

**Institut für Ernährungswissenschaft der
Technischen Universität München**

***Früherkennung der Autoimmunerkrankungen Typ-1-Diabetes und
Zöliakie in Risikopopulationen***

Julia Pilgram geb. Dittler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

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

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Eberhard Graßmann
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. med. Günther Wolfram
2. apl. Prof. Dr. med., Dr. med. habil. Anette-G. Ziegler,
Ludwig-Maximilians Universität München

Die Dissertation wurde am 03.08.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau am 13.09.2000 angenommen.

Meinem Vater

Alle Dinge sind schwer, bevor sie leicht werden.

(Persisches Sprichwort)

Bevor ich mich bei all denen bedanke, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, richte ich meinen Dank an **meine Eltern**, die mir meinen beruflichen Werdegang ermöglicht und stets an mich geglaubt haben.

Herrn Prof. Dr. G. Wolfram möchte ich herzlich danken, dass er als mein Doktorvater die Durchführung dieser Dissertation ermöglichte und mich mit wertvollen Hinweisen und Anregungen während der Arbeitsphase und der Fertigstellung der Arbeit unterstützt hat.

Frau Prof. Dr. Anette.-G. Ziegler gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung während der Doktorarbeit. Ihre wertvollen fachlichen Anregungen, die begeisterte persönliche Unterstützung und ihr entgegengebrachtes Vertrauen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danken möchte ich ihr für die freundschaftliche, konstruktive und faire Zusammenarbeit, die mir u. a. die Teilnahme an Kongressen im In- und Ausland und die Veröffentlichung meiner Forschungsergebnisse möglich machte.

Ganz herzlich danken möchte ich Herrn Dr. med. Michael Hummel, der mich als Mitbetreuer unermüdlich fachlich und menschlich bei der Abfassung dieser Dissertation unterstützt hat. Gerade in den Zeiten der „Durststrecken“ hat er an mich geglaubt und mir Mut gemacht. Die freundschaftliche, produktive und von Spaß geprägte Arbeit mit ihm bleiben mir unvergessen. Deshalb gilt ihm mein besonderer Dank.

Herrn Prof. Dr. E. Standl gilt mein Dank für die Möglichkeit, die wissenschaftlichen Arbeiten am Institut für Diabetesforschung durchzuführen und für die Überlassung von Patientenproben.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. E. Bonifacio, der mich in die Geheimnisse des tTGCA-Assays einführte und somit maßgeblich zur Etablierung und stetigen Optimierung des Tests am Institut für Diabetesforschung beitrug. Darüber hinaus danke ich ihm für die nützlichen Anregungen bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse.

Frau Annette Schimmel und Frau Ulrike Mollenhauer möchte ich herzlich für die große Hilfe bei der Durchführung der immunologischen Untersuchungen und Frau Dr. rer. nat. Heike Naserke für die praktischen Tips bei der Abfassung meiner Arbeit danken.

Danken möchte ich auch Herrn Mike Schenker, der für mich als Arzt die Blutentnahmen vorgenommen hat und als IT-Spezialist so manche computertechnische Katastrophe zu verhindern wusste. Frau Michaela Dübell möchte ich für die gewissenhafte Dokumentationsarbeit und die Hilfe bei der Rekrutierung der Patienten danken.

Frau Dr. oec. troph. Daniela Muhr-Becker und Frau Dr. biol. hum. Karin Ferber gilt mein besonderer Dank für die konstruktive Kritik und für das Durchsehen der Arbeit in der Phase der Fertigstellung. Ohne sie hätte diese Arbeit den Ansprüchen an die neue Rechtschreibung nicht gerecht werden können.

Der Bayer Corporation und der Deutschen Diabetes Gesellschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit in Form von Projektförderungen.

Danken möchte ich auch meiner Schwester Susanne und ihrem Mann Max, die mich stets in Zeiten der wissenschaftlichen Niederlagen aufgefangen haben und nicht zuletzt meinem Mann Christian, der computertechnisch oft die letzte Rettung war und mich in der Endphase meiner Doktorarbeit so großzügig finanziell unterstützt hat.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Einführung	1
1.2	Grundlagen	3
	Typ-1 (insulinabhängiger) Diabetes mellitus	3
	Zöliakie (Einheimische Sprue)	7
1.3	Problemstellung	12
2	UNTERSUCHUNGSGRUPPEN UND METHODEN	14
2.1	Untersuchungsgruppen	14
2.1.1	Untersuchungsgruppen für den GADIA2-combi	14
2.1.1.1	Kontrollpersonen	14
2.1.1.2	Neumanifeste Typ-I-Diabetiker	14
2.1.1.3	Verwandte ersten Grades von Typ-1-Diabetikern	14
2.1.1.4	Ein- und Ausschlusskriterien	15
2.1.2	Untersuchungsgruppen für den tissue-Transglutaminase-C-Assay	15
2.1.2.1	Kontrollpersonen	15
2.1.2.2	Neumanifeste Typ-1-Diabetiker	15
2.1.2.3	Kinder diabetischer Eltern	16
2.1.2.4	Ein- und Ausschlusskriterien	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Metabolische Parameter beim Typ-1-Diabetes	20
2.2.2	Nachweis von Autoantikörpern beim Typ-1-Diabetes	17
2.2.2.1	Nachweis von Inselzell-Autoantikörpern (ICA)	19
2.2.2.2	Nachweis von Insulin-Autoantikörpern (IAA)	19
2.2.2.3	Nachweis von Autoantikörpern gegen GAD und IA2	18
2.2.2.4	Kombinierter Nachweis von Autoantikörpern gegen GAD und IA2 (GADIA2-combi) in Venen- und Kapillarblut	17
2.2.2.5	Gewinnung von Kapillarblut	18
2.2.3	Nachweis von Auto-Antikörpern bei Zöliakie	20
2.2.3.1	Nachweis von Endomysium-Antikörpern (EMA) der Klasse IgA	21
2.2.3.2	Nachweis von Antigliadin-Antikörpern (AGA) der Klassen IgA und IgG	21
2.2.3.3	Nachweis von tissue-Transglutaminase-C-Antikörpern (tTGCA) der Klassen IgG und IgA	20
2.3	Statistik	22

3	ERGEBNISSE	24
3.1	GADIA2-combi	24
3.1.1	Etablierung des GADIA2-combi	24
3.1.1.1	Ermittlung des optimalen Mischungsverhältnisses der beiden Antigene GAD und IA2	24
3.1.1.2	Bestimmung des Normbereichs	24
3.1.1.3	Reliabilität des GADIA2-combi	25
3.1.1.4	Sensitivität des GADIA2-combi	26
3.1.1.5	Korrelation der GADIA2-combi-Titer mit GADA- und IA2A-Titern im Einzeltest	27
3.1.1.6	Der additive Effekt	29
3.1.2	Charakterisierung der GADIA2-combi-Ergebnisse bei Verwandten ersten Grades von Typ-I-Diabetikern	29
3.1.2.1	Höhe der GADIA2-combi-Titer bei 1606 erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern	29
3.1.2.2	Antikörperstatus bei 770 erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern mit Verlaufsbeobachtung	30
3.1.2.3	Antikörperkombination bei 86 Antikörper-positiven erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern	32
3.1.2.4	Typ-1-Diabetes bei Antikörper-positiven erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern	33
3.1.2.5	Prädiktiver Wert (Abschätzung des Diabetesrisikos)	36
3.1.2.6	Sensitivität des GADIA2-combi bei der Detektion von Verwandten mit Typ-1-Diabetes	38
3.1.2.7	Diabetesrisiko in Abhängigkeit weiterer immunologischer und klinischer Merkmale	40
3.1.3	GADIA2-combi-Titer in venösem und kapillärem Blut	41
3.2	Tissue-Transglutaminase-C(tTGC)-Assay	44
3.2.1	Etablierung des tTGC-Assays	44
3.2.1.1	Ermittlung des Normalbereichs	44
3.2.1.2	Validierung des Tests	44
3.2.2	Zöliakie-assoziierte Antikörper bei Kindern diabetischer Eltern	46
3.2.2.1	Gewebs (tissue)-Transglutaminase-C-Antikörper (tTGCA)	46
3.2.2.2	Endomysium- Antikörper (EMA) und Anti-Gliadin-Antikörper (AGA)	49
3.2.2.3	Antikörper-Kombinationen	53
3.2.2.4	Beziehung zum Geschlecht	54

3.2.3	Verlaufsbeobachtung bei tTGC- und EMA-positiven Kindern	55
3.2.3.1	Alter bei tTGCA- und EMA-Entwicklung	57
3.2.4	Zöliakie-assoziierte Antikörper in Abhängigkeit des Stillens	58
3.2.5	Zöliakie- und Typ-1-Diabetes-assoziierte Antikörper	59
4	DISKUSSION	60
4.1	GADIA2-combi-Test	60
4.1.1	Untersuchungsgruppen	60
4.1.2	Methode zum kombinierten Nachweis von GAD- und IA2-Antikörpern (GADIA2-combi)	61
4.1.3	GADIA2-combi-Antikörper bei Verwandten ersten Grades von Typ-1-Diabetikern	66
4.1.4	GADIA2-combi-Titer in Kapillarblut	70
4.2	Gewebs (tissue)-Transglutaminase-C-Test (tTGC)	72
4.2.1	Untersuchungsgruppen	72
4.2.2	Methode zum Nachweis von tissue-Transglutaminase-C-Antikörpern (tTGC) der Immunglobulinklassen G und A (IgG und IgA)	73
4.2.3	Zöliakie-assoziierte Antikörper bei Kindern diabetischer Eltern	75
4.3	Screening-Modell für erstgradig Verwandte von Typ-1-Diabetikern	82
5	ZUSAMMENFASSUNG	84
6	LITERATURVERZEICHNIS	87
Anhang		
	Anleitung zur Blutentnahme	A1
	Anamnesebogen Inselzell-Antikörpertest	A2
	Anamnesebogen bei Geburt	A3
	Fragebogen zur Nachuntersuchung 9 Monate nach Geburt	A5
	Fragebogen zur Nachuntersuchung 2 Jahre nach Geburt	A9
	Fragebogen zur Nachuntersuchung 5 Jahre nach Geburt	A11
	Fragebogen zur Nachuntersuchung 8 Jahre nach Geburt	A14
	Vorveröffentlichungen	A17
	Lebenslauf	A18

1 EINLEITUNG

Die Einführung führt zunächst allgemein auf die Themen Typ-1-Diabetes und Zöliakie im Kontext der Arbeit hin. Im Kapitel „Grundlagen“ werden Hypothesen zur Ätiologie und Pathogenese der beiden Erkrankungen erläutert. Hier werden vor allem deren immunologischen Grundlagen beschrieben und die bisherigen Arbeiten auf diesem Gebiet dargestellt. Danach werden jeweils die aktuellen Methoden der Immundiagnostik aufgezeigt. Im Anschluss werden Gemeinsamkeiten der beiden Erkrankungen aufgeführt. Die anschließende Problemstellung fasst die wesentlichen Fragen zusammen, die in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden sollen.

1.1 Einführung

Die gehäuft gemeinsam auftretenden Autoimmunerkrankungen Typ-1-Diabetes (insulinabhängiger Diabetes) und Zöliakie (gluteninduzierte Enteropathie) sind bis heute in ihrer Entstehung weder komplett erforscht, noch sind sie heilbar. Besonders wegen ihrer mannigfaltigen und massiven Folgeerkrankungen - die dem Gesundheitswesen jährlich immense Kosten bereiten - bedeuten sie ein großes individuelles Leid für die Betroffenen. Medizinische und diätetische Maßnahmen ermöglichen Betroffenen beider Erkrankungen relativ akzeptable Lebensbedingungen, die sich von denen eines Gesunden kaum unterscheiden müssen. Im Hinblick auf frühzeitige therapeutische Optionen und zur Vermeidung bzw. Verzögerung von Sekundärkomplikationen ist es aber indiziert, geeignete Früherkennungsmassnahmen gerade in Risikopopulationen zu realisieren.

Für beide Erkrankungen spielen in der Frühdiagnostik Antikörper die zentrale Rolle:

Der „Goldstandard“ als Marker für die Prädiktion und Diagnose des Typ-1-Diabetes sind verschiedene cytoplasmatische Antikörper, sogenannte Inselzell-Autoantikörper (ICA) [14]. Der Vorteil der durch Immunfluoreszenz auf humanen Pankreasschnitten nachgewiesenen ICA liegt darin, dass durch einen Test mindestens zwei Antikörper gleichzeitig detektiert werden. Die Grenzen des ICA-Tests liegen aber eindeutig in der unterschiedlichen Sensitivität innerhalb verschiedener Labors, in der teilweise geringen Präzision und aufwändigen Auswertung durch erfahrene Ableser und in der Notwendigkeit von humanem Pankreasgewebe. Aus diesen Gründen kann dieser Test in Routinelabors bisher nicht angewendet werden. Seit eine Glutamatdecarboxylase (GAD) und eine Tyrosinphosphatase (IA2) als die wesentlichen Antigene des ICA entdeckt [7, 92, 17, 79] und quantitative Radioligandenbindungs-Assays (RBA) gegen diese Antigene entwickelt wurden [92, 17, 50, 93], ist eine neue Generation des Diabetes-Screenings angebrochen, die die Diagnose und Früherkennung stark vereinfacht. Um ICA durch die neuen Antikörpertests mit ausreichender Sensitivität und Spezifität zu ersetzen, ist der Nachweis der Antikörper gegen beide Antigene

(GAD und IA2) nötig [16, 111, 140, 131]. Damit ein zuverlässiges Screening nach beiden Antikörpern zudem noch vereinfacht werden kann, schlugen die Arbeitsgruppe von Bonifacio et al. und andere einen kombinierten RBA beider Antikörper vor [17, 140, 58]. Diese sehr viel kostengünstigere und vereinfachte Methode liefert die wesentlichen Voraussetzungen für ein Risikogruppen- bzw. sogar groß angelegtes Bevölkerungs-Screening.

Vor diesem Hintergrund wird im Rahmen dieser Arbeit der kombinierte Assay „GADIA2-combi“ etabliert und mit dem Nachweis von ICA und Insulinoantikörpern (IAA) verglichen. Hierbei interessiert vor allem die Sensitivität und der prädiktive Wert bei erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern. Um den Test noch attraktiver zu machen, soll ausserdem die Verwendung von Kapillarblut im GADIA2-combi evaluiert werden.

Bei der Früherkennung und Diagnose der Zöliakie stehen bisher die Bestimmung der Gliadin- und sogenannte Endomysiumantikörper im Serum im Vordergrund. Da Antikörper gegen Gliadin (AGA) zwar typisch, aber nicht spezifisch für die Zöliakie sind, werden die diagnostisch sehr aussagekräftigen Endomysiumantikörper (EMA) als die wichtigsten serologischen Marker angesehen [135]. EMA werden wie ICA durch Immunfluoreszenz auf Gewebsschnitten nachgewiesen, wobei in der diagnostischen Routine sowohl Affenösophagie als auch humane Nabelschnur eingesetzt werden. Hier liegen wiederum die Nachteile dieses Test begründet: Hohe Kosten, schlechte Bezugsmöglichkeiten der Substrate und die Notwendigkeit von langen Erfahrungen bei der präzisen Auswertung der Tests.

Die Arbeitsgruppe von Dieterich et al. konnte 1997 erstmals die tissue(Gewebs)-Transglutaminase-C (tTGC) als das Antigen der EMA (eventuell sogar das zentrale Antigen der Zöliakie) identifizieren [38]. Bonifacio et al. entwickelten einen RBA zum Nachweis der gegen tTGC gerichteten Antikörper und konnten zeigen, dass 98% einer an Zöliakie erkrankten unbehandelten Patientengruppe Immunglobulin-G(IgG)-Antikörper gegen das neue Antigen aufwiesen [61]. Durch diesen Fortschritt können die bisherigen teuren und aufwendigen Antikörpertests eventuell auch hier ersetzt, zumindest aber wertvoll bereichert werden, um das Screening von Risikopopulationen bzw. der Allgemeinbevölkerung zu realisieren.

Deshalb wird in der vorliegenden Arbeit als weitere Methode ein RBA nach dem Design des GADA- bzw. IA2A-Assays zum Nachweis der tTGC-Antikörper etabliert. Da Kinder diabetischer Eltern aufgrund ihrer genetischen Prädisposition ebenfalls ein erhöhtes Diabetesrisiko aufweisen und da die beiden Erkrankungen Typ-1-Diabetes und Zöliakie gehäuft gemeinsam auftreten, ist diese Personengruppe vermutlich ebenfalls als Risikopopulation für eine Zöliakie anzusehen. Mit Hilfe dieses neuen Tests soll daher die Prävalenz der bisher wenig erforschten tTGC-IgG-Antikörper bei einer Gruppe von Kindern diabetischer Eltern geprüft werden. Darüber hinaus untersucht die vorliegende Arbeit innerhalb dieses Kollektivs erstmals das Alter bei Auftreten der Zöliakie-assozierten Antikörper, die zeitliche Abfolge und das damit verbundene Risiko an Zöliakie zu erkranken.

1.2 Grundlagen

Typ-1 (insulinabhängiger) Diabetes mellitus

Der Typ-1-Diabetes zählt zu den Autoimmunerkrankungen und ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die auf einem absoluten Mangel an Insulin beruht [6, 143]. Im Krankheitsverlauf kommt es zu einer Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen der Langerhans-Inseln im Pankreas, so dass die Insulinsekretion nicht mehr ausreicht, die Glucosehomöostase aufrechtzuerhalten und eine exogene Insulinzufuhr erforderlich wird. Die Möglichkeiten der modernen Insulintherapie erlauben es den Diabetikern heute, bei flexibler Mahlzeitengestaltung durchaus Blutzuckerwerte zu erreichen, die nur geringfügig vom Normbereich abweichen und relativ stabil sein können [6]. Tragisch sind bis heute die teilweise trotz guter Einstellung auftretenden massiven Folgeerkrankungen des Typ-1-Diabetes wie Erblindung, Neuropathien, dialysepflichtiger Niereninsuffizienz und das erhöhte Risiko für Herz-Kreislauf- und Gefässerkrankungen (Myokardinfarkt, Apoplex, Amputationen) [121].

Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese des Typ-1-Diabetes

Annähernd 0,3% der deutschen Bevölkerung leiden an einem Typ-1-Diabetes [143]. Bei einer ersten deutschlandweiten Untersuchung der Inzidenzfälle unter dem 5. Lebensjahr pro Jahr von 1993-1994, zählte man 6,55 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner [102]. Die Inzidenzrate innerhalb Europas schwankt von 5,2 in Rumänien und 42,8 in Finnland [67]. Der Einfluss genetischer Risikomarker, unterschiedliche Lebensstile, sozioökonomische- und Umweltfaktoren (z. B. Kuhmilch im Säuglingsalter) werden als Gründe für das Auftreten der geographischen Schwankungen diskutiert [108, 84]. Die europaweite Diabeteshäufigkeit hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen [37]. Auch in Deutschland sind die Prävalenz und Inzidenzrate gestiegen. Besonders in der Altersgruppe 10-19 Jahre ist dem nationalen Diabetesregister der ehemaligen DDR eine Steigung der Inzidenzrate von 5,6 auf 11,8 zu entnehmen [83], wobei als wesentlicher Faktor die steigende Vererbung von Diabetes-Risikogenen angesehen wird [143].

Der Typ-1-Diabetes gilt als T-Zell vermittelte organspezifische Autoimmunerkrankung. Bei entsprechender genetischer Prädisposition und noch ungeklärtem Einwirken von Umweltfaktoren, wird die destruktive Insulitis initiiert. Hierbei konnte durch Transferexperimente gezeigt werden, dass T-Zellen krankheitsvermittelnd sind während Diabetes-assoziierte Antikörper als Epiphänomene gelten [12, 113].

Eine wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung eines Autoimmundiabetes ist das Vorhandensein von genetischen Risikomarkern. Inzwischen sind zumindest 19 verschiedene Gen-Loci bekannt, die für einen Typ-1-Diabetes prädisponieren, wobei hier der HLA-Locus auf Chromosom 6p als der wichtigste gilt. Dieses Gen macht ca. 50% des genetischen

Diabetesrisikos aus. Bei Diabetikern fand man vor allem eine erhöhte Frequenz von HLA-DR3 und/oder -DR4 (69%) gegenüber Kontrollpersonen (26%), wobei das Diabetesrisiko für Träger beider Allele, d. h. DR3/DR4-heterozygote Personen, besonders hoch war [127, 104, 126].

Der Krankheitsprozess des Typ-1-Diabetes beginnt beim Menschen bereits in den ersten Lebensjahren [99], so dass potentielle Umwelteinflüsse schon sehr früh im Leben wirksam werden müssen, um Auslöser der Insulinitis sein zu können. So könnte eine Infektion (z. B. mit dem Coxsackie-Virus) oder eine frühe Exposition mit Nahrungsproteinen (z. B. Kuhmilch) durch die Ähnlichkeit von Proteinbestandteilen mit der β -Zelle zur Kreuzreaktivität mit körpereigenem Gewebe und dadurch zur organspezifischen Autoimmunität führen [9, 124]. Es werden auch Impfungen, der soziale Status, virale Infekte und die Stilldauer als Initiatoren bzw. Einflussfaktoren des Immunprozesses diskutiert. Neuere Veröffentlichungen bestätigen jedoch nicht, dass Impfungen für die Entstehung eines Typ-1-Diabetes verantwortlich gemacht werden können. So zeigte eine Untersuchung der allgemeinen Impfhäufigkeit von Antikörper-negativen oder -positiven Kinder von diabetischen Eltern in Deutschland keine Unterschiede in der Diabetesentwicklung [55]. Den sozialen Status betreffend deuten Untersuchungen darauf hin, dass das Diabetesrisiko mit der Zugehörigkeit zu einer höheren sozialen Schicht grösser ist [63]. Auch wurde lange Zeit ein kausaler Zusammenhang zwischen Virusinfektionen und der Erkrankung an Typ-1-Diabetes angenommen. Aufgrund der sehr langen prädiabetischen Phase geht man heute jedoch nicht mehr davon aus, dass virale Infekte bei Manifestation als ursächlich für die Krankheitsentstehung (mit Ausnahme der kongenitalen Rubella-Infektion) anzusehen sind [82, 105]. Dass ein Zusammenhang zwischen der Stilldauer und dem Risiko an Typ-1-Diabetes zu erkranken besteht, wurde erstmals anhand einer Untersuchung in Dänemark gezeigt [19]. Eine neuere Untersuchung bestätigte dieses Ergebnis [44]. Kinder, die weniger als drei Monate gestillt wurden hatten ein 1,37fach höheres Diabetesrisiko im Gegensatz zu denen, die über diesen Zeitraum hinaus mit Muttermilch ernährt wurden. In einer Querschnittsanalyse der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. A.-G. Ziegler am Institut für Diabetesforschung konnte hingegen kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Stilldauer und dem Diabetesrisiko, sowie anderen Ernährungsfaktoren gefunden werden [90].

Während humorale Immunphänomene beim humanen Typ-1-Diabetes eher als Begleiterscheinungen angesehen werden, gilt das zelluläre Immunsystem als pathogenetisch relevant. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Lymphozyten, nicht aber Serum, Immunglobuline oder Makrophagen die Krankheit von einem auf das andere Tier übertragen können. Auch beim Menschen gibt es eindeutige Hinweise für die Relevanz des zellulären Immunsystems. So lassen sich auch Jahre nach der Diabetesmanifestation T-Lymphozyten („Memory-Zellen“ genannt) nachweisen, die dafür verantwortlich sind, dass Pankreastransplantate von einem eineiigen nicht diabetischen Zwilling in einem diabetischen Zwillingsempfänger abermals durch einen Autoimmunprozess zerstört werden [12, 20, 113]. Man geht heute davon aus, dass bei einem Überschuss an T-Helfer-1-Zellen (Th1), die v. a.

entzündungsfördernde Moleküle sezernieren, im Gegensatz zu regulatorischen T-Helfer-2-Zellen (Th2) (hemmender Einfluss auf das Immunsystem), die destruktive Insulitis ausgelöst wird [96]. Aus dem Blut von Patienten mit Typ-1-Diabetes konnten T-Lymphozyten nachgewiesen werden, die spezifisch gegen Inselzellantigene gerichtet sind (z. B. gegen GAD) [42, 98]. Diskutiert wird nach wie vor, ob die Einleitung der Inselzellentzündung von einem Antigen ausgeht und sich dann auf weitere ausdehnt (spreading) oder ob für die Immunantwort gleich multiple Antigene verantwortlich gemacht werden können. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass Insulin das erste Antigen ist, das während der autoimmunen Entzündung der Inselzellen wirksam wird [145]. Offensichtlich scheint jedoch bei der humoralen Immunantwort eine Ausweitung auf mehrere Antikörper notwendig zu sein, da letztlich – mit wenigen Ausnahmen - nur Patienten mit multiplen Antikörpern an einem Typ-1-Diabetes erkranken [27, 145].

Immundiagnostik des Prä-Typ-1-Diabetes

In den letzten Jahren wurden eine Reihe von immunologischen und molekulargenetischen Tests entwickelt, die sowohl eine frühe Diagnostik als auch eine Vorhersage des Typ-1-Diabetes bei Risikopersonen (z. B. erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern) sowie der Normalbevölkerung zulassen. Man misst heute mit spezifischen Assays vier verschiedene Antikörper, die für die Diagnostik und Prädiktion des Typ-1-Diabetes eine sehr wichtige Rolle spielen: Inselzellautoantikörper (ICA), Insulinautoantikörper (IAA), Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase (GADA) und Antikörper gegen eine Tyrosinphosphatase (IA2A und IA2 β A) [100].

ICA reagieren mit Inselzellen und werden auf Gefrierschnitten des humanen Pankreas nachgewiesen [16, 106]. Positive ICA-Befunde werden durch Austitrierung näher charakterisiert (Angabe in JDF-Units), so reflektieren hohe Titer (> 80 JDF-U vs. niedrige Titer < 20 JDF-U) auch ein höheres Diabetesrisiko [13]. Die fluoreszenzmikroskopisch sichtbaren Markierungen entstehen durch Reaktion der Antikörper im Patientenserum mit verschiedenen β -Zellantigenen. Diese Antigene sind u. a. GAD und IA2. Man geht jedoch davon aus, dass noch weitere Antigene existieren, die bisher noch unbekannt sind. Der ICA-Test misst also gleichzeitig mindestens zwei Antikörper und hat als Einzeltest bisher die höchste Spezifität und Sensitivität. Als klassischer Immunmarker ist der Nachweis von ICA der Goldstandard im Hinblick auf die Prädiktion und Diagnose eines Typ-1-Diabetes und kann laut bisheriger Untersuchungsergebnisse durch Einzeltests gegen eines der bekannten Antigene Insulin, GAD oder IA2 nicht ersetzt werden [111]. Die beiden wesentlichen Nachteile des ICA-Tests sind sowohl die schwere Verfügbarkeit und teils mangelnde Qualität des humanen Pankreasgewebes als auch die schwierige Standardisierbarkeit durch die subjektive Auswertung am Mikroskop. Es wäre daher sinnvoll, den bestehenden ICA-Test durch quantitative, einfache und standardisierbare Assays gegen rekombinante β -Zellantigene zu ersetzen. Erste Versuche in diese Richtung wurden bereits unternommen und sprechen

dafür, den ICA-Test in Zukunft durch einen kombinierten Test mit zwei oder drei der genannten Antigene zu ersetzen [95, 140].

IAA treten vor der Therapie mit exogenem Insulin auf und sind gegen das körpereigene Insulin gerichtet [144, 129]. Sie werden sehr zuverlässig durch einen Radioimmunoassay nachgewiesen und bei etwa 20-70 % der neuentdeckten Typ-1-Diabetiker gefunden [129]. Hohe IAA-Titer bei Manifestation werden vor allem bei Kindern unter fünf Jahren nachgewiesen und bei gleichzeitigem Vorliegen mit ICA sind sie mit einem relativen Risiko von 100 % verbunden, einen Typ-1-Diabetes zu entwickeln [141]. Erst unlängst konnte die Methode zum Nachweis der IAA entscheidend verbessert werden. Bislang waren für einen Testansatz mindestens 600 μ l Patientenserum nötig. Diese Menge erschwerte gerade bei jungen Kindern - bei denen dieser Marker aber sehr aussagekräftig, eine Blutentnahme jedoch limitiert ist - die Durchführbarkeit des Tests. Williams et al. [141] entwickelten einen sogenannten "Micro-Assay" zum Nachweis der IAA, für den nur noch 20 μ l Serum nötig sind. Die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. A.-G. Ziegler am Institut für Diabetesforschung konnte zeigen, dass dieser Test im Vergleich zum herkömmlichen Assay weder an Sensitivität noch an Spezifität einbüßte [88].

Baekkeskov und Mitarbeiter berichteten 1990 erstmals bei Typ-1-Diabetikern von Antikörpern gegen ein 64-kDa-Protein (GAD), das aus Glutamat den Neurotransmitter Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) synthetisiert [97]. GAD wurde als diabetesspezifisches β -Zellantigen identifiziert und ein Test zur Messung dieser Antikörper entwickelt [1, 8]. Seitdem stellt GAD einen weiteren wichtigen immunologischen Marker in der Diagnostik des Typ-1-Diabetes dar [5, 28, 101, 109]. Bei etwa 60 % der neumanifesten Typ-1-Diabetiker lassen sich GADA nachweisen [50]. Daneben findet man Antikörper gegen GAD auch bei neurologischen Erkrankungen wie dem Stiffman- und dem polyendokrinen Syndrom [110, 115]. GADA sind zwar sehr sensitiv aber im Vergleich zu anderen Markern weniger spezifisch für einen Typ-1-Diabetes und müssen daher in Kombination mit anderen Antikörpern zur Spezifitätsverbesserung getestet werden [143].

Als neue immunologische Marker wurden 1996 zwei transmembranäre Proteine der sekretorischen Granula IA2 (auch als ICA512 bezeichnet) und IA2 β (auch Phogrin genannt) entdeckt, die zu der Familie der Tyrosinphosphatasen zählen [17, 45, 64, 92]. IA2 (ca. 40 kDa) wird in allen endokrinen Zellen und im Nervengewebe, IA2 β (37 kDa) vorwiegend in β -Zellen exprimiert. Da nur ein Teil der Personen mit IA2A auch Antikörper gegen IA2 β aufweist und IA2 β A nur sehr selten alleine nachgewiesen werden, geht man davon aus, dass auf den Test von IA2 β A verzichtet werden kann. Die gegen IA2 gerichteten Antikörper sind für den Typ-1-Diabetes sehr spezifisch und werden zu 60-100 % bei neu entdeckten Typ-1-Diabetikern nachgewiesen [7, 27]. IA2A korrelieren mit einer schnellen Diabetesentwicklung, da Personen, bei denen neben ICA oder IAA auch IA2A nachgewiesen werden, sehr viel schneller einen Typ-1-Diabetes entwickeln als IA2A-negative Personen [27].

Sowohl GAD- als auch IA2-Antikörper werden in der Regel analog mit einem Radioligandenbindungsassay (RBA) [34] nachgewiesen, der in Kapitel 2.2.1.3 eingehend beschrieben wird. Gerade im Hinblick auf ein Risikoscreening auf der Ebene der Normalbevölkerung und die Diabetesfrüherkennung, wäre es denkbar, beide Antikörper gleichzeitig in einem Assay zu messen, was besonders hinsichtlich eines hohen Probendurchsatzes und Minimierung der Kosten sinnvoll wäre. Sollte es darüberhinaus möglich sein, diesen kombinierten Antikörpertest auch in Kapillarblut durchzuführen, wären noch weitere Zeit- und Kosteneinsparungen möglich.

Zöliakie (Einheimische Sprue)

Auch die Zöliakie (im Erwachsenenalter einheimische Sprue genannt) gilt als organspezifische Autoimmunerkrankung, die bei genetisch prädisponierten Personen zu einer Zerstörung der Dünndarmmukosa führt. Im Gegensatz zum Typ-1-Diabetes ist der externe Trigger dieser Erkrankung bekannt: das Getreideprotein Gluten [78]. Die klinischen Symptome (Gedeihstörungen, chronische Durchfälle, aufgeblähter Bauch) resultieren aus dem strukturellen Schaden der Dünndarmmukosa, der zur Malabsorption führt [85]. Hiervon sind praktisch alle Nahrungsbestandteile wie Eiweiß, Kohlenhydrate, Fette, Vitamine, Mineralien und Spurenelemente betroffen [51]. Das Krankheitsbild der Zöliakie präsentiert sich heute nicht nur in der geschilderten klassischen Symptomatik, sondern in verschiedenen klinischen Bildern. Entsprechend dem „Eisbergmodell“ [24, 68] machen die klassischen Fälle als „über dem Wasser schwimmende Spitze“ nur etwa ein Siebtel aller Zöliakieerkrankungen aus. Die meisten Patienten leiden an stillen oder oligosymptomatischen Formen, einer sogenannten latenten bzw. silenten Zöliakie. Ein Patient mit einer latenten Form der Zöliakie ist z. B. symptomfrei, hat eine mikroskopisch unauffällige Mukosa, weist aber eine hohe Dichte an intraepithelialen Lymphozyten (IEL) auf oder besitzt Zöliakieassoziierte Antikörper. Bei der silenten Form der Zöliakie ist mikroskopisch zwar eine abgeflachte Mukosa feststellbar, die Patienten können aber über lange Zeit völlig frei von Symptomen sein [74].

Durch die klassische Behandlungsform der strengen (lebenslangen) glutenfreien Ernährung regeneriert sich die entzündete und abgeflachte Dünndarmmukosa auf normale Gestalt und Funktion und der Patient ist praktisch symptomfrei [51]. Bei unbehandelter Zöliakie aber auch bei häufigen oder andauernden Diätfehlern treten jedoch auch bei der Zöliakie massive Folgeerkrankungen wie Wachstumsstörungen, Anämien, assoziierte Autoimmunerkrankungen, neuro-psychiatrische Erkrankungen, Fertilitätsstörungen sowie eine erhöhte Rate von malignen Tumoren auf [52, 74, 128]. Bei letzteren handelt es sich um T-Zell-Lymphome des Dünndarms, Adenokarzinome des Dünndarms, Karzinome des Mundes, Pharynx und Ösophagus sowie Karzinoide [43]. Da auch eine silente Form der Zöliakie zu Folgeerkrankungen (wie Autoimmunerkrankungen, Osteopenie) führen kann, gilt auch hier eine rechtzeitige Behandlung als obligat [86, 74].

Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese der Zöliakie

Die Prävalenz der klassischen Form der Zöliakie liegt in Deutschland bei 1:2000. Berücksichtigt man jedoch die silenten und latenten Formen der Erkrankung, ist von einer sehr viel höheren Prävalenz von bis zu 1:300 auszugehen [24, 47, 49, 120]. Die Inzidenz schwankt europaweit von 1:200 in Irland bis zu 1:2000 in anderen Regionen [4, 46, 57, 69]. Studien u. a. aus Schweden zeigen einen stetigen Anstieg der Prävalenz der Zöliakie zwischen 1970 und 1988. Die Inzidenz erhöhte sich von 1,7 auf 3,1 %, was auf eine frühere und vermehrte Glutenexposition im Kindesalter zurückgeführt wird [4, 26, 136]. Überdies wurde eine Verschiebung im Alter des Auftretens der Erkrankung beobachtet. Zunehmend wird die Erkrankung Zöliakie bei Schulkindern und jungen Erwachsenen - und nicht wie bisher vorwiegend bei Kleinkindern - diagnostiziert [77].

Im Hinblick auf Aussagen über die Prävalenz und Inzidenz der Erkrankung sind sich die Wissenschaftler mittlerweile einig, dass nicht nur die klassische Form der Zöliakie (abgeflachte Mukosa, typische Symptome und Remission nach Einführung der glutenfreien Diät), sondern auch die stillen Verlaufsformen unbedingt berücksichtigt werden müssen [24, 128, 25].

Seit vielen Jahren sind die Immunreaktionen der Zöliakie zwar weitgehend bekannt, durch die verschiedenartigen Immunantworten ist es aber nach wie vor schwierig, auslösende immunologische Ursachen bei der Zöliakie von den Sekundärreaktionen zu trennen [85]. Seit Dieterich und Mitarbeiter 1997 [38] erstmals das Enzym tissue-Transglutaminase-C (tTG) als das zentrale Antigen in der Immunpathogenese der Zöliakie beschrieben haben, ist die Zöliakieforschung in ein Stadium gelangt, in dem es möglich scheint, den ursächlichen Immunprozess der Autoimmunerkrankung näher zu untersuchen. Eine umfassende Charakterisierung der Immunantwort gegen tTG, z. B. wann im Leben eines Menschen eine solche Immunantwort beginnt und welche Rolle das Auftreten der tTGCA innerhalb der Frühdiagnostik bzw. Prädiktion einer Zöliakie bei Risikopopulationen spielt, liegt bislang jedoch nicht vor.

Wie beim Typ-1-Diabetes gelten die Erbfaktoren in der Zöliakie als prädisponierend. Die Erkrankung ist mit Allelen des HLA-Genkomplexes assoziiert. Eine besondere Bedeutung haben die HLA-Haplotypen DR3-DQ2 und DR7-DQ2, in einigen Bevölkerungsgruppen auch DR5-DQ2 [72, 116]. Dieser Genkomplex kontrolliert Abwehr- und Entzündungsreaktionen im Organismus und ist vermutlich in besonderer Weise an den Entzündungsreaktionen der Dünndarmmukosa gegen Gliadin beteiligt [117].

Als weitere pathogenetische Komponente wird ein angeborener intestinaler Permeabilitätsdefekt bei den Patienten angesehen [48]. Hierdurch kann nach einem Modell von Schuppan et al. [107] vermehrt Gluten in die Lamina propria gelangen und so als Trigger für weitere Immunreaktionen fungieren. Die eingedrungenen Gluten-Peptide werden in ihrer Immunogenität erhöht und so zu Neoepitopen, indem sie durch tTG modifiziert (desaminiert) werden. Makrophagen präsentieren diese Gliadin-Peptidfragmente, was über

eine T-Zell-Stimulation eine Zytokinausschüttung zur Folge hat. Hierdurch wird die Produktion von Antikörpern (AGA, EMA, tTGCA – diese sind evtl. auch ursächlich in den Krankheitsprozess involviert) angeregt. Gleichzeitig werden mesenchymatische Zellen aktiviert, epitheliale Wachstumsfaktoren und Metalloproteinasen zu sezernieren, die zur Kryptenhypertrophie und schließlich zur finalen Zerstörung der Dünndarmenterozyten führen.

Für den initialen Trigger der Pathogenese werden aber auch Nahrungsproteine (Kuhmilchproteine), Umweltfaktoren wie Toxine oder Virusinfekte diskutiert. So führt die Homologie der Aminosäuresequenz von A-Gliadin und dem humanen Adenovirus zu der Theorie (molekulare Mimikry), dass eine Infektion mit dem Virus für die Erkrankung an Zöliakie notwendig ist [3]. Wie beim Typ1-Diabetes wird auch in der Pathogenese der Zöliakie der Einfluss des Stillens diskutiert. Mäki et al. beobachteten in diesem Zusammenhang, dass mit steigender Dauer der Stillphase das Alter bei Manifestation einer Zöliakie stieg [76].

Immundiagnostik der Zöliakie

Seit den 60er-Jahren werden in Fällen mit untypischer Symptomatik oder bei Verdacht einer Zöliakie standardmässig serologische Antikörperuntersuchungen zur Immundiagnostik eingesetzt [133]. Es werden hauptsächlich Anti-Gliadinantikörper (AGA) der Klassen IgA und IgG und sogenannte Endomysium-Antikörper (EMA) der Klasse IgA nachgewiesen.

AGA (IgA und IgG) sind gegen den Getreidekleber gerichtet und werden unter Verwendung eines enzymgebundenen-Immunsorbent-Assays (ELISA) bestimmt [103]. Die Verlässlichkeit des Assays ist abhängig vom Alter der Patienten und von der Aktivität der Erkrankung. AGA-IgA-Bestimmungen sind zuverlässig bei jungen Kindern mit aktiver Erkrankung. Der Test erreicht bei Spezifitäten von 80-98 % Sensitivitäten von 90 % bis zu 100 % (außer bei Patienten mit IgA-Mangel) [32, 119]. Die Bestimmung der AGA-IgG ist ebenfalls sensitiv, jedoch weniger spezifisch. Bei älteren Kindern und Erwachsenen mit stillem Krankheitsverlauf büsst der Test an Zuverlässigkeit ein. Nahezu jeder unbehandelte Zöliakiepatient weist zwar AGA-IgG und/oder AGA-IgA auf, doch lassen sich diese Antikörper auch bis zu 20% bei gesunden Kontrollpersonen detektieren [10, 21].

Die sogenannten IgA-Endomysiumantikörper (EMA) sind – wie bisher vermutet - gegen ein feines Bindegewebsgeflecht der glatten Muskulatur gerichtet. EMA werden mittels indirekter Immunfluoreszens sowohl auf Schnitten von Affenösophagie als auch humaner Nabelschnur nachgewiesen [60, 73]. Vor Behandlung haben etwa 90 % der Zöliakiepatienten EMA. Die Sensitivität der EMA ist eindeutig altersabhängig. Mit steigendem Alter steigt die Sensitivität des Tests auf bis zu 97 % verglichen mit etwa 80 % bei Kindern unter 2 Jahren [21].

Bisher hat die Praxis gezeigt, dass die höchstmögliche Sensitivität und Spezifität bei Verdachtsfällen der Zöliakie durch eine Kombination der AGA-IgA, AGA-IgG und IgA-EMA erreicht werden kann [21]. Trotzdem stehen die schwere Verfügbarkeit der

Gewebeschnitte und die subjektive mikroskopische Auswertung einer hohen Sensitivität und Spezifität des EMA-Tests entgegen.

Seit Dietrich und Mitarbeiter 1997 erstmals zeigten, dass das – wahrscheinlich - durch mechanischen Stress und Traumata von den Zellen freigesetzte Enzym, die tissue-Transglutaminase-C (tTGC), das Antigen der EMA ist [38], steht der Diagnostik der Zöliakie ein weiterer Immunmarker zur Verfügung. Erste Publikationen verschiedener Arbeitsgruppen über die Sensitivität und Spezifität eines Transglutaminase-Assays sind bereits erschienen [39, 61, 122]. Bisher wurde zum Nachweis der tTGC-Antikörper ein bereits kommerziell erhältlicher ELISA verwendet, der in einigen Arbeitsgruppen sowohl sensitiv (95 %-98 %) als auch spezifisch war (94%-95%) [39, 122]. Ein erst kürzlich erschienener Vergleich zwischen einem tTGCA-RBA, der Antikörper gegen die humane rekombinante tissue-Transglutaminase-C misst, und einem ELISA zeigte, dass der RBA dem ELISA in Sensitivität und Spezifität deutlich überlegen ist [10]. Da IgG-Antikörper gegen Zöliakie-assoziierte Antigene generell als weniger spezifisch als IgA-Antikörper angesehen werden, wird bislang in erster Linie die IgA-Fraktion der tTGC-Antikörper detektiert. Ein in anderen Studien erhobener [39] positiver Befund dieser Antikörper in Abwesenheit von IgA-EMA oder bei einem IgA-Mangel wird daher nicht als Indikator für ein erhöhtes Zöliakie-Risiko angesehen [62]. Bisher liegen hierfür jedoch keine bestätigenden Untersuchungen vor, so dass die Rolle bzw. der prädiktive Wert der tTGCA-IgG bei Zöliakie weitgehend unklar ist.

Gemeinsamkeiten von Typ-1-Diabetes und Zöliakie

Allein die Tatsache, dass in Deutschland ca. 1,0-7,8% der Typ-1-Diabetiker zusätzlich eine Zöliakie haben [128], lässt die Vermutung zu, dass Assoziationen hinsichtlich der Entstehung beider Autoimmunerkrankungen bestehen. So existieren für beide Erkrankungen gemeinsame HLA-Risiko-Allele (DR3, DQA*0501, DQB*0201), die jeweils zentrale Rolle der T-Zellen und vermutete Umweltfaktoren (z. B. Stildauer) in der Pathogenese der beiden Krankheiten [40, 24]. Sowohl beim Typ-1-Diabetes als auch bei der Zöliakie spielen die spezifischen Antikörper bei der Prädiktion die entscheidende Rolle. Die Art, Anzahl und Höhe der jeweiligen Diabetes-spezifischen Antikörper(titer) lassen den Status der β -Zellzerstörungsprozesses abschätzen und den ungefähren Ausbruch der Krankheit voraussagen [100]. Ob eine manifeste, silente oder latente Zöliakie vorliegt, ist mit hoher Sensitivität und Spezifität durch den Nachweis der Zöliakie-assoziierten Antikörper feststellbar [74, 53].

Gemeinsam sind den beiden Erkrankungen auch die fatalen Folgeerkrankungen, die mit grossem Leid für den Betroffenen und immensen Kosten für das Gesundheitssystem verbunden sind.

Ein wesentlicher Unterschied der beiden Erkrankungen ist die Wirkung der Therapien. Durch eine Gluten-freie Diät ist es bei einer diagnostizierten Zöliakie möglich, die Antikörpertiter zu normalisieren sowie Folgeerkrankungen weitgehend zu vermeiden [18]. Hingegen ist es für

den Typ-1-Diabetes bisher nicht gelungen, eine erfolgreiche Therapie zu entwickeln, die einen positiven Einfluss auf den Antikörperstatus und somit sekundär auf den Immunprozess hat. Es kommt daher immer zur Erkrankung, die eine exogene Insulingabe nötig macht, wobei langfristig gut eingestellte Blutzuckerwerte die Gefahr von Folgeerkrankungen mindern können [121]. Eine relativ symptomarme Zöliakie tritt meist nach Manifestation eines Typ-1-Diabetes auf, wohingegen bei mit Diät behandelten Zöliakiepatienten selten ein Typ-1-Diabetes diagnostiziert wird [128]. Bei einigen Zöliakiepatienten lassen sich im Verlauf der Krankheit zwar Diabetes spezifische Antikörper nachweisen, die aber nicht zwangsläufig zu einem Ausbruch eines Diabetes führen [18]. Das Testen von an Diabetes erkrankten Kindern auf die Antikörper EMA und AGA wird in der Praxis heute empfohlen, dies gilt jedoch nicht für Diabetesrisikopersonen (wie z. B. erstgradig Verwandte von Typ-1-Diabetikern). Ebenso werden Zöliakie-krankte Patienten nicht routinemässig auf Diabetes-spezifische Antikörper untersucht [75]. Im Zuge der tTGC-Forschung tauchte die Frage auf, ob durch die Prävalenz der tTGC-Antikörper bei Typ-1-Diabetikern nähere Erkenntnisse bzgl. der Assoziation zur Zöliakie zu gewinnen sind. Erste Untersuchungen in diese Richtung haben ergeben, dass diese Antikörper tatsächlich häufig bei Typ-1-Diabetikern nachweisbar sind, wobei ein Unterschied der Prävalenz zwischen den Immunglobulin-Fractionen IgA und IgG feststellbar sind. Antikörper gegen tTGC der Klasse IgG waren vier mal so häufig bei manifesten Diabetikern nachweisbar als Antikörper der Klasse IgA [62].

1.3 Problemstellung

Leider lassen sich die beiden Autoimmunerkrankungen Typ-1-Diabetes und Zöliakie bis heute weder durch primärpräventive Maßnahmen verhindern, noch sind sie heilbar. Die wesentliche Voraussetzung im Hinblick auf dieses Ziel, ist die vollständige Aufklärung der immunologischen Grundlagen der Entstehung dieser Erkrankungen. Unabhängig davon sollten aus präventivmedizinischer, gesundheitspolitischer und ethischer Sicht aber im Rahmen der Sekundärprävention sinnvolle und praktikable Methoden in der Früherkennung dieser beiden Erkrankungen realisiert werden. Nur dann können therapeutische Maßnahmen rechtzeitig ergriffen werden, um die Sekundärkomplikationen des Typ-1-Diabetes und der Zöliakie zu verhindern oder zumindest zu verzögern. Die einleitende Ausführung über den derzeitigen Status der Immundiagnostik zeigt, dass bereits vernünftige und realistische Ansätze zur methodischen Vereinfachung eines Diabetes- bzw. Zöliakie-Risikoscreenings gemacht wurden, jedoch im Hinblick auf ein gross angelegtes Risikoscreening noch verbessert werden können.

In diesem Kontext wird in der vorliegenden Arbeit das Prinzip eines kombinierten Nachweises der beiden Antikörper GADA und IA2A aufgegriffen und in einer bislang noch nicht evaluierten Risikogruppe (erstgradig Verwandte von Typ-1-Diabetikern) angewandt. Konkret soll die vorliegende Arbeit hinsichtlich dieser Methode folgende Fragen beantworten:

1. Kann im Hinblick auf ein kostengünstiges und relativ einfaches Diabetesrisikoscreening (auf Populationsebene) ein Radioligandenbindungsassay (RBA) etabliert werden, der reproduzierbar und spezifisch den gleichzeitigen Nachweis von Autoantikörpern gegen die Glutamatdecarboxylase (GADA) und eine Tyrosinphosphatase (IA2A) erlaubt? Und lässt sich dieser Assay mit den gleichen Ansprüchen auch mit Kapillarblut durchführen?
2. Wie sind die Verteilung und Häufigkeit der Antikörpertiter gegen GAD und IA2 einer standardisierten kombinierten Nachweismethode bei erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern?
3. Wie ist der prädiktive Wert für die Voraussage eines Typ-1-Diabetes mit einer standardisierten kombinierten Nachweismethode von GADA und IA2A?
4. Wie sensitiv ist dieser Test im Vergleich zu bereits etablierten Screeningstrategien auf Insellzell-Autoantikörper (ICA) und Insulinautoantikörper (IAA)?
5. Und lässt sich das Diabetesrisiko für Verwandte ersten Grades durch den kombinierten Test in Verbindung mit weiteren Markern wie: Alter, Verwandtschaftsstatus, IAA-Status und dem Ergebnis eines intravenösen Glucose Toleranztests (IVGTT) noch genauer abschätzen?

Da erstens Kinder diabetischer Eltern ebenfalls ein erhöhtes Diabetesrisiko haben und da zweitens die Erkrankungen Typ-1-Diabetes und Zöliakie gehäuft gemeinsam auftreten, ist zu vermuten, dass für Kinder von Diabetikern auch ein gewisses Risiko für die Entwicklung einer Zöliakie besteht. Nachdem dazu bisher keine Studien zur Verfügung stehen, soll in der vorliegenden Arbeit der Antikörperstatus gegen das neue Zöliakie-spezifische Antigen tissue-Transglutaminase-C (tTGC) analysiert und die Bedeutung dieser Antikörper für die Prädiktion einer Zöliakie in diesem Kollektiv charakterisiert werden. Darüberhinaus wird erstmals in einer Verlaufsbeobachtung die Abfolge und das zeitliche Auftreten Zöliakie-assoziiierter Antikörper ermittelt, um hierdurch nähere Erkenntnisse bzgl. der Pathogenese dieser Autoimmunerkrankung zu erlangen.

Bezüglich dieses Studienziels setzt sich die vorliegende Arbeit mit den folgenden weiteren Fragestellungen auseinander:

6. Lässt sich eine standardisierte Nachweismethode in Form eines RBA etablieren, die reproduzierbar und spezifisch Autoantikörper gegen tTGC misst?
7. Wie ist die Prävalenz von Autoantikörpern der Immunglobulinklasse IgG gegen tTGC bei Kindern Typ-1-diabetischer Eltern im Vergleich zu Patienten mit Typ-1-Diabetes und gesunden Kontrollpersonen?
8. Wie hoch ist die Prävalenz der Zöliakie-assoziierten Antikörper tTGC, Endomysiumantikörper (EMA) und Antigliadinantikörper (AGA) bei Kindern diabetischer Eltern?
9. Lässt sich auch bei Kindern diabetischer Eltern ein Zusammenhang zwischen der Prävalenz Zöliakie-assoziiierter Antikörper und dem Alter feststellen?
10. Hat die Stilldauer einen Einfluss auf die Prävalenz der tTGCA?
11. Welche Ergebnisse zeigt die prospektive Untersuchung dieses Kollektivs im Hinblick auf die zeitliche Entwicklung Zöliakie-assoziiierter Antikörper und welche Relevanz für die Erkrankung an Zöliakie ist damit verbunden?
12. Besteht ein Zusammenhang zwischen Zöliakie- und Diabetes-assoziierten Antikörpern?

Die Untersuchungen sollen zur Entwicklung präventivmedizinischer Massnahmen in der Frühdiagnostik und zu näheren Erkenntnissen in der Pathogenese der beiden Autoimmunerkrankungen beitragen.

2 UNTERSUCHUNGSGRUPPEN UND METHODEN

2.1 Untersuchungsgruppen

2.1.1 Untersuchungsgruppen für den GADIA2-combi

2.1.1.1 Kontrollpersonen

Zur Etablierung des Normalbereichs für den kombinierten Antikörpertest dienten 105 gesunde Personen mit negativer Familienanamnese hinsichtlich eines Typ-1-Diabetes (Durchschnittsalter \pm SD: 27,7 \pm 7,8 Jahre; Range: 19,2-52 Jahre). (Das Untersuchungsmaterial stammte grösstenteils aus einem bereits vorhandenen Normalkollektiv der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. A.-G. Ziegler am Institut für Diabetesforschung.) Alle Kontrollpersonen wurden zusätzlich in separaten Tests auf die Antikörper GAD und IA2 getestet. Bei 11 der 105 Kontrollpersonen wurde darüber hinaus Kapillarblut (nach Plasmagewinnung) kombiniert auf GAD- bzw. IA2-Antikörper getestet.

2.1.1.2 Neumanifeste Typ-I-Diabetiker

Um die Sensitivität des GADIA2-combi zu testen, wurden 72 neumanifeste Typ-1-Diabetiker (Durchschnittsalter bei Manifestation \pm SD: 20,3 \pm 11,6 Jahre; Range: 1,0-52,4 Jahre) sowohl mit dem GADIA2-combi-Test als auch mit den separaten Antikörper-Tests auf GADA und IA2A untersucht. Die Diagnose des Typ-1-Diabetes erfolgte nach WHO-Kriterien [89, 139]. Die neu erkrankten Patienten wurden im Städtischen Krankenhaus München-Schwabing stationär auf die Insulintherapie eingestellt, wobei die Blutentnahme zur Bestimmung der Antikörper vor Beginn der Insulinbehandlung vorgenommen wurde. Von den 72 Patienten erklärten sich 35 bereit, sich zusätzlich einer Kapillarblutentnahme zu unterziehen. Das daraus gewonnene Plasma wurde ebenfalls im GADIA2-combi-Test eingesetzt und mit den jeweiligen Ergebnissen aus dem Venenblut verglichen.

2.1.1.3 Verwandte ersten Grades von Typ-1-Diabetikern

Seit 1989 wurden am Institut für Diabetesforschung routinemäßig Verwandte ersten Grades von Typ-1-Diabetikern eingeladen an einem Screening-Programm für Diabetes-assoziierte Antikörper teilzunehmen. Bisher wurden 1606 Verwandte (Durchschnittsalter \pm SD: 19,6 \pm 15 Jahre; Range: 0,3-68,7 Jahre) auf Inselzell- und Insulin-Autoantikörper untersucht. Von den 1606 Verwandten waren 46 Antikörper-positiv (ICA- und/oder IAA-positiv). In der vorliegenden Studie wurden diese 1606 erstgradig Verwandte von Typ-1-Diabetikern zusätzlich auf GAD- bzw. IA2-Antikörper in dem kombinierten Verfahren getestet. Blutproben, die einen erhöhten GADIA2-combi-Titer aufwiesen, wurden in einem weiteren

Testdurchgang separat auf die beiden Antikörper GADA und IA2A getestet. Antikörperpositive Personen wurden um eine weitere Serumprobe gebeten und bei bestätigtem Befund aufgefordert, sich einem oralen Glukose Toleranz Test (OGTT) zu unterziehen, um die Stoffwechsellage zu kontrollieren (Median Zeitraum der Verlaufsbeobachtung: 5,6 Jahre). Alle Antikörper-negativen Verwandte wurden im Juli 1997 schriftlich oder telefonisch um eine weitere Serumprobe gebeten. Im Dezember 1997 waren insgesamt 684 Rückmeldungen eingegangen, wobei 683 Verwandte bestätigten, bisher nicht an einem Typ-1-Diabetes erkrankt zu sein (Median Beobachtungszeitraum: 6,6 Jahre). Die Mutter eines eineiigen Typ-1-diabetischen Zwillingspaars gab an, sieben Jahre nach der Antikörperuntersuchung an einem Typ-1-Diabetes erkrankt zu sein (Alter bei Diagnose: 57 Jahre; negativer Antikörperbefund 9 Monate nach Diagnose).

2.1.1.4 Ein- und Ausschlusskriterien

Blutproben von Verwandten ersten Grades von Typ-1-Diabetikern wurden nur in Verbindung mit einem beantworteten Fragebogen getestet (Anhang Seite A1-A2). Aus diesem Fragebogen musste deutlich der Verwandtschaftsgrad hervorgehen, um sicher zu stellen, dass eine Verwandtschaft ersten Grades vorlag.

Einschlussbeschränkungen hinsichtlich des Alters wurden nicht gemacht. Den neu entdeckten Typ-1-Diabetikern wurde vor Beginn der Insulintherapie Blut abgenommen. Alle Patienten hatten freiwillig in Verbindung mit einem Aufklärungsgespräch in die Untersuchung eingewilligt.

2.1.2 Untersuchungsgruppen für den tissue-Transglutaminase-C-Assay

2.1.2.1 Kontrollpersonen

Zur Etablierung des Normalbereichs für den tissue-Transglutaminase-C (tTGC)-Assays wurden insgesamt 209 gesunde Personen mit negativer Familienanamnese hinsichtlich einer Zöliakie und eines Typ-1-Diabetes (Durchschnittsalter \pm SD: $31,7 \pm 10,6$ Jahre; Range: 2,0-57,05) getestet. (Das Untersuchungsmaterial stammte überwiegend aus einem bereits rekrutierten Normalkollektiv von Frau Prof. Dr. A.-G. Ziegler am Institut für Diabetesforschung.)

2.1.2.2 Neumanifeste Typ-1-Diabetiker

Als weiteres Kontrollkollektiv für den tTGC-Test dienten 99 Personen mit neuentdecktem Typ-1-Diabetes (Durchschnittsalter \pm SD: $11,9 \pm 6,3$ Jahre; Range: 0,35-36,69). Die Diagnose des Typ-1-Diabetes erfolgte nach WHO-Kriterien [89, 139]. Die neumanifesten Patienten wurden im Städtischen Krankenhaus München-Schwabing stationär mit Insulin eingestellt. Bei keinem der 99 Patienten wurde je zuvor die Erkrankung Zöliakie diagnostiziert.

2.1.2.3 Kinder diabetischer Eltern

Seit 1989 wird weltweit erstmals unter der Leitung von Frau Prof Dr. A.-G. Ziegler die deutsche Multizenter-Studie BABY-DIAB zur Untersuchung der Genese der Diabetes-assoziierten Autoimmunität bei Kindern diabetischer Eltern durchgeführt. Diese prospektive Studie von Geburt an sieht vor, 2000 Kinder über einen Zeitraum von mindestens 8 Jahren (im Alter von 9 Monaten, 2, 5 und 8 Jahren) durch Blutentnahmen auf den Antikörperstatus (ICA, IAA, GADA, IA2A), Umweltfaktoren und erstmals auch auf genetische Marker (HLA-Typisierung, Prof. Dr. E. Albert, Labor für Immungenetik, LMU München) hin zu untersuchen. Zum Zeitpunkt 10/98 sind bereits etwa 1900 Kinder in die Studie eingeschlossen.

Aus diesem Kollektiv wurden insgesamt 913 Kinder (795 Studienteilnehmer und 118 Geschwisterkinder) auf Transglutaminase-Antikörper (IgG) untersucht. Die jüngste vorliegende Blutprobe wurde für die Querschnittsuntersuchung auf tTGCA-IgG herangezogen. Es waren dies 569 Serumproben von Kindern im Alter von 2 Jahren, 221 bei 5 Jahren und 123 im Alter von 8 Jahren. Hiervon waren 450 Mädchen und 463 Buben. Teilgenommen an der Studie haben insgesamt 795 Familien, wobei in 222 Fällen der Vater und in 558 Fällen die Mutter den Typ-1-Diabetes hatte und in 15 Fällen beide Elternteile erkrankt waren

Ein Teilkollektiv von insgesamt 520 Kindern wurde zusätzlich auf Endomysium-Antikörper (EMA) und Antigliadin-Antikörper (AGA) der Klassen IgG und IgA getestet. Dies waren alle 123 Kinder im Alter von 8 Jahren, alle 221 im Alter von 5 Jahren und 176 (der insgesamt 569) Kinder bei 2 Jahren. In der Gruppe der 2-jährigen Kinder wurden jedoch nur 162 blind getestet, die übrigen 14 Kinder wurden aufgrund eines positiven Antikörper-Befundes im tTGCA-IgG-Tests auf EMA und AGA getestet.

Bei einem positivem tTGCA-IgG-Testergebnis, nachweisbaren EMA oder AGA wurden alle vorherigen konsekutiven Blutproben auf tTGCA (IgG und IgA), EMA und AGA (IgG und IgA) getestet. Bei gleichzeitigem Vorliegen von tTGCA und EMA – und nach Bestätigung des Befundes anhand einer weiteren aktuellen Blutprobe – wurde eine Dünndarmbiopsie veranlasst. Eine manifeste Zöliakie wurde nach den geltenden Kriterien der European Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition diagnostiziert [123]. Bei keinem der untersuchten 913 Kinder wurde weder vor dem Einschluss in die Studie jemals die Erkrankung Zöliakie diagnostiziert, noch hatten die Kinder spezifische Symptome einer Zöliakie.

2.1.2.4 Ein- und Ausschlusskriterien

Blutproben von Kindern diabetischer Eltern wurden nur nach einer Einverständniserklärung der Eltern und in Verbindung mit beantworteten Fragebogen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt auf Zöliakie-Antikörper getestet (genehmigt durch die

Ethikkommission der Bayerischen Landesärztekammer, Nr. 95357). Die Fragebögen sind im Anhang (Anhang Seite A3-A16) aufgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Nachweis von Autoantikörpern beim Typ-1-Diabetes

2.2.1.1 Kombiniertes Nachweis von Autoantikörpern gegen GAD und IA2 (GADIA2-combi) in Venen- und Kapillarblut

Der GADIA2-combi-Test in venösem Serum und kapillärem Plasma basiert methodisch auf dem Design des Radioliganden-Bindungsassays zum separaten Nachweis von GAD- bzw. IA2-Antikörpern [50, 92, 99] (siehe Kapitel 2.2.1.3). Die cDNA für GAD65 wurde im Vektor pEX9 (Dr. A. Lernmark, Karolinska Hospital, Stockholm, Schweden) und die cDNA für IA2ic im Vektor pGEM-4Z (Dr. M. R. Christie, King's College, London, UK) kloniert. Transkription und Translation der beiden Antigene erfolgte *in vitro* in Anwesenheit von ³⁵S-Methionin (Amersham, UK) mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (Promega, Madison, WI). Die in dem Test eingesetzten 96-Well-Filtrationsplatten (*Multiscreen-DV*; Millipore, Eschborn) wurden vor ihrer Verwendung mit BSA überzogen. Hierfür wurden die Filter zunächst mit je 100 µl *Plain-Puffer* benetzt (150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,4). Nach einer Stunde wurde der Puffer entfernt und je 200 µl des sogenannten *Coating-Puffers* (150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,4, 1 % BSA) zugegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurden die Filter zweimal mit je 200 µl *Tween-Puffer* (150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,4, 0,05 % Tween 20) gewaschen und schliesslich mit je 250 µl Waschlösung (150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,4, 0,15 % Tween 20, 0,1 % BSA) pro Well befüllt. Die Platten wurden im Kühlschrank bei 4 °C bis zu ihrer Verwendung (innerhalb 7 Tage) gelagert. Direkt vor der Verwendung wurden die Platten nochmals mit je 200 µl Waschlösung gewaschen. Jeweils 15000 cpm ³⁵S-IA2 und ³⁵S-GAD wurden zusammen in insgesamt 50 µl IMP-Puffer (Tris-gepufferte Natriumchloridlösung mit Tween: 150 mM NaCl, 20 mM Tris, 0,15 % Tween 20, 10 mM Benzamidine, 0,1 % Aprotinin, 0,1 % BSA; pH 7,4) mit 2 µl Patientenserum in Reaktionsgefässen (*Safe-Lock 0,5 ml*, Eppendorf, Hamburg) über Nacht bei 4° C auf einem Rotor inkubiert. Die über Nacht gebildeten Immunkomplexe wurden in Doppelansätzen an Protein A Sepharose (*Protein A Sepharose® CL-4B*, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) immobilisiert. Hierfür wurden 50 µl einer 50%igen vorgequollenen Protein A Sepharose und 50 µl des präzipitierten Serums in Duplikaten in jedes Well pipettiert. Nach 45 Minuten Inkubation bei 4 °C unter leichtem Rütteln, wurden die Immunpräzipitate mehrmals intensiv gewaschen. Hierfür wurden jeweils 150µl Waschlösung in die Wells gegeben, die gesamte Platte kurz gerüttelt und mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Anschließend

wurden die gebundene Radioaktivität nach Zugabe von 50 µl Szintillationsflüssigkeit (*Microscint40*, Packard) im Szintillations-Counter (*Top-Count*, Packard) gemessen. Ein GADA- und IA2A-positives Serum (Positiv-Kontrolle) und ein Serum negativ für beide Antikörper wurden als interner Standard in jedem Test mitgeführt. Die GAD- und IA2-Aktivität innerhalb der gebundenen Immunkomplexe wurden als Index (Units) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Index} = \frac{\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Negativ-Kontrolle}}}{\text{cpm}_{\text{Positiv-Kontrolle}} - \text{cpm}_{\text{Negativ-Kontrolle}}} \times 100$$

cpm = Mittelwert der "counts per minute" aus Doppelbestimmungen

2.2.1.2 Gewinnung von Kapillarblut

Für die Gewinnung von Kapillarblut wurde den Patienten durch einen Stich (mittels Lanzette oder Stechhilfe) aus der Fingerbeere oder aus dem Ohrläppchen mit einem heparinisierten Kapillargefäß (Sarstedt Mikrovette GB 300; Nümbrecht-Rommelsdorf) ca. 200 µl Blut entnommen. Das Kapillargefäß wurde dann für 10 Minuten bei 5000 Upm zentrifugiert und der Plasmaüberstand abgenommen. Anstelle der 2 µl Patientenserum im GADIA2-combi in venösem Blut wurden hier 2 µl Plasma eingesetzt.

2.2.1.3 Nachweis von Autoantikörpern gegen GAD und IA2

Die gegen Glutamatdecarboxylase (GAD) und eine Tyrosinphosphatase (IA2) gerichteten Antikörper wurden jeweils anhand eines quantitativen Radioliganden-Bindungsassays (RBA) im Patientenserum nachgewiesen [50, 92, 99]. Die cDNA für GAD wurde im Vektor pEX9 (Dr. A. Lernmark, Karolinska Hospital, Stockholm, Schweden) und die cDNA für IA2 im Vektor pGEM-4Z (Dr. M.R. Christie, King's College, London, UK) kloniert. Die Antigene wurden jeweils *in vitro* mittels eines kommerziell erhältlichen Kits (Promega, Madison, WI) in Anwesenheit von ³⁵S-Methionin (Amersham, UK) transkribiert und translatiert. Durch Präzipitation mit 10%iger Trichloressigsäure wurde die in 2 µl Antigen eingebaute Radioaktivität in 2 ml Szintillationsflüssigkeit (*UltimaGold*, Packard) in einem Liquid-Szintillationscounter (*1219 Rackbeta*, Wallac, UK) evaluiert. Aliquote mit ca. 15000 cpm des jeweiligen Antigens wurden in IMP (Immuno-Precipitation) -Puffer (trisgepufferte Natrium-Chlorid-Lösung mit Tween: 150 mM NaCl, 20 mM Tris, 0,15 % Tween 20, 10 mM Benzamidine, 0,1 % Aprotinin, 0,1 % BSA; pH 7,4) mit 2 µl Patientenserum bei 4 °C über Nacht auf einem Rotor inkubiert. Am nächsten Tag wurden Duplikate der gebildeten Immunkomplexe in 96-well Filtrationsplatten (0,45 µm) (*Multiscreen*, Millipore, Bedford,

MA) an 50 µl vorgequollene 50%ige Protein A Sepharose (*Protein A Sepharose® CL-4B*, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) gebunden. Nach 45 Minuten Inkubation unter leichtem Rütteln mit Waschpuffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,4, 0,005 % Tween 20, 0,1 % BSA) wurden die Platten mehrmals intensiv gewaschen. Anschließend wurde die gebundene Radioaktivität nach Zugabe von 50 µl Szintillationsflüssigkeit (*Microscint40*, Packard) in einem Szintillationscounter gemessen (*Top-Count*, Packard, Meriden, CT). GADA-Titer < 13 Units und IA2A-Titer < 5 Units galten als negativer Befund. Diese Werte entsprachen jeweils der 99. Perzentile eines am Institut für Diabetesforschung getesteten Normalkollektivs [99].

2.2.1.4 Nachweis von Inselzell-Autoantikörpern (ICA)

ICA wurden durch eine indirekte Immunfluoreszenztechnik auf humanen Pankreasschnitten nachgewiesen [15]. Hierfür wurden 5 µm starke Pankreas-Gefrierschnitte der Blutgruppe 0 mit Aceton fixiert, mit unverdünntem Testserum überschichtet und für 30 Minuten in feuchter Umgebung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Gefrierschnitte einmal kurzzeitig und dann für 30 Minuten in PBS (phosphatgepufferte Natriumchlorid-Lösung: 40 g/l NaCl, 5,75 g/l Na₂HPO₄, 1 g/l KH₂PO₄, 1 g/l KCl; pH 7,4) gewaschen und anschließend getrocknet. Um die gebundenen Immunkomplexe sichtbar zu machen, wurden die Schnitte mit einem mit PBS-Puffer verdünntem fluoreszenzkonjugierten Ziegen-Antikörper gegen humanes IgG (*FITC goat-anti-human IgG*, ATAB, Stillwater, USA) überschichtet und in feuchter Umgebung und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem kurzen und einem 30-minütigen Waschschriff mit PBS wurden die Objektträger gesäubert, getrocknet und mit Eindeckmedium (*Perma Flour* Immunotech, Marseille, Frankreich), überschichtet und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Ein positiver ICA-Befund wurde dann gestellt, wenn die Inselzellen deutlich grün gefärbt sichtbar waren. Positive Serumbefunde wurden zusätzlich in PBS-Puffer ausstitriert. Die Endpunkttiter wurden in Juvenile Diabetes Foundation Units (JDF-U) angegeben, wobei die Detektionsgrenze 5-10 JDF-U betrug [99].

2.2.1.5 Nachweis von Insulin-Autoantikörpern (IAA)

Der Nachweis der IAA erfolgte durch einen kompetitiven Radioimmunoassay [144]. Eine Serumprobe wurde in Duplikaten mit Phosphatpuffer und BSA(bovines Serumalbumin)-Phosphatpuffer 1 Stunde inkubiert. Nach Zugabe von ¹²⁵Jod-markiertem Insulin (Hoechst) folgte eine 7-tägige Inkubation. Die Immunkomplexe wurden nach Zugabe von PEG (Polyäthylenglykol) 30 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Präzipitate mit PEG gewaschen und das gebundene ¹²⁵Jod-Insulin in einem γ-Counter gemessen. Die laborinterne obere Normgrenze für IAA betrug 49 nU/ml (Mittelwert + 4SD) [99].

2.2.2 Metabolische Parameter beim Typ-1-Diabetes

Als metabolische Parameter wurden bei einigen Studienteilnehmern die orale und die intravenöse Glukosetoleranz ermittelt. Hierfür wurde bei den Patienten zunächst ein Nüchternblutzucker bestimmt. Zur Messung der oralen Glukosetoleranz (oraler Glukosetoleranztest = OGTT) wurden den Patienten 400 ml Glukoselösung (= 75 g Glukose) verabreicht. Während des Tests waren die Patienten unter Ruhebedingungen. Zusätzlich zum Nüchternwert erfolgten weitere Blutentnahmen (Kapillarblut) zur Blutzuckerbestimmung nach 60 und 120 Minuten [143].

Die intravenöse Glukosetoleranz (intravenöse Glukosetoleranztest = IVGTT) wurde nach einem international standardisierten Protokoll [118], nach drei Tagen normaler bis kohlenhydratreicher Kost und mindestens 10-stündiger Nahrungskarenz (inkl. Nikotin und Koffein) durchgeführt. Den Patienten wurde mit einer Venenverweilkanüle über eine Cubitalvene ein Zugang gelegt, der mit einer langsam tropfenden isotonischen Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) offen gehalten wurde. Nach der Entnahme von ca. 20 ml Nüchternblut wurde eine 25%ige Glukoselösung in einer Menge von 0,5 g/kg Körpergewicht (max. 35 g) innerhalb von drei Minuten injiziert. Weitere Blutentnahmen folgten nach 1, 3 und 5 Minuten.

Die Insulinspiegel im Serum der entnommenen Blutproben wurden schließlich mit Hilfe eines Doppel-Antikörper-Radioligandenbindungsassays nach einer Methode von Soeldner et al. [114] ermittelt. Die Summe der 1- und 3-Minuten-Insulinwerte wurde als Index der frühen Phase der Insulinsekretion verwendet und die Ergebnisse als Perzentilen der Kontrollpersonen dargestellt. Als pathologisch wurden Werte unterhalb der 1. Perzentile ($\leq 49 \mu\text{U/ml}$) angesehen.

2.2.3 Nachweis von Auto-Antikörpern bei Zöliakie

2.2.3.1 Nachweis von tissue-Transglutaminase-C-Antikörpern (tTGCA) der Klassen IgG und IgA

Der Nachweis der tissue-Transglutaminase-C-Antikörper erfolgte nach dem Prinzip eines Radioliganden-Bindungsassays (RBA). Humane tTGC wurde aus der RNA humaner Pankreaszellen kloniert [10]. Das PCR-Produkt wurde dann direkt im pGEM-T-easy-Vektor unter Kontrolle des SP6 Promoters (V. Lampasona, San Raffaele Hospital, Meiland, Italien) kloniert. Das Vorgehen der radioaktiven Markierung des Antigens tTGC ist analog zu der Markierung der beiden Antigene GAD und IA2 (siehe 2.2.1.3).

In 96-deep-well-plates (Beckman, Fullerton, CA, USA) wurden jeweils 2 μl Testserum in Duplikaten mit 15000 cpm tTGC in 25 μl TBST (150 mM NaCl, 1 % Tween 20, 50 mM Tris, pH 7,4) auf Eis angesetzt. Nach intensivem Schütteln und Zentrifugation bei 2200 Upm für 5 Minuten wurde der Ansatz bei 4 °C abgedeckt über Nacht inkubiert. Die gebildeten Immunkomplexe wurden am nächsten Tag durch Zugabe von 2 mg vorgequollener Protein A-Sepharose (*Protein A Sepharose® CL-4B*, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) in 50

μl TBST pro well nach einer Stunde Inkubationszeit (bei 4 °C unter Schütteln) gebunden. Nach intensivem Waschen mit TBST (5 mal mit je 800 μl) und jeweils anschließender Zentrifugation bei 2200 Upm für 5 Minuten wurde das Pellet in Microtiter-Platten (*Optiplates*, Packard, Meriden, CT) überführt und mit 150 μl Szintillationsflüssigkeit (*Microscint4*, Packard) pro Well 30 Minuten bei 4 °C geschüttelt. Die gebundene Radioaktivität wurde im Szintillations-Counter (*Top-Count*, Packard) über 5 Minuten je Well gemessen.

Für den Nachweis der tTGC-IgA-Antikörper wurde die Protein A Sepharose durch 4 μl Anti-IgA kovalent gebundene Agarose-Beads (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) als Immunkomplex-Bindungsmedium ersetzt. Der Test entspricht ansonsten exakt dem des tTGCA-IgG-Nachweises.

2.2.3.2 Nachweis von Endomysium-Antikörpern (EMA) der Klasse IgA

Die Bestimmung der Endomysium-Antikörper der Klasse IgA erfolgte im Labor von Prof. Dr. M. Stern der Universitäts-Kinderklinik Tübingen. Es wurde ein kommerziell erhältlicher indirekter Immunfluoreszenzkit (Euroimmun, Gross Grönau, Deutschland) verwendet. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe von Gewebeschnitten des Darmes von Primaten. Auf Reagenzträger wurden jeweils 25 μl mit Phosphatpuffer (pH 7,2) verdünnte (1:5) Serumproben pipettiert und die mit den Darmgefrierschnitten beschichteten Objektträger (= Biochip) in den so entstandenen Tropfen eingetaucht. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde der Objektträger mit Phosphatpuffer abgespült und für eine Minute in einer Küvette mit Phosphatpuffer gewässert. Die gereinigten Felder des Reagenzträgers wurden mit je 20 μl Antiserum (Fluor-Isothiocyanat(FITC)-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 weiteren 30 Minuten Inkubationszeit wurde der Objektträger abgespült und mit Phosphatpuffer gewaschen, danach mit Phosphatgepuffertem Glycerin (pH 8,4) eingedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Bei einem positiven Befund war das extrazelluläre Bindegewebe der Dünndarmmukosa deutlich grün gefärbt sichtbar. Positive Seren wurden zusätzlich mit PBS-Puffer austitriert und die Endpunkttiter in Units angegeben. Der Grenzwert für Positivität lag bei 5 Units [119]. Ein Kind mit einem nachgewiesenen IgA-Mangel wurde auf EMA-IgG getestet. Für diesen Nachweis wurde anstelle des Anti-Human-IgA-Antikörpers der Ziege ein (FITC-markierter) Anti-Human-IgG-Antikörper vom Hasen (*Dia-Sorun*, Stillwater, MN, USA) verwendet.

2.2.3.3 Nachweis von Antigliadin-Antikörpern (AGA) der Klassen IgA und IgG

Antigliadin-Antikörper der Klasse IgA und IgG wurden im Institut von Prof. M. Stern der Universitäts-Kinderklinik Tübingen bestimmt. Hierfür wurde der kommerziell erhältliche ELISA der Firma Euroimmun (Gross Grönau, Deutschland) verwendet. 10 μl des Testserums wurden mit 1 ml Probenpuffer in einem Reaktionsgefäß verdünnt. Je 100 μl verdünnte

Serumprobe, Kalibrierungsserum sowie der Positiv- und Negativkontrolle wurden in die mit Antigen (aus Weizengluten isoliertes und gereinigtes Gliadin) beschichteten Reagenzgefäße pipettiert und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert. Die Reagenzgefäße wurden anschließend entleert und mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen und schließlich wieder vollständig entleert. Je 100 µl des Peroxidase-markierten Anti-Human-IgA- bzw. Anti-Human-IgG(Kaninchen)-Antikörpers wurden in die Reagenzgefäße pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entleerung und einem erneuten Waschschrift zur Entfernung nicht gebundener Detektionsantikörper wurden je 100 µl Chromogon-(Tetramethylbenzidin)/Substrat-(Wasserstoffperoxid)-Lösung in die Reaktionsgefäße gegeben und bei Dunkelheit 15 Minuten inkubiert. Die Reaktion der mit an den Gefäßwänden haftenden Antigliadin-Antikörper wurde dann mit 1 N Phosphorsäure gestoppt. 30 Minuten später erfolgte die photometrische Auswertung bei 450 nm Messwellenlänge und einer Referenzwellenlänge von > 620 nm. Als positiv wurden Seren beurteilt, die 3 SD über dem Mittelwert eines gesunden Kontrollkollektivs lagen. Der Cut-off für Positivität der AGA-IgG lag bei > 0,087 Units, der für AGA-IgA bei > 0,034 Units [119].

2.3 Statistik

Die statistischen Auswertungen in dieser Arbeit wurden mit dem Programmpaket SPSS Version 9,0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt. Ergebnisse wurden als Mittelwerte, Mediane oder als Mittelwerte \pm Standardabweichung berechnet. Zwei Stichproben wurden vor dem Vergleich ihrer Mittelwerte entweder graphisch (Histogramm) oder rechnerisch (Kolmogorov-Smirnov-Test) auf Normalverteilungen hin geprüft. Für Korrelationen wurde der parameterfreie Spearman's Rank-Test verwendet. Unterschiede in Häufigkeiten wurden mit dem χ^2 -Test, Unterschiede bzgl. der Titerhöhe mit dem Kruskal-Wallis-H-Test ermittelt. Das kumulative Diabetesrisiko bei Antikörper-positiven Personen wurde durch Lifetable-Analysen untersucht. Für die Berechnung von Antikörpergrenzwerten fand das Verfahren der Q-Q-Normalverteilungs-Plots Anwendung. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde in allen Fällen als signifikant angesehen.

Sensitivität, Spezifität, prädiktiver Wert

Für die Ermittlung der Qualität der verwendeten Antikörpertests wurden verschiedene Meßgrößen verwendet. Die Sensitivität ist eine Maß für die Empfindlichkeit eines Tests, mit der der Anteil der positiven Testresultate an der Gesamtheit der Kranken oder Antikörper-positiven angegeben wird. Je höher die Sensitivität ist, desto besser ist der Test geeignet, gesunde (bzw. Antikörper-negative) von kranken (bzw. Antikörper-positiven) Personen zu diskriminieren. Unter der Spezifität eines Tests versteht man die Eignung des Tests, gesunde bzw. Antikörper-negative Personen auch tatsächlich als gesund zu erkennen. Ein Antikörper-

Test hat eine geringe Spezifität im Hinblick auf eine spezielle Erkrankung, wenn dieser Antikörper z.B. auch bei anderen Erkrankungen auftritt oder gar häufig in der Normalbevölkerung nachweisbar ist. Der prädiktive Wert gibt an, wie groß die Wahrscheinlichkeit dafür ist, bei einem positiven Testergebnis zu erkranken.

3 ERGEBNISSE

3.1 GADIA2-combi

3.1.1 Etablierung des GADIA2-combi

3.1.1.1 Ermittlung des optimalen Mischungsverhältnisses der beiden Antigene GAD und IA2

Die beiden Antigene GAD und IA2 wurden zunächst separat voneinander radioaktiv markiert und die Qualität (cpm/ μ l markiertes Antigen) der jeweiligen Markierung im Scintillations-Counter evaluiert. Hierfür wurden jeweils 2 μ l Antigen (in 2 ml Scintillationsflüssigkeit) im γ -Counter gemessen. Je nach Menge der cpm/ μ l Antigen variierte das in den Test eingesetzte Volumen (in μ l) an Antigen.

Für die Ermittlung des optimalen Mischungsverhältnisses der beiden Antigene GAD und IA2 wurde ein Teilkollektiv der 72 Typ-1-Diabetiker bei Manifestation (siehe Kap. 2.1.1.2) gezielt ausgewählt. Es wurden 6 Seren, die positiv für GADA, 11 Seren, positiv für IA2A, und 14 Seren, die sowohl positiv für GADA als auch für IA2A waren, gewählt. Zusätzlich wurden in jedem Ansatz fünf Antikörper-negative Seren aus dem Normkollektiv (siehe Kap. 2.1.1.3) mitgetestet. Das Mischungsverhältnis der beiden Antigene wurde zunächst so gewählt, dass für 2 μ l Testserum jeweils 20000 cpm des jeweiligen Antigens im Testansatz zur Verfügung standen. Das Verhältnis wurde dann so lange variiert, bis der kombinierte Test den Einzeltests auf GADA bzw. IA2A qualitativ entsprach und so die maximale Sensitivität erreichte. Bei jeweils 15.000 cpm, war der Test am sensitivsten, d. h. alle GADA- bzw. IA2A-positiven, alle doppelt-positiven und alle negativen Seren des Teilkollektivs wurden mit dem kombinierten Test korrekt detektiert und die Höhe der Antikörpertiter des kombinierte Tests korrespondierten mit denen der Einzeltests. Bei einem Ungleichverhältnis derAntigene GAD und IA2 waren falsch positive Antikörper-Titer gegen das im Überschuss vorhandene Antigen häufiger. Bei 20000 cpm je Antigen war der Background (unspezifische cpm) zu hoch, so dass das Verhältnis zwischen der Positiv- und Negativkontrolle zu gering war und so ebenfalls gehäuft falsch positive Ergebnisse gemessen wurden. Bei einer zu niedrigen Konzentration der Antigene (weniger als 15000 cpm je Antigen), wurden dagegen positive Seren teilweise nicht erkannt.

3.1.1.2 Bestimmung des Normbereichs

Mit der Bewertung der 105 Kontrollseren mit dem GADIA2-combi ergab sich die in Abbildung 1 dargestellte Häufigkeitsverteilung der GADIA2-combi-Titer. Der Cut-off für

Positivität wurde bei 10 Units festgelegt, was nahezu der 99. Perzentile von 9,89 Units entsprach. Die statistische Analyse mit dem nichtparametrischen Test nach Kolmogorov-Smirnov ergab, dass diese Stichprobe normal verteilt war.

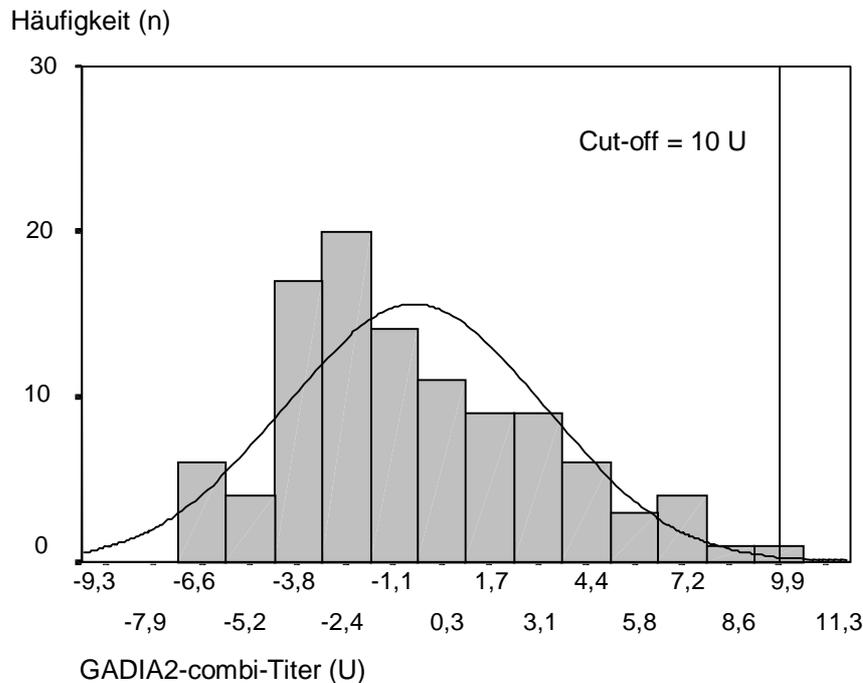


Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung der GADIA2-combi-Titer bei 105 gesunden Kontrollpersonen

3.1.1.3 Reliabilität des GADIA2-combi

Um die Zuverlässigkeit und die Variabilität des GADIA2-combi zu prüfen, wurden 20 Seren aus dem Kollektiv der 74 neumanifesten Typ-1-Diabetiker zwischen drei- und fünfmal getestet (Abbildung 2). Gerade im hohen Titerbereich schwankten die Ergebnisse teilweise erheblich. Die niedrigste Spannweite mit 0,9 Units wurde bei Serum Nr. 1 (Range: 2,2-3,1) und die höchste Spannweite mit 44,2 Units bei Serum Nr. 9 (Range: 35,3-79,5) gemessen. Ungeachtetdessen lagen alle sechs GADIA2-combi-negativen Seren auch bei wiederholten Tests unter dem Cut-off von 10 Units. Auch die positiven Antikörperbefunde der Seren Nr. 7-20 konnten in jedem weiteren Ansatz bestätigt werden.

GADIA2- combi -Titer

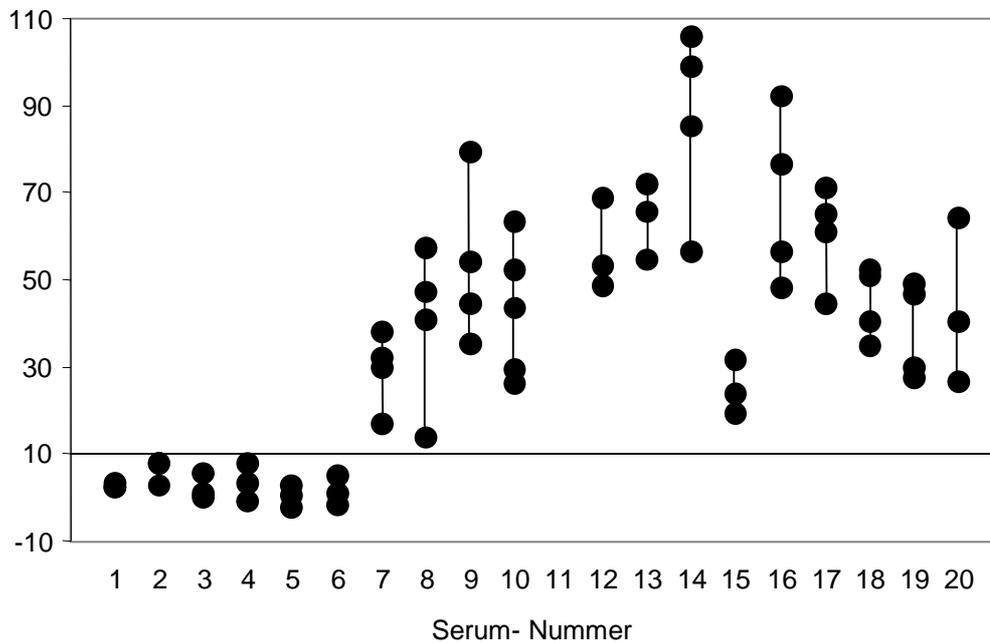


Abbildung 2: Variation der GADIA2-combi Ergebnisse von 20 neuentdeckten Typ-1-Diabetikern (6 Antikörper-negativ, 14 Antikörper-positiv) in wiederholten Testansätzen. Die waagerechte Linie kennzeichnet den Cut-off des GADIA2-combi von 10 Units.

3.1.1.4 Sensitivität des GADIA2-combi

Um die Sensitivität des GADIA2-combi zu prüfen, wurden die GADIA2-combi-Ergebnisse von insgesamt 72 neumanifesten Typ-1-Diabetikern mit den bereits ermittelten GADA- bzw. IA2A-Titern aus den Einzeltests verglichen. Es wurden hierfür 8 Seren sowohl negativ für GADA als auch für IA2A, 15 nur GADA-positive, 16 nur IA2A-positive und 33 sowohl GADA- als auch IA2A-positive Seren, selektiert. Die Ergebnisse des Vergleichs sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Der GADIA2-combi-Test detektierte alle doppelt-negativen und alle doppelt-positiven Seren zu 100%. Jeweils zwei der 15 nur GADA-positiven und zwei der 16 nur IA2A-positiven Seren wurden mit dem GADIA2-combi als falsch negativ getestet. Die GADA- bzw. IA2A-Titer der mit dem GADIA-combi-Test nicht korrekt detektierten Seren sind im Einzelnen in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 1: Sensitivität des GADIA2-combi bei 72 neumanifesten Typ-1-Diabetikern mit unterschiedlichem Antikörperstatus (+ = pos.; - = neg.)

	GADA-/IA2A-	nur GADA+	nur IA2A+	GADA+/IA2A+
Korrekt n (%)	8 (100)	13 (86,6)	14 (87,5)	33 (100)
Falsch negativ n (%)	0	2 (13,3)	2 (12,5)	0
Falsch positiv n (%)	0	0	0	0

Tabelle 2: Testergebnisse der im GADIA2-combi falsch detektierten Seren
U = Antikörpertiter in Units; Cut-off (in U): GADA = 13, IA2A = 5, GADIA2-combi = 10

	Serum-Nr.	GADIA2-combi (U)	GADA (U)	IA2A (U)
GADA – positiv	1	9,8	17	2
	2	8,1	31	2
IA2A - positiv	1	3,8	-1	13,2
	2	4	-2	14

3.1.1.5 Korrelation der GADIA2-combi-Titer mit GADA- und IA2A-Titern im Einzeltest

Die Titer des GADIA2-combi-Tests korrelierten mit den IA2A-Titern in den Seren, die nur für IA2A (n = 16) und für beide Antikörper positiv waren (n = 33) ($R_S = 0,406$; $p = 0,004$). Ebenso korrelierten die GADIA2-combi-Titer stark mit GADA-Titern in nur GADA-positiven (n = 15) bzw. doppelt-positiven Seren (n = 33) ($R_S = 0,492$; $p < 0,001$). Abbildung 3 zeigt die Korrelationen.

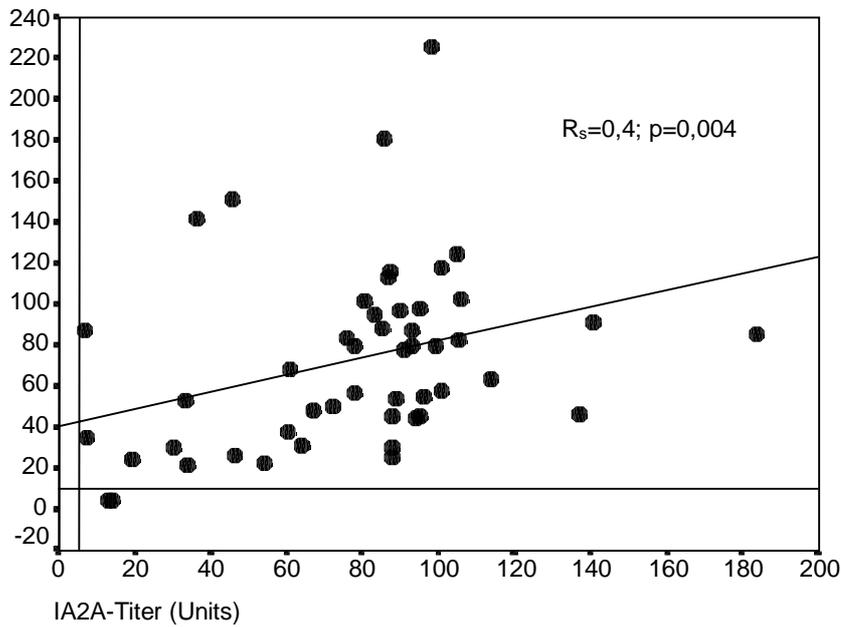
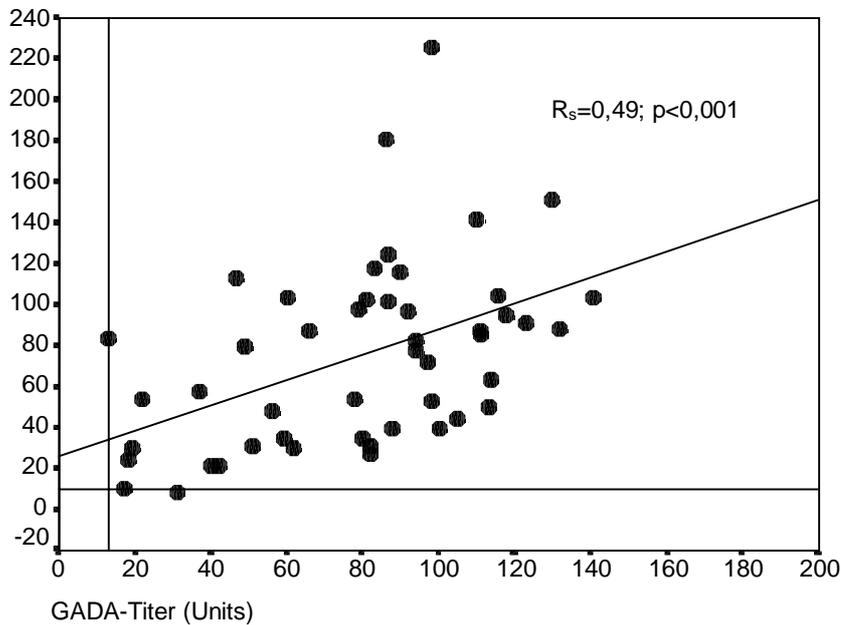
a) GADIA2-combi-Titer (Units)**b)** GADIA2-combi-Titer (Units)

Abbildung 3 a+b: Korrelation von GADIA2-combi-Titern mit a) IA2A-Titern bei insgesamt 49 neuentdeckten Typ-1-Diabetikern bzw. b) mit den GADA-Titern bei insgesamt 48 neuentdeckten Diabetikern. Die senkrechte Linie kennzeichnet jeweils den Cut-off von 10 Units des GADIA2-combi; die waagerechte Linie kennzeichnet in a) den Cut-off von 5 Units des IA2A-Tests und in b) den Cut-off von 13 Units des GADA-Tests.

3.1.1.6 Der additive Effekt

Neuentdeckte Typ-1-Diabetiker, die sowohl positiv für GADA als auch für IA2A waren, hatten signifikant höhere GADIA2-combi-Titer als diejenigen, die nur für einen der beiden Antikörper positiv waren ($p < 0,001$) (Tabelle 3).

Tabelle 3: Mittelwertvergleich der GADIA2-combi-Titer bei Patienten mit nur einem bzw. zwei positiven Antikörpern

Antikörperstatus	Anzahl der Personen	Mittelwert	Standardabweichung
GADA+ oder IA2A+	31	44,09	28,28
GADA+ und IA2A+	33	87,76	44,33

3.1.2 Charakterisierung der GADIA2-combi-Ergebnisse bei Verwandten ersten Grades von Typ-I-Diabetikern

3.1.2.1 Höhe der GADIA2-combi-Titer bei 1606 erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern

Mit der Aufteilung der getesteten 1606 Verwandte in Antikörper-negative, Antikörper-positive (ein oder mehrere Antikörper aus: GADIA2-combi, ICA und IAA) und Verwandte, die einen Diabetes entwickelten, in Relation zur Höhe der GADIA2-combi-Titer, ergab sich die in Abbildung 4 dargestellte Verteilung. Von den 1606 Verwandten wiesen 1519 (94,6 %) Personen keine Antikörper auf und waren auch nicht an Diabetes erkrankt, 63 (3,9 %) waren für einen oder mehrere Antikörpertests positiv, hatten aber keinen Typ-1-Diabetes und 24 (1,5 %) Verwandte (darunter Antikörper-positive bzw. -negative) waren erkrankt.. Der Median der GADIA2-combi-Titer in der Gruppe der Antikörper-negativen Verwandten lag bei 0,2 Units, in der Gruppe der Antikörper-positiven lag er bei 36,6 Units und die Gruppe der an Diabetes erkrankten wie einen Median der GADIA2-combi-Titer von 58,9 Units auf. Die Höhe der GADIA2-combi-Titer unterschied sich in diesen drei Gruppen signifikant (Antikörper-negative vs. Antikörper-positive, Antikörper-negative vs. Diabetiker und Antikörper-positive vs. Diabetiker jeweils $p < 0,001$).

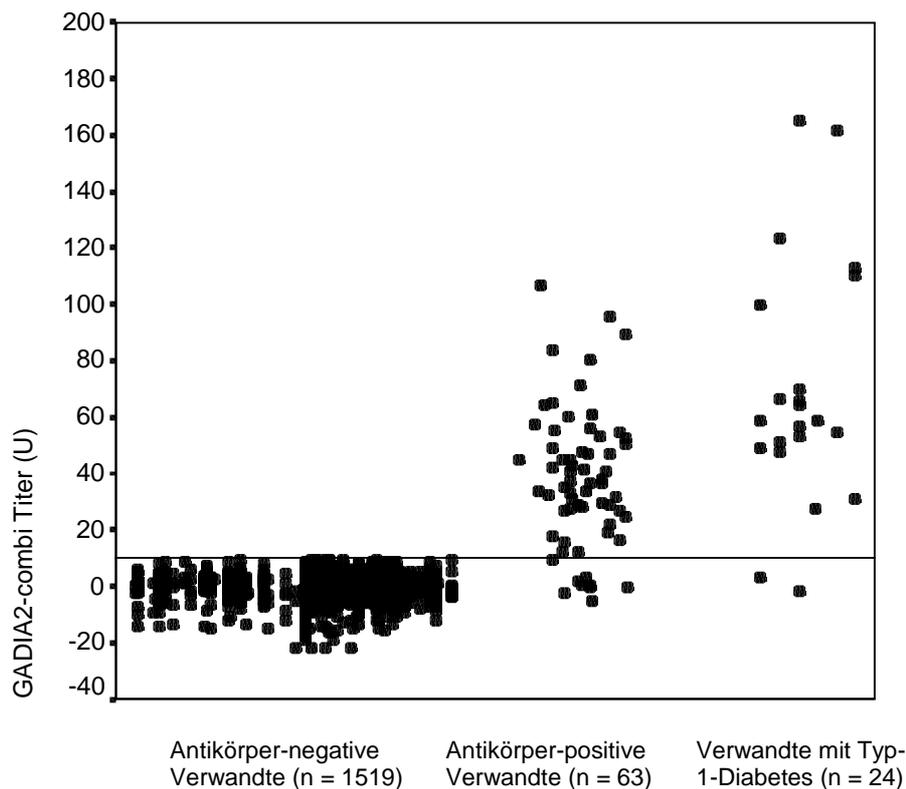


Abbildung 4: Scatterplot der GADIA2-combi-Titer von Antikörper-negativen, Antikörper-positiven und diabetischen erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern. Die waagerechte Linie kennzeichnet den Cut-off von 10 U. ($p < 0,001$ für das Gesamtkollektiv)

3.1.2.2 Antikörperstatus bei 1606 erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern mit Verlaufsbeobachtung

Von 1606 erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern waren insgesamt 86 Personen Antikörper-positiv und 1520 Personen waren Antikörper-negativ. 55 der 86 Antikörper-positiven Verwandten wurden bereits durch die Erstuntersuchung auf die Antikörper ICA und IAA detektiert. Die weiteren 31 Personen wurden allerdings erst durch die Nachuntersuchung mit dem GADIA2-combi-Test als Antikörper-positiv erkannt. Von 55 ICA- und/oder IAA-positiven Patienten waren 46 zusätzlich im GADIA2-combi-Test positiv (14ICA+/IAA-, 10 IAA+/ICA-, 22 ICA+/IAA+). Die Auswertung ist in Abbildung 5 zusammengefasst.

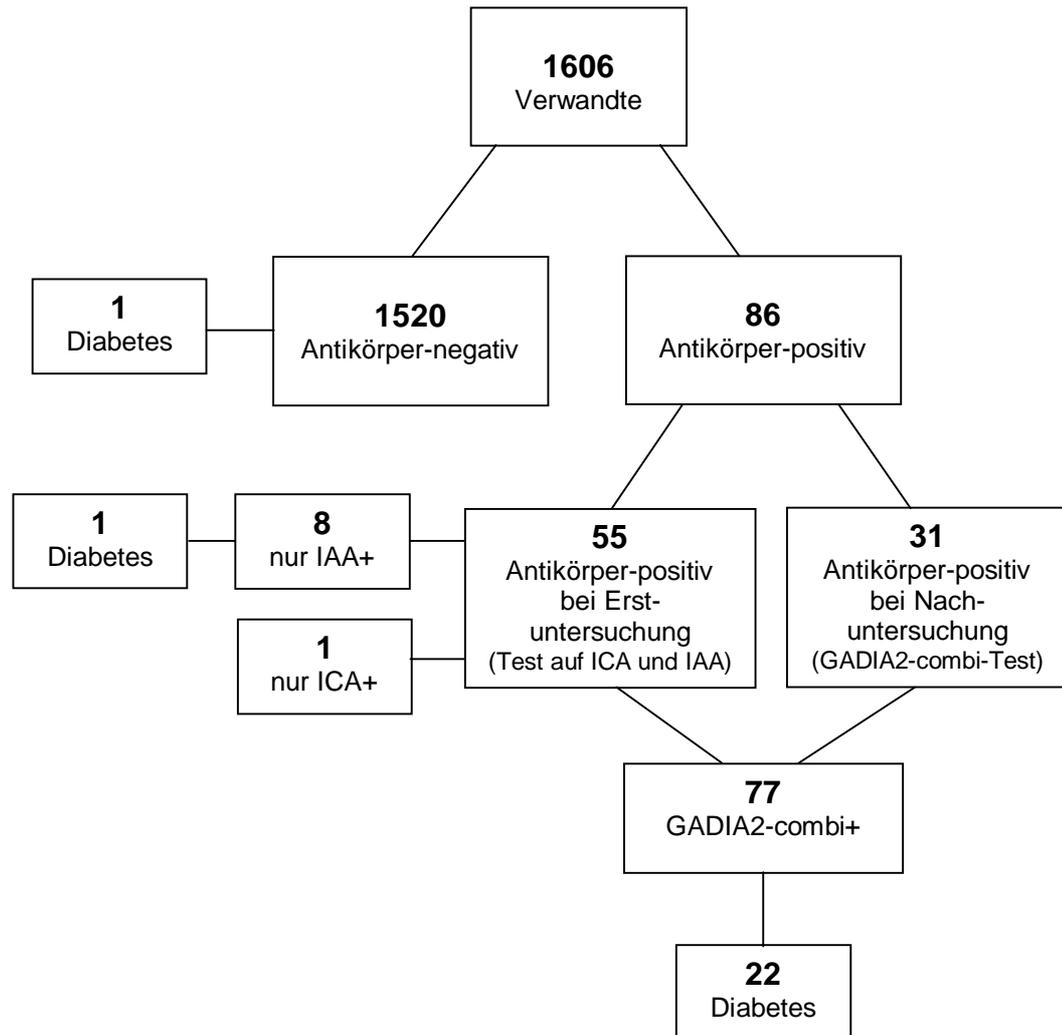


Abbildung 5: Flussdiagramm des GADIA2-combi-Studienkollektivs

Von den 1606 erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern konnte nach einem Beobachtungszeitraum (Median Verlaufsbeobachtung 5,6 Jahre) zur Bestätigung der erhobenen Antikörper-Befunde bei 770 (47,9%) Personen eine weitere Serumprobe untersucht werden. Hiervon waren 684 Personen Antikörper-negativ und 86 Personen persistierend Antikörper-positiv. Von den 684 Antikörper-negativen Verwandten entwickelte eine Person nach einem Beobachtungszeitraum von 7 Jahren einen manifesten Typ-1-Diabetes. Diese Person war in jeder Serumprobe für alle Antikörper negativ. 77 der 86 Antikörper-positiven Verwandten hatten GADIA2-combi-Titer über dem Cut-off von 10 Units. Von den restlichen neun Antikörper-positiven Verwandten hatte eine Person ICA und bei acht Personen ließen sich positive IAA detektieren (Abbildung 5).

3.1.2.3 Antikörperkombination bei 86 Antikörper-positiven erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern

Alle GADIA2-combi-Befunde der 86 Antikörper-positiven Personen wurden durch separate Tests auf GADA bzw. IA2A bestätigt. Hierbei wiesen von den 77 mit dem GADIA2-combi-Test positiv getesteten Personen insgesamt 44 Verwandte positive GADA-Titer, 4 Personen hatten erhöhte IA2A-Titer und 29 waren sowohl gegen GAD als auch gegen IA2 positiv. 46 (59,7 %) der 77 GADIA2-combi positiven Patienten wurden bereits durch ein früheres Screening auf ICA bzw. IAA als Antikörper-positiv identifiziert (14 ICA+/IAA-, 10 IAA+/ICA- und 22 ICA+/IAA+). Insgesamt 31 (40,3 %) getestete Personen hatten positive GADIA2-combi-Titer waren aber negativ für ICA und IAA.

Die Auswertung der Antikörperkombinationen ergab, dass die Mehrzahl (n = 34; 39,5 %) der 86 Antikörper-positiven Personen für nur einen der vier Antikörper (aus ICA, IAA, GADA und IA2A) positiv war. Dies waren überwiegend (n = 25) Antikörper gegen GAD. 22 Personen (25,6 %) waren für zwei Antikörper positiv und 19 Personen für drei (22,1 %). 13 (15,1 %) erstgradig Verwandte hatten alle vier Antikörper. Die Kombination der einzelnen Antikörper ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Antikörperkombinationen bei 86 Antikörper-positiven erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern

GADIA2-combi-Test	Anzahl positiver Antikörper	ICA	IAA	GADA	IA2A	n total (n Diabetes)
–	1 Antikörper	+	–	–	–	1 (0)
–		–	+	–	–	8 (1)
+		–	–	+	–	25 (2)
+	2 Antikörper	+	–	+	–	5 (1)
+		+	–	–	+	2 (1)
+		–	+	+	–	7 (0)
+		–	–	+	+	6 (0)
+	3 Antikörper	+	+	+	–	7 (3)
+		+	–	+	+	7 (5)
+		+	+	–	+	2 (1)
+		–	+	+	+	3 (1)
+	4 Antikörper	+	+	+	+	13 (8)
						$\Sigma = 86 (23)$

3.1.2.4 Typ-1-Diabetes bei Antikörper-positiven erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern

Von 86 erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern, die mindestens in einem Antikörpertest positiv waren (aus ICA, IAA und GADIA2-combi) entwickelten 23 einen manifesten Typ-1-Diabetes (Median Beobachtungszeitraum 5,6 Jahre; Intervall 0,5-8,2 Jahre, Median Alter bei Manifestation 17,6 Jahre; Intervall 1,4-35,4 Jahre). Hiervon waren 22 (95,7 %) positiv im GADIA2-combi-Test. Ein Kind, das einen manifesten Typ-1-Diabetes im Alter von 2 Jahren entwickelte, hatte lediglich Antikörper gegen IAA (siehe Tabelle 4 und Abbildung 5).

Typ-1-Diabetes in Abhängigkeit der Anzahl positiver Antikörper

Personen mit drei bzw. vier Antikörpern entwickelten signifikant häufiger einen Typ-1-Diabetes als Personen, die nur in einem bzw. in zwei Antikörpertests positiv waren ($p < 0,001$). Von 34 Verwandten mit nur einem positiven Antikörper entwickelten 3, von 22 Verwandten mit zwei Antikörpern entwickelten 2 Personen einen Typ-1-Diabetes (8,8% bzw. 10%). Die Hälfte der Personen mit drei positiven Antikörpern (10/19; 52,6 %) und fast zwei

Drittel (8/13; 62,5 %) der Personen mit allen vier Antikörpern erkrankten an Typ-1-Diabetes. Abbildung 6 zeigt diese Auswertung.

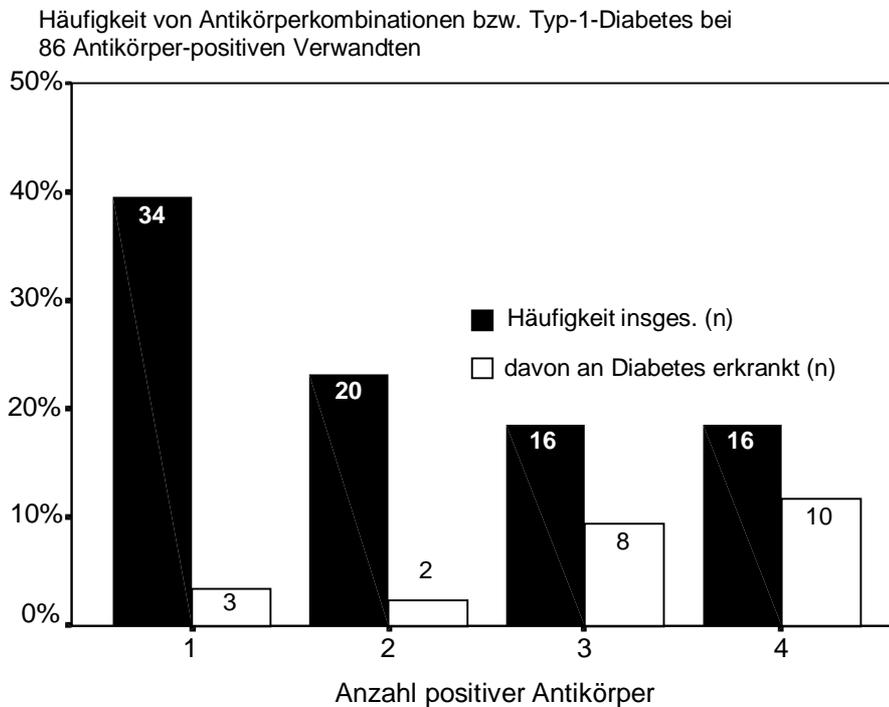


Abbildung 6: Anzahl positiver Antikörper und Diabetesentwicklung bei 86 Antikörper-positiven Verwandten (% beziehen sich immer auf die Gesamtgruppe der 86 Antikörper-positiven erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern)

Typ-1-Diabetes in Abhängigkeit der Antikörperkombination (-spezifität)

GADIA2-combi-positive Verwandte, bei denen sowohl IAA als auch ICA nachgewiesen werden konnten, entwickelten signifikant häufiger einen Typ-1-Diabetes als Patienten die für nur einen dieser Antikörper positiv bzw. für beide negative Werte zeigten ($p < 0,001$, siehe Abbildung 7).

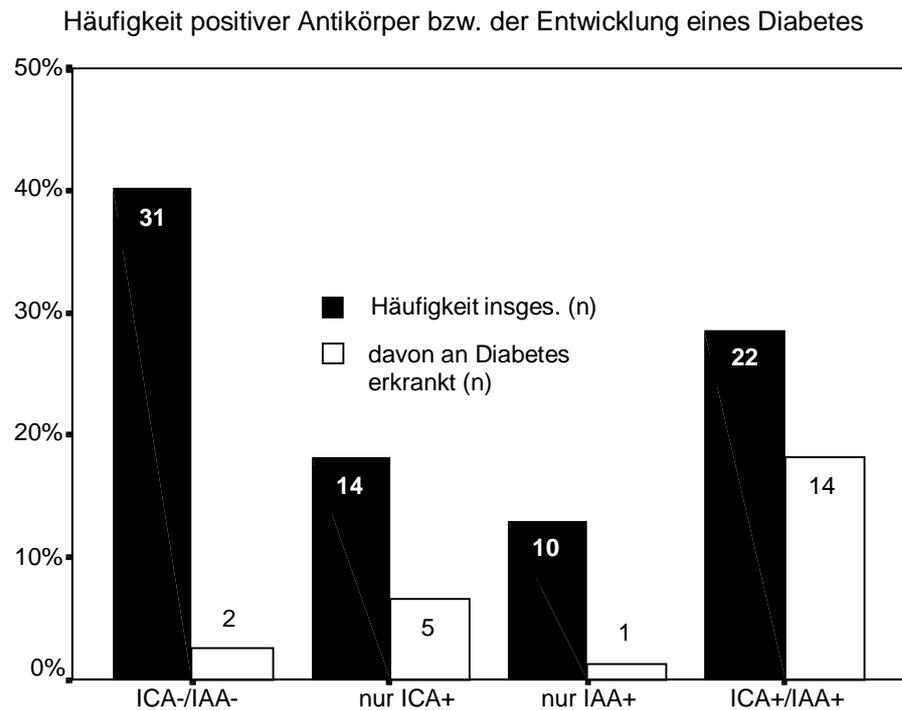


Abbildung 7: Antikörperkombinationen (aus ICA und IAA) und Diabeteserkrankungen bei 77 GADIA2-combi-positiven erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern

Die Analyse der 77 GADIA2-combi-positiven Verwandten im Hinblick auf die Antikörperspezifität (GADA bzw. IA2A) und zusätzliche IAA-Positivität ergab, dass die Mehrheit der GADIA2-combi-positiven Personen, mit GADA in Abwesenheit von IA2A (44/77), keine IAA aufwiesen (30/44). In dieser Gruppe entwickelten jedoch genauso viele Patienten einen Diabetes (3/30; 10 %) wie in der Gruppe der IAA-positiven (3/14; 21 %). Die Relevanz der IAA auf die Entwicklung eines Typ-1-Diabetes zeigte sich erst bei den GADA- und IA2A-positiven Personen. Hier erkrankten mehr als die Hälfte der IAA-positiven Personen (9/16; 56,3 %) im Vergleich zu 38,8 % (5/13) der IAA-negativen. Von den insgesamt nur 4 IA2A-positiven Personen erkrankten interessanterweise zwei unabhängig vom IAA-Status an einem Typ-1-Diabetes (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Häufigkeit von IAA und Diabeteserkrankungen bei 77 GADIA2-combi-positiven erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern in Abhängigkeit der Antikörperspezifität (GADA und/oder IA2A)

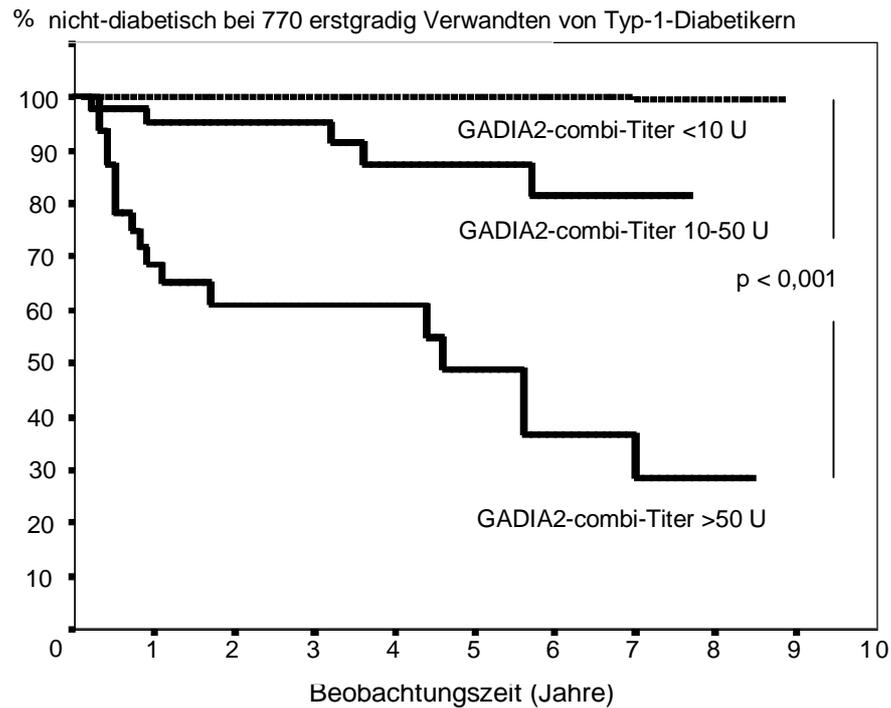
Antikörperkombination	Häufigkeit (n)	Diabetes (n)
GADA+/IA2A-	44	6
IAA+	14	3
IAA-	30	3
GADA-/IA2A+	4	2
IAA+	2	1
IAA-	2	1
GADA+/IA2A+	29	14
IAA+	16	9
IAA-	13	5

3.1.2.5 Prädiktiver Wert (Abschätzung des Diabetesrisikos)

Mittels Lifetable-Analysen wurde unter Berücksichtigung der GADIA2-combi-Titerhöhe und der Antikörperspezifität das Risiko ermittelt, innerhalb von 5 Jahren an Typ-1-Diabetes zu erkranken.

Beziehung zur Titerhöhe

Abbildung 8 zeigt das Risiko für Diabetiker innerhalb von fünf Jahren einen manifesten Typ-1-Diabetes zu entwickeln in Abhängigkeit der Titerhöhe des GADIA2-combi-Tests. Das Risiko für Verwandte ersten Grades von Typ-1-Diabetikern war bei GADIA2-combi-Titern über 50 Units mit 51,2% [95 % CI: 0,6-24] signifikant höher ($p < 0,001$), im Vergleich zu Verwandten mit Titern zwischen 10 und 50 Units (12,5 % [95 % CI: 30-73]) und darunter. Verwandte von Typ-1-Diabetikern mit GADIA2-combi-Titern unter 10 Units hatten ein sehr geringes Risiko innerhalb eines Beobachtungszeitraum von 5 Jahren an einem Typ-1-Diabetes zu erkranken (0,17 % [95 % CI: 0,01-0,5]). Die Analyse der Personen mit Titern über 50 Units ergab ausserdem, dass der überwiegende Teil (22 von insgesamt 33 Personen, 66,7 %) sowohl GADA als auch IA2A in den Einzeltests aufwies.



GADIA2-combi Titer <10U	693	682	670	588	492	432	397	325	171	1
GADIA2-combi Titer 10-50U	44	37	30	27	22	18	14	11		
GADIA2-combi Titer >50U	33	20	14	11	10	8	6	5		

Abbildung 8: Lifetable-Analyse des Diabetesrisikos bei Verwandten ersten Grades von Typ-1-Diabetikern in Abhängigkeit der GADIA2-combi-Titerhöhe. Der Beobachtungszeitraum beginnt mit der ersten Blutprobe und endet bei Diabetesmanifestation oder mit dem Tag des letzten Kontaktes mit der Person. Unter dem Graph ist die Anzahl der Personen mit unterschiedlichen Titerhöhen, die zu dem jeweiligen Zeitpunkt noch in die Studie eingeschlossen waren.

Beziehung zur Antikörperspezifität

Das kumulative Risiko in Abhängigkeit von der Antikörperspezifität (GADA oder/und IA2A) innerhalb von fünf Jahren an einem Typ-1-Diabetes zu erkranken zeigt Abbildung 9. Verwandte ersten Grades von Typ-1-Diabetikern mit GADA und IA2A, hatten ein signifikant höheres Risiko einen Typ-1-Diabetes zu entwickeln als Personen, die lediglich positiv für GADA waren. Das 5-Jahres-Risiko bei Personen mit beiden Antikörpern lag bei 46,5 % [95 % CI: 25-68]; Personen mit GADA hatten ein Risiko von 15,2 % [95 % CI: 2-28] ($p = 0,006$).

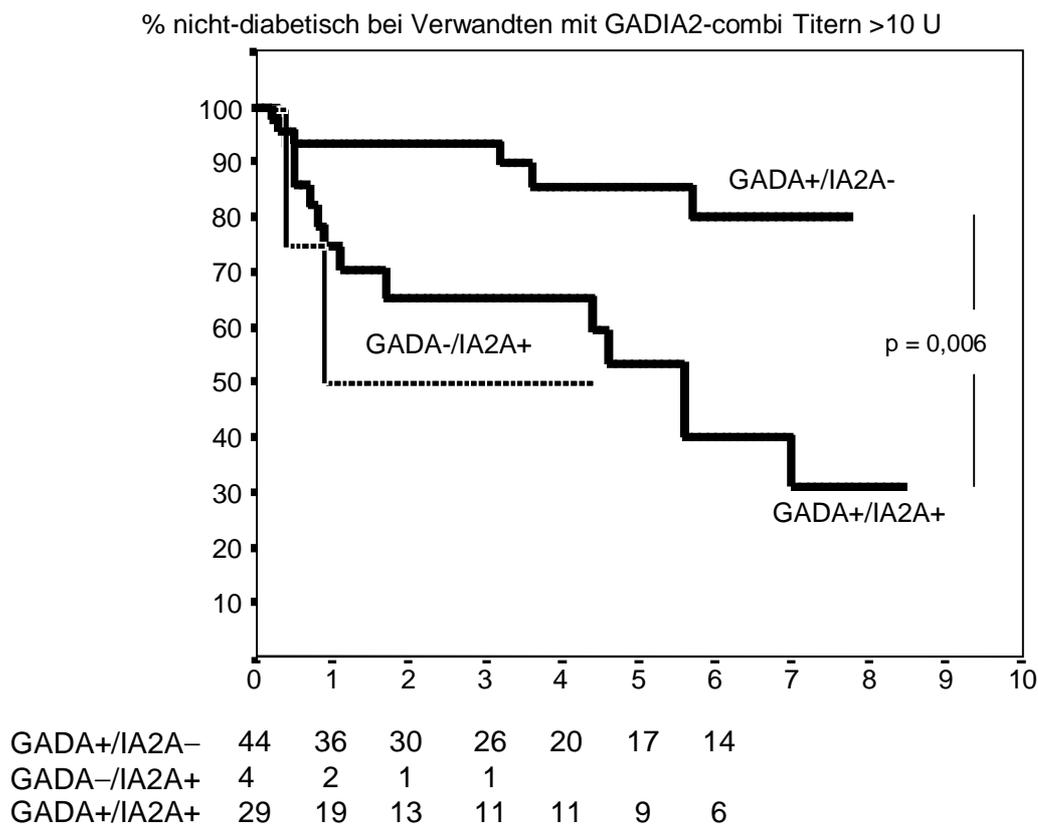


Abbildung 9: Lifetable-Analyse des Diabetesrisikos von Verwandten ersten Grades von Typ-1-Diabetikern in Abhängigkeit von der Antikörperspezifität (GADA+ und/oder IA2A+). Der Beobachtungszeitraum beginnt mit der ersten Blutprobe und endet bei Diabetesmanifestation oder dem letzten Kontakt mit der Person. Unter dem Graph ist die Anzahl der Personen mit den unterschiedlichen Antikörperkombinationen, die zum jeweiligen Zeitpunkt noch in die Studie eingeschlossen waren.

Von den vier Personen, die lediglich positiv für IA2A waren, entwickelten zwei innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von nur einem Jahr einen manifesten Typ-1-Diabetes (siehe auch Tabelle 5).

3.1.2.6 Sensitivität des GADIA2-combi bei der Detektion von Verwandten mit Typ-1-Diabetes

Zusammenhang zwischen Sensitivität und variablem Cut-off

Um zu prüfen, ob der gewählte Cut-off des GADIA2-combi-Tests für die Praxis geeignet ist, Personen mit einem Risiko innerhalb von 5 Jahren an Typ-1-Diabetes zu erkranken herauszufiltern, wurde der Einfluss höherer Grenzwerte für Positivität auf das 5-Jahres Risiko berechnet. Dieser Zusammenhang der Sensitivität des GADIA2-combi bei unterschiedlichen Grenzwerten und dem jeweiligen kumulativen Diabetesrisiko ist in Abbildung 10 dargestellt.

Bei einem Cut-off von 10 Units erreichte der GADIA2-combi-Test eine Sensitivität von 95,7 % bei einem geringen 5-Jahres Risiko von 29,1 % an Typ-1-Diabetes zu erkranken. D. h. bei diesem Cut-off wären mit dem GADIA2-combi-Test zwar fast alle (23/24) der an Typ-1-Diabetes erkrankten Personen vorher erkannt worden, innerhalb von 5 Jahren hätten aber nur 7 (7/24 = 29,1 %) Personen einen Typ-1-Diabetes entwickelt. Die übrigen 17 Personen erkrankten also später als nach 5 Jahren. Bei der Wahl eines höheren Cut-offs z.B. von 20 Units, wurden genauso viele Personen detektiert und das Risiko stieg nur um knapp drei %-Punkte (31,8 %). Die beste Übereinstimmung wurde mit einem Grenzwert für Positivität von 50 Units erreicht, da der Test mit 73,9 % (18/24) dann immer noch ausreichend sensitiv war und das Risiko bei 51,2 % lag. Erst bei einem Grenzwert über 50 Units stieg das 5-Jahres Risiko merklich an und der Test büßte deutlich an Sensitivität ein.

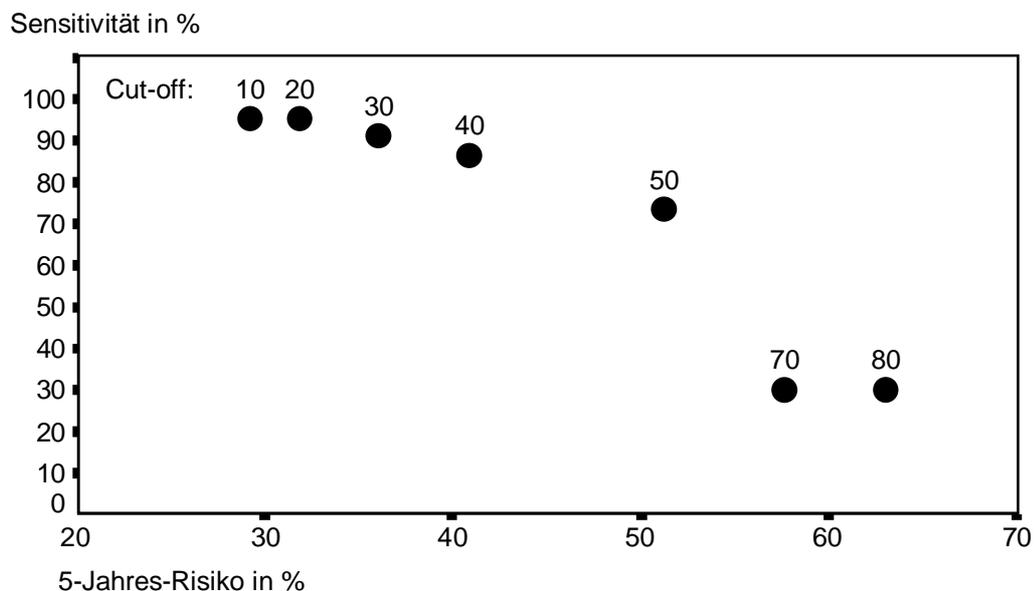


Abbildung 10: Sensitivität und das 5-Jahres-Diabetesrisiko des GADIA2-combi-Tests in Abhängigkeit von unterschiedlichen Grenzwerten für Positivität

Vergleich zu anderen Screening-Strategien

Die Sensitivität einzelner und kombinierter Antikörperuntersuchungen berechnet aus der Anzahl der Personen, die positiv für den jeweiligen Antikörpertest waren im Verhältnis zur Gesamtzahl aller erkrankten Personen ist in Abbildung 11 veranschaulicht.

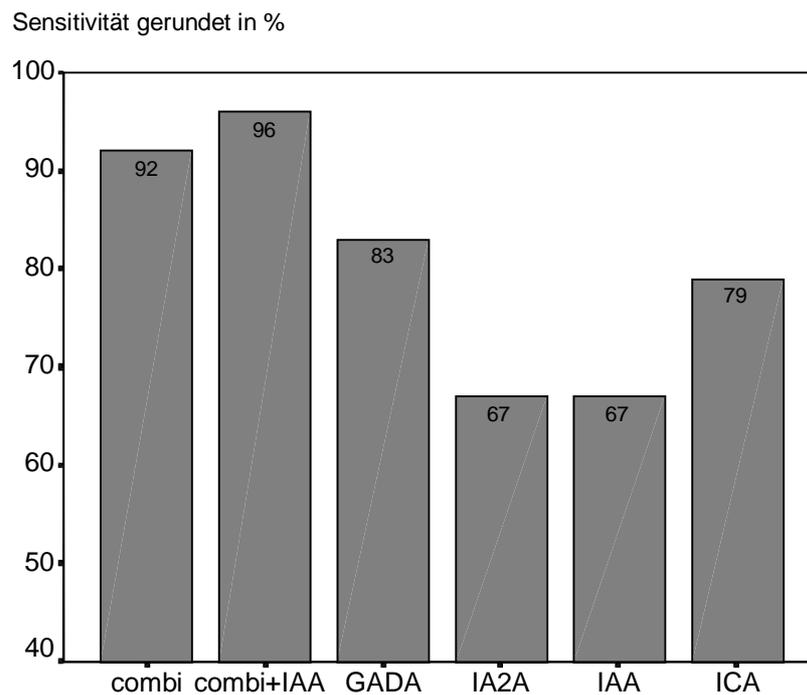


Abbildung 11: Sensitivitäten unterschiedlicher Screening-Strategien

Die höchste Sensitivität (95,8 %) wurde bei einem kombinierten Screening mit dem GADIA2-combi-Test zusammen mit dem IAA-Test erreicht. 85 der insgesamt 86 Antikörperpositiven Verwandten waren in mindestens einem der beiden Tests positiv. Hiermit wurden 23 der insgesamt 24 an Diabetes erkrankten Verwandte detektiert. Die zweithöchste Sensitivität erreichte der GADIA2-combi-Test als Einzeltest, in dem 77 von 86 Personen positiv waren und mit dem 22 von 24 Diabetiker (91,6 %) erkannt wurden. Ein Screening auf GADA erreichte eine Sensitivität von 83,3 % (20/24), ein ICA-Screening 79,1 % (19/24). Der IA2A- und der IAA-Test erlangten jeweils eine Sensitivität von 66,6 % (16/24).

3.1.2.7 Diabetesrisiko in Abhängigkeit weiterer immunologischer und klinischer Merkmale

Das kumulative Diabetesrisiko nach fünf Jahren Beobachtungszeit wurde bei den 77 GADIA2-combi-positiven Verwandten in Abhängigkeit weiterer Merkmale ermittelt. Hierbei wurde der IAA-Status, das Alter, der Verwandtschaftsgrad und die Ergebnisse des IVGTT berücksichtigt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Das kumulative 5-Jahres-Diabetesrisiko bei Verwandten mit GADIA2-combi-Titern > 10 Units

	Anzahl (n)	Anzahl der Erkrankten (n)	Diabetesrisiko nach 5 Jahren in % (95 % CI)	Signifikanz p-Wert
Alter (Jahre)				
≤ 15	37	10	34,2 (14-54)	0,97
< 15	40	12	26,7 (11-42)	
Verwandtschaftsgrad				0,83
Kind	36	11	35 (16-55)	
Geschwister	33	9	23,6 (8-38)	
Elternteil	8	2	27 (0-59)	
IAA-Status				0,07
IAA ≤ 49 nU/ml	32	13	45,8 (23-68)	
IAA > 49 nU/ml	45	9	19 (6-32)	
IVGTT				0,01
≤ 1. Perzentile (≤ 49 µU/ml)	17	10	68,6 (42-95)	
> 1. Perzentile (> 49 µU/ml)	11	3	12,5 (0-34)	

Verwandte mit einer verminderten Insulinsekretion (1+3-min-Insulinsekretion ≤ 49 µU/ml) nach einem IVGTT zeigten ein signifikant höheres kumulatives Risiko an Diabetes zu erkranken als Personen mit einer (nicht pathologischen) Insulinsekretion über der 1. Perzentile (68,6 % [42-95] vs. 12,5 % [0-34]; $p < 0,01$). Personen mit GADIA2-combi-Titern über dem Cut-off von 10 Units und positiven IAA-Titern hatten zwar ein tendenziell, nicht aber signifikant höheres Risiko, innerhalb von 5 Jahren einen Typ-1-Diabetes zu entwickeln, als Patienten mit negativen IAA-Titern (5-Jahres-Risiko [95 % CI] = 45,8 % [23-68] vs. 18,8 % [6-23]). Es konnte kein statistischer Zusammenhang zwischen dem Alter (≤ 15 vs. > 15 Jahre) und dem Diabetesrisiko beobachtet werden. Ebenso stand das Risiko an Diabetes zu erkranken in keinem statistischem Zusammenhang mit dem Verwandtschaftsgrad (Kind, Geschwister, Elternteil).

3.1.3 GADIA2-combi-Titer in venösem und kapillärem Blut

Die GADIA2-combi-Titer wurden bei 46 Personen in venösem Serum und kapillärem Plasma verglichen (11 Normalpersonen und 35 neu manifeste Typ-1-Diabetiker). Hiervon waren insgesamt 25 Personen für mindestens einen der beiden Antikörper (GADA und/oder IA2A) positiv und 21 waren Antikörper-negativ. Es konnte eine starke Korrelation zwischen beiden Messungen gefunden werden ($R = 0,8$; $R^2 = 0,71$; $P < 0,001$). Abbildung 12 zeigt die Korrelation der GADIA2-combi-Titer in venösem Serum und kapillärem Plasma.

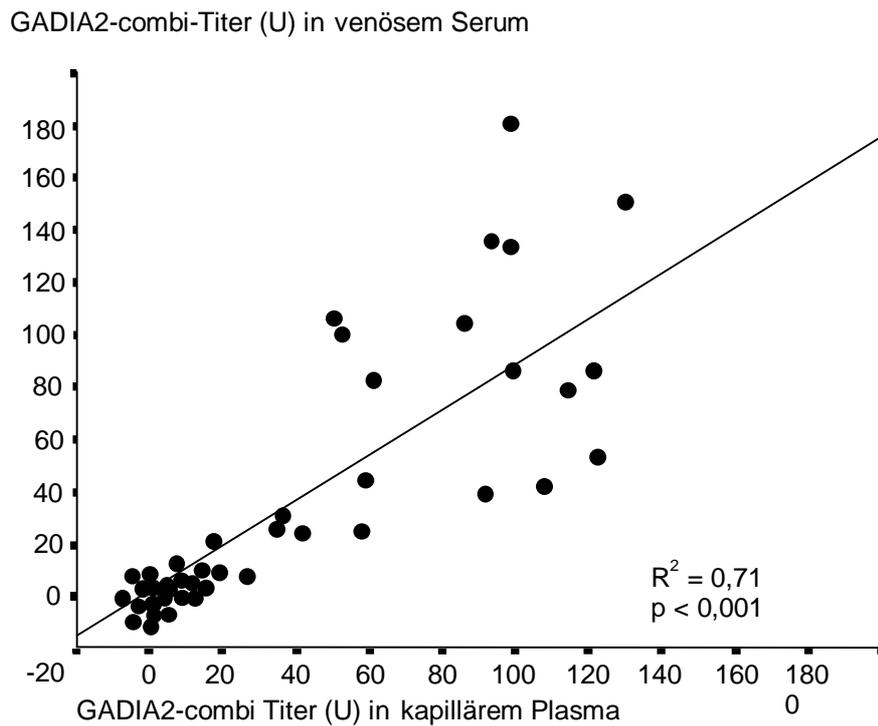


Abbildung 12: Scatterplot der GADIA2-combi-Titer in venösem Serum und kapillärem Plasma

Insgesamt wurden mit dem GADIA2-combi-Test im Kapillarblut 28 Proben als positiv und 18 als negativ detektiert. Gegenüber der Ergebnisse im Venenblut, die als Referenzmessungen galten, detektierte der GADIA2-combi-Test im Kapillarblut bei 5 Proben GADIA2-combi-Titer über dem Cut-off von 10 Units. Zwei dieser fünf Befunde konnten durch separate Tests als korrekt bestätigt werden, da diese Personen positive GADA-Titer aufwiesen. Die übrigen drei Messungen waren falsch-positiv. Die Einzelergebnisse dieser fünf Seren sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Einzelergebnisse der im Venen- und Kapillarblut gemessenen und von den Einzeltesergebnissen abweichenden GADIA2-combi-Titer

Blutprobe-Nr.	GADA-Titer in Venenblut	IA2A-Titer in Venenblut	GADIA2-combi-Titer in Venenblut	GADIA2-combi-Titer in Kapillarblut
1	17	2	9,8	18,9
2	31	2	8,1	26,6
3	9	4	4,8	11,7
4	-3	-1,5	7,1	10,3
5	1	0,3	3,5	12,7

3.2 Tissue-Transglutaminase-C(tTGC)-Assay

3.2.1 Etablierung des tTGC-Assays

3.2.1.1 Ermittlung des Normalbereichs

Um den Normalbereich der tTGC-Antikörper zu ermitteln, wurden Seren von 209 stoffwechselgesunden Personen getestet. Die tTGCA-Titer wurden in Units (U) angegeben, die anhand einer Standardkurve berechnet wurden (Berechnung erfolgt durch die Software des Top-Count, Packard, Meriden, CT). Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe eines Positivserums (Doppelverdünnungen) getestet, wobei der höchsten Verdünnung willkürlich der Wert von 200 zugewiesen wurde und dem Negativserum der Wert 0. Allen dazwischen liegenden Verdünnungen wurden verhältnismäßige Werte zugeteilt. Die gemessenen Zählraten (cpm) der einzelnen Testseren wurden mit der Standardkurve verglichen und in Units ausgedrückt.

Als Cut-off wurde die 99. Perzentile des Kontrollkollektivs gewählt, die bei 2,4 Units lag. Dieser Grenzwert entsprach auch dem Mittelwert zuzüglich drei Standardabweichungen der gemessenen Titer in dieser Gruppe ($0,33 + 3 \times 0,68$).

3.2.1.2 Validierung des Tests

Zur Validierung des tTGC-Tests wurden 17 „geblindete“ Seren aus einem Referenzlabor (zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Bürgin-Wolff, Laboratorium für Zöliakiediagnostik, Liestal, Schweiz) getestet. Das Referenzlabor testete die Seren auf EMA, AGA-IgG und AGA-IgA und biopsierte die Patienten. Zehn der 11 EMA-IgA-positiven Seren von an Zöliakie erkrankten Patienten, wurden durch den tTGC-IgG-Test detektiert. Die mit dem tTGC-IgG-Test nicht erkannte Serumprobe Nr. 10 (siehe Tabelle 8) war allerdings im tTGC-IgA-Test positiv. Die Dünndarmbiopsie zeigte bei Serum-Nr. 12 und 13 laut Referenzlabor eine normale Mukosa trotz positiven EMA. Serum 12 war im Transglutaminase-Test positiv, bei Serum 13 konnten jedoch keine tTGC-IgG nachgewiesen werden. Tabelle 8 stellt die Ergebnisse der beiden Labors gegenüber.

Tabelle 8: Gegenüberstellung der Antikörperergebnisse eines geblindeten Serenkollektivs eines Referenzlabors und des Münchner Labors
 Grenzwerte des Referenzlabors: EMA pos. ≥ 5 (Titer); AGA-IgG pos. ≥ 35 U; AGA-IgA pos. ≥ 25 U;
 Grenzwert für tTGCA pos. $\geq 2,4$ U (Labor München)
 + = positiv; - = negativ

Serum-Nr.	Referenzlabor				Labor München	
	Biopsie	EMA (Titer)	AGA-IgG	AGA-IgA	tTGC-IgG (U)	Anmerkung
1	+	1280	+	+	108	
2	+	1280	+	+	99	
3	+	1280	+	+	32	
4	+	1280	+	+	38	
5	+	1280	+	+	53	
6	+	640	-	+	6	
7	+	1280	+	+	35	
8	+	1280	+	schw. +	53	
9	+	640	+	-	313	
10	+	1280	+	+	0	tTGC-IgA+
11	+	1280	+	-	49	
12	-	640	-	-	31	EMA+, Biopsie-
13	-	160	-	-	0	EMA+, Biopsie-
14	-	-	+	-	0	
15	-	-	-	-	0	
16	-	-	+	-	0	
17	-	-	-	-	0	

	-	+
EMA	<5	≥ 5
AGA-IgG	<35 U	≥ 35 U
AGA-IgA	<25 U	≥ 25 U

3.2.2 Zöliakie-assoziierte Antikörper bei Kindern diabetischer Eltern

3.2.2.1 Gewebs (tissue)-Transglutaminase-C-Antikörper (tTGCA)

Antikörper gegen die tTGC der Klasse IgG wurden bei 33 der insgesamt 913 (3,6 %) Kinder (569 im Alter von 2 Jahren, 221 im Alter von 5 und 123 im Alter von 8 Jahren) diabetischer Eltern detektiert. Eine Person (0,5 %) des Kontrollkollektivs (1/209) zeigte erhöhte Antikörperwerte und 10 der insgesamt 99 Typ-1-Diabetiker (10,1 %) waren tTGCA-positiv. Die Prävalenz der tTGC-Antikörper der einzelnen Untersuchungsgruppen unterschied sich insgesamt signifikant ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 13).

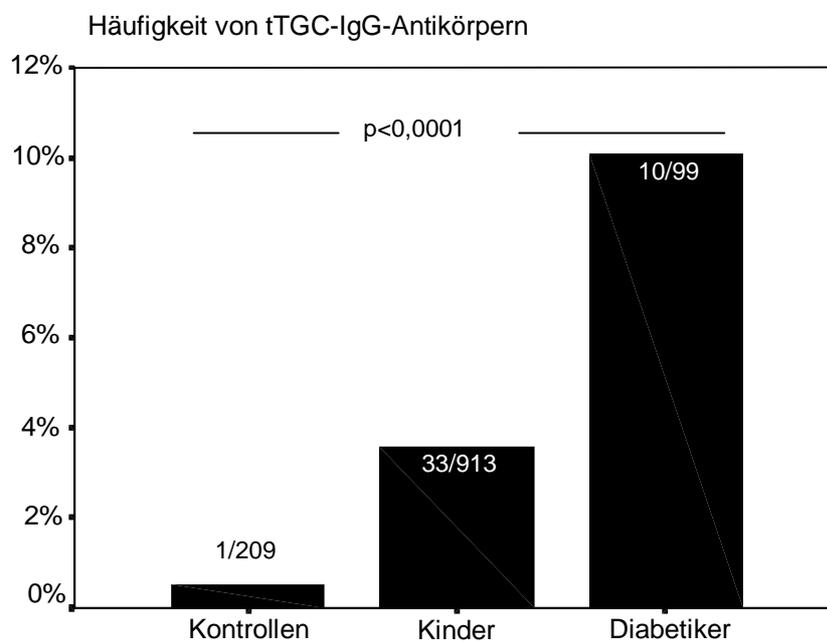


Abbildung 13: tTGC-IgG-Antikörper bei Kontrollen, Kindern diabetischer Eltern und Typ-1-Diabetikern

Ein signifikanter Unterschied in der Höhe der Antikörper-Titer ließ sich zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen nicht feststellen.

Prävalenz der tTGC-Antikörper in unterschiedlichen Altersgruppen bei Kindern diabetischer Eltern

Die Prävalenz der Antikörper unterschied sich in Abhängigkeit des Alters. Abbildung 14 zeigt die Häufigkeit von tTGCA in den Altersgruppen mit 2, 5 und 8 Jahren (Abbildung 19). Von

569 im Alter von zwei Jahren getesteten Kindern hatten 14 Antikörper-Titer über dem Cut-off von 2,4 Units (2,5 %). Im Alter von fünf Jahren wurden 221 Kinder getestet; hier konnten 11 (5,0 %) als positiv detektiert werden und bei acht Jahren hatten 8 von insgesamt 123 Kindern (6,5 %) Antikörper gegen tTGC ($p = 0,043$).

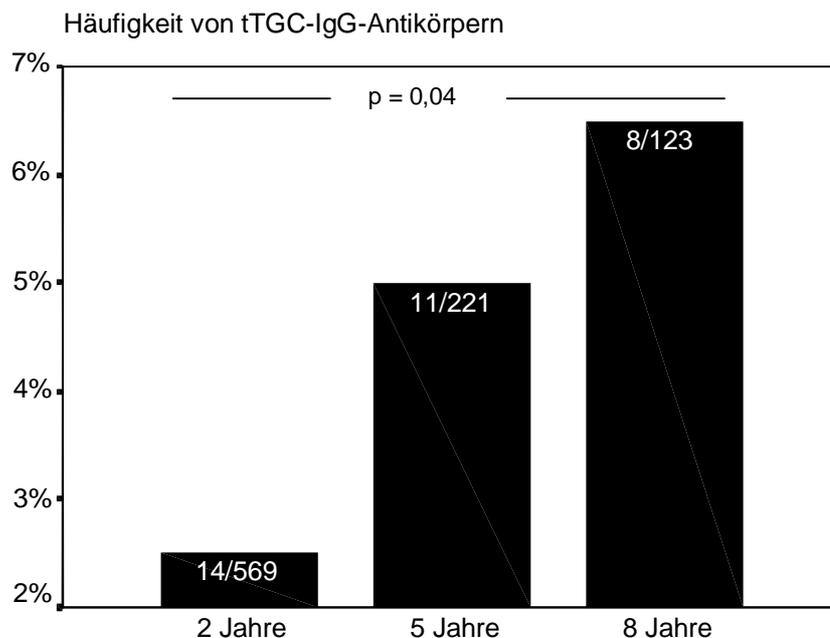


Abbildung 14: tTGC-IgG-Antikörper bei Kindern diabetischer Eltern in Abhängigkeit des Alters

Höhe der tTGCA-Titer bei 2, 5 und 8 Jahren

Die tTGC-IgG-Antikörper-Titer waren mit zunehmendem Alter signifikant höher ($p = 0,03$). So lagen die Antikörpertiter bei Kindern im Alter von zwei Jahren durchschnittlich bei 0,95 Units, im Alter von fünf Jahren bei 1,82 und in der Gruppe der 8-jährigen wurden durchschnittliche Titer von 5,64 Units gemessen (Abbildung 15).

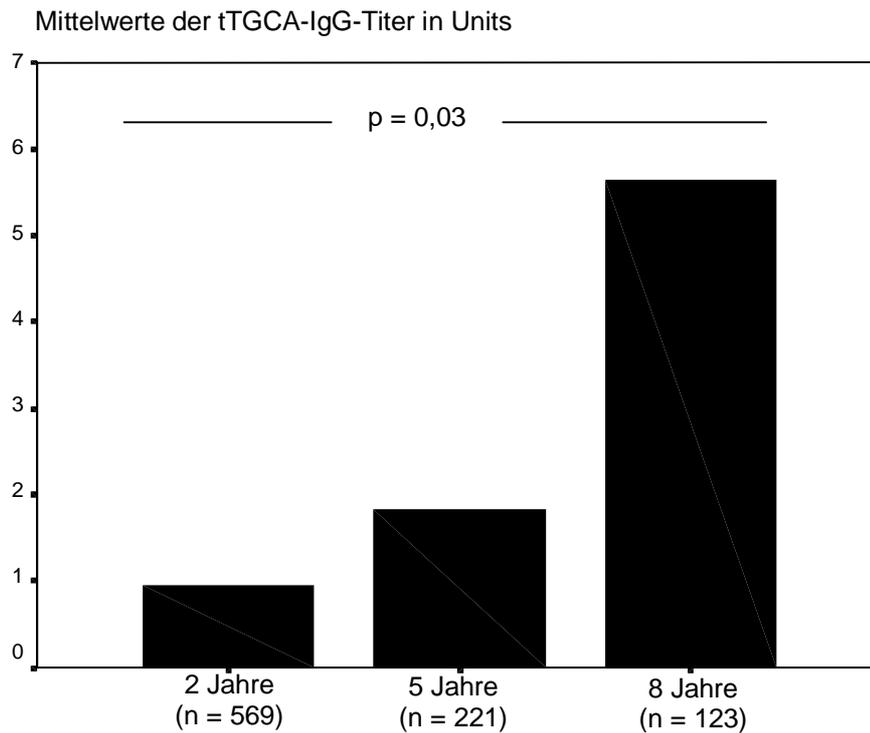


Abbildung 15: Mittelwerte der tTGCA-IgG-Titer bei 913 Kindern diabetischer Eltern in Abhängigkeit des Alters

Prävalenz der tTGCA-IgA-Antikörper

Antikörper gegen tTGC der Klasse IgA wurden bei 16 der insgesamt 33 tTGCA-IgG-positiven Kinder und bei einem Kind in Abwesenheit von tTGCA-IgG gemessen. Dieses Kind hatte alle Antikörper bis auf tTGCA-IgG. Die nähere Charakterisierung der tTGCA-IgA-Befunde in der Gruppe der 33 Kinder ergab, dass diese Antikörperfraktion häufiger bei Kindern mit tTGCA-IgG-Titern über 10 Units nachweisbar als bei Kindern mit IgG-Titern unter 10 Units. So hatten insgesamt zwölf der 16 tTGC-IgA-positiven Kinder tTGC-IgG-Antikörper-Titer > 10 Units im Gegensatz zu vier Kindern mit tTGCA-IgG-Titern < 10 Units. Abbildung 16 veranschaulicht diese Auswertung als Flussdiagramm.

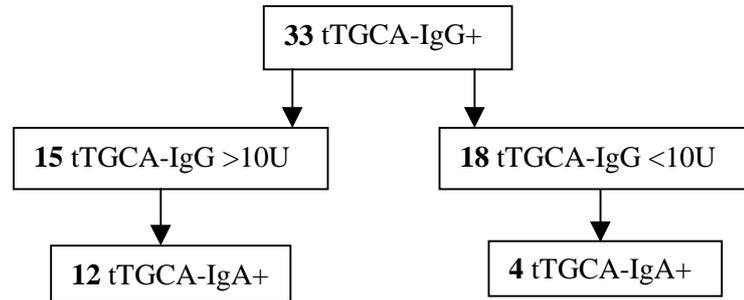


Abbildung 16: Verteilung der 16 tTGCA-IgA-positiven Seren bei 33 Kindern diabetischer Eltern

3.2.2.2 Endomysium- Antikörper (EMA) und Anti-Gliadin-Antikörper (AGA)

Die nachfolgenden Berechnungen zur Prävalenz der EMA und AGA beziehen sich auf das Teilkollektiv (nähere Erläuterung siehe Kapitel 2.1.2.3) von insgesamt 520 Kindern. Hiervon waren 33 tTGCA-IgG-positiv und 487 tTGCA-IgG-negativ.

Endomysium-Antikörper (EMA)

EMA wurden bei 13 (39 %) der 33 Kinder mit positiven tTGC-IgG-Antikörpern detektiert. Von insgesamt 487 tTGC-IgG-negativen (162 Kinder bei 2, 221 bei 5 und 123 bei 8 Jahren) waren 4 (0,8 %) EMA-positiv ($p < 0,001$ tTGC-IgG-positiv vs. tTGC-IgG-negativ). Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 17 dargestellt.

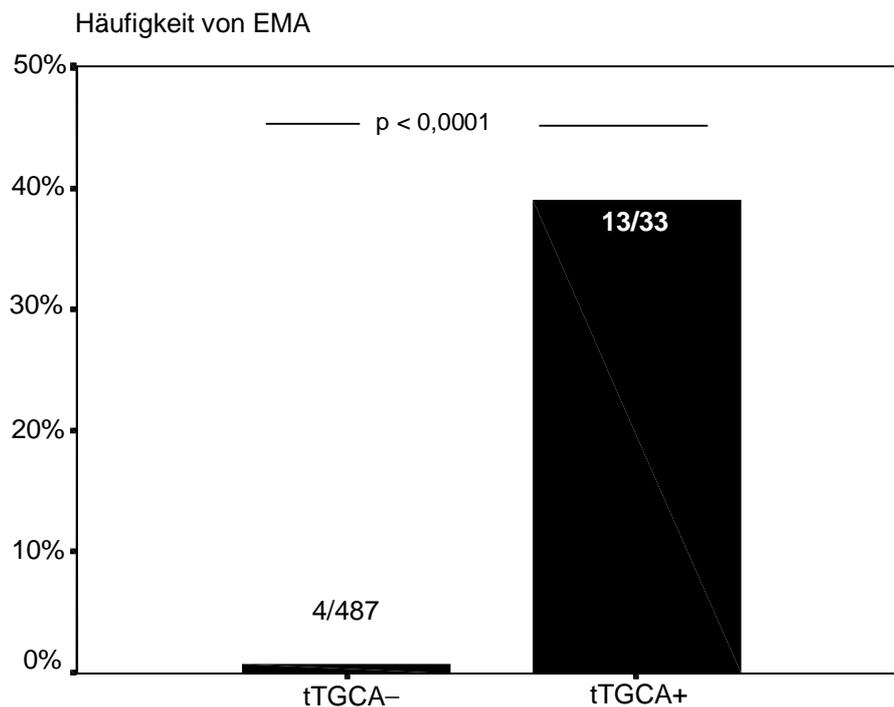


Abbildung 17: Endomysium-Antikörper (EMA) bei tTGCA-IgG-positiven- und negativen Kindern diabetischer Eltern

In Tabelle 9 sind die tTGCA-IgG- und IgA-Ergebnisse der insgesamt 17 EMA-positiven Kinder diabetischer Eltern gegenübergestellt. Hinsichtlich der Detektion der EMA-positiven Kinder erreichte der tTGCA-IgG-Test somit eine Sensitivität von 76,5 %, da vier (23,5 %) der 17 EMA-positiven Kinder durch den tTGCA-IgG-Test nicht erkannt wurden. Drei dieser vier Seren hatten EMA-Titer an der Detektionsgrenze von 5 Units. Drei der vier tTGCA-IgG-negativen Seren konnte jedoch mit dem tTGCA-IgA-Test detektiert werden. Die restlichen drei Seren wurden auch durch den IgA-Test vermisst. Eine weitere Charakterisierung der tTGCA-IgG-Titer der EMA-positiven Patienten ergab, dass diese zu 70,6 % über 10 Units lagen. TTGCA-IgG-Titer im unteren positiven Bereich wurden nur bei Serum-Nr. 15 gemessen.

Tabelle 9: tTGCA-IgG- und tTGCA-IgA-Titer bei 17 Kindern diabetischer Eltern mit Endomysium-Antikörpern (EMA); Angaben jeweils in Titer bzw. Units (U)
Grenzwerte für Positivität: tTGCA-IgG \geq 2,4 U; tTGCA-IgA \geq 2,0 U; EMA \geq 5,0 (Titer)

Serum-Nr.	EMA	tTGC-IgG	tTGC-IgA
1	5	0	0,3
2	5	1,1	0,2
3	5	1,3	0,7
4	5	34,7	62,8
5	5	54,2	67,3
6	5	56,0	7,0
7	50	54,2	18,7
8	100	12,35	157,3
9	100	23,82	200
10	100	73,0	200
11	100	82,1	150
12	200	35,0	200
13	200	112,4	54,9
14	200	200,0	200
15	400	1,0	150
16	400	4,9	150
17	800	200	150

Da alle Kinder im Alter von 5 und 8 Jahren auf EMA untersucht wurden, aus der Gruppe der 2-jährigen Kinder aber bisher nur ein Teil und hier bewusst die Kinder mit positiven tTGCA-IgG-Titern getestet wurde, bezieht sich die Analyse der Prävalenz der EMA korrekterweise nur auf die Gruppe der 5- und 8-jährigen Kinder (n = 344). Die Prävalenz der EMA lag in diesem Kollektiv bei 3,2 % (11/344) (siehe Zusammenfassung in Abbildung 19). In dieser Gruppe traten EMA bei den älteren Kindern tendenziell häufiger auf (2,3 % bei 5 Jahren vs. 4,9 % bei 8 Jahren). Der Unterschied war statistisch jedoch nicht signifikant.

In der Gruppe der 5- und 8-jährigen Kinder erkannte der tTGCA-IgG-Test 10 der 11 EMA-positiven Kinder, was einer Sensitivität von 91,6 % entspricht.

Antigliadin-Antikörper (AGA)

tTGCA-IgG-positive Kinder hatten mit 39,4 % (13/33) insbesondere häufiger Antigliadin-Antikörper der Klasse IgG als Kinder ohne tTGCA-IgG (22,4 %, 109/487; p = 0,026). Auch

AGA-IgA traten bei tTGCA-IgG-positiven Kindern signifikant häufiger (4/33, 12,1 %) auf als bei tTGCA-IgG-negativen Kindern (14/487, 2,9%; $p = 0,02$).

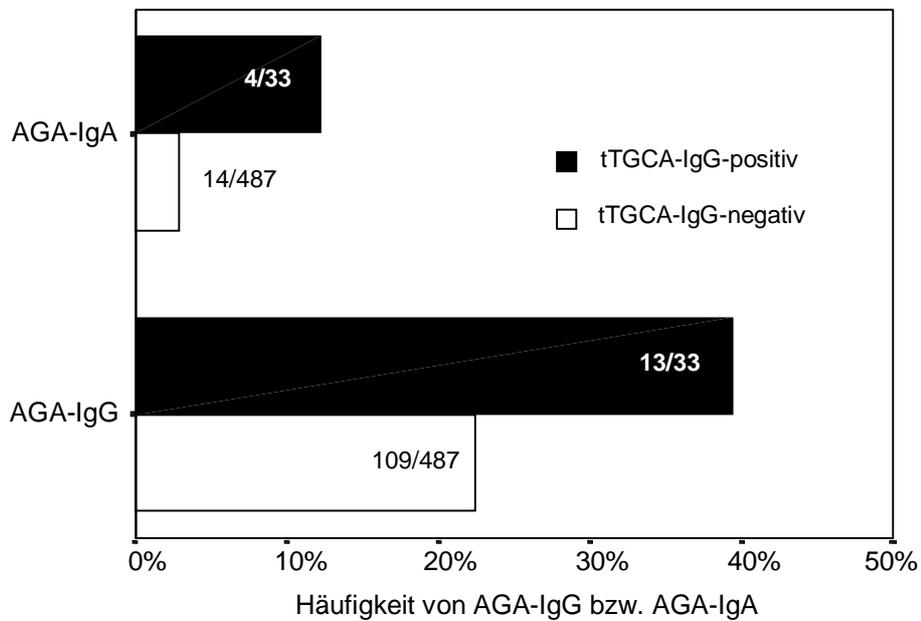


Abbildung 18: Antigliadin-Antikörper (AGA) der Klassen IgG und IgA bei 33 tTGCA-positiven und 487 tTGCA-negativen Kindern diabetischer Eltern

Im Gegensatz zu tTGCA-IgG und EMA traten AGA (IgG und IgA) mit zunehmendem Alter tendenziell weniger häufig auf (26,7 % bei Kindern im Alter von 2 Jahren, 23,5 % im Alter von 5 Jahren und 18,7 % im Alter von 8 Jahren). Dieses Ergebnis ist jedoch nicht signifikant (Abbildung 19).

	2 Jahre n = 569		5 Jahre n = 221		8 Jahre n = 123	
tTGCA-IgG Test	positiv n = 14 (2,5%)	negativ n = 555 (n = 162)*	positiv n = 11 (5,0%)	negativ n = 210	positiv n = 8 (6,5%)	negativ n = 115
EMA- positiv	3 (21,4%)	3 ** (1,9%)	5 (45,5%)	0 (0,0%)	5 (62,1%)	1 (0,9%)
AGA-IgA positiv	2 (14,3%)	5 ** (3,1%)	1 (9,1%)	8 (3,8%)	1 (12,5%)	1 (0,9%)
AGA-IgG positiv	5 (35,7%)	42 ** (26,6%)	5 (45,5%)	47 (22,3%)	3 (37,5%)	20 (17,4%)
tTGCA- IgA-positiv	5 (35,7%)	nicht getestet	6 (54,5%)	nicht getestet	5 (62,5%)	nicht getestet

*162 von 555 tTGCA-IgG-negativen Kindern wurden auf EMA und AGA getestet
**von 162 tTGCA-IgG-negativen Kindern

Abbildung 19: Antikörper-Ergebnisse von 913 Kindern diabetischer Eltern im Alter von 2, 5 und 8 Jahren im Rahmen einer prospektiven Verlaufsbeobachtung

3.2.2.3 Antikörper-Kombinationen

Tabelle 10 fasst den Antikörperstatus des auf alle vier Zöliakie-assoziierten Antikörper (tTGCA-IgG, EMA, AGA-IgA und -IgG) getesteten Teilkollektivs (n = 520) zusammen. Zusätzlich sind die positiven 17 tTGCA-IgA Befunde aufgeführt.

Tabelle 10: Kombination der Antikörper bei 520 für vier Zöliakie-assoziierte Antikörper getesteten Kindern diabetischer Eltern

	EMA	tTGC-IgG	tTGC-IgA*	AGA-IgG	AGA-IgA	n (%)
0 Tests positiv*	–	–	–	–	–	370 (71,0)*
1 Test positiv	+	–	–	–	–	2 (0,4)
	–	+	–	–	–	13 (2,5)
	–	–	–	+	–	100 (19,2)
	–	–	–	–	+	5 (1,0)
2 Tests positiv	+	–	–	+	–	1 (0,2)
	–	+	+	–	–	2 (0,4)
	–	–	–	+	+	8 (1,5)
	–	+	–	+	–	4 (0,8)
3 Tests positiv	+	+	+	–	–	5 (1,0)
4 Tests positiv	+	–	+	+	+	1 (0,2)
	+	+	+	+	–	5 (1,0)
	–	+	+	+	+	1 (0,2)
5 Tests positiv	+	+	+	+	+	3 (0,6)

*da nur Antikörper-positive Kinder (aus tTGCA-IgG, EMA, AGA-IgG und –IgA) auf tTGCA-IgA getestet wurden, bezieht sich "0 Tests positiv" nur auf diese vier Antikörper

Die Mehrheit (120 Kinder) der für alle Zöliakie-assoziierten Antikörper getesteten positiven Kinder wies nur einen Antikörper auf und dies war in erster Linie AGA-IgG (100 Kinder). Bei weiteren 13 Kindern konnten als einzige Antikörper tTGCA-IgG detektiert werden. Nur AGA-IgA hatten 5 und nur EMA hatten 2 Kinder. Weitere 8 Kinder hatten lediglich Antikörper gegen AGA-IgG und –IgA und zwei Kinder waren positiv für tTGCA-IgG in Verbindung mit tTGCA-IgA. Die Kombination tTGCA-IgG und AGA-IgG trat vier mal auf und nur ein Kind hatte EMA in Verbindung mit AGA-IgG. 14 Kinder hatten drei und mehr Antikörper. Wobei hiervon bei 5 Patienten in Abwesenheit von AGA hohe Titer an tTGCA (IgG und IgA) und EMA gemessen wurden. Bei weiteren 5 Kindern konnten zu dieser Kombination noch AGA-IgG nachgewiesen werden. Ein Kind mit einem IgA-Mangel, war positiv für tTGCA-IgG, AGA-IgG und EMA-IgG (die üblicherweise nicht getestet werden).

3.2.2.4 Beziehung zum Geschlecht

Die nachfolgenden Ergebnisse beziehen sich wieder auf die insgesamt 520 Kinder diabetischer Eltern, bei denen die vier Zöliakie-assoziierten Antikörper (tTGCA-IgG, EMA,

AGA-IgG und AGA-IgA) getestet wurden. Hiervon waren 275 Kinder männlich und 245 weiblich. Das Vorkommen von EMA war signifikant abhängig vom Geschlecht. Von insgesamt 17 EMA-positiven Kindern waren 12 (4,9 %) weiblich und 5 (1,8 %) männlich ($p = 0,042$). Die Kombination von positiven tTGC und EMA zeigte ebenfalls eine Abhängigkeit vom Geschlecht, war wiederum geschlechtsabhängig. Insgesamt waren 13 Kinder für beide Antikörper positiv und hiervon waren Mädchen (4,08 %) signifikant häufiger betroffen als Buben (1,09 %; $p = 0,028$). Das Vorkommen von tTGCA-IgG alleine zeigte keine Beziehung zum Geschlecht, wie auch AGA-IgG und -IgA.

3.2.3 Verlaufsbeobachtung bei tTGC- und EMA-positiven Kindern

Es wurden insgesamt 15 Kinder diabetischer Eltern, die sowohl für tTGCA (IgG und/oder IgA) als auch für EMA positiv waren, in konsekutiven Serumproben auf alle Zöliakie-assoziierten Antikörper getestet. Die Ergebnisse der Verlaufsbeobachtung sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Zöliakie-assoziierte Antikörper und Diagnose einer Zöliakie bei 15 tTGCA- und EMA-positiven Kindern diabetischer Eltern im zeitlichen Verlauf
IEL = intraepitheliale Lymphozyteninfiltrationen; EMA-Ergebnisse in Titer; Bedeutung von: -, +, ++, +++ am Tabellenfuss

Person	Ge- schlecht	Risiko durch	Alter	EMA IgA	AGA IgG	AGA IgA	tTGC IgG	tTGC IgA	Anmerkung
Sch.S.	w	Mutter	1,9	0	-	-	-	-	
			7,6	200	-	-	+++	+++	Diagnose: Zöliakie
Sch.R.	w		0,8	0	-	-	-	-	
			1,9	0	-	-	-	-	
			5,0	100	-	-	+++	+++	
			7,6	100	-	-	++	+++	Diagnose: Zöliakie
H.C.	w	Mutter	1,0	0	+	-	-	-	
			1,9	0	+	-	-	-	
			4,8	0	-	-	-	-	
			5,5	200	+	-	+++	++	Diagnose: Zöliakie
R.D.	w	Vater	1,0	0	-	-	-	-	
			2,0	400	-	++	++	+++	
			5,5	100	-	-	+	++	Diagnose: Zöliakie
Sch.A.	w	Vater	0,8	0	-	-	-	-	

			2,4	100	++	+	++	++	
			5,0	100	+++	+++	++	+++	Diagnose: Zöliakie
M.S.	w	Mutter	2,5	0	-	-	-	-	
			4,5	0	-	-	-	-	GADA-positiv
			8,5	200	++	-	+++	++	Diagnose: Zöliakie
B.J.	w	Mutter	8,5	800	++	+++	+++	+++	Diagnose: Zöliakie
Rc.D.	w	Vater	2,0	400	+++	+++	-	+++	Diagnose: Zöliakie
K.R.	w	Mutter	0,8	0	-	-	-	-	keine manifeste Zöliakie aber erhöhte IEL und typische Symptomatik
			2,1	0	+	-	-	-	
			4,5	50	+	-	++	+	
S.A.	w	Mutter	1,0	0	-	-	-	-	Bruder hat Diabetes- assoziierte Antikörper
			2,3	0	-	-	-	-	
			4,8	50	-	-	+	-	
			7,6	5	-	-	++	+++	
W.K.	m	Mutter	0,8	0	-	-	-	-	
			2,0	5	+	-	++	+	transient positiv
			2,9	0	-	-	-	-	
W.A.	w	Mutter	0,8	0	-	-	-	-	
			2,5	400	+	-	+	+++	Diagnose: Zöliakie
B.A.	m	Mutter	0,8	0	-	-	-	-	
			2,5	100	-	-	+	+++	
			4,5	5	-	-	++	++	
P.T.	m	Mutter	0,8	0	-	-	-	-	
			2,2	100	++	++	++	+++	
S.J.	m	Mutter	0,0	0	-	-	-	-	keine manifeste Zö- liakie aber erhöhte IEL; IgA-Mangel; EMA-IgG- positiv
			1,0	0	+	-	-	-	
			2,5	0	+++	-	+++	-	

	-	+	++	+++
AGA-IgG	< 0,087	<0,200	0,800	≥ 0,800
AGA-IgA	< 0,034	<0,050	<0,100	≥ 0,100
tTGC (IgG, IgA)	< 2,4; < 2,0	<20,2	<100,0	≥ 100,0

3.2.3.1 Alter bei tTGCA- und EMA-Entwicklung

Acht der prospektiv beobachteten 15 Kinder hatten tTGCA und EMA bereits bei der 2-Jahresuntersuchung. Bei der Kontrolluntersuchung im 5. Lebensjahr wurden tTGCA und EMA bei vier Kindern detektiert und zwei Kinder entwickelten die Antikörper erst mit acht Jahren. Bei einem Kind konnte die erste und einzige Blutprobe erst im achten Lebensjahr untersucht werden, so dass keine früheren konsekutiven Seren zur Vergängung standen. In den untersuchten Fällen traten tTGCA und EMA immer gleichzeitig und nie vor dem 2. Lebensjahr auf.

Alter bei AGA-Entwicklung

Von den 15 Kindern entwickelten insgesamt 11 im Laufe des Beobachtungszeitraums AGA. In drei Fällen konnten schwache AGA-IgG Titer vor Auftreten der tTGCA und EMA gemessen werden (im Alter von 1,0; 1,0 und 2,1 Jahre). Bei acht Patienten wurden AGA IgG und/oder IgA jedoch zusammen mit tTGCA und EMA bei der Untersuchung im 2. Lebensjahr oder später detektiert.

Antikörper bei Geburt

Serumproben bei Geburt (Nabelschnurblut) standen von 12 aller 15 im Verlauf beobachteter Kinder zur Verfügung. Bei keinem Kind konnten in dieser Serumprobe Zöliakie-assoziierte Antikörper nachgewiesen werden.

Transiente Antikörper-Positivität

Ein Junge (W.K.) wies nur transient tTGCA (IgG und IgA) und EMA auf. Bei einer Kontrolluntersuchung, etwa 11 Monate später, konnten keine Antikörper mehr nachgewiesen werden.

Biopsien und Diagnose einer Zöliakie

Bei 12 Kindern im Alter zwischen 2,0 und 8,5 Jahren, die sowohl positive tTGCA als auch EMA hatten, konnten bisher Biopsien durchgeführt werden. In 9 Fällen wurde hierdurch eine manifeste Zöliakie diagnostiziert. Zwei Kinder hatten bioptisch eine unveränderte Mukosa, jedoch erhöhte intraepitheliale Lymphozyteninfiltrationen. Eines dieser Kinder (K.R.) zeigte klinische Symptome einer Zöliakie wie ein retardiertes Wachstum, abdominelle Beschwerden und häufigen Stuhlgang. Bei einem Kind wurde durch die Biopsie eine manifeste Zöliakie ausgeschlossen (S.A.).

3.2.4 Zöliakie-assoziierte Antikörper in Abhängigkeit des Stillens

Bei 736 Kindern der insgesamt 913 auf tTGCA-IgG getesteten Kinder lag die Information darüber vor, ob diese Kinder gestillt wurden oder nicht. Von 543 Kindern wurde ermittelt, wie lange sie gestillt wurden, von 515 Kindern war die Stilldauer ohne jegliche Zufütterung (Milchnahrung, Beikost, Tee, Saft) bekannt. Die Analyse ergab, dass 537 Mütter ihre Kinder mindestens eine Woche lang gestillt haben, 173 Kinder wurden überhaupt nicht gestillt. Es konnte kein statistischer Zusammenhang zwischen dem Auftreten von tTGCA (IgG oder IgA) und der Brustfütterung festgestellt werden ($p = 0,769$, n. s.). Der Zeitpunkt der Zufütterung hatte ebensowenig einen Einfluss auf die Entwicklung von tTGCA (vor dem 3. Monat vs. zwischen dem 3. und 6. Monate vs. nach dem 6. Monat, $p = 0,713$, n. s.). Auch die Stilldauer insgesamt zeigte keinen Zusammenhang zur Prävalenz der tTGCA (< 6 Monate vs. > 6 Monate, $p = 0,87$, n. s.). Bei 372 auf EMA, AGA-IgA und AGA-IgG getesteten Kindern war bekannt, ob sie gestillt wurden. Von diesen Kindern sind 286 gestillt worden und 86 Kinder nicht. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Prävalenz der EMA und der Brusternährung ermittelt werden ($p = 0,88$, n. s.), ebensowenig bzgl. der Prävalenz von AGA-IgA ($p = 0,42$, n. s.). Hingegen hatte das Stillen einen deutlichen Einfluss auf die Prävalenz der AGA-IgG. Von den 286 gestillten Kindern waren 79 (27,6 %) positiv für AGA-IgG im Vergleich zu 7 von 86 nicht gestillten Kindern (8,1 %). Dieser Unterschied war statistisch hoch signifikant ($p < 0,0001$). Auch die Höhe der AGA-IgG-Titer (Mittelwerte) unterschied sich signifikant in den beiden Gruppen (0,048 U in der Gruppe der nicht gestillten Kinder vs. 0,085 U in der Gruppe der gestillten Kinder, $p = 0,006$). Die Analyse hinsichtlich der Prävalenzunterschiede von AGA-IgG zwischen gestillten und nicht gestillten Kindern in Abhängigkeit des Alters ist in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Prävalenz der Antigliadin-IgG-Antikörper (AGA-IgG) bei 372 Kindern diabetischer Eltern in Abhängigkeit des Alters und der Brusternährung

	Anzahl insgesamt (n)	Anzahl AGA-IgG-positiv in n (%)	Signifikanz
2 Jahre (n = 157)			
gestillt	129	38 (29,5)	p = 0,156 (n. s.)
nicht gestillt	28	4 (14,3)	
5 Jahre (n = 162)			
gestillt	121	36 (29,8)	p = 0,004
nicht gestillt	41	3 (7,3)	
8 Jahre (n = 53)			
gestillt	36	5 (13,9)	p = 0,163 (n. s.)
nicht gestillt	17	0	

Die Prävalenzunterschiede der AGA-IgG zwischen gestillten und nicht gestillten Kindern waren nach separater Berechnung in den einzelnen Altersgruppen (2, 5 und 8 Jahre) nicht durchweg signifikant. Einzig in der Gruppe der 5-jährigen bestätigte sich der in der Gesamtgruppe ermittelte signifikante Unterschied. Bei Kindern im Alter von 2 Jahren und im Alter von 8 Jahren war das Auftreten der AGA-IgG unabhängig davon, ob sie gestillt wurden oder nicht.

Die Auswertung der im Antikörper-Verlauf beobachteten Kinder ergab, dass 8 Kinder gestillt wurden, 3 Kinder wurden nicht gestillt und bei 4 Kindern lag keine Information darüber vor. Von den 8 nicht gestillten Kindern entwickelten 3 eine manifeste Zöliakie, ein Kind hatte IEL, 2 hatten bioptisch gesichert keine Zöliakie und weitere 2 wurden bisher noch nicht biopsiert. Alle drei nicht gestillten Kindern entwickelten eine manifeste Zöliakie. Drei der Kinder, bei denen keine Information vorlag, ob sie gestillt wurden, entwickelten ebenfalls eine Zöliakie und eines dieser Kinder hatte IEL.

3.2.5 Zöliakie- und Typ-1-Diabetes-assoziierte Antikörper

Alle 913 Kinder diabetischer Eltern wurden auf Diabetes-assoziierte Antikörper untersucht. Eine persistierende Positivität für mindestens einen der Diabetes-assoziierten Antikörper (aus IAA, ICA, GADA oder IA2A) konnte bei 42 Kindern (4,6 %) gefunden werden. Das Vorkommen von tTGCA war unabhängig vom Status (Quantität und Spezifität) der Diabetes-assoziierten Antikörper. So war die Prävalenz von tTGCA-IgG in Antikörper-negativen Kindern (4,8 %) ähnlich hoch wie bei Antikörper-positiven (3,6 %). Ein Kind (S.A.) hat ein Geschwister mit multiplen Antikörpern.

Eines der 15 Kinder mit Verlaufsbeobachtung (M.S.) wies ebenfalls GADA auf, die nach Diagnose der Zöliakie und nach Einführung einer glutenfreien Diät nicht mehr nachweisbar waren.

4 DISKUSSION

Die Aufgabe eines Antikörperscreenings ist einerseits, die Hochrisikopersonen für eine Erkrankung prospektiv zu identifizieren, um eventuell frühzeitig intervenieren zu können, andererseits deren Krankheitsrisiko innerhalb eines bestimmten Zeitraumes abzuschätzen. Die wesentlichen Ansprüche, die an einen neuen Screening-Test gestellt werden müssen sind: hohe Sensitivität und Spezifität, einfache Durchführbarkeit, hohe Probendurchsatzrate, niedrige Kosten und idealerweise eine weltweite Vergleichbarkeit. Eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung eines Antikörpertests ist die Ermittlung des Grenzwertes für Positivität, der die Trennung zwischen "gesund" und "krank" festlegt. Für die Definition eines Normalbereichs sollten daher gesunde Normalpersonen herangezogen werden.

4.1 GADIA2-combi-Test

Die beiden Antikörper gegen die Diabetes-assoziierten Antigene Glutamatdecarboxylase (GAD) und Tyrosinphosphatase (IA2) werden heute jeweils zuverlässig mit Hilfe eines Radiologandenbindungsassays (RBA) bei Risikopersonen getestet. Es wäre jedoch gerade im Hinblick auf Kosten- Zeit und Arbeitseinsparung ideal, würde man die beiden Antikörper gleichzeitig in einem Testansatz messen können. Darüberhinaus wäre es wünschenswert, wenn ein solcher kombinierter Test auch mit Kapillarblut durchführbar wäre, da man gerade im Rahmen eines gross angelegten Screenings dadurch noch weitere Kosten und Aufwand einsparen könnte und die Akzeptanz gerade bei Untersuchungen an Kleinkindern steigen würde.

4.1.1 Untersuchungsgruppen

Da ein Test zur simultanen Bestimmung von GADA und IA2A (GADIA2-combi) in venösem Serum und kapillärem Plasma am Institut für Diabetesforschung erst etabliert werden musste, wurde die Anwendung des Tests an einer Gruppe von gesunden Personen, bei denen durch Familienanamnese das Risiko für einen Typ-1-Diabetes ausgeschlossen werden konnte, allen weiteren Untersuchungen vorangeschickt.

Als weitere Kontrollgruppe dienten den WHO-Kriterien entsprechende neuentdeckte Typ-1-Diabetiker [89, 139]. Neuentdeckte Typ-1-Diabetiker haben im Hinblick auf Spezifität und Quantität von GADA und IA2A einen heterogenen Antikörperstatus [65]. Die Anwendung des GADIA2-combi in diesem Kollektiv sollte daher Aufschluss über die Sensitivität, Reliabilität und den Bereich der zu erwartenden Titerhöhe des GADIA2-combi geben. Die in dieser Kontrollgruppe gemessenen GADIA2-combi-Titer wurden dazu mit den Ergebnissen der separat durchgeführten Antikörpertests auf GADA und IA2A verglichen.

Die Aufgabe eines Screenings für Diabetes-assoziierte Antikörper liegt einerseits darin, Risikopatienten für die Krankheitsentwicklung prospektiv zu identifizieren, um rechtzeitig intervenieren zu können und andererseits das Diabetesrisiko innerhalb eines bestimmten Zeitraumes abzuschätzen. Als Personen mit einem erhöhten Diabetesrisiko gelten aufgrund der genetischen Prädisposition erstgradig Verwandte von Typ-1-Diabetikern. Im Durchschnitt liegt das Diabetesrisiko für diese Personen 10fach höher verglichen mit der Allgemeinbevölkerung [66, 125]. Als Studienpatienten dienten daher für den neuen Screeningtest (GADIA2-combi) Verwandte ersten Grades von Typ-1-Diabetikern, die bereits über einen längeren Zeitraum am Institut für Diabetesforschung rekrutiert und auf Insulin- und Inselzell-Autoantikörper (IAA und ICA) untersucht wurden.

4.1.2 Methode zum kombinierten Nachweis von GAD- und IA2-Antikörpern (GADIA2-combi)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Assay zum kombinierten Nachweis der Antikörper gegen GAD und IA2 etabliert. Dieser Test basiert methodisch in modifizierter Form auf einem Radioimmunoassay, der als markiertes Antigen mit ^{35}S markiertes Methionin in humanem, rekombinantem GAD bzw. IA2 verwendet [50, 92, 99]. Diese Methode wurde als Vorlage gewählt, da sie im Institut für Diabetesforschung bereits etabliert und sowohl spezifisch als auch sensitiv im Nachweis beider Antikörper war (GADA-Assay 100% Spezifität und 94% Sensitivität; IA2A-Assay 100% Spezifität und 100% Sensitivität) [145].

Für den GADIA2-combi werden die beiden separat voneinander radioaktiv markierten Antigene in einem Inkubationspuffer simultan dem Testserum angeboten. Im Serum vorhandene Antikörper bilden mit den Antigenen Immunkomplexe, die auf Filtrationsplatten an Protein A Sepharose binden. Ungebundenes Antigen und Reaktionpuffer werden durch intensives Waschen von den Immunpräzipitaten entfernt. Die in den Immunkomplexen gebundene Radioaktivität wird durch Zugabe von Szintillationsflüssigkeit fluoresziert und anhand hierdurch auftretender Lichtblitze in einem Szintillationscounter quantifiziert.

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Vorversuche zur Etablierung des GADIA2-combi vor kritischem Hintergrund zusammengefasst:

- Das Mischungsverhältnis von 1:1 beider Antigen mit je 15.000 cpm wurde gewählt, da sich bei diesem Verhältnis die zuverlässigsten Antikörpertiter im Vergleich mit den Ergebnissen der separaten Tests und der geringste Background zeigte. Die Menge von 15.000 cpm eines Antigens deckt sich mit der für den separaten Nachweis der Antikörper verwendeten Menge [145].
- Zur Bestimmung des Grenzwertes des GADIA2-combi stand eine Kontrollpopulation von 105 stoffwechselgesunden Personen mit negativer Familienanamnese hinsichtlich eines

Typ-1-Diabetes zur Verfügung. Mit einem Durchschnittsalter von 27,7 Jahren ist diese Kontrollgruppe älter als das Testkollektiv der erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern. Desweiteren befinden sich in dem Kontrollkollektiv keine Personen unter 19 Jahren (Range: 19,2-52), wohingegen das Testkollektiv durchaus Kinder unter einem halben Jahr beinhaltet (Range: 0,3-68,7). Es ist daher nicht auszuschliessen, dass ein Kontrollkollektiv mit einer heterogeneren Altersverteilung einen anderen Grenzwert geliefert hätte. Der anhand des Kontrollkollektivs ermittelte Grenzwertes von 10 Units, berechnet aus der 99. Perzentile (9,89) ist dennoch vertretbar, wie ein anderes Verfahren zur Ermittlung von Grenzwerten zeigt. Das Verfahren des QQ-Normalverteilungs-Plots dient der Prüfung auf eine Normalverteilung und der Ermittlung von Antikörpergrenzwerten innerhalb eines Testkollektivs. Es ist mit diesem Verfahren daher möglich einen Grenzwert ohne ein Kontrollkollektiv zu ermitteln [145]. Abbildung 20 zeigt den QQ-Plot der GADIA2-combi-Titer des Kontrollkollektivs und Abbildung 21 den der GADIA2-combi-Titer der erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern. Ist die Stichprobe normal verteilt, liegen die Messwerte auf einer Geraden, wie in Abbildung 20. Das Abknicken der Kurve in Abbildung 21 zeigt deutlich, dass keine Normalverteilung vorliegt, sondern dass die beobachteten Antikörpertiter zwei unterschiedliche Kollektive innerhalb des Gesamtkollektivs repräsentieren. Der Knickpunkt ermöglicht eine Trennung der beiden Gruppen und zeigt an, ab welchem Antikörper-Wert ein Serum als positiv einzustufen ist. Unverkennbar liegen in Abbildung 20 alle Punkte links der senkrechten Linie, die den Cut-off von 10 U kennzeichnet und in Abbildung 21 liegt der Knickpunkt der Kurve genau bei von 10 Units. Dieses Verfahren untermauert somit die korrekte Wahl des Grenzwertes, obwohl sich das Kontrollkollektiv hinsichtlich des Alters unterscheidet. Interessanterweise liegt der GADIA2-combi-Grenzwert nahezu in der Mitte zwischen dem des IA2A-Assay mit 5 Units und dem des GADA-Tests mit 13 Units.

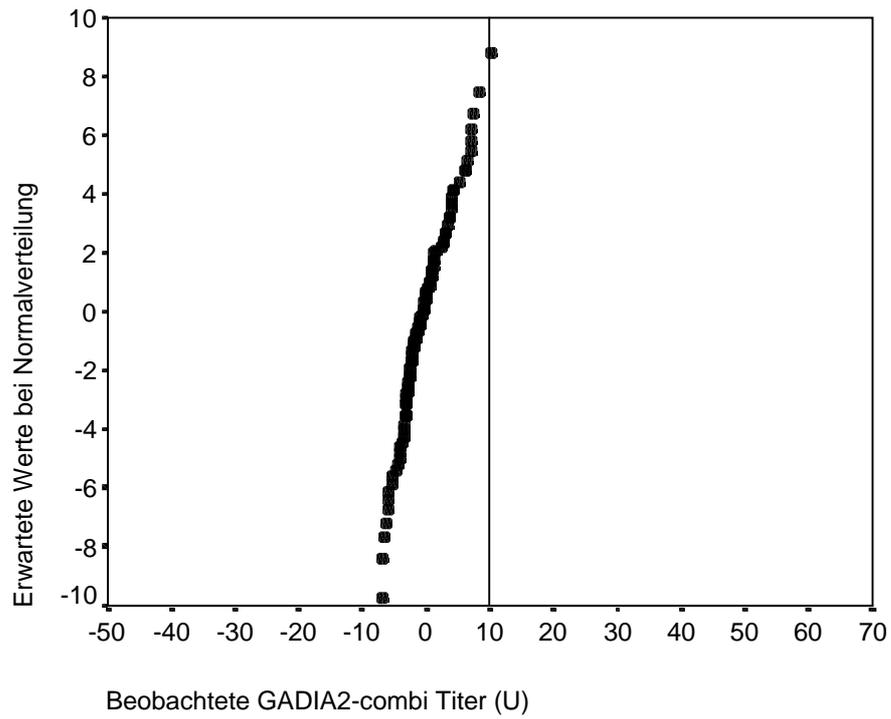


Abbildung 20: QQ-Normalverteilungs-Plot der GADIA2-combi-Titer von 105 gesunden Kontrollpersonen. Auf der Abszisse sind die beobachteten Werte und auf der Ordinate die erwarteten Titerwerte bei Vorliegen einer Normalverteilung aufgetragen. Ist die gewählte Stichprobe normalverteilt, liegen die Punkte auf einer Linie. Die vertikale Linie kennzeichnet den Cut-off von 10 Units.

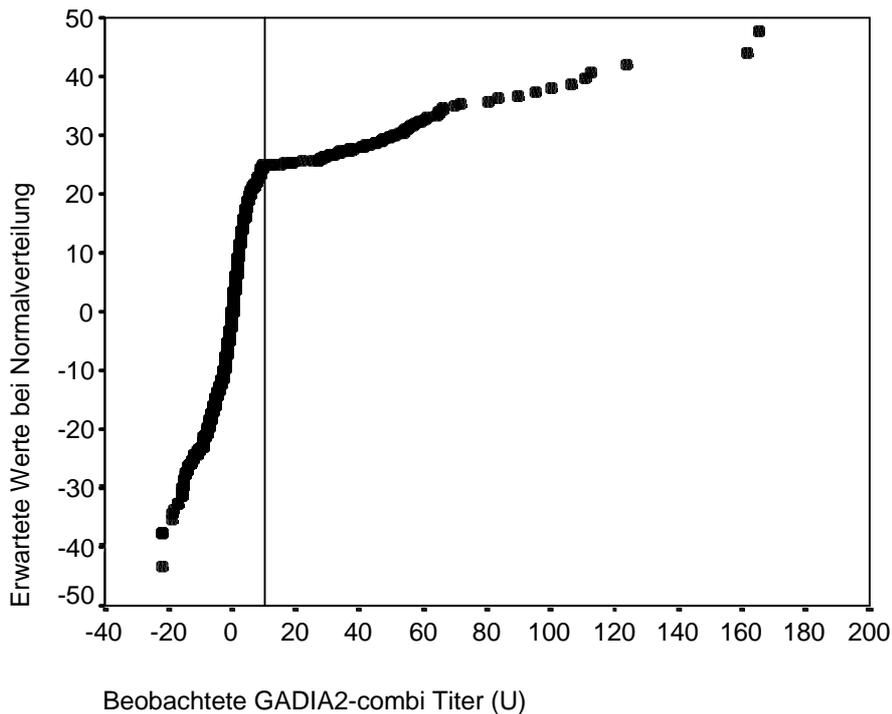


Abbildung 21: QQ-Normalverteilungsplot der GADIA2-combi-Titer von 1606 erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern. Auf der Abszisse sind die beobachteten Werte und auf der Ordinate die zu erwartenden Titerwerte bei Vorliegen einer Normalverteilung aufgetragen. Die vertikale Linie kennzeichnet den Cut-off von 10 Units.

- Das mehrmalige Testen von 20 ausgesuchten (Antikörper-positiven und Antikörper-negativen) nicht geblindeten Seren zeigte, dass der GADIA2-combi reproduzierbare Ergebnisse liefert. Zwar lag die Schwankungsbreite bei einigen Seren sehr hoch, es konnten aber alle Seren in ihrem Antikörperstatus in jedem Ansatz als „positiv“ bzw. „negativ“ bestätigt werden.
- Der GADIA2-combi-Test ist sensitiv bei der Detektion von Seren mit unterschiedlichem Antikörper-Status (aus GADA und IA2A). Sowohl doppelt negative als auch doppelt positive Seren erkannte der GADIA2-combi zu 100 %. Bei der Detektion von nur IA2-positiven Seren büßte der Test jedoch geringfügig an Sensitivität ein (87,5 %). Ebenso lag die Sensitivität mit 86,6 % bei der Identifikation der nur GADA-positiven Seren etwas niedriger. In beiden Gruppen lieferte der GADIA2-combi bei jeweils zwei Seren falsch negative Ergebnisse, wobei die GADIA2-combi-Titer der nicht korrekt detektierten GADA-positiven Seren mit 9,8 U bzw. 8,1 U nahe dem GADIA2-combi Cut-off lagen. Die GADIA2-combi-Titer von 3,8 U und 4 U der falsch negativ gemessenen IA2-positiven Seren sind jedoch deutlich im negativen Titerbereich. Die IA2A-Titer des Einzeltests sind aber auch hier mit 13,2 und 14 (Cut-off = 5 U) eher als niedrig anzusehen, da positive IA2A-Titer durchaus bei 200 U liegen können. Dieses Ergebnis

weiß aber daraufhin, dass der GADIA2-combi-Test bei Seren, die nur einen der beiden Antikörper im unteren Titerbereich aufweisen, eine Detektionsschwäche hat. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit anderen Studien, die einen kombinierten Nachweis dieser Diabetes-assoziierten Antikörper in erster Linie bei Patienten mit neumanifestem Typ-1-Diabetes evaluiert haben. Bonifacio et al. erzielten mit einem kombinierten Test eine Sensitivität von 88 % (vergleichbar mit ICA) und durch Receiver-Operating-Characteristic (ROC)-Plots (statistisches Verfahren zur Ermittlung von Antikörpergrenzwerten) konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass der kombinierte Test Patienten von Kontrollen besser diskriminieren konnte als separate Tests auf GADA bzw. IA2A allein [17]. Die Arbeitsgruppe um Kawasaki et al. berichtet von ähnlichen Ergebnissen. Hier konnte eine Übereinstimmung von 90 % zwischen dem kombinierten und der separaten Antikörpertests auf GADA und IA2A ermittelt werden. Detektionsschwächen zeigte der Test ebenfalls lediglich bei Seren mit Antikörpertitern im unteren Bereich [58]. Eine relativ neue Untersuchung von Bazzigaluppi et al. [11] konnte in einem heterogenen Untersuchungskollektiv von neumanifesten Typ-1-Diabetikern und erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern sogar eine 100%ige Übereinstimmung zwischen den Ergebnisse des kombinierten Tests und denen der separaten Tests auf GADA und IA2A ermitteln. In einer Studie von Wiest-Ladenburger et al. [140] wurden 204 erstgradig Verwandte von Typ-1-Diabetikern mit einem kombinierten GAD/IA2-Antikörper Test untersucht. Zwanzig Personen hatten positive Antikörpertiter. Dieses Ergebnis konnte nur in 17 Fällen (85 %) durch separate Tests bestätigt werden, drei Personen wurden falsch positiv detektiert. Eine Verlaufsbeobachtung im Hinblick auf eine etwaige Diabetesentwicklung der Antikörper-positiven Personen dieser Studie liegt bis jetzt allerdings nicht vor.

- Die GADIA2-combi-Titer korrelieren jeweils signifikant mit den IA2A- bzw. GADA-Titern der Einzeltests, d. h., dass die einzelnen Messwerte des GADIA2-combi nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ mit den Antikörper-Ergebnissen der Einzeltests korrespondieren. Diese Tatsache wird durch den Vergleich der Mittelwerte der GADIA2-combi-Titer von Patienten mit nur einem und Patienten mit zwei positiven Antikörpern (aus GADA und IA2A) noch unterstützt, da doppelt-positive Seren auch signifikant höhere GADIA2-combi-Titer aufweisen als einfach positive.
- Für die Kapillarblutentnahme wurde den Testpersonen - mit einer Lanzette (Bayer, Ponteaux, France) – zügig und tief in die Fingerbeere oder ins Ohrläppchen gestochen und der so entstandene Blutstropfen mittels einem heparinisierten Kapillargefäß aufgefangen. Unter den 46 Testpersonen waren 35 neumanifeste Typ-1-Diabetiker, die aufgrund häufiger Blutzuckerkontrollen im Zuge des Klinikaufenthaltes recht erfahren im Umgang mit diesem Blutentnahmesystem waren (wegen häufiger Laborkontrollen). Die Mehrheit dieser Personen (bis auf kleine Kinder) waren nach kurzer Einführung sogar in der Lage, das Blut bei sich selbst abzunehmen. Den weiteren 11 Normalpersonen wurde das Blut

abgenommen. Diese Personen empfanden die Kapillarblutentnahme durchweg als weniger schmerzhaft und angenehmer als die Venenblutentnahme. Im Durchschnitt wurden pro Testperson 100 μ l Plasma gewonnen. Da für den GADIA2-combi nur 6 μ l (bei Duplikaten 12 μ l) Plasma je Testperson eingesetzt werden, ist diese Menge absolut ausreichend.

4.1.3 GADIA2-combi-Antikörper bei Verwandten ersten Grades von Typ-1-Diabetikern

Mit der in der vorliegenden Arbeit standardisierten Methode zum kombinierten Nachweis von GAD- und IA2-Autoantikörpern ist ein Test verfügbar, der spezifische und reproduzierbare Ergebnisse liefert und damit die wesentlichen Voraussetzungen für ein Antikörper-Screening von Personengruppen mit einem erhöhten Diabetesrisiko erfüllt.

Das in der vorliegenden Studie untersuchte Testkollektiv von 1606 erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern weist eine GADIA2-combi-Antikörperprävalenz von 4,8 % (77/1606) auf. Die Personen sind durchschnittlich 5,4 Jahre in ihrem Antikörperverlauf beobachtet worden und alle 77 GADIA2-combi-positiven Seren wurden durch separate Tests auf GADA und IA2A bestätigt. 44 Personen waren positiv für GADA, wohingegen nur 4 Personen erhöhte IA2A-Titer hatten. Die restlichen 29 Personen hatten Antikörper gegen beide Antigene. 46 der 77 positiven Verwandten wurden bereits vorher durch ICA- und IAA-Tests als Antikörper-positiv identifiziert. Die weiteren 31 Personen sind jedoch ICA und IAA-negativ und wären in ihrem potentiellen Diabetesrisiko ohne ein Screening mit dem GADIA2-combi unentdeckt geblieben. Neben den 77 GADIA2-combi-positiven Verwandten hatten 9 Personen zwar Antikörper gegen ICA und IAA, (1 ICA, 8 IAA) waren aber, durch Einzeltests bestätigt, GADIA2-combi-negativ und wären bei einem ausschließlichen Screening mit dem GADIA2-combi ebenfalls vermisst worden.

Sensitivität des GADIA2-combi

Ein wesentlicher Anspruch, der an einen Antikörper-Screening-Test gestellt werden muss, ist die Sensitivität und die Qualität im Hinblick auf die Prädiktion einer möglichen Erkrankung. Da bei Abschluss der vorliegenden Studie von nur etwa der Hälfte ($n = 770$) des gesamten Untersuchungskollektivs ein aktueller Befund (Stichtag Dezember 1997) im Hinblick auf die Entwicklung eines Typ-1-Diabetes vorlag, dürfen sich alle Berechnungen zur Risikoabschätzung korrekterweise nur auf diese Untergruppe beziehen. Von den 770 Verwandten waren 86 für mindestens einen Antikörper positiv und insgesamt 24 Personen entwickelten bisher einen manifesten Typ-1-Diabetes. Hiervon waren bis auf zwei, alle Personen ($n = 22$) GADIA2-combi-positiv. Ein Kind erkrankte im Alter von 2 Jahren an Diabetes und hatte lediglich hochtitrige IAA (643 nU/ml). In der deutschen Multizenterstudie BABYDIAB (siehe Kapitel 2.1.2.3) sind ebenfalls zwei Kinder im Alter von 2 und 5 Jahren an Diabetes erkrankt. Sie waren ebenso für IAA positiv, jedoch für alle anderen Antikörper negativ [145]. Diese drei Kinder wären bei einem Risiko-Screening mit einem

ausschließlichen GADIA2-combi-Test nicht entdeckt worden. Darüber hinaus entwickelte eine Mutter eines an Diabetes erkrankten homozygoten Zwillingspaars 7 Jahre nach der ersten Untersuchung einen manifesten Typ-1-Diabetes und war auch in einer Kontrolluntersuchung zum Zeitpunkt des Studienabschlusses negativ für alle Antikörper. Es ist nicht auszuschließen, dass bei dieser Person während der 7 Jahre temporär Autoantikörper nachweisbar waren, die aber wieder zurückgegangen sind. Zu dem Schluss, dass der Antikörperstatus bei Diabetesmanifestation nicht das Ausmaß der Antikörperantwort während des gesamten Autoimmunprozesses widerspiegelt, kamen Ziegler et al. durch die Verlaufsbeobachtung bei mehr als 1350 Kindern diabetischer Eltern (von Geburt an) im Rahmen der BABYDIAB-Studie [145]. Kontrolluntersuchungen in regelmäßigen Abständen während der 7 Jahre hätten bei dieser Person eine Antikörperantwort eventuell zeigen können. Ungeachtet dessen ist auch diese Person durch den GADIA2-combi –aber auch durch alle anderen Screening-Tests –in ihrem bestehenden Diabetesrisiko nicht erkannt worden.

Die errechnete Sensitivität in der Vorhersage eines künftigen Typ-1-Diabetes für den GADIA2-combi lag bei 92 % (d. h. 22 der 24 erkrankten Personen wären vorzeitig erkannt worden) verglichen mit 79 % (19/24) bei einem ICA-Screening und 67 % (16/24), wenn nur IAA bestimmt worden wären. Mit einer Kombination der Screeningmethoden GADIA2-combi und IAA, konnte die Sensitivität maximal auf 96 % gesteigert werden. Mit diesem Screening-Ansatz wären somit alle später erkrankten Personen, bis auf die in allen Antikörpern negative Patientin, als Hochrisikopersonen detektiert worden. Bisher liegen keine vergleichbaren Studienergebnisse anderer Arbeitsgruppen vor, so dass eine entsprechende Gegenüberstellung anderer Befunde nicht erfolgen kann.

Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass der GADIA2-combi-Test als einzelner Test allen anderen Tests überlegen ist und in Kombination mit dem IAA-Test seine Sensitivität noch geringfügig gesteigert werden kann.

Prädiktiver Wert des GADIA2-combi

In der Literatur ist bis auf die bereits zitierte Arbeit von Wiest-Ladenburger et al. [140] keine vergleichbare Studie zur simultanen Detektion der Antikörper gegen GAD und IA2 bei erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern verfügbar. Die Befunde der vorliegenden Studie lassen sich aber durchaus mit denen aus separaten Tests auf GADA und IA2A vergleichen. So untersuchten Verge et al. [131] 882 erstgradig Verwandte von Typ-1-Diabetikern auf Diabetes-assoziierte Antikörper und fanden heraus, dass das Vorkommen von zwei oder mehr Antikörpern aus GADA, IA2A und IAA einen hohen prädiktiven Wert für eine spätere Diabetesentwicklung hat. Es wurden 97 % von ICA-positiven und 77 % von ICA-negativen Personen mit späterer Erkrankung an Diabetes mit einem kombinierten Screening auf GADA und IA2A identifiziert. Ähnliche Ergebnisse fanden Seissler et al. [111] mit einem kombinierten Screening auf GADA und IA2A von 1238 erstgradig Verwandten. Sie berichteten, dass 85 % aller ICA-positiven und 94 % der Patienten mit hohen ICA-Titern

detektiert wurden.

Für die Abschätzung des Diabetesrisikos bei GADIA2-combi-positiven Personen war sowohl die Spezifität der Antikörper GADA und IA2A als auch die Höhe der GADIA2-combi-Titer relevant. So stieg das kumulative Risiko innerhalb von 5 Jahren an einem Diabetes zu erkranken signifikant bei Personen, die GADA und IA2A hatten im Gegensatz zu GADA-Positivität allein (46 % vs. 15 %). Interessanterweise waren nur vier Personen ausschliesslich positiv für IA2A, von denen aber zwei innerhalb eines Jahres einen Typ-1-Diabetes entwickelten. Im Hinblick auf die sehr kleine Gruppe von vier Patienten, muss eine Interpretation dieser Beobachtung offen bleiben. Die Hypothese, dass das isolierte Auftreten von IA2A hier möglicherweise ein erhöhtes Risiko reflektiert, ist angesichts der kleinen Gruppe von vier Personen kritisch zu sehen. Es wurde jedoch darüber berichtet, dass das Vorliegen von IA2A – allerdings gemeinsam mit ICA oder IAA - mit einer schnellen Diabetesentwicklung in Zusammenhang steht [13].

Die Höhe der GADIA2-combi-Titer beeinflusst ebenfalls signifikant das kumulative Diabetesrisiko. Das Risiko lag bei 12 % für Personen mit Titern zwischen 10-50 Units und stieg auf 50 % für Verwandte ersten Grades von Typ-1-Diabetikern, die Titer > 50 Units aufwiesen. Hierbei scheinen hohe Antikörpertiter die Positivität für beide Antikörper (GADA und IA2A) zu reflektieren, da die Mehrheit der Verwandten mit GADIA2-combi-Titern > 50 Units beide Antikörper aufwies und Personen mit Titern < 50 Units nur für einen der beiden Antikörper positiv waren. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem der Vorversuche, bei dem signifikant höhere Antikörpertiter bei doppelt-positiven Seren ermittelt wurden (siehe Kapitel 3.1.1.6). Dass höhere Antikörper-Titer ein erhöhtes Diabetesrisiko widerspiegeln, wurde auch in einer anderen Studie beim Screening auf ICA ermittelt, so war hier das Risiko signifikant von der Höhe der ICA-Titer abhängig [14].

In dem Zusammenhang, dass das Diabetesrisiko abhängig von der Höhe der GADIA2-combi-Titer ist, wirft sich die Frage auf, ob ein GADIA2-combi-Cut-off von 10 Units gerechtfertigt ist. Zwar haben die QQ-Normalverteilungs-Plots eindeutig bestätigt, dass genau bei diesem Antikörperwert normale Titer von pathologischen zu diskriminieren sind, diese Tatsache muss aber nicht zwangsläufig bedeuten, dass dieser Grenzwert für die Prädiktion eines späteren Diabetes in der Praxis wirklich hilfreich ist. Die Beziehung zwischen der Sensitivität des GADIA2-combi und dem kumulativen Diabetesrisiko bei unterschiedlichen Grenzwerten hat gezeigt (siehe im Ergebnisteil 3.1.2.6 Abbildung 10), dass bei 10 Units zwar eine Sensitivität von fast 96 % erreicht wird, das 5-Jahres Risiko mit 29,1 % aber sehr gering ist. Erst bei einem deutlich höheren Grenzwert von 50 Units lag das Risiko bei 50% und der Test büßte mit 74 % an Sensitivität ein, lag damit aber immer noch im Bereich des ICA-Tests (79 %). Für die Praxis könnte dies heißen, dass Patienten mit GADIA2-combi-Titern zwischen 10-50 Units zunächst einen Antikörperbefund mit dem Hinweis auf ein niedriges Diabetesrisiko erhalten, aber in kurzen Intervallen von sechs Monaten nachuntersucht werden. Erst wenn die Antikörper-Titer bei > 50 Units liegen, ist der Patient über sein potentiell Diabetesrisiko zu informieren und z. B. ein oraler Glukosetoleranztest (OGTT) anzuraten.

Aufgrund der Beobachtungen, dass es erstens für das Diabetesrisiko eher unbedeutend ist, ob GADA oder IA2A vorliegen und vielmehr das Vorhandensein beider Antikörper Risiko steigernd ist und, dass zweitens hohe GADIA2-combi-Titer diesen Antikörperstatus zumindest quantitativ reflektieren können, relativiert sich die Schwäche des GADIA2-combi, die beiden Antikörper nicht diskriminieren zu können. Ungeachtetdessen ist es der Arbeitsgruppe um Kawasaki et al. [58] gelungen, die beiden Antigene GAD und IA2 mit zwei unterschiedlichen Isotopen zu markieren (^3H -Leucin für GAD und ^{35}S -Methionin für IA2), um so bei der Auswertung die jeweiligen Antikörper-Titer differenzieren zu können. Es werden in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. A.-G. Ziegler zwar Versuche zur Doppelmarkierung durchgeführt, die Ergebnisse des Tests kongruieren aber bisher noch nicht zufriedenstellend mit denen der Einzeltests. Da für einen umfassenden Antikörperbefund im Falle positiver GADIA2-combi-Titer bislang in jedem Fall ein separates Testergebnis beider Antikörper sinnvoll ist, sollten weitere Bestrebungen in diese Richtung folgen.

Abschätzung des Diabetesrisikos in Abhängigkeit weiterer Merkmale

Neben der Antikörperspezifität und Titerhöhe, wurde darüber berichtet, dass das Diabetesrisiko durch weitere Merkmale bestimmt wird [14, 131]. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Einfluss des Alters, des Verwandtschaftsstatus, der Insulinausschüttung nach einem IVGTT und der IAA-Status untersucht.

Unsere Beobachtung zeigte keinen zusätzlichen Einfluss des Alters auf das Diabetesrisiko bei GADIA2-combi-positiven Personen. Erstgradig Verwandte von Typ-1-Diabetikern mit GADIA2-combi-Titern über dem Cut-off hatten mit einem Alter unter 15 Jahren ein ähnliches Risiko nach fünf Jahren einen Diabetes zu entwickeln wie Personen über 15 Jahre (34,2 % vs. 26,7 %; $p = 0,97$ n. s.). Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit dem von Verge et al. [131], bei dem in einem Modell mit GADA, IA2A und IAA durch multivariate Analysen weder ICA noch das Alter der Person als unabhängige Kontributoren zur Risikoabschätzung bestätigt werden konnten. Im Gegensatz dazu war in der ICARUS-Studie mit einer sehr viel grösseren Kohorte [14] das Alter der Verwandten mit positiven ICA ein unabhängiger Prädiktor für einen späteren Diabetes. Ungeachtetdessen weiß man heute, dass der Autoimmunprozess des Typ-1-Diabetes, bereits sehr früh und dynamisch im Leben abläuft. Die eigene Arbeitsgruppe konnte anhand der BABYDIAB-Studie zeigen, dass im Alter von 2 Jahren bereits 11 % von 1353 Kindern diabetischer Eltern positiv für mindestens einen und 3,5 % sogar positiv für mehr als einen Antikörper waren. Die Kinder, mit mehr als einem positiven Antikörper im Alter von 2 Jahren, hatten ein Risiko von 50 % nach 5 Jahren einen Diabetes zu entwickeln [145]. So lässt sich zwar aufgrund der eigenen Beobachtungen nicht mit Bestimmtheit sagen, dass jüngere Kinder ein erhöhtes Risiko haben, doch scheint eine Initialuntersuchung auf Antikörper im frühen Kindesalter bei Risikopersonen zur rechtzeitigen Intervention sinnvoll zu sein.

Die eigenen Untersuchungen konnten ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen dem Diabetesrisiko und dem Verwandtschaftsstatus zeigen. So war das Risiko für Kinder

diabetischer Eltern ähnlich hoch, wie für Geschwister oder Elternteile eines Diabetikers (35 % vs. 23,6 % vs. 27 %; $p = 0,83$ n. s.). Da über den Einfluss des Verwandtschaftsstatus (Kind, Geschwister, Elternteil) auf das Diabetesrisiko bei GAD- und/oder IA2-positiven Personen bisher keine Untersuchungen vorliegen, ist ein Vergleich mit publizierten Ergebnissen nicht möglich.

Hingegen konnte eine Zunahme des Diabetesrisikos bei GADIA2-combi-positiven Verwandten mit einer verringerten Insulinausschüttung in der ersten Phase nach einem IVGTT beobachtet werden. Das Risiko nach fünf Jahren an einem Diabetes zu erkranken lag bei diesen Personen bei 68,6 % gegenüber Patienten mit normalen Werten, deren Risiko lediglich bei 12,5 % lag ($p = 0,01$). Ähnlich Resultate zeigte die Arbeitsgruppe um Verge et al. [131] bei Verwandten ersten Grades von Typ-1-Diabetikern mit einem oder mehreren positiven Antikörpern. Hieraus lässt sich schliessen, dass bei einem positivem GADIA2-combi-Befund ein IVGTT die Prognose eines künftigen Diabetes erhärten kann. Der Zeitpunkt für einen IVGTT sollte je nach Höhe der GADIA2-combi-Titer gewählt werden. Da Titer unter 50 U mit einem eher geringen Risiko gekoppelt sind, sollte zur näheren Charakterisierung des Diabetesrisikos ein IVGTT bei Patienten mit GADIA2-combi-Titern > 50 U indiziert sein.

Überdies ergab die eigene Untersuchung ein tendenziell, nicht aber signifikant erhöhtes Diabetesrisiko für GADIA2-combi-positiv Verwandte, die gleichzeitig positive IAA-Titer aufwiesen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Berechnungen zur Sensitivität, da sich durch ein zusätzliches Screening auf IAA die Sensitivität nur geringfügig steigern ließ. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint es nicht notwendig als Initialtest bei erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern den GADIA2-combi in Verbindung mit dem IAA-Test anzuwenden. Da aber, wie die eigene Arbeitsgruppe zeigen konnte [145], IAA als erste Antikörper im Autoimmunprozess des Diabetes auftreten und sie gerade bei Kindern unter 5 Jahren den höchsten prädiktiven Wert haben, ist die Kombination der beiden Tests in dieser Altersklasse zu empfehlen. Hierfür spricht auch die eigene Beobachtung des Kindes, dass durch den GADIA2-combi nicht entdeckt wurde und lediglich positiv für IAA war, im Alter von 2 Jahren aber einen manifesten Typ-1-Diabetes entwickelte. Unterstützt wird die Empfehlung auch durch das bereits oben dargestellte Ergebnis der BABYDIAB-Studie bzgl. zweier IAA-positiver Kinder mit Diabetesentwicklung im Alter von 2 und 5 Jahren. Die Wahl der Screeningmethode sollte demnach altersspezifisch differenziert erfolgen.

4.1.4 GADIA2-combi-Titer in Kapillarblut

Der Vergleich der GADIA2-combi-Titer in venösem Serum und kapillärem Plasma bei 46 Personen zeigte eine starke Übereinstimmung ($p < 0,001$). Der GADIA2-combi-Test detektierte im Kapillarblut zwar alle 25 Antikörper-positiven Personen, allerdings wurden drei Seren falsch positiv getestet. Demgegenüber wurden zwei Antikörper-positiv Seren im Venenblut falsch negativ getestet, da sie im separaten Test auf GADA bzw. IA2A positiv

waren. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass sich alle falsch getesteten Proben auf einem sehr niedrigen Niveau der Antikörpertiter befinden und die Fehlerhaftigkeit der Testergebnisse damit durchaus in einem tolerierbaren Bereich liegt. Zwar scheint der GADIA2-combi-Test im Kapillarblut in dieser Studie sensitiver zu sein als im Venenblut, doch muss hierbei das relativ kleine Kollektiv von 46 Personen in Betracht gezogen werden. Gerade im Hinblick auf falsch positive Ergebnisse im Kapillarblut, sollten weitere Untersuchungen an Normalpersonen bzw. Antikörper-negativen Personen folgen. Dieses Ergebnisse wurden bestätigt durch die erst kürzlich veröffentlichte Studie von Bazzigaluppi et al. [11] Diese Arbeitsgruppe fand sogar eine 100%ige Übereinstimmung des Kombi-Tests in kapillärem Vollblut im Vergleich zu den separat ermittelten GADA- bzw. IA2A-Titern in venösem Serum. In dieser Studie wurden gleich mehrere Substrate zur Antikörpermessung evaluiert. So wurden Einzeltests auf GADA, IA2A und ein kombinierter Test auf diese beiden Antikörper in Serum, Plasma, venösem Vollblut und kapillären Vollblut-Lysaten verglichen. Darüberhinaus untersuchte diese Gruppe das Serum und Eluate aus getrocknetem ICA-positivem Kapillarblut auf Filterpapier. Die Antikörperbefunde aus den Einzeltests und der kombinierten Messung sind konkordant in Serum, Plasma, venösem Vollblut und kapillären Vollblut-Lysaten. Die Antikörper-Titer im Test mit getrocknetem Kapillarblut lagen im Durchschnitt niedriger als in den Serumproben aus Venenblut. Dieser Test zeigte Detektionsschwächen bei sehr niedrigtitrigen Personen. Bazzigaluppi resümiert auf Grund dieser Ergebnisse, dass für ein Diabetesrisikoscreening ein Initialtest aus einem Tropfen getrocknetem Kapillarblut erfolgen kann. Diese Vereinfachung der Methode und die hierdurch verringerten Kosten sind ein entscheidender Schritt hinsichtlich der Realisierung eines großangelegten Risiko- bzw. Bevölkerungsscreenings zur Prädiktion eines Typ-1-Diabetes.

4.2 Gewebs (tissue)-Transglutaminase-C-Test (tTGC)

Die zentrale Bedeutung der tissue-Transglutaminase-C-Antikörper (tTGCA) in der Zöliakie scheint bereits gesichert. Auch dass die beiden Erkrankungen Typ-1-Diabetes und Zöliakie gehäuft gemeinsam vorkommen, ist bekannt. Kinder diabetischer Eltern haben aufgrund ihrer genetischen Prädisposition ein erhöhtes Diabetesrisiko. Ob sie aber auch ein erhöhtes Risiko besitzen an Zöliakie zu erkranken ist bisher unbekannt. Da für beide Erkrankungen die gleichen Risikogene eine Rolle spielen, ist es zu vermuten. Die Häufigkeit von Zöliakie-assoziierten Antikörpern in diesem Kollektiv könnte darüber Aufschluss geben. Antikörper gegen tTGC lassen sich auch bei Typ-1-Diabetikern nachweisen und werden analog dem Radiologanden-Bindungsassay (RBA) zum Nachweis der Diabetes-assoziierten Antikörper (GADA und IA2A) detektiert. Allerdings galt bei den bisherigen Untersuchungen das Augenmerk besonders einer Antikörperfraktion der tTGCA, den Immunglobulin-A (IgA)-Antikörpern. Antikörpern der Immunglobulin-Klasse-G (IgG) hält man in der Zöliakie generell für sehr unspezifisch. Aktuelle Studien deuten aber darauf hin, dass gerade den IgG-Antikörpern gegen tTGC beim Typ-1-Diabetes eine besondere Bedeutung zukommt. In jedem Fall dient eine Untersuchung dieser Antikörper bei Kindern diabetischer Eltern dazu, nähere Erkenntnisse über die Spezifität dieses Markers zu erlangen und in Verbindung mit den weiteren Zöliakie-assoziierten Antikörpern das Zöliakie-Risiko für für diese Risikopopulation zu ermitteln.

4.2.1 Untersuchungsgruppen

Da die verwendete Methode zum Nachweis von Autoantikörpern gegen tTGC im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls erst etabliert wurde, ist auch hier eine Kontrollgruppe von gesunden Personen, bei denen weder ein erhöhtes Risiko für einen Typ-1-Diabetes noch für Zöliakie bestand, zur Ermittlung des Normalbereichs in die Untersuchung mit einbezogen worden.

Als zweites Kontrollkollektiv diene eine Gruppe von neumanifesten Typ-1-Diabetikern. Aufgrund der Tatsache, dass ca. 1,0-7,8% der Typ-1-Diabetiker in Deutschland zusätzlich an Zöliakie erkranken [34, 128, 134, 2], und da tTGC offensichtlich ein zentrales Antigen der Zöliakie darstellt [38], ist diese Patientengruppe bereits in anderen Studien auf die Prävalenz dieser Antikörper hin untersucht worden [61, 62]. Dieses Studienkollektiv diene in der vorliegenden Studie zur Einordnung der Prävalenz der tTGCA-IgG im eigentlichen Untersuchungskollektiv Kinder diabetischer Eltern in einen Bezugsrahmen und zur Charakterisierung der Verteilung und Höhe der zu erwarteten Antikörper-Titer.

Das eigentliche Studienkollektiv für den tTGC-Antikörpertest bestand aus Kindern diabetischer Eltern, die bereits über einen längeren Zeitraum im Rahmen der prospektiven

BABYDIAB Studie am Institut für Diabetesforschung rekrutiert und prospektiv auf Diabetes-spezifische Autoantikörper untersucht wurden. Nachdem diese Kinder aufgrund ihrer genetischen Prädisposition als Personen mit einem erhöhten Diabetesrisiko gelten und da die betreffenden Risikoallele häufig auch für die Zöliakie zutreffen, bestand ein berechtigter Grund zur Annahme, dass diese Kinder auch ein erhöhtes Zöliakierisiko besitzen. Von dieser einzigartigen und besonders gut charakterisierten Risikopopulation standen alle konsekutiven Seren zur Verfügung, so dass u. a. der Zöliakie-assoziierte Immunprozess, gekennzeichnet durch das Auftreten aller Zöliakie-assoziierten Antikörper, erstmals prospektiv untersucht werden konnte.

4.2.2 Methode zum Nachweis von tissue-Transglutaminase-C-Antikörpern (tTGC) der Immunglobulinklassen G und A (IgG und IgA)

Zum Nachweis der tissue-Transglutaminase-C-Antikörper (tTGCA) wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Radioliganden-Bindungs-Assay (RBA) etabliert, dessen Methode prinzipiell der des GADIA2-combi-Tests entspricht. Im Zuge der Etablierung des tTGCA-Tests, wurde am Institut für Diabetesforschung ein neuer Szintillationscounter erstanden, wodurch eine Modifizierung des bisher angewandten RBA resultierte. Die bislang verwendeten Filtrationsplatten wurden durch deep-well-plates ersetzt und die Präparation der Filtrationsplatten mit BSA erübrigte sich hierdurch. Der TBST-Puffer (siehe 2.2.3.1) dient als Universalpuffer für alle Reaktions- und Arbeitsschritte des RBA. Diese Umstellung bedeutet eine weitere Vereinfachung des gesamten Tests, da nunmehr ein Puffer angesetzt werden muss.

Das Prinzip des RBA wurde, dem in anderen Labors verwendeten ELISA, als Nachweismethode der tTGCA vorgezogen, da eine mit unserem Labor assoziierte Arbeitsgruppe zeigen konnte, dass die Sensitivität und Spezifität des RBA dem des ELISA überlegen ist [61, 10]. Darüber hinaus ermöglicht diese Nachweismethode den kombinierten Nachweis mit GADA und IA2A als dreifach kombinierter Test („Tripple-Test“).

Für den tTGCA-Nachweis wird das radioaktiv markierte Antigen dem Patientenserum in einem Inkubationspuffer präsentiert. Die entstandenen Immunkomplexe aus Antigen und Antikörper werden beim Nachweis von tTGC-IgG-Antikörpern an Protein A Sepharose (bzw. bei tTGC-IgA-Antikörpern an Agarose-Beads) immobilisiert. Durch intensives Waschen werden die Immunkomplexe von überschüssigem Antigen und Inkubationspuffer befreit und die gebundene Radioaktivität durch Zugabe von Szintillationsflüssigkeit im Szintillationscounter evaluiert.

Lediglich durch den Austausch des Immunkomplex-Bindungsmediums (Protein A Sepharose bei IgG-Antikörpern und Anti-IgA kovalent gebundene Agarose-Beads bei IgA-Antikörpern)

lassen sich mit dem etablierten RBA beide Transglutaminase-C-Antikörperklassen nachweisen. Da mit einem IgG-Assay die Antikörper-positiven Patienten mit bei Zöliakie gehäuft auftretenden IgA-Mangel [29] auch erfasst werden, und generell wenige Forschungsergebnisse über die Bedeutung der IgG-Antikörper bei Zöliakie vorliegen, wurde in der vorliegenden Arbeit, obwohl IgG-Antikörper bei Zöliakie weitgehend als wenig spezifisch gelten [38], der Focus auf die Charakterisierung der tTGCA-IgG gerichtet. Bei Patienten mit erhöhten tTGCA-IgG, EMA oder AGA wurden alle konsekutiven verfügbaren Seren auf alle Zöliakie-assoziierten Antikörper untersucht, wobei dann auch tTGCA-IgA bestimmt wurden. Die mit unserem Labor kooperierende Arbeitsgruppe um Bonifacio et al. entwickelte im Hinblick auf die Optimierung eines tTGCA-Tests unlängst einen RBA [10], mit dem simultan beide tTGC-Antikörperfraktionen (IgG und IgA) bestimmt werden können. Hierdurch lassen sich die hohe Sensitivität des IgG-Tests mit der hohen Spezifität des IgA-Tests kombinieren. Nahezu alle Patienten mit Zöliakie (pathologischer Dünndarmbiopsiefund) wurden in dieser Studie mit dem kombinierten Test identifiziert (110/112 Patienten hatten IgG und 109/112 hatten IgA). Insgesamt erkannte der Test 111/112 Patienten und somit war der Test im Vergleich zum bisherigen „Goldstandard“ in der Prädiktion der Zöliakie, dem EMA-Test (identifizierte 109/112 Patienten), überlegen. Demgegenüber wurden mit dem EMA-Test nur 1,1 %, mit dem kombinierten tTGCA-Test aber 4,3 % der Normalpersonen positiv gemessen, womit der EMA-Test eindeutig spezifischer war. Im Rahmen eines Nachfolgeprojektes wird am Institut für Diabetesforschung derzeit ebenfalls ein kombinierter Test zum Nachweis beider tTGC-Antikörperklassen etabliert.

Vor diesem Hintergrund ist es sogar möglich, Zöliakie- und Diabetes-assoziierte Antikörper gleichzeitig mit einem Test zu detektieren. Denkbar wäre eine Kombination des GADIA2-combi mit dem genannten tTGCA-IgG/IgA-Kombitest. Die Vorstufe eines solchen „Vierfachtests“ ist Lampasona et al. [61] bereits gelungen zu etablieren. Sie kombinierten in einem Radioliganden-Bindungsassay den Nachweis von drei Antikörpern, nämlich GADA, IA2A und tTGCA-IgG, und konnten so sehr sensitiv sowohl unbehandelte Zöliakiepatienten als auch neumanifeste Typ-1-Diabetiker identifizieren. Dieser Test ließ sich ebenso wie der GADIA2-combi in kapillärem Plasma jedoch nicht in kapillärem Vollblut durchführen.

Festlegung des Cut-offs und Validierung des Tests

Für die Festlegung des Cut-offs für den tTGC-IgG-Tests wurden 209 gesunde Normalpersonen mit negativer Familienanamnese hinsichtlich eines Typ-1-Diabetes und einer Zöliakie getestet. In Anbetracht des Durchschnittsalters von 31,7 Jahren weicht dieses Kollektiv deutlich von dem eigentlichen Studienkollektiv von Kindern diabetischer Eltern ab. Es ist daher nicht auszuschließen, dass mit einem jüngeren Normalkollektiv ein anderer Grenzwert für Positivität ermittelt worden wäre. Da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen konnten, dass die Prävalenz der tTGCA-IgG eindeutig altersabhängig ist, sollte unbedingt ein weiteres im Alter angepasstes Kontrollkollektiv getestet werden. Mit der

Rekrutierung eines solchen Kontrollkollektivs wurde daher am Institut für Diabetesforschung im Rahmen einer auf die vorliegende Arbeit aufbauende Studie bereits begonnen.

Ungeachtetdessen erwies sich der tTGC-Test mit unserem laborinternen Cut-off von 2,4 Units durchaus als geeignet, EMA-positive Seren von -negativen zu diskriminieren, wie die Validierung des Tests ergab. Da Dietrich und Mitarbeiter zeigen konnten [38], dass die tissue-Transglutaminase-C das Antigen der durch den sogenannten Endomysiumtest nachgewiesenen Antikörper ist, sind EMA und tTGCA folglich gegen das gleiche Antigen gerichtet und somit lassen sich Ergebnisse beider Tests prinzipiell vergleichen. Die Gegenüberstellung der EMA-IgA-Ergebnisse mit denen des tTGCA-IgG-Tests in 17 Seren zeigte, dass der tTGCA-IgG-Test 11 von 13 EMA-positiven Seren erkannte. Ein weiteres tTGCA-IgG-negatives Serum wurde aber durch den tTGCA-IgA-Test erkannt. Trotzdem wurden streng genommen zwei von 13 EMA-positiven Seren nicht identifiziert, wobei diese beiden Seren trotz EMA einen negativen Biopsiefund hatten. In dem hier untersuchten Zusammenhang sei dieser Vergleich jedoch trotz unterschiedlicher Antikörperklassen gestattet, da es die Frage zu beantworten galt, ob der tTGCA-IgG-Test in der Lage ist, auf der Basis des EMA-Befundes, Antikörper-positive von Antikörper-negativen ("krank" von "gesund") zu diskriminieren und somit als Ersatz für den EMA-Test geeignet ist. Die war in dieser Arbeitsphase mit einem Cut-off von 2,4 U möglich.

4.2.3 Zöliakie-assoziierte Antikörper bei Kindern diabetischer Eltern

Prävalenz der tissue-Transglutaminase-C-Antikörper (tTGCA)

Die Häufigkeit von tTGCA-IgG unterschied sich innerhalb der drei Untersuchungsgruppen signifikant. Die Prävalenz war bei Kindern diabetischer Eltern 7-mal höher als bei gesunden Normalpersonen (3,6 % vs. 0,5%) und jeder 10. Typ-1-Diabetiker wies Antikörper gegen tTGCA-IgG auf. Da Kinder diabetischer Eltern bisher noch nicht auf tTGCA untersucht wurden (weder IgA- noch IgG-Antikörper), kann hier kein Vergleich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen erfolgen. Das Ergebnis bestätigt jedoch die eingangs aufgestellte Hypothese, dass nicht nur Typ-1-Diabetiker sondern auch deren Nachkommen vermehrt Antikörper gegen tTGC aufweisen.

Aufgrund der Tatsachen, dass grundsätzlich eine Verschiebung im Alter der Erstdiagnose einer Zöliakie beobachtet wird [4, 26, 136] und EMA insbesondere häufiger bei älteren Kindern (>2 Jahre) nachgewiesen werden [21], lag die Vermutung nahe, dass die Prävalenz der tTGCA ebenfalls altersabhängig ist. Dies konnte mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da innerhalb des Studienkollektivs der Kinder diabetischer Eltern, ein signifikanter Anstieg der Prävalenz der tTGCA mit zunehmendem Alter beobachtet werden konnte. Ventura [130] machte bei Zöliakiepatienten eine vergleichbare Erfahrung und vermutet sogar einen Zusammenhang mit der Dauer der Glutenexposition. Auf der Basis des

von Schuppan [107] erstellten Modells der Pathogenese der Zöliakie (siehe Kapitel 1.2 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese der Zöliakie) ist diese Theorie vorstellbar. Denn je länger bzw. öfter Gluten aufgrund des intestinalen Permeabilitätsdefektes bei prädestinierten Personen in die Lamina propria gelangt, umso intensiver sind möglicher Weise die folgenden Immunreaktionen, die u. a. auch die Produktion der genannten Antikörper beinhalten.

Antikörper gegen tTGC der Klasse IgA wurden bei allen tTGCA-IgG-positiven Kindern und bei nachweisbaren EMA oder AGA bestimmt. Insgesamt hatten 17 Kinder nachweisbare tTGCA-IgA, wobei hiervon nur ein Kind tTGCA-IgG-negativ war. Die Prävalenz der tTGCA-IgA war höher bei Kindern mit tTGCA-IgG-Titern > 10 Units. Eine ähnliche Beobachtung machte Lampasona bei Patienten mit Typ-1-Diabetes [62]. Dieser Befund gibt nochmals Anlass dazu, den gewählten Cut-off von 2,4 U zu diskutieren. Denn offensichtlich lässt sich die Gruppe der tTGCA-IgG-positiven Kinder anhand der Titerhöhe unterteilen in eine Gruppe mit niedrigen Titern (< 10 U) und in eine weitere mit Titern über 10 U. Diese zweite Gruppe ist überwiegend zusätzlich positiv für tTGCA-IgA und auch EMA. Da niedrige tTGCA-IgG-Titer häufiger bei Kindern unter 5 Jahren gemessen wurden, bedeutet diese Differenzierung, dass der tTGCA-IgG-Test mit der Wahl eines höheren Cut-offs (z. B. > 10 U), insbesondere bei jüngeren Kindern an Spezifität gewinnen könnte.

Da aber bisher unklar ist, welche Bedeutung auch niedrige tTGCA-IgG-Titer in der Pathogenese der Zöliakie bei Typ-1-Diabetikern zukommt, sollten erst weitere Untersuchungen zeigen, wie sinnvoll ein höherer Grenzwert für Positivität ist.

Prävalenz von Endomysium-Antikörpern (EMA) in Verbindung mit tissue-Transglutaminase-C-Antikörpern (tTGCA)

In der vorliegenden Studie hatten 3,3 % der auf alle vier Zöliakie-assoziierten Antikörper getesteten 520 Kinder einen positiven EMA-Befund und 3 % der im Alter von 5 Jahren getesteten Kinder hatten sowohl tTGC-IgG-Antikörper als auch EMA. Obwohl die Mehrheit dieser Kinder über keinerlei Zöliakie-typische Symptome klagte, korrelierte das Vorhandensein dieser Antikörper mit der durch Biopsien bestätigten Diagnose einer Zöliakie. Bei neun Kindern wurde bisher eine Biopsie durchgeführt und in 7 Fällen wurde eine Zöliakie festgestellt. Zwei der neun Kinder hatten eine regelrecht ausgebildete Mukosa, jedoch erhöhte Lymphozyten-Infiltrationen (IEL) und eines dieser Kinder zeigte sogar klinische Symptome einer Zöliakie. Dass eher die silenten bzw. latenten Formen der Zöliakie bei Patienten mit Typ-1-Diabetes vorherrschen, wurde häufig beobachtet [34, 75, 134] und durch die vorliegenden Ergebnisse auch für Kinder von Diabetikern bestätigt. Nicht nur die hohe Antikörperprävalenz bei Kindern diabetischer Eltern, sondern vor allem die erstaunlich hohe Erkrankungsrate bestätigt die eingangs aufgestellte Hypothese, dass nicht nur Diabetiker, sondern auch deren Kinder ein erhöhtes Zöliakierisiko besitzen und gleichfalls einem Zöliakierisiko-Screening unterzogen werden sollten.

Die Charakterisierung der EMA-Ergebnisse bei Kindern diabetischer Eltern diene in der vorliegenden Arbeit zusätzlich der Beurteilung der tTGCA-IgG-Ergebnisse, um den neuen Test in seiner Eignung für ein Risiko-Screening einordnen zu können. So waren EMA zwar eindeutig häufiger bei tTGCA-positiven Kindern nachweisbar (13/33), trotzdem wurden mit dem tTGCA-IgG-Test vier von insgesamt 17 EMA-positiven Kindern vermisst. Drei der vier mit dem tTGCA-IgG-Test nicht detektierten Kinder wurden auch mit dem tTGCA-IgA-Assay nicht erkannt, hatten aber auch den niedrigsten messbaren EMA-Titer. Ein weiteres Kind mit einem hohen EMA-Titer war zwar tTGCA-IgG negativ, wurde aber mit tTGCA-IgA-Test erkannt. Somit lässt sich der tTGCA-IgG-Test bei sehr jungen Kindern als wenig spezifisch und im Hinblick auf die Detektion EMA-positiver Personen als nur mässig sensitiv beurteilen (76,5 %). Anders verhält es sich in der Gruppe der älteren Kinder mit 5 und 8 Jahren (n=344). Hier erreichte der Test eine sehr viel höhere Sensitivität von 91,6%, indem er 10 von insgesamt 11 EMA-positiven Kinder erkannte.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass tTGCA-IgG nicht nur bei Zöliakie sondern auch beim Typ-1-Diabetes wenig spezifisch sind, auf der Basis der EMA-Ergebnisse eine altersabhängige Sensitivität aufweisen und daher mit den gestellten Ansprüchen an einen Marker für ein Risikoscreening nicht ohne weiteres herangezogen werden können. Andererseits zeigen die Ergebnisse aber auch, dass alle 9 an Zöliakie erkrankten Kinder des Studienkollektivs tTGCA-IgG hatten und somit keines dieser Kinder durch den Test vermisst wurde. Hinsichtlich der Detektion erkrankter Personen – und das ist für die Praxis bedeutend – ist der Test somit durchaus sensitiv.

Auf der Titerebene lassen sich die EMA- und tTGCA-IgG-Befunde ebenfalls näher beurteilen. Kinder diabetischer Eltern mit tTGCA-IgG-Titern unter 20 U sind EMA negativ und bei tTGCA-IgG-Titern darüber sind überwiegend auch EMA nachweisbar. Diese Kinder haben dann auch meist IgA-Antikörper gegen tTGC. Insofern unterstützt diese Beobachtung die Berechtigung der Frage, ob der Grenzwert 2,4 U praxisnah ist, da ein Grenzwert von z. B. 20 U die Spezifität des Tests deutlich steigern würde. Andererseits würde hierdurch möglicherweise die Sensitivität bei der Detektion von erkrankten Personen gesenkt.

Im Hinblick auf das Teil-Ziel dieser Arbeit, den Nachweis der tTGC-IgG-Antikörper möglicherweise als initialen Screening-Test zu etablieren, der sowohl sensitiv als auch spezifisch ist, und evtl. sogar geeignet ist, den bisherigen aufwändigen EMA-Test zu ersetzen, muss folgendes angemerkt werden. Zwar scheint es angesichts der gehäuft auftretenden Fälle eines IgA-Mangels bei Personen mit Zöliakie bzw. Risiko-Personen (in der vorliegenden Studie hatte eine Person einen IgA-Mangel) in gewissem Masse angemessen, IgG-Antikörper gegen tTGC zu bestimmen, doch erfüllt dieser Test nicht die geforderten Ansprüche an die Sensitivität und Spezifität. Da auch die vorliegende Arbeit zeigen konnte, dass IgA-Antikörper gegen tTGC im Vergleich zu IgG-Antikörpern spezifischer sind, ein IgG-Test aber auch Patienten mit einem IgA-Mangel erkennen kann, sollte in Zukunft als Initialtest ein kombiniertes Screening nach beiden Antikörperfraktionen eingesetzt werden. Erst bei einem positiven Ergebnis sollte im Bedarfsfall durch Einzeltests ein differenzierter Befund

angestrebt werden.

Ob bzw. welche Bedeutung jedoch die tTGC-IgG-Antikörper – und hier insbesondere die im niedrigen Titerbereich - dennoch bei Verwandten von Typ-1-Diabetikern haben, kann auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse leider nicht beantwortet werden. Lampasona [62] hat ebenfalls, obwohl IgG-Antikörper bei Zöliakie generell als wenig spezifisch gelten, tTGC-IgG-Antikörper in unterschiedlichen Kollektiven untersucht und einige interessante Ergebnisse und Theorien insbesondere bzgl. der von ihm beobachteten bemerkenswert hohen Prävalenz (42%) der tTGC-IgG bei Typ-1-Diabetikern zusammengestellt. In dieser Studie wurde u. a. die Prävalenz von tTGCA-IgG mit der von tTGCA-IgA bei Kontrollen, Typ-1-Diabetikern und Typ-2-Diabetikern verglichen. Und auch diese Studie konnte zeigen, dass das Vorhandensein von tTGCA-IgG scheinbar ein für den Typ-1-Diabetes spezifisches Phänomen ist, da Typ-2-Diabetiker kaum betroffen sind. Bezüglich des HLA-Phänotyps fand Lamposana, dass tTGCA-IgG-Antikörper häufiger mit HLADRB1*04 (Diabetes-typisch) und weniger mit dem für Zöliakie-typischen HLADRB1*03 korrespondierten. Er vermutet daher, dass bei diesen Patienten der Autoimmunprozess nicht, wie für die Zöliakie angenommen, durch Gliadin sondern durch einen andern Mechanismus vermittelt wird (zumal tTGCA-IgG-positive Personen auch überwiegend keine Antigliadin-Antikörper (AGA) hatten). Eine Autoimmunantwort gegen tissue-Transglutaminase-C im Rahmen einer direkten Immunisierung während der Phase der B-Zell-Zerstörung scheint ihm ebenfalls eine mögliche Erklärung. So kann man sich vorstellen, dass während der akuten Entzündungs- und B-Zellzerstörungs-Phase Transglutaminase-C in einer immunogenen Form präsentiert wird (möglicherweise durch bestimmte Allele wie DRB1*04 begünstigt) und so als Trigger für den Immunprozess fungiert. Ein anderer Weg könnte sein, dass Transglutaminase-C an Diabetes-assoziierte Antigene bindet, wie GAD, IA2 oder Insulin und so durch einen speziellen Mechanismus als Antigen erkannt wird. In einem Tiermodell einer anderen Autoimmunerkrankung konnte gezeigt werden, dass die Funktion der Transglutaminase-C, Intrazelluläre Proteinen, die während des Zelltods ausgeschüttet werden, kovalent zu binden, durch die Entwicklung von tTGCA-IgG beeinträchtigt war [94]. Lampasona et al. gehen daher davon aus, dass niedrige tTGCA-IgG-Spiegel, wie sie ja auch in der vorliegenden Arbeit in einer bestimmten Personengruppe beobachtet wurden, eine weitreichendere Bedeutung im Rahmen destruktiver Autoimmunität haben als bisher angenommen.

Diese Erklärungsansätze lassen sich jedoch nicht ohne weiteres auf das hier getestete Kollektiv der Verwandten von Typ-1-Diabetikern übertragen. Es muss berücksichtigt werden, dass es sich bei den hier untersuchten Kindern um Personen handelt, die nicht oder noch nicht an Diabetes erkrankt sind. Zwar wiesen insgesamt 42 Kinder Diabetes-assoziierte Antikörper auf, es konnte aber kein Unterschied in der Prävalenz der tTGC-IgG-Antikörper zwischen den Antikörper-negativen und-positiven ermittelt werden. Mehr noch, tTGCA-IgG waren sogar tendenziell (nicht signifikant) häufiger bei (Diabetes-)Antikörper-negativen Kindern nachweisbar. Insofern bleibt die Bedeutung der tTGC-IgG-Antikörper bei Kindern diabetischer Eltern an dieser Stelle offen. Dass ihnen eine bisher unbekannte Bedeutung

zukommt, ist durch die Beobachtung, dass sie in dieser Personengruppe 7-mal häufiger vorkommen als bei Normalpersonen, sehr wahrscheinlich. Möglicherweise haben tTGCA-IgG sogar einen prädiktiven Wert für einen Diabetes. Weitere Studien hierzu sind auf Grund des vorliegenden Datenmaterials absolut berechtigt und sollten in naher Zukunft folgen.

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass das Vorhandensein von EMA und EMA+tTGCA-IgG geschlechtsabhängig war, da Mädchen signifikant häufiger betroffen waren als Buben. Mehr noch, alle bioptisch gesicherten Zöliakieerkrankungen wurden bei Mädchen diagnostiziert. Dieser Befund deckt sich mit der bereits beobachteten weiblichen Prädominanz bei Patienten mit beiden Autoimmunerkrankungen, Typ-1-Diabetes und Zöliakie [34]. In welcher Weise das Geschlecht bei der Entwicklung einer Zöliakie eine Rolle spielt, sollten genetische Studien zeigen. Für die Praxis bedeutet dies, dass insbesondere bei weiblichen Nachkommen von Typ-1-Diabetikern mit einer Zöliakie gerechnet werden kann.

Prävalenz von Antigliadin-Antikörpern (AGA)

Die hier ermittelte hohe Prävalenz von AGA (IgG und IgA) bei Kindern diabetischer Eltern deckt sich mit dem bei Zöliakiepatienten beobachteten häufigen Vorkommen dieser Antikörper. Auch die Tatsache, dass insbesondere die IgG-Antikörper gegen Gliadin häufig gemessen wurden, stimmt mit anderen Befunden überein [10, 21]. Bei zwei der bisher 7 an Zöliakie erkrankten Kinder diabetischer Eltern wurden allerdings in keiner der konsekutiven Blutproben AGA gemessen. Die daraus resultierende niedrige Spezifität und Sensitivität lassen ein Pre-Screening mit AGA, zumindest für Kinder diabetischer Eltern, nicht empfehlenswert erscheinen. Welche Bedeutung den AGA dennoch in der Pathogenese der Zöliakie zukommen, bleibt unklar. Andererseits muss bedacht werden, dass der messbare Antikörperstatus im Serum nicht auch gleichermassen den der Mukosa widerspiegelt. So ist nicht auszuschließen, dass auch bei den Patienten mit negativem Serum-Befund AGA in der Mukosa vorhanden sind. Hummel et al. [bisher unveröffentlichte Studie] konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass das Auftreten von AGA in Abwesenheit von tTGCA und EMA bei dem gleichen Studienkollektiv negativ mit dem Zöliakie-assoziierten HLA-Allel DR3 korrelierte. Sie vermuten daher, dass eine Immunität gegen Gliadin ungeachtet der genetischen Disposition auftreten kann und die Entwicklung einer Autoimmunreaktion vielmehr das Vorhandensein Zöliakie-assoziiierter HLA-Allele für die Präsentation von tTGC oder tTGC-Gliadin-Komplexen erfordert. Dies würde auch das häufige Vorkommen der AGA bei Normalpersonen mit für die Erkrankung untypischen HLA-Typen erklären [10]. Welche Rolle den AGA in der Krankheitsentstehung der Zöliakie zukommt, sollten zukünftig Studien klären.

Verlaufsbeobachtung

Die vorliegende Untersuchung dokumentiert erstmals anhand einer prospektiven Analyse in einer Risikopopulation das zeitliche Auftreten von Zöliakie-assoziierten Antikörpern und der

damit verbundenen Relevanz für die Erkrankung an Zöliakie (siehe hierzu Tabelle 11). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Zöliakie-assoziierte Autoimmunität im Vergleich zur sehr gut dokumentierten Diabetes-assoziierten Autoimmunität in der gleichen Risikopopulation, später aber akuter auftritt [145]. Während sich Inselzell-Antikörper bei Kindern diabetischer Eltern bereits im ersten Lebensjahr feststellen lassen wurden Antikörper gegen tTGC und EMA nie vor dem zweiten Lebensjahr detektiert. Nur eine Minderheit die diese Antikörper entwickelte, hatte bereits nachweisbare AGA im ersten Lebensjahr. Beim Typ-1-Diabetes beobachtete die Arbeitsgruppe um Ziegler et al. [145] eine eher gleichförmige Autoimmunantwort im Frühstadium des Diabetesprozesses, da sie i.d.R. mit Insulin-Autoantikörpern beginnt und sich danach auf zusätzliche Antikörper (spreading) ausweitet. Bei der Zöliakie konnte hier keine spezifische Sequenz der Antikörper-Entwicklung festgestellt werden. Die Beobachtung, dass AGA, EMA und tTGCA – wenn sie detektiert werden – zunächst gleichzeitig gemessen werden, weist darauf hin, dass sich die Immun- und Autoimmunantwort bei der Zöliakie schnell entwickeln. Um diese Befunde zu bestätigen und um dadurch zum weiteren Verständnis der Pathogenese der Zöliakie beizutragen, sollten weitere Untersuchungen in anderen Populationen, insbesondere bei Kindern von Zöliakiepatienten, folgen. Für die Screeningpraxis bedeutet dieser Befund, dass auch bei negativem Antikörperbefund bei Risikopersonen in regelmässigen Abständen eine Kontrolluntersuchung durchgeführt werden sollte, um den Zeitpunkt einer potentiellen Antikörperentwicklung zu treffen. Es bedeutet aber auch, dass ein Antikörperscreening im Hinblick auf ein potentielles Zöliakie-Risiko bei Kindern diabetischer Eltern erst nach dem ersten Lebensjahr sinnvoll ist.

Bedeutung der Ernährung

Bemerkenswert ist der Befund, dass ein im Antikörperverlauf beobachtetes Kind, das sowohl Zöliakie- als auch Diabetes-assoziierte Antikörper aufwies, nach Diagnose der Zöliakie und damit Einführung einer Gluten-freien Ernährung, die Diabetes-assoziierte Autoimmunität nicht mehr nachweisbar war. Da eine transiente Positivität gegenüber Inselzell-Antikörpern beim Typ-1-Diabetes sehr ungewöhnlich ist [145], könnte dieses Phänomen ein Hinweis darauf sein, dass bei einigen Personen die humorale Expression im Rahmen der Inselzell-Autoimmunität durch eine Glutenexposition beeinflusst wird. Invers betrachtet könnte das protektive Phänomen einer Gluten-freien Ernährung auch die Erklärung für die häufig beschriebene Sequenz des Auftretens beider Erkrankungen sein, da zusätzlich zum Typ-1-Diabetes eine Zöliakie, äusserst selten jedoch zur Zöliakie ein Diabetes auftritt [134]. Von der omnipotenten Relevanz des Glutens im Hinblick auf die Beeinflussung des Antikörperstatus bei anderen Autoimmunerkrankungen (idiopathischer Hypoparathyreodismus, IgA-Nephropathie) wurde bereits berichtet [31, 142]. Vor diesem Hintergrund hat die eigene Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit dem Instituto Scintifico San Raffaele in Mailand ein Pilotprojekt gestartet, mit dem die Frage beantwortet werden soll, ob Gluten eine Determinante der Inselzell-Autoimmunität ist und ob der Typ-1-Diabetes womöglich durch

die Eliminierung des Glutens aus der Ernährung verhindert werden kann [18]. Hierbei werden noch nicht erkrankte Kinder diabetischer Eltern mit Diabetes-assoziierten Antikörpern für sechs Monate Gluten-frei ernährt, um festzustellen, ob die Titer der Diabetes-assoziierten Antikörper hierdurch gesenkt werden können oder sogar ganz zurückgehen. Bisher liegen leider noch keine publizierten Ergebnisse dieser Pilotstudie vor, da es durch eine niedrige Diät-Compliance zu einem Ausfall von Studienteilnehmern geführt hat. Die ersten vorläufigen Ergebnisse sind Mitte 2000 zu erwarten.

Neben dem definitiven Einfluss des Glutens als externer Trigger der Zöliakie, wird sowohl der Stilldauer als auch dem Zeitpunkt der Kuhmilchexposition in der Ernährung des Kindes eine Rolle zugeschrieben [76]. Ein solcher Zusammenhang zwischen der frühkindlichen Ernährung und einer Erkrankung wird auch für den Typ-1-Diabetes diskutiert [44, 132]. Eine umfassende Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe konnte jedoch keinerlei Zusammenhang zwischen der Stilldauer und der Entwicklung Diabetes-assoziiertes Antikörper bei Kindern diabetischer Eltern ermitteln [54]. Ebenso konnte die vorliegende Studie einen solchen Zusammenhang in Bezug auf eine Autoimmunreaktion weder gegen tTGC und EMA, noch gegen AGA-IgA zeigen. So waren tTGCA weder von der Dauer des ausschliesslichen Stillens noch von der Gesamt-Stilldauer abhängig.

Sehr überraschend waren hingegen die Ergebnisse, dass bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kindern diabetischer Eltern sowohl ein negativer Zusammenhang zwischen der Prävalenz der AGA-IgG und der Brusternährung vorlag, als auch bzgl. der mittleren Höhe der Antikörper-Titer in beiden Gruppen. Gestillte Kinder wiesen signifikant häufiger AGA-IgG auf als nicht gestillte Kinder und auch die mittleren Antikörper-Titer waren bei den gestillten Kindern signifikant höher. Mit der Aufteilung der gesamten analysierten Gruppe hinsichtlich des Alters relativierte sich dieser Zusammenhang jedoch, da eine signifikant höhere Prävalenz der AGA-IgG bei gestillten Kindern dann nur noch bei den 5-jährigen Kindern ermittelt wurde, nicht aber bei den Kindern im Alter von 2 und 8 Jahren. Eine Erklärung für dieses sehr interessante Phänomen muss an dieser Stelle offen bleiben, da in der Literatur keinerlei vergleichbare Ergebnisse zu finden sind.

Möglicherweise hat das Stillen aber einen Einfluss auf das Alter der Manifestation einer Zöliakie. So fanden Mäki et al. [76] heraus, dass mit zunehmender Stilldauer das Alter der Krankheitsmanifestation nach oben verschoben wurde. Dieses Phänomen könnte damit zusammenhängen, dass durch eine längere Stillphase Beikost und damit auch Gluten erst später in die Ernährung des Säuglings eingeführt wird und somit bei prädisponierten Personen auch erst verzögert als Trigger für eine Zöliakie fungieren kann.

4.3 Screening-Modell für erstgradig Verwandte von Typ-1-Diabetikern

Auf der Basis der Ergebnisse des GADIA2-combi-Tests und des tTGCA-Tests, lässt sich ein Modell für eine Screening-Strategie bei erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern erstellen. Das folgende Modell fasst die bisher bekannten und die aus der vorliegenden Studie erlangten praxisrelevanten Erkenntnisse für ein sinnvolles Antikörper-Screening in dieser Risikopopulation zusammen:

Tabelle 13: Screening-Modell zur Früherkennung von Typ-1-Diabetes und Zöliakie bei erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern

Screening-Phase	Alter (Jahre)	IAA-Test	GADIA2-combi-Test	tTGC-IgG/IgA-combi-Test
1	1-2	ja	nein	nein
2	2-3	ja	ja	ja
3	4-5	ja	ja	ja
4	>7	nein	ja	ja

Die Untersuchungen haben eindeutig gezeigt, dass ein einmaliges Screening auf beide Autoimmunerkrankungen wahrscheinlich nicht ausreichend ist. Idealerweise sollte ein Screening sehr früh im Leben der prädisponierten Personen angesetzt werden, um möglichst jede Phase des beginnenden Autoimmunprozesses beider Erkrankungen in dieser Risikopopulation frühzeitig erfassen zu können. Hierbei ist jedoch nicht jedes Antikörper-Screening gleichermassen geeignet, wie die Sensitivitätsberechnungen und Verlaufsbeobachtungen zeigen konnten. Aufgrund der Tatsache, dass IAA gerade bei jungen Kindern (<5 Jahre) den höchsten prädiktiven Wert besitzen wäre es sinnvoll, das kombinierte Screening auf beide Erkrankungen mit dem Test auf IAA zu beginnen. Ein geeigneter Zeitpunkt für diese Untersuchung scheint zwischen dem 1. und dem 2. Lebensjahr zu liegen. Dieser Test könnte z. B. im Rahmen der kindlichen Vorsorgeuntersuchung "U7" stattfinden. Da eine unlängst veröffentlichte Studie der eigene Arbeitsgruppe zeigen konnte, dass auch der neue IAA-Micro-Assay ebenso so sensitiv und spezifisch in kapillärem Vollblut ist wie der GADIA2-combi, lässt sich der Aufwand für diese Untersuchung erheblich reduzieren. Bei einem negativen Ergebnis erfolgt die nächste Untersuchung etwa ein Jahr später. Sollte der Test jedoch positiv sein, wird aus der Initialprobe der GADIA2-combi und ICA gemessen. Sollte sich der positive Befund auf IAA beschränken, muss eine Kontrolle nach sechs Monaten erfolgen.

In der 2. Screeningphase, die zwischen dem 2. und 3. Lebensjahr angesetzt sein sollte, wird

der IAA-Status überprüft und der GADIA2-combi eingesetzt. Gleichzeitig ist hier das erste Screening auf Zöliakie-Antikörper wie tTGCA-IgG und -IgA indiziert. Da die beiden Antikörperfraktionen mit erfreulich guten Ergebnissen kombiniert getestet werden können [10], ist dieser praktische Vorteil hierbei zu berücksichtigen. Durch die hohe Sensitivität dieser Methode kann daher auf ein Initial-Screening der bisher verwendeten EMA verzichtet werden. Prinzipiell spricht nichts dagegen auch hier den Test auf IAA und den GADIA2-combi mit Kapillarblut anzusetzen. Da aber die Information darüber, ob dies mittlerweile auch für den tTGC-Test möglich ist bei Abschluss der vorliegenden Arbeit leider nicht vorlag, kann an dieser Stelle keine definitive Empfehlung für ein Testsubstrat gegeben werden. Sollten Versuche zeigen, dass diese Methode keine verlässlichen Ergebnisse für den tTGCA-Test liefert, ist ein Test aus venösem Serum für alle Antikörper bei dieser Untersuchung natürlich sinnvoller. Ideal bleibt freilich die Vorstellung eines „Vierfachtests“ (GADIA2-combi + tTGCA-IgG/IgA) aus Kapillarblut. Ein Test auf EMA und AGA ist erst bei einem hoch positiven tTGCA-Ergebnis nötig, bei einem niedrigen Titer ist es zunächst angebracht, separat auf tTGCA-IgG und IgA zu testen. Wenn der GADIA2-combi positiv ist, ist ein Test auf ICA empfehlenswert. In beiden Fällen sollte der Patient jedoch in einem Zeitraum von sechs Monaten kontrolliert werden.

Die nächste Routinekontrolle im Rahmen dieses Screening-Modells ist etwa im Alter von 5 Jahren anzusetzen. Eventuell liesse sich diese Kontrolle auch mit einer Vorsorgeuntersuchung verbinden. In Frage kommen würden die U9, da sie zwischen dem 60. und 64. Lebensmonat empfohlen ist. Ob bei dieser Gelegenheit nochmals IAA getestet werden sollten oder nur im Falle eines positiven GADIA2-combi Befundes, ist zu überlegen. Einerseits bedeutet der Test einen zusätzlichen Kosten- und Mehraufwand, andererseits ist die Altersgrenze für den prädiktiven Wert dieses Markers sicher fließend. Idealerweise sollten daher wie in der vorherigen Untersuchung IAA, GADIA2-combi und tTGCA-IgG und -IgA gemessen werden. Bei positiven Befunden sind die gleichen Folgetests wie bei Screening-Phase 2 angeraten und ebenfalls eine sechsmonatige Kontrollperiode. Die vorerst letzte Kontrolle ist mit 8 Jahren vorgesehen. Hier wird der GADIA2-combi und der kombinierte tTGCA-Test angewendet. Die Optionen bei einem positiven Ergebnis decken sich mit denen der vorangegangenen Kontrollen.

Eine Verlaufsbeobachtung sollte freilich mit acht Jahren nicht abgeschlossen sein, doch können in diesem Moment keine Empfehlungen für die folgende Zeit gemacht werden. Eventuell ist eine Nachuntersuchung im Abstand von zwei oder drei Jahren sinnvoll. Um dies aber konkret belegen zu können, wären Verlaufbeobachtungen bzgl. der Antikörperentwicklung bei älteren Kindern hilfreich.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die gehäuft gemeinsam auftretenden Autoimmunerkrankungen Typ-1-Diabetes und Zöliakie sind bis heute in ihrer Pathogenese nicht vollständig geklärt, unheilbar und aufgrund ihrer assoziierten Morbidität in Form von Sekundärkomplikationen umso tragischer. Für beide Erkrankungen besteht zwar heute die Möglichkeit einer Früherkennung anhand spezifischer Antikörper, doch sind die Detektionstechniken teilweise für ein sinnvolles Risikoscreening ungeeignet.

Cytoplasmatische Inselzellautoantikörper (ICA) sind zweifellos nützliche Marker für die Prädiktion eines Typ-1-Diabetes, die Nachweismethode aber relativ unpräzise und kostenintensiv. Seit eine Glutamatdecarboxylase (GAD) und eine Tyrosinphosphatase (IA2) als die wesentlichen Antigene der Inselzell-Autoantikörper (ICA) entdeckt und quantitative Radioliganden-Bindungs-Assays (RBAs) gegen diese Antigene entwickelt wurden, tritt die Bedeutung der ICA im Rahmen der Früherkennung des Typ-1-Diabetes immer mehr zurück. Im ersten Teil der vorliegenden Studie wurde daher eine relativ einfache simultane Detektionstechnik beider Antikörper (GADIA2-combi) etabliert und erstmals bei erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern angewandt. Die Methode wurde darüberhinaus hinsichtlich ihrer Sensitivität und ihres prädiktiven Werts im Vergleich zu bereits etablierten Screeningmethoden auf ICA und Insulinautoantikörper (IAA) bewertet.

Es lassen sich für diesen ersten Teil der Arbeit folgende Ergebnisse zusammenfassen:

1. Von 1606 erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern hatten 77 (4,8 %) GADIA2-combi-Titer über der 99.sten Perzentile ermittelt aus 105 gesunden Normalpersonen. Dieser Befund wurde durch separate Tests auf GADA und IA2A zu 100 % bestätigt. Weitere 9 Personen hatten positive Antikörper aus ICA und IAA, waren aber negativ im GADIA2-combi. Dieser Befund wurde ebenfalls durch Einzeltests auf GADA und IA2A bestätigt.
2. Insgesamt entwickelten 24 der 1606 Verwandte einen manifesten Typ-1-Diabetes (Median Beobachtungszeit 5,6 Jahre). Hiervon waren 22 Personen im GADIA2-combi-Test positiv, eine Person hatte lediglich IAA und eine weitere Person war negativ für alle Antikörper. Der GADIA2-combi-Test erreichte als Einzeltest die höchste Sensitivität, bei der Detektion dieser Personen. Sie lag für den GADIA2-combi bei 92 %. Eine Kombination dieses Tests mit dem Test auf Insulinautoantikörper (IAA) erhöhte die Sensitivität lediglich auf 96 %. Die Sensitivitäten der einzelnen Tests auf die Antikörper GADA, IA2A, IAA und ICA lagen alle deutlich niedriger (86 %, 67 %, 67 %, und 79 %).
3. Die Höhe der GADIA2-combi-Titer beeinflusst signifikant ($p = 0,006$) die Höhe des Diabetesrisikos. Das kumulative Risiko (in %) nach fünf Jahren einen Diabetes zu

entwickeln stieg mit Zunahme Titerhöhe (>50 Units: 51 %; >10-50 Units: 12 %; <10 Units: 0,17 %) und in Abhängigkeit der Präsenz von GADA+IA2A (ermittelt durch Einzeltests) (beide: 47 %; nur GADA: 15 %; nur IA2A: nicht zu ermitteln, da nur vier Fälle).

4. Bei Verwandten mit positiven GADIA2-combi-Titern war eine niedrige Insulinausschüttung in der ersten Phase nach einem intravenösem Glukose-Toleranztest positiv mit einem erhöhten Diabetesrisiko korreliert. Demgegenüber war jedoch weder das Alter noch der Verwandtschaftsstatus ein zusätzlicher Kontributor für das Diabetesrisiko. Das Risiko stieg aber tendenziell für GADIA2-combi-positive Personen mit zusätzlicher IAA-Positivität (IAA+: 46 % vs. IAA-: 19 %; n.s.).
5. Der GADIA2-combi lässt sich ebenso zuverlässig in Kapillarblut anwenden, da die GADIA2-combi-Befunde in Kapillarblut stark mit Ergebnissen in Venenblut korrelierten (R^2 : 0,71; $p < 0,0001$).

Die Antikörper gegen die erst 1997 identifizierte Tissue-Transglutaminase-C (tTGC), die das Antigen der Endomysium-Antikörper (EMA) darstellt, sind neue Immunmarker in der Pathogenese der Zöliakie. Ihre Rolle in der Prädiktion dieser Erkrankung insbesondere im Rahmen der assoziierten Erkrankung Typ-1-Diabetes ist bisher jedoch nicht geklärt. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Detektionstechnik gegen tTGC-IgG-Antikörper etabliert und bei Kindern diabetischer Eltern analysiert. In einer prospektiven Untersuchung wurde erstmals die Abfolge und das zeitliche Auftreten aller derzeitig bekannten Zöliakie-assoziierten Antikörper in diesem Kollektiv charakterisiert.

Für den zweiten Teil der Arbeit lassen sich folgende Ergebnisse zusammenfassen:

1. tTGC-IgG-Antikörpertiter über dem Cut-off von 2,4 Units ermittelt aus 209 gesunden Normalpersonen, liessen sich bei 33 (3,6 %) der insgesamt 913 getesteten Kinder diabetischer Eltern detektieren. Im Vergleich dazu hatten 10 (10,1 %) der 99 manifesten Typ-1-Diabetiker und nur eine (0,5 %) der Kontrollperson IgG-Antikörper gegen tTGC. Die Prävalenz der Antikörper war signifikant altersabhängig (2,5 % bei 2 Jahren, 5 % bei 5 Jahren und 6,5 % bei 8 Jahren). Ebenso stieg die durchschnittliche Höhe der Antikörpertiter signifikant mit dem Alter (0,95 U bei Jahren, 1,82 U bei 2 Jahren und 5,64 U bei 8 Jahren).
2. Eine silente Form der Zöliakie (ohne klinische Symptome) wurde durch intestinale Biopsien bei 9 Kindern diabetischer Eltern diagnostiziert. Zwei weitere Kinder hatten eine regelrechte Mukosa, aber eine hohe Dichte an Lymphozyten-Infiltrationen. Bei allen 11 Kindern wurden Antikörper gegen tTGC nachgewiesen.
3. Die bei Zöliakie sehr spezifischen und sensitiven Marker EMA wiesen insgesamt 17 (3,26 %) der 520 auf diese Antikörper untersuchten Kinder auf. Hiervon waren 13 Kinder

tTGCA-positiv und nur 4 Kinder waren tTGCA-negativ. Auch die Prävalenz der EMA stieg tendenziell (jedoch nicht signifikant) mit zunehmendem Alter.

4. Anti-Gliadin-Antikörper (AGA) der Klasse IgG traten sehr häufig auf (23, 5 %). AGA-IgA hatten 3,5 % der untersuchten Kinder diabetischer Eltern. AGA (IgG und IgA) waren sowohl bei tTGCA-IgG-negativen als auch bei positiven Kindern prävalent und zeigten keine Assoziation mit dem Alter.
5. Das Auftreten von Zöliakie-assoziierten Antikörpern war unabhängig von Diabetes-assoziierten Antikörpern bei betroffenen Kindern. Ein Kind verlor jedoch GADA nach Einführung einer Gluten-freien Diät, was ein Hinweis dafür sein könnte, dass eine Gluten-freie Ernährung einen protektiven Einfluss auf die Autoimmunreaktionen des Typ-1-Diabetes haben könnte.
6. Die Verlaufsbeobachtung von 15 (1,6 %) sowohl tTGCA- als auch EMA-positiven Kindern zeigte, dass in zwei Fällen AGA vor tTGCA und EMA im Alter von 9 Monaten auftraten wobei in den übrigen Fällen Zöliakie-assoziierte Antikörper nie vor dem 2. Lebensjahr messbar waren. Drei Kinder hatten gar keine messbaren AGA. Diese Befunde deuten darauf hin, dass eine Zöliakie-assoziierte Autoimmunität bereits sehr früh im Leben von Kindern diabetischer Eltern beginnt.
7. Weder das Stillen ansich noch die Gesamtstilldauer hatte einen Einfluss auf die Entwicklung von tTGC-IgG-Antikörper. Überraschenderweise hatten gestillte Kinder signifikant häufiger AGA-IgG und auch höhere Antikörper-Titer als nicht gestillte Kinder.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass der GADIA2-combi sowohl in Venen- als auch Kapillarblut ein sehr spezifischer und sensitiver Test mit einem hohen prädiktiven Wert für die Vorhersage eines Typ-1-Diabetes bei erstgradig Verwandten von Typ-1-Diabetikern darstellt. Die Ergebnisse dieser Arbeit rechtfertigen daher den Einsatz dieses Tests anstelle des aufwändigen ICA-Tests für ein Initial-Screening in Risikogruppen bzw. auf Populationsebene.

Die vorliegende Arbeit konnte überdies zeigen, dass eine bemerkenswert hohe Anzahl an Kindern diabetischer Eltern bereits früh im Leben eine Zöliakie-assoziierte Autoimmunität und eine silente Form der Zöliakie aufweist. Es ist daher unbedingt zu befürworten, dass auch für dieses Risikokollektiv ein Screening auf Zöliakie-assoziierte Antikörper eingeführt wird. Die hier speziell evaluierten tTGC-IgG-Antikörper sind aufgrund ihrer geringen Spezifität für ein Initialscreening nicht ohne weiteres geeignet, jedoch ist eine Kombination dieser Antikörperfraktion mit den sehr viel spezifischeren tTGC-IgA-Antikörpern ein idealer Test, den EMA-Test in einem Risikoscreening in diesem Kollektiv zu ersetzen .

6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Aanstoot HJ, Sigurdsson E, Jaffe M, Shi Y, Christgau S, Grobbee D, Bruining GJ, Molenaar JL, Hofman A, Baekkeskov S: Value of antibodies to GAD65 combined with islet cell cytoplasmic antibodies for predicting IDDM in a childhood population. *Diabetologia* 37: 917-924, 1994
- [2] Acerini CL, Ahmed ML, Ross KM, Sullivan PB, Bird G, Dunger DB: Coeliac Disease in Children with IDDM: Clinical Characteristics and Response to Gluten-free Diet. *Diabetic Medicine* 15: 38-44, 1998
- [3] Arató A, Kósnai I, Szönyi L, Tóth M: Frequent past exposure to adenovirus 12 in coeliac disease. *Acta Paediatr Scand* 80: 1101-1102, 1991
- [4] Ascher H, Krantz I, Kristiansson B: Increasing incidence of coeliac disease in Sweden. *Arch Dis Child* 66: 608-611, 1991
- [5] Atkinson MD, Maclaren NK, Sharp DW, Lacy PE, Riley WJ: 64,000 M_r autoantibodies as predictors of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 335: 1357-1360, 1990
- [6] Badenhoop K, Böhm BO, Häring HU, Usadel K.-H.: Klassifikation, Ätiologie, Pathogenese, Epidemiologie, Verlauf und Prognose. In: Mehnert H, Schöffling K, Standl E, Usadel K.-H. (Hrsg.): *Diabetologie in Klinik und Praxis*. Thieme Verlag, Stuttgart 1994
- [7] Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, De Camilli P: Identification of the 64k autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347: 151-156, 1990
- [8] Baekkeskov S, Landin M, Kristensen J, Srikantan S, Bruining GJ, Soeldner K, Eisenbarth G, Lindgren F, Sudquist G, Lernmark A: Antibodies to a M_r 64,000 autoantibodies as predictors of insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 70: 926-934, 1987
- [9] Baum H, Davies H, Peakman M: Molecular mimicry in the MHC: hidden clues to autoimmunity? *Immunol Today* 17: 68-70, 1996
- [10] 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
- [11] Bazzigaluppi E, Bonfanti R, Bingley PJ, Bosi E, Bonifacio E: Capillary Whole Blood Measurement of Islet Autoantibodies. *Diabetes Care* 22: 275-279, 1999
- [12] Bendelac A, Carnaud C, Boitard C, Bach JF: Syngenic 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
- [13] Bingley PJ, Christie MR, Bonifacio E, Bonfanti R, Shattock M, Fonte MT, Bottazzo GF, Gale EAM: Combined Analysis of Autoantibodies Improves Prediction of IDDM in Islet Cell Antibody-Positive Relatives. *Diabetes* 43: 1304-1310, 1994
- [14] Bingley PJ: Interactions of age, islet cell antibodies, insulin autoantibodies, and first-phase-insulin response in prediction risk progression to IDDM in ICA+ relatives: the ICARUS data set. Islet Cell Antibody Register Users Study. *Diabetes* 45: 1720-1728, 1996
- [15] Bonifacio E, Bingley PJ, Dean BM, Shattock M, Dunger D, Gale EAM, Bottazzo GF: Quantification of islet cell antibodies and prediction of insulindependent diabetes. *Lancet* 335: 147-149, 1991
- [16] Bonifacio E, Genovese S, Braghi S, Bazzigalupi E, Lampasona V, Bingley PJ, Rogge L, Pastore MR, Boggetti E, Bottazzo GF, Gale EAM, Bosi E: Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity. *Diabetologia* 38: 816-822, 1995
- [17] Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E: Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40k autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *J Immunol* 155: 5419-5426, 1995
- [18] 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.* 14(3): 259-260, 1998
- [19] Borchers-Johnson K, Zachauer-Christiansen B, Mandrup-Poulsen T, Joner G, Christie M, Kastrup K, Nerup J: Relation between breastfeeding and incidence rates of insulin-dependent diabetes mellitus: a hypothesis. *Lancet* 2: 1083-1086, 1984
- [20] Bottazzo GF, Pujol-Borrell R, Gale E: Aetiologie of diabetes: the role of autoimmune mechanisms. In: *Diabetes Annual/I*. Alberti KGMM, Krall LP (eds.) Amsterdam; Elsevier, 16-52, 1985

- [21] Bürgin-Wolff A, Gaze H, Hadziselimovic F, Huber H, Lentze MJ, Nussle D, Reymond-Berthet C: Antigliadin and antiendomysium antibody determination for coeliac disease. *Arch Dis Child* 66(8): 941-947, 1991
- [22] Brandtzaeg P, Bengtsson TS, Halstensen TS et al.: Mucosal immunology and food antigens. In: Food allergy and food intolerance. Somogyi JC, Müller HR, Ockhuizen TH eds. *Bibl Nutr Dieta* No. 48. Basel: Karger, 1991, S. 30-54
- [23] Carter MJ, Willkocks MM, Mitchison HC, Record CO, Madeley CR: Is a persistent adenovirus infection involved in coeliac disease? *Gut* 30: 1563-1567, 1989
- [24] Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, Rossini M, Bordicchia F, Candela F, Coppa GV, Giorgi PL: Coeliac Disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 343: 200-203, 1994
- [25] Catassi C, Fabiani E, Ratsch IM, Coppa GV, Giorgi PL: Celiac disease in the general population: Should we treat asymptomatic cases? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 24 (suppl. 1): 10-13, 1997
- [26] Cavell B, Stenhammer L, Ascher H, et al: Increasing incidence of childhood coeliac disease in Sweden. Results of a national study. *Acta Paediatr Scand* 81: 589-592, 1992
- [27] Christie MR, Roll U, Payton MA, Hatfield ECI, Ziegler AG: Validity of screening for individuals at risk for type 1 diabetes by combined analysis of antibodies to recombinant proteins. *Diabetes Care* 20: 965-970, 1997
- [28] Christie MR, Tun RYM, Lo SSS, Cassidy D, Brown TJ, Holland J, Shattock M, Bottazzo GF, Leslie RDG: Antibodies to GAD and tryptic fragments of islet 64k antigen as distinct markers for development of IDDM. Studies with identical twins. *Diabetes* 41: 782-787, 1992
- [29] 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
- [30] Colyer J, Kumar PJ, Waldron NM, Clark ML, Farthing MJG: Gliadin binding to rat and human enterocytes. *Clin Sci* 72: 593-598, 1987
- [31] Coppa R: The pathogenetic potential of environmental antigens in IgA-nephropathy. *Am J Kidney Dis* 12: 420-424, 1988
- [32] Corazza GR, Biagi F, Andreani ML, Gasbarrini G: Screening test for coeliac disease. *Lancet* 49: 325-326, 1997
- [33] Cornell HJ: Mucosal digestion studies of whole gliadin fractions in coeliac disease.

- Ann Clin Biochem 27: 44-49, 1990
- [34] Cronin CC, Shanahan F: Insulin-dependent diabetes mellitus and coeliac disease. *Lancet* 349: 1096-1097, 1997
- [35] Davidson AGF, Bridges MA: Coeliac disease : A critical review of aetiology and pathogenesis. *Clin Chim Acta* 163: 1-40, 1987
- [36] Degli Esposti M, Mackay IR: The GABA network and the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 40: 352-356, 1997
- [37] Diabetes Epidemiology Research International Group: secular trends in incidence of childhood IDDM in 10 countries. *Diabetes* 39: 858-864, 1990
- [38] Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D: Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease. *Nature medicine* 7: 797-801, 1997
- [39] Dieterich W, Laag E, Schöpfer H, Volta U, Ferguson A, Gillet H, Riecken EO, Schuppan D: Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of coeliac disease. *Gastroenterology* 115: 1317-1321, 1998
- [40] Eisenbarth JS, Colman P, Ziegler AG: Pathogenesis of IDDM. In 13th edition *Joslin Textbook* (Weir GC, Kahn CR, eds), 219-240, 1996
- [41] EMRC/ESPGHAN Working Group – Serological Screening for CD. Protocol 5th Workshop. Ring Test Data. Protocol Trieste 1998
- [42] Endl J, Otto H, Jung G, Meinel E, Hummel M, Ziegler AG, Wank R, Schendel DJ: Identification of naturally processed T cell epitopes from glutamic acid decarboxylase presented in the context of HLA-DR alleles by T lymphocytes of recent onset IDDM patients. *J Clin Invest* 99: 2405-2415, 1997
- [43] Ferguson A, Kingstone K: Coeliac disease and malignancies. *Acta Paediatr* 412: 78-81, 1996
- [44] Gerstein HC: Cow's milk exposure and type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Care* 17: 13-19, 1994
- [45] Gorus F, Goubert P, Semakula C, Vandewalle CL, De Schepper J, Scheen A, Christie MR, Pipeleers DG, the Belgian Diabetes Registry: IA-2-autoantibodies complement GAD65-autoantibodies in new-onset IDDM patients and help predict impending diabetes in their siblings. *Diabetologia* 40: 95-99, 1997
- [46] Greco L, Tozzi AE, Mayer M, Grimaldi M, Silano G, Auricchio S: Unchanging clinical picture of coeliac disease presentation in Campania, Italy. *Eur J Pediatr* 148:

- 610-613, 1986
- [47] Greco L, Mäki M, Di Donato F, Visakorpi JK: Epidemiologie of coeliac disease in Europe and the Mediterranean area: In: Auricchio S, Visakorpi JK, eds. *Common food intolerances 1: Epidemiology of coeliac disease*. Dynamic Nutrition Research. Basel: S Karger AG, S. 25-44, 1992
- [48] Greco L, Dàdamo G, Truscelli A, Parrilli G, Mayer M, Budillon G: Intestinale permeability after single dose gluten challenges in coeliac disease. *Arch Dis Child* 66: 870-872, 1991
- [49] Grodzinsky E, Franzen L, Hed J, Ström M. High prevalence of celiac disease in healthy adults revealed by antigliadin antibodies. *Ann Allergy* 96:66-70, 1992
- [50] Grubin CE, Daniels T, Toivola B, Landin-Olsson M, Hagopian WA, Li L, Karlens AE, Boel E, Michelsen B, Lernmark A: A novel radioligand binding assay to determine diagnostic accuracy of isoform-specific glutamic acid decarboxylase antibodies in childhood IDDM. *Diabetologia* 37: 344-350, 1994
- [51] Harms HK: Die Zöliakie. In: *DZG medizin. Deutsche Zöliakie-Gesellschaft e.V. (Hrsg.). Stuttgart, 1998, S. 4-14*
- [52] Holmes GKT: Non malignant complications of coeliac disease. *Acta Paediatr* 412: 68-75, 1996
- [53] Holmes GKT et al.: Malignancy in coeliac disease – effect of gluten free diet. *Gut* 30: 333-338, 1989
- [54] Hummel M, Schenker M, Ziegler AG: Appearance of diabetes-associated antibodies in children of diabetic parents is independent from environmental factors. *Diabetologia (supplement 1)* 41: A91, 1998
- [55] Hummel M, Ziegler AG: Vaccines and the Appearance of Islet Cell Antibodies in Offspring of diabetic Mothers: Results from the BABY-DIAB Study. *Diabetes Care* 19: 1456-1457, 1996
- [56] Itoh A, Maki T: Protection of nonobese diabetic mice from autoimmune diabetes by reduction of islet mass before insulinitis. *Proc nat Acad Sci* 93: 11053-11056, 1996
- [57] Johnston SD, Watson RGP, McMillan SA, Sloan J, Love AHG: Prevalence of coeliac disease in Northern Ireland. *Lancet*: 1370, 1997
- [58] Kawasaki E, Yu L, Gianani R, Vertge CF, Babu S, Bonifacio E, Eisenbarth GS: Evaluation of islet cell antigen (ICA)512/IA-2 autoantibody radioassays using overlapping ICA512/IA-2 constructs. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 375-379, 1997

- [59] Kröncke KD, Funda J, Berschick B, Kolb H, Kolb Bachofen V: Macrophage cytotoxicity towards isolated rat islet cells: neither lysis nor its protection by nicotinamide are beta-cell specific. *Diabetologia* 34: 232-238, 1991
- [60] Ladinsler B, Rossipal E, Pittschieler K: Endomysium antibodies in coeliac disease: an improved method. *Gut* 35: 776-778, 1994
- [61] Lampasona V, Bazzigaluppi E, Barera G, Bonifacio E: Tissue transglutaminase and combined screening for coeliac disease and type 1 diabetes-associated autoantibodies. *Lancet* 352: 1192-1193, 1998
- [62] 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
- [63] La Porte RE, Orchard TJ, Kuller HL, Wagener DK, Drash AL, Schneider BB, Fishbein HA: The Pittsburgh insulin-dependent diabetes mellitus registry: the relationship of insulin-dependent diabetes mellitus incidence to social class. *Amer J Epidemiol* 114: 379-384, 1991
- [64] Lan MS, Lu J, Goto Y, Notkins AL: Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma. *Dev Biol* 163: 505-514, 1994
- [65] Leslie RDG, Atkinson MA, Notkins AL: Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 42: 3-14, 1999
- [66] Leslie RDG, Pyke DA: The genetics of diabetes. In: Alberti KGMM, Krall LP (eds.) *The Diabetes Annual 3*. Amsterdam, Elsevier, S. 39-54, 1986
- [67] Levy-Marchal C, Patterson C, Green A, on behalf of the EURODIAB ACE Study Group: Variation by age group and seasonality at diagnosis of childhood IDDM in Europe. *Diabetologia* 38: 823-830, 1995
- [68] Logan RFA: Problems and pitfalls in epidemiological studies of coeliac disease. In: Auricchio S, Visakorpi JK, eds.: *Epidemiology of coeliac disease. Common food intolerances*, 1: 14-24, Basel, Karger, 1992
- [69] Logan RFA, Rifkind EA, Busuttil A, Gilmour HM, Ferguson A: Prevalence and „incidence“ of celiac disease in Edinburgh and the Lothian region of Scotland. *Gastroenterology* 90: 334-342, 1986
- [70] Lorenzsonn V, Olsen WA: In vivo responses of rat intestinal epithelium to intraluminal dietary lectins. *Gastroenterology* 82: 838-848, 1982

- [71] Mahon J, Blair GE, Wood GM, et al.: Is persistent adenovirus 12 infection involved in coeliac disease? A search for viral DNA using the polymerase chain reaction: *Gut* 32: 1114-1116, 1991
- [72] Mäki M, Holm K, Lipsanen V, Hällström O, Viander M, Collin P, Savilahti E, Koskimies S: Serological markers and HLA genes among healthy first-degree relatives with coeliac disease. *Lancet* 338: 1350-1353, 1991
- [73] Mäki M: The humoral immune system in coeliac disease. *Bailliers Clin Gastroenterol* 9: 231-249, 1995
- [74] Mäki M, Collin P: Coeliac disease. *Lancet* 349: 1755-1759, 1997
- [75] Mäki M, Huupponen T, Holm K, Hällström O: Seroconversion of reticulin autoantibodies predicts coeliac disease in insulin dependent diabetes mellitus. *Gut* 36: 239-242, 1995
- [76] Mäki M, Holms K: Incidence and prevalence of coelic disease in Tampere. Coeliac disease is not disappearing. *Acta Paediatr Scand* 79: 980-982, 1990
- [77] Mäki M, Kallonen K, Lähdeaho ML, Visakorpi JK: Changing pattern of childhood coeliac disease in Finland. *Acta paediatr Scand* 77: 408-412, 1988
- [78] Marsh MN: The natural history of gluten sensitivity: defining, refining and redefining. *QJM* 88: 9-13, 1995
- [79] Marshall MO, Hoyer PE, Peterson JS, Hejnaes KR, Genovese S, Dyrberg T, Bottazzo GF: Contribution of glutamate decarboxylase antibodies to the reactivity of islet cell cytoplasmatic antibodies. *J Autoimmunity* 7: 497-508, 1994
- [80] Maton PN, Selden AC, Fitzpatrick ML, Chadwick VS: Defective gall-bladder emptying and cholecystokinin release in celiac disease: reversal by gluten-free diet. *Gastroenterology* 88: 391-396, 1985
- [81] McMillan SA, Watson RPG, McCrum EE, Evans AE: Factors associated with serum antibodies to reticulin, endomysium, and gliadin in an adult population. *Gut* 39: 43-47, 1996
- [82] Menser MA, Forrest JM, Bransby RD: Rubella infection and diabetes mellitus. *Lancet* 1: 57-60, 1978
- [83] Michaelis D, Jutzi E, Heinke P: Inzidenz- und Prävalenztrend des juvenilen Typ-1-Diabetes in der ostdeutschen Bevölkerung. *Diabet Stoffw* 2: 245-250, 1993
- [84] Muntoni S, Font MT, Stoduto S, Marietti G, Bizzarr C, Crino A, Ciampalini P,

- Multari G, Suppa MA, Matteoli MC, Lucentini L, Sabastiani LM, Visalli N, Pozzilli P, Boscherini B, Mintoni S: Incidence of insulin dependent diabetes mellitus among Sardinian-heritage children born in Lazio region, Italy. *Lancet* 349: 160-162, 1997
- [85] Murch S, Walker-Smith J: Die Immunologie der Zöliakie. In: *Annales Nestlé*, Vol. 51/2, Schweiz: Les Presses de la Venoge, S. 64-71, 1993
- [86] Mustalahti K, Collin P, Sievänen H, Salmi J, Mäki M: Osteopenia in patients with clinically silent coeliac disease warrants screening. *Lancet* 354: 744-745, 1999
- [87] Mylotte M, Egan-Mitchell B, McCarthy CF, McNicholl B: Incidence of Coeliac disease in the West of Ireland. *BMJ* 1: 703-705, 1973
- [88] Naserke HE, Dozio N, Ziegler AG, Bonifacio E: Comparison of a novel micro-assay for insulin autoantibodies with the conventional radiobinding assay. *Diabetologia* 41: 681-683, 1998
- [89] National Diabetes Data Group. Classification und diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 28: 1039-1057, 1979
- [90] Norris JM, Beaty BB, Klingensmith G, Yu L, Hoffman M, Chase P, Erlich H, Hamman RF, Eisenbarth GS, Rewers M: Lack of Association between early exposure to cow's milk protein and B-cell autoimmunity. *J Amer med Ass* 276: 609-614, 1996
- [91] Oberhuber G: Die Immunologie der Zöliakie. *Leber Magen Darm* 29: 169-172, 4/1999
- [92] Payton M, Hawke C, Christie MR: Relationship of the 37,000- and 40,000-Mr tryptic fragment of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 (ICA512). *J Clin Invest* 96: 1506-1511, 1995
- [93] Peterson JS, Hejnaes KR, Moody A, Karlsen AE, Marshall MO, Høien-Madsen M, Boel E, Michelsen BK, Dyrberg T: Detection of GAD65 antibodies in diabetes and other autoimmune diseases using a simple radioligand assay. *Diabetes* 43: 459-467, 1994
- [94] Piredda L, Amendola A, Colizzi V et al.: Lack of tissue transglutaminase protein cross-linking of macromolecules from dying cells: relationship to development of autoimmunity in MRLPlpr/lpr mice. *Cell Death and Differentiation* 4: 463-472, 1997
- [95] Rabin DU, Pleasic SM, Shapiro JA, Yoo-Warren H, Oles J, Hicks JM, Goldstein DE, Rea PMM: Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. *J Immunol* 152: 3183-3188, 1994

- [96] Rabinovitch A: Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes* 43: 613-621, 1994
- [97] Richter W, Endl J, Eiermann TH, Brandt M, Kientsch-Engel R, Thivolet C, Pujol-Borrell, Jungfer H, Scherbaum WA: Human monoclonal antibodies from patients with type 1 diabetes reveal glutamate decarboxylase as the major cytoplasmic islet cell antigen. *Proc nat Acad Sci* 89: 8467-8471, 1992
- [98] Roep BO, Kallan AA, Duinkerken G, Arden SD, Hutton GC, Bruining GJ, De Vries RRP: T-cell reactivity to beta-cell membrane antigens associated with beta-cell destruction in IDDM. *Diabetes* 44: 278-283, 1995
- [99] Roll U, Christie MR, Füchtenbusch M, Payton MA, Hawkes CJ, Ziegler AG: Perinatal autoimmunity in offspring of diabetic parents. The German Multicenter BABY-DIAB study: detection of humoral immune response to islet antigens in early childhood. *Diabetes* 45: 967-973, 1996
- [100] Roll U, Ziegler AG: Combined antibody screening for improved prediction of IDDM – recent strategies of the 90's. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105: 1-14, 1997
- [101] Roll U, Christie MR, Standl E, Ziegler AG: Association of anti-GAD antibodies with islet cell antibodies and insulin autoantibodies in first-degree relatives of type 1 diabetic patients. *Diabetes* 43: 154-160, 1994
- [102] Rosenbauer J, Fabian-Marx T, Herzig P, Giani G: Type-1-diabetes in children under 5 years in Germany: Incidence and geographical distribution. *Diabetologia* 39 (Suppl.) A190, 1996
- [103] Savilahti E, Viander M, Perkkio M, Vainio E, Kalimo K, Reunala T: IgA antigliadin antibodies: a marker of mucosal damage in childhood coeliac disease. *Lancet* 1: 320-322, 1983
- [104] 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
- [105] Scherbaum WA, Hampl W, Muir P, Glück M, Boehm BO, Seissler J, Egle H, Hauner H, Heinze E, Banatvala JE, Pfeiffer EF: Association between islet cell antibodies and Coxsackie B, mumps and cytomegalo virus infections in non-diabetic individuals 7-19 years. The Ulm-Frankfurt Population Study. *Diabetologia* 34: 835-838, 1991
- [106] Scherbaum WA, Mirakian R, Pujol-Borrell R, Dean BM, Bottazzo GF: Immunochemistry in the study and diagnosis of organ specific autoimmune disease.

- In: Polak JM, Van Norden S: Immunocytochemistry. Modern Methods and Applications. Wright, Bristol (pp.456-476), 1986
- [107] Schuppan D, Dieterich W, Rieken EO: Exposing gliadin as a tasty food for lymphocytes. *Nature Medicine* 4(6): 666-667, 1998
- [108] Scott FW: Cow's milk and insulin dependent diabetes mellitus: Is there an relationship? *Amer J clin Nutr* 51: 489-491, 1990
- [109] Seissler J, Amann J, Mauch L, Haubruck H, Wolfarth S, Bieg S, Richter W, Holl R, Heinze E, Northemann W, Scherbaum WA: Prevalence of autoantibodies to the Mr 65,000 and Mr 67,000 isoforms of glutamate decarboxylase (GAD) in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 92: 1394-1399, 1993
- [110] Seissler J, Bieg S, Yassin N, Mauch L, Northemann W, Boehm BO, Scherbaum WA: Association between antibodies to the Mr 67,000 isoforms of glutamic decarboxylase (GAD) and type 1 diabetes mellitus with coexisting autoimmune polyendocrine syndrome II. *Autoimmunity* 19 231-238, 1994
- [111] Seissler J, Morgenthaler NG, Achenbach P, Lampeter EF, Glawe D, Payton M, Christie M, Scherbaum WA, the DENIS Study Group: Combined screening for autoantibodies to IA-2 and autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in first-degree relatives of patients with IDDM. *Diabetologia* 39: 1351-1356, 1996
- [112] Seissler J, Boms S, Wohlrab U, Morgenthaler NG, Mothes T, Boehm BO, Scherbaum WA: Antibodies to human recombinant tissue transglutaminase measured by radioligand assay: Evidence for high diagnostic sensitivity for coeliac disease. *Horm Metab Res* 31: 375-379, 1999
- [113] Sibley RK, Sutherland DE, Goet F, Michael AF: Recurrent diabetes mellitus in the pancreas iso- und allograft. A light and electron microscopic and immunohistochemical analysis of four cases. *Lab. Invest.* 53: 132-144, 1985
- [114] Soeldner JS, Slone D. Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin using a double antibody technic. *Diabetes* 14: 771-779, 1965
- [115] Solimena M, Folli F, Aparisi R, Pozza G, DeCamilli P: Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrome. *N Engl J Med* 322: 1555-1560, 1990
- [116] Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdøl F, Thorsby E: Evidence for a primary association of coeliac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med* 169: 345-350, 1989
- [117] Sollid LM, Thorsby E: HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping

- and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 105: 910-922, 1993
- [118] Srikanta S, Ganda OP, Rabizadeh A, Soeldner JS, Eisenbarth GS. First degree relatives of patients with Type 1 diabetes mellitus: islet cell antibodies and abnormal insulins secretion. *N Engl J Med* 313: 461-464, 1985
- [119] Stern M, Teuscher M, Wechmann T: Serological screening for coeliac disease: methodological standars and quality control. *Acta paediatr Suppl* 412: 49-51, 1996
- [120] Stern M: Zöliakie. Krankheitsbild und Diagnostik. *Mta* 11/6: 458-461, 1996
- [121] Strian F, Haslbeck M: Neurologische Erkrankungen. In: *Diabetologie in Klinik und Praxis*. Thieme Verlag, Stuttgart 1994
- [122] Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Kolho KL, Korponay-Szabó IR, Sarnesto A, Savilahti E, Collin P, Mäki M: Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology* 115: 1322-1328, 1998
- [123] The Working Group of the European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child* 65: 909-911, 1990
- [124] 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,
- [125] Tilil H, Köbberling J: Age-corrected empirical genetic risk estimates for first-degree relatives of IDDM patients. *Diabetes* 36: 93-99, 1987
- [126] Tiwari JL, Terasaki PI: Juvenile diabetes mellitus (insulin-dependent). In: Tiwari JL, Terasaki PI, et al. *HLA and disease associations*. Springer Verlag, New York, pp 185-210, 1985
- [127] Todd JA, Bell JI, McDevitt HO: HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus. *Nature* 329: 599-604, 1987
- [128] Trier JS: Celiac Sprue. *NEJM* 325: 1709-1719, 1991
- [129] Vardi P, Ziegler AG, Mathews JH, Dib S, Keller RJ, Ricker AT, Wolfsdorf JJ, Herkowitz RD, Rabizadeh A, Eisenbarth GS, Soeldner JS: Concentration of insulin autoantibodies at onset of type 1 diabetes: inverse og-linear correlation with age. *Diabetes Care* 11: 736-739, 1988
- [130] Ventura A, Magazzu G, Greco L, SIGEP Study Group. Duration of exposure to gluten risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease.

- Gastroenterology 117: 297-303, 1999
- [131] Verge CF, Gianni R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaola M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS: Prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD and ICA512dc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 45: 926-933, 1996
- [132] Virtanen SM, Räsänen L, Ylönen K et al.: Early introduction of dairy products associated with increased risk of IDDM in finish children. *Diabetes* 42: 1789-1793, 1993
- [133] Visakorpi JK: Die Diagnostik der Zöliakie. In: *Annales Nestlé*, Vol. 51/2, Schweiz: Les Presses de la Venoge, S. 47-54, 1993
- [134] Vitoria JC, Castano L, Rica I, Bilbao JR, Arietta A, Garcia-Masdevall MD. Association of Insuline-Dependent Diabetes Mellitus and Celiac Disease: A Study Based on Serological Markers. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 27: 47-52, 1998
- [135] Vogelsang H, Wyatt J, Penner E, Lochs H: Screening for celiac disease in first degree relatives of patients with celiac disease by lactulose/mannitol test. *Am J Gastroenterol* 90: 1838-1842, 1995
- [136] Weile B, Cavell B, Nivenius K, Krasilnikoff PA: Striking differences in the incidence of childhood celiac disease between Denmark and Sweden: A plausible explanation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 21: 64-68, 1995
- [137] Weinman MD, Allan CH, Trier JS, Hagen SJ: Repair of microvilli in the rat small intestine after damage with lectins contained in the red kidney bean. *Gastroenterology* 97: 1193-1204, 1989
- [138] Weiser MM, Douglas AP: An alternative mechanism for gluten toxicity in coeliac disease. *Lancet* 1: 567-569, 1976
- [139] WHO-Expert Committee on diabetes mellitus. Second Report. WHO Technical Report Series No. 646, Genf, WHO, 1980
- [140] Wiest-Ladenburger U, Hartmann R, Harmann U, Berling K, Böhm BO, Richter W: Combined analysis and single-step detection of GAD65 and IA2 autoantibodies in IDDM can replace the histochemical islet cell antibody test. *Diabetes* 46: 565-571, 1997
- [141] Williams AJK, Bingley PJ, Bonifacio E, Palmer JP, Gale EAM: A novel microassay for insulin autoantibodies. *J Autoimmunity* 10: 473-478, 1997
- [142] Wortsmann J, Kumar V: Case report: idiopathic hypoparathyroidism co-existing

- with celiac disease: immunologic studies. *Am J Sci* 307: 420-427, 1994
- [143] Ziegler A.-G., Scherbaum WA: Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese des Typ-1-Diabetes. In: Mehnert H, Standl E, Usadel K.-H (Hrsg.): *Diabetologie in Klinik und Praxis*. ThiemeVerlag, Stuttgart 1999
- [144] Ziegler AG, Ziegler R, Vardi P, Jackson RA, Soeldner JS, Eisenbarth GS: Life-table analysis of progression to diabetes of anti-insulin autoantibody positive relatives of individuals with type-1-Diabetes. *Diabetes* 38: 1320-1325, 1989
- [145] 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: 460-468, 1999

ANHANG

Inselzell-Antikörpertest zur Diabetesfrüherkennung für Geschwister, Kinder und Eltern eines Typ-I-Diabetikers

Inzwischen ist es möglich, durch einen einfachen Bluttest festzustellen, ob die Anlage besteht, auch Typ-I-Diabetes zu entwickeln. Dabei werden im Blut der Betroffenen sogenannte Inselzell-ANTIKÖRPER bestimmt, die dem Ausbruch des Typ-I-Diabetes in der Regel 10 bis 20 Jahre vorausgehen. Der Test wird derzeit am Institut für Diabetesforschung **kostenlos** durchgeführt und insbesondere allen Geschwistern und Kindern von Typ-I-Diabetikern empfohlen.

Das Diabetesrisiko steigt mit der Anzahl der positiven Antikörper und der Titerhöhe der Antikörper. Werden z.B. drei oder vier positive Antikörper gemessen, beträgt das Risiko, innerhalb der nächsten 5 Jahre an Typ-I-Diabetes zu erkranken, etwa 80%.

Ein positiver Testbefund tritt etwa bei 5% aller getesteten Verwandten von Typ-I-Diabetikern auf. Bei einem positiven Testbefund müssen zunächst weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um das Stadium der Erkrankung festzulegen und die Funktion der insulinproduzierenden Zellen zu prüfen. Diese weiteren Untersuchungen bestehen aus einem oralen und einem intravenösen Zuckerbelastungstest. Je nach Untersuchungsbefund besteht dann für Sie die Möglichkeit, an Studien zur "Verhinderung des Typ-I-Diabetes" teilzunehmen. Über die Aufnahmebedingungen und den Stand der entsprechenden Studien werden Sie von uns eingehend informiert.

Natürlich ist ein einmaliger Test nicht absolut sicher. Ein kleiner Teil von Personen, die einen Typ-I-Diabetes entwickeln, werden von einem einmalig durchgeführten Test nicht erfaßt. Für getestete Verwandte von Typ-I-Diabetikern bedeutet das, daß bei einem *negativen* Testbefund die Entwicklung eines Diabetes nicht für immer ausgeschlossen werden kann, jedoch sehr unwahrscheinlich ist. Um ganz sicher zu gehen, sollten Sie den Test in etwa 5 bis 10 Jahren wiederholen lassen.

Anleitung zur Blutabnahme:

1. Nach einer venösen Blutabnahme von etwa 10 ml zentrifugieren Sie das Blut ab und schicken uns nur das Serum. Bitte schicken Sie es in einem kleinen, aber gut verpackten Behälter, um das Zerbrechen von Röhrchen zu vermeiden. Ansonsten sind keine Besonderheiten beim Verschicken zu beachten.
2. Bitte füllen Sie den Fragebogen sorgfältig aus (ein extra Bogen für jede getestete Person).
3. Bitte senden Sie alles an:

Prof. Dr. Anette-G. Ziegler
Institut für Diabetesforschung
Krankenhaus München-Schwabing
Kölner Platz 1
80804 München

A N A M N E S E B O G E N
I N S E L Z E L L - A N T I K Ö R P E R T E S T

TEIL I:
INFORMATIONEN ÜBER DAS NICHTDIABETISCHE FAMILIENMITGLIED,
DAS UNTERSUCHT WERDEN SOLL

NAME: _____
(VORNAME) (FAMILIENNAME)

GESCHLECHT: M W

GEBURTSDATUM: _____

VERWANDTSCHAFTSGRAD: GESCHWISTER
 KIND
 ELTERN

DATUM DER BLUTABNAHME: _____

HABEN SIE SCHON EINMAL INSULIN ERHALTEN: JA NEIN

LEIDEN SIE AN ANDEREN KRANKHEITEN UND WENN WELCHEN?

TELEFON: _____

ADRESSE: _____

TEIL II:
INFORMATION ÜBER DAS FAMILIENMITGLIED MIT TYP-I-DIABETES

NAME: _____
(VORNAME) (FAMILIENNAME)

GESCHLECHT: M W

GEBURTSDATUM: _____

TELEFON: _____

BEHANDELNDES KRANKENHAUS: _____

TYP-I-DIABETES: DATUM DER DIAGNOSE: _____

INSULIN SEIT WANN (DATUM): _____

Institut für Diabetesforschung

Prof. Dr. med. Anette G. Ziegler
Kölner Platz 1
80804 München
Tel: 089-307931-14
Fax:089-3081733

Klinik- oder Praxisstempel**Bankleitzahl:****Kontonummer:****Datum:****Anamnesebogen bei Geburt****Zutreffendes bitte ankreuzen bzw. ausfüllen**

Mutter mit Typ-I-Diabetes

Vater mit Typ-I-Diabetes

Datum: _____

Name: _____ Vorname: _____

Geburtsdatum: _____ Alter: _____

Adresse: _____

Telefon: _____

Angaben über das Kind:

Name: _____ Vorname _____

Geb.-Datum: _____ Geschlecht: _____

Schwangerschaftsdauer in Wochen: _____ Geburtsgewicht: _____

Größe bei Geburt in cm: _____

Traten während der Schwangerschaft oder bei Geburt Komplikationen auf? Wenn ja, welche?

Fragen an den diabetischen Elternteil:

- Diabetes seit: _____

- Alter bei Diabetesmanifestation:

- Augenhintergrundsveränderungen: ja nein

- Lasertherapie: ja nein

- Nierenschäden: ja nein

- Wie hoch war Ihr letzter Wert von HbA1: _____

HbA1c: _____

Wurde bei einem anderen Elternteil je ein erhöhter Blutzucker festgestellt, bzw. besteht ein manifester Diabetes?

Ich wurde über die Studie aufgeklärt und bin mit der Antikörperuntersuchung und der HLA-Typisierung der eingeschickten Blutproben einverstanden.

Unterschrift: _____

Institut für Diabetesforschung

Prof. Dr. med. Anette G. Ziegler
Kölner Platz 1
80804 München
Tel: 089-307931-14
Fax:089-3081733

Zentrum:

Datum:

Fragebogen zur Nachuntersuchung

9 Monate nach Geburt

zutreffende Kästchen bitte ankreuzen

Mutter mit Typ-I-Diabetes

Mutter mit Schwangerschaftsdiabetes

Vater mit Typ-I-Diabetes

Name: _____ Vorname: _____ Geburtsdatum: _____

Adresse: _____ Tel.: _____

Fragen an die Mutter:

1. Welchen Hauttyp würden Sie sich zurechnen ?

- a) Augenfarbe: blau braun grün grau
- b) Haarfarbe: rötlich blond braun schwarz
- c) Hautfarbe: hell dunkel

2. Ist Ihnen innerhalb Ihrer Familie/Verwandschaft ein Fall von Diabetes bekannt?

- | | | | | | |
|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Ihr Vater: | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II | Ihre Mutter: | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II |
| Ihr Großvater väterlicherseits: | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II | Ihr Großvater mütterlicherseits: | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II |
| Ihre Großmutter väterlicherseits: | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II | Ihre Großmutter mütterlicherseits : | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II |
| Ihr(e) Bruder: | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II | Ihre Schwester(n) : | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II |
| Ihr(e) Onkel väterlicherseits: | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II | Ihr(e) Onkel mütterlicherseits: | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II |
| Ihre Tante(n) väterlicherseits: | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II | Ihre Tante(n) mütterlicherseits: | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II |

Zusätzliche Fragen an die Mutter mit Schwangerschaftsdiabetes

1. Besteht bei Ihnen heute ein Diabetes? Falls ja, welcher Typ? Typ I Typ II
- nein
- Falls ja, Behandlung mit Insulin Tabletten Diät
- Letzter HbA_{1c}-Wert: _____ letzter HbA₁-Wert: _____
- Wann wurde(n) diese(r) Wert(e) bestimmt? _____

2. Falls bei Ihnen heute kein Diabetes besteht: Wurde nach der Schwangerschaft jemals wieder Ihr Blutzucker getestet? nein ja
- Wenn ja, wie hoch war der letzte Wert? _____ mg/dl, Wann wurde dieser Wert bestimmt? _____

3. Wieviel wiegen Sie derzeit? (Körpergewicht in kg): _____

Fragen an den Vater

Name: _____ Vorname: _____ Geburtsdatum: _____

1. Welchen Hauttyp würden Sie sich zurechnen ?

- a) Augenfarbe: blau braun grün grau
- b) Haarfarbe: rötlich blond braun schwarz
- c) Hautfarbe: hell dunkel

2. Ist Ihnen innerhalb Ihrer Familie/Verwandschaft ein Fall von Diabetes nein bekannt?

- | | | | | | |
|--------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--|--------------------------------|---------------------------------|
| Ihr Vater: | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II | Ihre Mutter: | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II |
| Ihr Großvater
väterlicherseits: | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II | Ihr Großvater
mütterlicherseits: | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II |
| Ihre Großmutter
väterlicherseits: | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II | Ihre Großmutter
mütterlicherseits : | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II |
| Ihr(e) Bruder: | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II | Ihre Schwester(n) : | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II |
| Ihr(e) Onkel
väterlicherseits: | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II | Ihr(e) Onkel
mütterlicherseits: | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II |
| Ihre Tante(n)
väterlicherseits: | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II | Ihre Tante(n)
mütterlicherseits: | <input type="checkbox"/> Typ I | <input type="checkbox"/> Typ II |

3. Besteht auch bei Ihnen ein Diabetes? Falls ja, welcher Typ? Typ I Typ II
- nein
- Falls ja, seit wann? _____

Angaben zum Kind

Name: _____ Vorname: _____

Geburtsdatum: _____ Alter: _____

1. Welchen Hauttyp würden Sie Ihrem Kind zurechnen ?

a) Augenfarbe: blau braun grün graub) Haarfarbe: rötlich blond braun schwarzc) Hautfarbe: hell dunkel2. Besteht heute bei Ihrem Kind ein Diabetes? nein Falls ja, seit wann? _____3. Sind bei Ihrem Kind bislang irgendwelche Krankheiten oder gesundheitlichen Probleme
getreten? nein

falls ja, welche?: _____

Allergien: _____

Medikamente: _____

4. Angaben zur Körperlichen Entwicklung¹ :

a) Heutige Größe: _____ cm heutiges Gewicht: _____ kg

b) Freies Sitzen? ja nein c) Stehen mit Festhalten? ja neind) Krabbeln? ja nein e) "Mama/Papa" ungezielt? ja nein

5. Angaben zur Säuglingsernährung:

a) Haben Sie Ihr Kind gestillt? ja neinWenn ja, wieviele Wochen haben Sie Ihr Kind *ausschließlich*, d.h. ohne Zufüttern, gestillt? _____ WochenWenn ja, wie lange haben Sie Ihr Kind *insgesamt*, d.h. Stillen plus andere Kost, gestillt? _____ Wochenb) Hat Ihr Kinderarzt bei Ihrem Kind eine Milchunverträglichkeit festgestellt? ja nein

6. Wie haben Sie sich als Mutter während der Schwangerschaft und nach der Geburt Ihres Kindes bis heute ernährt?

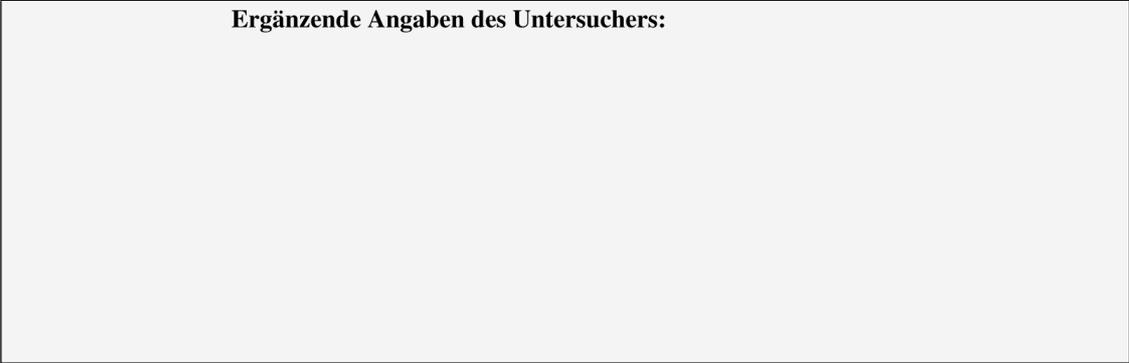
a) "Normale" Kost einschließlich Fleischprodukten und Milchprodukten: ja neinb) Vegetarische Kost ohne Fleischprodukte aber mit Milchprodukten: ja neinc) Streng vegetarische Kost ohne Fleischprodukte und ohne Milchprodukte: ja neind) Haben Sie während der Schwangerschaft geraucht? nein Falls ja, wieviel/Tag? _____

1) nach den Denver-Entwicklungsskalen für Grobmotorik und Sprache

Institut für Diabetesforschung

Bitte achten Sie darauf, daß der Fragebogen vollständig ausgefüllt wird.

Ergänzende Angaben des Untersuchers:



**Institut für Diabetesforschung
Prof. Dr. med. A.-G. Ziegler
Kölner Platz 1
80804 München**

Tel: 089-30793114
Fax: 089-3081733

Institut für Diabetesforschung

Prof. Dr. med. Anette G. Ziegler
 Kölner Platz 1
 80804 München
 Tel: 089-307931-14
 Fax: 089-3081733

Zentrum: Datum:

Fragebogen zur Nachuntersuchung

2 Jahre nach Geburt

zutreffende Kästchen bitte ankreuzen

Mutter mit Typ-I-Diabetes

Mutter mit Schwangerschaftsdiabetes

Vater mit Typ-I-Diabetes

Name: _____ Vorname: _____ Geburtsdatum: _____

Adresse: _____ Tel.: _____

Fragen an die Mutter

1. Besteht auch bei Ihnen ein Diabetes? Falls ja, welcher Typ? Typ I Typ II nein

Falls ja, seit wann? _____

2. Haben Sie weitere Kinder? nein

Kinder: 1. Name: _____ geboren am: _____ Geschlecht: _____

2. Name: _____ geboren am: _____ Geschlecht: _____

3. Name: _____ geboren am: _____ Geschlecht: _____

Hat eines oder mehrere Ihrer Kinder Diabetes entwickelt? nein

falls ja: Diabetes seit _____

Zusätzliche Fragen an die Mutter mit Schwangerschaftsdiabetes

1. Besteht bei Ihnen heute ein Diabetes? nein jaFalls ja, Behandlung mit Diät Tabletten InsulinLetzter HbA_{1c}-Wert: _____, letzter HbA₁-Wert: _____, Wann wurde(n) diese(r) Wert(e) bestimmt? _____

2. Wieviel wiegen Sie derzeit? (Körpergewicht in kg): _____, Körpergröße (in cm): _____

Institut für Diabetesforschung
zutreffende Kästchen bitte ankreuzen

3. Falls bei Ihnen heute kein Diabetes besteht: Wurde nach der Schwangerschaft jemals wieder Ihr

Blutzucker getestet?

 nein

 ja

Wenn ja, wie hoch war der letzte Wert? _____ mg/dl, Wann wurde dieser Wert bestimmt? _____

Angaben zum Kind

Name: _____ Vorname: _____

Geburtsdatum: _____ Alter: _____

1. Besteht heute bei Ihrem Kind ein Diabetes? nein Falls ja, seit wann? _____

2. Sind bei Ihrem Kind bislang irgendwelche Krankheiten aufgetreten? nein

Infektionskrankheiten: Mumps

 ja

 nein

Masern

 ja

 nein

Windpocken

 ja

 nein

Röteln

 ja

 nein

Falls eine der obengenannten Infektionskrankheiten aufgetreten ist: Wann genau? _____

Sonstige Krankheiten: _____

Allergien: _____

Medikamente: _____

3. Welche Impfungen wurden bei Ihrem Kind bislang durchgeführt ?

Diphtherie - Tetanus - Keuchhusten (DTP):

 ja

 nein

Sonstige Impfungen: _____

nur Diphtherie - Tetanus (DT):

 ja

 nein

Kinderlähmung - Schluckimpfung:

 ja

 nein

Masern - Röteln - Mumps:

 ja

 nein

4. Angaben zur körperlichen Entwicklung¹ : a) heutige Größe: _____ cm, heutiges Gewicht: _____ kg

b) Treppensteigen?

 ja

 nein

c) Kombiniert zwei Wörter sinnvoll

 ja

 nein

d) Hüft auf der Stelle?

 ja

 nein

e) Große Fontanelle geschlossen?

 ja

 nein

Ergänzende Angaben des Untersuchers:

Bitte achten Sie darauf, daß der Fragebogen vollständig ausgefüllt wird.

¹⁾ nach den Denver-Entwicklungsskalen für Grobmotorik und Sprache

Institut für Diabetesforschung

Prof. Dr. med. Anette G. Ziegler
Kölner Platz 1
80804 München
Tel: 089-307931-14
Fax: 089-3081733

Zentrum:

Datum:

Fragebogen zur Nachuntersuchung 5 Jahre nach Geburt *zutreffende Kästchen bitte ankreuzen*

Mutter mit Typ-I-Diabetes

Mutter mit ehemaligem
Schwangerschaftsdiabetes

Vater mit Typ-I-Diabetes

1.) Angaben zum diabetischen Elternteil

Name: _____ Vorname: _____ Geburtsdatum: _____

Adresse: _____ Tel.: _____

2.) Fragen an den Vater

1. Besteht bei Ihnen ein Diabetes?

Falls ja, welcher Typ?

 Typ I

 Typ II

 nein

Falls ja, seit wann? _____

3.) Fragen an die Mutter

1. Besteht bei Ihnen ein Diabetes?

Falls ja, welcher Typ?

 Typ I

 Typ II

 nein

Falls ja, seit wann? _____

Zusätzliche Fragen an die Mutter mit ehemaligem Schwangerschaftsdiabetes

1. Besteht bei Ihnen heute ein Diabetes?

 nein

 ja

Falls ja, Behandlung mit

 Diät

 Tabletten

 Insulin

Letzter HbA_{1c}-Wert: _____, letzter HbA₁-Wert: _____, Wann wurde(n) diese(r) Wert(e) bestimmt? _____

2. Wieviel wiegen Sie derzeit? (Körpergewicht in kg): _____, Körpergröße (in cm): _____

4.) Angaben zum Kind

Name: _____ Vorname: _____

Geburtsdatum: _____ Alter: _____

1.) Besteht heute bei Ihrem Kind ein Diabetes? ja nein Falls ja, seit wann? _____

2.) Angaben zur körperlichen Entwicklung : a) heutige Größe: _____ cm, heutiges Gewicht: _____ kg

3.) Wurden folgende Impfungen bei Ihrem Kind durchgeführt? Wenn ja, in welchem Lebensjahr, bzw. Lebensmonat?

Alter des Kindes bei Impfung

Diphtherie - Tetanus - Keuchhusten (DTP): ja nein _____nur Diphtherie - Tetanus (DT): ja nein _____Kinderlähmung - Schluckimpfung: ja nein _____Masern - Röteln - Mumps: ja nein _____BCG (Tuberkulose) ja nein _____HIB (Haemophilus influenzae B Virus) ja nein _____

sonstige Impfungen: _____

4.) Hatte Ihr Kind eine der folgenden Krankheiten? Wenn ja in welchen Lebensalter, bzw. Lebensmonat?

Alter des Kindes bei Erkrankung

Masern: ja nein _____Röteln: ja nein _____Mumps: ja nein _____Windpocken: ja nein _____

Sonstige Erkrankungen: _____

Allergien: _____

Medikamente: _____

- 5.) Sind Sie als Vater/Mutter oder ein anderes Familienmitglied an Zöliakie erkrankt? ja nein
- 6.) Spezielle Fragen zur Zöliakie: Hat(te) Ihr Kind
- a) chronische Durchfälle (schaumig, übelriechend, farblos, fettig) > 3 Stuhlgänge pro Tag ja nein
- b) chronischer Blähbauch, > 1 Monat Dauer ja nein
- c) chronisches Erbrechen (im Schwall); > 1 Monat Dauer ja nein
- d) chronische Flatulenz; > 1 Monat Dauer ja nein
- e) chronische Verstopfung; > 1 Monat Dauer ja nein

Als zusätzliche Untersuchung aus der an uns gesandten Blutprobe bieten wir Ihnen eine Antikörpertestung auf Zöliakie an. Zöliakie, eine Erkrankung des Dünndarms, kann durch eine Umstellung auf glutenfreie Ernährung sehr gut behandelt werden.

Ich bin mit der Untersuchung einverstanden:

ja

nein

Zutreffendes bitte ankreuzen

Ergänzende Angaben des Untersuchers:

Bitte achten Sie darauf, daß der Fragebogen vollständig ausgefüllt wird.

1) nach den Denver-Entwicklungsskalen für¹ Grobmotorik und Sprache

Institut für Diabetesforschung

Prof. Dr. med. Anette G. Ziegler
 Kölner Platz 1
 80804 München
 Tel: 089-307931-14
 Fax: 089-3081733

Zentrum: Datum:

Fragebogen zur Nachuntersuchung

8 Jahre nach Geburt

zutreffende Kästchen bitte ankreuzen

Mutter mit Typ-I-Diabetes

Mutter mit Schwangerschaftsdiabetes

Vater mit Typ-I-Diabetes

1.) Angaben zum diabetischen Elternteil

Name: _____ Vorname: _____ Geburtsdatum: _____

Adresse: _____ Tel.: _____

2) Fragen an die Mutter:

Besteht bei Ihnen ein Diabetes?

 nein

Falls ja, welcher Typ?

 Typ I Typ II

Falls ja, seit wann? _____

Zusätzliche Fragen an die Mutter mit Schwangerschaftsdiabetes

1. Besteht bei Ihnen heute ein Diabetes?

 nein ja

Falls ja, Behandlung mit

 Diät Tabletten InsulinLetzter HbA_{1c}-Wert: _____, letzter HbA₁-Wert: _____, Wann wurde(n) diese(r) Wert(e) bestimmt? _____

2. Wieviel wiegen Sie derzeit? (Körpergewicht in kg): _____, Körpergröße (in cm): _____

3. Falls bei Ihnen heute kein Diabetes besteht: Wurde nach der Schwangerschaft jemals wieder Ihr

Blutzucker getestet?

 nein ja

Wenn ja, wie hoch war der letzte Wert? _____ mg/dl, Wann wurde dieser Wert bestimmt? _____

3.) Fragen an den Vater

1. Besteht bei Ihnen ein Diabetes?

 nein

Falls ja, welcher Typ?

 Typ I Typ II

Falls ja, seit wann? _____

4.) Angaben zum Kind

Name: _____ Vorname: _____

Geburtsdatum: _____ Alter: _____

1.) Besteht heute bei Ihrem Kind ein Diabetes? ja nein Falls ja, seit wann? _____

2.) Angaben zur Körperlichen Entwicklung : a) heutige Größe: _____ cm, heutiges Gewicht: _____ kg

3.) Um einen möglichst aktuellen und vollständigen Überblick über den Einfluß von Impfungen, Krankheiten, Allergien, Medikamenteneinnahme, Stilldauer und Rauchgewohnheiten auf die Krankheitsentstehung zu bekommen, bitten wir Sie bitte die folgenden Fragen erneut auszufüllen, auch wenn Sie diese schon in einem vorhergehenden Fragebogen beantwortet haben.

a.) Wurden folgende Impfungen bei Ihrem Kind durchgeführt? Wenn ja, in welchem Lebensjahr bzw. Lebensmonat?

	ja	nein	Alter des Kindes bei Impfung
Diphtherie - Tetanus - Keuchhusten (DTP):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
nur Diphtherie - Tetanus (DT):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Kinderlähmung - Schluckimpfung:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Masern - Röteln - Mumps:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
BCG (Tuberkulose)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
HIB (Haemophilus influenzae B Virus)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
sonstige Impfungen: _____			

b.) Hatte Ihr Kind eine der folgenden Krankheiten? Wenn ja in welchem Lebensalter, bzw. Lebensmonat?

	ja	nein	Alter des Kindes bei Erkrankung
Masern:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Röteln:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Mumps:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Windpocken:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____

Sonstige Erkrankungen _____

Allergien: _____

Institut für Diabetesforschung*zutreffende Kästchen bitte ankreuzen*

Medikamente: _____

c.) Waren Sie zur Zeit der Zeugung Ihres Kindes Raucher?

 ja nein

Wenn ja, wieviele Zigaretten pro Tag? _____

d.) Haben Sie als Mutter während der Schwangerschaft geraucht? ja nein

Wenn ja, wieviele Zigaretten pro Tag? _____

e.) Haben Sie Ihr Kind gestillt? ja neinWenn ja, bis zu welchem Lebensmonat **nur** gestillt? _____gestillt **und** beigefüttert _____**Bitte achten Sie darauf, daß der Fragebogen vollständig ausgefüllt wird.****Ergänzende Angaben des Untersuchers:**

Vorveröffentlichungen

Originalarbeiten:

- Dittler J, Seidel D, Schenker M, Ziegler AG: GADIA2-combi determination as first-line screening for improved prediction of type-1-diabetes in relatives. *Diabetes* 47: 592-597, 1998
- Bonifacio E, Ziegler AG, Hummel M, Dittler J, Lampasona V, Pastore MR, Bosi E: Gluten: is it also a determinant of islet autoimmunity? *Diabetes Metabolism Reviews* 24 (3): 259-260, 1998
- 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*, in press

Abstracts:

- Dittler J, Hummel M, Mollenhauer U, Ziegler AG: Development of a combined GAD/IA2-antibody test system in venous and capillary blood samples of type-1 and pre type-1-diabetic patients (Abstract, 32nd Annual Meeting, European Association for the Study of Diabetes). *Diabetologia* 39 (Suppl. 1): A38, 1996
- Dittler J, Schiller M, Mollenhauer U, Seidel D, Standl E, Ziegler AG: Development of a combined GADIA2-antibody test system in venous and capillary blood for screening and improved prediction of IDDM (Abstract, 57th Annual Meeting and Scientific Sessions, American Diabetes Association). *Diabetes* 46 (Suppl. 1): 196A, 1997
- Hummel M, Stern M, Bonifacio E, Dittler J, Ziegler AG: The ABCD-BABYDIAB-Study: Development of celiac disease associated antibodies in offspring of parents with type 1 diabetes (Abstract, 35. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1 (Suppl. 1): 27, 2000

Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Julia Pilgram geb. Dittler
Geburtsdatum: 6. Februar 1970
Geburtsort: Lingen (Ems)
Eltern: Ludwig Dittler, Diplom-Ingenieur
Ursula Wahlers, Diätassistentin

AUSBILDUNG UND BERUFLICHE TÄTIGKEIT

1976-1980

Grundschule in Lingen

1980-1982

Orientierungsstufe in Lingen

1982-1989

Gymnasium in Lingen

1989-1996

Studium der Oecotrophologie an der TU München - Weihenstephan

04/1997-07/1999

Freie Mitarbeit als Ernährungsberaterin am Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, München

08/1998-08/1999

Ernährungsberatung bei der HiPP GmbH & Co. Vertrieb KG, Pfaffenhofen

Stuttgart, den 1. August 2000