

<u>1.</u>	<u>EINLEITUNG</u>	7
1.1	Ätiologie des Typ 1-Diabetes mellitus	7
1.2	Genetik des Typ 1-Diabetes mellitus	8
1.3	Immunologische Marker des Typ 1-Diabetes mellitus	10
1.3.1	Inselzellantikörper (ICA)	10
1.3.2	Insulinautoantikörper (IAA)	11
1.3.3	Antikörper gegen das 64 KD Antigen (GAD)	12
1.3.4	Weitere Autoantikörper	13
1.4	Tiermodelle des Typ 1-Diabetes mellitus	13
1.5	Kuhmilch	14
1.5.1	Proteinzusammensetzung der Kuhmilch	14
1.5.2	Genetische Varianten des β -Caseins in der Kuhmilch	15
1.5.3	Immunologische Bedeutung des Caseins	16
1.6	Antikörper gegen Kuhmilchproteine	16
1.6.1	Bovines Serumalbumin (BSA)	17
1.6.2	β -Laktoglobulin	18
1.6.3	Casein	19
1.7	Kuhmilch und Typ 1-Diabetes mellitus	19
1.7.1	Kuhmilchkonsum	19
1.7.2	Stilldauer	20
1.7.3	Diät	21
1.8	Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	23

<u>2.</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	24
2.1	Familienstudie	24
24	2.1.1 Aufbau	
	2.1.2 Population	24
	2.1.3 Kontrollpersonen	25
	2.1.4 ICA und IAA	26
2.2	Material	26
	2.2.1 Puffer und Substratlösungen	26
	2.2.2 Chemikalien und Reagenzien	27
	2.2.3 Material und Geräte	29
2.3	ELISA	31
	2.3.1 Testprinzip	31
	2.3.2 β -Casein A1- und A2-ELISA	33
	2.3.3 Standardkurve	36
2.4	Statistische Methoden	37
	2.4.1 Statistische Auswertung	37
	2.4.2 Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizient	38

<u>3.</u>	ERGEBNISSE	39
3.1	Deskriptive Statistik	39
3.1.1	β-Casein A1-Antikörper bei Typ 1-Diabetikern	39
3.1.1.1	Alter und Geschlecht	39
3.1.1.2	Manifestationsalter	40
3.1.1.3	Diabetesdauer	41
3.1.1.4	ICA und IAA	41
3.1.2	β-Casein A1-Antikörper bei Geschwistern der Typ 1-Diabetiker	43
3.1.2.1	Alter und Geschlecht	43
3.1.2.2	ICA und IAA	44
3.1.3	β-Casein A1-Antikörper bei Eltern der Typ 1-Diabetiker	45
3.1.3.1	Alter und Geschlecht	45
3.1.3.2	ICA und IAA	46
3.1.4	β-Casein A1-Antikörper bei Kontrollpersonen	47
3.1.4.1	Alter und Geschlecht	47
3.1.5	β-Casein A2-Antikörper bei Typ 1-Diabetikern	48
3.1.5.1	Alter und Geschlecht	48
3.1.5.2	Manifestationsalter	49
3.1.5.3	Diabetesdauer	50
3.1.5.4	ICA und IAA	50
3.1.6	β-Casein A2-Antikörper bei Geschwistern der Typ 1-Diabetiker	52
3.1.6.1	Alter und Geschlecht	52
3.1.6.2	ICA und IAA	53
3.1.7	β-Casein A2-Antikörper bei Eltern der Typ 1-Diabetiker	54
3.1.7.1	Alter und Geschlecht	54
3.1.7.2	ICA und IAA	55

3.1.8 β-Casein A2-Antikörper bei Kontrollpersonen	56
3.1.8.1 Alter und Geschlecht	56
3.2 Inferenzstatistik	57
3.2.1 Vergleichende Darstellung der β-Casein A1-Antikörper	57
3.2.1.1 Typ 1-Diabetiker und ihre Geschwister	57
3.2.1.2 Typ 1-Diabetiker und ihre Eltern	59
3.2.1.3 Typ 1-Diabetiker und Kontrollpersonen	60
3.2.1.4 Geschwister und ihre Eltern	62
3.2.1.5 Geschwister und Kontrollpersonen	63
3.2.1.6 Eltern und Kontrollpersonen	64
3.2.2 Vergleichende Darstellung der β-Casein A2-Antikörper	66
3.2.2.1 Typ 1-Diabetiker und ihre Geschwister	66
3.2.2.2 Typ 1-Diabetiker und ihre Eltern	67
3.2.2.3 Typ 1-Diabetiker und Kontrollpersonen	68
3.2.2.4 Geschwister und ihre Eltern	70
3.2.2.5 Geschwister und Kontrollpersonen	70
3.2.2.6 Eltern und Kontrollpersonen	72
3.2.3 Unterschiedliche Bindung der Seren an die A1- oder A2-Variante des β-Caseins	74

<u>4. DISKUSSION</u>	75
4.1 ELISA zum Nachweis von β-Casein Antikörpern	75
4.2 β-Casein A1- und A2-Antikörper	77
4.3 Unterschiedliche Bindung der Seren an die A1- oder A2-Variante des β-Caseins	81
4.4 Mögliche pathogenetische Bedeutung von β-Casein A1 im Zusammenhang mit dem Typ 1-Diabetes mellitus	85
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u>	87
<u>6. LITERATUR</u>	90
<u>7. ANHANG</u>	117
Danksagung	117
Lebenslauf	118

ABKÜRZUNGEN

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ANA	antinukleäre Antikörper
AS	Aminosäure
BB-Ratte	Bio-Breeding Ratte
BSA	bovines Serumalbumin
CF-ICA	Komplement-fixierende Inselzellantikörper
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAD	Glutaminsäure-Decarboxylase
HLA	humanes Leukozytenantigen
IAA	Insulinautoantikörper
ICA	Inselzellantikörper
ICSA	Inselzelloberflächen-Antikörper
IDDM	insulin dependent diabetes mellitus (insulinpflichtiger Diabetes mellitus)
IFT	Immunfluoreszenztechnik
Ig	Immunglobulin
JDF	Juvenile Diabetes Foundation
KD	Kilodalton
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NOD-Maus	non-obese diabetic Maus (diabetische, nicht adipöse Maus)
PCR	polymerase chain reaction
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen
RIA	Radio Immuno Assay
SD	Standardabweichung
SEM	standard error of mean (Standardfehler, mittlerer Fehler des Mittelwertes)
U	Units

1. EINLEITUNG

1.1 Ätiologie des Typ 1-Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus Typ 1 (juvener Diabetes) ist definiert als ein Insulinmangelsyndrom, das als Folge eines selektiven Untergangs insulinproduzierender Beta-Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas auftritt. Die Prävalenz des Typ 1-Diabetes beträgt in Mitteleuropa ca. 0.3 %, wobei beide Geschlechter gleich häufig betroffen sind (*Kolb et al. 1991*). Zugleich stellt der insulinpflichtige Diabetes mellitus eine der häufigsten chronischen Erkrankungen im Kindesalter dar (*Scott et al. 1996*). Erkenntnisse der letzten Jahre stützen die These einer chronisch progredienten Autoimmunerkrankung mit multifaktorieller Genese, wobei die auslösenden Faktoren noch weitestgehend unklar sind (*Eisenbarth 1986*). Genetische Faktoren spielen in der Ätiologie des Diabetes eine prädisponierende Rolle, da 20 % der Typ 1-Diabetiker eine positive Familienanamnese haben und mehr als 90 % die HLA-Merkmale DR 3 und / oder DR 4 aufweisen (*Palmer et al. 1991*). Eine genetische Prädisposition ist zwar Voraussetzung für den Typ 1-Diabetes mellitus, aber aufgrund der Tatsache, daß sich die Diabetesinzidenz in den letzten drei Jahrzehnten fast verdreifacht hat (*Krolewski et al. 1987*) kommen jedoch wahrscheinlich zusätzliche Faktoren hinzu, die an der Pathogenese ursächlich beteiligt sind.

Es wird angenommen, daß die Erkrankung wahrscheinlich durch Umweltfaktoren verursacht wird, die in einem genetisch empfänglichen Individuum den destruktiven Immunprozeß initiieren (*Leslie et al. 1994*). Hier wurde vor einigen Jahren einer viralen Genese größere Bedeutung beigemessen, insbesondere den Mumps-Viren (*Federlin et al. 1987*), Coxsackie B4-Viren (*Szopa et al. 1990*), Röteln-Viren (*Bodansky et al. 1986*) und den Zytomegalie-Viren (*Pak et al. 1990*). Andere Arbeitsgruppen können diese Ergebnisse nicht bestätigen (*Karjalainen et al. 1988*, *Foulis et al. 1997*), so daß aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse vermehrt nach anderen Triggersubstanzen gesucht wird.

In letzter Zeit rücken zunehmend Änderungen der Nahrungsgewohnheiten in den Vordergrund des Interesses. Eine vermehrte Aufnahme von Lebensmitteln, die sehr

reichhaltig an Proteinen, Kohlenhydraten oder Nitrosaminen sind, könnten das Risiko, einen Diabetes zu entwickeln, erhöhen (*Dahlquist et al. 1990*). Fast alle epidemiologischen Studien über Ernährung in Zusammenhang mit Diabetes mellitus konzentrieren sich aber auf Diäten in der frühen Kindheit, und hier insbesondere auf die Milch (*Ellis et al. 1996*). Verstärkt gewinnen nun Untersuchungen von verschiedenen Bestandteilen der Kuhmilch als möglicher Umweltfaktor bezüglich der Pathogenese des Typ 1-Diabetes an Bedeutung.

1.2 Genetik des Typ 1-Diabetes mellitus

Die Empfänglichkeit für den insulinpflichtigen Diabetes mellitus ist an bestimmte Gene in der HLA-Region des kurzen Arms von Chromosom 6 gekoppelt.

Die Bedeutung genetischer Faktoren beim Typ 1-Diabetes ergibt sich aus einer Konkordanzrate von 30-40 % bei eineiigen Zwillingen (*Barnett et al. 1981*). Das Erkrankungsrisiko für Geschwister eines Typ 1-Diabetikers ist bei HLA-identischen Geschwistern 15-25 % (*Deschamps et al. 1984*), während HLA-verschiedene Geschwister kaum ein erhöhtes Risiko haben, an einem Typ 1-Diabetes zu erkranken (*Tarn et al. 1988*).

Mitte der 70-er Jahre wurden zunächst die HLA-Klasse I-Antigene B8 und B15 mit dem Diabetes assoziiert (*Singal et al. 1973, Nerup et al. 1974*). Spätere Untersuchungen zeigten eine wesentlich stärkere Korrelation des Typ 1-Diabetes mit dem DR-Locus der HLA-Klasse II-Antigene (*Platz et al. 1981*). In 90-95 % der Fälle wurden bei Diabetikern HLA-DR3 und- / oder- DR4 gefunden (*Wolf et al. 1983*). In der Normalbevölkerung wurden diese HLA-Antigene in weniger als 40 % der Fälle nachgewiesen (*Thomson et al. 1989*). Eine schwächere positive Assoziation des insulinpflichtigen Diabetes mellitus mit den HLA-Merkmalen DR1, DR6 und DR8 fanden Awata und Mitarbeiter (*Awata et al. 1990*).

Im Gegensatz dazu sind das HLA-Antigen DR2 und in geringerem Ausmaß auch HLA-DR5 nicht bzw. in geringerer Frequenz bei Diabetikern anzutreffen und scheinen einen Schutz gegenüber der Erkrankung zu vermitteln (*Platz et al. 1981, Thomson et al. 1988*).

Durch weitere Differenzierung der HLA-Region mit Hilfe der Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP) konnte ein weiteres

Kopplungsungleichgewicht zwischen DR- und DQ-Genen in verschiedenen Arbeitsgruppen festgestellt werden (*Owerbach et al. 1984, Festenstein et al. 1986, Nepom et al. 1986*). So weisen über 95 % der DR4 positiven Diabetiker die DQ-Allele DQw8 auf, im Vergleich zu nur ca. 55 % der DR4-positiven Kontrollpersonen (*Owerbach et al. 1989*). Eine Besonderheit zeigt hier die Abwesenheit einer bestimmten Aminosäure an Position 57 der DQ β -Kette. DQ β -Allele ohne Asparaginsäure in Position 57 kommen vermehrt bei kaukasischen Typ 1-Diabetikern vor. Dagegen scheint das Vorhandensein dieser Aminosäure an Position 57 einen protektiven Faktor darzustellen (*Todd et al. 1987*). Charron geht von einem erhöhten Erkrankungsrisiko aus, wenn die Genotypen DR4, DR3, DR1, DRw16, DRw13, DQw8, DQw2, DQw5, DW19 oder DQ β mit der Aminosäurefrequenz Ala-Val-Ser an Position 57 vorhanden sind (*Charron 1992*).

Die vorgenannten Ergebnisse zeigen, daß eine HLA-assoziierte Prädisposition besteht, jedoch als eine alleinige genetische Erklärung für die Manifestation des Typ 1-Diabetes nicht ausreicht. Thorsby et al. schließen eine Beteiligung anderer, bisher unbekannter Gene nicht aus (*Thorsby et al. 1993*). Zusätzlich werden nicht MHC-gekoppelte Gene, wie zum Beispiel das Insulingen und Gene auf Chromosom 11 diskutiert (*Eisenbarth 1986, Roep et al. 1991*).

Risikopopulationen können zwar durch HLA-Typisierungen ermittelt werden. Eine sichere Aussage über die Manifestation läßt sich dagegen nicht treffen, so daß genetische Analysen allein in der Diabetesfrüherkennung eher eine untergeordnete Rolle spielen. Allerdings ist in Kombination mit Diabetes-assoziierten Autoantikörpern eine Risikoabschätzung möglich (*Maclaren 1988*).

1.3 Immunologische Marker des Typ 1-Diabetes mellitus

1.3.1 Inselzellantikörper (ICA)

Inselzellantikörper (ICA) sind erstmals 1974 von Bottazzo und Mitarbeitern beschrieben worden (*Bottazzo et al. 1974*). Zytoplasmatische ICA sind organspezifische Antikörper der Klasse IgG, die mit allen endokrinen Inselzellen des Pankreas reagieren und nicht B-Zell spezifisch sind (*Ziegler et al. 1990*).

Verschiedene Familienstudien zeigen, daß bei 65-85 % der frisch manifestierten Typ 1-Diabetiker (*Kolb 1991*) sowie bei 1-7 % der Familienangehörigen 1. Grades (*Federlin et al. 1987, Becker et al. 1990*) und bei nur etwa 0.5 % der Kontrollpopulation Inselzellantikörper nachweisbar sind (*Irvine et al. 1977*). Im weiteren Verlauf der Erkrankung sinkt die Prävalenz der ICA-positiven Diabetiker jedoch auf weniger als 20 % ab. ICA sind bei beiden Geschlechtern gleich häufig und unabhängig vom Alter anzutreffen (*Lendrum et al. 1976*).

Antikörper-positive Personen tragen im Vergleich zu Antikörper-negativen Personen ein 50-200 -faches höheres Risiko, einen Diabetes zu entwickeln, so daß das Vorliegen von ICA als ein potentieller Risikofaktor angesehen werden muß (*Lipton et al. 1989*).

Mit Hilfe eines indirekten Immunfluoreszenztests gelang Lernmark und Mitarbeitern der Nachweis von Inselzelloberflächen-Antikörpern (ICSA) (*Lernmark et al. 1987*). Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte die Spezifität der ICSA für B-Zellen nachgewiesen werden (*van de Winkel et al. 1982*). Bei frisch manifestierten Diabetikern waren ICSA in bis zu 67 % der Fälle nachweisbar, wohingegen nur 2-3 % der Kontrollpersonen ICSA-positiv waren (*Freedmann et al. 1979*).

Ein Teil der ICA fixiert im indirekten Fluoreszenztest Komplement, sogenannte CF (complement fixing) -ICA. Es handelt sich dabei offenbar nicht um eine besondere Variante, da in der Regel nur ICA aus hochtitrigen Patientenseren im Test Komplement fixieren. Vielmehr ist die Komplementfixierung Ausdruck hoher zytoplasmatischer ICA-Titer. Bottazzo zeigte 1980 eine Komplementfixierung bei 50 % der ICA-positiven Seren (*Bottazzo et al. 1980*).

In einer Studie von Johnston und Mitarbeitern an 29 eineiigen Zwillingen, von denen der eine gesund und der andere an Diabetes mellitus erkrankt war, betrug die

Sensitivität für IgG-ICA 100 %, für CF-ICA 88 % und die Spezifität lag für IgG-ICA bei 84 % , für CF-ICA bei 100 % (*Johnston et al. 1989*). Der positive Vorhersagewert für die Entwicklung eines Diabetes mellitus betrug für IgG-ICA 77 % und für CF-ICA 100 %. Auch Karjalainen kam ein Jahr später in einer Studie an finnischen Kindern zu ähnlichen Ergebnissen. Er zeigte jedoch, daß nur hohe (> 18 JDF Einheiten) und persistierende ICA-Titer, insbesondere wenn sie Komplement-fixierend waren, einen Diabetes mellitus bei gesunden Kindern voraussagen können (*Karjalainen 1990*).

Durch die Bemühungen der letzten Jahre, die ICA-Assays durch internationale Workshops zu standardisieren (*Bottazzo et al. 1986, Bonifacio et al. 1987, Boitard et al. 1988*), und somit die Reproduzierbarkeit, Spezifität und Sensibilität zu erhöhen, sowie mit den Ergebnissen aus zahlreich durchgeführten Familien- und Zwillingsstudien zählen Inselzellantikörper (IgG-ICA und auch CF-ICA) zu anerkannten Markern der prädiabetischen Phase mit bewiesenem hohem positivem Vorhersagewert.

1.3.2 Insulinautoantikörper (IAA)

Antikörper gegen Insulin (Insulinautoantikörper, IAA) wurden erstmals 1983 von Palmer und Mitarbeitern bei frisch manifestierten Typ 1-Diabetikern ohne eine vorherige Insulintherapie nachgewiesen (*Palmer et al. 1983*). Die Prävalenz bei Manifestation liegt zwischen 20 - 50 % im Gegensatz zu 0.1 - 5 % bei Normalpersonen (*Kolb 1991*). Die zum Teil voneinander abweichenden Ergebnisse lassen sich im wesentlichen auf die zwei unterschiedlichen Testverfahren zur Messung von IAA zurückführen. Studien der letzten Jahre, in denen beide Testmethoden verglichen wurden, zeigten eine Überlegenheit des RIA (Radio Immuno Assay) gegenüber des ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (*Levy-Marshall et al. 1991, Greenbaum et al. 1992*). In Familienstudien konnten bei 15 % der Geschwister sowie bei 8 % der Eltern von Typ 1-Diabetikern IAA nachgewiesen werden (*Federlin et al. 1987, Kuglin et al. 1989*).

Es werden IAA der Klasse IgM und IgG unterschieden (*Dean et al. 1986*). IgM-IAA treten vorübergehend nach einer Reihe von Virusinfektionen auf und sind daher kaum als krankheitsspezifisch anzusehen (*Bodansky et al. 1986*).

Insulinautoantikörper sind invers korreliert zum Alter, d. h. sie wurden in weitaus höheren Konzentrationen bei Kindern unter 3 Jahren als bei älteren Kindern und Erwachsenen gefunden (*Vardi et al. 1988*).

Untersuchungen von Eisenbarth und Mitarbeitern zeigten eine Korrelation der IAA-Titer mit der Progression des Diabetes (*Eisenbarth et al. 1992*). IAA in Kombination mit ICA und CF-ICA sind als größere Risikofaktoren zu werten, einen Typ 1-Diabetes zu entwickeln, als das Vorhandensein eines einzelnen Antikörpers (*Ziegler et al. 1989, Landin-Olsson et al. 1992*). Bei Vorliegen der genetischen Risikokonstellation bezüglich der HLA-Antigene, insbesondere HLA-DR4, entwickeln Verwandte ersten Grades von Diabetikern signifikant häufiger IAA als Personen, die diese Merkmale nicht tragen (*Kuglin et al. 1989, Ziegler et al. 1991*).

1.3.3 Antikörper gegen das 64 KD-Antigen (GAD)

1982 konnte durch Immunpräzipitation erstmals ein Inselzellprotein mit einer Molekularmasse von 64 KD als primäres Zielantigen pankreatischer Inselzellen nachgewiesen werden (*Baekkeskov et al. 1982*). Dieses 64 KD-Autoantigen wurde 1990 von Baekkeskov und Mitarbeitern als das Enzym Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD), welches den Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) synthetisiert, identifiziert (*Baekkeskov et al. 1990*).

Es existieren zwei Isoformen des Enzyms mit der Größe 65 KD und 67 KD (*Erlander et al. 1991*), wobei sich jedoch die Hauptimmunantwort gegen 65 KD richtet (*Hagopian et al. 1993*).

Antikörper gegen das 64 KD-Antigen sind sogar schon bis zu acht Jahre vor der Manifestation eines Diabetes Typ 1 nachzuweisen (*Baekkeskov et al. 1987*) und bei frisch manifestierten Diabetikern in 84 % der Fälle vorhanden, so daß sie als ein sehr früher und nützlicher prädiktiver Marker hinsichtlich der Entstehung eines Diabetes mellitus zu werten sind (*Atkinson et al. 1990*). Vor wenigen Jahren konnten Seißler und Mitarbeiter in einer ICA-positiven Population eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von 64 KD-Autoantikörpern, CF-ICA und IAA mit HLA-DR4 und der Abwesenheit von Asparaginsäure an Position 57 der DQ β -Kette zeigen. Im Gegensatz zu ICA-Antikörpern, deren Konzentration nach Diabetesmanifestation abnimmt, persistieren 64 KD-Antikörper über Jahre (*Seißler et al. 1992*). Weiterhin

reflektieren 64 KD-Antikörper die verminderte B-Zell-Funktion besser als ICA oder IAA und sind daher sehr nützlich in der Verlaufsbeobachtung und bei der Suche nach einem latenten Typ 1-Diabetes (*Bärmeier et al. 1991, Tuomi et al. 1993*).

1.3.4 Weitere Autoantikörper

Patienten mit Typ 1-Diabetes weisen im Serum eine Vielzahl von Autoantikörpern gegen unterschiedliche Strukturen des Körpers auf. So läßt sich häufig eine subklinische Autoimmunität gegen andere endokrine Organe durch eine erhöhte Prävalenz von organspezifischen Autoantikörpern gegen mikrosomales Schilddrüsenantigen, Thyreoglobulin, Parietalzellen und Nebennierenantigen beobachten. Daneben sind auch nicht organspezifische Autoantikörper, z. B. antinukleäre Antikörper (ANA), gehäuft nachweisbar (*Bottazzo et al. 1978, Betterle et al. 1984, Federlin et al. 1987, Becker et al. 1991*).

1.4 Tiermodelle des Typ 1-Diabetes mellitus

Ein großer Teil der Vorstellungen zur Ätiologie und Immunpathogenese des Typ 1-Diabetes stammen aus Untersuchungen an Tiermodellen. Die 1974 erstmals gezüchtete BB-(BioBreeding-) Wistar-Ratte (*Bach et al. 1986*) sowie die 1980 gezüchtete NOD-(non-obese diabetic) Maus (*Tocchino 1986*) sind Inzuchtstämme, die einen spontanen Diabetes mellitus entwickeln. Die Tiere zeigen klinische Symptome und eine Insulitis wie der Mensch (*Mansfield et al. 1992*) und bilden auch verschiedene Antikörper wie ICA, IAA und GAD (*Pickup et al. 1991*). Im Gegensatz zum Menschen besteht ein Geschlechtsunterschied bezüglich der Diabetesinzidenz bei den NOD-Mäusen. Die Inzidenz erreicht in einem Alter von 30 Wochen 80 % bei den weiblichen und 35 % bei den männlichen Mäusen (*Makino et al. 1980*), wobei von Kolonie zu Kolonie die Werte variieren (*Pozzilli et al. 1993*). Die für eine Diabetesentstehung prädisponierenden Gene finden sich innerhalb und außerhalb der MHC-Region. Ein diabetogenes Gen der NOD-Maus ist eng mit dem Klasse II-Haupthistokompatibilitätskomplex verknüpft. Sowohl die Expression eines I-A β -Locus (His an Position 56, Ser an Position 57; entsprechend dem menschlichen

HLA-DQ β non-Asp an Position 57) als auch die Abwesenheit von I-E, was dem humanen DR entspricht (Hattori et al. 1986), sind notwendig, um einen autoimmunen Diabetes entstehen zu lassen (Kikutani et al. 1992).

Trotz der stark ingezüchteten Linien liegt die Diabetesinzidenz weit unter 100 %. Umweltfaktoren wie Streß (Carter et al. 1987), Viren (Like et al. 1991), Temperatur (Williams et al. 1990) und insbesondere Diäten (Elliott et al. 1984, 1988, Coleman et al. 1990) modulieren das Erkrankungsrisiko und den Erkrankungszeitpunkt. Auch hier sind in den letzten Jahren verschiedene Nahrungsbestandteile, wie z. B. die Kuhmilch, Schwerpunkt des Interesses geworden.

1.5 Kuhmilch

1.5.1 Proteinzusammensetzung der Kuhmilch

Die Proteine der Kuhmilch setzen sich aus Caseinen und Molkenproteinen zusammen. Der Anteil der Caseine am Gesamt-Proteingehalt der Kuhmilch beträgt etwa 80 %, der an Molkenproteinen etwa 20 %.

Seit 1952 ist bekannt, daß bei den einzelnen Caseinen genetische Varianten vorliegen, die sich in der Aminosäuresequenz unterscheiden.

Die Synthese der Milchproteine findet an den Polyribosomen des endoplasmatischen Retikulums der Milchdrüse statt. Eine Ausnahme bilden die aus dem Blut übertretenden Serumalbumine und Immunglobuline der Klasse IgG. Die nachstehende Tabelle zeigt die Charakteristika der einzelnen Eiweiße auf (Kielwein 1994), von denen vor allem den β -Caseinen hinsichtlich der Diabetes mellitus-Entstehung eine besondere Bedeutung zuzukommen scheint.

Tab. 1.1: Die Proteinzusammensetzung der Kuhmilch (Daten aus Kielwein 1994, leicht verändert)

Protein	Anteil (%) Milchprotein	Anzahl Amino- säuren je mol	Synthese	Genetische Varianten
Caseine				
α -Casein	47-57	199	Milchdrüse	5
β -Casein	25-35	209	Milchdrüse	12
k-Casein	8-15	169	Milchdrüse	5
Molkenproteine				

β-Lactoglobulin	9.8	162	Milchdrüse	8
α-Lactalbumin	3.7	123	Milchdrüse	3
Serumalbumin	1.2	608	Leber	7
Immunglobuline	1.8-5.0		Leber / Milchdrüse	

1.5.2 Genetische Varianten des β-Caseins in der Kuhmilch

Die verschiedenen genetischen Varianten des Caseins lassen sich durch isoelektrische Fokussierung voneinander trennen (*Bovenhuis et al. 1989*). Eine gebräuchliche Methode, die Aminosäuresequenzen des β-Caseins zu analysieren, ist die PCR (*Lindersson et al. 1995*). Es sind bisher mehrere Varianten des β-Caseins entdeckt worden, wobei laut COGNOSAG Workshop-Report (*Larsen et al. 1992*) die A1-, A2-, A3-, A4-, B-, D-, E-, C-, A3M- und die B2-Varianten unterschieden werden. Ein Jahr später identifiziert Lien die A5-Variante und Visser 1995 das β-Casein F-5P (*Lien et al. 1993, Visser et al. 1995*).

Die beiden häufigsten genetischen Varianten des β-Caseins sind die A1- und A2-Varianten (*Van Eenennaam et al. 1991*). β-Casein A1 und A2 unterscheiden sich nur in einer einzigen Aminosäure an Position 67, wobei A1 Histidin und A2 Prolin enthält (*Eigel et al. 1984*).

1.5.3 Immunologische Bedeutung des Caseins

Polymorphkernige Leukozyten von Neugeborenen haben eine geringere bakterizide Aktivität und Chemotaxis verglichen mit der ihrer Mütter (*Mills et al. 1979*). Diese immunologische Lücke wird potentiell durch die Bestandteile der Muttermilch aufgewogen. Denn neben der ernährungsphysiologisch wichtigen Rolle stärkt die Muttermilch auch die Abwehr gegen bakterielle und virale Infektionen. Dafür sorgt ein hoher Gehalt an Immunglobulinen, hauptsächlich IgA (*Achi et al. 1992*), aber auch an verschiedenen Enzymen wie Lysozym und Peroxidase und an eisenbindenden Proteinen wie Laktoferrin und Transferrin (*Goldman et al. 1985*). Durch enzymatische Spaltung von Casein im Darm werden biologisch aktive Peptide (Gly-Leu-Phe und Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr) freigesetzt, die die Phagozytoseaktivität von kindlichen Makrophagen *in vitro* steigern (*Gattegno et al. 1988*). Diese Peptide vermögen Mäuse *in vivo* gegen die sonst letale *Klebsiella pneumoniae*-Infektion zu schützen (*Parker et al. 1984, Migliore-Samour et al. 1992*). Spezifische Bindungen an immunkompetente Zellen sind für die verschiedenen Peptide des Caseins nachgewiesen worden (*Jaziri et al. 1992*). Humanes Casein trägt somit zur Stimulation des Immunsystems bei Neugeborenen bei und ist durch eine „strategisch aktive Zone“ mit immunmodulierendem Effekt gekennzeichnet (*Migliore-Samour et al. 1988*).

1.6 Antikörper gegen Kuhmilchproteine

IgG-Antikörper gegen Kuhmilchproteine sind schon in geringen Mengen bei Geburt vorhanden, nehmen dann bei ausschließlich mit Muttermilch ernährten Kindern kontinuierlich ab und erreichen einen erneuten Anstieg bei Einführung von Kuhmilchprodukten. Neugeborene, die schon sehr früh (< 1 Monat) tierische Milchprodukte bekommen, zeigen den höchsten und schnellsten Anstieg von IgG-Kuhmilchantikörpern (*Taino et al. 1988*). Voraussetzung für eine lokale Immunreaktion ist, daß die Antigen-wirksamen Proteine intakt das Darmepithel, welches bei Säuglingen und Kleinkindern eine höhere Durchlässigkeit zeigt, passieren können (*Ring 1992, Schmidt 1994*). Kuhmilchproteinantikörper der Klassen IgA und IgM sind bei Geburt noch nicht vorhanden, steigen dann aber an,

wobei das Maximum für IgA-Antikörper bei 28 Monaten und das für IgM-Antikörper bei 6 Monaten liegt (*Taino et al. 1988*).

Auf einen Zusammenhang von Kuhmilchantikörpern und Typ 1-Diabetes weisen verschiedene Arbeitsgruppen hin. So haben z. B. Savilahti und Mitarbeiter in mehreren Studien bei frisch manifestierten Diabetikern signifikant höhere Konzentrationen von IgA- und IgG-Antikörpern gegen Kuhmilch nachgewiesen als bei Kontrollen (*Savilahti et al. 1988, 1993*). Auch andere Arbeitsgruppen fanden IgA-Antikörper erhöht. Die Konzentration dieser Antikörper ist negativ zur Stilldauer und positiv zum Kuhmilchkonsum korreliert. Der Antikörpertiter war signifikant assoziiert mit dem Risiko, einen Typ 1-Diabetes zu entwickeln (*Dahlquist et al. 1992, Virtanen et al. 1994*).

1.6.1 Bovines Serumalbumin (BSA)

Serumkonzentrationen von BSA-Antikörpern in diabetischen Tiermodellen (NOD-Maus und BB-Ratte) waren signifikant höher als in Kontrolltieren (*Beppu et al. 1987, Scott et al. 1989*). Weiterhin konnte im Tierversuch ein Betazell-Oberflächenprotein (p69) aufgezeigt werden, an das die BSA-Antikörper binden. Ein Vergleich der Primärstruktur von bovinem Serumalbumin mit der DR- und DQ- β -Kette ließen eine Region der Übereinstimmung zwischen den Aminosäuren 157-175 der MHC-Klasse II-Antigene erkennen (*Glerum et al. 1989*).

Karjalainen und Mitarbeiter führten Immuno-Assays und Western-Blots zur Erfassung von BSA-Antikörpern bei 142 Kindern mit Typ 1-Diabetes durch. Alle Diabetespatienten hatten erhöhte Serumkonzentrationen von IgG-Antikörpern gegen BSA, jedoch nicht von Antikörpern gegen andere Milchproteine. Somit konnte hier von einer spezifischen Immunantwort ausgegangen werden. Die Antikörperkonzentration sank nach der Diagnosestellung ab und erreichte innerhalb von 1-2 Jahren Normalspiegel. Ein Großteil der Antikörper war gegen ABBOS, eine bestimmte Sequenz des BSA-Moleküls bestehend aus 17 Aminosäuren von Position 152-168, gerichtet. Antikörper gegen dieses Peptid reagierten mit p69 und könnten so an der Entwicklung der Inselzeldysfunktion bei Typ 1-Diabetikern beteiligt sein (*Karjalainen et al. 1992*). Auch andere Arbeitsgruppen haben ähnliche signifikante Ergebnisse bei finnischen, französischen und brasilianischen diabetischen Kindern

gefunden, jedoch nicht mit einer so hohen Frequenz wie Karjalainen (*Saukkonen et al. 1994, Levy-Marchal et al. 1995, Pardini et al. 1996*). Krokowski und Mitarbeiter wiesen auch bei Patienten, deren Typ 1-Diabetes sich erst im Erwachsenenalter manifestierte, höhere Antikörper-Titer gegen BSA nach, insbesondere wenn die Patienten HLA-DR3 positiv waren (*Krokowski et al. 1995*).

Dennoch sind die Daten in der Literatur kontrovers. So konnten Atkinson und Mitarbeiter keinen Unterschied bezüglich der Prävalenz von Antikörpern gegen bovines Serumalbumin bei Diabetikern und Kontrollpersonen finden (*Atkinson et al. 1993*). Die Diskrepanzen könnten zum einen auf verschiedenen Nachweismethoden (ELISA, IFT, RIA) beruhen, wobei jede Assay-Technik eine andere Teilmenge von BSA-Antikörpern mit einer geringen IgG- oder IgA-Überlappung nachweist (*Karjalainen et al. 1992*). Zum anderen könnten auch Unterschiede von Alter und Dauer des Diabetes, aber auch die verschiedenen Nationalitäten eine Mitursache sein (*Pardini et al. 1996*). Die Bedeutsamkeit von BSA-Antikörpern in der prädiabetischen Phase ist letztendlich noch nicht geklärt.

1.6.2 β -Laktoglobulin

IgG- (*Savilahti et al. 1993, Ahmed et al. 1997*) und IgA- (*Dahlquist et al. 1992*) Antikörper gegen β -Laktoglobulin sind bei Diabetikern im Vergleich zu Kontrollpersonen in signifikant höheren Konzentrationen nachzuweisen, wobei die jüngsten Patientengruppen die höchsten Werte erreichen.

Bei kurzer Stildauer und früher Einführung von Milchprodukten in die Säuglingsnahrung treten häufiger und in höheren Konzentrationen Antikörper gegen β -Laktoglobulin auf, die mit einem erhöhten Risiko eines Typ 1-Diabetes assoziiert sind (*Dahlquist et al. 1992*).

1.6.3 Casein

Obwohl Casein den größten Teil der Milchproteine bildet, sind Casein-Antikörper bisher kaum untersucht worden. In einer Studie mit je 44 Diabetikern und Kontrollpersonen wurden unter anderem Antikörper gegen Casein bestimmt. Trotz höherer Konzentrationen bei Diabetikern war das Ergebnis statistisch nicht signifikant (*Karjalainen et al. 1992*).

1.7 Kuhmilch und Typ 1-Diabetes

1.7.1 Kuhmilchkonsum

Es ist eine enge Assoziation zwischen dem durchschnittlichen jährlichen Kuhmilchkonsum pro Person und der jährlichen Diabetesinzidenz bei Kindern im Alter von 0-14 Jahren in verschiedenen Ländern festgestellt worden. Die Korrelation zwischen Kuhmilchkonsum und Diabetesinzidenz beträgt 0.96, was einer linearen Regression entspricht. Eine Analyse der Daten zeigt, daß 94 % der geographischen Varianz der Inzidenz durch den unterschiedlichen Kuhmilchkonsum erklärt werden kann (*Dahl-Jorgensen et al. 1991*). Diese Ergebnisse konnten auch durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden (*Scott 1990, Muntoni et al. 1994*). So fanden Fava und Mitarbeiter den gleichen Zusammenhang zwischen Kuhmilchkonsum und Inzidenz des Typ 1-Diabetes für neun verschiedene Regionen innerhalb Italiens (*Fava et al. 1994*).

Die Diabetesinzidenz variiert geographisch sehr stark. So beträgt sie in Japan 0.6 Fälle pro 100.000 Personen und Jahr bei einem Kuhmilchkonsum von ca. 40 l / Person / Jahr, während Finnland die weltweit höchste Inzidenzrate mit 42.9 Fällen pro 100.000 Personen und Jahr bei einem Kuhmilchkonsum von ca. 225 l / Person / Jahr aufweist (*DERI Group 1988, Green et al. 1992, Muntoni et al. 1994*).

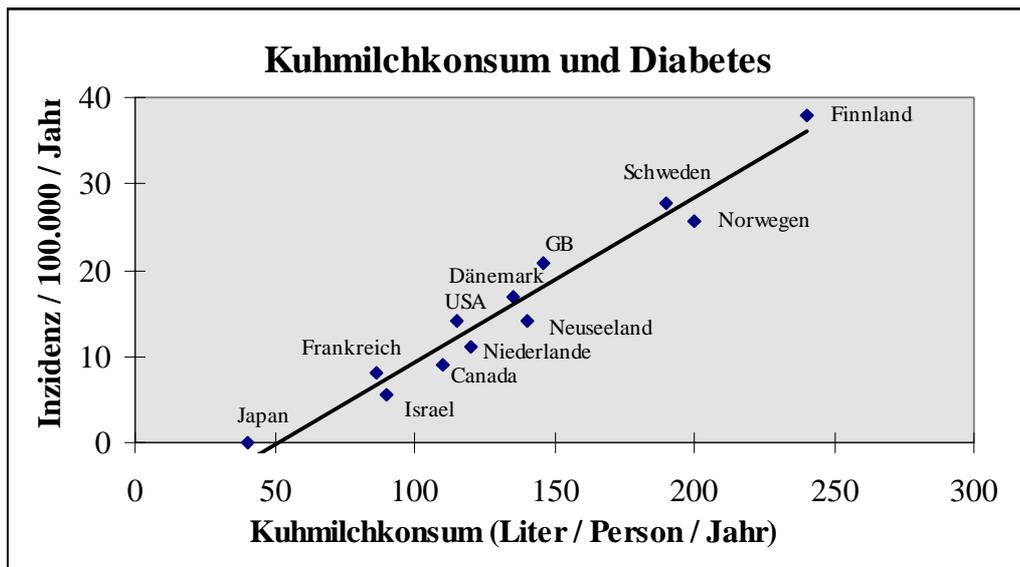


Abb. 1.1: Kuhmilchkonsum und Diabetesinzidenz in verschiedenen Ländern (Daten aus Scott 1990, Dahl-Jorgensen 1991, Muntoni 1994)

1.7.2 Stlldauer

Schon 1984 wurde bei diabetischen Kindern eine kürzere Stlldauer als bei ihren gesunden Geschwistern und Kontrollgruppen festgestellt (*Borch-Johnsen et al. 1984*). Der Anteil bei Typ 1-Diabetikern, die in ihrer Kindheit jemals gestillt worden sind, liegt um 30 % niedriger als bei gesunden Kontrollen. (*Mayer et al. 1988*). Ein Vergleich der Diabetesinzidenz mit der Stlldauer zeigt eine negative Korrelation in verschiedenen Ländern (*Scott 1990*). Diese Ergebnisse sind in den letzten Jahren vielfach bestätigt worden. Alle Arbeitsgruppen haben bei Typ 1-Diabetikern eine frühere Kuhmilchexposition bzw. eine kürzere Stlldauer im Vergleich zu Kontrollpersonen festgestellt (*Kostraba et al. 1993, Virtanen et al. 1993, Verge et al. 1994*). Andererseits liegen auch Untersuchungen vor, die keinen Zusammenhang finden konnten (*Nigro et al. 1985, Bodington et al. 1994*).

Eine Meta-Analyse von 13 epidemiologischen Studien, in denen Diabetesinzidenz und Stlldauer untersucht wurden, zeigte, daß eine frühe Kuhmilchexposition ein 1.5-fach höheres Risiko birgt, später an einem Diabetes mellitus zu erkranken (*Gerstein 1994*).

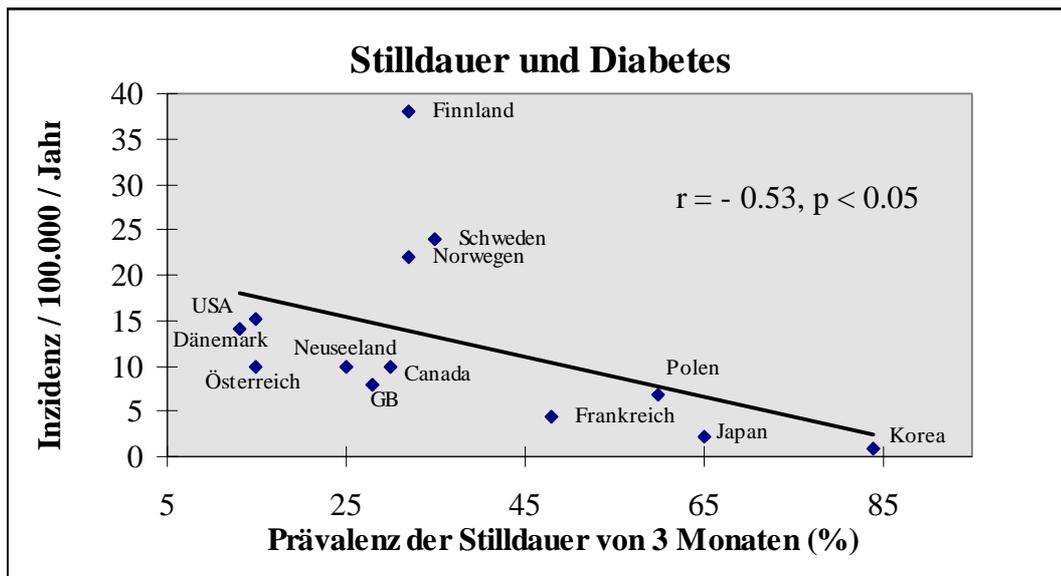


Abb. 1.2: Stildauer und Diabetesinzidenz (Daten aus Scott 1990)

1.7.3 Diät

Tiermodelle, die spontan einen Diabetes mellitus entwickeln, sind nützliche Hilfsmittel, diabetogene Nahrungsbestandteile zu identifizieren. Untersuchungen zeigten, daß der natürliche Verlauf und insbesondere die Frequenz des Diabetes in Tiermodellen durch verschiedene Diäten manipuliert werden können (*Scott et al. 1996*).

So konnte bei BB-Ratten die normale Inzidenz von 50 % auf 15% reduziert werden, wenn diese mit einer semisynthetischen Diät ernährt wurden, in der die Proteine durch L-Aminosäuren ersetzt wurden. Bei einer Supplementierung von Milchpulver stieg die Diabetesinzidenz dagegen auf 52 % an (*Elliott et al. 1984*).

Diäten, die hydrolysiertes Casein als einzige Proteinquelle beinhalten, bewirkten eine drastische Senkung der Diabetesinzidenz. Dies trat aber nur ein, wenn die Diät vor dem 30. Lebensstag zugeführt wurde. Gleichzeitig wurde die Expression der MHC-Klasse I-Antigene auf den endokrinen Zellen des Pankreas reduziert. Ratten mit deutlicher Reduktion der Expression entwickelten keine Insulinitis und keinen Diabetes. Andere Nahrungszusätze hingegen konnten die Diabetesinzidenz nicht beeinflussen (*Issa-Chergui et al. 1988, Hoorfar et al. 1991,1992, Li et al. 1995*). Analog der Diät der BB-Ratten wurden entsprechende Ergebnisse bei NOD-Mäusen erzielt. Auch hier ließ sich mit hydrolysiertem Casein die Diabetesinzidenz deutlich verringern bzw. sogar komplett verhindern. Zusätzlich war der Schweregrad der

Insulitis geringer ausgeprägt bei den Mäusen, die an einem Diabetes erkrankt waren (Coleman et al. 1990, Hoorfar et al. 1993, Hermitte et al. 1995).

Interessanterweise entwickelten Mäuse, denen Casein von indischen Kühen (*Bos indicus*) zugeführt wurde, keinen Diabetes. Im Gegensatz dazu stieg die Diabetesinzidenz bei Verwendung von Casein europäischer Kühe (*Bos taurus*). Die zwei genetischen Varianten des β -Caseins (A1 und A2) wurden in vergleichbaren Untersuchungen getestet, wobei nur die A1-Variante einen Diabetes mellitus verursachte, während die A2-Variante die Diabetesmanifestation verhinderte (Elliott 1994).

1.8 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Während die Bedeutung von verschiedenen Bestandteilen der Kuhmilch wie z. B. bovines Serumalbumin oder β -Lactoglobulin im Zusammenhang mit der Entstehung eines Typ 1-Diabetes mellitus schon in zahlreichen Studien analysiert worden ist, liegen noch keine größeren Untersuchungen zur Wertigkeit von β -Casein A1- und A2-Antikörpern hinsichtlich Ätiologie, Prävalenz und Pathogenese des Typ 1-Diabetes mellitus vor.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in dem Nachweis der Titerhöhe und der Häufigkeitsverteilung von Antikörpern gegen die häufigsten genetischen Varianten des β -Caseins, A1 und A2, bei Typ 1-Diabetikern sowie deren Geschwistern, Eltern und gesunden Kontrollpersonen.

Somit sollte nicht nur die Wertigkeit der β -Casein A1- und A2-Antikörper bei manifest an Typ 1-Diabetes mellitus erkrankten Personen, sondern auch ihre Bedeutung in der prädiabetischen Phase von klinisch gesunden Personen, die aufgrund ihrer positiven Familienanamnese ein erhöhtes Erkrankungsrisiko besitzen, eruiert werden.

Dabei wurde insbesondere die Frage untersucht, wie die Titer der β -Casein A1- und A2-Antikörper in den einzelnen Gruppen mit Alter, Geschlecht, Manifestationsalter, Diabetesdauer, ICA und IAA korrelieren. Weiterhin wurde eine vergleichende Darstellung der Antikörpertiter zwischen den verschiedenen Gruppen vorgenommen. Zusätzlich wurden qualitative Unterschiede der Antikörperbindung gegen die A1- bzw. A2-Variante des β -Caseins innerhalb der verschiedenen Gruppen untersucht. Hierbei wurden Seren der prospektiven Familienstudie Gießen- / Bad Oeynhausen verwendet. Die β -Casein A1- und A2-Antikörper wurden mittels eines ELISA gemessen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Familienstudie

2.1.1 Aufbau

Die Grundlage der vorliegenden Arbeit bildeten Serumproben der 1985 begonnenen Gießen- / Bad Oeynhaus-Studie.

Es handelte sich hierbei um eine prospektive Familienstudie in Zusammenarbeit mit der Diabetesklinik Bad Oeynhaus und der III. Medizinischen und Poliklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Erforschung des insulinpflichtigen Diabetes mellitus. Neben der Untersuchung von organspezifischen Autoantikörpern gegen Parietalzellen, Nebenniere, Schilddrüse und antinukleären Antikörpern galt die Bedeutung vor allem der pankreasspezifischen Autoimmunität (*Federlin et al. 1987, Becker et al. 1990, 1991*).

Die Seren der an der Studie teilnehmenden Diabetiker und Verwandten ersten Grades wurden in halbjährlichen Abständen abgenommen. Die Vollblutproben wurden nach der Entnahme zentrifugiert und in mehreren Aliquots bei - 20 Grad Celsius konserviert. Zur Bestimmung von Meßwerten wurden jeweils nur geringe Mengen einer Serumprobe aufgetaut, um die Qualität der Proben möglichst wenig zu beeinträchtigen.

In dieser Arbeit wurden die Seren auf die Anwesenheit von Kuhmilchproteinen untersucht.

2.1.2 Population

Die Population setzte sich aus jeweils einem Typ 1-Diabetiker als Indexperson, dessen Eltern sowie mindestens einem Geschwisterteil im Alter unter 16 Jahren zusammen.

Insgesamt wurden die Seren von 1257 Personen (inklusive Kontrollpersonen, siehe 2.1.3) auf die Anwesenheit von β -Casein-Antikörpern untersucht. Davon waren 287 Teilnehmer Typ 1-Diabetiker (140 männlich, 147 weiblich, Durchschnittsalter 16

Jahre, SD 6.97), 386 gehörten der Gruppe der Geschwister an (181 männlich, 205 weiblich, Durchschnittsalter 16 Jahre, SD 6.58) und 477 Teilnehmer entfielen auf die Elternteile (223 männlich, 254 weiblich, Durchschnittsalter 43 Jahre, SD 6.75). Die folgende Tabelle zeigt die Altersverteilung innerhalb der einzelnen Gruppen (Tab. 2.1).

Tab. 2.1: Altersverteilung der Studienteilnehmer und Kontrollpersonen

		Alter in Jahren						
		1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	>50	Gesamt*
Geschwister	n=	89	204	80	7			380
IDDM	n=	45	214	17	3	6	2	287
Elternteile	n=			8	157	257	51	473
Kontrollen	n=	33	24	14	10	8	8	97

*Die Anzahl der hier aufgeführten Personen unterscheidet sich geringfügig von der Anzahl der getesteten Personen, da sich bei einigen wenigen (insgesamt 20 von 1257) das Alter nicht ausfindig machen ließ.

2.1.3 Kontrollpersonen

Das Kontrollkollektiv wurde aus 107 gesunden Probanden gebildet, die keine Autoimmunerkrankung und keine positive Familienanamnese eines Typ 1-Diabetes aufwiesen. Das Durchschnittsalter der Kontrollpersonen beträgt 22 Jahre (SD 18.02) und liegt somit im Bereich des Durchschnittsalters der Teilnehmer der prospektiven Familienstudie (27 Jahre).

2.1.4 ICA und IAA

Alle in halbjährlichen Abständen eingehenden Proben der Gießen- / Bad Oeynhausener-Studie wurden mit der Immunfluoreszenztechnik auf Inselzellantikörper untersucht (*Becker et al. 1988, 1989*). Weiterhin wurden Insulinautoantikörper sowie Insulinantikörper der Klassen IgM und IgG mit Hilfe der ELISA-Technik bestimmt (*Kräuter et al. 1988, 1989, Schmelling et al. 1989*).

Die in dieser Arbeit verwendeten Werte für ICA und IAA wurden den vorgenannten Arbeiten entnommen.

2.2 Material

2.2.1 Puffer und Substratlösungen

Coatingpuffer

2.94 g NaHCO₃ + 1.59 g Na₂CO₃ in Aqua dest. auflösen
mit 1 mol Salzsäure auf pH 9.5 einstellen

β-Casein A1- und A2-Stammlösung

Antigen in Coatingpuffer in einer Konzentration von 10 µg / ml auflösen

Waschpuffer

Verdünnung von 500 ml PBS-Konzentrat auf 5000 ml mit Aqua dest.
Zugabe von 2.5 ml Tween 20 ⇒ 0.05 % Lösung

Proben

Verdünnung des Serums 1 : 100 mit Waschpuffer

Zweiter Antikörper

Verdünnung des zweiten Antikörpers 1 : 1000 mit Waschpuffer

Diethanolaminpuffer

97 ml $C_4H_{11}NO_2$ + 0.2 g NaN_3 + 0.1 g $MgCl_2 \cdot H_2O$ ad 700 ml cum H_2O

Einstellen des pH auf 9.8-9.9 mit 1 mol / l Salzsäure; ad 1000 ml cum H_2O

Substratpuffer

Substrat $C_6H_4NNa_2O_6P \cdot 6H_2O$ in einer Konzentration von 1 mg / ml in

Diethanolaminpuffer auflösen

2.2.2 Chemikalien und Reagenzien

Natriumkarbonat (Na_2CO_3)

zur Analyse

Best.Nr.: 6392

Fa. Merck

Natriumhydrogenkarbonat ($NaHCO_3$)

zur Analyse

Best.Nr.: 6329

Fa. Merck

Aqua ad iniectabilia

1000 ml

Fa. B. Braun Melsungen AG

PBS-Phosphatpufferkonzentrat

pH 7.4 ± 0.1

Best.Nr.: 3613

Fa. Biologische Arbeitsgemeinschaft GmbH, Lich

Tween 20 Polyäthylenglycolsorbitanmonolaurat

Best.Nr.: 3472

Fa. Caesar & Loretz

Alkalische Phosphatase konjugierter Anti-Human IgG-Antikörper

γ-Ketten-spezifisch, affinitätsgereinigt, aus Kaninchen

Best.Nr.: 309055008

Fa. Dianova

4-Nitrophenylphosphatdinatriumsalz-Hexahydrat (C₆H₄NNa₂O₆P*6H₂O)

für biochemische Zwecke

Best.Nr.: 6850

Fa. Merck

Diethanolamin (C₄H₁₁NO₂)

zur Synthese

Best.Nr.: 803116

Fa. Merck-Schuchardt

Natriumazid (NaN₃)

reinst

Best.Nr.: 6688

Fa. Merck

Magnesiumchlorid (MgCl₂*6H₂O)

zur Analyse

Best.Nr.: 5833

Fa. Merck

Salzsäure (HCl)

1 mol / l

1 N Lösung

Best.Nr.: 9060

Fa. Merck

Natronlauge (NaOH)

3 N Lösung

Best.Nr.: 9913

Fa. Merck

β-Casein A1 und A2

freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. R. B. Elliott, Neuseeland

2.2.3 Material und Geräte

pH-Meter

Präzisions-pH-Meter

Fa. Wissenschaftl. Technische Werkstätten

Combitips (Eppendorf)

12.5 ml

Best.Nr. 146947805

Fa. Kalensee

Handdispenser (Eppendorf)

Eppendorf Multipipette

Typ 4780

Best.Nr.: 146947800

Fa. Kalensee

Pipettenspitzen blau

100-1000 µl

Best.Nr.: 210061

Fa. Müller-ratiolab

Pipettenspitzen gelb

10-100 µl

Best.Nr.: 210060

Fa. Müller-ratiolab

Pipettenspitzen weiß

0.5-200 µl

Best.Nr.: 77-898-C2

Fa. Titertek

Mikrotiterplatten 96K

F-Form, erhöhter Rand

Best.Nr.: 655101

Fa. Greiner

Röhrchen-Tubes

500 Stck.; 3.5 ml

Best.Nr.: 55484

Fa. Sarstedt

Bechergläser

verschiedene Größen

Fa. Braun

Laborrührer

Typ RM 18

IKA-Werk

Multipipette

2-200 µl; 8 Kanal

Fa. Titertek

Titertek Multiskan Plus ELISA Reader

Typ 311 AO

Serie 1122-032, EFLAB

Fa. Flow

2.3 ELISA

2.3.1 Testprinzip

ELISA ist die Abkürzung für Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Der hier angewendete ELISA wird zur Bestimmung von β -Casein A1- und A2-Antikörpern eingesetzt.

1. Das Antigen in Coating-Puffer (Bikarbonatpuffer) wird in die Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben.
2. Nach einer Inkubationszeit hat sich ein Teil an die Plastikoberfläche angelagert. Das restliche Antigen wird ausgewaschen.
3. Der zu testende Antikörper wird hinzugegeben und bindet an das Antigen. Ungebundene Proteine werden durch einen erneuten Waschvorgang entfernt.
4. Zugabe eines zweiten Antikörpers, der kovalent an ein Enzym (alkalische Phosphatase) gebunden ist. Der Antikörper richtet sich gegen den Fc-Anteil des ersten Antikörpers. Auch hier wird der nicht gebundene Anteil des zweiten Antikörpers ausgewaschen.
5. Hinzufügen eines Substrats, das durch den Enzymanteil des zweiten Antikörpers in ein farbiges Endprodukt umgesetzt wird. Die Farbe verändert sich proportional der Reaktionsintensität zwischen Enzym und Substrat.
6. Die Menge des Testantikörpers wird über eine photometrische Bestimmung des angefärbten Enzym-Substrat-Komplexes bei definierter Wellenlänge gemessen.

Die folgende Abbildung stellt schematisch das Testprinzip des ELISA dar (Abb. 2.1).

ELISA Testprinzip

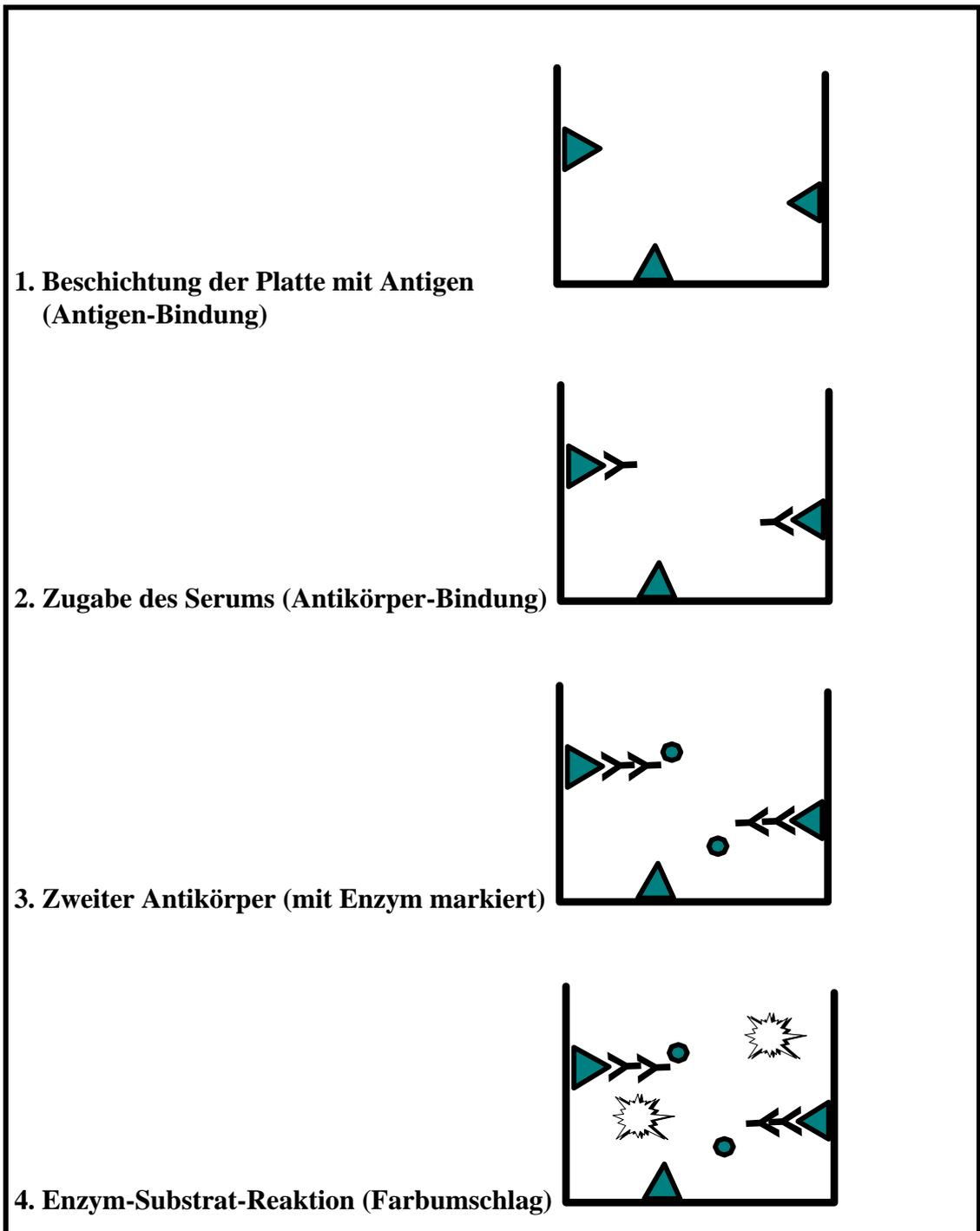


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Testprinzips eines ELISA

2.3.2 β -Casein A1- und A2-ELISA

Antikörper gegen die beiden häufigsten genetischen Varianten des β -Caseins wurden mittels eines von Hermann E. Wasmuth bereits etablierten ELISA im Immunologischen Labor der Medizinischen Klinik III und Poliklinik bestimmt (*Disputationsarbeit Wasmuth, eingereicht*). In der folgenden Beschreibung wird die angewandte Testmethode dargestellt.

Zum Beschichten der Mikrotiterplatten wird β -Casein A1 bzw. A2 mit einem frisch zubereiteten Coating-Puffer auf eine Konzentration von 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ verdünnt. Da sich β -Casein nur sehr schlecht in Aqua dest. auflöst, wird es für jeden Versuch neu in Coating-Puffer aufgelöst. Die Reihen 1,2,5,6,9 und 10 der Mikrotiterplatten werden mit je 100 μl der Verdünnung pro Vertiefung beschichtet. In die Reihen 3,4,7,8,11 und 12 werden je 100 μl Coating-Puffer ohne β -Casein pro Vertiefung einpipettiert. Anschließend werden die Platten bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

Die folgende Abbildung verdeutlicht das Pipettierschema des β -Casein-ELISA (Abb. 2.2).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Probe 1			Nullwert				Probe 11				
B	Probe 2			Std. 1 : 1600				Probe 12				
C	Probe 3			Std. 1 : 800				Probe 13				
D	Probe 4			Std. 1 : 400				Probe 14				
E	Probe 5			Std. 1 : 200				Probe 15				
F	Probe 6			Std. 1 : 100				Probe 16				
G	Probe 7			Probe 9				Probe 17				
H	Probe 8			Probe 10				Probe 18				

 = mit β -Casein A1- bzw. A2-beschichtete Reihen

 = unbeschichtete Reihen

Abb. 2.2: Pipettierschema des β -Casein ELISA

Nach Abschütten der Überstände erfolgt ein dreifaches Waschen der Platten mit 200 μl Waschpuffer pro Vertiefung. Anschließend werden die zu untersuchenden

Serumproben (100 µl / well) in einer Verdünnung von 1:100 in PBS / Tween 20 auf die Mikrotiterplatte aufgetragen.

Die Serumproben werden in jeweils vier nebeneinander liegenden Wells der Platten pipettiert, so daß spezifische und unspezifische Bindung nebeneinander zu sehen sind. Es werden jeweils Doppelbestimmungen der spezifischen und der unspezifischen, d. h. der durch die Affinität von Serum an die Mikrotiterplatte hervorgerufenen Hintergrundbindung, durchgeführt. Aus beiden Doppelbestimmungen wird jeweils der Mittelwert gebildet. Die unspezifische Hintergrundbindung wird dann von der spezifischen Bindung als absoluter Wert subtrahiert, um nur die tatsächlichen Antikörperspiegel im Serum der Probanden zu beurteilen. Diese werden dann als Δ Units / ml wiedergegeben.

Nach einer Inkubation der Seren von einer Stunde bei 37°C und darauffolgenden dreimaligem Waschen mit PBS / Tween 20 werden die Antikörper mit einem zweiten Antikörper (mit alkalischer Phosphatase konjugierter anti-human IgG-Antikörper aus Kaninchen) in einer Verdünnung von 1:1000 nachgewiesen. Die Inkubationszeit des zweiten Antikörpers beträgt ebenfalls eine Stunde bei 37°C.

Vor der abschließenden Enzymreaktion wird erneut dreimal für je 2 Minuten gewaschen. Es wird zunächst das Substrat NPD in einer Konzentration von 1 mg / ml in Substratpuffer hinzugegeben. Der Substratpuffer wird sofort nach Fertigstellung mit 150 µl / well auf die Platte pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit erfolgt der Stop der Enzymreaktion mit 50 µl 1 molarer Natronlauge.

Abschließend wird von den einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm die Extinktion gemessen.

Die nachstehende Tabelle zeigt die Arbeitsschritte des β -Casein-ELISA (Abb. 2.2).

Tab. 2.2.: Arbeitsschritte des β -Casein-ELISA

	Arbeitsschritt	Reagenz	Konz.	Menge	Zeit	Temp.
1.	Coating	β -Casein A1 bzw. A2 Reihen 1,2,5,6,9,10	10 $\mu\text{g} / \text{ml}$	100 $\mu\text{l} / \text{well}$		
	Inkubation	Coating-Puffer Reihen 3,4,7,8,11,12		100 $\mu\text{l} / \text{well}$	1 h	37°C
2.	3 x Waschen	PBS / Tween 20	0.05 %	200 $\mu\text{l} / \text{well}$	2 min.	22°C
3.	Serum Inkubation	PBS / Tween 20	1 : 100	100 $\mu\text{l} / \text{well}$	1 h	37°C
4.	3 x Waschen	PBS / Tween 20	0.05 %	200 $\mu\text{l} / \text{well}$	2 min.	22°C
5.	Zweiter Antikörper Inkubation	PBS / Tween 20	1 : 1000	100 $\mu\text{l} / \text{well}$	1 h	37°C
6.	3 x Waschen	PBS / Tween 20	0.05 %	200 $\mu\text{l} / \text{well}$	2 min.	22°C
7.	Enzym Inkubation	Substratpuffer	1 mg / ml	150 $\mu\text{l} / \text{well}$	30 min.	22°C
8.	Stop	NaOH	1 mol / l	50 $\mu\text{l} / \text{well}$		
9.	Extinktion		405 nm			

2.3.3 Standardkurve

Für jedes zu untersuchende Serum wurden Doppelbestimmungen für die spezifische und unspezifische Bindung durchgeführt. Aus beiden Doppelbestimmungen wurde dann jeweils der Mittelwert errechnet. Die unspezifischen Bindungen an die antigenfreien Vertiefungen der Platte wurden von den spezifischen Ergebnissen der antigenbeschichteten Vertiefungen subtrahiert, um die endgültigen Extinktionswerte zu erhalten.

Um die Schwankungen der verschiedenen Assays auszugleichen, wurde ein Verfahren mit einem hochpositiven Standardserum gewählt. Dieses Serum wurde in fünf verschiedenen Konzentrationen auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Standard 1 = 1:1600, Standard 2 = 1:800, Standard 3 = 1:400, Standard 4 = 1:200 und Standard 5 = 1:100. Zusammen mit einem Nullwert (Standard 0), bei dem kein Serum pipettiert wird, ließ sich aus den Werten eine Standardkurve zeichnen (Abb. 2.3).

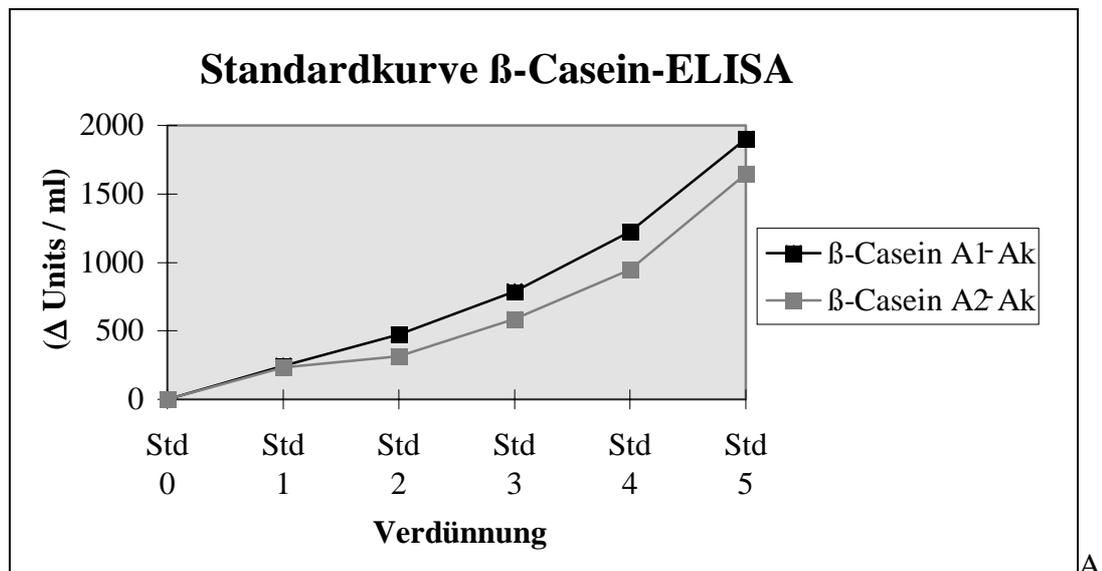


Abb. 2.3.: Standardkurve der β -Casein A1- und A2-Antikörper

Die Ergebnisse der nachfolgenden Serumproben wurden dann mit Hilfe des ELISA-Reader automatisch abgelesen und auf der Standardkurve eingeordnet. Auf jeder Mikrotiterplatte verblieb somit noch Platz für 18 zu untersuchende Serumproben. Es zeigte sich hierbei, daß sich die Extinktionswerte der Seren ohne Verrechnung mit der Standardkurve nicht wesentlich von den Werten unterscheiden, die mit der

Standardkurve verrechnet wurden. Aus diesen Gründen sind die gemessenen Werte bei der Auswertung der Ergebnisse absolute Werte, die bei 405 nm Wellenlänge als Delta Units/ml ($\Delta U/ml$) mit Hilfe des ELISA-Reader abgelesen wurden.

2.4 Statistische Methoden

2.4.1 Statistische Auswertung

Die Erfassung der Daten erfolgte mit EXCEL 5.0. Für die statistische Auswertung, die vom Institut für medizinische Informatik (Leiter: Prof. Dr. J. Dudeck) unterstützt wurde, ist SPSS for Windows verwendet worden. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mit EXCEL 5.0 und mit Harvard Graphics 3.0.

Deskriptive Auswertungen:

Kombinationen von qualitativen Merkmalen ließen sich anhand von Kreuztabellen darstellen und für die quantitativen Meßwerte wurden Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt.

Vergleichende Auswertungen:

Zusammenhänge zwischen verschiedenen stetigen Parametern wurden mit Hilfe der linearen Regression, Spearman-Rang-Korrelation und multiplen Regression beurteilt.

Zusammenhänge zwischen qualitativen Merkmalen wurden durch Kontingenztafeln dargestellt und mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests bewertet.

Unterschiede zwischen den Verwandtschaftsgraden wurden altersbereinigt mit Hilfe der einfachen Covarianzanalyse getestet.

2.4.2 Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizient

Die Parameter zur Präzisionsbestimmung für den β -Casein-ELISA sind in der folgenden Tabelle aufgeführt (Tab. 2.3). Die hier angegebenen Werte, die der Dissertationsarbeit von Hermann E. Wasmuth entnommen sind, basieren auf je 10 Untersuchungen.

Die Variationsbreite entsprach den für einen ELISA üblichen Schwankungen der Meßwerte.

Tab. 2.3.: Darstellung der Inter- und Intra-Assay-Variationskoeffizienten der verwendeten Testsysteme

	Inter-Assay-Koeffizient	Intra-Assay-Koeffizient
β-Casein A1-ELISA	9.8 %	7.4 %
β-Casein A2-ELISA	10.2 %	8.7 %