

## **4. DISKUSSION**

### **4.1 ELISA zum Nachweis von $\beta$ -Casein-Antikörpern**

1971 beschrieben Engvall und Perlmann erstmals eine ELISA-Testmethode zum Nachweis von IgG (*Engvall et al. 1971*), die im Laufe der Zeit kontinuierlich weiterentwickelt wurde und heute eine gängige Methode darstellt, um Antikörper gegen die verschiedensten Proteine nachzuweisen (*Burks et al. 1989*).

$\beta$ -Casein A1- und A2-Antikörper sind zuvor bei Diabetikern jedoch noch nie im Rahmen einer prospektiven Familienstudie untersucht worden. In der vorliegenden Arbeit wurden die  $\beta$ -Casein-Antikörper mit Hilfe eines ELISA bestimmt.

Hierbei handelt es sich um einen Festphasenassay, bei dem es nach der Antigenbindung an die Festphase zu einer Bindung der Antikörper an das Antigen kommt. Vorversuche zu diesem ELISA, der die valide und spezifische Bestimmung der  $\beta$ -Casein A1- und A2-Antikörper ermöglicht, sind in der Dissertationsarbeit von Hermann E. Wasmuth beschrieben, wobei die wichtigsten Einflußgrößen im folgenden kurz erwähnt werden.

Wichtig für die Spezifität des Assays erscheint insbesondere die optimale Antigenkonzentration, die in dieser Studie bei 10  $\mu$ g Casein / ml lag und so zur maximalen Bindung der Antikörper führte.

Ein Problem aller Antikörper-Bestimmungen mit einem ELISA stellt die unspezifische Bindung dar. Diese Problematik wurde schon in anderen Publikationen erörtert (*Goldman et al. 1978, Reeves 1980*). Einige Autoren führten eine Korrektur der unspezifischen Bindung durch (*Goldman et al. 1978*), während andere ihre Ergebnisse ohne Berichtigung beließen (*Reeves 1980*). Da die unspezifische Bindung von Patient zu Patient und selbst auch bei demselben Patienten variieren kann (*Storms et al. 1986*), wurden in dieser Arbeit zum einen Doppelbestimmungen sowohl der spezifischen als auch der unspezifischen Bindung durchgeführt, um größere Schwankungen in der Antikörperbindung

rechtzeitig zu bemerken. Zum anderen wurde jede einzelne Serumprobe durch Subtraktion des arithmetischen Mittelwertes der unspezifischen von der spezifischen Bindung korrigiert. Das Ergebnis der Antikörperbindung der jeweiligen Serumprobe wurde dann in  $\Delta$  Units / ml wiedergegeben.

Zusätzlich wurde eine hohe Serumverdünnung (1:100) gewählt, um die unspezifische Bindung möglichst auf ein Minimum zu reduzieren.

Eine weitere Einflußgröße stellt die Temperatur dar. Hier zeigten sich die niedrigsten unspezifischen Bindungen bei einer Außentemperatur von 24 - 28 °C, wohingegen sich die unspezifischen Bindungen bei hohen Außentemperaturen (35 °C) fast verdoppelten und so das Ablesen der  $\Delta$  Units / ml unmöglich machten.

Die IgG-Spezifität der Antikörper wurde durch IgG-Präzipitation nachgewiesen. Durch eine Vorinkubation der Seren mit diabetesrelevanten (BSA, Humaninsulin, Schweineinsulin) und diabetesirrelevanten Antigenen (HSA,  $\gamma$ -Globuline), die die Antikörperkonzentrationen nicht wesentlich reduzierten, wurde eine mögliche Kreuzreaktivität der  $\beta$ -Casein A1- und A2-Antikörper mit anderen Antigenen ausgeschlossen.

Für den gesamten Test wurden ungefähr 5 - 6 Stunden benötigt, so daß das Verfahren nicht zuletzt wegen seiner einfachen Handhabung gut im routinemäßigen Laborbetrieb durchführbar ist. Da der beschriebene ELISA bereits etabliert und weitestgehend von Störgrößen bereinigt war, konnte er als Screening-Methode für  $\beta$ -Casein A1- und A2-Antikörper im Immunologischen Labor der Medizinischen Poliklinik problemlos eingesetzt werden.

## 4.2 $\beta$ -Casein A1- und A2-Antikörper

In dieser Studie wurden erstmals bei Typ 1-Diabetikern und ihren Verwandten ersten Grades Antikörper gegen die zwei häufigsten genetischen Varianten des  $\beta$ -Caseins systematisch untersucht.

$\beta$ -Casein A1 und A2 unterscheiden sich nur in einer Aminosäure an Position 67. An der A1-Variante befindet sich die Aminosäure Histidin, die bei der A2-Variante durch die Aminosäure Prolin ersetzt ist (*Eigel et al. 1984*).

Aufgrund der selektiven Durchlässigkeit der Darmmukosa für tryptische Fragmente des bovinen  $\beta$ -Caseins in den ersten Lebensmonaten ist eine Immunisierung des Individuums mit dem Hexapeptid des  $\beta$ -Casein Moleküls, welches sich an Position 63 - 68 befindet, möglich. Wegen der bekannten immunologischen Aktivität wird es auch als „immunmodulatorisches Peptid“ bezeichnet (*Migliore-Samour et al. 1988*). Eine Bindung dieser Hexapeptide an immunkompetente Zellen wurde bereits dargestellt (*Jaziri et al. 1992*).

Es kann deshalb prinzipiell von einer Antikörperantwort gegen das  $\beta$ -Casein ausgegangen werden. Da die beiden  $\beta$ -Casein Varianten A1 und A2 in der Aminosäurebesetzung der Position 67 variieren, besteht die Möglichkeit, daß dieses „immunmodulatorische Peptid“ eine verschieden stark ausgeprägte Antikörper-Antwort induziert. Deshalb ist es sinnvoll,  $\beta$ -Casein A1- und A2-Antikörper getrennt voneinander zu bestimmen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Immunantwort gegen die beiden  $\beta$ -Caseine A1 und A2 bei Typ 1-Diabetikern, ihren Geschwistern und Eltern sowie gesunden Kontrollpersonen unterschiedlich abläuft. Desweiteren soll dadurch die mögliche pathogenetische Rolle der Kuhmilch im Zusammenhang mit dem insulinpflichtigen Diabetes mellitus näher beleuchtet werden.

In dieser Studie ist in allen vier Gruppen (Diabetiker, Geschwister, Eltern und Kontrollpersonen) das Auftreten von  $\beta$ -Casein A1- und A2-Antikörpern altersabhängig.

Mit steigendem Lebensalter nahm die  $\beta$ -Casein A1- und A2-Antikörperkonzentration ab.

Der Grund für diese Altersabhängigkeit ist vermutlich in der generellen kindlichen Reaktion auf immunologische Stimuli zu suchen. Verschiedene Untersuchungen belegen, daß die Immunantwort auf unterschiedliche Antigene bei Kindern im allgemeinen verstärkt ist (*Karjalainen et al. 1986, Mc Evoy et al. 1986*). Die Ergebnisse einer verstärkten kindlichen Immunantwort werden dadurch unterstützt, daß in der Gruppe der Eltern die Altersabhängigkeit zwar auch vorhanden, jedoch weitaus geringer ausgeprägt ist.

Die zweite zentrale Aussage dieser Studie ist der unterschiedlich hohe Antikörpertiter in den einzelnen Gruppen. In absteigender Reihenfolge präsentieren sich die vier untersuchten Gruppen auf folgende Weise: Diabetiker, Geschwister, Eltern und Kontrollen. Die Typ 1-Diabetiker haben die höchsten  $\beta$ -Casein A1- und A2-Antikörperkonzentrationen, während bei der Kontrollgruppe die niedrigsten Werte gemessen wurden.

Die negative Korrelation von  $\beta$ -Casein A1- und A2-Antikörpern mit dem Lebensalter der Probanden kann zum Teil die höhere Prävalenz dieser Antikörper bei Diabetikern und Geschwistern im Vergleich zu Eltern und Kontrollpersonen erklären, da den beiden erstgenannten Gruppen auch die jüngsten Teilnehmer der Studie angehören.

Daß diese Abhängigkeit aber dennoch einen eigenständigen, unabhängigen Faktor darstellt und nicht nur durch die Altersabhängigkeit erklärt werden kann, läßt sich aus folgenden Beobachtungen herleiten: Bei gleichem Durchschnittsalter der Diabetiker und Geschwister liegt die Antikörperkonzentration der Diabetiker tendentiell höher, wenn auch nicht statistisch signifikant. Außerdem weisen auch Eltern mit einem Durchschnittsalter von 43 Jahren tendentiell höhere (aber statistisch nicht signifikante) Antikörperkonzentrationen auf als die jüngere Kontrollgruppe mit einem Durchschnittsalter von 22 Jahren, obwohl bei alleiniger Altersabhängigkeit ein umgekehrtes Ergebnis erwartet worden wäre.

Weiterhin waren die Antikörper in allen Gruppen geschlechtsunabhängig und weder mit den Krankheitsmarkern ICA noch mit IAA korreliert und somit

voraussichtlich Resultat einer von diesen Antikörpern unabhängigen Immunantwort.

Zwischen dem Manifestationsalter der Typ 1-Diabetiker und den beiden häufigsten genetischen Varianten des  $\beta$ -Caseins (Casein A1 und A2) fand sich eine Korrelation. Antikörper ließen sich bei den in jüngeren Jahren Erkrankten in höheren Konzentrationen nachweisen als bei den älteren Patienten. Daraus läßt sich jedoch nicht ableiten, ob dies ein selbständiger Faktor ist oder ob es nicht eher im Zusammenhang mit der bereits beschriebenen Altersabhängigkeit im Zusammenhang steht. Keine Abhängigkeit konnte mit der Diabetesdauer gefunden werden.

Bei einem Vergleich der  $\beta$ -Casein A1- und A2-Antikörper zwischen den verschiedenen Gruppen, in denen der Einfluß des Alters durch eine entsprechende Alterskorrektur in einer Covarianzanalyse aufgehoben wurde, unterschieden sich Diabetiker von ihren Eltern und Kontrollpersonen hoch signifikant bzw. signifikant. Ebenso unterschieden sich die Geschwister verglichen mit ihren Eltern und Kontrollpersonen hoch signifikant bzw. signifikant.

Im Gegensatz dazu war zwischen Diabetikern und ihren Geschwistern sowie zwischen Eltern und Kontrollpersonen statistisch kein Unterschied bezüglich der  $\beta$ -Casein A1- und A2-Antikörperkonzentrationen nachweisbar.

Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle (Tab. 4.1) dargestellt und im folgenden Text näher erläutert.

Tab. 4.1: Signifikanzen zwischen den verschiedenen Gruppen bezüglich der  $\beta$ -Casein A1- und A2-Antikörper

	Casein A1	Casein A2
<b>Diabetiker und Geschwister</b>	n.s.	n.s.
<b>Diabetiker und Eltern</b>	$p < 0.001$	$p = 0.015$
<b>Diabetiker und Kontrollen</b>	$p < 0.001$	$p = 0.015$
<b>Geschwister und Eltern</b>	$p < 0.001$	$p = 0.015$
<b>Geschwister und Kontrollen</b>	$p < 0.001$	$p = 0.015$
<b>Eltern und Kontrollen</b>	n.s.	n.s.

Als Erklärung für die annähernd gleichartige Immunantwort der beiden Gruppen dient sicherlich der ähnliche genetische Hintergrund, auch wenn Diabetiker tendenziell höhere Casein A1- und A2-Antikörperkonzentrationen aufweisen als ihre Geschwister. Außerdem ist hier von gleichen Umweltfaktoren bezüglich der Ernährung insbesondere mit Kuhmilch, die sich bereits in früher Kindheit auf beide Gruppen gleichermaßen ausgewirkt haben, auszugehen.

Überdies ist das Ergebnis konform mit dem anderer Familienstudien, in denen Antikörper (z. B. ICA) bei Diabetikern bestimmt wurden. Es finden sich auch dort überzufällig häufig erhöhte Antikörper bei Geschwistern der Diabetiker im Vergleich zu Normalpersonen (*Becker et al. 1990*).

Somit überrascht es nicht, daß sich Geschwister und Diabetiker hoch signifikant von der Kontrollgruppe unterscheiden.

Erstaunlich ist es dagegen, daß es hier trotz des gemeinsamen Genoms signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe der Diabetiker und ihren Eltern und der Gruppe der Geschwister und ihren Eltern gibt. Dies könnte an den unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten in der Kindheit der Eltern im Vergleich zur Kindheit der Diabetiker bzw. ihrer Geschwister liegen.

Die niedrigen Antikörpertiter der Normalgruppe sind höchstwahrscheinlich auf ein im Vergleich zu Diabetikern niedrigeres genetisches Risiko zurückzuführen. Das gegenüber der Kontrollgruppe geringfügig erhöhte genetische Risiko der Diabetesentwicklung bei den Eltern kommt in einer tendenziell höheren Antikörperkonzentration der Eltern zum Ausdruck, wenngleich dies statistisch nicht signifikant ist.

### **4.3 Unterschiedliche Bindung der Seren an die A1- oder A2-Variante des $\beta$ -Caseins**

Interessanterweise ließ sich eine präferentielle Bindung der Seren an die eine oder die andere Variante des  $\beta$ -Caseins nachweisen. Hierzu wurden die Mittelwerte der  $\beta$ -Casein A1-Antikörper von den Mittelwerten der  $\beta$ -Casein A2-Antikörper in den einzelnen Gruppen subtrahiert.

Während die Typ 1-Diabetiker und ihre Geschwister einen positiven Wert, d.h. eine höhere Konzentration an  $\beta$ -Casein A1-Antikörpern aufwiesen, zeigte sich bei Eltern und gesunden Kontrollpersonen ein negativer Wert.

Dieser Unterschied einer präferentiellen Bindung zwischen den vier Gruppen an eine der beiden häufigsten genetischen Varianten des  $\beta$ -Caseins war statistisch hoch signifikant ( $p < 0.001$ ).

Es kann davon ausgegangen werden, daß in der vorliegenden Studie die Seren der Diabetiker und Geschwister bevorzugt an die A1-Variante binden, während in den Seren der Eltern und Kontrollpersonen vermehrt Antikörper gegen die A2-Variante des  $\beta$ -Caseins nachzuweisen sind.

Diese Beobachtung im Zusammenhang mit dem Diabetes mellitus erscheint aus verschiedenen Gründen von entscheidender Bedeutung.

Untersuchungen im Tierversuch zeigen, daß durch Hinzufügen oder Weglassen von Kuhmilchproteinen die Manifestation des insulinpflichtigen Diabetes mellitus manipuliert werden kann (*Scott et al. 1996*).

Ein vollständiges Entfernen von Casein aus der Nahrung verhindert bei der ansonsten spontan diabetisch werdenden NOD-Maus das Auftreten der Erkrankung (*Elliott et al. 1984, 1988*).

Spezifischere Untersuchungen haben gezeigt, daß bei Gabe von  $\beta$ -Casein A1 eine normale bis sogar über dem Durchschnitt liegende Diabetesentwicklung im Tiermodell stattfindet, während bei Verwendung von  $\beta$ -Casein A2 oder humanem Casein die Rate praktisch auf 0 % sinkt (*Elliott 1994*).

Sowohl Resultate der vorgenannten Studie, in der Mäuse nach Gabe von  $\beta$ -Casein A1 einen Diabetes entwickeln, als auch Ergebnisse dieser Arbeit, in der Seren von

Typ 1-Diabetikern und ihren Geschwistern vermehrt Antikörper gegen die A1-Variante des  $\beta$ -Caseins aufweisen, deuten möglicherweise darauf hin, daß vor allem der A1-Variante eine besondere Rolle in Bezug auf die Pathogenese des Diabetes zuzuschreiben ist.

Dagegen könnte der A2-Variante des  $\beta$ -Caseins, die bei Supplementierung zur Nahrung die Manifestation des Diabetes im Tiermodell verhindert, und die in dieser Studie bevorzugt an Seren von gesunden Kontrollpersonen bindet, unter Umständen eine protektive Rolle zukommen.

Es wäre mit Sicherheit interessant,  $\beta$ -Casein Antikörper bei der mit A1 bzw. A2 gefütterten NOD-Maus zu bestimmen, um so einen engeren Zusammenhang zwischen alimentär zugeführten  $\beta$ -Casein und der humoralen Immunantwort der Maus herzustellen.

Weitere Hinweise auf eine Beteiligung von Kuhmilchbestandteilen an der Pathogenese des Typ 1-Diabetes mellitus liefern Beobachtungen epidemiologischer Art.

Eine starke Korrelation zwischen steigendem Kuhmilchkonsum und der gleichzeitig steigenden Diabetesinzidenz ist festgestellt worden (*Dahl-Jorgensen et al. 1991*).

Überdies zeigten Migrationsstudien ein Fehlen des Typ 1-Diabetes mellitus in West Samoa. Wandern jedoch Teile dieser Bevölkerung nach Neuseeland aus, beträgt die Diabetesinzidenz 10 Fälle pro 100.000 Personen und Jahr (*Elliott 1994*). Interessanterweise gibt es in West Samoa keinerlei Kühe, so daß auch hierdurch wieder die Hypothese der Kuhmilch als möglicher Faktor in der Pathogenese des Diabetes mellitus unterstrichen wird.

Migrationsstudien mit anderen ethnischen Gruppen, z. B. Asiaten, die nach Großbritannien emigrieren, spiegeln analoge Ergebnisse wider (*Elliott et al. 1989, Drash 1990, Bodansky et al. 1992, Lipton et al. 1995*). So untersuchten Bodansky und Mitarbeiter 151 Kinder in Großbritannien, von denen 26 asiatischen Ursprungs waren. Asiatische Familien zeigten eine ansteigende Diabetesinzidenz bei den Kindern, die in Großbritannien geboren waren. Außerdem verdoppelte sich die Inzidenz mit 4,4/100.000 pro Jahr von 1978-84 auf 9,1/100.000 pro Jahr von 1985-90. Diese Inzidenz war nahezu identisch mit der Inzidenz für nicht-



asiatische Kinder in der gleichen Region von Großbritannien. Die asiatischen Kinder scheinen hier einem Umweltfaktor ausgesetzt zu sein, zu dem sie vor der Migration keinen Kontakt hatten.

Eine weitere Studie vom Elliott und Mitarbeitern scheint die in der vorliegenden Arbeit gefundene differierende Wertigkeit von  $\beta$ -Casein A1- und A2-Antikörpern zu stützen. So basiert die Ernährung des Massai-Volkes in Ostafrika hauptsächlich auf Kuhmilchprodukten (Elliott et al. 1995). Jedoch entwickeln überraschenderweise entgegen der Annahme, daß ein Zusammenhang zwischen Kuhmilchkonsum und Diabetes besteht (Dahl-Jorgensen et al. 1991), nur wenige Personen einen Diabetes. Als Erklärungsmöglichkeit dient die Tatsache, daß die Milch, die von den Massai konsumiert wird, von der Rinderrasse „Bos indicus“, einer Zebu Art, stammt. Die Milch dieser Kuhart enthält kein  $\beta$ -Casein A1, sondern fast ausschließlich die A2-Variante des  $\beta$ -Caseins (Ng-Kwai-Hang et al. 1992).

In den letzten Jahren werden in der westlichen Welt immer häufiger Milchviehrassen gezüchtet, deren Milch weniger Fett und mehr Protein enthält. Diese Kühe produzieren durchschnittlich aber mehr  $\beta$ -Casein A1 als die herkömmlichen Herden. Die sog. „A2 Kuh“, welche z. B. die vorherrschende Rasse in Afrika ist, ist aufgrund des hohen Fettgehalts nicht mehr erwünscht.

Überdies besteht verstärkt die Tendenz zur Einnutzungsrassen, zu der bei den Milchrasen unter anderem die Holstein-Friesen Kuh, eine Abstammung vom *Bos taurus*, zählt (Kielwein 1994), deren Milch hauptsächlich die A1-Variante des  $\beta$ -Caseins enthält. Die vermehrte geographische Verbreitung dieses Rindertypes in Europa und parallel dazu der gleichzeitige Anstieg der Diabetesinzidenz (Sebastiani et al. 1996) könnte einen Zusammenhang bedeuten.

Dies könnte den Anstieg der Diabetesinzidenz in Ländern erklären, in denen zur selben Zeit das selektive Züchten von diesen modernen Milchkühen begonnen hat. Im Tierversuch mit NOD-Mäusen konnte gezeigt werden, daß Casein von der indischen Kuh (*Bos indicus*), welches als 10 % -iger Zusatz einer auf Soja basierenden Kindernahrung (Prosobee) dazugegeben wurde, keinen Diabetes verursacht. Prosobee alleine ist nicht diabetogen. Auf der anderen Seite wirkt

Casein von der europäischen Kuh (*Bos taurus*) als 10 % ger Zusatz zu Prosobee bei Mäusen diabetogen (*Elliott 1994*).

#### **4.4 Mögliche pathogenetische Bedeutung von $\beta$ -Casein A1 im Zusammenhang mit dem Typ 1-Diabetes mellitus**

Für einen Zusammenhang zwischen der Zufuhr von  $\beta$ -Casein A1 und der Entwicklung eines Typ 1-Diabetes kann folgende Hypothese entwickelt werden:

Bei einem genetisch prädisponierten Menschen kommt es bei vorzeitiger alimentärer Casein A1-Aufnahme im frühen Kindesalter zu einer Sensibilisierung gegen  $\beta$ -Casein. Dies tritt nur bei A1-Caseinen auf, da sich durch das Histidin in Position 67 eine zusätzliche Cleavage-Stelle ergibt und somit A1-Casein zu Casomorphinen abgebaut werden kann (*Becker 1995, unveröffentlichte Daten, persönliche Mitteilung*). Diese Casomorphine dringen durch die beim Neugeborenen noch nicht suffiziente Darm-Blut-Schranke in die Peyerschen Plaques und führen hier zu einer Sensibilisierung der Lymphozyten.

Nach dieser Sensibilisierung beim genetisch Prädisponierten könnte es nun nach einer langen Latenzphase im Rahmen eines viralen Infekts oder durch andere exogene Noxen zu einer Aktivierung der sensibilisierten Lymphozyten kommen und so zum Anstoßen der für die Beta-Zelle letalen Autoimmunkaskade kommen. Stillen in den ersten 3 Lebensmonaten vermindert zum einen die Zufuhr von  $\beta$ -Casein A1 (*Gerstein 1994*), da das immunstimulierende Hexapeptid des humanen Caseins eine völlig andere Aminosäurezusammensetzung enthält als das bovine Casein (*Elliott 1994*). Zum anderen führen immunsuppressive Faktoren im Colostrum und in der transitorischen Milch zu einer Immuntoleranz im Sinne einer verbesserten Self- / Non-Self-Diskrimination (*Minchewa et al. 1990, Mandalapu et al. 1995*).

Andererseits wäre es auch denkbar, daß  $\beta$ -Casein Antikörper nicht direkt an der autoimmunen Zerstörung der B-Zellen beteiligt sind. Möglicherweise gibt es gegen  $\beta$ -Casein gerichtete T-Zell-Rezeptoren, die nach entsprechender Aktivierung die Zerstörung der Beta-Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas einleiten können. Die  $\beta$ -Casein Antikörper wären dann vielmehr als Epiphänomene einer eventuell T-Zell vermittelten Antikörper-Reaktion zu sehen.

Es ist durchaus möglich, daß Casein-Antikörper nur Marker sind, die die Sensibilisierung ausdrücken, aber keinen Beitrag zum Immunprozeß selbst leisten.

Um jetzt bereits  $\beta$ -Casein-Antikörper als serologische Marker in der präklinischen Phase des Typ 1-Diabetes mellitus verwenden zu können bzw. um zu klären, inwiefern  $\beta$ -Casein-Antikörper als prädiktive Marker verwertbar sind, erfordert es weitere Untersuchungen.

Zum einen ist es wichtig, einen Normalwert im Kindesalter bei gesunden Kontrollpersonen zu bestimmen. Zusätzlich müßten mit Hilfe einer prospektiven Familienstudie bei den genetisch prädisponierten Geschwistern von Typ 1-Diabetikern  $\beta$ -Casein A1- und A2-Antikörper über einen langen Zeitraum bestimmt werden. Dies ist erforderlich um herauszufinden, ob es bei bestimmten Antikörpertitern zur Manifestation des insulinpflichtigen Diabetes mellitus kommt.

Darüber hinaus erscheint es erstrebenswert, Antikörper gegen die häufigsten genetischen Varianten des  $\beta$ -Caseins in noch größeren Probandengruppen sowie im Tierversuch weiter zu verfolgen. Dies verspricht außerdem, Einblick zu geben in die dem Diabetes mellitus zugrunde liegenden Pathomechanismen.

Auch wenn  $\beta$ -Casein vielleicht nur eine additive Rolle in der multifaktoriellen Genese der chronisch progredienten Autoimmunerkrankung des Typ 1-Diabetes mellitus spielt, erscheint es doch aufgrund der Beobachtungen der präferentiellen Bindung der Seren von Diabetikern und ihren Geschwistern an die A1-Variante in dieser Studie wichtig zu sehen, ob eine  $\beta$ -Casein A1-freie Ernährung die Diabetesinzidenz auch beim Menschen reduzieren kann.

In jedem Falle kann die Beobachtung aber bereits jetzt als Warnhinweis insofern gelten, als es sinnvoll erscheint, in gefährdeten Familien bei Neugeborenen die Stillzeit möglichst lange auszudehnen und den Beginn des Kuhmilchersatzes zu verzögern.

## **5. ZUSAMMENFASSUNG**

Im Zusammenhang mit dem insulinpflichtigen juvenilen Diabetes mellitus Typ 1 gewinnen in den letzten Jahren zunehmend Änderungen der Ernährungsgewohnheiten an Bedeutung. In zahlreichen Studien wurden verschiedene Bestandteile der Kuhmilch als möglicher Umweltfaktor bezüglich der Pathogenese des Typ 1-Diabetes mellitus untersucht.

Für das Milchprotein Casein lagen bisher noch keine größeren Untersuchungen zur Wertigkeit hinsichtlich Ätiologie, Prävalenz und Pathogenese des Diabetes mellitus vor.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals in einer so groß angelegten Studie wie dieser Antikörper gegen die häufigsten genetischen Varianten des  $\beta$ -Caseins bestimmt. Die Grundlage hierzu bildeten Serumproben der Giessen / Bad Oeynhausen Studie, einer prospektiven Familienstudie. Insgesamt wurden 1257 Seren von 287 Typ 1-Diabetikern, 386 Geschwistern und 477 Elternteilen auf die Anwesenheit von  $\beta$ -Casein A1- und A2-Antikörpern untersucht. Das Kontrollkollektiv bestand aus 107 gesunden Probanden, die keine positive Diabetes-Familienanamnese aufwiesen.

Neben den Unterschieden in der Höhe der Antikörpertiter wurde auch die unterschiedliche Bindung der  $\beta$ -Casein-Antikörper an die A1- bzw. A2-Variante zwischen den vier Gruppen analysiert. Durchgeführt wurden die Untersuchungen mittels eines ELISA.

Eine wesentliche Abhängigkeit bestand bezüglich der Casein-Antikörperkonzentrationen. Die Typ 1-Diabetiker hatten die höchsten  $\beta$ -Casein A1- und A2-Antikörperkonzentrationen, während bei der Kontrollgruppe die niedrigsten Werte gemessen wurden. Dazwischen lagen die Geschwister, die niedrigere Konzentrationen als die Diabetiker, aber höhere als ihre Eltern aufwiesen.

Es wurde weiterhin eine eindeutige Altersabhängigkeit von  $\beta$ -Casein A1- und A2-Antikörpern festgestellt. Für alle vier untersuchten Gruppen waren hohe Werte streng mit niedrigem Lebensalter korreliert. Diese Beobachtung war statistisch hoch signifikant.

Während keine Korrelation mit der Dauer der Erkrankung demonstriert werden konnte, war aber die Antikörperhäufigkeit streng signifikant korreliert mit dem Manifestationsalter. Es zeigten sich höhere Antikörpertiter bei Diabetikern, deren Erkrankung sich in jüngeren Jahren manifestierte.

Weder Casein A1- noch A2-Antikörper waren mit dem Geschlecht, mit ICA oder IAA korreliert.

Bei Betrachtung der  $\beta$ -Casein A1- und A2-Antikörper zwischen den verschiedenen Gruppen unterscheiden sich Diabetiker von ihren Eltern und Kontrollpersonen hoch signifikant bzw. signifikant. Ebenso unterscheiden sich die Geschwister verglichen mit ihren Eltern und Kontrollpersonen hoch signifikant bzw. signifikant.

Im Gegensatz dazu war zwischen Diabetikern und ihren Geschwistern sowie zwischen Eltern und Kontrollpersonen statistisch kein Unterschied bezüglich der  $\beta$ -Casein A1- und A2-Antikörperkonzentrationen nachweisbar.

Bei einem qualitativen Vergleich der  $\beta$ -Casein A1- mit den A2-Antikörpern fanden sich bei Typ 1-Diabetikern und ihren Geschwistern vermehrt A1-Antikörper. Im Gegensatz hierzu waren in den Seren der Eltern und Kontrollpersonen vermehrt Antikörper gegen die A2-Variante nachzuweisen. Die präferentielle Bindung der Seren an die eine oder andere Variante des Caseins war bei einem Vergleich aller vier Gruppen statistisch hoch signifikant ( $p < 0.001$ ).

In einem näheren Zusammenhang mit dem insulinpflichtigen Diabetes mellitus scheint die A1-Variante des  $\beta$ -Caseins zu stehen. Auf der anderen Seite könnte der A2-Variante eher eine protektive Rolle zugesprochen werden.

Zusammenfassend wurde in dieser Studie der in der Literatur beschriebene Zusammenhang zwischen Kuhmilch und Diabetes durch Bestimmung der Antikörper gegen die häufigsten genetischen Varianten des  $\beta$ -Caseins näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß  $\beta$ -Casein A1 ein mögliches potentielles Antigen in der Pathogenese des Diabetes darstellt.

Weitere Untersuchungen sind jedoch noch notwendig, um die pathogenetischen Erklärungsmodelle dieser Studie weiterzuverfolgen bzw. bestätigen zu können.

Die Ergebnisse dieser Familienstudie lassen es in der Zusammenschau mit den Literaturdaten als sinnvoll erscheinen, in Familien mit einer Prädisposition zur Typ 1-Diabetesentwicklung die Stillzeit bei Neugeborenen möglichst lange auszudehnen und den Beginn des Kuhmilchersatzes zu verzögern.