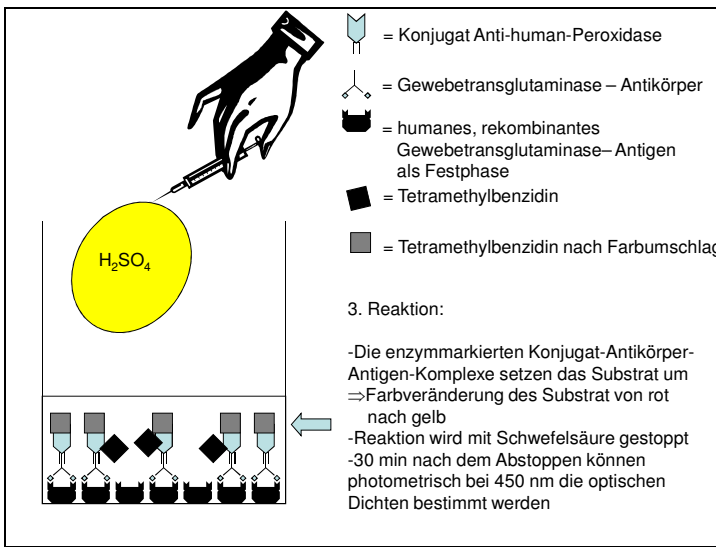


Abbildung 12: Versuchsaufbau schematisch 10 von 10, H_2SO_4 = Schwefelsäure

2.4.2 Bestimmung des tTG-IgG Titers

Hier wurde ebenfalls ein indirekter, nicht kompetitiver Enzym-Immunoassay, zur individuellen qualitativen und quantitativen Bestimmung von tTG-IgG-Antikörpern im Serum verwendet. Auch in diesem ELISA wird in der Festphase humanes, rekombinantes tTG-Antigen verwendet.

2.4.2.1 Verdünnung der Patientenserum

Vgl. 2.4.1.1

Im Unterschied zur tTG-IgA-Titerbestimmung wurden zur Standard 1:100 Verdünnung noch 1:200, 1:300, 1:400 und 1:1000 Verdünnungen benötigt, um die Titer zu bestimmen.

2.4.2.2 Durchführung

Vgl. 2.4.1.2

Die Durchführung der tTG-IgG-Titerbestimmung ist im Einzelnen mit der tTG-IgA-Titerbestimmung identisch. Auf das initiale Auswaschen der Kavitäten mit dem Waschpuffer wird allerdings verzichtet.

2.5 Statistik

Die Ergebnisse wurden mit dem Statistikprogramm WinStat und PASW Statistics 18 auf eventuell vorliegende Korrelationen überprüft. Ein rechnerischer Signifikanztest wird aufgrund der geringen Anzahl an Datensätzen nicht benötigt, stattdessen wurde der Rangkorrelationskoeffizient r_s nach Spearman zum Vergleich der beiden Datensätze benutzt. Dieser Rangkorrelationskoeffizient r_s ist ein dimensionsloser Index. Er gilt als Maß für die direkte lineare Beziehung zweier Datensätze. Er umfasst Werte von $-1,0 < r_s < +1,0$. Je näher der Wert bei $+1,0$ liegt, desto enger kann die Korrelation dieser beider Datensätze angesehen werden. Zusätzlich wurden die Verteilung, die Häufigkeiten und Mittelwerte bestimmt und miteinander verglichen.

3. Ergebnisse

3.1 Ermittlung des tTG-IgA Titers

Von den 73 Patientenseren befanden sich 25 Proben außerhalb des Messbereichs bzw. des linearen Bereichs der Standardkurve. Die Seren zeigten einen Titer >100 arbitrary units an. Um einen eventuellen Grenzfall im Bereich von 100 Units mit einzubeziehen, wurden diejenigen der 25 Proben erneut mit einer 1:100 Verdünnung getestet, die auch nach der 1:1000 Verdünnung nicht im linearen Bereich der Standardkurve zu liegen kamen. Dadurch konnten eindeutige Antikörpertiter ermittelt werden.

Die Titer umfassen Werte von 8,2 – 2744 U/ml. Es konnte kein Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Probanden festgestellt werden, da sowohl weibliche als auch männliche Probanden hohe und auch niedrige Titer aufweisen. Auch konnten keine Auffälligkeiten bezüglich des Alters der Patienten und der Messergebnisse beobachtet werden. Weder bei älteren, noch bei jüngeren Patienten gab es eine Häufung hoher, beziehungsweise niedriger Werte, bezogen auf das Alter. 90,5% der Messergebnisse lagen bei einem Titerwert von 0 bis 500 U/ml. 5,5% ergaben Titerwerte von 500 bis 1000 U/ml. Die restlichen 4% ergaben Werte von 1000 bis 3000 U/ml. Der Maximumwert liegt bei 2744 U/ml, der Minimumwert bei 8,2 U/ml, Somit ergibt sich eine Spannweite der Werte von 2735,8. Der Mittelwert liegt bei 202,24 U/ml, die Standardabweichung bei 419,84 U/ml. Das breite Ergebnisfeld befindet sich also im unteren Bereich der Werte von 0 bis 3000 U/ml (s.o.).

Die Titer wurden mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Test mit der Signifikanzkorrektur nach Lilliefors auf Normalverteilung untersucht. Dieser besagt, dass bei einem Signifikanzwert gegen „ ,000 “ von einer Normalverteilungsannahme Abstand genommen werden muss. Sowohl die absoluten Titerwerte als auch die logarithmierten Titerwerte zu Basis e ergaben keine Normalverteilung (siehe Tabelle 2 und Abb. 13 + 14).

Tabelle 2: Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors für tTG(IgA) und ln[tTG(IgA)], tTG(IgA)= Antikörper vom Typ A gegen Gewebetransglutaminase, ln = Logarithmus zur Basis e, n= Anzahl

	Kolmogorov-Smirnov	
	n	Signifikanz
tTG(IgA)	73	,000
ln[tTG(IgA)]	73	,032

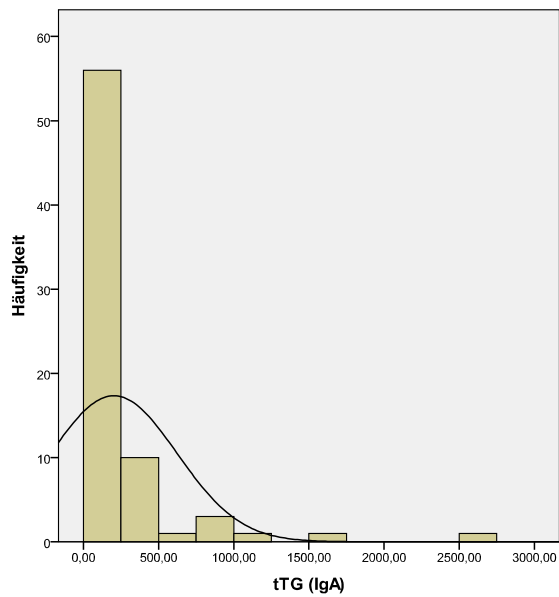


Abbildung 13: Histogramm der absoluten Titerwerte von tTG(IgA) mit Normalverteilungskurve, tTG(IgA)= Antikörper vom Typ A gegen Gewebetransglutaminase

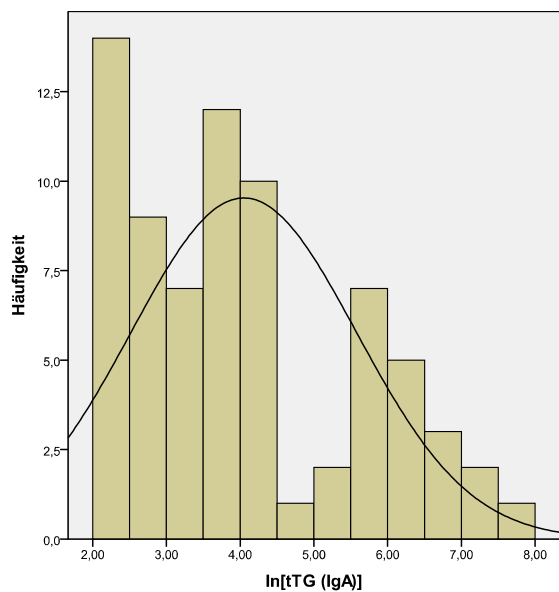


Abbildung 14: Histogramm der logarithmierten Titerwerte zur Basis e von tTG(IgA) mit Normalverteilungskurve, ln= Logarithmus zur Basis e, tTG(IgA)= Antikörper vom Typ A gegen Gewebetransglutaminase

3.2 Ermittlung des tTG-IgG Titers

Bei der Ermittlung des tTG-IgG Titers wurden insgesamt 5 Verdünnungen (1:100, 1:200, 1:300, 1:400 und 1:1000) benötigt, um bei allen Proben eindeutige Werte im linearen Bereich der Standardkurve zu erhalten.

Die Werte erstrecken sich von 0,86 – 459,2 U/ml. Auch bei dieser Bestimmung ergab es ein gemischtes Bild. So lässt sich auch hier keine Korrelation zwischen hohen oder niedrigen Werten und dem Geschlecht zuordnen, da sowohl männliche als auch weibliche Serenproben hohe und niedrige Titer aufweisen. Auch bei der Ermittlung des tTG-IgG Titers konnte kein Zusammenhang bezüglich des Alters und hoher bzw. niedriger Titerwerte gestellt werden. Sowohl ältere als auch jüngere Patienten weisen hohe bzw. niedrige Werte auf. Die IgG Werte zeichnen ein breiteres Verteilungsmuster auf. 86% ergaben Werte von 0 bis 50 U/ml. 5,5 % hatten Werte von 100 bis 150 U/ml. Ca. 3% verteilen sich auf den Bereich zwischen 150 bis 200 U/ml. Der Rest mit je ca. 2% Anteil liegt bei 50 bis 100 U/ml, 200 bis 250 U/ml, 350 bis 400 U/ml und 450 bis 500 U/ml. In den Bereichen 250 bis 350 U/ml und 400 bis 450 U/ml kamen keine Ergebnisse zum liegen. Das Maximum liegt bei 459,20 U/ml, das Minimum bei 0,86. Dies ergibt eine Spannweite der Werte von 458,34. Der Mittelwert liegt bei 35,95 U/ml, die Standardabweichung bei 78,66 U/ml. Auch hier befindet sich der Hauptbereich im unteren Drittel der Gesamtwerte.

Auch bei diesen Titern wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test mit der Signifikanzkorrektur nach Lilliefors verwendet. Auch hier ergaben die absoluten Titerwerte als auch die logarithmierten Titerwerte zu Basis e keine Normalverteilung (siehe Tabelle 3 und Abb. 15 + 16).

Tabelle 3: Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors für tTG(IgG) und $\ln[tTG(IgG)]$, tTG(IgG)= Antikörper vom Typ G gegen Gewebetransglutaminase, \ln = Logarithmus zur Basis e, n= Anzahl

	Kolmogorov-Smirnov	
	n	Signifikanz
tTG(IgG)	73	,000
$\ln[tTG(IgG)]$	73	,000

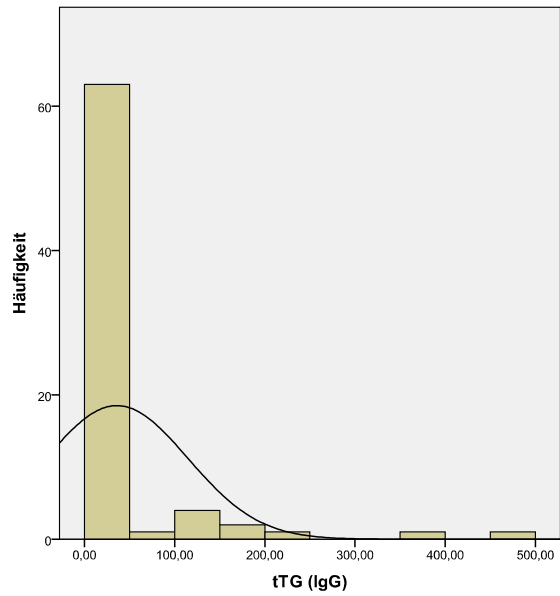


Abbildung 15: Histogramm der absoluten Titerwerte von tTG(IgG) mit Normalverteilungskurve, tTG(IgG)= Antikörper vom Typ G gegen Gewebetransglutaminase

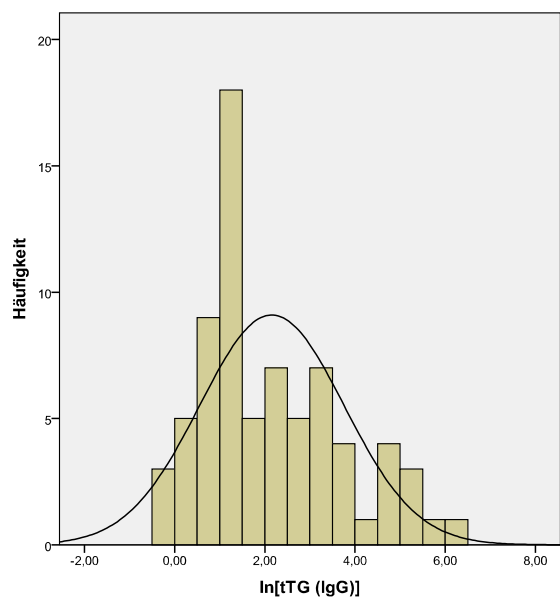


Abbildung 16: Histogramm der logarithmierten Titerwerte zur Basis e von tTG(IgG) mit Normalverteilungskurve, ln= Logarithmus zur Basis e, tTG(IgG)= Antikörper vom Typ G gegen Gewebetransglutaminase

3.3 Direkter Vergleich von tTG-IgG zu tTG-IgA Titer

Im direkten Vergleich der Ergebnisse der tTG-IgA und der tTG-IgG Titerermittlung und der vergleichenden graphischen Darstellung der Probandentiter wird Folgendes ersichtlich:

Bei 93 % (69 von 73) der Proben liegt der IgA Titer über dem des IgG; bei 7 % davon (5 von 69) liegt der Wert signifikant höher über dem des IgG (siehe Abbildung 17 - 24).

Bei 7% (5 von 73) der Proben liegt hingegen der IgG Titer über dem des IgA (siehe Abbildung 17 - 24).

Bei der Betrachtung der Balkendiagramme von IgA und IgG im Vergleich wird Folgendes ersichtlich:

- Die Werte von IgA und IgG korrelieren nicht miteinander, d. h. ein hoher tTG-IgA Titer bedingt nicht einen hohen tTG-IgG Titer.
- Ebenso geht ein niedriger IgA Titer nicht mit einem niedrigen IgG Titer einher und umgekehrt.
- Liegt hingegen ein hoher IgG Titer vor, so liegt auch ein hoher IgA Titer vor.

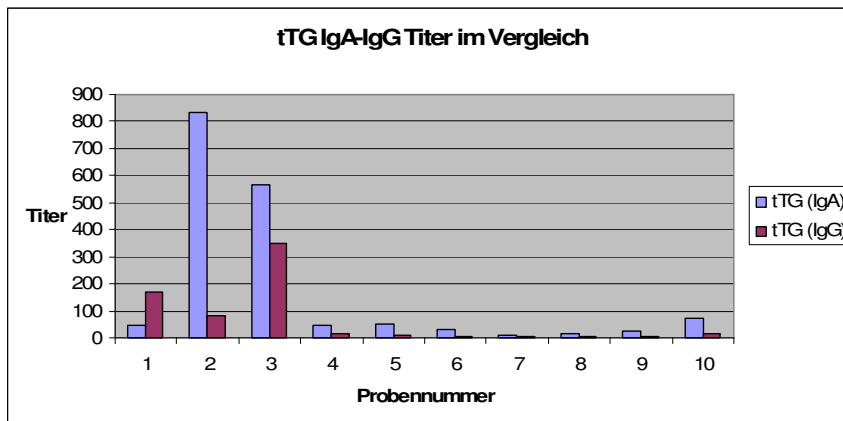


Abbildung 17: tTG IgA-IgG Titer im Vergleich, Probennummer 1-10, tTG (IgA)= Antikörper vom Typ A gegen Gewebetransglutaminase, tTG (IgG)= Antikörper vom Typ G gegen Gewebetransglutaminase

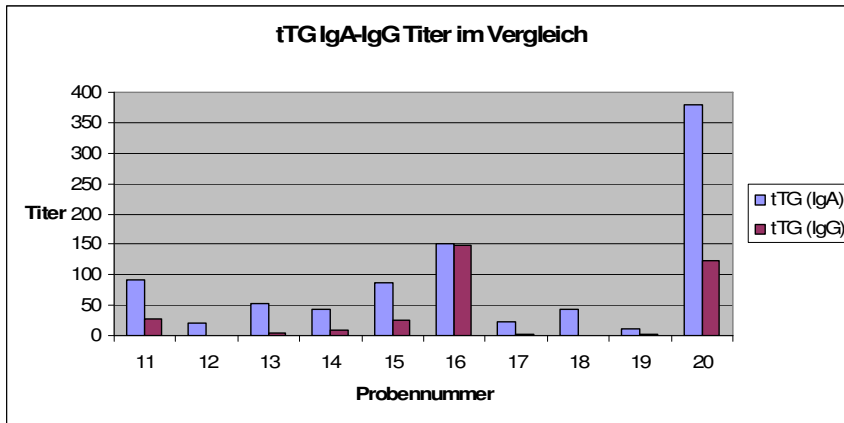


Abbildung 18: tTG IgA-IgG Titer im Vergleich, Probennummer 11-20, tTG (IgA)= Antikörper vom Typ A gegen Gewebetransglutaminase, tTG (IgG)= Antikörper vom Typ G gegen Gewebetransglutaminase

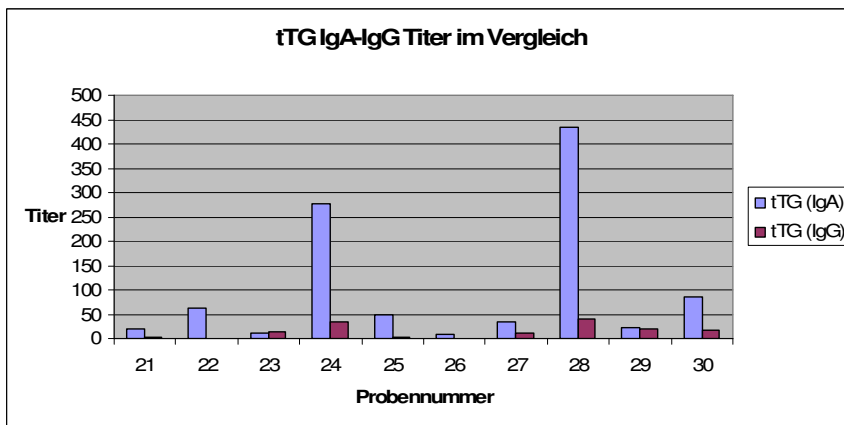


Abbildung 19: tTG IgA-IgG Titer im Vergleich, Probennummer 21-30, tTG (IgA)= Antikörper vom Typ A gegen Gewebetransglutaminase, tTG (IgG)= Antikörper vom Typ G gegen Gewebetransglutaminase

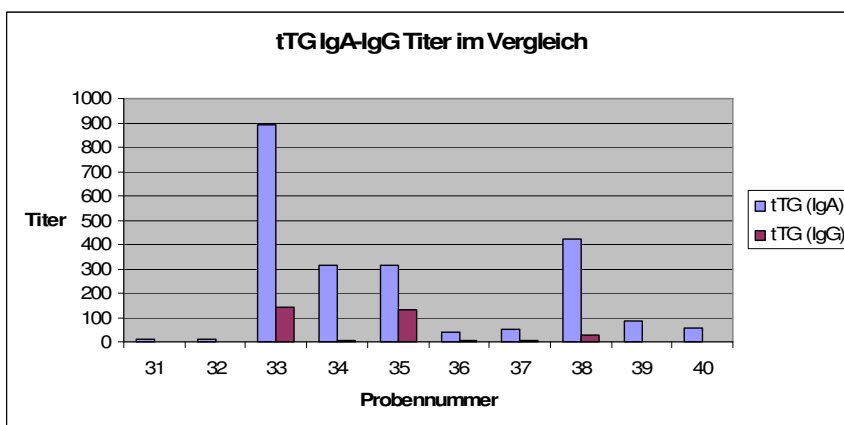


Abbildung 20: tTG IgA-IgG Titer im Vergleich, Probennummer 31-40, tTG (IgA)= Antikörper vom Typ A gegen Gewebetransglutaminase, tTG (IgG)= Antikörper vom Typ G gegen Gewebetransglutaminase

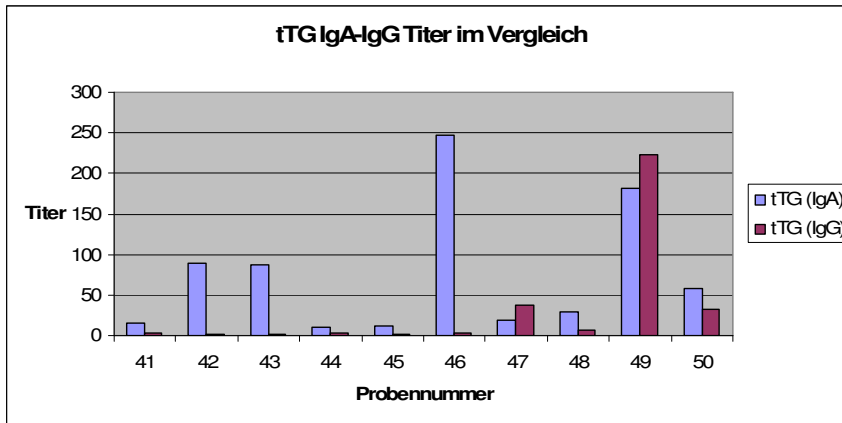


Abbildung 21: tTG IgA-IgG Titer im Vergleich, Probennummer 41-50, tTG (IgA)= Antikörper vom Typ A gegen Gewebetransglutaminase, tTG (IgG)= Antikörper vom Typ G gegen Gewebetransglutaminase

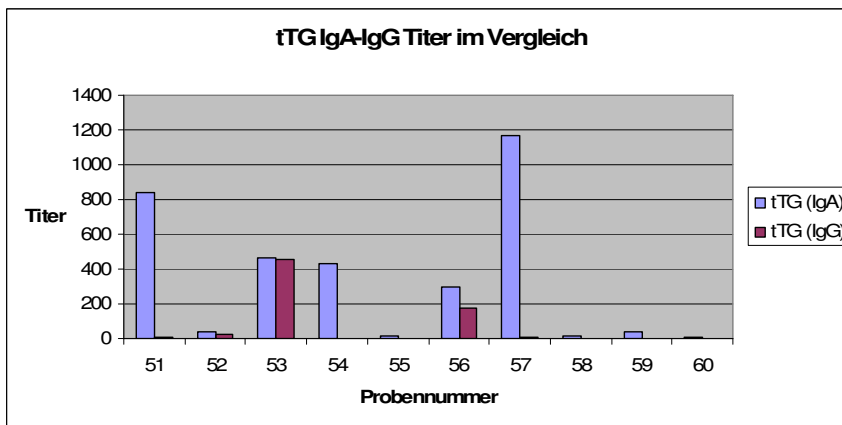


Abbildung 22: tTG IgA-IgG Titer im Vergleich, Probennummer 51-60, tTG (IgA)= Antikörper vom Typ A gegen Gewebetransglutaminase, tTG (IgG)= Antikörper vom Typ G gegen Gewebetransglutaminase

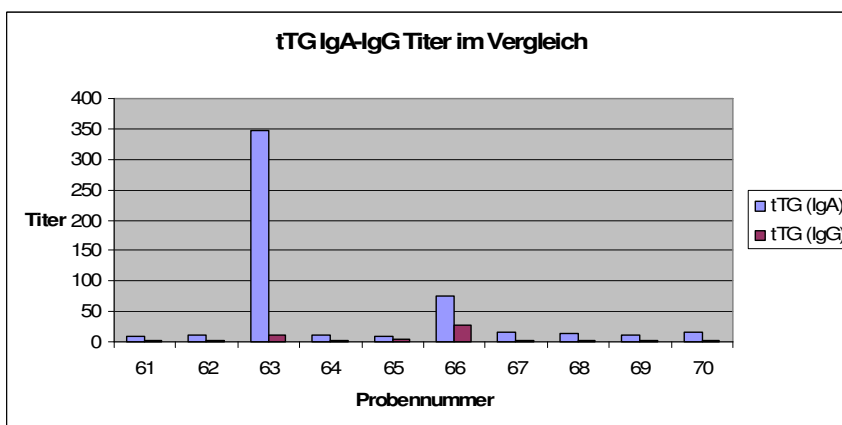


Abbildung 23: tTG IgA-IgG Titer im Vergleich, Probennummer 61-70, tTG (IgA)= Antikörper vom Typ A gegen Gewebetransglutaminase, tTG (IgG)= Antikörper vom Typ G gegen Gewebetransglutaminase

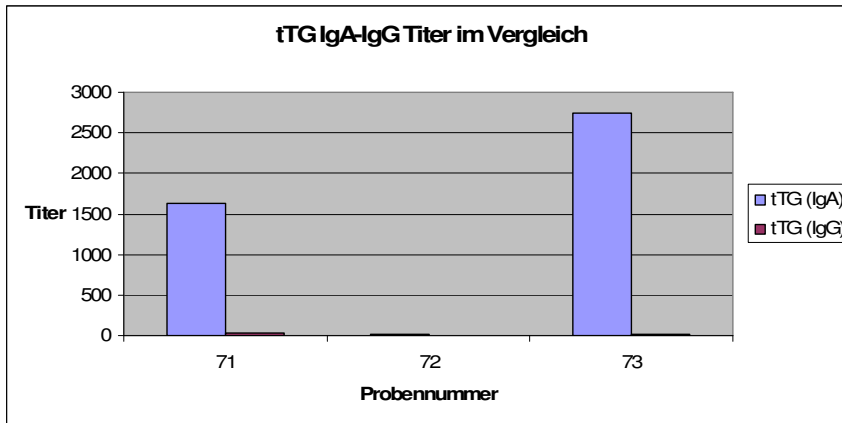


Abbildung 24: tTG IgA-IgG Titer im Vergleich, Probennummer 71-73, tTG (IgA)= Antikörper vom Typ A gegen Gewebetransglutaminase, tTG (IgG)= Antikörper vom Typ G gegen Gewebetransglutaminase

3.4 Rechnerischer Vergleich der Titer / Statistische Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden mittels Statistikprogrammen auf Korrelation, Verteilung, Häufigkeiten und Mittelwerte hin untersucht und die Ergebnisse grafisch dargestellt.

Die deskriptive Statistik ergab folgende Werte:

Tabelle 4: deskriptive Statistik, IgA= Antikörper vom Typ A, IgG= Antikörper vom Typ G

	IgA	IgG
gültige Fälle	73,00	73,00
Mittelwert	202,24	35,95
Std.Abweichung	419,84	78,66
Minimum	8,20	0,86
Maximum	2744,00	459,20
Spannweite	2735,80	458,34
25. Perzentil	14,10	2,82
Median	45,60	5,29
75. Perzentil	214,30	27,45

Die Tabelle zeigt ein sehr unterschiedliches Bild. So liegen die Mittelwerte beispielsweise sehr weit auseinander, das Maximum und Minimum der unterschiedlichen Titer ebenfalls. Die Spannweite der Werte ist bei IgA deutlich größer als bei IgG. Sowohl bei IgA als auch bei IgG liegt der Mittelwert eher im unteren Wertedrittel, bezogen auf die Gesamtwerte Verteilung (siehe auch Abb. 25).

Die Verteilungsuntersuchung ergab Folgendes:

Verteilung der IgG-Titer:

Tabelle 5: Werteverteilung der IgG-Titer, IgG= Antikörper vom Typ G

	Häufigkeit	Prozent	Prozent kumuliert
IgG			
0 bis 50	63	86,30	86,30
50 bis 100	1	1,37	87,67
100 bis 150	4	5,48	93,15
150 bis 200	2	2,74	95,89
200 bis 250	1	1,37	97,26
250 bis 300	0	0,00	97,26
300 bis 350	0	0,00	97,26
350 bis 400	1	1,37	98,63
400 bis 450	0	0,00	98,63
450 bis 500	1	1,37	100,00

Verteilung der IgA-Titer:

Tabelle 6: Werteverteilung der IgA-Titer, IgA= Antikörper vom Typ A

	Häufigkeit	Prozent	Prozent kumuliert
IgA			
0 bis 500	66	90,41	90,41
500 bis 1000	4	5,48	95,89
1000 bis 1500	1	1,37	97,26
1500 bis 2000	1	1,37	98,63
2000 bis 2500	0	0,00	98,63
2500 bis 3000	1	1,37	100,00

Bei einem Vergleich der Häufigkeiten ergibt sich Abbildung 21.

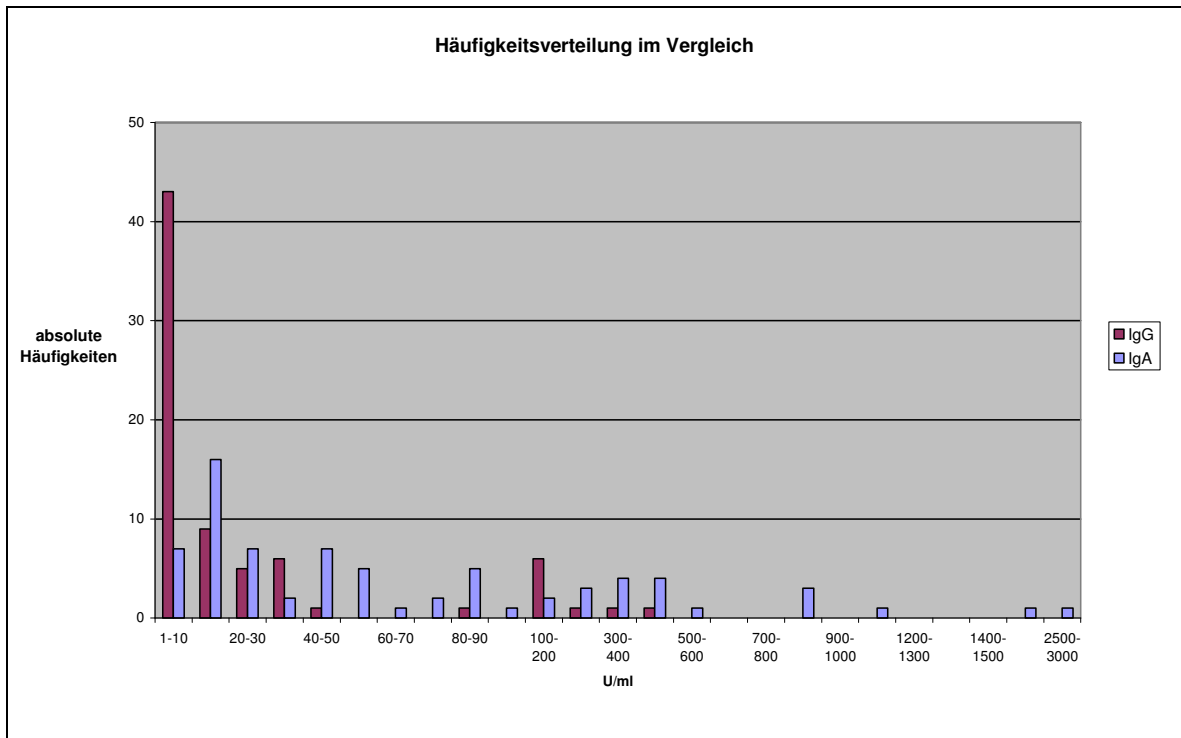


Abbildung 25: Intervallvergleich der absoluten Häufigkeiten der Titer von IgA und IgG aus 73 Patientenseren, IgA= Antikörper vom Typ A, IgG= Antikörper vom Typ G, U/ml=Units (arbiträre Einheit) pro ml

Die Spearman Rangkorrelation gilt als parameterfreies Maß für die Stärke des monotonen Zusammenhangs zwischen zwei Variablen. Dabei werden keine Annahmen über die Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Variablen gemacht. Der Vorteil dieses Koeffizienten nach Spearman im Vergleich z. B. zum Pearsons Korrelationskoeffizienten ist, dass er keine Annahme einer linearen Beziehung beider Variablen benötigt und dass er nicht in Intervallen gemessen werden muss. Er ist also auch für nichtlineare Zusammenhänge verwendbar. Spearmans Rangkorrelationskoeffizient ergab folgenden Wert:

Tabelle 7: Spearman Rangkorrelation, IgA= Antikörper vom Typ A, IgG= Antikörper vom Typ G

	IgA : IgG
Korrelationskoeffizient	0,59
gültige Fälle	73

Bei einem Wert des Rangkorrelationskoeffizienten $r_s=+1$ besteht ein vollständiger positiver Zusammenhang bzw. ein perfekter gleichgerichteter Zusammenhang und im Streudiagramm würde ein linearer Zusammenhang in Form einer Gerade sichtbar.

Die Werte wurden in 4 Gruppen unterteilt: Gruppe 0 erfasst die Werte $IgG > IgA + IgG < 130$ U/ml, Gruppe 1 erfasst die Werte $IgG > IgA + IgG > 130$ U/ml, Gruppe 10 erfasst die Werte $IgG < IgA + IgG < 130$ U/ml und Gruppe 11 die Werte $IgG < IgA + IgG > 130$ U/ml. Der Wert 130 U/ml wurde als Grenze zu hohen IgG Titerwerten im Vergleich zu den restlichen Werten gewählt, um den direkten Vergleich der 4 Gruppen darstellen zu können. Das Streudiagramm dieser Verteilung zeigt eine heterogene Verteilung der Reaktionsmuster. Jedoch konzentriert sich die Mehrzahl der Werte in einem Bereich bis 500 U/ml für IgA bzw. bis 250 U/ml für IgG.

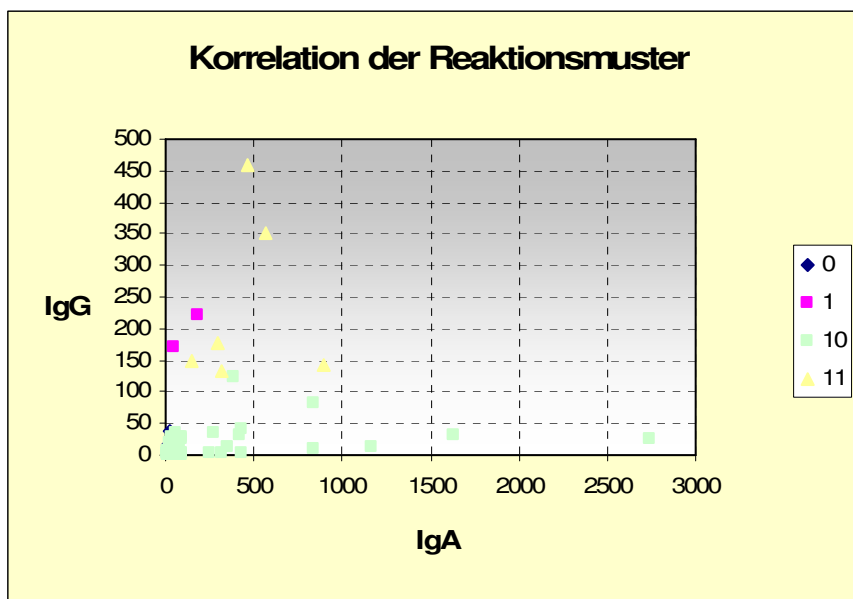


Abbildung 26: Korrelation der Reaktionsmuster, IgA= Antikörper vom Typ A, IgG= Antikörper vom Typ G, 0= $IgG > IgA + IgG < 130$ U/ml, 1= $IgG > IgA + IgG > 130$ U/ml, 10= $IgG < IgA + IgG < 130$ U/ml, 11= $IgG < IgA + IgG > 130$ U/ml

Die Kreuztabelle zeigt die absoluten und prozentualen Anteile der Aufteilung in 4 Gruppen:

Tabelle 8: absolute und prozentuale Anteile der Aufteilung in 4 Gruppen, 0= IgG>IgA + IgG<130 U/ml, 1= IgG>IgA + IgG>130 U/ml, 10= IgG<IgA + IgG<130 U/ml, 11= IgG<IgA + IgG>130 U/ml

	0	1	10	11	Summen
Häufigkeit	2	2	63	6	73
Total-Prozent	2,7	2,7	86,3	8,2	100

4. Diskussion

Bei der vorliegenden Arbeit wurden 73 Patientenseren von Typ 1 Diabetikern mit der Diagnose Zöliakie ausgewählt: 26 männliche, 44 weibliche und 3 mit unbekanntem Geschlecht. Das Alter der Patienten reicht von 4 bis 84 Jahren. Nach genauer Bestimmung der Anti-tTG-AK Titer IgA und IgG, dem direkten Vergleich, dem grafischen Vergleich und nach statistischer Auswertung konnten folgende Ergebnisse beobachtet werden:

Die Titer von IgA und IgG korrelieren nicht miteinander. Ein hoher tTG-IgA Titer bedeutet nicht zwangsweise ein hoher tTG-IgG Titer. Außerdem wird beobachtet, dass auch niedrige tTG-IgA Titer nicht mit einem niedrigen tTG-IgG Titer einhergehen. Dasselbe gilt für niedrige tTG-IgG Titer, die nicht mit niedrigen tTG-IgA zu beobachten sind.

Allerdings konnte festgestellt werden, dass im Falle eines hohen tTG-IgG Titers ebenfalls ein hoher tTG-IgA Titer vorliegt.

Es wurde aufgezeigt, dass bei den Probanden ein sehr heterogenes Muster der humoralen Immunantwort auftreten kann (vgl. Abb. 26). Der größte Musteranteil umfasst diejenigen, bei denen der IgA Titer über dem des IgG liegt (Gruppe 10), gefolgt von den sich gleichenden, eher niedrigen Werten (Gruppe 11). Dann folgen die sich gleichenden Werte mit eher hohen Titern (Gruppe 1) und diejenigen, bei denen die IgG Titer über denen des IgA liegen (Gruppe 0), wobei die beiden letzten Gruppen gleichhäufig auftreten.

Eine Korrelation bezüglich des Alters und dem Titer konnte nicht festgestellt werden, sowohl für IgA als auch für IgG. Auch ein Zusammenhang des Geschlechts und dem Titer wurde nicht beobachtet.

Im Falle der Zöliakie bei Typ 1 Diabetespatienten konnte gezeigt werden, dass sowohl IgA als auch IgG Subtypen von Plasmazellen gebildet werden. Dabei führen unterschiedliche Zytokinmuster zu einer bestimmten qualitativen und quantitativen Ausprägung. Dies bestätigen die Studien von Kontakou und Mitarbeitern, Przemioslo und Mitarbeitern, Farrell und Kelly. Dabei wird bei der Zöliakiepathogenese von einer „unangemessenen“ T-Zell-vermittelten Immunantwort ausgegangen. Über 95% der Zöliakiepatienten bilden das HLA-DQ2 Heterodimer aus. Durch diese werden an den APC, die vom Gluten stammenden Gliadinpeptide, in deren antigenpräsentierenden Stellen präsentiert.

Folglich werden intestinale, in der Lamina propria liegende, T-Helfer-Zellen stimuliert, welche dann weitere Lymphozyten, T-Zellen, natürliche Killerzellen und B-Zellen aktivieren. Neben den gebildeten Immunglobulinen der Plasmazellen werden Zytokine wie Interferon- γ , Interleukin-4, TNF- α freigesetzt, die erstens zu einem vermehrten Einbau von HLA-DQ2 Heterodimeren in der Schleimhautmembran und zweitens zur Schädigung der Enterozyten führt (Kontakou, Przemioslo et al. 1995; Przemioslo, Lundin et al. 1995; Farell und Kelly 2002). Es kommt demnach zu einem sich selbst verstärkenden Effekt und erklärt die Tatsache, dass nach Glutenzufuhr nach GFD die Krankheit neu aufflammt und schnell Symptome zeigen kann. Der Ausbruch und die Ausprägung dieser Krankheit hängen von vielerlei Faktoren ab. Ebenso wird durch mehrere Faktoren bestimmt, ob, welche Art und wie viel Antikörper gegen das Enzym tTG, gegen Gliadin und Endomysium gebildet werden.

So stellen auch B-Lymphozyten APC's dar, da sie mit ihren membrangebundenen Antikörpern Antigene erkennen können. Nach Kontakt mit dem Antigen werden diese aufgenommen, anschließend prozessiert und auf HLA Klasse II präsentiert. Die darauf folgende Aktivierung der B-Zelle durch nur geringe Mengen an Antigenen führt zur zusätzlichen Exprimierung von CD80 und CD40 Oberflächenmolekülen. Dadurch werden spezifische T-Zellen aktiviert, die einerseits für die B-Zell-Reifung Zytokine sezernieren, andererseits kommt es zu einem T-B-Zell-Kontakt über CD40-CD40-Liganden-Interaktion und damit zur Immunglobulinproduktion in der B-Zelle. Die durch die CD40-CD40 Interaktion aktivierten T-Lymphozyten sind nun also in der Lage, mehrere verschiedene Zytokine (s.o.) zu sezernieren. Diese beeinflussen und regulieren die Immunantwort. So steuern die Zytokine die Reifung der B-Zelle zu einer IgG, IgA oder IgE produzierenden Plasmazelle. Das dabei verwendete Zytokinmuster erbringt daher eine qualitativ und quantitativ unterschiedliche Immunantwort, was bei dieser Arbeit ebenfalls beobachtet wurde. Es kommt durch die unterschiedlichen Zytokinmuster zu einem heterogenen Ausprägungsbild der Immunglobuline (Pichler, Peter et al. 1996; Carol, Lambrechts et al. 1998; Sollid 2000).

Von den T-Zellen gibt es drei Subtypen: Die TH0-Zellen, die eher geringere Mengen an Zytokinen ausschütten, stehen vor allem zu Beginn einer Immunantwort und sezernieren maßgeblich IL2, IL4, IL5, IFN- γ , TNF- α und IL 10.

Wie oben bereits erwähnt, stehen diese vor allem im Zusammenhang mit dem vermehrten Einbau von HLA-DQ2 Molekülen in der Schleimhautmembran und der Zerstörung der Enterozyten. Es lässt sich nach den vorliegenden Untersuchungen vermuten, dass vor allem Zytokinmuster mit hohem Anteil an diesen Zytokinen bei den schweren Krankheitsverläufen der Zöliakie vorhanden sind. Im Falle einer chronischen Stimulation und unter dem Einfluss von IL12, IFN- γ und der CD80/CD28-Interaktion kommt es zur Ausreifung der TH0-Zellen zu TH1 Zellen. Diese weisen ein eher eingeschränktes Zytokinmuster auf, sezernieren hingegen aber in hohen Dosen IL2, IFN- γ , IL-12 und TNF- α/β . TNF- α triggert die Sezernierung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) der intestinalen Fibroblasten, was zu einer Mukosadestruktion aufgrund einer Bindegewebsauflösung führt (Collin, Kaukinen et al. 2002).

Ähnlich wie TH1 reift TH2 auch aus der Vorläuferzelle TH0 unter dem Einfluss von IL-4 und IL-13 heran. TH2-Zellen produzieren vor allem IL-4 und IL-5 und wenig bis kein IL-2. Dabei muss beachtet werden, dass die Grenze zwischen TH1 und TH2 nur schwammig ist, da kein absoluter Unterschied der Zytokinproduktion messbar ist. Dass teilweise dieselben Zytokine in den unterschiedlichen Zytokinmustern auftreten, erklärt die Untersuchungsergebnisse, warum sowohl IgA als auch IgG gebildet wird. Anscheinend kommt es beim Zytokinmuster für die ausgeprägte IgG-Produktion zu einer Überschneidung mit dem Zytokinmuster für eine ausgeprägte IgA-Produktion. Dies könnte erklären, warum stets ein sehr hoher IgG-Titer von einem sehr hohen IgA-Titer begleitet wird. Außerdem liegt die Vermutung nahe, dass bei dem Zytokinmuster für lediglich einen hohen IgA-Titer bestimmte Zytokine für eine ausgeprägte IgG-Produktion fehlen, da mit einem hohen IgA-Titer nicht ein hoher IgG-Titer korreliert. Vor allem aber TH2, weniger TH1 können durch B-Lymphozyten als APC, siehe oben, stimuliert werden. Für die Aktivierung von enormer Wichtigkeit ist die Bindung von CD4 der T-Zelle an die MHC-II bzw. CD8 an die α_3 -Region des MHC-I der B-Zelle. Essenziell für die Ig-Produktion, besonders dem „switch“ zu IgA, IgG1-4 und IgE ist die CD40/CD40 Interaktion. Die dann freigesetzten Zytokine bewirken nicht nur den Isotypenswitch der Immunglobuline, sondern auch die Sezernierung wird angetrieben. Einige B-Zellen differenzieren sich zu Plasmazellen, andere wandeln sich in langlebige Memoryzellen um (Pichler, Peter et al. 1996; Tangye, Ferguson et al. 2002).

Es gibt enorm viele unterschiedliche Zytokine, die die Immunantwort des Menschen regulieren und es gibt bestimmte Zytokine, die den „switch“ zur IgA und IgG Produktion bewerkstelligen. TGF- β wird als Polypeptidfamilie (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) von T-Zellen und aktivierten Monozyten (TGF- β 1) freigesetzt. Es hat pleiotrope Wirkung und wirkt auf ruhende Zellen stimulierend, auf aktive Zellen eher hemmend. Zusammen mit IL-5 und IL-2 kommt es zu einem „switch“ von IgM zu IgA und damit zu einer Steigerung der IgA-Produktion. Die Vermutung liegt nahe, dass vor allem TGF- β für einen hohen IgA-Titer bei der Zöliakiepathogenese verantwortlich ist. IFN- γ fördert die Differenzierung von TH1-Zellen, während die Differenzierung von TH2-Zellen gehemmt wird. IFN- γ ist wie IL2 ein „Switch-Faktor“ von IgM zu IgG1 und IgG3. Untersuchungen zeigten zudem, dass IL-18 die IFN- γ Synthese antreiben kann und somit zu einer Verschiebung in Richtung Gluten-spezifische TH1 Antwort führen kann (Salvati, MacDonald et al. 2002). Ebenso konnte gezeigt werden, dass IFN- α die Fähigkeit besitzt, eine TH1 vermittelte Immunantwort aufflammen zu lassen (Monteleone, Pender et al. 2001). Dies könnte die Erklärung dafür sein, dass einem hohen IgG-Titer ein hoher IgA-Titer folgt. Es könnte durch das „Aufflammen“ der TH1 Antwort zu einem erhöhten TGF- β Wert führen, der wiederum die IgA Produktion ankurbelt.

1998 beobachteten Nilsen und Mitarbeiter in der Dünndarmmukosa einen extrem erhöhten (bis zu 1000-fach) mRNA-Spiegel für IFN- γ , nachdem sie unbehandelten Zöliakiepatienten Gluten verabreichten. (Nilsen, Lundin et al. 1995; Pichler, Peter et al. 1996; Nilsen, Jahnsen et al. 1998). Diese hohen Spiegel können den Switch zur IgG3 Produktion auslösen und vor allem bei unbehandelten, nicht unter Diät stehenden Patienten zu extremen Titerwerten nach Glutenaussetzung führen. Da IgG3 vor allem bei Autoimmunerkrankungen erhöht ist (Hagemann 2008), ist dies wahrscheinlich. Wie schon erwähnt, wird auch bei chronischen Prozessen IFN- γ ausgeschüttet (Pichler, Peter et al. 1996) und unbehandelte Zöliakiepatienten führen unkontrolliert Gluten zu, was dann zu einer chronischen Stimulation in der Dünndarmmukosa führen könnte. Dass IFN- γ eine große Rolle bei der Pathogenese der Zöliakie spielt, belegen ebenfalls Untersuchungen von Kontakou und Mitarbeitern (s.o.) (Kontakou, Sturgess et al. 1994).

Zum serologischen Nachweis werden aktuell Antikörper der Klassen IgA und IgG gegen tTG bzw. Endomysium herangezogen. Es handelt sich hierbei um die

gleichen Antikörper, jedoch um unterschiedliche Nachweisverfahren. Die unterschiedlichen Namen sind histologisch bedingt (DZG 2008).

Immunglobuline sind Glycoproteine, und einzeln betrachtet bestehen sie aus 2 identischen schweren und leichten Ketten. Es gibt 2 Arten leichter Ketten, κ und λ und 9 Arten schwerer Ketten, namengebend für das Immunglobulin: μ /IgM, δ /IgD, γ 1-4/IgG1-4, α /IgA und ϵ /IgE. Das Immunglobulin besitzt einen konstanten Teil Fc und 2 variable Regionen F(ab). Der „untere“ Fc-Teil dient unter anderem der Komplementbindungsfähigkeit, Bindung an spezifische Fc-Rezeptoren und der Fähigkeit, transplazentar geschleust zu werden. Die Fab-Teile dienen der Antigenbindung. Diese ist spezifisch und wird Idiotyp bezeichnet. Durch das Immunglobulin-Rearrangement kommt es zu einer hohen Vielfalt der Immunglobuline. Mehrere Gene codieren für ein Immunglobulin und werden miteinander kombiniert.

IgA wird in gesamt- und sekretorisches IgA eingeteilt. Sekretorisches IgA dient der immunologischen Schleimhautbarriere und ist im Serum nicht oder nur in geringen Konzentrationen nachweisbar.

IgA liegt zu 90% in monomerer Form und zu 10% in polymerer Form in Serum, Speichel, Tränenflüssigkeit, Muttermilch und Nasen-, Tracheobronchial-, Intestinal- und Urogenitalsekreten vor. Es dient der Bindung von Mikroorganismen auf der Schleimhautoberfläche, der Aktivierung des alternativen Komplementsystems und der Aktivierung von Entzündungsreaktionen.

Das Gesamt-IgA besitzt 2 Isoenzyme, IgA1 zu ca. 90% und IgA2 zu ca. 10%. Es weist bei der Zöliakie einen erhöhten Wert auf (Hagemann 2008).

Mit einem relativen Molekulargewicht von 160 000 macht es 5-10% der Serum-Ig aus. Das selektive IgA-Mangel-Syndrom tritt bei Zöliakiepatienten im Vergleich zur Normalbevölkerung etwa 10-fach erhöht auf (Hansson 1999). Diese Tatsache macht die Zöliakiediagnostik mit IgG besonders interessant, da sie bei Patienten mit IgA-Defizit geeignet ist, um Zöliakie eindeutig zu bestimmen (Cataldo, Lio et al. 2000). IgG dient neben IgA ebenfalls dem Schleimhautschutz. Es ist ein Immunglobulin der sekundären Immunreaktion und spielt besonders bei Prozessen mit einem dem Immunsystem bekannten Erreger eine Rolle. Es ist das einzige plazentagängige Immunglobulin im menschlichen Körper und ist bei chronischen Autoimmunerkrankungen erhöht. Es spielt bei der Phagozytose eine erhebliche Rolle, da Makrophagen und Killerzellen mit der Fc-Region des IgG eine

Bindung eingehen können. Als Subklassen des IgG sind IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 bekannt, wobei IgG3 vor allem bei Autoimmunerkrankungen erhöht ist (Hagemann 2008). Mit einem relativen Molekulargewicht von 150 000 macht es 75-85% des Serum-Ig aus, und ist damit quantitativ am Größten vertreten. Untersuchungen bei Typ1-Diabetikern lassen vermuten, dass IgG Antikörper gegen Zöliakie-Antigene für die Krankheit weniger spezifisch sind, als IgA Antikörper (Lampasona, Bonfanti et al. 1999). Das Ergebnis dieser Arbeit, dass einem hohen IgA Titer nicht gleichzeitig ein hoher IgG Titer zugeordnet werden kann, könnte dies untermauern.

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Enzyms tTG, welches die Glutaminreste verändert, eine überragende Rolle in der spezifischen T-Zell-Erkennung spielt. Auch konnte gezeigt werden, dass die, durch tTG desaminierten Glutamine mit ihren Epitopen eine besonders hohe Affinität zu den DQ2 Molekülen haben und daher wesentlich zum Krankheitsgeschehen der Zöliakie beitragen (Arentz-Hansen, Korner et al. 2000). Untersuchungen von Seissler et al. bestätigen ebenfalls die Ergebnisse des heterogenen Reaktionsmusters bei der Zöliakie. In Laborversuchen wurden die Antikörperbindungsstellen mithilfe einer Reihe von tTG-Fragmenten näher untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die heterogene Antikörperreaktion stark epitopenformabhängig ist. Die Autoimmunantwort zielt mehrere funktionelle Epitope an, die an verschiedenen funktionellen Bereichen der tTG vorkommen. Die Antikörper sind also in der Lage verschiedene funktionelle Bereiche auf dem Zielantigen tTG zu erkennen (Seissler, Wohlrab et al. 2001).

Besonders Endokrinologen, nicht nur Gastroenterologen sollten ein besonderes Augenmerk für Zöliakie entwickeln, da sie immerhin bei 2-5% der insulinabhängigen Diabetikern oder der autoimmunen Schilddrüsenerkrankung diagnostiziert werden konnte. Insbesondere bei Fällen, bei denen intestinale Symptome fehlen oder unklar sind, sollte gezielt nach Zöliakie gefahndet werden. Studien von Bottaro und de Freitas kommen sogar auf eine Prävalenz von 5,4 - 7,4%. Nach einem Vergleich von 40 Studien mit unterschiedlichen Screeningmethoden kommen Collin, Kaukinen und Mitarbeiter auf eine Prävalenz von 4,1%. Vor 30 Jahren wusste man zwar von einem Zöliakieaufkommen von 1-1,5% bei insulinabhängigen Kindern, allerdings ging die Diagnose Zöliakie allzu häufig unter, da man die Diarrhö oft als autonome diabetische Neuropathie oder

exokrine Pankreasinsuffizienz fehl interpretierte. Die behandelte Zöliakie zeigt bei mehreren Typ 1 Diabetikern positive Effekte. Einerseits legten sich die intestinalen Symptome sehr rapide, andererseits wurde festgestellt, dass die Anzahl schwerer Unterzuckerepisoden weniger wurde (Collin, Kaukinen et al. 2002). Inwiefern Autoimmunerkrankungen wie Diabetes Typ 1 oder die autoimmune Schilddrüsenerkrankung mit der Zöliakie zusammenhängen, lässt sich momentan nur vermuten. Collin und Mitarbeiter versuchen, diese Koexistenz beider Krankheiten mit einer molekularen Nachahmung, zu erklären. Dabei aktiviert Gliadin oder die Gewebetransglutaminase tTG T-Zellen, die kreuzreaktiv mit diversen Autoantigenen sind. Sie sehen ebenfalls die Möglichkeit, dass tTG unabhängig vom Gliadin, mittels Desaminierung oder Kreuzverbindungen andere externe oder Autoantigene modifizieren kann und somit Neoantigene generiert. Diese Antigene und deren Antikörperproduktion könnten des Weiteren diverse Autoimmunphänomene außerhalb des Gastrointestinaltraktes induzieren.

Neuste Untersuchungen von 2007 zeigen allerdings eine Verbindung zwischen Zöliakie und mehreren immunvermittelten Krankheiten, wie der oben erwähnten oder der primären Leberzirrhose. Einige dieser Krankheiten teilen sich HLA Haplotypen und Non-HLA Allele. Die Empfehlung der Autoren dieser Untersuchung lautet daher, bei allen Zöliakiepatienten im Rahmen der Diagnose die Schilddrüsenfunktion zu überwachen und bei Nachuntersuchungen zu kontrollieren (Ch'ng, Jones et al. 2007). Dass Diabetespatienten vom Typ 1 auf Zöliakie gescreent werden, sollte eigentlich zum Standard gehören. Auf Nachfragen bei mehreren Hausärzten und Klinikärzten sei dies allerdings nicht der Fall. Lediglich wenn sich der Patient symptomatisch vorstellt, sei eine serologische Untersuchung indiziert. Die Beobachtung, dass Diabetes Typ 1 eher vor der Zöliakie, weniger danach diagnostiziert wird, könnte als indirektes Anzeichen genommen werden, dass die diagnostizierte und mit einer GFD behandelte Zöliakie die Patienten vor Autoimmunerkrankungen schütze. Ventura et al stellten den Zusammenhang zwischen dem Alter der Zöliakiediagnose und der Häufigkeit des Auftretens von Autoimmunerkrankungen fest. So traten Autoimmunerkrankungen bei später diagnostizierten Zöliakiepatienten häufiger auf (23,6%), als bei Zöliakiepatienten, die schon im frühen Kindesalter mit einer GFD behandelt wurden (5,1%). Dies zeigt die Wichtigkeit der Früherkennung durch Screeningtests und der Behandlung der Zöliakie, um die Patienten eventuell vor

der Entwicklung einer Autoimmunkrankheit zu schützen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auch darauf hin, dass auch IgA negativ-getestete Patienten an Zöliakie erkranken können, da durchaus ein erhöhter Titer für IgG vorliegen kann. Dass nicht nur der Zeitpunkt der Diagnose, sondern auch die Erstgabe von Gluten eine immense Rolle im Verlauf der Erkrankung spielt, zeigten Untersuchungen von Norris et al. Sie erkannten einen Zusammenhang zwischen der Erstgabe von Weizen, Gerste und Roggen und der Zöliakieentwicklung. Außerdem stellten sie keine Verbindung bezüglich der Zöliakieentwicklung und der Erstgabe von Hafer und Reis fest. Die Daten ließen vermuten, dass die Gabe von glutenhaltigen Lebensmitteln innerhalb der ersten 3 Lebensmonate das Risiko der Zöliakieerkrankung erhöht. Dabei können bereits geringe Mengen ausschlaggebend sein. Die intestinale Barriere der Säuglinge, als Hauptabwehrorgan gegen Fremdartige, Toxine und Makromoleküle ist in sehr jungen Jahren nicht so vollständig ausgebildet, wie die älterer Kinder. Dies ermöglicht nicht nur dem Gliadin, auch in geringsten Mengen, einen erleichterten Zugang zum Organismus. (Norris, Barriga et al. 2005). Da vor allem IgA in der Schleimhaut die Reaktion auslösen kann, könnte die geminderte Barriere bei Kleinkindern und Säuglingen die Krankheit negativ beeinflussen.

Sowohl IgA als auch IgG spielen bei der Zöliakiediagnostik eine wichtige Rolle. Um die Bindung der Antikörper an das Zielantigen tTG zu demonstrieren, wurde humane tTG geklont und zur Entwicklung einer neuen, radioliganden Bestimmungsmethode von Kombiniert- und Einzelerfassung der Immunglobulin A und G-spezifischen Antikörpern verwendet. Die Autoren sind der Auffassung, dieser Test überwindet die begrenzten Möglichkeiten des herkömmlichen EmA-Tests (Seissler, Boms et al. 1999). Die Diagnostik reicht mittlerweile über die Bestimmung des IgA-Titers hinaus. Die Ergebnisse dieser Arbeit vermitteln die Wichtigkeit einer breiten Zöliakiediagnostik. Früherkennung und Differenzialdiagnostik sind mittlerweile zu einer wichtigen aber schwierigen Aufgabe geworden. Das heterogene Bild der Immunreaktion bei Zöliakiepatienten unter Typ 1 Diabetes soll bei der Fokussuche beachtet werden. Eine Empfehlung zur serologischen Untersuchung wurde schon 2002 für symptomatische Patienten und Patienten mit folgenden Risikokrankheiten ausgesprochen: Verwandte ersten und zweiten Grades von Patienten mit Zöliakie, Patienten und deren Verwandte mit Typ 1 Diabetes mellitus, Patienten mit Sjögrensyndrom oder anderen

Bindegeweberkrankungen, Patienten mit Down- oder Turner-Syndrom und Patienten mit selektivem IgA-Mangel oder einer unerklärten Anämie (Schultz, Hellerbrand 2002). 2009 stellten Smyth et al. genetische Zusammenhänge beider Krankheiten Zöliakie und Typ1 Diabetes fest. Sie stellten sich erstens die Frage ob Allele, die in Zusammenhang mit der Erkrankung Diabetes Typ 1 stehen, ebenfalls ein Risiko an Zöliakie zu erkranken darstellen und zweitens, ob Risikoallele der Erkrankung Zöliakie auch ein Risiko an Diabetes Typ 1 zu erkranken darstellen. Ihre Untersuchungen gaben deutlich Aufschluss darüber, dass es alle Kombinationen gibt, die entweder vor der einen oder der anderen oder beiden Erkrankungen schütze, ebenso gibt es alle Kombinationen, die den Patienten an einer der beiden oder an beiden Krankheiten erkranken lässt. Sie fanden ebenfalls eine 32 Basenpaare umfassende Genregion, die ein neues Risikokogen für beide Krankheiten darstellt. Dieses Allel verhindert die Rezeptorausbildung auf der Oberfläche von Lymphozyten und anderen Zellen. Des Weiteren stellten Smyth et al. fest, dass homozygote Träger dieses Allels eine hohe Resistenz gegenüber einer Infektion mit dem HI-Virus innehaben. Die Erkenntnisse dieser Studie werden mit Sicherheit zu neuen Therapiemethoden, zu neuen Vorbeugemaßnahmen und vielleicht zur Heilung von Krankheiten führen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, das heterogene Bild der Immunreaktion bei der Zöliakie in Verbindung mit Typ 1 Diabetes und die Erkenntnis, gegebenenfalls Krankheiten durch hinreichendes breit gefächertes Screening vermeiden zu können, gibt Antrieb zur Erweiterung der Diagnostik mittels gezieltem Screening nach Risikogenen. Der Nutzen im Gegensatz zu Kosten und Ethik steht hierbei nach Auffassung des Autors klar im Vordergrund und muss in Zukunft näher untersucht und bestätigt werden.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Ausprägung der humoralen Immunreaktion bei Typ 1 Diabetespatienten mit Zöliakie. Aus einer Serumbank von 803 Typ 1 Diabetespatienten wurden 73 IgA (Immunglobulin vom Typ A) positive Proben ausgewählt, die IgG (Immunglobulin vom Typ G) Titer und teilweise fehlenden IgA Titer anhand eines kompetitiven Enzym-Immunoessays bestimmt.

Bei dem direkten Vergleich der Ergebnisse gab es keine Korrelation bezogen auf hohe oder niedrige Werte und dem Geschlecht oder Alter der Patienten. Dies gilt sowohl für die Bestimmung der IgA- als auch für die IgG-Titer. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass einem hohen IgA-Titer nicht zwangsläufig ein hoher IgG-Titer zugewiesen werden kann. Ebenso gilt dies für niedrige IgA Werte, denen ebenfalls nicht ein niedriger IgG-Titer folgt. Indes konnte bei mehreren Patienten mit einem hohen IgG-Titer auch ein hoher IgA-Titer nachgewiesen werden.

Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass es einem bestimmten Zytokinmuster bedarf, um Qualität und Quantität bei Aufbau und Ablauf einer Immunreaktion zu regulieren. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sowohl IgA als auch IgG zur Serum-Diagnostik der Zöliakie herangezogen werden können. Außerdem kann die IgG-Diagnostik bei bestehendem Verdacht der Zöliakie und gleichzeitigem Bestehen eines bekannten oder unbekanntes IgA-Defizits ergänzend hinzugezogen werden. Man kann sagen, die Zöliakiediagnostik sollte in Kliniken nicht nur bei frisch manifestierten Diabetikern zum Standard gehören, sondern auch bei Patienten mit selektivem IgA-Defizit, da bei Zöliakiepatienten dieses Risiko 10-fach erhöht ist.

In Zukunft wird die Suche nach allen Formen der Zöliakie ausgedehnt werden, um eventuelle Grenzfälle, Erkrankungskombinationen und Erkrankungsphasen besser beschreiben und therapieren zu können. Dabei sollte das Ergebnis dieser Arbeit, das heterogene Erscheinungsbild der humoralen (IgA-/IgG-) Immunantwort, Beachtung finden.

6. Literaturverzeichnis

1. **Arentz-Hansen H., Körner R., Molber O., Quarsten H., Vader W. Kooy M. C., Lundin K. E. A., Koning F., Roepstorff P., Sollid L. M., McAdam S. N. (2000).** "The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase." The Journal of Experimental Medicine **191**: 603-612.
2. **Bertrams J. (1993).** "Immungenetik des Typ-I-Diabetes." Aktuelles Wissen Hoechst (Diabetes und Immunologie - eine wechselseitige Beziehung): 16-31.
3. **Bianchi M.L., Bardella M.T. (2008).** "Bone in celiac disease" Osteoporosis International **19**: 1705-1716
4. **Carol M., Lambrechts A., van Gossum A., Libin M., Goldamn M., Mascart-Lemone F. (1998).** "Spontaneous secretion of interferon gamma and interleukin 4 by human intraepithelial and lamina propria gut lymphocytes." Gut **42**: 643-649.
5. **Cataldo F., Lio D., Marino V., Picarelli A., Ventura A., Corazza G. R., the Working Groups on Celiac Disease of SIGEP and Club del Tenue (2000).** "IgG(1) antiendomysium and IgG antitissue transglutaminase (anti-tTG) antibodies in coeliac patients with selective IgA deficiency. Working Groups on Celiac Disease of SIGEP and Club del Tenue." Gut **47**: 366-669.
6. **Catassi C., Fabiani E., Räscht I. M., Coppa G. V., Giorgi P. L., Pierdomenico R., Alessandrini S., Iwanejko G., Domenici R., Mei E., Miano A., Marani M., Bottaro G., Spina M., Dotti M., Montanelli A., Barbato M., Viola F., Lazzari R., Vallini M., Guariso G., Plebani M., Cataldo F., Traverso G., Ughi C., Chiaravalloti G., Baldessarre M., Scarcella P., Bascietto F., Ceglie L., Valenti A., Paolucci P., Caradonna M., Bravi E., Ventura A. (1996).** "The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects." Acta Paediatrica Supplement **412**: 29-35.
7. **Ch'ng C. L., Jones M. K., Kingham G. C. (2007).** "Celiac disease and autoimmune thyroid disease." Clinical Medicine & Research **5**: 184-192.
8. **Collin P., Kaukinen K., Välimäki M., Salmi J. (2002).** "Endocrinological disorders and celiac disease." Endocrine Reviews **23**: 464-483.
9. **Dayer E., Délèze G. (2002).** "Zöliakie und Antikörper anti-Transglutaminase." Cadaceus Express **Volume 1**

10. **DZG (2008).** "Genetische Veranlagung." from <http://dzg-online.de>.
Downloaddatum 18.03.2008
11. **DZG (2008).** "Typ 1 Diabetes und Zöliakie." from <http://dzg-online.de>.
Downloaddatum 18.03.2008
12. **Farell R. J., Kelly C. P. (2002).** "Celiac Sprue." The New England Journal of Medicine **346**: 180-188.
13. **Gillett P.M., Gillett H.R., Israel D.M., Metzger D.L., Stewart L., Chanoine J.P., Freeman H.J 2001.** "High prevalence of celiac disease in patients with type 1 diabetes detected by antibodies to endomysium and tissue transglutaminase." Canadian Journal of Gastroenterology **15**:297-301.
14. **Hadziselimovic F., Bürgin-Wolff F. (2001).** "Zöliakie." Elias Journal **1**: 3-6.
15. **Hagemann O. (2008).** "Gesamt-IgA." Laborlexikon, from <http://www.laborlexikon.de>. Downloaddatum: 12.03.2008.
16. **Hagemann O. (2008).** "HLA-Typisierung" Laborlexikon, from <http://www.laborlexikon.de>. Downloaddatum: 12.03.2008.
17. **Hagemann O. (2008).** "IgG." Laborlexikon, from <http://www.laborlexikon.de>.
Downloaddatum 12.03.2008.
18. **Hansson T. (1999).** "Coeliac Disease - Clinical and immunological Aspects". Acta Universitatis Upsaliensis. **839**: 1-52.
19. **Kagnoff M. F. (2004).** "Overview and Pathogenesis of Celiac Disease". NIH Consensus Development Conference on Celiac Disease: 20-21
20. **Keller K.-M. (2001).** "Glutensensitive Enteropathie (Zöliakie) - ein Krankheitsbild im Wandel." Medizin im Dialog **3**: 1-9.
21. **Keller K.-M. (2003).** "Klinische Symptomatik: "Zöliakie, ein Eisberg". "Monatsschrift Kinderheilkunde **7**: 706-714.
22. **Kontakou M., Przemioslo R. T., Sturgess R. P., Limb G. A., Ellis H. J., Day P., Ciclitira P. J. (1995).** "Cytokine mRNA expression in the mucosa of treated coeliac patients after wheat peptide challenge." Gut **37**: 52-57.
23. **Kontakou M., Sturgess R. P., Przemioslo R. T., Limb G. A., Nelufer J. M., Ciclitira P. J. (1994).** "Detection of interferon gamma mRNA in the mucosa of patients with coeliac disease by in situ hybridisation." Gut **35**: 1037-1041.

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

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

26. **Monteleone G., Pender S. L. F., Alstead E., Hauer A. C., Lionetti P., MacDonald T. T. (2001).** "Role of interferon alpha in promoting T helper cell type 1 responses in the small intestine in coeliac disease." Gut **48**: 425-429.

27. **Nilsen E. M., Jahnsen F. L., Lundin K. E., Johansen F. E., Fausa O., Sollid L. M., Jahnsen J., Scott H., Brandtzaeg P. (1998).** "Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease." Gastroenterology **115**: 551-563.

28. **Nilsen E. M., Lundin K. E. A., Krajci P., Sollid L. M., Brandtzaeg P. (1995).** "Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma." Gut **37**: 766-776.

29. **Norris J. M., Barriga K., Hoffenberg E. J., Taki I., Miao D., Haas J. E., Emery L. M., Sokol R. J., Erlich H. A., Eisenbarth G. S., Rewers M. (2005).** "Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease." The Journal of the American Medical Association **293**: 2343-2351.

30. **Pichler W. J., Peter H. H., Hänsch M. G. (1996).** Prinzipien des Immunsystems. Klinische Immunologie. **2**: 3-88.

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

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

33. **Schultz M., Hellerbrandt C. (2002).** "Sprue/Zöliakie: Viele Fälle bleiben unerkannt." Deutsches Ärzteblatt **99**: 28-29.

34. **Seissler J., Boms S., Wohlrab U., Morgenthaler N. G., Mothes T., Boehm B. O., Scherbaum W. A. (1999).** "Antibodies to human recombinant tissue transglutaminase measured by radioligand assay: evidence for high diagnostic sensitivity for celiac disease." Hormone & Metabolic Research **31**: 375-379.
35. **Seissler J., Wohlrab U., Wuensche C., Scherbaum A., Boehm B. O. (2001).** "Autoantibodies from patients with coeliac disease recognize distinct functional domains of the autoantigen tissue transglutaminase." Clinical & Experimental Immunology **125**: 216-221.
36. **Smyth D. J., Plagnol V., Walker N. M., Cooper J. D., Downes K., Yang J. H. M., Howsen J. M. M., Stevens H., McManus R., Wijmenga C., Heap G. A., Dubois P. C., Clayton D. G., Hunt K. A., van Heel D. A., Todd J. A. (2008)** "Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease." The New England Journal of Medicine **359**: 2767-2777.
37. **Sollid L. M. (2000).** "Molecular basis of celiac disease." Annual Reviews of Immunology **18**: 53-81.
38. **Sumnik Z., Cinek O., Bratanic N., Kordonouri O., Kulich M., Roszai B., Arato A., Lebl J., Soltesz G., Danne T., Battelino T., Schober E. (2006).** "Risk of celiac disease in children with type 1 diabetes is modified by positivity for HLA-DQB1*02-DQA1*05 and TNF -308A." Diabetes Care **29**: 858-863.
39. **Tangye S. G., Ferguson A., Avery D. T., Ma C. S., Hodgkin P. D. (2002).** "Isotype switching by human B cells is division-associated and regulated by cytokines." Journal of Immunology **169**: 4298-4306.
40. **Valerio G., Maiuri L., Troncone R., Buono P., Lombardi F., Palmieri R., Franzese A. (2002)** "Severe clinical onset of diabetes and increased prevalence of other autoimmune diseases in children with coeliac disease diagnosed before diabetes mellitus." Diabetologia **45**:1719-1722

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Zöliakie-Eisberg und das Spektrum der Glutensensibilität (nach Mäki und Collin 1997)	8
Abbildung 2: Pipettierschema	23
Abbildung 3: Versuchsaufbau schematisch 1 von 10	24
Abbildung 4: Versuchsaufbau schematisch 2 von 10	24
Abbildung 5: Versuchsaufbau schematisch 3 von 10	25
Abbildung 6: Versuchsaufbau schematisch 4 von 10	25
Abbildung 7: Versuchsaufbau schematisch 5 von 10	26
Abbildung 8: Versuchsaufbau schematisch 6 von 10	26
Abbildung 9: Versuchsaufbau schematisch 7 von 10	27
Abbildung 10: Versuchsaufbau schematisch 8 von 10	27
Abbildung 11: Versuchsaufbau schematisch 9 von 10	28
Abbildung 12: Versuchsaufbau schematisch 10 von 10	28
Abbildung 13: Histogramm der absoluten Titerwerte von tTG(IgA)	31
Abbildung 14: Histogramm der logarithmierten Titerwerte zur Basis e von tTG(IgA)	31
Abbildung 15: Histogramm der absoluten Titerwerte von tTG(IgG)	33
Abbildung 16: Histogramm der logarithmierten Titerwerte zur Basis e von tTG(IgG)	33
Abbildung 17: tTG IgA-IgG Titer im Vergleich, Probennummer 1-10	34
Abbildung 18: tTG IgA-IgG Titer im Vergleich, Probennummer 11-20	35
Abbildung 19: tTG IgA-IgG Titer im Vergleich, Probennummer 21-30	35
Abbildung 20: tTG IgA-IgG Titer im Vergleich, Probennummer 31-40	35
Abbildung 21: tTG IgA-IgG Titer im Vergleich, Probennummer 41-50	36
Abbildung 22: tTG IgA-IgG Titer im Vergleich, Probennummer 51-60	36
Abbildung 23: tTG IgA-IgG Titer im Vergleich, Probennummer 61-70	36
Abbildung 24: tTG IgA-IgG Titer im Vergleich, Probennummer 71-73	37
Abbildung 25: Vergleich der Häufigkeiten von IgA und IgG	40
Abbildung 26: Korrelation der Reaktionsmuster	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Populationsübersicht	20
Tabelle 2: Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors bei $tTG(IgA)$ und $\ln[tTG(IgA)]$	31
Tabelle 3: Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors bei $tTG(IgG)$ und $\ln[tTG(IgG)]$	32
Tabelle 4: deskriptive Statistik	38
Tabelle 5: Werteverteilung der IgG-Titer	39
Tabelle 6: Werteverteilung der IgA-Titer	39
Tabelle 7: Spearman Rangkorrelation	40
Tabelle 8: absolute und prozentuale Anteile der Aufteilung in 4 Gruppen	42

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Bernhard O. Böhm bedanken, dass er mir diese Arbeit ermöglicht hat und mich stets bis zur Vollendung unterstützt hat.

Besonderen Dank gebührt meinen Eltern Erika und Volker Knoche, die mir das Studium der Zahnmedizin und damit diese Arbeit ermöglicht haben. Ebenfalls danke ich meinem Bruder Kai Knoche und meiner Freundin Kerstin Hopp für Ihr fleißiges Korrekturlesen.