

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie

Nahrungsbestandteile und deren Einfluss auf die Pathogenese von Autoimmundiabetes bei Mensch und Maus

Daniela Bettina Müller

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

Doktors der Haushalts- und Ernährungswissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. J. J. Hauner

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H. Daniel
2. apl. Prof. Dr. A-G. Ziegler

Die Dissertation wurde am 05.01.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 25.02.2010 angenommen.

Für meine beiden Großväter

Inhaltsverzeichnis

1	Aufgabenstellung	1-3
2	Einleitung und Literaturübersicht	4-23
2.1	Grundlagen des Typ 1 Diabetes.....	4
2.1.1	Bedeutung der Genetik.....	5-6
2.1.2	Pathogenese und immunologische Hintergründe des Typ 1 Diabetes.....	6-8
2.2	Weizen und seine Proteinfractionen.....	8-9
2.2.1	Zöliakie und die Assoziation zwischen Typ 1 Diabetes und Zöliakie.....	10-14
2.2.2	Einfluss von Weizenproteinen auf die Entwicklung des Autoimmundiabetes im Tiermodell.....	14
2.2.3	Tiermodelle des Typ 1 Diabetes.....	14-15
2.2.4	Einfluss diätetischer Faktoren auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes im Tiermodell.....	16
2.3	Kuhmilch und ihre Proteinfractionen.....	17-18
2.3.1	Einfluss von Kuhmilchproteinen auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes im Tiermodell.....	18-19
2.4	Einfluss von Weizen und Kuhmilch beim humanen Typ 1 Diabetes.....	19-21
2.5	Assoziation zwischen Darm-assoziiertem Immunsystem und Autoimmundiabetes.....	21-22
2.6	Weitere Nahrungsbestandteile und deren mögliche Assoziation mit Typ 1 Diabetes	22-23
3	Material und Methoden	24-41
3.1	Untersuchungen am NOD-Mausmodell.....	24
3.1.1	Mäusekollektiv.....	24
3.1.2	Diäten.....	24-27
3.1.3	Protokoll Teilversuch 1 und 1a.....	27-29
3.1.4	Protokoll Teilversuch 2.....	29-30
3.1.5	Protokoll Teilversuch 3.....	31

3.2	Experimentelle Methoden.....	32
3.2.1	Getreideextraktion zur Gewinnung der Proteinfractionen...	32-34
3.2.2	Herstellung von Proteinextrakten aus Nahrungs- oder Futtermitteln.....	35
3.2.3	Elektrophoretische Auftrennung der Proteinfractionen (SDS-Page).....	36-37
3.2.4	Bestimmung der Proteingehalte der Extrakte.....	37
3.2.5	IgG-Insulinautoantikörpermessungen in murinen und humanen Seren.....	37-39
3.2.6	Radioliganden-Bindungsassay mit Nahrungsbestandteilen	39
3.2.7	IAA-Affinitätsmessungen und Reaktivität mit Hühnerinsulin.....	40
3.2.8	IgA-Insulinautoantikörpermessungen in humanen Seren...	40-41
3.3	Statistik.....	41
4	Ergebnisse	42-79
4.1	Fütterungsversuche mit NOD-Mäusen.....	42
4.1.1	Nahrungsaufnahme und Gewichtsentwicklung der NOD-Mäuse in den Versuchsgruppen.....	42
4.2	Teilversuch 1 – weizen-und caseinhaltiges Futter im Vergleich zu einer basalen Diät.....	43-44
4.2.1	Kumulatives Diabetesrisiko der NOD-Mäuse in Teilversuch 1.....	44
4.2.2	Insulinautoantikörper-Prävalenzen der NOD-Mäuse im Alter von zehn Lebenswochen in Teilversuch 1.....	45
4.2.3	Diabetesinzidenz der NOD-Mäuse vor und nach 25 Lebenswochen in Teilversuch 1.....	46
4.3	Teilversuch 2 – Weizen und Weizenbestandteile.....	46
4.3.1	Quantifizierung und Qualität der extrahierten Weizenfraktionen.....	46-48
4.3.2	Kumulatives Diabetesrisiko der NOD-Mäuse in Teilversuch 2.....	48-50
4.3.3	Insulinautoantikörper-Prävalenzen der NOD-Mäuse im Alter von zehn Lebenswochen in Teilversuch 2.....	50-51

4.3.4	Diabetesinzidenz der NOD-Mäuse vor und nach 25 Lebenswochen in Teilversuch 2.....	51-52
4.4	Teilversuch 3 – Ergänzende Nahrungsbestandteile.....	52
4.4.1	Kumulatives Diabetesrisiko der NOD-Mäuse in Teilversuch 3.....	52-53
4.4.2	Insulinautoantikörper-Prävalenzen NOD-Mäuse in Teilversuch 3 im Alter von zehn Lebenswochen.....	54-55
4.4.3	Diabetesinzidenz der NOD-Mäuse in Teilversuch 3 vor und nach 25 Lebenswochen.....	55-56
4.5	Diabetesentwicklung bei Fütterung aller Diäten im Vergleich.....	56-57
4.6	Diabetesentwicklung männlicher NOD-Mäuse im Teilversuch 1a.....	57
4.6.1	Kumulatives Diabetesrisiko der männlichen NOD-Mäuse in Teilversuch 1a.....	57-58
4.6.2	Diabetesinzidenz der männlichen NOD-Mäuse in Teilversuch 1a vor und nach 25 Lebenswochen.....	58-59
4.7	Reaktivität von humanen Insulinautoantikörpern mit Hühnerinsulin und IgA-Isotypenmessung.....	59
4.7.1	Bindungseigenschaften von humanen Insulinautoantikörpern mit Hühnerinsulin.....	59-62
4.7.2	Identifizierung von Insulinautoantikörpern des IgA-Isotyps	62-64
4.8	IAA-Bindungseigenschaften und Reaktivität mit Lebensmittelproteinen in humanen Seren.....	65
4.8.1	Proteinlösungen der ausgewählten Lebensmittel.....	65-67
4.8.2	Bindungseigenschaften von Insulinautoantikörpern an Proteinextrakte ausgewählter Lebensmittelbestandteile.....	68-71
4.8.3	Häufigkeit der kreuzreaktiven Insulinautoantikörper-Komponente in Seren ausgewählter Probanden.....	71-73
4.8.4	Eingrenzung und Identifizierung der Milchprotein-komponenten, die an kreuzreaktive Insulinautoantikörper binden.....	73-79
5	Diskussion.....	80-95

5.1	Fütterungsversuche mit NOD-Mäusen.....	80-82
5.1.1	Effekte unterschiedlicher Proteinquellen auf die Diabetesentwicklung im NOD-Modell.....	82
5.1.2	Wirkungen von gestaffelten Weizenulagen und einzelnen Weizenproteinfraktionen auf die Diabetesentwicklung im NOD-Modell.....	83-85
5.1.3	Einfluss weiterer Nahrungskomponenten der Kleinkindernahrung auf die Diabetesentwicklung im NOD-Modell.....	85-87
5.1.4	Abschließende Betrachtung der Ernährungsversuche am NOD-Modell.....	87
5.2	Reaktivität von humanen Insulinautoantikörpern mit Hühnerinsulin und IgA-Isotypenmessung.....	87-88
5.2.1	Bindungsverhalten von Insulinautoantikörpern an Hühnerinsulin in humanen Seren.....	88-89
5.2.2	Identifizierung von IgA-Insulinautoantikörper Isotypen in humanen Seren.....	89-90
5.2.3	Abschließende Betrachtung der Tests zu den Bindungseigenschaften und Isotypen der Insulinautoantikörper.....	90-91
5.3	Bindung kreuzreaktiver Insulinautoantikörper an Casein....	91
5.3.1	Untersuchungen zu Bindungseigenschaften der Insulinautoantikörper mit Nahrungskomponenten in humanen Seren.....	91-93
5.3.2	Untersuchung der Insulinautoantikörperbindung an einzelne Proteinfraktionen der Kuhmilch.....	93
5.3.3	Abschließende Betrachtung der Tests zu den kreuzreaktiven Insulinautoantikörpern.....	93-94
5.4	Zukunftsaussichten.....	94-95
6	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen.....	96-100
7	Literatur.....	101-117

Inhaltsverzeichnis.....	I-V
Abbildungsverzeichnis.....	VI-VIII
Tabellenverzeichnis.....	IX-X
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
Vorveröffentlichungen.....	XII
Lebenslauf.....	XIII-XIV
Danksagung.....	XV

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Modell zur Entwicklung von Typ 1 Diabetes.....	6
Abb. 2	Stammbaum der für die Ernährung relevanten Getreidearten.....	9
Abb. 3	Peptidmodifikation im Darmlumen durch die tissue-Transglutaminase (t-TG).....	12
Abb. 4	Zuteilung der weiblichen NOD-Mäuse auf die Zucht- und Versuchsgruppen in Teilversuch 1.....	28
Abb. 4a	Zuteilung der männlichen NOD-Mäuse auf die Zucht- und Versuchsgruppen in Teilversuch 1a.....	28
Abb. 5	Zuteilung der weiblichen NOD-Mäuse auf die Zucht- und Versuchsgruppen in Teilversuch 2.....	30
Abb. 6	Zuteilung der weiblichen NOD-Mäuse auf die Zucht- und Versuchsgruppen in Teilversuch 3.....	31
Abb. 7	Schema der Proteinextraktion und Trennung der Fraktionen aus Weizenmehl.....	33
Abb. 8	Kumulatives Diabetesrisiko weiblicher NOD-Mäuse bei Fütterung mit casein und/oder weizenhaltigen Diäten.....	44
Abb. 9	Insulinautoantikörper-Titer weiblicher NOD-Mäuse bei Fütterung casein- und weizenhaltiger Diäten.....	45
Abb. 10	Elektrophoretische Auftrennung der Weizenproteinfraktionen auf einem 12%igen Polyacrylamid Gel.....	47
Abb. 11	Kumulatives Diabetesrisiko weiblicher NOD-Mäuse bei Fütterung von Diäten mit verschiedenen Weizenkonzentrationen und Weizenproteinfraktionen.....	50
Abb. 12	Insulinautoantikörper-Titer weiblicher NOD-Mäuse bei Fütterung von Diäten mit verschiedenen Weizenkonzentrationen und Weizenproteinfraktionen.....	51

Abb. 13	Kumulatives Diabetesrisiko weiblicher NOD-Mäuse bei Fütterung von Diäten mit verschiedenen Nahrungsbestandteilen.....	53
Abb. 14	Insulinautoantikörper-Titer weiblicher NOD-Mäuse bei Fütterung von Diät C mit Zusatz von verschiedenen Nahrungsbestandteilen.....	55
Abb. 15	Diabetesentwicklung weiblicher NOD-Mäuse bei Fütterung der verschiedenen Diäten.....	57
Abb. 16	Kumulative Diabetesinzidenz männlicher NOD-Mäuse bei Fütterung casein- und weizenhaltiger Diäten.....	58
Abb. 17	Aminosäuresequenzen von humanem und Hühnerinsulin.....	59
Abb. 18	Kompetitionskurven von hoch affinen Insulinautoantikörpern mit humanem bzw. Hühnerinsulin.....	60
Abb. 19	Kompetitionskurven von Insulinautoantikörpern mit humanem bzw. Hühnerinsulin.....	60
Abb. 20	Relative Reaktivität von Insulin-autoantikörpern mit humanem (y-Achse) und Hühnerinsulin (x-Achse).....	62
Abb. 21	Negative Korrelation zwischen relativer Insulinautoantikörperbindung an humanes bzw. Hühnerinsulin und der Affinität zu markiertem humanem [¹²⁵ I] Insulin.....	62
Abb. 22	Gesamt IgG-IAA und IgA-IAA für jede Probe.....	64
Abb. 23	Bindung von IAA bei vier Probanden an Lebensmittelbestandteile im Vergleich zu humanem Insulin.....	68-69
Abb. 24	Bindung von IAA in sieben verschiedenen Seren an Lebensmittelbestandteile im Vergleich zu humanem Insulin.....	70-71
Abb. 25	Häufigkeit der kreuzreaktiven IAA-Komponente in Patientenseren.....	72

Abb. 26	Bindung von IAA an Milch, Milchproteine, Formelnahrungen und Weizen im Vergleich zu humanem Insulin.....	74
Abb. 27	Bindungskurven von IAA an Lebensmittelbestandteile	75
Abb. 28	Bindungskurven von IAA an Milchproteine.....	76
Abb. 29	Bindung von IAA an verschiedene Milchproteine im Vergleich zu Insulin (Teil 1).....	77
Abb. 30	Bindung von IAA an verschiedene Milchproteine im Vergleich zu Insulin (Teil 2).....	78
Abb. 31	Bindung von IAA an verschiedene Milchproteine im Vergleich zu Insulin (Teil 3).....	79

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Proteinfractionen verschiedener Getreidearten.....	8
Tab. 2	Zusammensetzung von Frauenmilch und Kuhmilch.....	17
Tab. 3	Hauptproteinbestandteile von Kuhmilch mit Molekulargewichten.....	18
Tab. 4	Zusammensetzung der drei basalen Diäten und der handelsüblichen Referenzdiät	26
Tab. 5	Rohstoffverzeichnis der Diäten.....	27
Tab. 6	Geräte für die Getreideextraktion.....	32
Tab. 7	Chemikalien für die Getreideextraktion.....	32
Tab. 8	Geräte für die Herstellung von Proteinextrakten.....	35
Tab. 9	Chemikalien für die Herstellung von Proteinextrakten.....	35
Tab. 10	Geräte für die Gelelektrophorese.....	36
Tab. 11	Chemikalien für die Gelelektrophorese.....	36
Tab. 12	Geräte für die IgG-IAA-Messungen.....	37
Tab. 13	Chemikalien für die IgG-IAA-Messungen.....	37
Tab. 14	Futter- und Energieaufnahme pro Maus und Tag in Bezug auf die jeweilige Diät.....	43
Tab. 15	Diabetesinzidenz innerhalb der Versuchsgruppen von Teilversuch 1 vor und nach 25 Lebenswochen.....	46
Tab. 16	Analyse der Proteinkonzentration der extrahierten Weizenalbumin und -globulinfraktion in verschiedenen Verdünnungen in fünf unabhängigen Messreihen (A-E) und daraus resultierende Mittelwerte der Extraktionseffizienz.....	48
Tab. 17	Diabetesinzidenz innerhalb der Versuchsgruppen von Teilversuch 2 vor und nach 25 Lebenswochen.....	52
Tab. 18	Diabetesinzidenz innerhalb der Versuchsgruppen von Teilversuch 3 vor und nach 25 Lebenswochen.....	56
Tab. 19	Diabetesinzidenz innerhalb der Versuchsgruppen von Teilversuch 1a vor und nach 25 Lebenswochen.....	59

Tab. 20	Analyse der Proteinkonzentration der extrahierten Lebensmittellösungen in verschiedenen Verdünnungen und daraus resultierende Mittelwerte.....	66-67
Tab. 21	Charakteristika der Probanden, deren IAA an Milchpulverextrakt binden.....	73

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Asp	Asparagin
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute (counts per minute)
GAD(A)	(Antikörper gegen) Glutamatdecarboxylase
HLA	Histokompatibilitätskomplex (human leucocyte antigen)
I(A)A	Insulin(auto)antikörper
IA-2(A)	(Antikörper gegen) Protein-Tyrosinphosphatase IA-2
ICA	Inselzell-Antikörper
Ig	Immunglobulin
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min.	Minuten
n.b.	nicht bekannt
NOD	nonobese diabetic
RBA	Radioliganden-Bindungsassay
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
T1D	Typ 1 Diabetes
Tab.	Tabelle
TBST	Tris buffered saline plus Tween
TBT	Tris buffered Tween
t-TG	tissue-Transglutaminase
vs.	versus
WHO	World Health Organization
ZnT8	Zinktransporter 8

1 Aufgabenstellung

Typ 1 Diabetes ist eine multifaktorielle, chronische Autoimmunerkrankung, die aus einer Zerstörung der β -Zellen des Pankreas durch das körpereigene Immunsystem resultiert. Während der Zerstörungsphase, der präklinischen Phase, treten Autoantikörper gegen Inselzellantigene als charakteristisches Merkmal auf, bevor ein absoluter Insulinmangel evident wird und es zur klinischen Manifestation des Typ 1 Diabetes kommt. Autoantikörper gegen Insulin (IAA) sind dabei oft die ersten Antikörper, die detektiert werden können. Die Entstehung von Typ 1 Diabetes beruht zu einem großen Teil auf einer genetischen Prädisposition, wobei die genetische Veranlagung nicht in jedem Fall zur Entwicklung der Krankheit führt. Daher wird vermutet, dass weitere Auslöser das initiale Krankheitsgeschehen mit der Immunantwort in Gang setzen, wobei hier besonders Umwelteinflüsse wie Nahrungsbestandteile oder Virusinfektionen diskutiert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Im Non-obese-diabetic (NOD) -Mausmodell, einem Tiermodell, das spontan Autoimmundiabetes entwickelt, konnte durch verschiedene Ernährungsmodulationen die Diabetesmanifestation verzögert oder sogar verhindert werden. Abschließend konnte aber bislang noch kein Nahrungsbestandteil eindeutig identifiziert werden, der die Erkrankung auslöst oder zur Verzögerung beiträgt.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Wirkung von Modulationen in der Zusammensetzung der Nahrung auf die Pathogenese des Typ 1 Diabetes im NOD-Mausmodell untersucht werden. Der Einfluss spezieller Nahrungsbestandteile, die im Rahmen der Diabetesentwicklung diskutiert werden, soll näher betrachtet werden. Hier werden besonders Weizen und Weizenproteinen, Casein und Nahrungsbestandteile der frühkindlichen Ernährung (Apfel, Karotte, Mais, Kartoffel) auf potenziell diabetogene Effekte untersucht. Das erste Ziel ist dabei die Entwicklung einer klar definierten, einfach aufgebauten Versuchsdiät. Dieser Basisdiät können dann sukzessive einzelne Nahrungsbestandteile zugesetzt werden und so die Möglichkeit

geschaffen werden, eindeutig nur den Einfluss des jeweilig zugesetzten Nahrungsbestandteils im Gegensatz zu der Basisdiät auf die Diabetesentwicklung im NOD-Modell zu untersuchen.

2. Bezüglich der initialen Immunantwort bei der Pathogenese des Typ 1 Diabetes rückt zunehmend das Darm-assoziierte Immunsystem in den Fokus der Forschung. IgA-Antikörper gegen exogene Noxen werden auf inneren, epithelialen Oberflächen, unter anderem auf der Darmmucosa, gebildet. Der IgA-Isotyp der IAA könnte in der Darmmucosa ursprünglich gegen Nahrungsbestandteile synthetisiert werden und sich über Mechanismen der molekularen Mimikry im weiteren Verlauf gegen körpereigene Proteine, in diesem Fall Insulin, richten. Dies könnte ein Bindeglied zwischen Nahrungsbestandteilen und nachfolgender IAA Reifung, reflektiert durch die Bildung von IgG-Antikörpern und der Entstehung von Autoimmundiabetes darstellen. In der vorliegenden Arbeit sollen zu diesem Zweck im Radioimmunoassay ausgewählte Seren von Patienten mit bekannten Bindungsaffinitäten zu humanem Insulin untersucht werden, um IAA zu identifizieren, die zum Isotyp der IgA gehören. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob diese IAA kreuzreaktiv mit nicht humanen Insulinen sind und somit möglicherweise ursprünglich gegen andere Moleküle gerichtet waren.

3. Es ist bekannt, dass einige Nahrungsbestandteile wie Casein und Weizengluten im Zusammenhang mit einem erhöhten Diabetesrisiko diskutiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollen in Seren von ausgewählten Patienten vorliegende IAA auf eine mögliche Kreuzreaktivität mit verschiedenen Nahrungsbestandteilen untersucht werden. Hierzu soll im Radioimmunoassay die Bindung von IAA an bestimmte Moleküle in proteinreichen Homogenaten von Casein, Weizen, Folgenahrungen für Kleinkinder sowie ausgewählten Nahrungsbestandteilen der frühkindlichen Ernährung im Gegensatz zur Bindung an humanes Insulin getestet werden. Dabei liegt der Fokus der Untersuchungen darauf, über das Bindungsverhalten der IAA Rückschlüsse auf Nahrungsbestandteile ziehen

zu können, die als potenzielle initiale Zielantigene der IAA in Frage kommen könnten.

Insgesamt soll diese Arbeit den möglichen Einfluss einzelner Nahrungsbestandteile auf das Immungeschehen des Autoimmundiabetes herausarbeiten. Anhand der in vivo am NOD-Modell gewonnenen Daten werden die potenziell diabetogenen Nahrungsbestandteile an humanen Seren getestet. Mittels dieser in vitro Modelle soll untersucht werden, inwieweit das Immungeschehen des Typ 1 Diabetes initial über Kreuzreaktionen mit Nahrungsbestandteilen getriggert werden könnte.

Die Ergebnisse dieser Versuche könnten weitere, bisher unbekannte Mechanismen der Diabetespathogenese beschreiben, und damit für die Entwicklung von Primärtherapien zur Verhinderung der Typ 1 Diabetes Entstehung im frühen Kindesalter verwendet werden.

2 Einleitung und Literaturübersicht

2.1 Grundlagen des Typ 1 Diabetes

Diabetes mellitus tritt einerseits in den Industrieländern verbreitet als sogenannte Zivilisationskrankheit in Kombination mit dem metabolischen Syndrom auf, andererseits existiert Diabetes auch als Autoimmunerkrankung. Aufgrund seiner Ätiologie kann der Diabetes mellitus nach ADA und WHO (1998) wie folgt klassifiziert werden:

1. Typ 1 Diabetes mellitus
 - a) Autoimmun (β -Zellzerstörung)
 - b) Idiopathisch (ohne Hinweise auf Autoimmunität)
2. Typ 2 Diabetes mellitus (Insulinresistenz und Insulinsekretionsdefekt)
3. Spezifische Diabetestypen
4. Gestationsdiabetes

Der Typ 1 Diabetes, auf den im Weiteren detailliert eingegangen werden soll, ist eine chronische, multifaktorielle Autoimmunerkrankung, die aus einer selektiven Zerstörung der pankreatischen β -Zellen durch das körpereigene Immunsystem resultiert. Die Inzidenz des Typ 1 Diabetes ist in den letzten Jahren weltweit angestiegen und zeigt einen Trend zu immer jüngeren Patienten (Atkinson und Eisenbarth 2001, Gillespie et al. 2004).

Dem Auftreten des manifesten klinischen Bildes des Typ 1 Diabetes gehen oft Jahre symptomloser Entwicklung voraus, bis bei einer Zerstörung von ca. 80% der Inselzellmasse ein absoluter Insulinmangel evident wird (Sutherland et al. 1984).

Während der präklinischen Phase können bereits immunologische Veränderungen beobachtet werden – Autoantikörper sind ein typischer Marker der Zerstörungsphase (Leslie et al. 2001, Barker et al. 2004, Achenbach et al. 2005).

Obwohl die Entstehung des Typ 1 Diabetes zu einem großen Teil auf einer immungenetischen Prädisposition beruht, jedoch die genetische Veranlagung nicht in allen Fällen zur Entwicklung von Typ 1 Diabetes führt, werden zusätzliche Faktoren wie virale Infektionen oder Nahrungsbestandteile als mögliche Auslöser der Erkrankung diskutiert (Scott et al. 1998, und 2002, Ziegler et al. 2001, Virtanen und Knip 2003, van Odijk et al. 2004, Fillippi und von Herrath 2005).

2.1.1 Bedeutung der Genetik

Die Anlage, an Typ 1 Diabetes zu erkranken, ist erblich: Kinder von Typ 1 diabetischen Eltern haben selbst ein Erkrankungsrisiko von fünf Prozent; dem gegenüber steht eine Prävalenz von 0,3% innerhalb der deutschen Allgemeinbevölkerung.

Typ 1 Diabetes ist mit über 18 Genen, die die Entstehung der Krankheit determinieren, polygenetisch (Bach 1994, Atkinson und Eisenbarth 2001). Sowohl beim Menschen als auch in Tiermodellen sind die Gene mit dem größten Einfluss auf die Entwicklung des Typ 1 Diabetes innerhalb des MHC (major histocompatibility complex) bzw. beim Menschen innerhalb des HLA-Komplexes (human leukocyte antigen) lokalisiert, der für die Immunerkennung und Antigenpräsentation gegenüber CD_4^+ T-Zellen eine zentrale Rolle spielt (Davies et al. 1994, Bach 1994, Pugliese und Eisenbarth 2002, Hermann et al. 2005).

Den größten genetischen Einfluss mit ca. 50% hat das auf Chromosom 6p liegende, den HLA-Komplex codierende Gen IDDM1 (Gianani und Eisenbarth 2005). Die Genotypen HLA DR*03/04 (DQB1*57 non-Asp) und HLA DR*04/04 (DQB1*57 non-Asp) sind in Deutschland mit dem höchsten Typ-1-Diabetes-Risiko assoziiert (Hummel und Ziegler 2002). Kinder von Typ 1 diabetischen Eltern mit einem der beiden Hochrisiko-Genotypen haben innerhalb der ersten fünf Lebensjahre ein kumulatives Risiko von 20% eine Inselautoimmunität zu entwickeln, gegenüber nur 2,7% bei den Kindern, die keinen der Risiko-Genotypen tragen (Schenker et al. 1999, Bonifacio et al. 2004).

Weitere Gene, die außerhalb des HLA-Komplexes liegen und mit Typ 1 Diabetes assoziiert werden, sind unter anderem das Insulin Gen auf Chromosom 11p15 (Todd et al. 2007, Field 2002, Bell et al. 1984) sowie das (CTLA)-4 Gen auf Chromosom 2q33 oder die Gene der Interleukine IL-4 und IL-13 auf Chromosom 5q31 (Steck et al. 2005).

Daten von Studien mit Zwillingspaaren, die unterschiedliche Konkordanzraten aufweisen, stärken jedoch die Vermutung, dass der Typ 1 Diabetes aus dem Zusammenwirken endogener genetischer Faktoren und exogener Einflüsse entsteht (Barnett et al. 1981, Olmos et al. 1988, Redondo et al. 2001).

Eine nationale Zwillingsstudie aus Finnland (Hytinen et al. 2003) beschreibt, dass 88% der phänotypischen Varianz genetisch determiniert ist, die weitere Varianz jedoch aus Umweltfaktoren resultiert.

2.1.2 Pathogenese und immunologische Hintergründe des Typ 1 Diabetes

Der Typ 1 Diabetes ist das Resultat einer autoimmunbedingten Zerstörung der β -Zellen des Pankreas, verursacht durch eine Infiltration der Inselzellen (Insulitis) durch mononukleäre Zellen (Gepts 1965, Foulis et al. 1986). Mit der fortschreitenden Zerstörung der β -Zellen - der prädiabetischen Phase - treten auch metabolische Störungen auf, wie ein Verlust der Frühphasen-Insulinsekretion und später eine verminderte orale Glucosetoleranz. Gleichzeitig mit der Infiltration der Inselzellen können auch immunologische Veränderungen beobachtet werden: Insulinautoantikörper (IAA) und verschiedene Inselzellantikörper (GADA, IA2-A, ICA, ZnT8-Antikörper) (Bingley et al. 1997, Ziegler et al. 1999 und 2003, Spinas und Lehmann 2001, Hummel et al. 2004). Ein mögliches Modell des Zeitverlaufs der Entwicklung des Typ 1 Diabetes ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

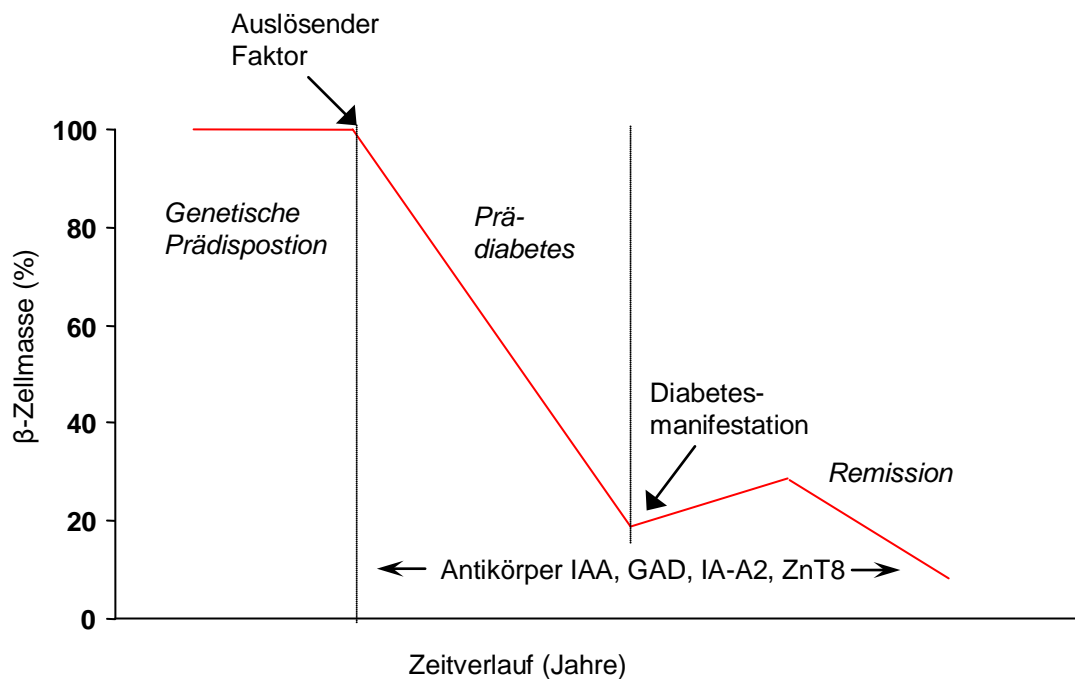


Abb. 1 Modell zur Entwicklung von Typ 1 Diabetes (modifiziert nach Spinas, Ziegler, Gianani).

Die bei der Insulinitis auftretenden infiltrierenden Zellen bestehen zu einem hohen Anteil aus T-Zellen der Subtypen CD_4^+ und CD_8^+ , sowie aus Makrophagen und B-Zellen (Bach 1994). Sowohl CD_4^+ als auch CD_8^+ T-Zellen scheinen in dem Entzündungsprozess der β -Zellen eine grundlegende Rolle zu spielen, jedoch gibt es Untersuchungen an NOD-Mäusen, nach denen die CD_4^+ T-Zellen an den initialen Prozessen der β -Zellentzündung beteiligt sind (Katz et al. 1995, Haskins und McDuffie 1990, Noorchashm et al. 1997, Atkinson und Eisenbarth 2001). Eine Progression des Diabetes scheint allerdings auch das Vorhandensein von CD_8^+ T-Zellen zu erfordern (Delovitch und Singh 1997, Somoza et al. 1994).

Die Inselautoantikörper, die bereits viele Jahre vor der Manifestation des Typ 1 Diabetes in venösem und kapillarem Blut nachgewiesen werden können, sind ein spezifisches Merkmal für Typ 1 Diabetes (Atkinson und Eisenbarth 2001). Derzeit sind Autoantikörper gegen zytoplasmatische Inselzellantigene (ICA), gegen Insulin (IAA), gegen Glutamatdecarboxylase (GADA) und gegen die Protein-Tyrosinphosphatase IA-2 (IA-2A) für die Diagnostik und Prädiktion des Typ 1 Diabetes etabliert. Allerdings kommt hier nicht nur dem Auftreten der Antikörper *per se*, sondern auch der Affinität der Antikörper, dem Antikörpertiter und der Antikörperpersistenz eine große Bedeutung zu. So sind bei Kindern meist IAA als erste Antikörper nachzuweisen, weshalb postuliert wurde, dass Insulin das primäre Antigen des Typ 1 Diabetes sei. Das Auftreten multipler Antikörper ist mit einem stark erhöhten Risiko für die Entwicklung von Typ 1 Diabetes verbunden (Hummel et al. 2006). Neuste Ergebnisse von Wenzlau et al. (2007) schreiben auch dem Zinktransporter ZnT8 als Autoantigen des Typ 1 Diabetes eine große Bedeutung in der Prädiktion des Diabetes zu: die kombinierte Messung von ZnT8A, GADA, IA-2A und IAA erbrachte eine 98%ige Detektion von Autoimmunität bei Ausbruch des Typ 1 Diabetes. Außerdem konnte gezeigt werden, dass hoch affine IAA, die im frühen Lebensalter auftreten und mit Proinsulin reagieren, mit einer Progression zu multiplen Autoantikörpern oder Typ 1 Diabetes assoziiert sind (Achenbach et al. 2004a). Da aus prospektiven Studien in Risikopopulationen ab der Geburt hervorging, dass der Autoimmunprozess oft schon innerhalb der ersten beiden Lebensjahre initiiert wird, rücken frühe exogene Noxen zunehmend in den Fokus der Forschung. Diskutiert werden hier vor allem Nahrungsfaktoren wie die Dauer des Stillens, die Einführung von Gluten oder

Kuhmilchproteinen in die Ernährung, sowie virale Erkrankungen und Impfungen (Gianani und Eisenbarth 2005).

Gluten ist der entscheidende externe Trigger der Autoimmunerkrankung Zöliakie, sowie von Dermatitis herpetiformis und Weizenallergie. Es gibt zunehmend Hinweise, dass Gluten auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wie dem Typ 1 Diabetes eine große Relevanz besitzt und möglicherweise eine pathogenetische Verbindung zwischen eben diesen verschiedenen immunologischen Erkrankungen schafft.

Im Folgenden wird daher neben den Kuhmilchproteinen auch Gluten als Weizenprotein näher betrachtet sowie das Krankheitsbild der Zöliakie und deren Assoziation mit Typ 1 Diabetes erläutert.

2.2 Weizen und seine Proteinfractionen

Für einen Großteil der Menschen stellen Weizen und verwandte Getreidearten eine zentrale Nährstoffquelle dar. Auf Grund ihrer großen ökonomischen und ernährungsphysiologischen Bedeutung sowie ihrer rheologischen Eigenschaften waren die Speicherproteine der Getreide unter den ersten Proteinen, die charakterisiert wurden. Speicherproteine des Getreideendosperms wurden nach ihrer unterschiedlichen Löslichkeit bereits 1907 durch Osborne in vier verschiedene Fraktionen eingeteilt: wasserlösliche Albumine, in verdünnten Salzlösungen lösliche Globuline, in Alkohol/Wasser lösliche Prolamine sowie Gluteline, die in alkalischen Lösungen oder verdünnter Säure gelöst werden können (Osborne 1907).

In der Literatur werden die Proteinfractionen der verschiedenen Getreidearten häufig mit eigenen Namen versehen (Belitz et al. 2001).

Tab. 1 Proteinfractionen verschiedener Getreidearten.

Fraktion	Weizen	Roggen	Gerste	Hafer	Mais	Reis	Hirse
Albumin	Leukosin						
Globulin	Edestin						
Prolamin	Gliadin	Secalin	Hordein	Avenalin	Zein	Oryzin	Kafirin
Glutelin	Glutenin	Secalinin	Hordenin	Avenin	Zeanin	Oryzenin	

Das Speicherprotein Gluten des Weizens, welches als ursächliches Agens verschiedener Immunerkrankungen diskutiert wird, ist eine Mischung aus Gliadinen und Gluteninen (Shewry und Tatham 1997, Koning 2005). Die alkohollösliche Fraktion der Weizengliadine besteht aus einer heterogenen Gruppe monomerer Proteine (Jones et al. 1959, Shewry et al. 1995) mit einem hohen Gehalt an Glutamin- und Prolinresten (Belitz et al. 2001), die nur über intramolekulare Disulfidbrücken (α -, β - und γ -Gliadine) verfügen oder keine Cysteinreste besitzen (ω -Gliadine). Im Gegensatz dazu treten die Glutenine des Weizens als Polymere auf, die durch intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Ketten stabilisiert werden (Désormeaux et al. 1992). Nach Reduktion können die Glutenine mittels Elektrophorese in hoch- (HMW) und niedrigmolekulare (LMW) Gruppen eingeteilt werden (Belitz et al. 2001, Shewry und Tatham 1997). Das Molekulargewicht der Gliadine liegt zwischen 30 und 50 kDa, das Molekulargewicht der HMW-Glutenine bewegt sich zwischen 80 und 120 kDa und das der LMW-Glutenine liegt zwischen 30 und 75 kDa (Battais et al. 2003). Auf Grund der Polyploidie der Weizensorten zeigen die Fraktionen des Glutens starke Polymorphismen und bilden so eine Gruppe eng verwandter, jedoch unterschiedlicher Proteine (Shewry und Tatham 1997, Koning 2005). Obwohl Gluten neben Weizen in unterschiedlichen Konzentrationen auch in Hafer, Reis, Mais oder Hirse und weiteren Getreidearten nachzuweisen ist, verringert sich die Pathogenität der Glutenvarianten mit abnehmender Verwandtschaft zum Tribus der Triticeae.

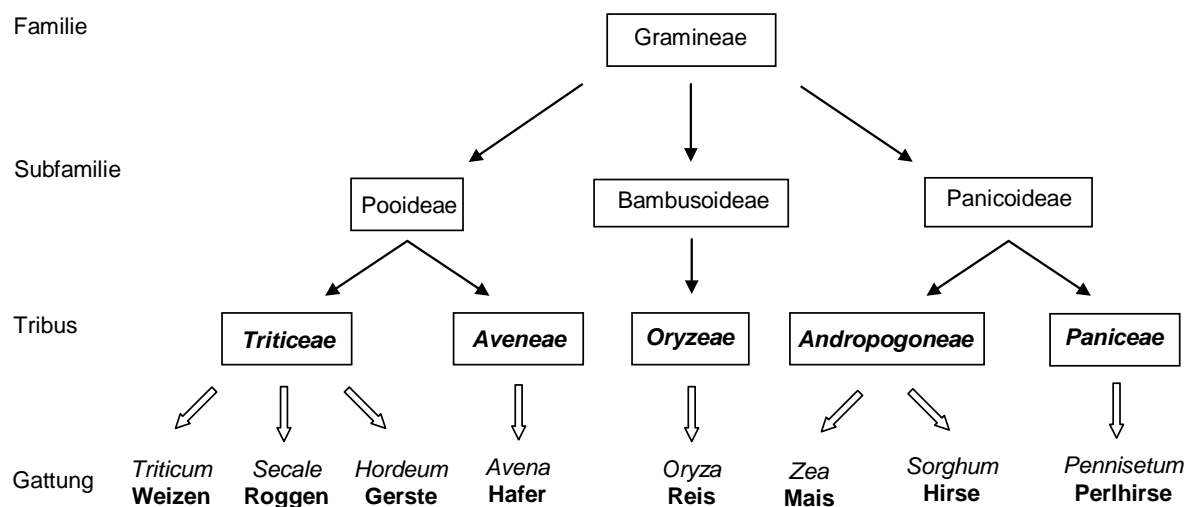


Abb. 2 Stammbaum der für die Ernährung relevanten Getreidearten.

2.2.1 Zöliakie und die Assoziation zwischen Typ 1 Diabetes und Zöliakie

Zöliakie ist mit einer Prävalenz von circa 0,4% in Deutschland etwa genauso häufig wie Typ 1 Diabetes. Allerdings handelt es sich um eine deutlich unterdiagnostizierte Erkrankung, da die abnorme Immunantwort auf Gluten in genetisch vorbelasteten Individuen neben den klassischen Verlaufsformen mit ausgeprägten gastrointestinalen und systemischen Symptomen auch zu symptomlosen oder symptomarmen, undiagnostizierten Verlaufsformen führen kann (Ciccocioppo et al. 2005, Koning 2005, James 2005). Zöliakie ist eine Autoimmunerkrankung, deren Symptome in den typischen Fällen aus der Zottenatrophie der Dünndarmmucosa resultieren und sich in Durchfällen, Gewichtsverlust, Malabsorption mit Steatorrhoe und Vitaminmangelsymptomen manifestiert. Das klinische Spektrum der Zöliakie hat sich in den letzten Jahrzehnten jedoch verändert. Aufgrund der verfeinerten Antikörperdiagnostik werden vermehrt Zöliakieerkrankungen ohne eindeutige gastrointestinale Symptome festgestellt. Dabei handelt es sich zum Teil um stille Verlaufsformen oder um atypische Formen der Zöliakie, zu denen unter anderem neurologische Symptome, wie z.B. periphere Neuropathien, Myopathie und zerebrale Ataxie zählen (Hadjivassiliou et al. 1996, Usai et al. 1997, Burk et al. 2001, Polizzi et al. 2000). Die Erkrankung ist glutenabhängig, da eine glutenfreie Ernährung zu einer kompletten Remission der geschädigten Darmschleimhaut und Symptombefreiheit führt. Die einzige derzeit verfügbare Behandlung bei Zöliakiepatienten ist eine lebenslange strikte Einhaltung einer glutenfreien Diät, die ein Abklingen der Symptome und eine Normalisierung der histologischen Läsionen bewirkt (Marsh 1992, Sollid 2002). Zöliakiepatienten haben in Abhängigkeit der Dauer der Glutenexposition ein deutlich erhöhtes Risiko an Typ 1 Diabetes, Hashimoto Thyreoiditis, rheumatoider Arthritis oder Sjögren Syndrom zu erkranken (Ventura et al. 1999, Meize-Grochowski 2005, James 2005, Helms 2005).

1997 konnte mit der tissue-Transglutaminase (t-TG) das zentrale Antigen der Erkrankung beschrieben werden (Dieterich 1997 und 2003). Die Zöliakie gehört daher zu den am besten verstandenen Autoimmunerkrankungen. Auch hier bildet die genetische Prädisposition die Basis der Erkrankung, wobei bei der Zöliakie die Assoziation zu bestimmten HLA-Allelen noch stärker als bei Typ 1 Diabetes ist. 90-95 % der Patienten mit Zöliakie weisen das Allel HLA-DQ2 oder HLA-DQ8 auf

(Lundin et al. 1993, Sollid et al. 2002). Da circa 25% der Bevölkerung der westlichen Welt die genannten Risikogene exprimiert, aber davon nur ein geringer Anteil Zöliakie entwickelt, wird vermutet, dass einerseits weitere Gene beteiligt sind (Londei et al. 2005) und andererseits Umweltfaktoren möglicherweise für die Entwicklung der Krankheit eine Rolle spielen. So könnte eine durch Infektionen erhöhte Interferon- γ Produktion, welche ihrerseits die HLA-DQ2 Expression steigert, die Schwelle für eine Gluten-spezifische T-Zell Antwort herabsetzen (Vader et al. 2003, Bardella et al. 1999). Bei Kindern mit Risiko-Allelen wird der Zusammenhang zwischen früher Einführung von Gluten in die Ernährung und der Entwicklung von Zöliakie diskutiert. Ivarsson et al. (2000) stellten fest, dass das Zusammenspiel von drei Faktoren partiell Einfluss auf die Entwicklung der Erkrankung nehmen kann: die Menge an eingeführtem Gluten, das Alter bei der ersten Gabe von glutenhaltigen Lebensmitteln und ob die Kleinkinder zum Zeitpunkt der Einführung von Gluten noch gestillt wurden. Derzeit gibt es für den lokalen Pathomechanismus bei Zöliakiepatienten folgenden möglichen Erklärungsansatz: auf Grund seiner hohen Gehalte an Prolinresten ist der proteolytische Abbau von Nahrungsgluten im Gastrointestinaltrakt nur eingeschränkt möglich (Koning 2005). Das ubiquitär in Geweben vorhandene, Ca^{2+} abhängige Enzym tissue-Transglutaminase kann Peptide im Intestinum auf zwei unterschiedliche Arten modifizieren, abhängig von dem vorliegenden pH Wert und der Substratkonzentration: bei niedrigen pH Werten und hoher Glutenkonzentration im Darm wird die Desaminierung von Peptiden und damit die Entstehung von Glutamatresten begünstigt. Bei höheren pH Werten entsteht eine Isopeptidbindung, bei der zwei Peptide über eine kovalente Bindung zwischen einem Glutamin- und einem Lysinrest miteinander verknüpft werden (Reif et al. 2004, Sollid 2002). Die HLA-DQ2 und -DQ8 Heterodimere auf Antigen präsentierenden Zellen sind so aufgebaut, dass sie besonders gut an negativ geladene Reste wie Glutamat binden (Helms 2005, James 2005, Koning 2005, Cicocioppo et al. 2005).

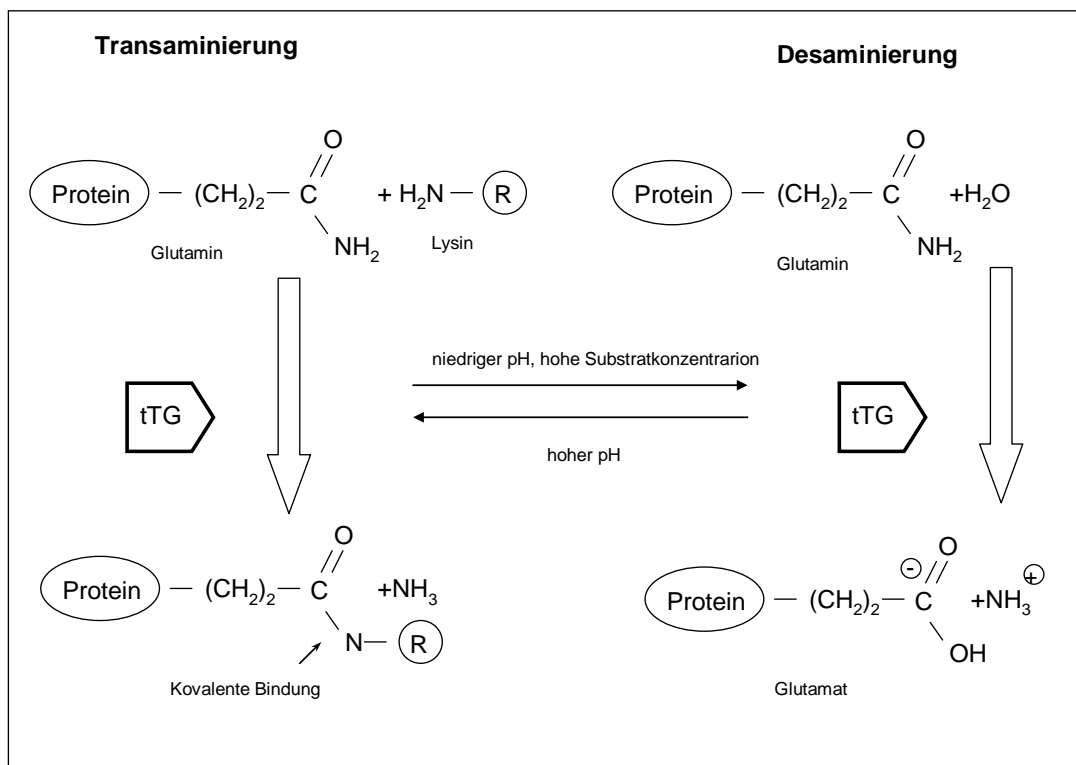


Abb. 3 Peptidmodifikation im Darmlumen durch die tissue-Transglutaminase (t-TG). Niedrige pH-Werte und hohes Substratangebot führen zur Desaminierung durch die t-TG und Entstehung von negativ geladenen Glutamatresten (rechts). Hohe pH-Werte begünstigen die Entstehung einer Isopeptidbindung und damit die Verknüpfung von zwei Peptidresten (links).

Die Gluten-spezifische T-Zell Antwort auf die Gliadin- und Gluteninmoleküle wird also durch die t-TG katalysierte Modifikation der Peptide verstärkt (Koning 2005, Vader et al. 2003, Piper et al. 2002). Zusätzlich kann zwischen den Peptid-HLA-Komplexen eine Bindung mit der t-TG entstehen, wodurch das Enzym ebenfalls als Antigen erkannt wird. Hieraus ergibt sich die Immunantwort mit der spezifischen Antikörperbildung gegen die t-TG (Koning 2005, Helms 2005, Reif 2004). Es ist jedoch weiterhin unklar, wie Glutenfragmente in die Mucosa eindringen können: vermutet wird, dass Gliadin über eine gesteigerte Expression von Zonulin die Permeabilität der tight junctions verändert und so den parazellulären Weg zur Lamina Propria öffnet (Clemente et al. 2003, Fasano et al. 2000). Der Kontakt zwischen Glutenfragmenten und den Immunzellen innerhalb der Lamina Propria verläuft möglicherweise über eine Freisetzung von Exosomen der basolateralen Membran der Enterozyten, die die entsprechenden Peptide enthalten. Einmal in der Lamina Propria werden die Proteinfragmente von Antigen-

präsentierenden Zellen aufgenommen und verarbeitet (Van Niel et al. 2003). Gluten-spezifische T-Zellen können über Kreuzreaktionen auch mit Secalin- (Roggen) und Hordeinpeptiden (Gerste) reagieren, die eine hohe Sequenzhomologie mit Glutenpeptiden aufweisen (s. Abb. 1). Ausschlaggebend scheint die Präsenz von Prolinresten an bestimmten Positionen zu sein, die eine selektive Desaminierung durch die t-TG ermöglichen und so die Erkennung durch T-Zellen begünstigen (Vader et al. 2003, Dieterich et al. 2003).

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass 1,5-10% der Patienten mit Typ 1 Diabetes zusätzlich an Zöliakie leiden (Rami und Schober 2005). In dieser Patientengruppe dominieren die silenten, also symptomarmen, und latenten Formen der Zöliakie. Patienten mit Typ 1 Diabetes und auch deren erstgradige Verwandte zeigen eine höhere Prävalenz an Zöliakie-assoziierten Antikörpern gegen Gliadin, Endomysium und t-TG als gesunde Kontrollpersonen (Lampasona et al. 1999, Hummel et al. 2000, Bruno 2003, Murray 2005). Bei DQ2-homozygoten Patienten mit Typ 1 Diabetes wurde von Bao et al. 1999 eine Prävalenz von Transglutaminase-IgA Antikörpern von 32% beschrieben. Bei den von unserer Arbeitsgruppe prospektiv beobachteten 1511 Kindern von Patienten mit Typ 1 Diabetes wurden im Alter von 8 Jahren bei 4,9% IgA-Transglutaminase-Antikörper und bei 1,1% eine durch Biopsie gesicherte Zöliakie gefunden (Hummel et al. 2007). Diese Untersuchung zeigt interessanterweise auch, dass in dieser Population Zöliakie-assoziierte Antikörper später als Inselautoantikörper auftreten. Auch die T-Zell Reaktivität von Typ 1 Diabetikern gegenüber Gluten war bei neu diagnostizierten Patienten erhöht, während sich die Reaktivität nach länger bestehendem Typ 1 Diabetes nicht von Kontrollpersonen unterschied (Klemetti et al. 1998). Umgekehrt testeten Ventura et al. (2000) neu diagnostizierte Zöliakiepatienten auf Typ 1 Diabetes assoziierte Inselautoantikörper und konnten mit 11,1% eine erhöhte Prävalenz beschreiben. Die beschriebenen elf Patienten waren allerdings nur für jeweils einen Inselautoantikörper positiv, was ein niedriges Risiko für einen späteren Typ 1 Diabetes widerspiegelt. Bei diesen Patienten war nach zwei Jahren glutenfreier Ernährung auf Grund der Zöliakie eine Elimination der Inselautoantikörper zu beobachten. Frühere Untersuchungen von Ventura et al. weisen darauf hin, dass die Dauer der Glutenexposition mit

einem erhöhten Risiko für Typ 1 Diabetes aber auch anderen Erkrankungen wie Hashimoto Thyreoiditis, rheumatoider Arthritis oder Sjögren Syndrom assoziiert ist: wurde vor dem zweiten Lebensjahr Zöliakie diagnostiziert, lag die Prävalenz für Typ 1 Diabetes bei 0,8%, bei Diagnose zwischen dem zweiten und dem zehnten Lebensjahr bei 4,7% und bei Diagnose nach dem zehnten Lebensjahr bei 6,6% (Ventura et al. 1999).

Die Verknüpfungen zwischen Typ 1 Diabetes und Zöliakie können einerseits auf die gemeinsamen HLA-Risiko-Allele zurückgeführt werden, andererseits aber auch auf möglicherweise ähnliche Pathomechanismen hindeuten (Bonifacio et al. 1998, Hummel et al. 2000). Die gesteigerte Darmpermeabilität in der Anfangsphase der Zöliakie bietet eine mögliche Erklärung für den Ausbruch anderer Autoimmunerkrankungen, die mit ihr assoziiert sind (Meize-Grochowski 2005).

2.2.2 Einfluss von Weizenproteinen auf die Entwicklung des Autoimmundiabetes im Tiermodell

2.2.3 Tiermodelle des Typ 1 Diabetes

Um den Einfluss der Ernährung auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes zu untersuchen, wurde in zahlreichen Fütterungsversuchen in Tiermodellen die Wirkung verschiedener Nahrungsbestandteile getestet. Die bekanntesten Tiermodelle des Autoimmundiabetes sind die Bio-Breeding Rat (BB-Ratte) und die Non-obese-diabetic Mouse (NOD-Maus), die beide spontan Autoimmundiabetes entwickeln. Im Folgenden wird das NOD-Modell näher erläutert, da diese Tiere in der vorliegenden Dissertation als Versuchsmodell herangezogen wurden.

Die Entdeckung der NOD-Maus erfolgte zufällig durch Makino et al. 1980. Die Nachkommen der weiblichen Maus, die spontan klinische Symptome des Autoimmundiabetes zeigte, wurden per Inzucht vermehrt und nach Diabetesentwicklung und Fruchtbarkeit selektiert, woraus der NOD-Stamm etabliert wurde. NOD-Mäuse zeichnen sich durch eine dem Menschen ähnliche Diabetesentwicklung und dem Auftreten einer Insulinitis aus. Die

Risikokomponenten für die Entwicklung des Autoimmundiabetes sind bei den NOD-Mäusen wie beim Menschen (s. Kapitel 1.1.1) auch im MHC, bei den Mäusen als H2^{g7} bezeichnet, lokalisiert. Allerdings liegen bei den Tieren auffällige geschlechtsspezifische Unterschiede in der Diabetesinzidenz vor: die weiblichen Tiere entwickeln bis zur dreißigsten Lebenswoche mit einer kumulativen Häufigkeit von 80% Autoimmundiabetes, die männlichen Tiere entwickeln den Diabetes mit einer Häufigkeit von unter 20% (Makino et al. 1980). Die Zerstörung der pankreatischen Zellen setzt bei den meisten Mäusen kurz nach der Geburt ein und in den Seren dieser Tiere können Diabetes-assoziierte Antikörper nachgewiesen werden (Atkinson 1988, Reddy et al. 1988, Ziegler et al. 1989 a und b, Serreze 1998). Bei NOD-Mäusen sind – wie beim Menschen auch – im Vorfeld der Diabetesmanifestation IAA detektierbar. Jedoch sind in diesem Modell die IAA die einzigen bekannten Diabetes-assoziierten Antikörper (Yu et al. 2000), wobei ihr Auftreten, wie bei diabetischen Kindern, mit einer späteren Diabetesentwicklung assoziiert zu sein scheint (Abiru et al. 2001). Internationale Workshops zu weiteren Autoantikörpern im NOD-Modell zeigten, dass die im humanen Autoimmundiabetes auftretenden Autoantikörper GAD und IA-2 in den Mäusen nur sehr unspezifisch nachweisbar sind (Bonifacio et al. 2001). Durch die dem humanen Autoimmundiabetes ähnliche Pathogenese des NOD-Modells ist es möglich, an diesen Tieren Untersuchungen zu Therapie und Prävention durchzuführen. Charakteristische Unterschiede des NOD-Modells zum humanen Typ 1 Diabetes sind unter anderem die Taubheit der NOD-Mäuse (Atkinson et al. 1999), das Fehlen von C5-Plasmaproteinen im Komplementsystem (Baxter und Cooke 1993) sowie kein murines Äquivalent zum HLA-DR-Molekül auf den antigenpräsentierenden Zellen (Hattori et al. 1986) und Abweichungen in der Art der Insulitis (Miyazaki et al. 1985). Ebenfalls wichtig für die Übertragung von Ergebnissen aus dem NOD-Modell auf den Menschen ist, dass der Stamm so starker Inzucht unterliegt, dass auch Ergebnisse aus Versuchsgruppen mit größeren Tierzahlen im Grunde so gewertet werden müssten, wie eine einzige Fallstudie beim Menschen (Atkinson et al. 1999). Trotzdem können Versuche in Tiermodellen wertvolle Hinweise auf potenzielle Trigger des Immungeschehens liefern und so einen Beitrag zur Prävention des Typ 1 Diabetes leisten.

2.2.4 Einfluss diätetischer Faktoren auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes im Tiermodell

Mit speziellen Diäten konnte im NOD-Modell die Bedeutung von Nahrungsbestandteilen auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes demonstriert werden: Hoorfar et al. (1992) zeigten, dass Soja und Getreide die Diabetesinzidenz bei den Tieren erhöhen. In Fütterungsversuchen von Funda et al. (1999) und Schmid et al. (2004 b) konnte eine glutenfreie Haltung der Tiere die Diabetesinzidenz gegenüber einer Kontrollgruppe signifikant senken. Außerdem zeigten Schmid et al. (2004 b), dass bei den NOD-Mäusen der Zeitraum zwischen der vierten und fünften Lebenswoche der kritische Zeitraum zu sein scheint, in dem glutenfreies Futter die protektive Wirkung auf die Diabetesentwicklung der Tiere hat. Durch Fütterungsversuche wurde hier weiterhin festgestellt, dass ein Zusatz von Gliadin zum glutenfreien Futter die Diabetesprotektion nicht aufhob. Durch eine Ernährung von NOD-Mäusen mit einer weizenhaltigen Diät konnten Maurano et al. (2005) eine Enteropathie mit intraepithelialer T-Zell-Infiltration und erhöhter Expression von HLA-Klasse-II Molekülen nachweisen. Eine Untersuchung an BioBreeding (BB) Ratten weist auf ein möglicherweise Diabetes-relevantes Antigen hin, nämlich ein Weizenglobulin (Glb1). Die IgG-Antikörper Reaktivität mit Glb1 – bzw. dem Weizenspeicherprotein WP5212, das eine 80%ige Aminosäurehomologie mit Glb1 aufweist - in Seren diabetischer Ratten und Menschen korrelierte mit dem Grad der Inselinfiltration bzw. der Insulitis (MacFarlane et al. 2003). Normalerweise sind Globuline nicht in der Glutenfraktion von Getreide enthalten, können jedoch durch unvollständige Auswaschung in der Matrix der Prolamine und Gluteline retiniert werden. Das hier untersuchte Globulin weist zusätzlich Sequenzhomologien zu einem tight junction Protein auf, welches die Permeabilität des intestinalen Epithels reguliert (MacFarlane et al. 2003).

2.3. Kuhmilch und ihre Proteinfraktionen

Die Milch aller Säuger setzt sich aus den gleichen Hauptinhaltsstoffen zusammen, nämlich aus Proteinen, Fetten, dem Kohlenhydrat Lactose, Mineralstoffen, Vitaminen und Wasser wobei die Verhältnisse der Zusammensetzung auf die jeweiligen Bedürfnisse der Nachkommen abgestimmt sind. Während z. B. der Anteil der Caseine am Gesamtprotein in der Kuhmilch bei etwa 80% liegt, entfallen in der Frauenmilch wesentlich geringere Anteile auf die Caseine (Kielwein 1994).

Tab. 2 Zusammensetzung von Frauenmilch und Kuhmilch.

Spezies	Trocken- masse	Gesamt- protein	Caseine	Molken- proteine	Fett	Lactose
Mensch	12,9	0,9	0,4	0,5	4,0	7,1
Kuh	12,7	3,4	2,8	0,6	3,9	4,7

Hauptproteinbestandteile der Kuhmilch sind die Caseine und die Molkenproteine gefolgt von Minorproteinen und Enzymen.

Caseine sind Phosphoproteine und liegen in der Milch als stark hydratisierte Mizellen vor. Die κ -Caseine bilden die Oberfläche der Mizellen, während die α -Caseine das Gerüst bilden, das von β -Caseinen ausgefüllt wird. Stabilisiert werden die Mizellen durch Calciumphosphatbrücken. Herauslösen von Calcium durch Ansäuerung (pH 4,7) oder Komplexbildner (Labenzym) führt zum Zerfall der Mizellen.

Die Molkenproteine der Kuhmilch sind die β -Lactoglobuline, die α -Lactalbumine sowie Serumalbumine und Immunglobuline. Zu den Minorproteinen zählen vor allem das Transferrin und das Lactoferrin, außerdem noch saure Glycoproteine (Belitz et al. 2001, Kielwein 1994).

Tab. 3 Hauptproteinbestandteile von Kuhmilch mit Molekulargewichten.

Proteine	Molekulargewicht (kDalton)	Anteil am Gesamtprotein %
Caseine		
α_{s1}	23,6	30,6
α_{s2}	25,2	8,0
κ	19,0	0,1
β	24,0	28,4
γ_1	20,5	2,4
γ_2	11,8	2,4
γ_3	11,6	2,4
Molkenproteine		
β -Lactoglobulin	18,3	9,8
α -Lactalbumin	14,2	3,7
Serumalbumin	66,3	1,2
IgG ₁	162,0	1,2-3,3
IgG ₂	152,0	0,2-0,7
IgA	400,0	0,2-0,7
IgM	950,0	0,2-0,7
Enzyme		Spuren
Minorproteine		Spuren

2.3.1 Einfluss von Kuhmilchproteinen auf die Entwicklung des Autoimmundiabetes im Tiermodell

Antikörper gegen praktisch alle der oben erwähnten Proteine konnten in verschiedenen Studien bei Patienten mit kürzlich diagnostiziertem Typ 1 Diabetes nachgewiesen werden, wobei im weiteren Verlauf der Forschung gezeigt wurde, dass auch eine große Anzahl nicht diabetischer Kontrollpersonen diese Antikörper aufwies (Wasmuth und Kolb 2000).

Casein ist eines der Kandidatenproteine, welche als mögliche Trigger der Autoimmunität des Typ 1 Diabetes diskutiert werden. Untersuchungen im NOD-Modell und bei der BB-Ratte erbrachten jedoch verschiedene Ergebnisse. Versuchsdiäten mit hydrolisiertem Casein zeigten eine niedrigere Diabetesinzidenz als Vergleichsdiäten (Hoorfar et al. 1993). Vollcasein führte im NOD-Modell zu einer erhöhten Diabetesinzidenz (Linn et al. 1999, Beales et al.

2002), während es bei BB-Ratten sogar protektiv wirkte. (Beales et al. 2002). Das postulierte besondere diabetogene Potenzial von der β -Caseinvariante A1 konnte bisher nicht bestätigt werden (Truswell 2005, Beales et al. 2002). Eine Untersuchung, die sich mit dem diabetogenen Potenzial von bovinem Serumalbumin (BSA) beschäftigte, erbrachte keine eindeutigen Ergebnisse: eine Standard Diät, eine milchfreie und eine BSA enthaltende Diät führten zu einer vergleichbaren Diabetesinzidenz im Nagermodell (Paxon et al. 1997).

2.4 Einfluss von Weizen und Kuhmilch beim humanen Typ 1 Diabetes

Zwei prospektive Studien, DAISY (diabetes autoimmunity study in the young) in den USA und BABYDIAB in Deutschland, untersuchen die Beziehung zwischen der erstmaligen Einführung von glutenhaltigen Lebensmittel in die Beikost von Kindern und der Entwicklung von Inselautoimmunität. Ein erhöhtes Risiko für Inselzellautoimmunität zeigten Kinder (mit erstgradigen Verwandten mit Typ 1 Diabetes oder Risiko HLA-Genotypen) der DAISY-Studie, die Getreide bereits vor dem vierten Lebensmonat oder erst nach dem sechsten Lebensmonat erhielten. Norris et al. (2003) differenzierten bei der amerikanischen Kohorte zwischen der Einführung von glutenhaltiger und nicht-glutenhaltiger Beikost in die frühkindliche Ernährung, wobei für beide Kollektive gezeigt werden konnte, dass eine Zufütterung vor dem vierten Lebensmonat das Risiko der Inselzellautoimmunität erhöht. Ebenfalls hatten die Kinder ein höheres Risiko, die beide Formen der Beikost nach dem sechsten Lebensmonat erhielten (Norris et al. 2003). Die prospektive BABYDIAB Studie in Deutschland untersucht von Geburt an die Entwicklung von Inselzellautoimmunität bei Kindern mit mindestens einem diabetischen Elternteil. In dieser Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Kinder, die erstmals vor dem dritten Lebensmonat glutenhaltige Beikost erhielten, ein signifikant höheres Risiko hatten, Inselautoimmunität zu entwickeln, als Kinder, denen erst zwischen dem dritten und sechsten Lebensmonat glutenhaltige Beikost gefüttert wurde (Ziegler et al. 2003). Möglicherweise spielt in diesem Zusammenhang das noch nicht völlig ausgereifte Darm assoziierte Immunsystem (GALT) von Kleinkindern eine ursächliche Rolle. Durch eine Eliminierung von Gluten aus der Diät von Kindern, die an einer prospektiven Studie zur

Sekundärprävention für Diabetes teilnahmen, konnte kein Zusammenhang zwischen Diabetes assoziierten Antikörpertitern und Glutenexposition beobachtet werden. Allerdings waren diese Kinder für mindestens zwei Diabetes assoziierte Autoantikörper positiv getestet worden, und wiesen damit ein sehr hohes Risiko für die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes auf (Hummel et al. 2002). Auf den Ergebnissen der BABYDIAB Studie aufbauend wird in Deutschland seit 2001 die Interventionsstudie BABYDIÄT durchgeführt: Kinder bis zum Alter von drei Lebensmonaten und einem erstgradigen Verwandten mit Typ 1 Diabetes und bestimmten HLA-Genotypen wurden eingeschlossen. Ziel der BABYDIÄT Studie ist, den Einfluss einer verzögerten Glutenexposition d.h. keine Glutengabe vor dem ersten Lebensjahr auf die Entstehung von Inselautoimmunität bzw. die Entwicklung eines manifesten Typ 1 Diabetes zu untersuchen und durch engmaschige Nachuntersuchungen die Entstehung von Inselautoimmunität aufzuklären. Kinder der Interventionsgruppe werden bis zum ersten Lebensjahr glutenfrei ernährt, Kinder der Kontrollgruppe erhalten gemäß der Empfehlungen in Deutschland glutenhaltige Beikost nach dem sechsten Lebensmonat (Schmid et al. 2004 a).

Der Einfluss von Kuhmilch und deren Proteinen auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes wird kontrovers diskutiert. Finnische Studien wiesen darauf hin, dass Antikörper, die bovines Insulin binden, auch an humanes Insulin binden können und so eine Verbindung zwischen Kuhmilch und dem Auftreten von IAA darstellen könnten (Vaarala et al. 1999, Paronen et al. 2000). Einige Untersuchungen konnten zwar zeigen, dass sich IgG Antikörper gegen BSA auch gegen ein spezielles Oberflächenprotein der β -Zellen richteten (Karjalainen et al. 1992, Hilger et al. 2001), aber Antikörper gegen BSA konnten ebenfalls bei gesunden Kontrollpersonen sowie Patienten mit anderen Immunerkrankungen nachgewiesen werden (Persaud und Barranco-Mendoza 2004). Untersuchungen zur Stilldauer und Einführung von Kuhmilch in die frühkindliche Ernährung konnten keinen Zusammenhang zwischen der Entwicklung von Autoimmundiabetes und den beiden untersuchten Faktoren zeigen (Couper et al. 1999, Hummel et al. 2000, Ziegler et al. 2003, Norris et al. 1996). Virtanen et al. (2000) postulierten, dass eine hohe Zufuhr an Kuhmilch in der frühen Kindheit zu einem erhöhten

Diabetesrisiko in vorbelasteten Kindern führen kann, was durch eine weitere Studie untermauert wurde (Kimpimäki et al. 2001). Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse steht die internationale TRIGR (Trial to reduce IDDM in the genetically at risk) Studie, die untersucht, inwieweit sich exklusives Stillen bzw. hydrolysierte Proteine in der Säuglingsernährung der ersten acht Lebensmonate protektiv auf die Entwicklung von Typ 1 Diabetes auswirken. Die teilnehmenden Kinder erhalten in der Interventionsgruppe nach der Stillphase eine kuhmilchproteinfreie hydrolysierte Babynahrung oder in der Kontrollgruppe normale Säuglingsnahrung (Akerblom et al. 2005). Eine Studie aus Italien konnte allerdings zeigen, dass eine Immunantwort auf Kuhmilchproteine, besonders β -Casein, nicht nur auf Typ 1 diabetische Patienten beschränkt ist, sondern auch bei gesunden Probanden auftritt (Sarugeri et al. 1999). Harrison und Honeyman (1999) erörterten die Frage, ob möglicherweise eine gestörte Immuntoleranz der Darmmucosa und nicht Kuhmilch oder andere Nahrungsbestandteile der eigentliche auslösende Faktor für eine Immunreaktion ist, die zum Autoimmundiabetes führen könnte.

2.5 Assoziation zwischen Darm-assoziiertem Immunsystem und Autoimmundiabetes

Turley et al. (2005) konnten im NOD-Modell zeigen, dass Darm-assoziierte Antigene nicht nur wie erwartet in mesenterialen Lymphknoten und den Peyer'schen Plaques, sondern auch in den peripankreatischen Lymphknoten den CD_4^+ und CD_8^+ T-Zellen präsentiert werden. Peripankreatische Lymphknoten können also als Teil des Darm-assoziierten Immunsystems (GALT) angesehen werden. Auf diesem Weg könnten Nahrungsantigene, die eine inflammatorische Kapazität besitzen, durch molekulare Mimikry möglicherweise zu einer verstärkten Immunreaktion gegen pankreatische Antigene führen.

Verschiedene Studien verknüpfen eine erhöhte intestinale Permeabilität mit dem Auftreten von Autoimmundiabetes: Meddings et al. (1999) zeigten im Tiermodell, dass eine erhöhte Darmpermeabilität der Entwicklung von Typ 1 Diabetes vorangeht. Auch bei Typ 1 Diabetes Patienten konnte eine Veränderung der Darmmucosa gezeigt werden, die auf eine veränderte intestinale Barrierefunktion schließen lässt (Secondulfo et al. 2004). Dieser Befund konnte kürzlich bei

18 Personen mit Prä-Typ 1 Diabetes bestätigt werden. Personen mit Inselautoantikörpern, aber noch nicht manifestem Diabetes, wiesen bereits eine erhöhte intestinale Permeabilität für das Disaccharid Laktulose als Hinweis auf eine gestörte Barrierefunktion des Darms auf (Bosi et al. 2006). In BB-Ratten scheint der Entwicklung von Autoimmundiabetes in Abhängigkeit von verschiedenen Diäten eine Dysfunktion des Darms voranzugehen (Malaisse et al. 2004, Sampson et al. 2005). Unlängst konnte in BB-Ratten kurz vor der Manifestation von Autoimmundiabetes eine durch Zonulin erhöhte Mucosapermeabilität nachgewiesen werden (Watts et al. 2005). Fasano et al. (2000) konnten im Tiermodell Zonulin als einen Faktor identifizieren, der potenziell für eine erhöhte Mucosapermeabilität verantwortlich ist. Auch zu dieser Thematik konnte kürzlich beim Menschen gezeigt werden, dass Inselautoantikörper-positive Personen höhere Zonulinspiegel aufweisen (Sapone et al. 2006). Anhand von in vitro Versuchen mit intestinalen Zellen von Ratten konnten Clemente et al. (2003) demonstrieren, dass Gliadin über eine Zonulin Ausschüttung die Permeabilität der Darmmucosa erhöht. Ob dieser Mechanismus auch für die initialen Immunprozesse des humanen Typ 1 Diabetes tatsächlich relevant ist, muss in weiteren Studien belegt werden.

2.6 Weitere Nahrungsbestandteile und deren mögliche Assoziation mit Typ 1 Diabetes

Zusätzlich zu Weizen- und Kuhmilchproteinen spielen in der frühkindlichen Ernährung auch Karotten, Äpfeln, Mais oder Kartoffeln eine Rolle (Kersting 2001), deren möglicher Einfluss auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes bisher weitgehend unerforscht ist. Apfel ist bekannt als Allergen im Zusammenhang mit einer Kreuzreaktivität zu Birkenpollen (Asero et al. 1999, Hoffmann et al. 1999), ebenso ist das allergene Potenzial der Karotte nachgewiesen (Kreft et al. 1995). Zum Einfluss von mikrobiellen Toxinen auf der Schale von Kartoffeln und in Kartoffeln selbst auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes im Maus-Modell gibt es Hinweise, dass diese Toxine pankreatische Zellen schädigen können (Myers et al. 2003). Mais mit seinen Proteinfractionen gehört aufgrund seiner Verwandtschaft zum Weizen zu den potenziell interessanten

Nahrungsbestandteilen im Hinblick auf das Immungeschehen des Typ 1 Diabetes. Außerdem gibt es Anhaltspunkte, die zeigen, dass sogenanntes „Maisgluten“ - das Zein - bei einigen Zöliakiepatienten eine inflammatorische Reaktion auslöst (Kristjansson et al. 2005).

Unklar bleibt bislang, welcher Bestandteil der Ernährung letztendlich ein ursächliches Agens in der Entwicklung des Typ 1 Diabetes darstellen könnte. Auf Grund der Verbindung zur Zöliakie gelangte zunächst das Gluten und speziell dessen Bestandteil Gliadin in den Fokus der Forschung. Gliadin hat mit seinen die Mucosapermeabilität verändernden Eigenschaften, nicht nur im Rahmen der Zöliakie das Potenzial, Autoimmunprozesse über das Eindringen von Nahrungsproteinen in die Lamina Propria zu triggern. Andererseits konnte im Tierversuch zwar durch Weizeneliminierung das Auftreten von Autoimmundiabetes verzögert oder verhindert werden (Funda et al. 1999, Schmid et al. 2004 b), jedoch konnte ein Zusatz von Gliadin zu weizenfreiem Futter die Diabetesinzidenz nicht erhöhen (Schmid et al. 2004 b).

Ebenso kontrovers bleibt die Diskussion um den Einfluss von Kuhmilchproteinen auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes. Die besondere Relevanz der Kuhmilchproteine liegt darin begründet, dass sie zu den ersten Proteinen gehören, mit denen der Darm des Säuglings über die Ernährung konfrontiert wird. Von diesen Milchproteinen kann die Mehrzahl immunologische Reaktionen beim Menschen auslösen (Wasmuth und Kolb 2000) und damit möglicherweise auch das Immungeschehen des Typ 1 Diabetes beeinflussen. Während gezeigt werden konnte, dass immunologische Reaktionen auf die Kuhmilchproteine sowohl bei gesunden als auch bei Typ 1 diabetischen Probanden vorlagen (Sargueri et al. 1999), existieren auch konträre Studienergebnisse: über IAA-Reaktionen bei Kindern wurde gezeigt, dass möglicherweise eine Kreuzreaktion zwischen in der Kuhmilch vorhandenem bovinem Insulin und humanem Insulin stattfindet (Vaarala et al. 1999). Im Nagermodell konnte über Diäten mit verschiedenen Kuhmilchproteinen bisher keine Diabetesprotektion erreicht werden (Paxon et al. 1997, Beales et al. 2002).

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungen am NOD-Mausmodell

3.1.1 Mäusekollektiv

Alle im Rahmen dieser Dissertation zu den Fütterungsversuchen im NOD-Mausmodell herangezogenen Tiere stammten aus der Zucht des Instituts für Diabetesforschung, München.

Die Elterntiere wurden ursprünglich von Taconics (Germantown, NY) bezogen. Alle Tiere wurden unter „specific-pathogene-free“ (SPF) Bedingungen in Käfigen mit maximal fünf Tieren gehalten. Futter und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug 14h zu 10h, die relative Luftfeuchte im Tierstall lag bei 55-60%.

In Bezug auf die Haltung sowie für alle Tierexperimente wurden die nationalen Tierschutzgesetze befolgt.

Für die Zucht der Versuchs- und Kontrollgruppen im Rahmen dieser Arbeit fanden 59 weibliche und 30 männliche Tiere Verwendung. Insgesamt wurden 200 weibliche NOD-Mäuse und 33 männliche NOD-Mäuse in die Versuchs- und Kontrollgruppen eingeschlossen. Die Aufteilung der Nachkommen in die Versuchsgruppen erfolgte nach dem „litter-matching Prinzip“, bei dem die Jungtiere eines Wurfes auf möglichst viele Untersuchungsgruppen verteilt werden, um so den genetischen Hintergrund der einzelnen Gruppen vergleichbar zu halten. Auf diese Weise wird der Einfluss von Besonderheiten eines einzelnen Wurfes und dessen Genetik auf die Versuchsergebnisse verringert.

3.1.2 Diäten

Um Nahrungsproteine zu identifizieren, die möglicherweise eine auslösende oder verstärkende Wirkung auf die initialen immunologischen Prozesse des Typ 1 Diabetes besitzen, wurden in drei Versuchsansätzen diabetogene Effekte einzelner Nahrungsbestandteile getestet. Um den Einfluss der einzelnen Nahrungsbestandteile auf die Pathogenese von Autoimmundiabetes im NOD-Mausmodell über eine Gabe mit dem Futter verifizieren zu können, erfolgte in

Kooperation mit dem Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen die Entwicklung klar definierter Versuchsdäten, die sich durch ihre möglichst einfache Zusammensetzung auszeichneten.

Um die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Versuchsdäten zu gewährleisten, wurden drei standardisierte, isokalorische, basale Diäten entworfen, mit einem jeweiligen Proteingehalt von 16%. Die Diäten enthielten als Proteinträger Casein, Soja, Weizen oder Geflügelfleischmehl. In den weiteren Bestandteilen unterschieden sich die Diäten nicht.

- Diät A mit Soja, Casein und Weizen
- Diät B mit Soja und Casein
- Diät C mit Soja und Geflügelfleischmehl

Die Supplementierung von Vitaminen und Mineralstoffen sowie von essentiellen Aminosäuren (AS) für alle Diäten erfolgte nach den Empfehlungen des NRC (1995). Um eine ausreichende Versorgung mit schwefelhaltigen AS zu gewährleisten, wurden allen Diäten der verschiedenen Versuchsreihen jeweils 0,3% D/L-Methionin (3 g/kg Diät) zugesetzt. Die kalkulierte verdauliche Energie (ME) lag bei den drei Versuchsdäten A, B und C im Mittel bei 2974 kcal/kg (2905-3030 kcal/kg).

Als Referenz diente die handelsübliche Nagerdiät von Altromin (1324), die viele unterschiedliche Proteinquellen beinhaltet (s. Tab. 4).

Tab. 4 Zusammensetzung der drei basalen Diäten und der handelsüblichen Referenzdiät.

	Diät A (Soja, Casein, Weizen)	Diät B (Soja, Casein)	Diät C (Soja, Geflügel- fleischmehl)	Diät D (Referenzdiät)
Energie (ME)	2905 kcal	2988 kcal	3030 kcal	2500 kcal
Kohlenhydrate	63,9%	67,3%	64,8%	37,1%
Fette	4,3%	4,2%	4,5%	4,0%
Proteine	16,1%	15,6%	15,5%	19,0%
Weizen	30%	-	-	30-60% *
Casein	12,5%	12,5%	-	-
Geflügelfleischmehl	-	-	15%	+
Sojaschrot	5%	10%	10%	+
Sojaöl	4%	4%	4%	+
Zellulose	3,5%	5%	6%	k.A.
Maisstärke	34,3%	57,8%	54,3%	k.A.
Saccharose	6%	6%	6%	k.A.
Vitamine	lt. Empfehlung	lt. Empfehlung	lt. Empfehlung	+
Mineralstoffe	lt. Empfehlung	lt. Empfehlung	lt. Empfehlung	+
				verschiedene Komponenten**

*unterschiedliche Angaben; k.A. keine Angabe; + enthalten; - nicht enthalten

** Weizen, Weizennachmehl, Weizenkleie, Soja, Gerste, Mais, Fischmehl, Molke und Lupine

In den drei im folgenden erläuterten Versuchsansätzen erfolgte im ersten Ansatz der Vergleich der drei basalen Diäten A, B, C und einer handelsüblichen Nagerdiät im NOD-Mausmodell, um eine Diät ohne diabetogene Wirkung zu identifizieren, die in den weiteren Fütterungsversuchen Verwendung finden sollte. Im zweiten Ansatz stand die Untersuchung des potenziell diabetogenen Einflusses von Weizen in abgestuften Zulagen und von einzelnen Weizenbestandteilen im Vergleich zur basalen, nicht diabetogenen Diät C im NOD-Modell im Vordergrund. Hierzu wurden der Diät C 30%, 10% oder 5% Weizen zugesetzt, bzw. isoliertes Gluten oder die Weizenfraktion der Albumine und Globuline. Im dritten Versuchsansatz fand die Untersuchung einiger in der frühkindlichen Ernährung eingesetzter Nahrungsbestandteile wie Möhre, Mais, Kartoffeln und Äpfel auf ihre möglichen diabetogenen Eigenschaften im Vergleich zur basalen Diät C statt. Die oben genannten Bestandteile wurden hier zu jeweils 5% der basalen Diät C zugesetzt.

Tab. 5 Rohstoffverzeichnis der Diäten.

Rohstoffe	Hersteller
Casein, Lebensmittelqualität	Meggle, Wasserburg
Gluten	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ungeschälte Kartoffelfasern, trocken	Brückner-Werke, Hamburg
Karottenpulver	Brückner-Werke, Hamburg
Apfelpulver	Rügamer GmbH, Schwebheim, Unterfranken
Geflügelfleischmehl	Altromin, Lage
Haltungsdiaät 1324	Altromin, Lage

Alle weiteren Rohstoffe, Mineralstoffe und Vitamine für die nährstoffdefinierten Diäten wurden vom Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie, Gießen zur Verfügung gestellt.

3.1.3 Protokoll Teilversuch 1 und 1a

Der erste Versuchsansatz diente der Entwicklung von diabetogenen und nicht-diabetogenen basalen Diäten im NOD-Modell. Als gemeinsame Proteinquelle der Diäten fanden hier Casein oder Geflügelfleischmehl Verwendung. Die beiden selbstkonzipierten Diäten A und B hatten Casein als Hauptproteinquelle und unterschieden sich nur im Weizenanteil, während in Diät C Geflügelfleischmehl als Proteinquelle eingesetzt wurde und diese Diät zusätzlich weizenfrei war (s. Tab.4). Als Referenz diente eine handelsübliche Nagetierdiät.

Es wurden zwei Gruppen von Zuchtpaaren gebildet, deren Muttertiere während Trächtigkeit und Laktation entweder

- die glutenfreie, caseinhaltige Diät B,
- oder die gluten- und caseinfreie Diät C

ad libitum erhielten.

Die aus den Jungtieren gebildeten Versuchsgruppen bestanden jeweils aus 9-12 weiblichen Nachkommen bzw. aus 10, 11 und 12 männlichen Nachkommen.

Die weiblichen Jungtiere der Zuchtgruppe der glutenfreien Diät B wurden nach der Laktation im Alter von drei Lebenswochen von den Muttertieren getrennt und in drei Versuchsgruppen aufgeteilt. Eine der Gruppen erhielt die Referenzdiät

(Diät D), eine zweite die weizenhaltige Diät A und eine dritte Gruppe verblieb auf der weizenfreien Diät B. Die Zuteilung der weiblichen Jungtiere der Zuchtgruppe der gluten- und caseinfreien Diät C erfolgte mit drei Lebenswochen in eine Versuchsgruppe, bestehend aus 9 weiblichen Tieren, die auf Diät C verblieb (s. Abb. 4).

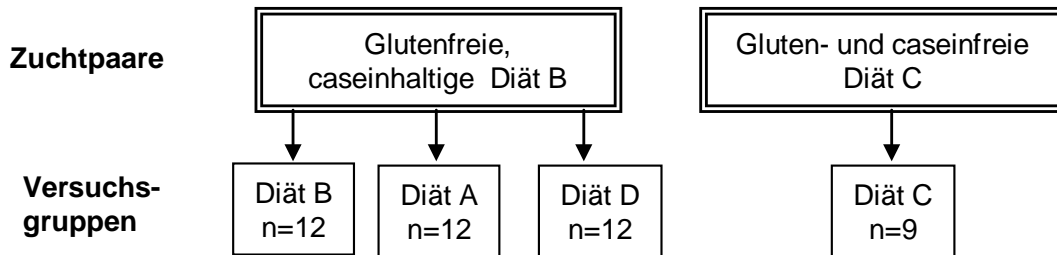


Abb. 4 Zuteilung der weiblichen NOD-Mäuse auf die Zucht- und Versuchsgruppen in Teilversuch 1.

Die männlichen Jungtiere der Zuchtgruppe der glutenfreien Diät B wurden wie für die weiblichen Tiere beschrieben nach der Laktation im Alter von drei Lebenswochen von den Muttertieren getrennt und in drei Versuchsgruppen aufgeteilt. Analog zur Gruppeneinteilung der weiblichen Mäuse erhielt eine der Gruppen die Referenzdiät (Diät D) eine zweite die weizenhaltige Diät A und eine dritte Gruppe verblieb auf der weizenfreien Diät B (s. Abb. 4a).

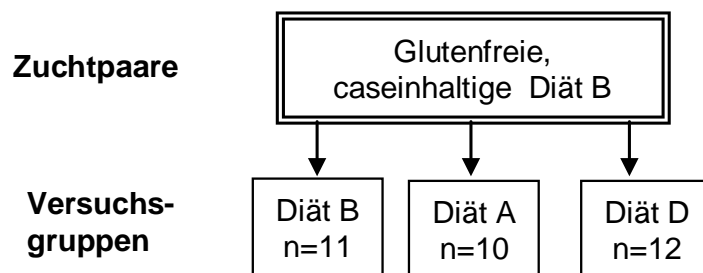


Abb. 4a Zuteilung der männlichen NOD-Mäuse auf die Zucht- und Versuchsgruppen in Teilversuch 1a.

Im Alter von 3-4 Lebenswochen und nach 10 Lebenswochen wurde das Gewicht der Mäuse ermittelt.

Nach 10 Lebenswochen erfolgte bei allen Jungtieren unter Betäubung eine Blutabnahme von ca. 0,5 ml Blut aus dem retroorbitalen Plexus mittels einer Kapillarpipette, außerdem wurden die Mäuse ab diesem Zeitpunkt zweimal wöchentlich mit Glucoseteststreifen (Diabur-Test 5000, Roche Diagnostics GmbH) auf Glucoseausscheidungen im Urin kontrolliert.

Die Manifestation von Autoimmundiabetes wurde dabei definiert als zweimalig hintereinander auftretende renale Glucoseausscheidung und im Blut der Schwanzvene gemessene Blutglucosewerte oberhalb von 11,1 mmol/L (Teststreifen Ascensia® ELITE Sensoren, Bayer; Gerät Glucometer Elite® 2000, Bayer). Insgesamt erfolgte die Beobachtung der Diabetesentwicklung der Tiere über einen Zeitraum von 36 Lebenswochen. Nach dieser Zeit ohne Diabetesmanifestation wurden die Mäuse, ebenso wie bei Diabetesmanifestation, durch cervicale Dislokation getötet. Anschließend wurde Blut aus der Vena Cava entnommen und Blutglucose im Blut der Schwanzvene gemessen.

Die Verarbeitung des aus den Blutabnahmen bei zehn Lebenswochen und bei Exitus stammenden Vollblutes erfolgte zur Gewinnung des Serums über eine zehnminütige Zentrifugation bei 9000 rpm in einer Eppendorfzentrifuge (5415 R, Eppendorf, Hamburg). Das Serum wurde bei -18°C bis zur späteren Messung der Insulinautoantikörper mittels Radio-Immuno-Bindungassay (s. Kapitel 3.2.5) aufbewahrt.

3.1.4 Protokoll Teilversuch 2

Im zweiten Versuchsansatz wurde der Einfluss unterschiedlicher Weizengehalte sowie der Einfluss von einzelnen Weizenkomponenten auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes im NOD-Modell untersucht. Als Basis der hier verwendeten fünf Diätvariationen und als Kontrolldiät diente die gluten- und caseinfreie Diät C.

Weizen wurde mit einem höchsten Gehalt von 30% (entsprechend der zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Angaben der Firma Altromin bezüglich des Weizengehaltes der Standardnagerdiät 1324, Diät D) und in Abstufungen von 10% und 5% Weizen Diät C zugesetzt. Die verschiedenen Gehalte des Weizens im

Futter sollten ermöglichen, eine Aussage darüber zu machen, ab welcher Menge oral zugeführter Weizen eventuell diabetogene Eigenschaften zeigt. Außerdem wurde isoliertes Weizengluten entsprechend einem Weizengehalt von 30% zugesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit isolierte Weizenalbumine und -globuline, ebenfalls angepasst an einen Weizengehalt von 30%, wurden bei gleichzeitiger Fütterung von Diät C über das Trinkwasser verabreicht. Durch die Gabe der isolierten Weizenfraktionen wurde versucht, die möglicherweise diabetesrelevanten Proteinfractionen zu identifizieren.

Alle Zuchtpaare für diesen zweiten Versuchsansatz wurden mit Diät C versorgt. Die Trennung der Jungtiere von den Muttertieren sowie die Zuteilung auf sechs Gruppen erfolgte nach drei Lebenswochen. Die Versuchsgruppen bestanden aus 13 bzw. 14 weiblichen Jungtieren, denen die jeweiligen Variationen von Diät C bis zu ihrem Versuchsende ad libitum zur Verfügung standen (s. Abb. 5).

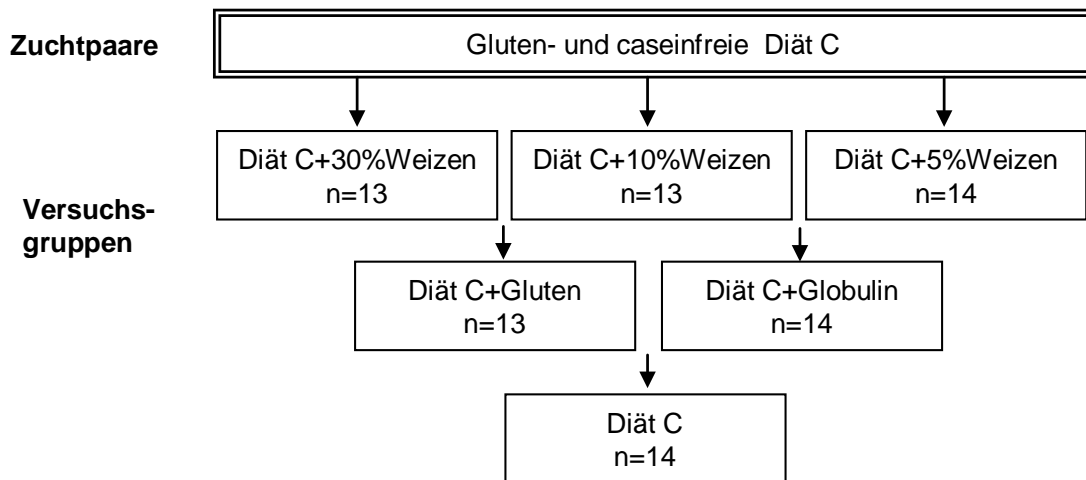


Abb. 5 Zuteilung der weiblichen NOD-Mäuse auf die Zucht- und Versuchsgruppen in Teilversuch 2.

Die Blutabnahmen bei den Jungtieren nach 10 Lebenswochen, sowie die Wägung, die Urin- und Blutglucosetests und der Beobachtungszeitraum wurden analog zum Protokoll des ersten Teilversuchs (s. 3.1.3) durchgeführt.

3.1.5 Protokoll Teilversuch 3

Dieser Versuch untersuchte den Einfluss verschiedener Nahrungsbestandteile auf die Entwicklung von Typ 1 Diabetes, wobei die Auswahl der Komponenten die Einführung bestimmter Lebensmittel im Säuglingsalter berücksichtigte.

Basierend auf der gluten- und caseinfreien Diät C wurden Diätvariationen konzipiert, die jeweils eine zusätzliche Nahrungskomponente (Kartoffel, Apfel, Möhre oder Mais) enthielten. Als Zusatzmenge wurden hier 5% veranschlagt, da auf diese Weise ohne gravierende Veränderungen in der Nährstoffzusammensetzung der Diät eine wirksame Dosis des potenziell diabetogenen Proteins eingebracht werden konnte. Als Kontrolle diente auch hier die basale Diät C.

Alle Zuchtpaare des dritten Versuchs wurden mit der gluten- und caseinfreien Diät C versorgt. Die Jungtiere wurden im Alter von drei Lebenswochen von den Muttertieren getrennt in fünf Versuchsgruppen zu je 14 bzw. 15 weiblichen Tieren aufgeteilt (s. Abb. 6).

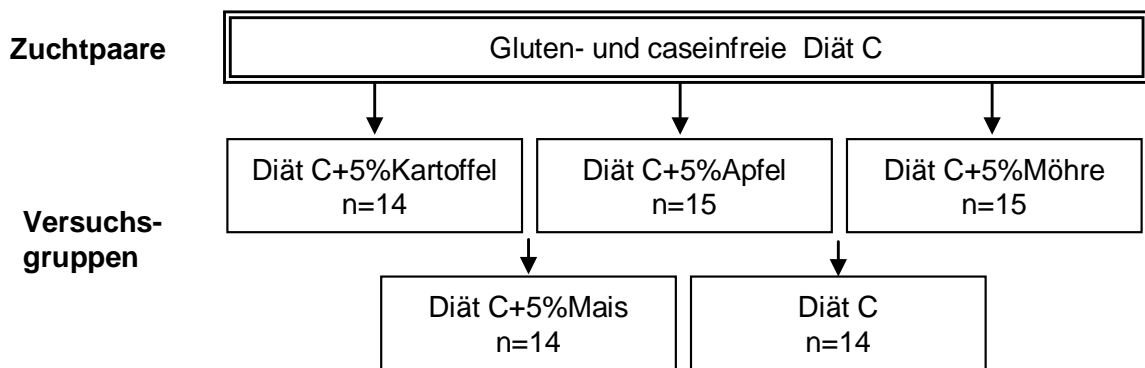


Abb. 6 Zuteilung der weiblichen NOD-Mäuse auf die Zucht- und Versuchsgruppen in Teilversuch 3.

Die Blutabnahmen bei den Jungtieren bei einem Lebensalter von 10 Wochen, sowie die Wägung, die Urin- und Blutglucosetests und der Beobachtungszeitraum wurden wie in den Protokollen zu den Teilversuchen 1 und 2 (s. 3.1.3 und 3.1.4) beschrieben durchgeführt.

3.2 Experimentelle Methoden

3.2.1 Getreideextraktion zur Gewinnung der Proteinfractionen

Tab. 6 Geräte für die Getreideextraktion.

Geräte	Hersteller
Sorvall RC 5B Superspeed Centrifuge	Kendro, Langenselbold
Sorvall SLA-1500 Rotor	Kendro, Langenselbold
Sorvall Polycarbonate Oakridge Bottle (200ml)	Kendro, Langenselbold
Eppendorf Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Vibrax VXR	IKA, Heitersheim
Vibrax VF 2	IKA, Heitersheim
Analysenwaage	Mettler Toledo, Gießen
Ultraschallbad	Mettler Toledo, Gießen
Waage PJ 3000	Mettler Toledo, Gießen
Eucosan pH-Meter pH5/6 & Ion 6	Eutech Instruments, Nijkerk NL

Tab. 7 Chemikalien für die Getreideextraktion.

Chemikalien	Hersteller
Ammoniumsulfat, ≥ 99%	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kaliumhydrogenphosphat, ≥ 99%	Merck, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol, ≥ 99%	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Aceton	Apotheke Städt. Krankenhaus München Schwabing
Ethanol, ≥ 99,9%	Apotheke Städt. Krankenhaus München Schwabing
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Trizma® Base	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Essigsäure	Apotheke Städt. Krankenhaus München Schwabing
Salzsäure	Apotheke Städt. Krankenhaus München Schwabing
Weizenmehl Type 550	Davert GmbH, Senden
2-Propanol	Apotheke Städt. Krankenhaus München Schwabing
Stickstoff (als Gas)	Linde

Um die im Weizen enthaltenen Proteinfractionen voneinander zu trennen, wurde eine modifizierte dreistufige Extraktion vorgenommen, wobei im ersten Schritt der Extraktion die Albumine und Globuline im Überstand vorlagen, im zweiten Extraktionsschritt die Prolamine (Gliadine) im Überstand enthalten waren und mit dem letzten Schritt die Gluteline (Glutenine) abgetrennt wurden (Wilson und Goulding 1991, Mimouni et al. 1998, Nicolas et al. 1998 Idris et al. 2003).

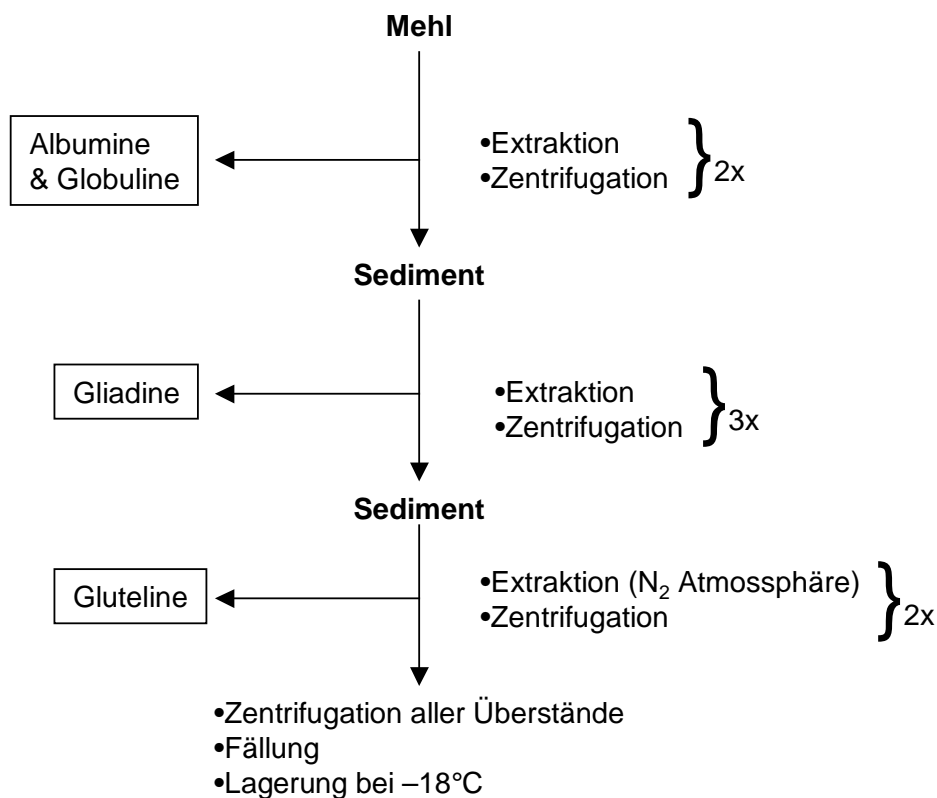


Abb. 7 Schema der Proteinextraktion und Trennung der Fraktionen aus Weizenmehl.

Von handelsüblichem Weizenmehl Type 550 wurden 0,1 g eingewogen, mit 1 ml Sörensen-Puffer (pH 7,35) versetzt und 20 min bei 4°C geschüttelt. Nach einer Zentrifugation (20 min, 1000 rpm, Sorvall RC 5B Superspeed Centrifuge) bei 4°C wurde der Überstand abgenommen und das Sediment nach Zusatz von Sörensen-Puffer noch einmal nach derselben Methode extrahiert. Die beiden Überstände wurden vereinigt und bei 4°C bis zur Beendigung der weiteren Extraktionsstufen gelagert.

Das Sediment wurde mit bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend in 0,5 ml 60% (v/v) Ethanol gelöst, 20 min bei 4°C geschüttelt und wiederum 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Gliadinen wurde abgenommen und das Sediment zwei weitere Male in 60%igem Ethanol gelöst und diesem Extraktionsschritt unterworfen. Die Überstände wurden vereinigt und das Pellet anschließend wieder mit bidestilliertem Wasser gewaschen wurde.

Für die folgende Extraktion der Glutenine wurde 1 ml einer 2 M Harnstofflösung mit 50 ml 0,1 M TRIS-HCl und 50% (v/v) 2-Propanol verwendet. Die Proben wurden für 20 min unter Stickstoff-Atmosphäre bei 60°C geschüttelt, die anschließende Zentrifugation (20 min, 1000 rpm) erfolgte bei Raumtemperatur. Die Überstände dieser zweifach vorgenommenen Extraktion wurden vereinigt und alle Proben der verschiedenen Extraktionsschritte bei 20°C und 14000 rpm in der Eppendorf-Zentrifuge für 30 min zentrifugiert, um eventuell noch verbliebene ungelöste Partikel zu entfernen.

Zur Fällung der Proteine aus dem jeweiligen Lösungsmittel wurde die dreifache Menge Aceton (+1% DTT) zugesetzt und die Fällung bei -18°C über Nacht durchgeführt. Nach Zentrifugation bei 4°C und Verwerfen der Überstände wurden die Albumine und Globuline in bidestilliertem Wasser gelöst, die Gliadine in einem Gemisch (4:1) aus TBT-Puffer (50 mM Tris, 1% Tween, pH 8,0) und 1 M Essigsäure, sowie die Glutenine in ihrer harnstoffhaltigen Extraktionslösung.

Um die Albumin- und Globulinfraktion des Weizens für die Fütterungsversuche zu gewinnen, wurde die Fällung mit dem dreifachen Volumen 2 molarer Ammoniumsulfatlösung bei 4°C über Nacht durchgeführt. Anschließend wurden die Albumine und Globuline in autoklaviertem Wasser gelöst.

Alle Proben wurden bei -18°C bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert.

3.2.2 Herstellung von Proteinextrakten aus Nahrungs- oder Futtermitteln

Tab. 8 Geräte für die Herstellung von Proteinextrakten.

Geräte	Hersteller
Eppendorf Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Ultra Thurrax T 25	Bachhofer, Reutlingen
Vibrax VXR	IKA, Heitersheim
Analysenwaage	Mettler Toledo, Gießen
Eucosan pH-Meter pH5/6 & Ion 6	Eutech Instruments, Nijkerk NL

Tab. 9 Chemikalien für die Herstellung von Proteinextrakten.

Chemikalien	Hersteller
Trizma® Base	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tween	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Lactoglobulin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
α -Casein	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
β -Casein	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Vollcasein	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Milchpulver	Bayerische Milchindustrie eG, Landshut

Um die im Tierversuch getesteten Nahrungsmittelbestandteile so wie Milchpulver, Caseine, BSA, Lactoglobulin und Weizenmehl *in vitro* auf mögliche Kreuzreaktionen mit IAA testen zu können, wurden Extrakte der einzelnen Bestandteile hergestellt.

Von getrockneten, pulverisierten Milchkomponenten wurden zwischen 0,1 g und 0,5 g in ein Glasröhrchen eingewogen und mittels Ultra-Thurrax in TBT-Puffer (50 mM Tris, 1% Tween, pH 8) homogenisiert, um die löslichen Proteine zu extrahieren. Das entstandene Homogenat wurde dann bei 4°C für drei Stunden geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation in der Eppendorfszentrifuge bei 4°C und 15000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet verworfen. Die Probe wurde mehrfach zentrifugiert, bis ein klarer Überstand vorlag. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden die Extrakte bei –18°C gelagert.

3.2.3 Elektrophoretische Auftrennung der Proteinfractionen (SDS-Page)

Tab. 10 Geräte für die Gelelektrophorese.

Geräte	Hersteller
Eppendorf Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Schüttler DSG 304	Heidolph, Schwabach
Eppendorf Thermomixer Compact	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Electrophoresis Power Supply EPS 300	Amersham, Buckinghamshire GB
Elektrophorese Kammer und Ausstattung	Biorad, München

Tab. 11 Chemikalien für die Gelelektrophorese.

Chemikalien	Hersteller
SDS, 99%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat \geq 98%	Roth, Karlsruhe
Temed, 99%	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30%	Roth, Karlsruhe
Trizma® Base	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EDTA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dithiothreitol	Roth, Karlsruhe
HCl	Apotheke Städt. Krankenhaus München Schwabing
Ethanol	Apotheke Städt. Krankenhaus München Schwabing
Methanol	Apotheke Städt. Krankenhaus München Schwabing
Glycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycerin	Apotheke Städt. Krankenhaus München Schwabing
peqGOLD Proteinmarker 1211 (27-1010)	peqLab, Erlangen

Zur Verifizierung der einzelnen Proteinfractionen aus der Getreideextraktion (s. 3.2.1) erfolgte eine Gelelektrophorese nach Laemmli. Für die Auftrennung wurden 10%ige bzw. 12%ige Trenngele benutzt. Jeweils 20 μ l ~~Proben~~ wurden mit 5 μ l Auftragspuffer (5-fach konzentriert) versetzt, 5 min auf 95°C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Es wurde ein TRIS-Glycin-Laufpuffer mit 10% SDS verwendet. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 30 mA/Gel. Zur Identifizierung der Banden diente peqGold Protein-Marker 1211.

Die Anfärbung der Gele erfolgte für ca. 30 min mit 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, in 100 ml Lösungsmittelgemisch aus 50% bidestilliertem Wasser, 40%

Ethanol und 10% Eisessig. Anschließend wurden die Gele mit einer Lösung aus 50% bidestilliertem Wasser, 40% Methanol und 10% Eisessig entfärbt. Um ein Zerreißen der Gele zu verhindern, wurden die Gele vor der Trocknung 15 min mit einer glycerin (10%)- und ethanolhaltigen (20%) Lösung behandelt.

3.2.4 Bestimmung der Proteingehalte der Extrakte

Die Bestimmung des Proteingehaltes von Weizenproteinfraktionen oder Extraktionslösungen erfolgte photometrisch mittels eines BCA Protein Assay Kits (PIERCE Bestell-Nr. 23225), der nach Herstellerangaben angewendet wurde.

3.2.5. IgG-Insulinautoantikörpermessungen in murinen und humanen Seren

Tab. 12 Geräte für die IgG-IAA-Messungen.

Geräte	Hersteller
Vakuumpumpe UNO 004B	Pfeiffer Balzers, Aßlar
Gamma Counter Cobra II	Packard, Meriden, CT, USA
CL-GPR Zentrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld

Tab. 13 Chemikalien für die IgG-IAA-Messungen.

Chemikalien	Hersteller
Trizma® Base	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tween	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Insuman® Rapid	Aventis, Frankfurt a M
¹²⁵ I-A14 Insulin	Aventis, Frankfurt a M
Protein-A-Sepharose	Amersham, Buckinghamshire GB
Protein-G-Sepharose	Amersham, Buckinghamshire GB

Die Bestimmung der Insulinautoantikörper (IAA) in murinen Seren erfolgte mittels eines Radioliganden-Bindungsassays (RBA) (Williams et al. 1997, Naserke et al. 1998, Koczwarra et al. 2003). Der Test arbeitet mit Protein A- und G-Sepharose und erfordert nur sehr geringe Serumvolumina. Die Sensitivität und Spezifität wurde in den Workshops diabetischer Tiermodelle 2000 und 2002 bestätigt (Bonifacio et al. 2001). Sämtliche Testschritte wurden auf Eis durchgeführt und gekühlter TBT-Puffer (50 mM Tris, 1% Tween; pH 8) verwendet. In jedem

Testansatz wurden zwei murine Standardseren mit definierten IAA Titern, sowie ein IAA-positives und ein IAA-negatives Mäuseserum zur Kontrolle mitgemessen. Der Test für die einzelnen murinen Seren wurde in einer Doppelbestimmung angesetzt: für eine Probe murines Serum wurden für den Test jeweils zwei Duplikate in insgesamt vier Rundbodenröhrchen mit jeweils 5 µl Serum angesetzt. Dem ersten Duplikat wurden je 25 µl humanes „kaltes“ Insulin (8 U/ml) zugesetzt, um alle insulinspezifischen Bindungsstellen im Serum zu blockieren. Damit repräsentierte die in diesem Duplikat später gemessene radioaktive Strahlung in Zerfällen pro Minute (cpm) die unspezifische Bindung des radioaktiv markierten Insulins. Als Volumenausgleich wurden dem zweiten Duplikat 25 µl TBT-Puffer zugesetzt. In jedes Röhrchen wurden 1,5 µl [¹²⁵I]-A14 markiertes humanes Insulin (360 µCi/µg, ca. 22000 cpm/Röhrchen), verdünnt mit 25 µl TBT-Puffer pro Röhrchen, pipettiert. Der Ansatz wurde über 72 h bei 4°C inkubiert. Am Vortag der weiteren Verarbeitung wurden 2 mg Protein-A-Sepharose pro Röhrchen in TBT-Puffer bei 4°C über Nacht vorgequollen. Am nächsten Tag wurden 6 µl Protein-G-Sepharose pro Röhrchen zugesetzt und zweimal mit TBT-Puffer gewaschen. Pro Röhrchen erfolgte ein Zusatz von 50 µl des Sepharosegemisches in TBT-Puffer und unter Schütteln wurde bei 4°C für eine Stunde inkubiert. Während dieser Phase präzipitierten die Antigen-Antikörperkomplexe. Es folgten sechs Waschschrte mit je 1,8 ml TBT-Puffer pro Röhrchen und jeweils anschließender Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 2100 rpm, um das ungebundene [¹²⁵I] Insulin auszuwaschen. Die Überstände nach jeder Zentrifugation wurden mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Abschließend wurde die Radioaktivität der Antigen-Antikörperpellets im γ-Counter gemessen. Für alle Proben wurde von jedem Duplikat das arithmetrische Mittel der gemessenen cpm bestimmt. Vom Mittel des Duplikats mit TBT-Puffer wurde der Mittelwert des Duplikats mit Zusatz von „kaltem“ Insulin abgezogen, um eine Bereinigung um die unspezifische Bindung zu erreichen (Δcpm).

Um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Testansätze zu erhalten, wurden Indizes nach folgender Formel berechnet:

$$IAA\text{-Index} = (\Delta\text{cpm Probe} / \Delta\text{cpm Standard}) \times 100$$

Die Grenze für positive Messwerte liegt bei einem IAA-Index ≥ 4 und entspricht der 99sten Perzentile von Messwerten, die in Seren von BALBL/c und C57BL/6 Mäusen ermittelt wurde.

Die Bestimmung von IAA in humanen Seren erfolgte nach einem analogen Testverfahren. Hier lag die obere Grenze für Normalwerte bei $\geq 1,5$ Testunits und entsprach der 99sten Perzentile von Messwerten, die in Seren nicht diabetischer Kontrollpersonen ermittelt wurden. Das Testverfahren erreichte 70% Sensitivität und 99% Spezifität im internationalen „Diabetes Autoantibodies Standardization Program“ Workshop (DASP). Als Interassay Abweichungs-koeffizient wurden 11% ermittelt (Bingley et al. 2005). Alle Serumproben waren kodiert und somit bei den Antikörpertests für die durchführende Person verblindet.

Der RBA Ablauf erfolgte für humane Seren in gleicher Weise wie für die murinen Seren. Lediglich das Sepharosegemisch wurde verändert: es wurden nur 1,5 mg Protein-A-Sepharose und 2 μ l Protein-G-Sepharose in 25 ml TBT-Puffer pro Röhrchen zugegeben, da sich diese Mengen für die Detektion in humanen Seren als ausreichend erwiesen haben.

3.2.6 Radioliganden-Bindungsassay mit Nahrungsbestandteilen

Um zu ermitteln, ob zwischen Nahrungsproteinen und IAA eine Kreuzreaktion stattfindet, wurde das RBA-Testverfahren für humane Seren modifiziert: zum Teil wurden am Vortag des Testansatzes die zu untersuchenden Proteinlösungen mit 6 mg/ml Protein-A- und 8 mg/ml Protein-G-Sepharose versetzt und über Nacht inkubiert, um eine Vorklärung vorzunehmen und so mögliche unspezifisch bindende Proteine zu fällen. Nach anschließender Zentrifugation (12000 rpm, 5 min, Eppendorfzentrifuge) wurden die Überstände dann im RBA verwendet. Zusätzlich zu den Duplikaten der Seren mit „kaltem“ Insulin und TBT-Puffer wurden Duplikate mit jeweils 5 μ l Serum und 25 μ l der entsprechenden, auf verschiedene Konzentrationen eingestellten, Proteinlösung angesetzt.

Alle weiteren Schritte verliefen analog zu der oben beschriebenen Methode.

3.2.7 IAA-Affinitätsmessungen und Reaktivität mit Hühnerinsulin

Die Affinität der IAA wurde über kompetitive Bindung mit verschiedenen Konzentrationen unmarkiertem humanem Insulin ebenfalls im RBA ermittelt (Achenbach et al. 2004, Koczwara et al. 2006). Der Testansatz erfolgte wie unter 3.2.6 und 3.2.5 beschrieben mit Duplikaten von je 5 µl ausgewählten humanen Seren und 25 µl verdünntem [¹²⁵I]-A14 markiertem humanem Insulin. Allerdings wurde dann, statt immer die gleiche Konzentration humanes Insulin zu verwenden, in fünf aufsteigenden Konzentrationen je 25 µl „kaltes“ Humaninsulin zugesetzt, um die insulinspezifischen Bindungsstellen im Serum zu blockieren.

Um eine Reaktivität von IAA im RBA mit Hühnerinsulin darstellen zu können, erfolgte der Testansatz wie oben beschrieben über die kompetitive Bindung mit sechs aufsteigenden Konzentrationen unmarkiertem Hühnerinsulins. Die für eine 50%ige Inhibierung (IC₅₀) der Bindung der IAA an [¹²⁵I]-A14 markiertes humanes Insulin notwendige Konzentration an „kaltem“ Insulin und die K_d Werte wurden mit dem Programm GraphPad Prism3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) ermittelt.

Die IAA Affinität wurde ausgedrückt als reziproke K_d Werte (L/mol) (Achenbach et al. 2004, Koczwara et al. 2006). Die relative Kapazität von humanem oder Hühnerinsulin, IAA Bindungen zu inhibieren, wurde als Verhältnis von

$$IC_{50_{Humaninsulin}} / IC_{50_{Hühnerinsulin}}$$

berechnet, wobei Werte <1 bedeuten, dass die IAA bevorzugt an Humaninsulin binden, während Werte >1 zeigen, dass die IAA stärker an Hühnerinsulin binden.

3.2.8 IgA-Insulinautoantikörpermessungen in humanen Seren

Die unter 3.2.5 beschriebene Methode zur IgG-IAA-Messung wurde für die Messung der IgA IAA wurde hier modifiziert angewandt. Der Testansatz erfolgte mit Duplikaten von je 5 µl Serum, die mit 25 µl [¹²⁵I]-A14 markiertem humanem Insulin versetzt und 72 h bei 4°C inkubiert wurden. Nach Zusatz von 7 µl Protein-G-Sepharose in 50 µl TBT-Puffer pro Röhrchen und wurde unter Schütteln bei 4°C für eine Stunde inkubiert, wodurch die IgG Antigen-

Antikörperkomplexe präzipitierten. Nach Zentrifugation wurden 60l Überstand entnommen und in ein neues Röhrchen transferiert. Nach Zusatz von 10l anti-human IgA-Agarose in 40 µl TBT-Puffer zu diesen Röhrchen wurde nochmals unter Schütteln bei 4°C für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss erfolgten die unter 3.2.5 beschriebenen Waschschriffe für alle Röhrchen (Protein-G-Sepharose und IgA-Agarose) und die Messung im γ -Counter.

3.3 Statistik

Die Auswertung von kumulativem Diabetesrisiko und Diabetesfrequenzen im NOD-Modell erfolgte mittels Überlebensanalysen. Zum Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen im NOD-Modell wurde der log-rank Test angewandt. Die Vergleiche der Insulitisscores und Antikörperprävalenzen zwischen den Gruppen im NOD-Modell wurden mit Hilfe des nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Über Spearmans Correlation wurde die Korrelation zwischen relativer IAA-Bindung an Hühnerinsulin und IAA Affinitäten ermittelt. Der Vergleich der Affinitäten zwischen den einzelnen Gruppen erfolgte über den Mann-Whitney-U-Test. Als signifikant wurden bei allen Analysen Werte von $p < 0,05$ angesehen. Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Chicago, IL) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Fütterungsversuche mit NOD-Mäusen

Im Rahmen der Fütterungsversuche im NOD-Modell wurde anhand selbst entworfener, klar aufgebauter Versuchsdäten der Einfluss von Nahrungsbestandteilen getestet, die im Rahmen der Diabetesentwicklung diskutiert werden. Besonders wurden hier Weizen und Weizenproteine, das Kuhmilchprotein Casein und Nahrungsbestandteile der frühkindlichen Ernährung (Apfel, Karotte, Mais, Kartoffel) auf potenziell diabetogene Effekte untersucht. Zusätzlich zur Beobachtung der Diabetesentwicklung der Tiere wurden die IAA-Titer im Alter von 10 Lebenswochen bei allen Mäusen der Versuchsgruppen bestimmt, um eine mögliche Korrelation zwischen den IAA-Titern und dem Alter der Tiere bei Diabetesmanifestation darstellen zu können.

4.1.1 Nahrungsaufnahme und Gewichtsentwicklung der NOD-Mäuse in den Versuchsgruppen

Die durchschnittliche Nahrungsaufnahme war in allen Gruppen ähnlich und lag bei den 10 Wochen alten Tieren zwischen 2,29 g und 2,72 g pro Tag und Maus. Auch die Energieaufnahme der ausgewachsenen Tiere war mit 6,87 kcal bis 8,17 kcal pro Tag und Maus in allen Versuchsgruppen annähernd vergleichbar. Nur bei den Tieren, die mit der Referenzdiät Diät D (handelsübliche Nagetierdiät) versorgt wurden, lag die Futter- und Energieaufnahme höher (3,57 g/Maus/Tag und 8,92 kcal/Maus/Tag) (s. Tab.14).

Die Verfütterung der verschiedenen Diäten an die Muttertiere resultierte in annähernd gleichen Körpergewichten der Jungtiere beim Einsetzen in die einzelnen Versuchsgruppen und führte später zu einer sehr ähnlichen Entwicklung des Körpergewichtes. Beim Einsetzen in die Versuchsgruppen zwischen drei und vier Lebenswochen lagen die Ausgangsgewichte der Absetzlinge zwischen 7,1 g und 8,5 g und im Alter von 10 Lebenswochen erreichten die weiblichen NOD-Mäuse Körpergewichte zwischen 19,5 g und 22,9 g.

Tab. 14 Futter- und Energieaufnahme pro Maus und Tag in Bezug auf die jeweilige Diät.

	Mäuse/Gruppe [n]	Futteraufnahme [g/Maus/Tag±SD]*	Energieaufnahme [kcal/Maus/Tag±SD]*
Diät A (Soja, Casein, Weizen)	12	2.36±0.36	7.09±1.08
Diät B (Soja, Casein)	12	2.29±0.35	6.87±1.05
Diät C (Soja, Geflügelfleisch- mehl)	10	2.49±0.09	7.66±0.15
Diät D (Referenzdiät)	12	3.57±0.35	8.92±0.87
Diät C (Soja, Geflügelfleisch- mehl)	13	2.64±0.06	8.01±0.19
Diät C+ 5% Weizengluten	13	2.54±0.08	7.65±0.25
Diät C+ 30% Weizen	13	2.67±0.10	7.87±0.29
Diät C+ 10% Weizen	13	2.67±0.04	8.05±0.13
Diät C+ 5% Weizen	14	2.70±0.08	8.12±0.25
Diät C+ Weizenalbumin und -globulin	14	2.65±0.06	8.06±0.20
Diät C+ 5% Apfel	15	2.72±0.07	8.17±0.21
Diät C+ 5% Karotte	15	2.71±0.14	7.99±0.42
Diät C+ 5% Kartoffel	14	2.59±0.07	7.87±0.20
Diät C+ 5% Mais	14	2.65±0.07	8.08±0.22

*Die angegebenen Werte gelten für weibliche NOD-Mäuse im Alter von 10 Lebenswochen

4.2 Teilversuch 1 – weizen- und caseinhaltiges Futter im Vergleich zu einer basalen Diät

In diesem Versuchsteil wurden vier verschiedene Diäten eingesetzt, um einerseits den möglichen Einfluss von Weizen und/ oder Casein auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes im NOD-Modell herauszuarbeiten und andererseits eine Diät zu finden, die möglichst nicht diabetogen ist. Die weiblichen NOD-Mäuse erhielten entweder eine weizen- und caseinhaltige (Diät A), eine caseinhaltige, aber weizenfreie Diät (Diät B) oder eine casein- und weizenfreie Diät (Diät C) (s. Protokoll Teilversuch 1, Material und Methoden Kap. 3.1.3). Als Referenz wurde eine handelsübliche Nagetierdiät (Diät D) herangezogen, die eine Mischung

unterschiedlicher Proteinquellen enthält (Weizen, Weizennachmehl, Weizenkleie, Soja, Gerste, Mais, Fischmehl, Molke und Lupine).

4.2.1 Kumulatives Diabetesrisiko der NOD-Mäuse in Teilversuch 1

Die Entwicklung von Autoimmundiabetes war bei der Gruppe, die mit der casein- und weizenfreien Diät C ernährt wurde, zeitlich verschoben (s. Abb. 8). Bei diesen Tieren konnte eine signifikante Verringerung der Diabeteshäufigkeit bis zu einem Lebensalter von 25 Wochen (38% Diabetes) im Gegensatz zu Tieren, die die casein- und weizenhaltige Diät A erhielten, beobachtet werden (75% Diabetes, $p=0,044$). Auch die Mäuse, die mit Diät D (Altromin) gefüttert wurden, zeigten im Vergleich zu Gruppe C eine erhöhte Diabetesinzidenz im Alter von 25 Lebenswochen (66%, $p=0,087$). Eine Fütterung mit der caseinhaltigen, aber weizenfreien Diät B führte nach 25 Lebenswochen mit 50% diabetischen Tieren zu einer mittleren Diabetesrate.

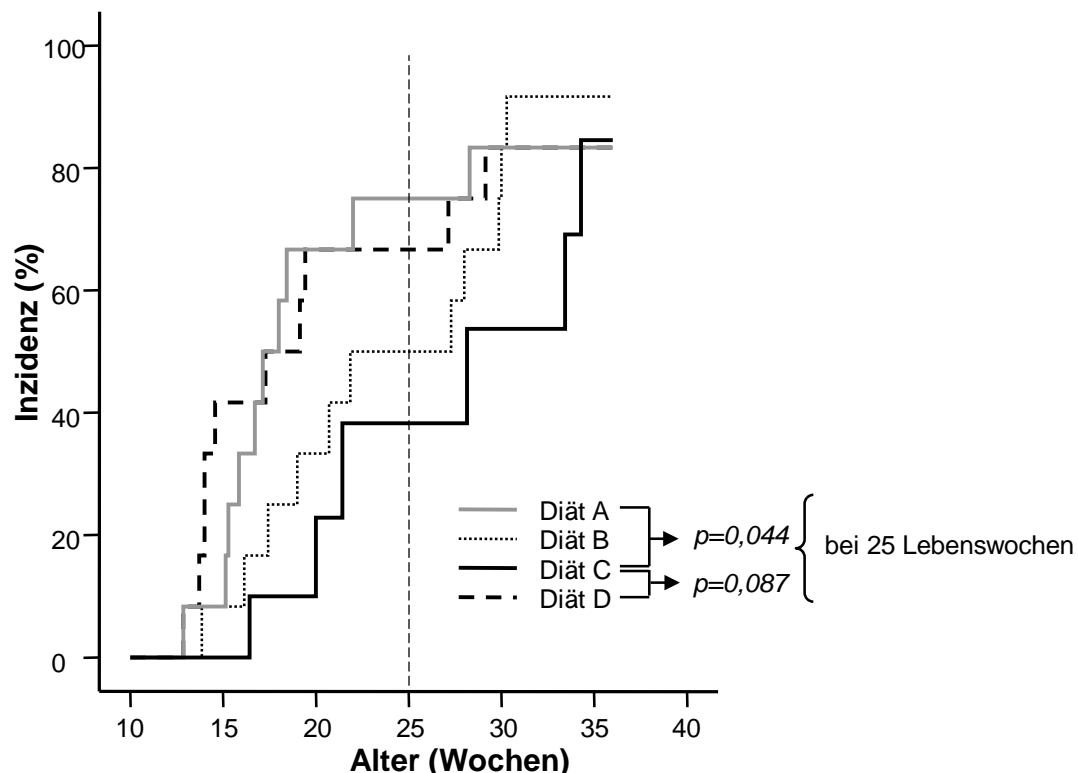


Abb. 8 Kumulatives Diabetesrisiko weiblicher NOD-Mäuse bei Fütterung mit casein und/oder weizenhaltigen Diäten. Dargestellt sind die Überlebensanalysen in Abhängigkeit von den verschiedenen Diäten, wobei Diät A Weizen und Casein beinhaltet, Diät B nur Casein, Diät C ist sowohl weizen- als auch caseinfrei und Diät D entspricht der Referenzdiät.

4.2.2 Insulinautoantikörper-Prävalenzen der NOD-Mäuse im Alter von zehn Lebenswochen in Teilversuch 1

Die NOD-Mäuse entwickelten in allen Versuchsgruppen zu mindestens 80% IAA (s. Abb. 9).

- Diät A → 92%
- Diät B → 83%
- Diät C → 80%
- Diät D → 83%

Die IAA-Titer lagen bei allen Gruppen für diejenigen Tiere leicht niedriger, die entweder keinen Autoimmundiabetes entwickelten oder dieser sich erst nach 25 Lebenswochen manifestierte. Ein Vergleich der IAA-Titer dieser Tiere mit den IAA-Titern derjenigen Mäuse, die vor 25 Lebenswochen Autoimmundiabetes entwickelten, zeigte weder innerhalb noch zwischen den einzelnen Gruppen signifikante Unterschiede.

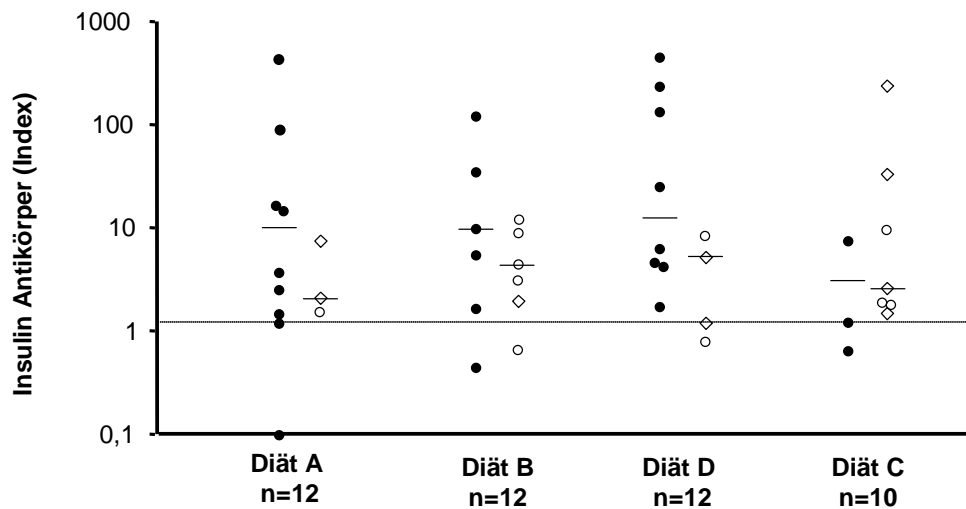


Abb. 9 Insulinautoantikörper-Titer weiblicher NOD-Mäuse bei Fütterung casein- und weizenhaltiger Diäten. Auf der x-Achse sind die einzelnen Versuchsgruppen aufgetragen. Auf der y-Achse sind die IAA-Indizes in einer logarithmischen Skalierung dargestellt. Ausgefüllte schwarze Kreise stehen für Tiere, die vor 25 Lebenswochen Autoimmundiabetes entwickelten, leere Rauten für Tiere, die nicht diabetisch waren und leere Kreise für die Tiere, bei denen sich nach 25 Lebenswochen Autoimmundiabetes manifestierte. Die gepunktete Linie entspricht dem Grenzwert für positive IAA-Titer.

4.2.3 Diabetesinzidenz der NOD-Mäuse vor und nach 25 Lebenswochen in Teilversuch 1

In Tabelle 15 ist dargestellt, wie sich das Verhältnis der Diabetesentwicklung zwischen den einzelnen Gruppen unterscheidet, differenziert nach nicht diabetischen Tieren und Tieren, die entweder vor oder nach 25 Lebenswochen Autoimmundiabetes entwickelten.

Tab. 15 Diabetesinzidenz innerhalb der Versuchsgruppen von Teilversuch 1 vor und nach 25 Lebenswochen

Diäten	Versuchs-tiere (n)	DM vor 25 LW (n[%])	DM nach 25 LW (n[%])	kein DM (n[%])
Diät A (Weizen & Casein)	12	9 [75]	1 [8]	2 [17]
Diät B (Casein)	12	6 [50]	5 [42]	1 [8]
Diät C (weizen- & caseinfrei)	10	3 [30]	3 [30]	4 [40]*
Diät D (Referenz))	12	8 [66]	2 [17]	2 [17]

* 3 dieser Mäuse verstarben vorzeitig aus unbekanntem Gründen

4.3 Teilversuch 2 – Weizen und Weizenbestandteile

In diesem Teilversuch wurde einerseits der Einfluss von Weizen in verschiedenen Konzentrationen auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes im NOD-Modell getestet, andererseits wurden sowohl die Albumin- und Globulinfraktion (über das Trinkwasser verabreicht) als auch das Gluten des Weizens auf ihr diabetogenes Potenzial untersucht.

4.3.1. Quantifizierung und Qualität der extrahierten Weizenfraktionen

Wie unter Material und Methoden 3.2.1 beschrieben wurden durch eine mehrstufige Extraktion aus handelsüblichem Weizenmehl Typ 550 die einzelnen Proteinfractionen des Weizens gewonnen, wobei die Fraktionen der Albumine und Globuline gemeinsam vorlagen, die Fraktionen Gliadine und Glutenine jedoch einzeln. Ausgehend davon, dass in Weizenmehl ca. 10% Protein enthalten sind und davon 15% der Albumin- bzw. 7% der Globulinfraktion zuzuordnen sind (Belitz et al. 2001), mussten 1200g Weizenmehl verarbeitet werden, um die benötigte

Menge an Albuminen und Globulinen, die mit dem Trinkwasser an die NOD-Mäuse verabreicht wurde, zu gewinnen.

Zur Verifizierung der Extraktionsmethode wurden die Hauptproteine des Weizenmehls fraktioniert und mittels Gelelektrophorese die Sauberkeit der Trennung überprüft (Material und Methoden 3.2.3).

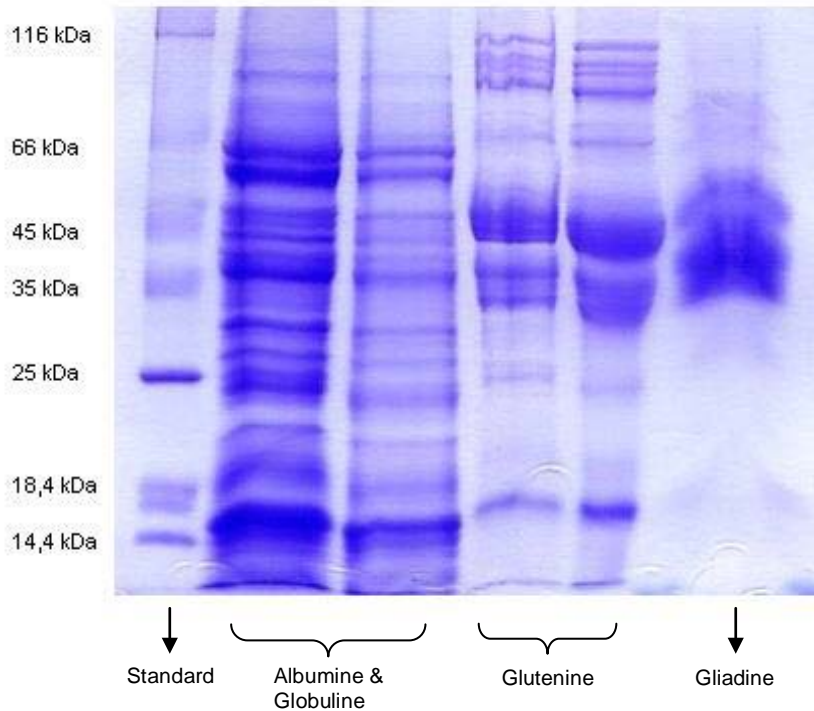


Abb. 10 Elektrophoretische Auftrennung der Weizenproteinfraktionen auf einem 12%igen Polyacrylamid Gel. Die einzelnen Proteinfraktionen sind den jeweiligen Banden zugeordnet und am linken Rand sind die Molekulargewichte in kDa angezeigt.

Außerdem wurde die Effizienz der Extraktion über eine quantitative Proteinbestimmung mit einem BCA Protein Assay Kit ermittelt (s. Tab. 16 und Material und Methoden 3.2.4) und eine ca. 50%ige Ausbeute der gewünschten Albumin- und Globulinfraktion für die Extraktionen zu Grunde gelegt.

Tab. 16 Analyse der Proteinkonzentration der extrahierten Weizenalbumin und – globulinfraktion in verschiedenen Verdünnungen in fünf unabhängigen Messreihen (A-E) und daraus resultierende Mittelwerte der Extraktionseffizienz.

Messung	Mittelwert ΔE	Konz. $\mu\text{g/ml}$	Ausbeute der Extraktion (%)	Mittelwert Ausbeute der Extraktion (%)
<i>A</i>				
Verd.1/5	200,5	8881,3	44,4	
Verd.1/10	119,5	11709,7	58,6	56,2
Verd.1/15	85,5	13115,4	65,6	

<i>B</i>				
Verd.1/5	161	6356,8	31,8	
Verd.1/10	106,5	9759,8	48,8	44,8
Verd.1/15	75,5	10751,6	53,8	

<i>C</i>				
Verd.1/5	194,5	8473,2	42,4	
Verd.1/10	118,5	11553,8	57,8	50,1
Verd.1/15	109,5	19688,3	98,4*	

<i>D</i>				
Verd.1/5	187,5	8008,2	40,0	
Verd.1/10	106	9688,1	48,4	45,2
Verd.1/15	69,5	9439,1	47,2	

<i>E</i>				
Verd.1/5	193	8372,6	41,9	
Verd.1/10	118,5	11553,8	57,8	50,0
Verd.1/15	72,5	10085,4	50,4	

* Wert in der Berechnung nicht berücksichtigt; E = Extinktion

4.3.2 Kumulatives Diabetesrisiko der NOD-Mäuse in Teilversuch 2

Die Mäuse wurden wie im Protokoll zum zweiten Teilversuch dargestellt (s. Material und Methoden Kap. 3.1.4) in die unterschiedlichen Gruppen eingeteilt und mit den entsprechenden Diäten ernährt.

Das Alter der Mäuse bei Diabetesmanifestation war abhängig von der Weizenkonzentration im Futter (s. Abb. 11). Weizenzulagen in Konzentrationen von 5% und 10% zu Diät C führten bei den Mäusen zu einem deutlich früheren Diabetesausbruch (79% und 54% Diabetes nach 25 Lebenswochen) als bei den Tieren, die die basale Diät C erhielten (s. Abb. 11). Diese hatten eine

Diabetesinzidenz von 29% im gleichen Alter und damit ein signifikant verzögertes Auftreten von Diabetes im Vergleich zu den Tieren, die mit der Diät C+ 5% Weizen gefüttert wurden ($p < 0,01$). Eine hohe Konzentration an Weizen (Diät C+ 30% Weizen) führte mit 38% erkrankten Tieren nach 25 Lebenswochen jedoch im Vergleich zu Mäusen der Versuchsgruppe mit Diät C nicht zu einem beschleunigten Diabetesausbruch. Ganz im Gegenteil führte der Zusatz von 30% Weizen zu einer wesentlich niedrigeren Gesamtdiabetesinzidenz verglichen mit NOD-Mäusen, die mit Diät C+ 5% Weizen versorgt wurden (62% nicht diabetische Tiere bei Diät C+ 30% Weizen und 21% nicht diabetische Tiere bei Diät C+5% Weizen, $p = 0,034$). Der Zusatz von isoliertem Weizengluten und der Weizenalbumin- und -globulinfraktion zu Diät C, angepasst an den Gehalt der Proteinfractionen bei 30% Weizen, führte bei diesen Tieren nicht zu einer gesteigerten Diabetesinzidenz (31% diabetische Tiere bei Verfütterung von Diät C+ Gluten sowie 29% diabetische Mäuse bei Verfütterung von Diät C+ Albumin- und Globulinfraktion jeweils in einem Alter von 25 Lebenswochen s. Abb. 11). Bemerkenswert ist der sehr einheitliche Verlauf der drei Überlebenskurven der Versuchsgruppen die mit 30% Gesamtweizen beziehungsweise den Zusätzen von isoliertem Weizengluten oder Weizenglobulinen und -albuminen, angepasst an den Gehalt der Proteinfractionen bei 30% Gesamtweizen, gefüttert wurden.

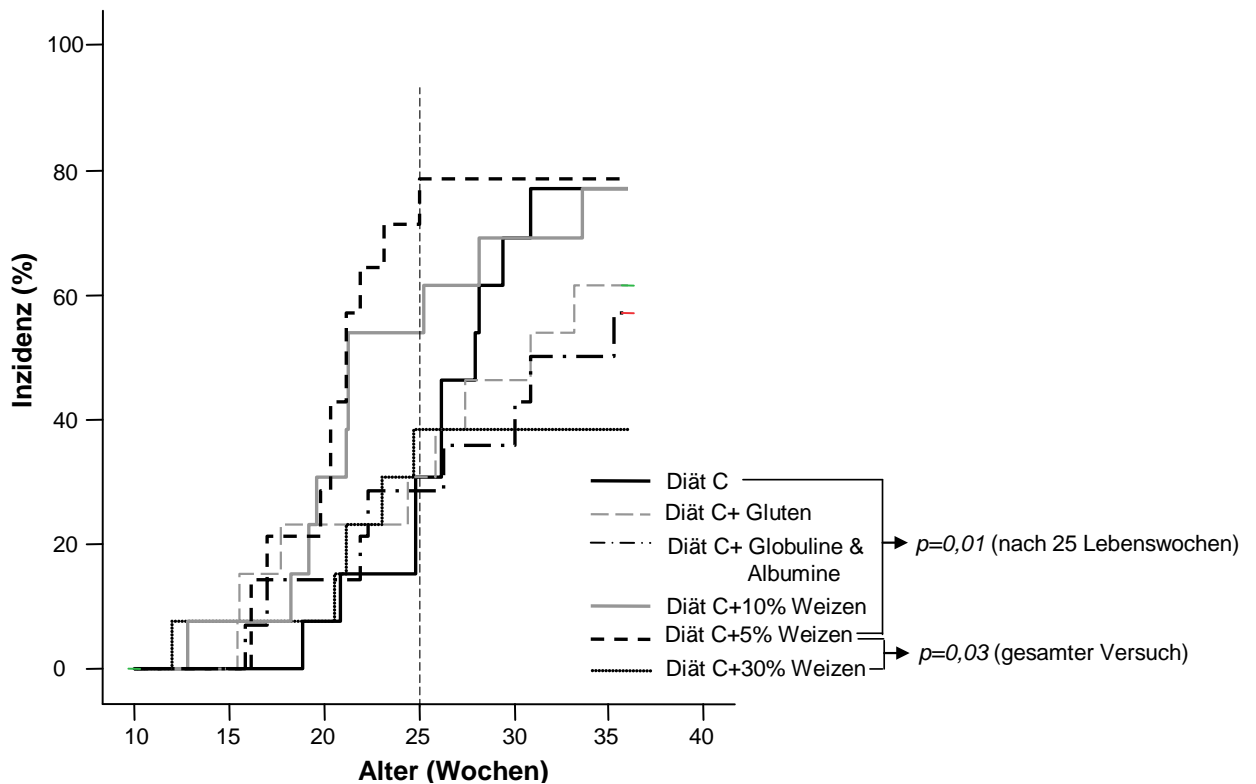


Abb. 11 Kumulatives Diabetesrisiko weiblicher NOD-Mäuse bei Fütterung von Diäten mit verschiedenen Weizenkonzentrationen und Weizenproteinfraktionen. Dargestellt sind die Überlebensanalysen in Abhängigkeit von den verschiedenen Diäten, wobei Diät C weizen- und caseinfrei ist und die weiteren Diäten zusätzlich die jeweils angezeigten Supplemente enthalten.

4.3.3 Insulinautoantikörper-Prävalenzen der NOD-Mäuse im Alter von zehn Lebenswochen in Teilversuch 2

Die NOD-Mäuse entwickelten in allen sechs Versuchsgruppen zu mindestens 71% IAA (s. Abb. 12):

- Diät C → 86% Tiere mit IAA
- Diät C+ Gluten → 92% Tiere mit IAA
- Diät C+ Albumin und Globulin → 71% Tiere mit IAA
- Diät C+ 5% Weizen → 86% Tiere mit IAA
- Diät C+ 10% Weizen → 77% Tiere mit IAA
- Diät C+ 30% Weizen → 92% Tiere mit IAA

Ebenso wie unter 4.2.1 beschrieben lagen die Mediane der IAA-Titer bei allen Gruppen (außer bei Gruppe Diät C+ 5% Weizen) für diejenigen Tiere niedriger, die entweder keinen Autoimmundiabetes entwickelten oder dieser sich erst nach

25 Lebenswochen manifestierte. Allerdings waren auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisbar.

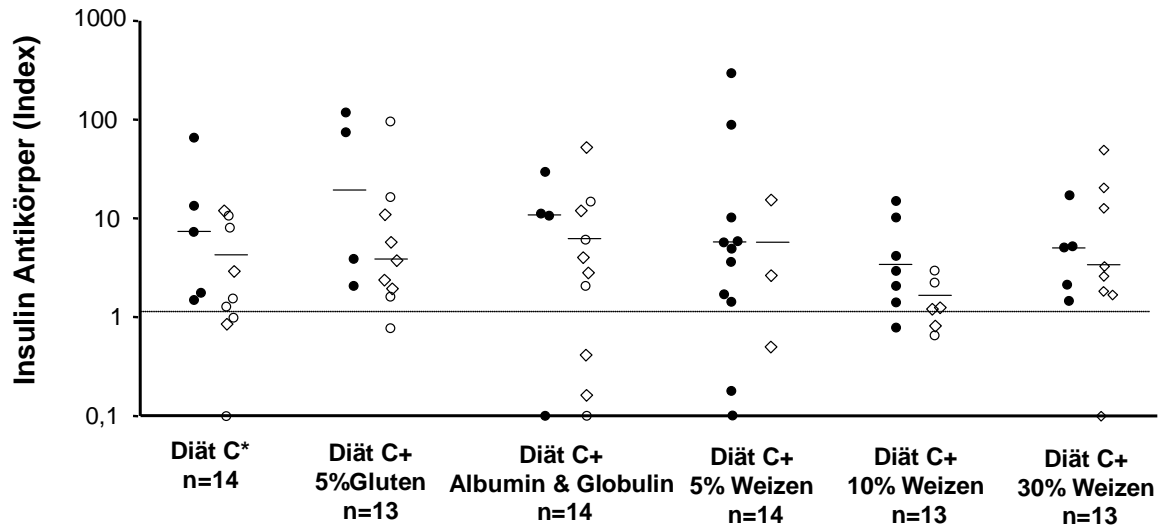


Abb. 12: Insulinautoantikörper-Titer weiblicher NOD-Mäuse bei Fütterung von Diäten mit verschiedenen Weizenkonzentrationen und Weizenproteinfraktionen. Auf der x-Achse sind die einzelnen Versuchsgruppen dargestellt. Auf der y-Achse sind die IAA-Indizes in einer logarithmischen Skalierung aufgetragen. Ausgefüllte schwarze Kreise stehen für Tiere, die vor 25 Lebenswochen Autoimmundiabetes entwickelten, leere Rauten für Tiere, die nicht diabetisch waren und leere Kreise für die Tiere, bei denen sich nach 25 Lebenswochen Autoimmundiabetes manifestierte. Die gepunktete Linie entspricht dem Grenzwert für positive IAA-Titer.

*Die Blutproben der Gruppe Diät C wurden sowohl in diesem Telexperiment als auch unter 4.4.1 zum Vergleich herangezogen

4.3.4 Diabetesinzidenz der NOD-Mäuse vor und nach 25 Lebenswochen in Teilversuch 2

In Tabelle 17 ist dargestellt, wie sich die Diabetesentwicklung zwischen den einzelnen Gruppen unterscheidet, differenziert nach nicht diabetischen Mäusen und Mäusen, die entweder vor oder nach 25 Lebenswochen Autoimmundiabetes entwickelten.

Tab. 17 Diabetesinzidenz innerhalb der Versuchsgruppen von Teilversuch 2 vor und nach 25 Lebenswochen.

Diäten	Versuchs-tiere (n)	DM vor 25 LW (n[%])	DM nach 25 LW (n[%])	kein DM (n[%])
Diät C+ Gluten	13	4 [31]	4 [31]	5 [38]
Diät C+ Albumin & Globulin	14	4 [29]	4 [29]	6 [42]
Diät C+ 5% Weizen	14	11 [79]	0	3 [21]
Diät C+ 10% Weizen	13	7 [54]	3 [23]	3 [23]
Diät C+ 30% Weizen	13	5 [38]	0	8 [62]
Diät C	14	4 [29]	6 [42]	4 [29]*

*eine Maus verstarb aus unbekanntem Gründen vorzeitig

4.4 Teilversuch 3 – Ergänzende Nahrungsbestandteile

Die weiblichen NOD-Mäuse wurden wie unter Material und Methoden 3.1.5 beschrieben gezüchtet, von den Muttertieren getrennt und in die entsprechenden Versuchsgruppen eingeteilt. Die unterschiedlichen Diäten wurden auf der Basis von Diät C hergestellt und Nahrungsbestandteile, die in der Säuglings- und Kleinkindernahrung eine Rolle spielen (Karotte, Kartoffel, Mais und Apfel) in Höhe von jeweils 5% zugesetzt. Eine Supplementierung der einzelnen Diäten mit den entsprechenden Nahrungsbestandteilen erfolgte in Höhe von 5%, da, wie für die 5%ige Weizenzulage gezeigt werden konnte, ein Zusatz dieser Konzentration ausreichend war, um eine Wirkung auf die Diabetesentwicklung auszuüben. Damit konnten in diesem Teilversuch mögliche Einflüsse von Nahrungsbestandteilen der frühkindlichen Ernährung auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes im NOD-Modell getestet werden.

4.4.1 Kumulatives Diabetesrisiko der NOD-Mäuse in Teilversuch 3

Verglichen mit der zusatzfreien Basisdiät C führten bei den NOD-Mäusen alle anderen Diäten mit den zugesetzten Nahrungsbestandteilen zu einer moderaten Steigerung der Diabetesinzidenz in den ersten 25 Lebenswochen (s. Abb. 13). Besonders die Tiere, die mit der Diät C+ 5% Mais gefüttert wurden, zeigten einen signifikant beschleunigten Ausbruch des Autoimmundiabetes mit 50% diabetischen Mäusen vor 18 Lebenswochen im Vergleich zu Tieren, die mit

der basalen Diät C ernährt wurden (keine Diabetesmanifestation bei den Mäusen der Gruppe Diät C im gleichen Alter, $p=0,002$). Im Alter von 25 Lebenswochen konnten zwischen den Tieren der verschiedenen Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Diabetesinzidenz detektiert werden (s. Abb. 13).

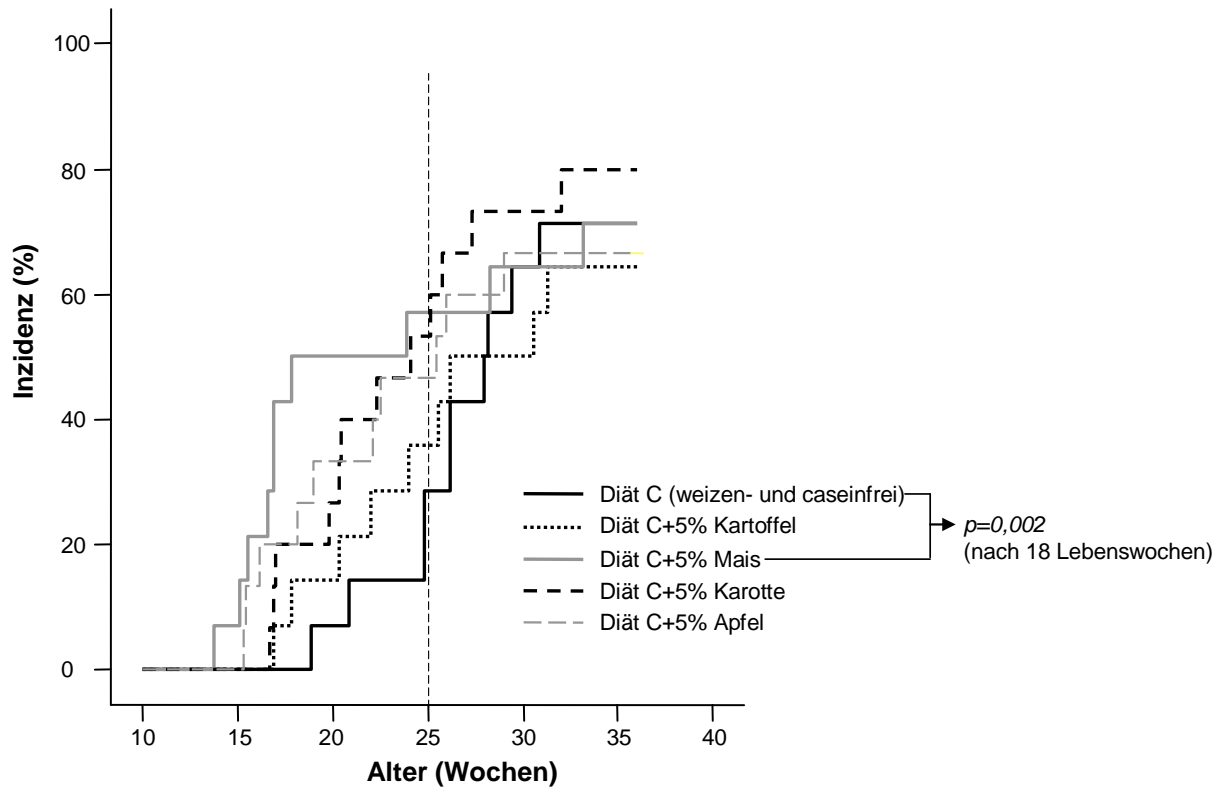


Abb. 13 Kumulatives Diabetesrisiko weiblicher NOD-Mäuse bei Fütterung von Diäten mit verschiedenen Nahrungsbestandteilen. Dargestellt sind die Überlebensanalysen in Abhängigkeit von den verschiedenen Diäten, wobei Diät C weizen- und caseinfrei ist, während bei den übrigen Diäten die basale Diät C mit 5% der jeweiligen Komponente supplementiert wurde.

4.4.2 Insulinautoantikörper-Prävalenzen der NOD-Mäuse im Teilversuch 3 im Alter von zehn Lebenswochen

Die NOD-Mäuse entwickelten in allen fünf Versuchsgruppen zu mindestens 79% IAA (s. Abb. 14).

- Diät C → 86% Tiere mit IAA
- Diät C+ 5% Kartoffel → 79% Tiere mit IAA
- Diät C+ 5% Mais → 79% Tiere mit IAA
- Diät C+ 5% Apfel → 93% Tiere mit IAA
- Diät C+ 5% Karotte → 93% Tiere mit IAA

Bei der Gruppe, die mit der Karottenkomponente gefüttert wurde, konnte bei einer Maus kein Blut entnommen werden, daher n=14. Ähnlich wie unter 4.2.1 und 4.3.2 beschrieben, lagen die durchschnittlichen IAA-Titer bei allen Gruppen (außer bei Gruppe Diät C+ 5% Kartoffel) für diejenigen Tiere etwas niedriger, die entweder keinen Autoimmundiabetes entwickelten oder sich dieser erst nach 25 Lebenswochen manifestierte. Signifikante Unterschiede zwischen den IAA-Titern der einzelnen Gruppen lagen nicht vor.

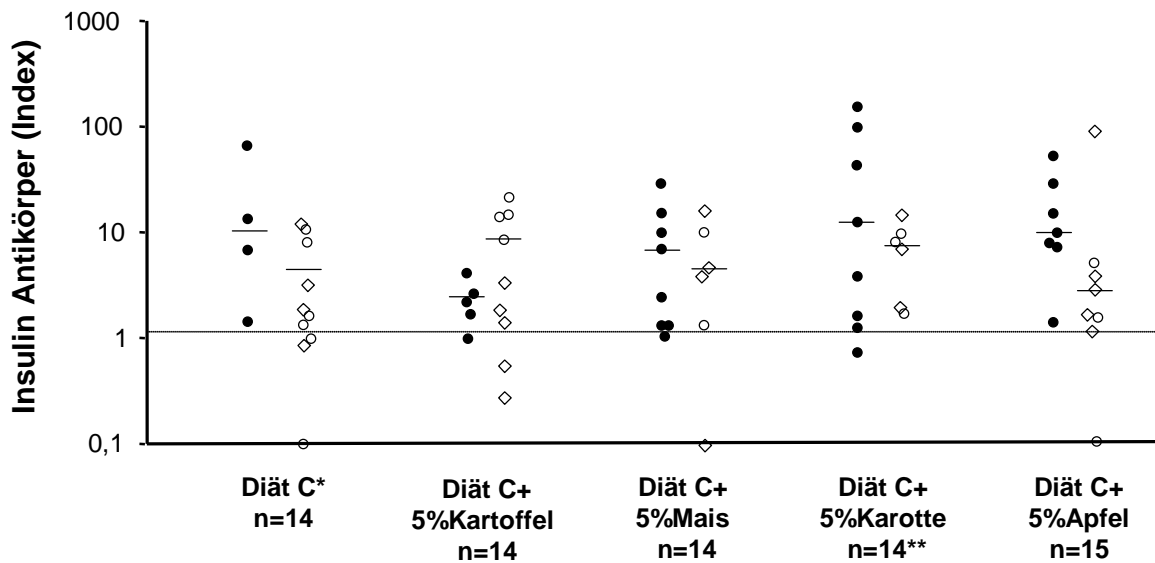


Abb. 14 Insulinautoantikörper-Titer weiblicher NOD-Mäuse bei Fütterung von Diät C mit Zusatz von verschiedenen Nahrungsbestandteilen. Auf der x-Achse sind die einzelnen Versuchsgruppen dargestellt. Auf der y-Achse sind die IAA-Indizes in einer logarithmischen Skalierung aufgetragen. Ausgefüllte schwarze Kreise stehen für Tiere, die vor 25 Lebenswochen Autoimmundiabetes entwickelten, leere Rauten für Tiere, die nicht diabetisch waren und leere Kreise für die Tiere, bei denen sich nach 25 Lebenswochen Autoimmundiabetes manifestierte. Die gepunktete Linie entspricht dem Grenzwert für positive IAA-Titer.

*Die Blutproben der Gruppe Diät C wurden sowohl in diesem Telexperiment als auch unter 4.3.2 zum Vergleich herangezogen

**Von einem der Tiere lag keine Blutprobe vor

4.4.3 Diabetesinzidenz der NOD-Mäuse in Teilversuch 3 vor und nach 25 Lebenswochen

In Tabelle 18 ist dargestellt, wie sich das Verhältnis der Diabetesentwicklung zwischen den einzelnen Gruppen unterscheidet. Differenziert wurde nach Tieren, die nicht diabetischen wurden und nach Tieren, die entweder vor oder nach 25 Lebenswochen Autoimmundiabetes entwickelten.

Tab. 18 Diabetesinzidenz innerhalb der Versuchsgruppen von Teilversuch 3 vor und nach 25 Lebenswochen.

Diäten	Versuchs-tiere (n)	DM vor 25 LW (n[%])	DM nach 25 LW (n[%])	kein DM (n[%])
Diät C	14	4 [29]	6 [42]	4 [29]
Diät C+ 5% Kartoffel	14	5 [36]	4 [28]	5 [36]
Diät C+ 5% Mais	14	8 [57]	2 [14]	4 [29]
Diät C+ 5% Karotte	15	8 [53]	4 [27]	3 [20]
Diät C+ 5% Apfel	15	7 [47]	3 [20]	5 [33]

4.5 Diabetesentwicklung bei Fütterung aller Diäten im Vergleich

In der folgenden Abbildung 15 sind die Effekte der verschiedenen Diäten, bezogen auf die Diabetesinzidenz im Alter von 25 Lebenswochen und auf das Alter, bei dem 50% der Mäuse diabetisch waren, zusammenfassend dargestellt. Die Manifestation von Autoimmundiabetes wurde durch Diät A (Casein und Weizen), Diät D und Diät C +5% Weizen deutlich beschleunigt. Überraschenderweise war der Einfluss von Weizen invers dosisabhängig: bei geringen Dosen wie 10% und 5% wurde ein beschleunigter Ausbruch von Autoimmundiabetes deutlich, während hohe Dosen von 30% sogar tendenziell protektiv wirkten. Die Supplementierung von Weizenalbuminen und -globulinen sowie reinem Weizengluten (jeweils angepasst an 30% Weizen) beeinflusste die Entwicklung von Diabetes im NOD-Modell nicht negativ.

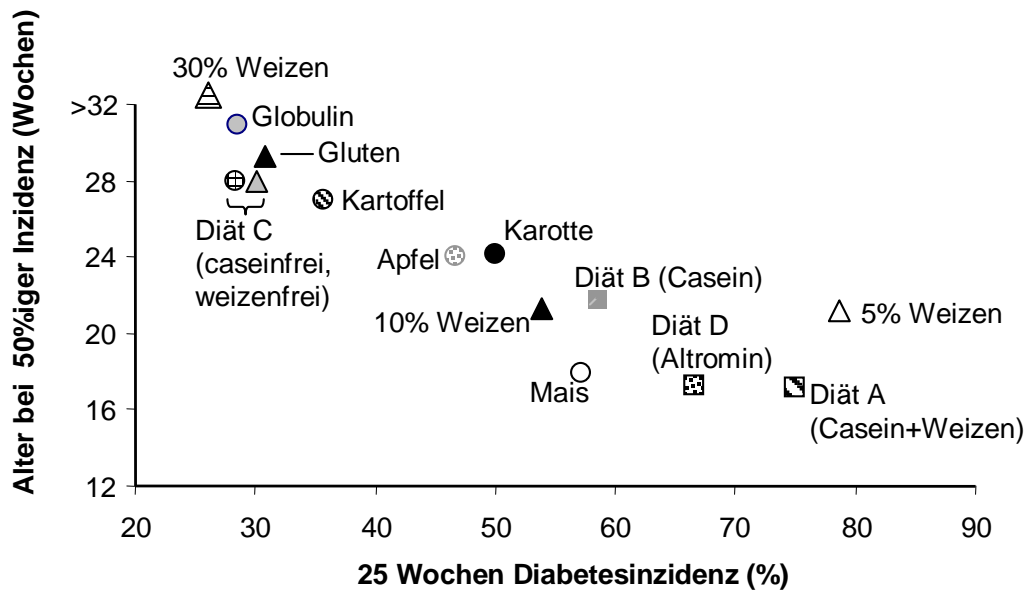


Abb. 15 Diabetesentwicklung weiblicher NOD-Mäuse bei Fütterung der verschiedenen Diäten. Dargestellt ist auf der x-Achse der prozentuale Anteil der diabetischen Tiere im Alter von 25 Lebenswochen. Auf der y-Achse ist das Alter angegeben, bei dem 50% der Tiere einer Untersuchungsgruppe diabetisch waren. Potenziell diabetogen sind die Diäten A und D sowie 5% Weizenzusatz, während 30% Weizenzusatz, Globulin- sowie Glutenzusatz und die reine Diät C eher protektiv wirkten.

4.6 Diabetesentwicklung männlicher NOD-Mäuse im Teilversuch 1a

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 33 männliche NOD-Mäuse zusätzlich zu den weiblichen Tieren in drei Versuchsgruppen eingeschlossen, um eine mögliche Wirkung von Modifikationen in der Ernährung auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes auch an den männlichen NOD-Mäusen zu testen. Die Männchen dieses Stammes entwickeln im Laufe ihres Lebens nur zu ca. 20% Autoimmundiabetes (Makino 1980).

4.6.1 Kumulatives Diabetesrisiko der männlichen NOD-Mäuse in Teilversuch 1a

Hier wurden drei Versuchsgruppen gebildet und wie beschrieben mit unterschiedlichen Diäten ernährt (Material und Methoden 3.1.3). Die NOD-Mäuse, die mit der weizenfreien, aber caseinhaltigen Diät B versorgt wurden, entwickelten

bis zur 36. Lebenswoche 27,3% Diabetes, die Gruppe, die mit Diät A (Weizen und Casein) ernährt wurden hatten eine Diabetesinzidenz von 20% und in der Gruppe, die die Diät D (Referenzdiät) erhielt, waren 8,3% diabetische Tiere (s. Abb. 16). Die Diabetesinzidenz der männlichen NOD-Mäuse unterschied sich zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant.

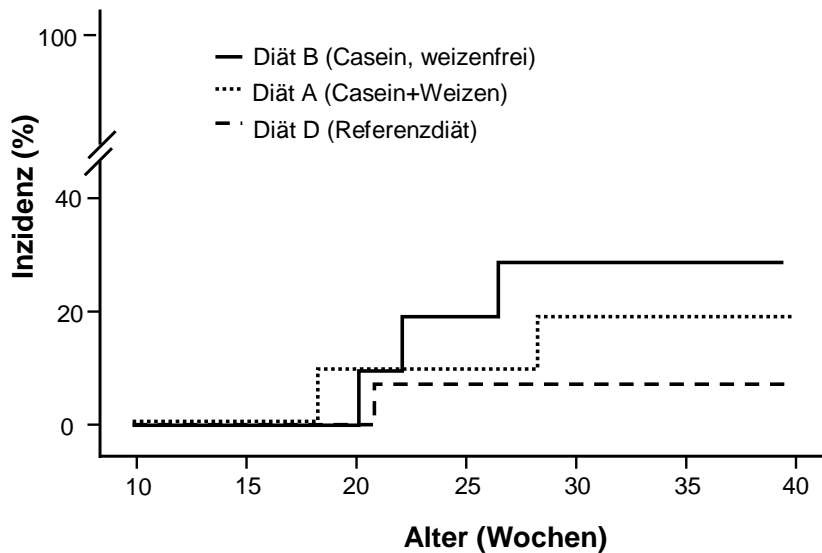


Abb. 16 Kumulative Diabetesinzidenz männlicher NOD-Mäuse bei Fütterung casein- und weizenhaltiger Diäten. Dargestellt sind die Überlebensanalysen in Abhängigkeit von den in der Abbildung beschriebenen Diäten.

4.6.2 Diabetesinzidenz der männlichen NOD-Mäuse in Teilversuch 1a vor und nach 25 Lebenswochen

In Tabelle 19 ist dargestellt, wie sich die Diabetesentwicklung der männlichen NOD-Mäuse zwischen den einzelnen Gruppen unterscheidet, differenziert nach nicht diabetischen Mäusen und Mäusen, die entweder vor oder nach 25 Lebenswochen Autoimmundiabetes entwickelten.

Tab. 19 Diabetesinzidenz innerhalb der Versuchsgruppen von Teilversuch 1a vor und nach 25 Lebenswochen

Diäten	Versuchs-tiere (n)	DM vor 25 LW (n[%])	DM nach 25 LW (n[%])	kein DM (n[%])
Diät B (Casein+weizenfrei)	11	2 [18]	1 [9]	8 [73]
Diät A (Casein+Weizen)	10	1 [10]	1 [10]	8 [80]
Diät D (Altromin Standard)	12	1 [8]	n.d.*	11 [92]

*keine diabetischen Mäuse nach 25 Lebenswochen

4.7. Reaktivität von humanen Insulinautoantikörpern mit Hühnerinsulin und IgA-Isotypenmessung

Um zu untersuchen, ob sich eine IAA-Reaktion im frühen Stadium der Diabetesentwicklung nicht initial gegen körpereigenes Insulin richtet, sondern möglicherweise gegen exogene Proteine aus der Nahrung, wurden die Bindungseigenschaften der IAA ausgewählter Probanden getestet. Im Testansatz wurde sowohl das Bindungsverhalten gegenüber humanem Insulin als auch gegenüber Hühnerinsulin analysiert. Um zusätzlich Anhaltspunkte bezüglich der Initiierung der gegen Insulin gerichteten Immunreaktionen an Schleimhäuten zu erhalten, wurden für die IgA-Isotypen spezifische IAA-Messungen etabliert und durchgeführt.

4.7.1 Bindungseigenschaften von humanen Insulinautoantikörpern mit Hühnerinsulin

Hühnerinsulin wurde für diese Untersuchungen herangezogen, weil es einerseits an einer möglicherweise kritischen Stelle für die Antikörperbindung in der A-Kette deutliche Unterschiede zu humanem Insulin aufweist (s. Abb. 17) und weil zusätzlich unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen konnten, dass einige IAA eine starke Bindung an Hühnerinsulin aufwiesen.

	A-Kette	B-Kette
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
humanes Insulin	G I V E Q C C T S I C S L Y Q L E N Y C N	F V N Q H L C G S H L V E A L Y L V C G E R G F F Y T P K T
Hühnerinsulin	- - - - - H N T - - - - -	A A - - - - - S - - - - - A

Abb. 17 Aminosäuresequenzen von humanem und Hühnerinsulin. Die Aminosäuresequenzen von humanem und Hühnerinsulin unterscheiden sich an sieben Positionen.

Die Bindungseigenschaften der getesteten IAA mit Hühnerinsulin im Vergleich zu humanem Insulin unterschieden sich innerhalb der untersuchten IAA-positiven Seren. In einigen Proben konnte die IAA-Bindung an radioaktiv markiertes humanes [125 I] Insulin durch wesentlich geringere Mengen von unmarkiertem humanem Insulin kompetitiv ersetzt bzw. inhibiert werden, als von Hühnerinsulin, was auf eine geringe Kreuzreaktivität dieser IAA mit dem Hühnerinsulin schließen lässt (s. Abb. 18). In anderen Proben konnte die Bindung von IAA an radioaktiv markiertes humanes [125 I] Insulin durch wesentlich geringere Mengen von Hühnerinsulin inhibiert werden, als von unmarkiertem humanem Insulin, wodurch gezeigt wurde, dass hier Hühnerinsulin der bevorzugte Ligand war (s. Abb. 19).

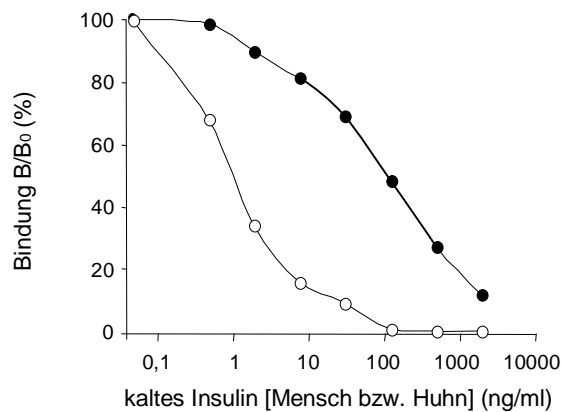


Abb. 18 Kompetitionskurven von hoch affinen Insulinautoantikörpern mit humanem bzw. Hühnerinsulin. Dargestellt sind IAA mit hoher Affinität, die vorzugsweise an humanes Insulin binden (leere Kreise) und weniger stark eine Bindung mit Hühnerinsulin eingehen (gefüllte Kreise; die Inhibition durch Hühnerinsulin ist als Rechtsverschiebung zu sehen).

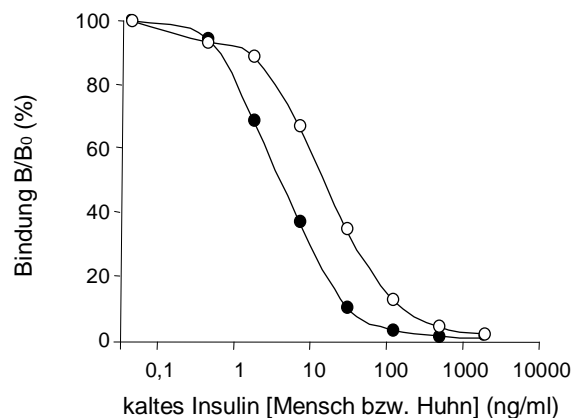


Abb. 19 Kompetitionskurven von Insulinautoantikörpern mit humanem bzw. Hühnerinsulin. Dargestellt sind IAA, die vorzugsweise an Hühnerinsulin binden (gefüllte Kreise) und weniger stark eine Bindung mit humanem Insulin eingehen (leere Kreise; die Inhibition durch Hühnerinsulin ist als Linksverschiebung zu sehen).

Insgesamt wurden Serumproben von 24 ausgewählten IAA-positiven Kindern auf ihre Reaktivität mit Hühnerinsulin hin untersucht. Die Inhibition von radioaktiv markiertem humanem [¹²⁵I] Insulin mit humanem bzw. Hühnerinsulin ist als IC₅₀ dargestellt (= 50%ige Inhibitionskapazität: Konzentration des kompetitiven Liganden, um eine 50%ige Inhibierung der Bindung zu erreichen, Abb. 20). Die relative Bindung von Hühnerinsulin verglichen mit humanem Insulin variierte 1750-fach innerhalb der untersuchten Proben. IAA von 12 Proben banden bevorzugt an humanes Insulin und brauchten 3- bis 70-fach weniger humanes Insulin als Hühnerinsulin, um eine 50%ige Inhibition der Bindung an radioaktiv markiertes humanes [¹²⁵I] Insulin zu erreichen (Median IC₅₀_{human}/IC₅₀_{Huhn} = 0,07; Spannweite von 0,014 bis 0,33; offene Kreise in Abb. 20). IAA von vier der 24 untersuchten Seren banden humanes und Hühnerinsulin gleich gut (gefüllte Quadrate in Abb. 20). Allerdings banden IAA von acht Seren bevorzugt an Hühnerinsulin und brauchten 4- bis 25-fach mehr humanes Insulin als Hühnerinsulin, um eine 50%ige Inhibition der Bindung an radioaktiv markiertes humanes [¹²⁵I] Insulin zu erreichen (Median IC₅₀_{human}/IC₅₀_{Huhn} = 11, Spannweite von 4 bis 25; gefüllte Kreise in Abb. 20). Die relative Inhibition durch humanes Insulin bezogen auf die Inhibition mit Hühnerinsulin wurde als Verhältnis von IC₅₀_{human}/IC₅₀_{Huhn} ausgedrückt (Abb. 21). Ein Verhältnis <1 zeigt eine bevorzugte Bindung der IAA an humanes Insulin, ein Verhältnis >1 eine bevorzugte Reaktion mit Hühnerinsulin.

Das Verhältnis von IC₅₀_{human}/IC₅₀_{Huhn} korrelierte mit der IAA-Affinität. Alle Proben mit einer hohen IAA Affinität (>10⁹L/mol) banden bevorzugt an humanes Insulin, während alle außer einer Probe mit einer geringeren IAA-Affinität (<10⁹L/mol) bevorzugt an Hühnerinsulin banden (r= -0,68 und p< 0,001; s. Abb. 21).

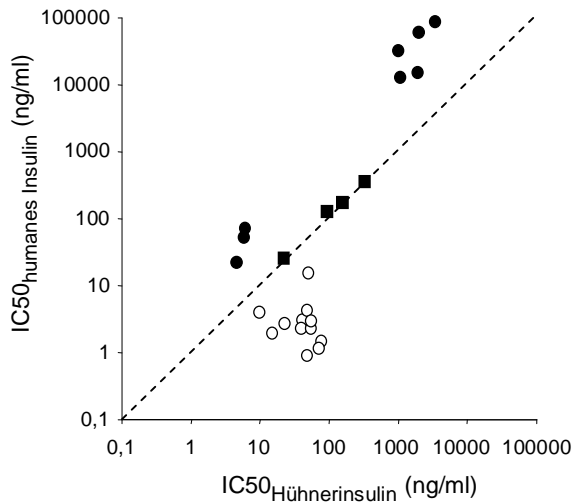


Abb. 20 Relative Reaktivität von Insulin-autoantikörpern mit humanem (y-Achse) und Hühnerinsulin (x-Achse). Die Kapazität, das humane [125 I] Insulin kompetitiv zu hemmen ist als IC₅₀ dargestellt.

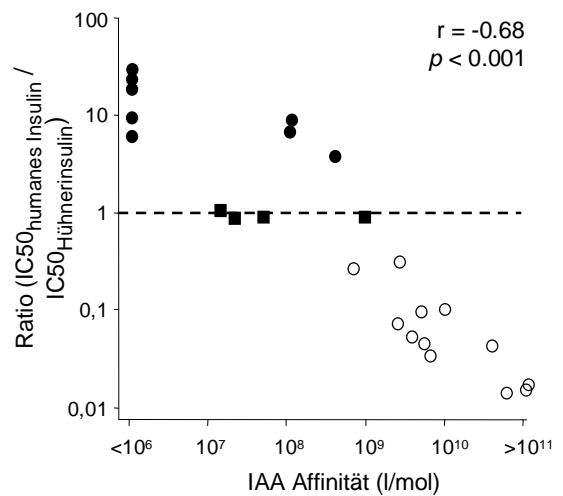


Abb. 21 Negative Korrelation zwischen relativer Insulinautoantikörperbindung an humanes bzw. Hühnerinsulin und der Affinität zu markiertem humanem [125 I] Insulin. Dargestellt ist das Verhältnis von IC₅₀_{human} / IC₅₀_{Huhn} in Korrelation zur IAA-Affinität ($r = -0,68$ und $p < 0,001$).

4.7.2 Identifizierung von Insulinautoantikörpern des IgA-Isotyps

In den zehn untersuchten Serumproben von gesunden Kontrollpersonen konnten keine IgA-IAA detektiert werden, die an markiertes humanes [125 I] Insulin banden (s. Abb. 22).

Bei diesen Kontrollseren lag die Hintergrundstrahlung in cpm für die IgA-IAA bei 31 cpm (Spannweite von 20 bis 36 cpm). Im Folgenden wurden 44 Serumproben auf eine IgA-IAA Komponente hin untersucht, die eventuell eine Bindung an Hühnerinsulin zeigen könnte und so die Hypothese einer mukosalen Erstimmunisierung stützen würde. Eine IgA-Bindung an radioaktiv markiertes humanes [125 I] Insulin oberhalb dieser Hintergrundstrahlung konnte für 5 der 24 IAA-positiven Kinder gezeigt werden, bei denen auch die Reaktivität mit Hühnerinsulin bestimmt wurde. Eine starke IgA-Bindung an markiertes humanes [125 I] Insulin wurde bei 4 von 8 Kindern gefunden, deren IAA bevorzugt an Hühnerinsulin banden. Bei zwei Kindern band die IgA-Komponente sogar mehr

markiertes humanes [125 I] Insulin als die IgG-Komponente (IgG-IAA 198 cpm vs. IgA-IAA 507 cpm und IgG-IAA 182 cpm vs. IgA-IAA 481 cpm; s. Abb. 22). Ein einzelnes Kind hatte IAA, deren IgG und IgA Komponente ähnlich gut mit markiertem humanem [125 I] Insulin reagierten (191 cpm IgG-IAA und 95 cpm IgA-IAA). Alle drei dieser letztgenannten Kinder wiesen IAA mit einer sehr geringen Affinität zu humanem [125 I] Insulin auf ($<10^6$ L/mol). Ein viertes Kind dieser Gruppe mit niedrig affinen IAA und eines der vier Kinder, deren IAA gleich gut mit humanem und mit Hühnerinsulin banden (s. Abb. 20 und 21), hatten schwach bindende IgA-IAA zusammen mit sehr stark bindenden IgG-IAA. Keine der 12 Serumproben mit hoch affinen IAA und geringer Reaktivität mit Hühnerinsulin zeigte IgA-IAA.

Um herauszuarbeiten, ob IgA-IAA ein Charakteristikum der frühen immunologischen Reaktionen gegen Insulin sind, wurden die ersten IAA-positiven Serumproben von 20 weiteren Kindern auf IgA-IAA hin getestet. Eines dieser Kinder hatte IgA-IAA: ein neun Monate altes Mädchen, das außerdem auch GAD und IA-2 Antikörper hatte und im Alter von 2,8 Jahren Typ 1 Diabetes entwickelte. Diese Serumprobe hat sowohl hoch ($4,8 \times 10^9$ L/mol) als auch niedrig affine IAA ($1,2 \times 10^6$ L/mol). Die niedrig affine IAA-Komponente dieser Probe band bevorzugt an Hühnerinsulin ($IC_{50_{human}}/IC_{50_{Huhn}} = 1,6$) und beinhaltete IgA-IAA, während die hoch affine IAA-Komponente kaum mit Hühnerinsulin reagierte ($IC_{50_{human}}/IC_{50_{Huhn}} = 0,06$) und keinerlei IgA-IAA aufwies. Follow-up Proben zeigten eine schrittweise Verringerung der niedrig affinen und ein Ansteigen der hoch affinen IAA-Komponente sowie sinkende IgA-IAA und steigende IgG-IAA Titer.

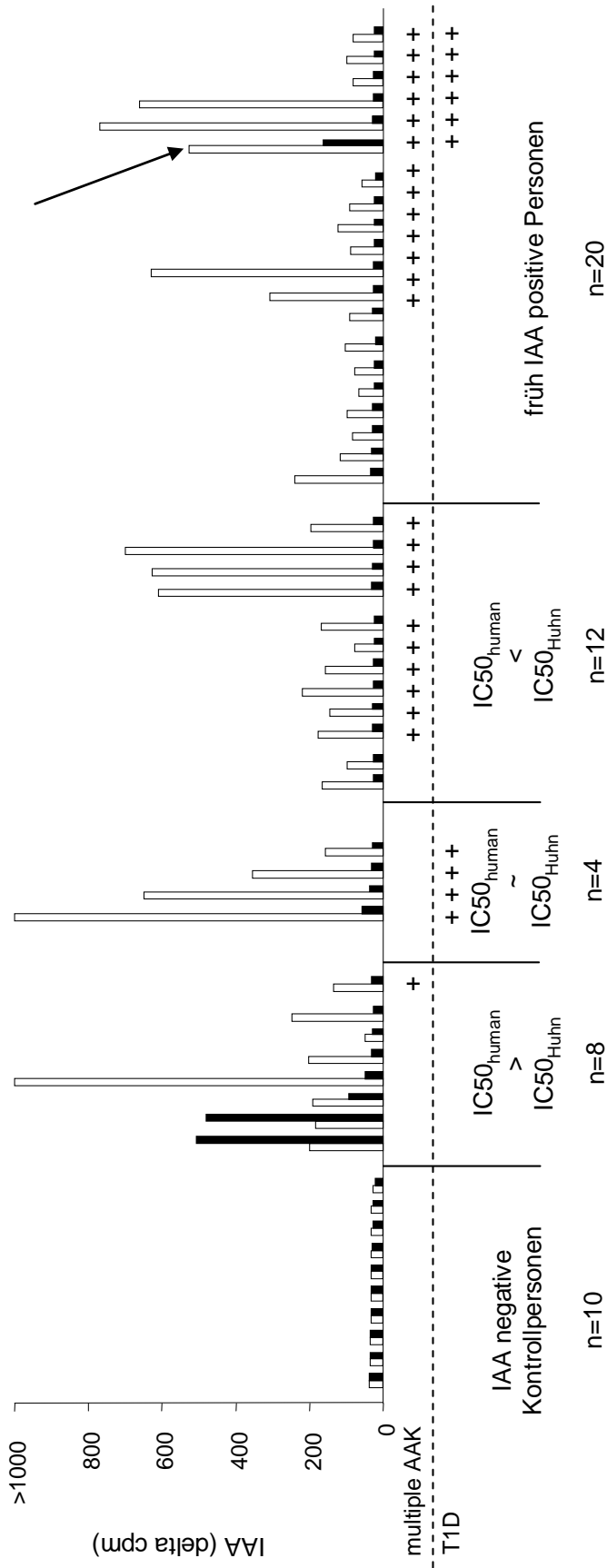


Abb. 22 Gesamt IgG-IAA und IgA-IAA für jede Probe. Die Proben sind gruppiert nach IAA-negativen Kontrollpersonen (n=10), Proben von IAA-positiven Kindern, die bevorzugt an Hühnerinsulin banden, Kinder, deren IAA humanes und Hühnerinsulin gleich gut banden, Kinder, die IAA aufwiesen, die besonders mit humanem Insulin reagierten sowie die ersten IAA-positiven Proben von 20 Kindern, die vor einem Lebensalter von 2 Jahren IAA entwickelten. Die IgG-IAA werden mit leeren Balken dargestellt, die IgA-IAA sind durch gefüllte Balken dargestellt und werden als cpm ausgedrückt. Die mit einem Pfeil markierte Probe ist die eines Kindes mit niedrig affinen IgA-IAA und gleichzeitig hoch affinen IgG-IAA, sowie multiplen Autoantikörpern, welches Typ 1 Diabetes entwickelte.

4.8 IAA-Bindungseigenschaften und Reaktivität mit Lebensmittelproteinen in humanen Seren

Die vorangegangenen Versuche zu den Bindungseigenschaften von IgA- und IgG-IAA mit Hühnerinsulin und humanem Insulin konnten zeigen, dass einerseits IAA nachweisbar sind, die nicht nur gegen Insulin gerichtet sind und dass andererseits IgA-IAA-Isotypen vorhanden sind, die für die Hypothese einer gegen Insulin gerichtete Immunreaktion an Schleimhäuten sprechen. Nachdem außerdem die Ergebnisse der Fütterungsversuche im NOD-Modell darauf hinwiesen, dass neben Weizenproteinen auch das Kuhmilchprotein Casein als potenziell diabetogener Nahrungsbestandteil eine Rolle spielen könnte, wurden Proteinlösungen aus einigen Säuglingsnahrungen, die Kuhmilchbestandteile enthalten, sowie aus Milch und Milchkomponenten und aus Weizen und Geflügelfleischmehl hergestellt. Ausgewählte Seren von IAA-positiven Probanden wurden auf ihre Bindungseigenschaften mit diesen Lebensmittelproteinen hin untersucht, um die mögliche Relevanz dieser Proteine als Zielantigene für Antikörper, die ebenfalls an Insulin binden, zu analysieren.

4.8.1 Proteinlösungen der ausgewählten Lebensmittel

Als repräsentative Proben der Säuglingsernährung wurden verschiedene Formulanahrungen und Spezialnahrungen der Milupa GmbH verwendet:

- Milumil Folgemilch (im Folgenden als Milumil bezeichnet) enthält Magermilchpulver, Milchzucker, pflanzliche Öle, Stärke, Glucosesirup und Ballaststoffe
- Milupa Pregomin (im Folgenden als PRE bezeichnet) enthält Maltodextrin, pflanzliche Öle, Maisstärke, extensiv hydrolysiertes Sojaweiß und Schweinekollagen
- Milumil hypoallergene Folgemilch (im Folgenden als HA bezeichnet) enthält hydrolysiertes Molkenprotein, pflanzliche Öle, Stärke, Glucosesirup und Ballaststoffe
- Milupa Spezialnahrung SOM (im Folgenden als SOM bezeichnet) enthält Glucosesirup, pflanzliche Öle, Dextrose und Sojaproteinisolat

Außerdem wurden als weitere Lebensmittelbestandteile ausgewählt:

- Magermilchpulver (in den Abbildungen als Milch bezeichnet)
- α - und β -Casein
- Vollcasein (in den Abbildungen als Casein bezeichnet)
- bovines Serumalbumin (in den Abbildungen als BSA bezeichnet)
- Lactoglobulin
- Weizenmehl Type 550 (in den Abbildungen als Weizen bezeichnet)
- Geflügelfleischmehl (in den Abbildungen als Geflügel bezeichnet)

Aus den Formulanahrungen und Lebensmittelbestandteilen wurden Proteinextrakte bzw. aus den Reinstoffen Lösungen jeweils in TBT-Puffer hergestellt und die Proteingehalte der Lösungen mit einem BCA Protein Assay Kit bestimmt (s. Material und Methoden 3.2.2 und 3.2.4).

Tab. 20 Analyse der Proteinkonzentration der extrahierten Lebensmittellösungen in verschiedenen Verdünnungen und daraus resultierende Mittelwerte.

Messung	Mittelwert ΔE	Konzentration $\mu\text{g/ml}$	Mittelwert Konzentration $\mu\text{g/ml}$
<i>Magermilchpulver</i>			
Unverd.	243,5	337,03	338
Verd.1/2	131	339,05	

¹ PRE			
Unverd.	101	128,66	137,5
Verd.1/2	59	147,22	

² HA			
Unverd.	109,5	140,10	143
Verd.1/2	58,5	145,94	

³ SOM			
Unverd.	135	175,08	185
Verd.1/2	77,5	195,13	

⁴ Milumil			
Unverd.	162,5	213,98	215,5
Verd.1/2	86,5	218,77	

Fortsetzung Tab. 20 Analyse der Proteinkonzentration der extrahierten Lebensmittellösungen in verschiedenen Verdünnungen und daraus resultierende Mittelwerte.

Messung	Mittelwert ΔE	Konzentration $\mu\text{g/ml}$	Mittelwert Konzentration $\mu\text{g/ml}$
<i>Weizen</i>			
Unverd.	247	342,68	352
Verd.1/2	139,5	362,72	
<i>α-Casein</i>			
Verd.1/5	467,5	4009,04	4271
Verd.1/10	293,5	4208,89	
Verd.1/20	173,5	4598,31	
<i>β-Casein</i>			
Verd.1/5	430	3505,95	3913
Verd.1/10	284	4043,97	
Verd.1/20	159,5	4193,52	
<i>Casein</i>			
Unverd.	102,5	130,67	132
Verd.1/2	54,5	135,70	
<i>Lactoglobulin</i>			
Verd.1/2	400	1260,91	1243
Verd.1/5	184	1226,67	
<i>Geflügelfleischmehl</i>			
Unverd.	73,5	38725,40	25485
Verd.1/10	1129,5	50776,89*	
Verd.1/30	92	14543,41	
Verd.1/50	88	23187,00	
<i>BSA</i>			
Verd.1/2	397	1247,49	1240
Verd.1/5	185	1234,06	

¹PRE = hypoallergene Spezialnahrung

²HA = Milumil HA hypoallergene Folgenahrung,

³SOM = milchfreie Spezialnahrung

⁴Milumil = Folgemilch

* Wert wurde nicht zur Berechnung herangezogen

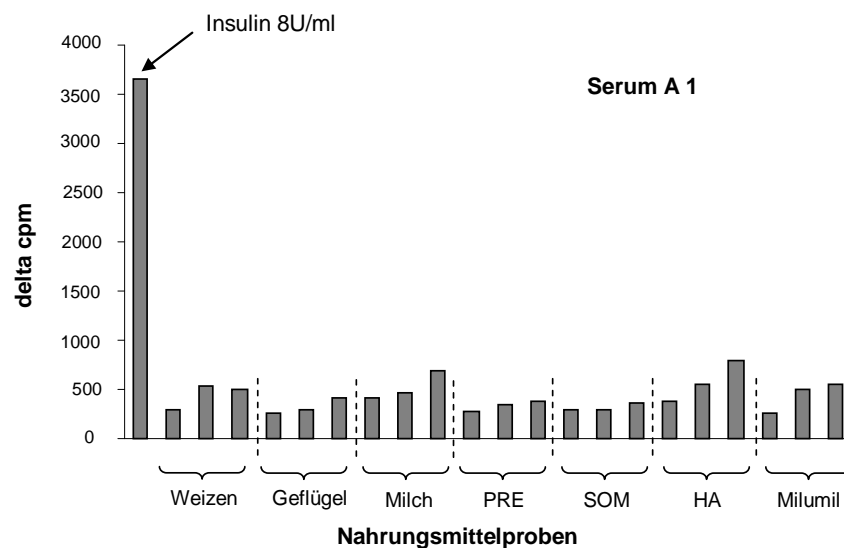
E=Extinktion

4.8.2 Bindungseigenschaften von Insulinautoantikörpern an Proteinextrakte ausgewählter Lebensmittelbestandteile

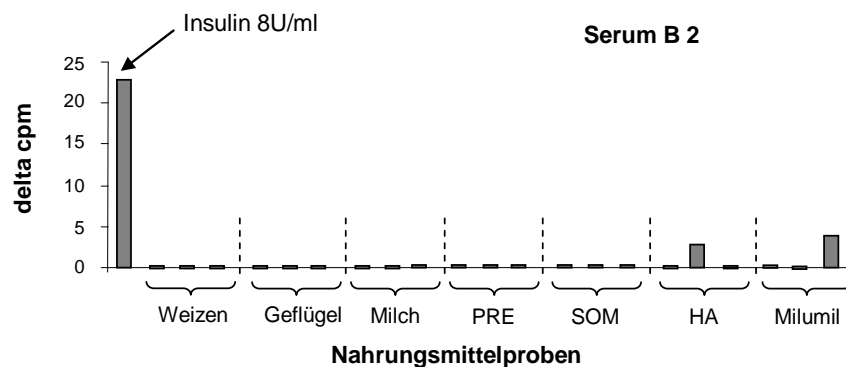
Im ersten Versuchsansatz wurden die Serumproben vier ausgewählter IAA-positiver Probanden mit den Extrakten aus Weizenmehl, Geflügelfleischmehl, Magermilchpulver und den vier verschiedenen Formulanahrungen als kompetitive Liganden im IAA-RBA gemessen. Das Serum A 1 stammt von einem IgA-IAA positiven Probanden, Serum B 2 hat niedrige Titer an hoch affinen IAA und Serum C 3 ist von einem Typ 1 diabetischen Probanden. Im Serum D 4 sind ebenfalls IgA-IAA nachweisbar und der Proband hatte keinen Typ 1 Diabetes zum Zeitpunkt der Gewinnung der Serumprobe.

Bei allen vier Probanden (s. Abb. 23 A-D) konnten die IAA wie erwartet mit humanem Insulin inhibiert werden.

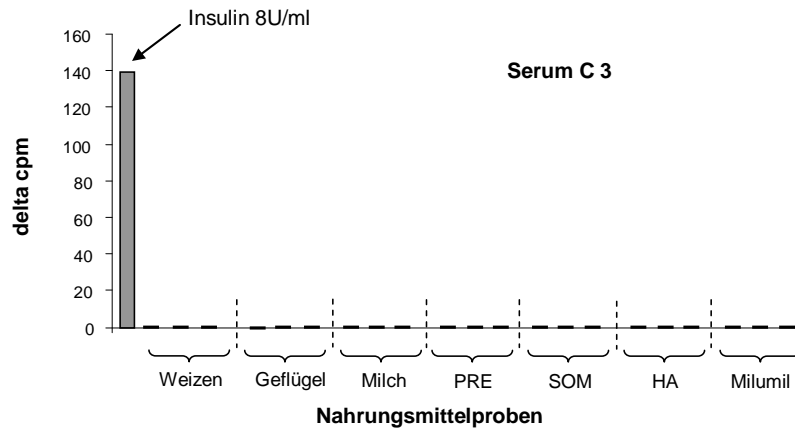
A



B



C



D

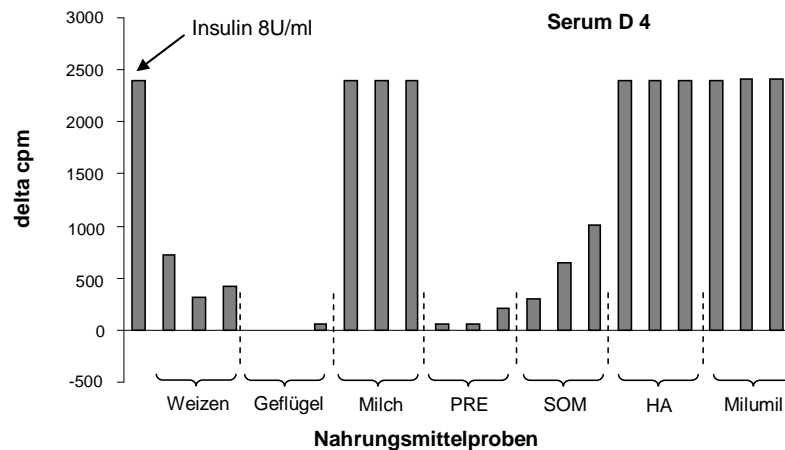


Abb. 23 A-D Bindung von IAA bei vier Probanden an Lebensmittelbestandteile im Vergleich zu humanem Insulin. Die IAA-Menge, die an den jeweiligen Liganden bindet, ist als inhibierte delta cpm Menge auf der y-Achse abgetragen. Auf der x-Achse sind die einzelnen Nahrungsmittelproben aufgetragen, die jeweils in den Konzentrationsstufen 50, 100 und 250 µg/ml als kompetitiver Ligand eingesetzt wurden. Die IAA in A, B und C binden an humanes Insulin, aber nicht an die Lebensmittelproteine. Dagegen binden die IAA in D sowohl an humanes Insulin als auch deutlich an Milch, SOM, HA und Milumil.

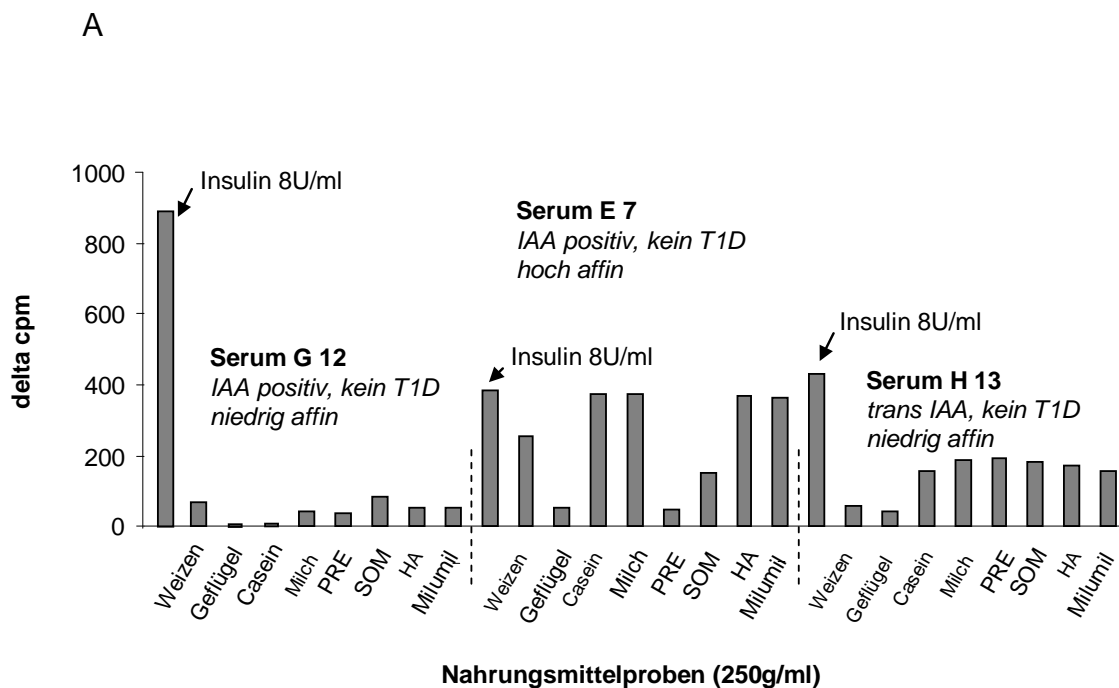
Allerdings banden die IAA von drei der Probanden nicht an die getesteten Extrakte und zeigen somit keine Kreuzreaktivität mit den untersuchten Lebensmittelproteinen (s. Abb. 23 A-C).

Bei dem vierten Probanden konnten die IAA jedoch nicht nur mit humanem Insulin, sondern auch deutlich mit Milchpulverextrakt und einigen Extrakten der Formulanahrungen inhibiert werden (s. Abb. 23 D).

Diese IAA besitzen eine kreuzreaktive Komponente, die sowohl Insulin als auch Lebensmittelproteine bindet.

Aufbauend auf diese erste Messung wurden in einem folgenden Testansatz die IAA sieben weiterer ausgewählter Probanden auf eine Reaktion mit den jeweiligen Nahrungsmittelbestandteilen hin untersucht, wobei hier die Proteinextrakte ausschließlich in einer Konzentration von 250µg/ml eingesetzt wurden.

Die IAA von zwei der untersuchten Seren zeigten eine Bindung an die Nahrungsproteine, was auf das Vorliegen einer kreuzreaktiven IAA-Komponente hindeutet (s. Abb. 24 A und B). Die hoch affinen IAA im Serum des nicht diabetischen Probanden E 7 zeigten eine deutliche Bindung an Vollcasein, Milchpulverextrakt, HA und Milumil; für die niedrig affinen IAA des ebenfalls nicht diabetischen Probanden F 9 wurde eine Bindung an Milchpulverextrakt, PRE und HA nachgewiesen. Die Seren der fünf weiteren Probanden zeigten keine eindeutige Reaktivität mit den Lebensmittelproteinen.



IAA-positiven Probanden auf eine Reaktion mit Milchpulverextrakt (20µg/ml) getestet, um die Häufigkeit des Auftretens solcher Antikörper zu untersuchen.

Die IAA von drei (Serum M 18, N 19 und P 20) dieser 37 Probanden (8,1%) banden stark an Milchpulverextrakt. Die IAA-Bindung an markiertes humanes [¹²⁵I] Insulin konnte zu 89%, 55% und 12% durch die Zugabe von Milchpulverextrakt inhibiert werden (s. Abb. 25).

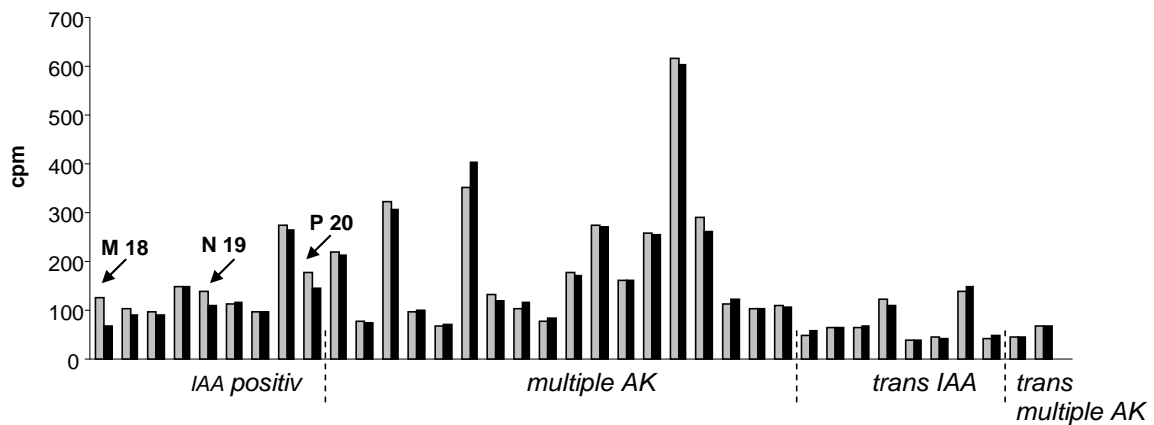


Abb. 25 Häufigkeit der kreuzreaktiven IAA-Komponente in Patientenserum. Die IAA-Mengen, die entweder uninhibiert (heller Balken) oder durch Milchpulverextrakt in einer Konzentrationsstufe von 20µg/ml inhibiert wurden (dunkler Balken), sind jeweils als Mittelwerte der cpm auf der y-Achse abgetragen. Auf der x-Achse sind die Probandenserum nach Antikörperstatus gruppiert. Die IAA der mit einem Pfeil gekennzeichneten Seren M 18, N 19 und P 20 sind durch das Milchpulverextrakt inhibierbar.

Von den bisher untersuchten Serumproben (zusammen 46) wurden insgesamt bei sechs IAA-positiven Probanden Antikörper identifiziert, die an Milchpulverextrakt binden. Bei allen sechs milchreaktiven IAA-Proben handelte es sich um Seren mit IAA, die eine niedrig affine Bindung mit humanem Insulin eingehen (1×10^6 bis $3,8 \times 10^8$ L/mol). Nur einer dieser Probanden entwickelte zusätzlich zu den IAA Autoantikörper gegen GAD (GADA) und keiner der Probanden entwickelte Typ 1 Diabetes in einem medianen Nachverfolgungszeitraum von 5,9 Jahren (1,0 bis 7,3 Jahre). Bei drei der milchreaktiven IAA-Proben konnte zusätzlich eine IgA-IAA-Komponente nachgewiesen werden (s. Tab. 21).

Tab. 21 Charakteristika der Probanden, deren IAA an Milchpulverextrakt binden.

ID	Probandenalter (Jahre) bei Probe	Insulinautoantikörper Charakteristika				Status bei letztem Kontakt zum Patienten		
		Affinität (L/mol)	Bindung an Milchpulverextrakt	IgA-IAA	Bindung and Hühnerinsulin versus Humaninsulin	Alter (Jahre)	AK-Status	Diabetes
27617	2,76	$3,8 \times 10^8$	+	(+)	$IC50_{\text{Huhn}} < IC50_{\text{human}}$	3,79	IAA	nein
24265	2,27	$2,2 \times 10^8$	+	n.b.	n.b.	8,66	IAA, GADA	nein
25936	9,41	1×10^6	+	+	$IC50_{\text{Huhn}} < IC50_{\text{human}}$	10,98	IAA	nein
24909	7,12	1×10^6	+	+	$IC50_{\text{Huhn}} < IC50_{\text{human}}$	12,61	IAA	nein
21225	4,51	$3,5 \times 10^7$	+	n.b.	n.b.	11,80	keine	nein
22493	1,98	$2,5 \times 10^7$	+	n.b.	n.b.	8,49	IAA	nein

AK = Autoantikörper

n.b. = limitiertes Probenvolumen, daher nicht bestimmt

Kategorisierung der IAA-Affinitäten:

$> 1 \times 10^9$ entspricht hoch affinen IAA

$5 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ entspricht moderat affinen IAA

$< 5 \times 10^8$ entspricht niedrig affinen IAA

4.8.4 Eingrenzung und Identifizierung der Milchproteinkomponenten, die an kreuzreaktive Insulinautoantikörper binden

Um im Weiteren charakterisieren zu können, an welche Milchproteinkomponenten die kreuzreaktiven IAA bevorzugt binden, wurde das Serum D 4, das im ersten Testansatz positiv mit einigen Nahrungsproteinen reagiert hatte, weiterverwendet, da von diesem Serum ein ausreichendes Volumen für weitere Messungen zur Verfügung stand. Im folgenden Testansatz wurden mit diesem Serum und einem Kontrollserum eines Typ 1 diabetischen Probanden zuerst die Bindungseigenschaften der IAA mit Milchpulverextrakt in verschiedenen Konzentrationen untersucht (s. Abb. 26 A). In einem weiteren Testansatz wurden α -, β - und Vollcasein im Vergleich zu Milchpulverextrakt, den Folgenahrungen und Weizenmehl gemessen (s. Abb. 26 B).

Eine deutliche Reaktion konnte für die IAA des Patienten D 4 (niedrig affin, IAA-positiv, kein Typ 1 Diabetes) mit Milchpulverextrakt, α -, β - und Vollcasein und auch mit der milchhaltigen Formulanahrung (Milumil) nachgewiesen werden, nicht aber für die diabetische Kontrollperson (grafisch nicht dargestellt).

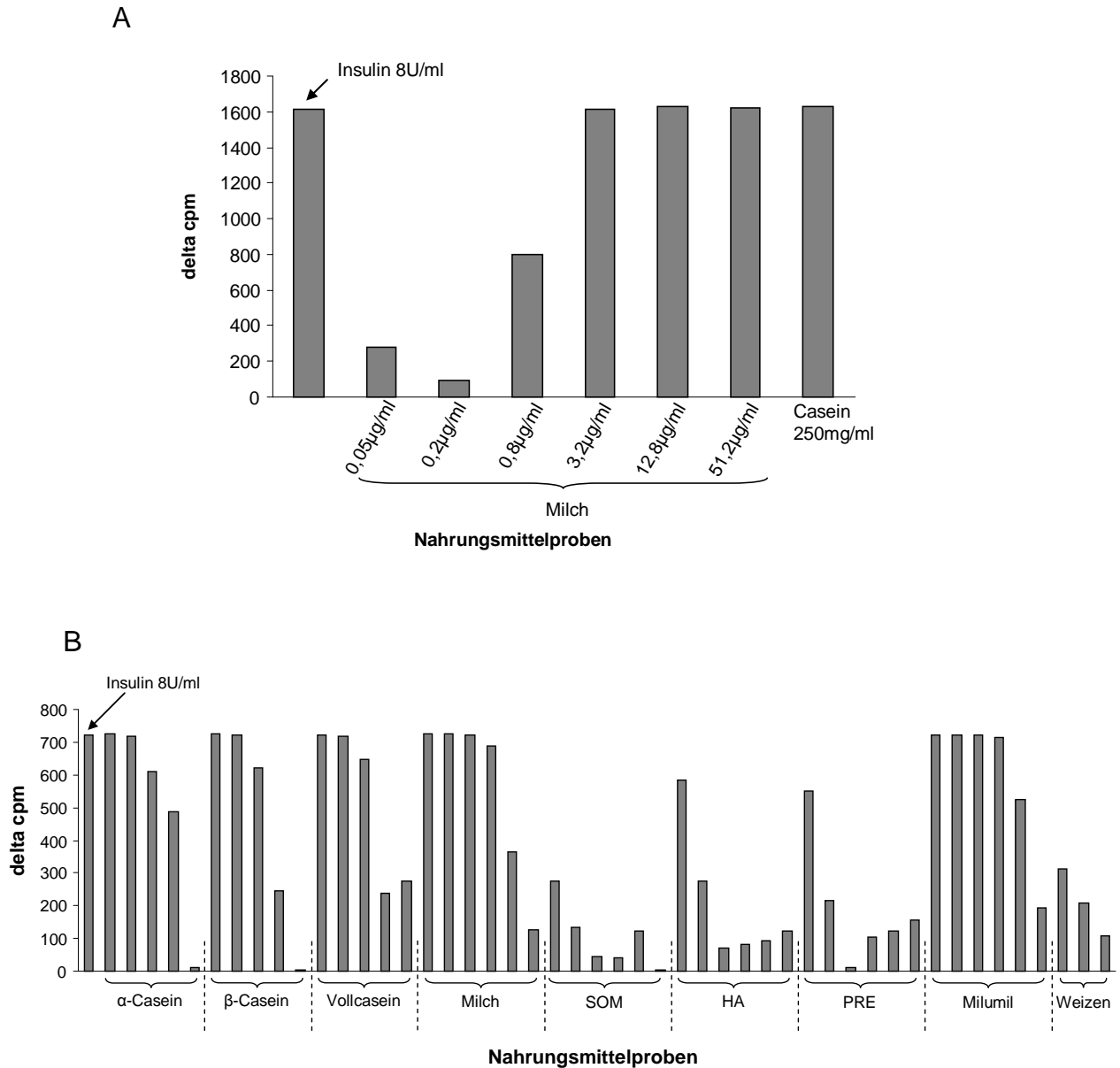


Abb. 26 A und B Bindung von IAA an Milch, Milchproteine, Formulanahrungen und Weizen im Vergleich zu humanem Insulin. Die IAA-Menge, die an den jeweiligen Liganden bindet, ist als inhibierte delta cpm Menge auf der y-Achse abgetragen. Auf der x-Achse sind die einzelnen Nahrungsmittelproben aufgetragen, die als kompetitiver Ligand eingesetzt wurden. Abbildung 26 A zeigt die Reaktion der IAA mit Milchpulverextrakt in verschiedenen Konzentrationen. In Abbildung 26 B wurden α - , β - und Vollcasein in den Konzentrationsstufen 2,56µg/ml; 0,64µg/ml; 0,16µg/ml; 0,04µg/ml und 0,001µg/ml eingesetzt. Milchpulverextrakt und die Formulanahrungen wurden in den Konzentrationsstufen 25,6µg/ml; 6,4µg/ml; 1,6µg/ml; 0,4µg/ml; 0,1µg/ml und 0,0025µg/ml sowie Weizen in 102,4µg/ml; 25,6µg/ml und 6,4µg/ml verwendet. Die IAA des Serums zeigten im Vergleich zur Bindung an humanes Insulin eine deutliche Reaktion mit α - , β - und Vollcasein, Milchpulverextrakt und Milumil.

In den beiden folgenden Abbildungen 27 und 28 sind die Bindungskurven der IAA des Serums D 4 mit den verschiedenen Nahrungsbestandteilen dargestellt.

Aus Abbildung 27 ist ersichtlich, dass die IAA bevorzugt mit Milchpulverextrakt und mit der milchhaltigen Formulanahrung Milumil reagierten. Die Reaktion der IAA mit hydrolysierten Formulanahrungen und Weizenmehl waren weniger stark ausgeprägt. In Abbildung 28 lässt sich anhand der Bindungskurven klar erkennen, dass die IAA eine Bindung mit den Milchproteinen α - und β -Casein eingehen, aber keinerlei Reaktion mit BSA oder Lactoglobulin zu beobachten ist.

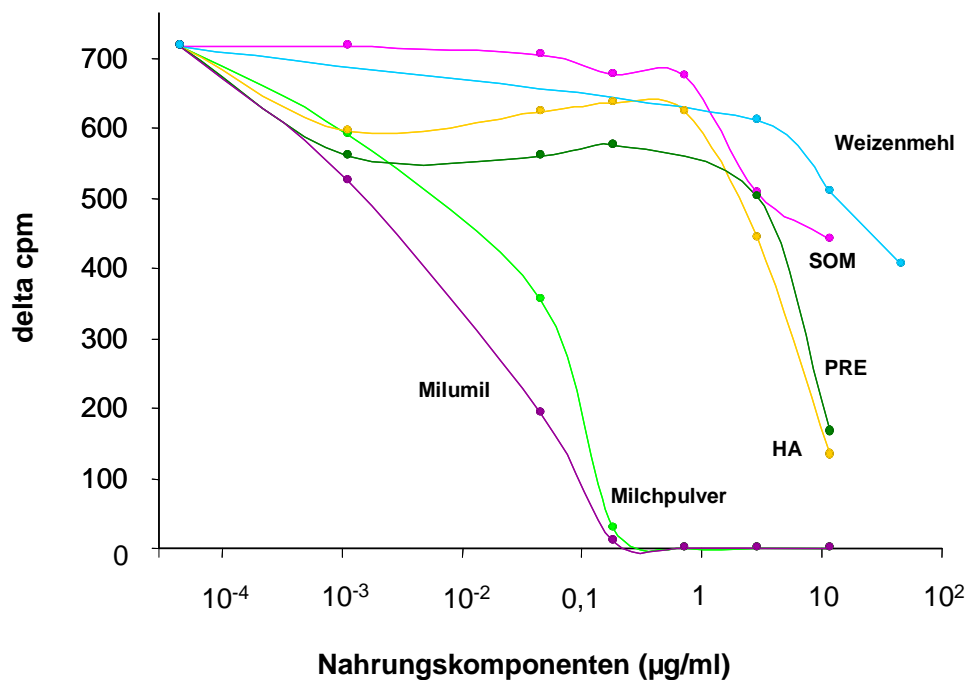


Abb. 27 Bindungskurven von IAA an Lebensmittelbestandteile. Die IAA-Menge, die an den jeweiligen Liganden bindet, ist als inhibierte delta cpm Menge auf der y-Achse abgetragen. Auf der x-Achse sind die einzelnen Konzentrationen der Nahrungsmittelproben aufgetragen, die als kompetitive Liganden eingesetzt wurden.

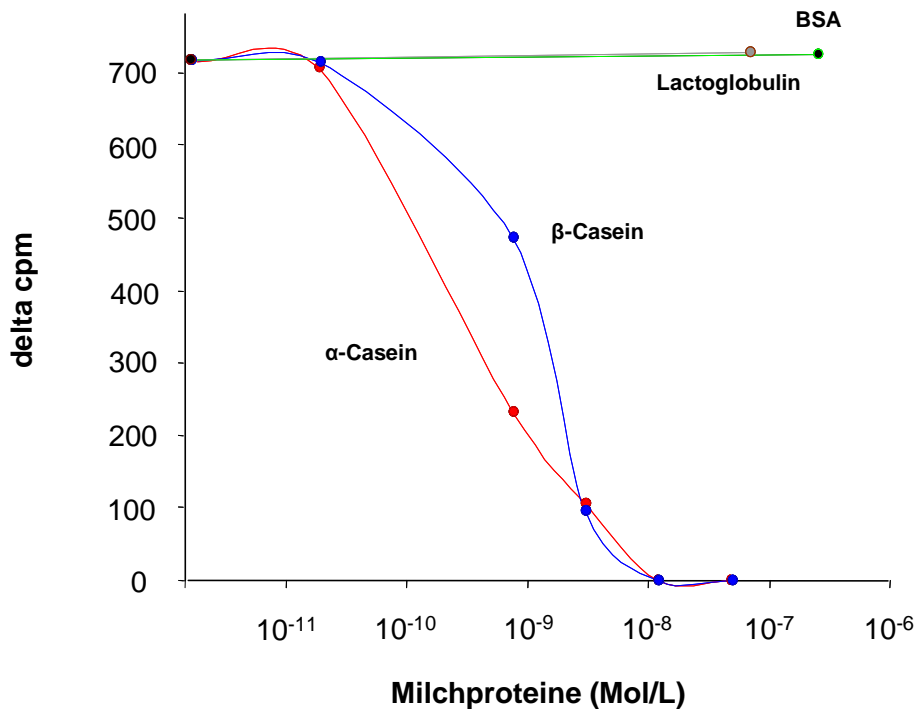


Abb. 28 Bindungskurven von IAA an Milchproteine. Die IAA-Menge, die an den jeweiligen Liganden bindet, ist als inhibierte delta cpm Menge auf der y-Achse abgetragen. Auf der x-Achse sind die einzelnen Konzentrationen der Milchproteine aufgetragen, die als kompetitive Liganden eingesetzt wurden.

Nachdem die Untersuchungen mit Serum D 4 gezeigt hatten, dass die kreuzreaktive IAA-Komponente mit Milchproteinen (Milchpulverextrakt und den Caseinen) reagiert, wurden die IAA in zehn unterschiedlichen Seren von sechs Probanden auf ihre Reaktivität mit unterschiedlichen Konzentrationen an α - und β -Casein sowie Insulin und BSA hin untersucht (s. Abb. 29-31). Diese Proben wurden ausgewählt, da sie entweder in irgendeiner Form auffällige IAA-Bindungsmuster aufwiesen oder in den beschriebenen vorangegangenen Analysen eine Reaktion mit einem der Nahrungsbestandteile gezeigt hatten.

In Abbildung 29 ist die IAA-Reaktivität von vier verschiedenen Serumproben mit α - und β -Casein, Insulin und BSA dargestellt. Jeweils zwei Seren stammen von einem Probanden, wurden jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgenommen. Während bei einem der Probanden (D 5, D 6) die IAA beider getesteter Seren an die Caseine und Insulin banden, unterschieden sich die IAA der Seren des anderen Probanden (E 7, E 8) in ihrer Reaktion: während die IAA der früheren

Probe bevorzugt an α -Casein banden, war in der späteren Serumprobe nur eine Reaktivität mit Insulin aber mit keinem der kompetitiven Liganden nachweisbar. Keines der vier untersuchten Seren zeigte eine Bindung mit BSA.

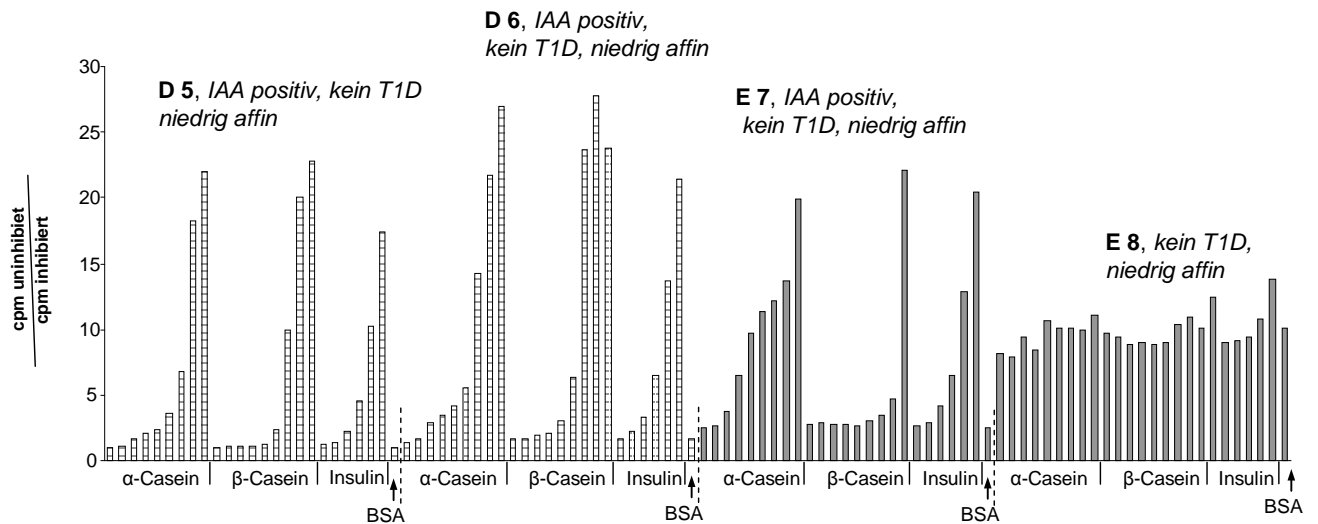


Abb. 29 Bindung von IAA an verschiedene Milchproteine im Vergleich zu Insulin (Teil 1). Die IAA-Menge, die an den jeweiligen Liganden bindet (relative IAA-Bindung), ist als Quotient aus uninhibierten und inhibierten cpm-Werten (delta cpm) auf der y-Achse abgetragen. Auf der x-Achse sind die einzelnen Milchproteine aufgetragen, die als kompetitive Liganden eingesetzt wurden. α - und β -Casein wurden in den Konzentrationsstufen 0,0025 μ g/ml; 0,01 μ g/ml; 0,02 μ g/ml; 0,04 μ g/ml; 0,08 μ g/ml; 0,16 μ g/ml; 0,32 μ g/ml; 0,64 μ g/ml und 2,56 μ g/ml eingesetzt, Insulin in den Konzentrationsstufen 4 ng/ml; 16 ng/ml; 64 ng/ml; 256 ng/ml; 1024 ng/ml und 4096 ng/ml sowie BSA in einer Konzentration von 1 μ g/ml. Säulen, die Seren des selben Probanden symbolisieren, sind gleich eingefärbt.

Abbildung 30 zeigt die IAA Reaktivität in drei verschiedenen Seren von zwei Probanden. Von den zwei Seren, die von einem Probanden stammen (F 10, F 11), aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen wurden, zeigte nur das spätere der beiden Seren eine Bindung an die Caseine. Ebenso reagierten die IAA des Serums des anderen Probanden (M 18) mit den Caseinen. Alle drei untersuchten Seren zeigten keinerlei IAA-Reaktion mit BSA.

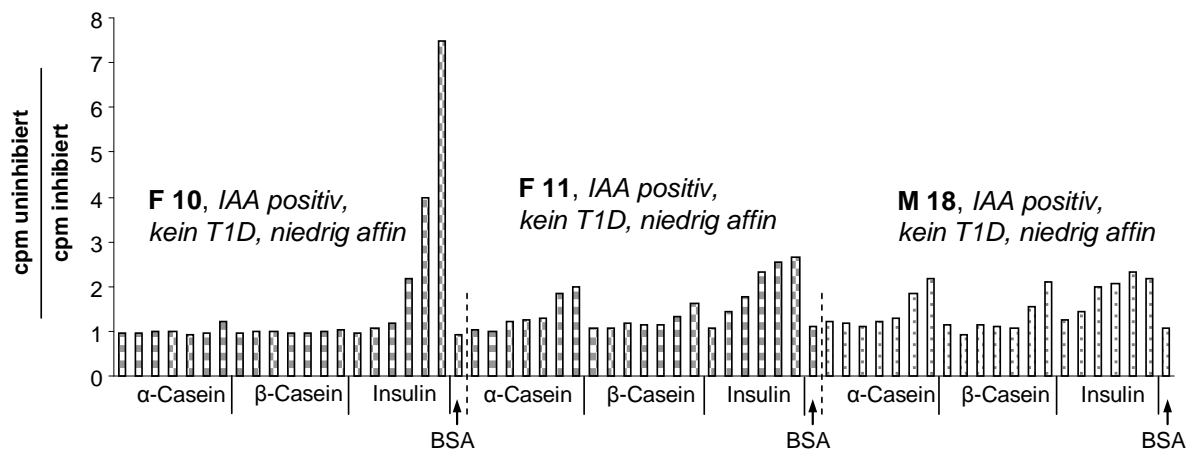


Abb. 30 Bindung von IAA an verschiedene Milchproteine im Vergleich zu Insulin (Teil 2). Die IAA-Menge, die an den jeweiligen Liganden bindet (relative IAA-Bindung), ist als Quotient aus uninhibierten und inhibierten cpm-Werten (delta cpm) auf der y-Achse abgetragen. Auf der x-Achse sind die einzelnen Nahrungsmittelproben aufgetragen, die als kompetitive Liganden eingesetzt wurden. α - und β -Casein wurden in den Konzentrationsstufen 0,16 μ g/ml; 0,64 μ g/ml; 1,28 μ g/ml; 5 μ g/ml; 20 μ g/ml; 80 μ g/ml und 320 μ g/ml eingesetzt, Insulin in den Konzentrationsstufen 64 ng/ml; 256 ng/ml; 1024 ng/ml; 4096 ng/ml; 16384 ng/ml; 65542 ng/ml und 8U/ml sowie BSA in einer Konzentration von 20 μ g/ml. Säulen, die Seren des selben Probanden symbolisieren, sind gleich eingefärbt.

In Abbildung 31 ist die IAA-Reaktivität in drei weiteren Seren dargestellt, wobei ebenfalls zwei von einem Probanden (L 16, L 17) stammen. Die IAA dieser beiden Seren wiesen eine deutliche Reaktivität mit den Caseinen auf. Die IAA des Serums des anderen Probanden (H 13) zeigten verglichen mit Insulin keine Bindung an die Caseine. Alle drei untersuchten Seren zeigten keine Reaktion mit BSA.

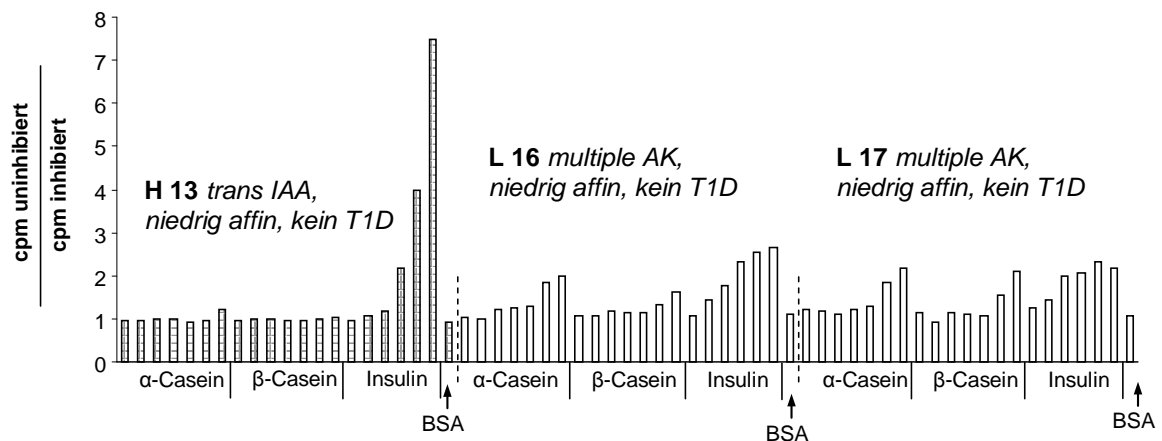


Abb. 31 Bindung von IAA an verschiedene Milchproteine im Vergleich zu Insulin (Teil 3). Die IAA-Menge, die an den jeweiligen Liganden bindet (relative IAA-Bindung), ist als Quotient aus inhibierten und uninhibierten cpm-Wert (delta cpm) reziprok auf der y-Achse abgetragen. Auf der x-Achse sind die einzelnen Nahrungsmittelproben aufgetragen, die als kompetitive Liganden eingesetzt wurden. α - und β -Casein wurden in den Konzentrationsstufen 0,16 μ g/ml; 0,64 μ g/ml; 1,28 μ g/ml; 5 μ g/ml; 20 μ g/ml; 80 μ g/ml und 320 μ g/ml eingesetzt, Insulin in den Konzentrationsstufen 64 ng/ml; 256 ng/ml; 1024 ng/ml; 4096 ng/ml und 16384 ng/ml sowie BSA in einer Konzentration von 20 μ g/ml. Säulen, die Seren des selben Probanden symbolisieren, sind gleich eingefärbt.

Insgesamt ergab sich aus der Untersuchung der zehn verschiedenen Serumproben von sechs Probanden, dass die IAA in der Nachverfolgung verschiedene Bindungseigenschaften gegenüber den Caseinen aufweisen können: bei zwei der Probanden veränderte sich die IAA-Reaktivität mit den Caseinen der beiden jeweils zugehörigen Seren im Zeitverlauf. Die kreuzreaktiven IAA banden bevorzugt an α - und β -Casein, nicht aber an BSA.

Zusammenfassend konnten anhand der durchgeführten Tests IAA identifiziert werden, die nicht nur weniger stark an humanes Insulin binden, sondern bevorzugt an die hier getesteten Nahrungsbestandteile (insbesondere das Kuhmilchprotein Casein). Somit wird die Theorie unterstützt, dass in einigen Fällen solche Antikörper eventuell ursprünglich gegen andere Moleküle gerichtet waren und sich im weiteren Verlauf der Antikörperreifung gegen körpereigene Proteine, wie in diesem Fall Insulin, richten könnten.

5 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Modulationen in der Zusammensetzung von Proteinträgern der Nahrung auf die Pathogenese des Typ 1 Diabetes im NOD-Mausmodell untersucht. Besonders der Einfluss spezieller Nahrungsbestandteile, die im Rahmen der Diabetesentwicklung diskutiert werden, wurde näher betrachtet. Aufbauend auf den so erzielten in vivo Ergebnissen im Mausmodell wurden verschiedene Analysen mit humanen Seren durchgeführt. Die Seren ausgewählter Patienten wurden im Radioimmunoassay untersucht, um IAA zu identifizieren, die einerseits eine weniger starke Bindung an humanes Insulin aufweisen und somit möglicherweise ursprünglich gegen andere Moleküle gerichtet waren und die andererseits zum Isotypen der IgA-IAA gehören.

Weiterhin wurde im Radioimmunoassay die Bindung von IAA, die eine niedrigere Affinität zu humanem Insulin aufwies, an bestimmte Moleküle in proteinreichen Homogenaten von Casein, Weizen und Folgenahrungen für Kleinkinder im Vergleich zur Bindung an humanes Insulin getestet. Dabei lag der Fokus der Untersuchungen darauf, über das Bindungsverhalten der IAA Rückschlüsse auf Nahrungsbestandteile ziehen zu können, die als potenzielle initiale Zielproteine der IAA in Frage kommen könnten.

5.1 Fütterungsversuche mit NOD-Mäusen

Sowohl Weizen als auch Kuhmilch werden im Tierversuch wie auch in der menschlichen Ernährung eine Rolle bei der Entwicklung von Autoimmundiabetes zugeschrieben. In verschiedenen Nagerstudien führte einerseits eine Zulage von Kuhmilch zu den Diäten zu einer Steigerung der Diabetesrate, andererseits schien eine Weizenzulage ebenfalls einen Einfluss auf die Diabetesentwicklung zu haben. Häufig wurde die Aussagekraft dieser Ergebnisse gemindert, da die Diäten meist eine Getreidegrundlage mit Weizenanteil hatten (Elliot et al. 1988, Coleman et al. 1990, Karges et al. 1997, Funda et al. 1999, Schmid et al. 2004 b, Maurano et al. 2005, Hoofar et al. 1993, Beales et al. 2002, Wasmuth und Kolb 2000, Flohé et al. 2003 und Funda et al. 2008). Die Diskussion um den Einfluss von Kuhmilchproteinen, von denen die Mehrzahl immunologische Reaktionen beim

Menschen auslösen kann, ist kontrovers. Im Nagermodell konnte über eine milchfreie Diät keine Diabetesprotektion erreicht werden (Wasmuth und Kolb 2000). Casein ist eines jener Kandidatenproteine, welche als mögliche Trigger der Autoimmunität des Typ 1 Diabetes diskutiert werden. Untersuchungen im NOD-Modell und bei BB-Ratten erbrachten bisher jedoch unterschiedliche Ergebnisse. Versuchsdiäten mit hydrolisiertem Casein zeigten eine niedrigere Diabetesinzidenz als Vergleichsdiäten (Hoorfar et al. 1993). Vollcasein führte im NOD-Modell zu einer erhöhten Diabetesinzidenz (Linn et al. 1999, Beales et al. 2002), allerdings scheint es bei BB-Ratten in diesem Zusammenhang sogar protektiv zu wirken (Beales et al. 2002). In der Literatur gibt es außerdem Hinweise auf Sequenzhomologien zwischen Kuhmilchproteinen und Inselzellantigenen. So resultieren aus der Caseinverdauung eine Vielzahl von Peptiden, von denen einige opioide Eigenschaften besitzen und damit immunkompetente Zellen beeinflussen können (Wasmuth und Kolb 2000).

Bedingt durch den Klärungsbedarf in den angeführten Bereichen, unterteilten sich die Fütterungsversuche mit den NOD-Mäusen in drei Versuchsabschnitte.

- Im ersten Teilversuch sollte über die Verwendung unterschiedlicher Proteinquellen eine möglichst wenig diabetogene Basisdiät gefunden werden.
- Im zweiten Teilversuch wurden ansteigende Weizenzulagen sowie der Zusatz verschiedener einzelner Weizenproteinfraktionen zur Basisdiät auf ihre mögliche diabetogene Wirkung hin untersucht.
- Der dritte Teilversuch analysierte die Effekte einiger Nahrungsbestandteile, die in der frühkindlichen Ernährung eine Rolle spielen, auf die Entwicklung des Autoimmundiabetes bei den NOD-Mäusen.

Die Stärke der hier durchgeführten in vivo Fütterungsexperimente am NOD-Modell liegt darin, dass bezüglich Proteinquelle, Fett und Kohlenhydraten speziell konzipierte und streng kontrollierte Diäten verwendet wurden. Alle Diäten wurden am Institut für Tierernährung der Justus-Liebig-Universität Gießen hergestellt. Während kommerzielle Diäten sich häufig in Abhängigkeit von der Charge unterscheiden sowie darüber hinaus vielfältige variierende Inhaltsstoffe und Gemenganteile enthalten, unterschieden sich die hier verwendeten Diäten nur in einer jeweils untersuchten Komponente voneinander und nicht in den weiteren

Inhaltsstoffen. Da variierende Inhaltsstoffe über unterschiedliche metabolische Prozesse die Entwicklung von Autoimmundiabetes verschleiern oder beeinflussen könnten, blieb mit dem hier gewählten Versuchsaufbau der Verlauf der Diabetesentwicklung zwischen den einzelnen Versuchsgruppen, die verschiedene Diäten erhielten, direkt vergleichbar.

5.1.1 Effekte unterschiedlicher Proteinquellen auf die Diabetesentwicklung im NOD-Modell

Die Ergebnisse des ersten Teilversuchs mit NOD-Mäusen, durch den eine möglichst wenig diabetogene Diät gefunden werden sollte, zeigten, dass Diät A, die Weizen in Kombination mit Casein als Proteinquellen enthielt, einen verstärkenden Einfluss auf die Häufigkeit des Diabetesausbruchs hatte (75% diabetische Tiere im Alter von 25 Lebenswochen). Der diabetogene Effekt von Casein allein (Diät B) mit 58% diabetischen Tieren bei 25 Lebenswochen war nicht so ausgeprägt. Da zwischen den beiden Diäten A und B kein weiterer Unterschied bestand, als die Weizenzulage in Diät A, können die Abweichungen in der Diabeteshäufigkeit zwischen den beiden Fütterungsprotokollen dem Einfluss von Casein allein bzw. dem kombinierten Effekt von Casein und Weizen gemeinsam zugeschrieben werden. Die vorliegenden Daten konnten die Ergebnisse von vorangegangenen Studien dahingehend bestätigen (Elliot et al. 1988, Funda et al. 1999, Schmid et al. 2004 b, Hoofar et al. 1993, Wasmuth und Kolb 2000, Flohé et al. 2003), als dass unsere Resultate den Schluss nahe legen, dass sich die diabetogenen Effekte von sowohl Casein als auch von Weizen addieren könnten.

Eine weitere Diät C, die als Proteinquellen nur Soja und Geflügelfleischmehl enthielt, führte zu einer in zwei Versuchsansätzen reproduzierbaren relativ geringen Diabetesinzidenz (ca. 30% im Alter von 25 Lebenswochen). Diese spezifische Diät C diente als Basisdiät für weitere Fragestellungen, bei denen im NOD-Modell die Effekte einzelner Nahrungsbestandteile auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes untersucht wurden.

5.1.2 Wirkungen von gestaffelten Weizenzulagen und einzelnen Weizenproteinfraktionen auf die Diabetesentwicklung im NOD-Modell

In früheren Studien führte eine weizenfreie Diät im NOD-Modell zu einer deutlichen Verminderung der Diabetesinzidenz (Schmid et al. 2004 b, Funda et al. 1999). Außerdem konnten Sequenzhomologien zwischen einem Weizen-vorratsprotein G1b1 und tight junction Proteinen, die an der Aufrechterhaltung der Permeabilität des intestinalen Epithels beteiligt sind und so einen Einfluss auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes haben könnten, nachgewiesen werden (MacFarlane et al. 2003). In vorangegangenen Untersuchungen wurde versucht einzugrenzen, welche Weizenkomponente möglicherweise für den negativen Effekt auf die Diabetesentwicklung verantwortlich sein könnte (Schmid et al. 2004 b). Auf Grund der Verbindung zur Zöliakie gelangte zunächst das Gluten und speziell dessen Bestandteil Gliadin in den Fokus der Forschung. Gliadin hat mit seinen die Mucosapermeabilität verändernden Eigenschaften nicht nur im Rahmen der Zöliakie das Potenzial, Autoimmunprozesse über das Eindringen von Nahrungsproteinen in die Lamina Propria zu triggern. Im Tierversuch konnte jedoch bislang mit dem Zusatz von Gliadin zu weizenfreiem Futter kein positiver Nachweis geführt werden, die Diabetesinzidenz zu erhöhen (Schmid et al. 2004 b). Möglicherweise könnten verschiedene Glutenpeptide über differente Mechanismen in die Pathophysiologie von Autoimmunerkrankungen involviert sein (Ciccocioppo et al. 2005).

In den hier unter kontrollierten Bedingungen durchgeführten Versuchen konnte zur diabetogenen Wirkung einer Weizenzulage, wie in vorangegangenen Studien im NOD-Modell dargestellt, kein eindeutig gerichteter Effekt reproduziert werden (Schmid et al. 2004 b). Ein abgestufter Weizenzusatz von 5%, 10% und 30% zur basalen Diät C zeigte entgegen der Erwartung einen invers dosisabhängigen Effekt auf die Diabetesrate. Bemerkenswert ist, dass Diät C mit 30% Weizenzusatz bei den NOD-Mäusen keine erhöhte Diabetesinzidenz im Vergleich zur basalen Diät C aufwies. Die Diabetesrate über die gesamte Dauer des Versuchs betrachtet lag bei den Mäusen, die Diät C mit 30% Weizenzulage erhielten sogar niedriger als bei den Mäusen, die die basale Diät C erhielten. Die Weizenzulage von 30% konnte aber die Diabetesentwicklung nicht völlig

verhindern. Eine Weizenzulage von 5% dagegen erhöhte die Diabetesrate im Vergleich zur basalen Diät C deutlich (79% diabetische Tiere im Alter von 25 Lebenswochen). Eine Weizenzulage von 10% führte zu 54% diabetischen Tieren im gleichen Alter.

Ein möglicher Mechanismus hinter diesen nicht erwarteten Ergebnissen, nämlich der protektive Effekt der hohen Weizenzulage und der konträre Effekt der niedrigen Weizenzulagen auf die Diabetesentwicklung im NOD-Modell, könnte in der komplexen Regulation der oralen Toleranz gegenüber Antigenen liegen. Die orale Toleranz entwickelt sich gegenüber Antigenen, mit denen der Gastrointestinaltrakt über die Nahrung konfrontiert wird (Strobel und Mowat 1998). Außerdem scheint das Lebensalter über eine sinkende Darmpermeabilität die Immunantwort gegenüber oralen Antigenen zu modifizieren (Vaarala 2006). Eine orale Toleranz kann über einen großen Konzentrationsbereich von Antigen Dosen erreicht werden; hierbei liegen unterschiedliche Mechanismen zugrunde: hohe Dosen an oralen Antigenen provozieren eine apoptotische Zerstörung von Antigen-spezifischen Zellen über einen TGF- β abhängigen Mechanismus (Chen et al. 1995, Chehade et al. 2005). Eine gestörte intestinale Barrierefunktion könnte daher zu negativen Effekten auf die orale Toleranz bezüglich einiger Antigene führen, und zwar in Abhängigkeit von der zugeführten Dosis wie in den vorliegenden NOD-Fütterungsversuchen zu beobachten. Es gibt außerdem zunehmend Hinweise, dass das Darm-assoziierte Immunsystem bei Kindern mit Typ 1 Diabetes gestört ist und dies möglicherweise zu einer pathogenen Immunantwort auf Nahrungsbestandteile und einer nachfolgenden Diabetesentwicklung führen könnte (Vaarala 2000, Cima et al. 2004, Vaarala 2006, Tiittanen et al. 2006).

Verschiedene Autoren postulieren, dass der β -Zelltod ein Resultat hoher lokaler Konzentrationen von Prooxidantien (wie NO \bullet und O $_2\bullet$ sowie bestimmter Zytokine) sein könnte, welche bei einer Entzündungsreaktion entstehen, vermittelt durch CD $_4^+$ und CD $_8^+$ T-Zellen (Persaud und Barranco-Mendoza 2004). Einen möglichen Erklärungsansatz für den protektiven Effekt von Weizen könnten in diesem Zusammenhang die Eigenschaften einiger Weizenkomponenten bieten: so enthält Weizen nicht unbedeutende Mengen an ein und mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Vitamin E. In einigen Studien wurde vorgeschlagen, dass

Antioxidantien wie Vitamin E oder Ubichinon zu einem verzögerten Diabetesausbruch führen (Hyppönen 2004). Weizen enthält Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure und Vitamin E (Souci et al. 2000), was zu höheren Spiegeln von potenziell Diabetes-protektiven Substanzen führen könnte, wenn sie der Diät in hohen Dosen zugesetzt werden. Einen weiteren möglichen Erklärungsansatz für die protektive Wirkung der höheren Weizenzulagen könnte der hohe Phytinsäuregehalt des Weizens (bis zu 1100 mg/100g) darstellen. Sowohl tierexperimentelle Studien als auch Humanstudien geben Hinweise darauf, dass Phytinsäure zu einer deutlichen Reduktion der postprandialen Blutglukosespiegel führt (Dilworth et al. 2005, Lee et al. 2006, Panlasigui und Thompson 2006). Möglicherweise könnte damit eine geringere postprandiale Insulinsekretion eine Schutzwirkung auf das Pankreas ausüben und zu einem verzögerten Diabetesausbruch führen.

Um weitere Hinweise auf die für die Diabetesentwicklung relevante Weizenkomponente zu erzielen, wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit isoliertes Gluten oder Weizenglobuline und α -albumine zur basalen Diät C hinzugefügt. Auch hier zeigten die vorliegenden Daten ein unerwartetes Ergebnis: weder die Supplementation mit Gluten, noch mit Globulinen und Albuminen führte zu einer gesteigerten Diabetesinzidenz verglichen mit der basalen Diät C. Dieser Befund entspricht den Beobachtungen bezüglich der Supplementation mit Gliadin zu weizenfreiem Futter (Schmid et al. 2004 b). Dies könnte – in Anbetracht des oben erwähnten sich möglicherweise addierenden Effektes von Casein und Weizen – bedeuten, dass eine einzelne Nahrungskomponente zwar die Entwicklung von Autoimmundiabetes beeinflusst, aber nicht für sich den Ausbruch auslösen oder verhindern kann.

5.1.3 Einfluss weiterer Nahrungsbestandteile der Kleinkindernahrung auf die Diabetesentwicklung im NOD-Modell

Im dritten Versuchsansatz wurden einige Nahrungsbestandteile untersucht, die in Deutschland in der frühkindlichen Ernährung eingesetzt werden. Dabei wurden der basalen Diät C jeweils 5% der untersuchten Komponente zugesetzt, basierend auf

der Annahme, dass wie für den Weizenzusatz von 5% dargestellt werden konnte, ein 5%iger Zusatz ausreichend ist, um einen Effekt auf die Diabetesentwicklung auszuüben. Die Ergebnisse dieses Telexperiments zeigten, dass der Zusatz von Karotte, Apfel, Kartoffel und Mais zu der basalen Diät C nur für den Maiszusatz zu einer signifikanten Veränderung im frühen Ausbruch von Autoimmundiabetes verglichen mit Diät C allein führte. Dieser Effekt konnte nur im ersten Drittel des Beobachtungszeitraums des Mäuseversuchs gezeigt werden, im weiteren Verlauf glich sich die Diabetesinzidenz der mit Mais gefütterten NOD-Mäuse wieder der der anderen Tiere an. Da Zöliakie und Autoimmundiabetes einen gemeinsamen genetischen Hintergrund haben (Holmes 2002) und Mais auf Grund seiner von Weizen verschiedenen Proteinfractionen oft als harmlos für Zöliakiepatienten beschrieben wird, konnte mittels der hier vorliegenden Daten gezeigt werden, dass möglicherweise Mais ein höheres diabetogenes Potenzial aufweist, als bisher angenommen und dass Risikowirkungen auch in Bezug auf Zöliakie künftig erneut geprüft werden sollten.

Eine frühere Studie beschrieb, dass Bakterientoxine von *Streptomyces* (besonders Bafilomycin) auf der Kartoffelschale die Diabetesentwicklung im Tiermodell negativ beeinflussen könnten (Myers et al. 2003). Aus diesem Grund wurden der basalen Diät C 5% ungeschälte getrocknete Kartoffeln zugesetzt. Mit diesen Mengen an Kartoffeln, die angemessen in Bezug auf die tägliche Ernährung schienen, konnten im NOD-Mausmodell keine adversen Effekte auf die Diabetesentwicklung nachgewiesen werden. Apfel und Karotte, die für ihre potenziell allergenen Eigenschaften bekannt sind (Kreft et al. 1995), zeigten in Zulagen von jeweils 5% zur basalen Diät C für die Entwicklung von Autoimmundiabetes im NOD-Modell ebenfalls keine Relevanz.

Mit frühen Versuchen von Elliot und Martin (1984) an BB-Ratten konnte demonstriert werden, dass intakte Proteine allgemein diabetogen waren, während die Gabe von Aminosäuren die Diabetesentwicklung verringerte. Eine Konfrontation der jungen NOD-Mäuse mit vielen verschiedenen Proteinen nach dem Abstillen wie in Diät D (Altromin) enthalten, resultierte in einer verstärkten Diabetesinzidenz mit 66% diabetischen Tieren im Altern von 25 Lebenswochen. Da dies nicht auf das diabetogene Potenzial einer isolierten Nahrungskomponente zurückgeführt werden kann, bietet die Hypothese, dass eine frühe Stimulation des

noch nicht ausgereiften Darm-assoziierten Immunsystems mit Fremdproteinen mit einem höheren Risiko einer β -Zell Autoimmunität assoziiert ist (Wahlberg et al. 2006), einen Erklärungsansatz für die hier dargestellten Ergebnisse der Fütterungsversuche. Ein allgemein möglicher Mechanismus hinter der Assoziation zwischen Nahrungsproteinen und der Entwicklung von Autoimmundiabetes könnten immunologische Kreuzreaktionen, sogenannte molekulare Mimikry, sein.

5.1.4 Abschließende Betrachtung der Ernährungsversuche am NOD-Modell

Zusammenfassend konnte im ersten Teil dieser Arbeit der Einfluss von diätetischen Faktoren auf die Diabetesentwicklung im NOD-Modell bestätigt werden. Allerdings wurden die vorher beschriebenen adversen Effekte von Weizen und speziell von Weizengluten hier nicht als solches reproduziert. Der Einfluss von Weizen und Casein scheint eine additive Wirkung auszuüben und resultierte in einem frühzeitigen Diabetesausbruch bei den NOD-Mäusen. Andererseits führten hohe Weizenzusätze (und hieran angepasste Zusätze von Weizengluten, Albuminen und Globulinen) zu einem verzögerten Ausbruch von Autoimmundiabetes und niedrigeren Diabetesinzidenzen. Da im Rahmen dieser Versuchsreihe die selbst entwickelten und klar definierten Versuchsdäten genutzt wurden, war es möglich zu zeigen, dass wahrscheinlich eine Nahrungskomponente allein nicht ausreicht, die Diabetesentwicklung völlig zu verhindern oder andererseits zu triggern. Es bleibt somit nach wie vor spekulativ, ob und welche Bestandteile der Ernährung letztendlich ursächlich an der Entwicklung des Typ 1 Diabetes beteiligt sein könnten.

5.2 Reaktivität von humanen Insulinautoantikörpern mit Hühnerinsulin und IgA-Isotypenmessung

Insulinautoantikörper sind ein Marker der präklinischen Phase des Typ 1 Diabetes bei Kindern, wobei die initial immunisierenden Prozesse, die zur Bildung der IAA führen, weitgehend unbekannt sind. Eine allgemein akzeptierte Vermutung ist, dass eine frühe IAA-Antwort des Immunsystems durch exogene Faktoren, besonders durch Nahrungsbestandteile innerhalb des Gastrointestinaltraktes ausgelöst werden könnte (Norris et al. 2003, Ziegler et al. 2003, Vaarala et al.

1995, Vaarala et al. 1998, Vaarala et al. 1999, Makela et al. 2006). Die Darmmukosa stellt einen sehr wahrscheinlichen Ort für initiale Immunisierungen dar, da über das Darm-assoziierte Immunsystem sowohl Antigene als auch immunkompetente Zellen zu den pankreatischen Lymphknoten gelangen können (Turley et al. 2005). Hinweise, die eine solche Vermutung stützen könnten, wären durch den Nachweis von IAA gegeben, die bevorzugt an Insulin anderer Spezies oder an Nahrungsproteine binden. Die Hypothese einer mukosalen Erstimmunisierung würde weiter durch den Nachweis von IAA erhärtet, die Antikörper des IgA-Isotyps aufweisen. IgA-Antikörper werden unter anderem auf den epithelialen Oberflächen der Darmschleimhaut gebildet, wo sie eine Schutzfunktion gegenüber infektiösen Partikeln und Pathogenen haben, die über die Nahrung in den Gastrointestinaltrakt gelangen.

5.2.1 Bindungsverhalten von Insulinautoantikörpern an Hühnerinsulin in humanen Seren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausgewählte Seren IAA-positiver Kinder mit dem Ziel untersucht, möglicherweise IAA zu identifizieren, die bevorzugt an von humanem Insulin verschiedene Moleküle binden und für die somit möglicherweise nicht humanes Insulin das primäre Zielantigen war. Es wurde eine Auswahl an IAA-positiven Seren verwendet, von denen die Affinitäten zu humanem Insulin bereits aus vorangegangenen Studien bekannt waren (Achenbach et al. 2004 a und b). Bevorzugt wurden Seren mit einer relativ geringen Affinität zu humanem Insulin ausgewählt, da vermutet werden kann, dass eventuell nicht humanes Insulin das primäre Zielantigen dieser IAA ist. Um die Bindungseigenschaften dieser IAA mit Insulin untersuchen zu können, wurde Hühnerinsulin ausgewählt, welches sich von humanem Insulin an den Positionen 8, 9 und 10 der A-Kette und an den Positionen 1, 2, 27 und 30 der B-Kette unterscheidet. Entsprechend den Ergebnissen vorausgegangener Studien zu den Bindungseigenschaften von IAA mit Insulin anderer Spezies (Achenbach et al. 2004 a und b), banden die hoch affinen, Diabetes-relevanten IAA nur schlecht an Hühnerinsulin. Überraschend war das Ergebnis, dass alle der niedrig affinen IAA und ungefähr die Hälfte der moderat affinen IAA im Vergleich zu humanem Insulin bevorzugt an Hühnerinsulin

banden. Demnach war humanes Insulin nicht der favorisierte Ligand der hier untersuchten niedrig/moderat affinen IAA. Obwohl diese IAA im Vergleich zu humanem Insulin eine höhere Affinität zu Hühnerinsulin aufwiesen, war die Menge an Hühnerinsulin, die benötigt wurde, um eine Bindung an Insulin zu verhindern, relativ groß. Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch Hühnerinsulin nicht der Ligand ist, an den diese IAA ursprünglich hoch affin binden und demnach ist es auch wahrscheinlich nicht das primär immunisierende Antigen für die Antikörper. Unabhängig von der Frage, welches Antigen als primär immunisierendes Agens tatsächlich relevant ist, wurde aus den hier vorliegenden Reaktivitäten mit Hühnerinsulin deutlich, dass sich eine humorale Immunität gegenüber humanem Insulin aus Immunreaktionen gegenüber anderen Antigenen entwickeln könnte.

5.2.2 Identifizierung von IgA-Insulinautoantikörper Isotypen in humanen Seren

Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass als Ort der Immunisierung für Diabetes-assoziierte Antikörper die Mucosaoberflächen des Gastrointestinaltraktes relevant sein könnten. Unter Verwendung eines neu entwickelten Assays konnte in den Serumproben mit niedrig affinen IAA, die an Hühnerinsulin banden, eine IgA-IAA-Komponente identifiziert werden. Durch einen pre-clearing Schritt im Testverfahren wurde die IgG-IAA-Komponente entfernt, so dass keine falsch positiven IgA-IAA Ergebnisse durch im Überschuss vorliegende IgG-IAA entstehen konnten. Zusätzlich wurden mit diesem Assay einzelne Seren mit hohen Titern an IAA nachgewiesen, bei denen die IgA-Komponente überwog. Dies stützt die Hypothese, dass eine mukosale Exposition gegenüber Antigenen eine IAA Reaktion hervorrufen kann.

Die hoch affinen IAA, die mit einem hohen Risiko für die Entwicklung von multiplen Autoantikörpern und Typ 1 Diabetes verbunden sind (Achenbach et al. 2004 a und b), banden nicht an Hühnerinsulin und hatten keine IgA-Komponente. Dies legt die Vermutung nahe, dass hier möglicherweise die Immunisierung über die Mucosa nur eine untergeordnete Rolle für die Pathogenese des Typ 1 Diabetes spielt. In der beschriebenen Studie gab es eine Ausnahme, nämlich ein neun Monate altes Kind, was später Typ 1 Diabetes entwickelte. Im Serum dieses

Kindes war eine IgA-IAA-Komponente, die an Hühnerinsulin band, gemeinsam mit den typischen hoch affinen IgG-IAA nachweisbar. Die Nachverfolgung zeigte, dass dieses Kind in der Diabetes-assoziierten Autoimmunreaktion frühzeitig eine IgA-Antwort aufwies, wobei die IgA-Komponente schnell von den typischen hoch affinen IgG-IAA überlagert wurde. Dieser Ablauf untermauert die Hypothese, dass initial eine mukosale Immunisierung gegen ein von humanem Insulin verschiedenes Molekül stattfand und sich die anschließende Immunantwort schnell gegen Inselantigene richtete. Es ist nicht auszuschließen, dass bei anderen Kindern eine solch schnelle Konversion der Antikörper nicht detektiert wurde und eine Phase transienter IgA-IAA aufgrund von relativ großen Zeiträumen zwischen den Nachverfolgungsuntersuchungen häufig unbemerkt bleibt. Möglicherweise sind solche frühen IgA-IAA-Antworten in der Pathogenese von Autoimmundiabetes sogar recht verbreitet.

5.2.3 Abschließende Betrachtung der Tests zu den Bindungseigenschaften und Isotypen der Insulinautoantikörper

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass bei einem kleinen Anteil von Kindern die persistierenden Insulinautoantikörper bevorzugt an nicht-humanes Insulin binden und daher möglicherweise ursprünglich andere Zielmoleküle hatten. Außerdem war es möglich, nachzuweisen, dass einige dieser IAA eine IgA Komponente besitzen, was darauf hinweisen könnte, dass eben diese Antikörper möglicherweise über eine mukosale Exposition mit dem immunisierenden Antigen entstanden sind.

Die Relevanz dieser Ergebnisse für die Pathogenese von Typ 1 Diabetes muss weiter untersucht werden. Insgesamt unterstützen die Resultate der Studie die Hypothese, dass Autoantikörper, die an humanes Insulin binden, durch Immunisierungsreaktionen gegen exogene Antigene an mukosalen Oberflächen und der sich anschließenden Immunkaskade entstehen könnten. Zusammenfassend konnte mit diesen Ergebnissen ein Mechanismus in der gegen Insulin gerichteten humoralen Immunreaktion aufgezeigt werden, der verschiedene exogene Antigene involviert und die Hypothese einer mukosalen Immunisierung unterstützt. Abhängig davon, ob dieser Mechanismus kausal oder

protektiv für Typ 1 Diabetes ist, wird eine zukünftige Identifizierung der Zielantigene dieser mucosalen Immunisierung Komponenten aufzeigen können, die entweder ursächlich an der Autoimmunität gegenüber Insulin beteiligt sind oder neue Wege der Diabetesprotektion eröffnen.

5.3 Bindung kreuzreaktiver Insulinautoantikörper an Casein

In der Literatur werden mehrere Hypothesen zu dem Einfluss von gastrointestinaler Antigenexposition und von Nahrungsbestandteile auf die Entwicklung von Typ 1 Diabetes diskutiert (Lefebvre et al. 2006). Die Einführung von fester Nahrung wird zwar deutlich durch kulturelle Einflüsse und ethnische Zugehörigkeit beeinflusst, aber im allgemeinen werden Säuglinge während der ersten vier bis sechs Monate gestillt und/oder erhalten Formulanahrung. Die Ernährung wird oft erst zwischen 17 und 26 Lebenswochen um weitere Nahrungsmittel wie Getreide, Obst und Gemüse ergänzt (Agostoni et al. 2008). Besonders Weizengluten, bovines Insulin aus der Kuhmilch oder das Casein der Kuhmilch standen bisher im Verdacht, als primär immunisierende Antigene eine Immunkaskade auszulösen, die in einer Autoimmunität gegen humanes Insulin mündet (Norris et al. 2003, Ziegler et al. 2003, Vaarala et al. 1995, 1998, 1999; Makela et al. 2006, Cavallo et al. 1996, Elliott et al. 1997, Thorsdottir et al. 2000). Wie unter 5.2 beschrieben, gelang es, einen möglichen Mechanismus hinter der humoralen Insulin Immunität aufzuzeigen. Diese Untersuchung konnte sowohl eine bevorzugte Bindung von IAA an andere Moleküle als humanes Insulin nachweisen, als auch IAA vom IgA-Isotyp identifizieren, die die Hypothese einer mucosalen Immunisierung stützen (Koczwara et al. 2007).

5.3.1 Untersuchungen zu Bindungseigenschaften der Insulinautoantikörper mit Nahrungsbestandteilen in humanen Seren

Um herauszuarbeiten, ob einige IAA möglicherweise eine Kreuzreaktivität mit Bestandteile der frühkindlichen Ernährung aufweisen, wurden die IAA in ausgewählten Seren auf eine Bindung mit verschiedenen Nahrungsbestandteile und den Proteinfractionen der Kuhmilch untersucht. Die initialen Experimente hierzu konnten zeigen, dass sich bei drei von neun der untersuchten Seren die

IAA-Bindung an markiertes humanes [¹²⁵I] Insulin deutlich durch die Zugabe von Kuhmilchpulver inhibieren ließ, nicht aber mit hydrolisiertem oder hypoallergenem Milchpulver der Säuglingsernährung. Ebenfalls war keine Reaktivität der IAA mit Weizenmehlextrakt oder Geflügelfleischmehlextrakt nachweisbar. Dies untermauert einerseits die Annahme, dass eine erste Immunantwort über die Mucosa und das Darm-assoziierte Immunsystem stattfinden kann. Andererseits spricht dieses Ergebnis dafür, dass nur intakte Proteine eine immunisierende Wirkung haben könnten, da weder für die hydrolisierte noch die hypoallergene Säuglingsnahrung eine Reaktion nachweisbar war. Dies entspricht Ergebnissen, von Hoorfar et al. (1993) und Elliott et al. (1988), die berichteten, dass im Nagermodell hydrolisierte Proteine häufig eine weniger starke diabetogene Wirkung entfalten als intakte Proteine. Durch weitere Testreihen mit 46 Patientenseren konnten insgesamt sechs Seren identifiziert (13%) werden, deren IAA-Bindung an markiertes humanes [¹²⁵I] Insulin mit Milchpulver inhibierbar war. Die genannten sechs Seren dieser milchreaktiven IAA-Proben gehen eine niedrig affine Bindung (1×10^6 bis $3,8 \times 10^8$ L/mol) mit humanem Insulin ein (Achenbach et al. 2004). Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den vorher beschriebenen Analysen bezüglich der IAA Reaktivität mit Hühnerinsulin, bei denen ebenfalls alle Hühnerinsulin-reaktiven IAA-Proben niedrig affin waren. Weiterhin wird nochmals die Hypothese bestätigt, dass IAA, die eine niedrig affine Bindung mit humanem Insulin eingehen, dieses möglicherweise nicht als primäres Zielantigen hatten, sondern sich initial gegen andere Antigene richteten (Koczwara et al. 2007). Die Ergebnisse der beschriebenen Testreihe weisen zusätzlich darauf hin, dass Kuhmilch möglicherweise ein primäres Zielmolekül der gegen Insulin gerichteten Immunantwort sein könnte und demnach die nachgewiesenen milchreaktiven IAA eventuell erst sekundär aus einer ursprünglich gegen ein Nahrungsprotein gerichteten Immunantwort entstanden sind. Von den sechs betroffenen Kinder entwickelte nur eines zusätzlich zu den IAA Autoantikörper gegen GAD (GADA) und keines der Kinder erkrankte während des Nachverfolgungszeitraums an Typ 1 Diabetes. Zusätzlich konnte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit bei drei der milchreaktiven IAA-Proben eine IgA-IAA Komponente nachgewiesen werden (siehe 5.2). Auch diese Resultate fügen sich in die Ergebnisse der Analysen bezüglich der IAA-Reaktivität mit Hühnerinsulin ein

und stärken die Annahme, dass eine initiale Immunantwort des Darm-assoziierten Immunsystems ursprünglich gegen Nahrungsproteine gerichtet sein könnte und sich daraus im weiteren Verlauf die IAA entwickeln.

5.3.2 Untersuchung der Insulinautoantikörperbindung an einzelne Proteinfractionen der Kuhmilch

Da in der Literatur einzelne Milchproteine wie Lactoglobulin, BSA und besonders Casein als möglicherweise diabetogen diskutiert werden (Dosch und Becker 2002), wurden zusätzliche Messungen mit den sechs milchreaktiven Seren durchgeführt und einzelne Proteinfractionen der Kuhmilch benutzt, um die als Antigen in Frage kommende Milchkomponente zu identifizieren. Aus diesen Analysen ergab sich, dass die IAA-Bindung der milchreaktiven IAA an markiertes humanes [¹²⁵I] Insulin mit α - und β -Casein vollständig inhibierbar war, jedoch nicht mit Lactoglobulin oder BSA. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die IAA-Bindung in den untersuchten milchreaktiven Seren an markiertes humanes [¹²⁵I] Insulin deutlich stärker mit α - und β -Casein inhibiert werden konnte als mit humanem Insulin. Die Affinität dieser milchreaktiven IAA zu α - und β -Casein lag eindeutig höher als die zu humanem Insulin.

5.3.3 Abschließende Betrachtung der Tests zu den kreuzreaktiven Insulinautoantikörpern

Möglicherweise könnten diese Versuche darauf hinweisen, dass IAA, die im Assay mit Casein oder gegebenenfalls mit einer anderen Nahrungskomponente reagieren, aus einer Immunantwort hervorgehen, die ursprünglich gegen einen Nahrungsbestandteil gerichtet war. Bei den hier untersuchten Seren zeigten sechs eine Reaktion mit Milchpulver und nachfolgend mit Casein, also mit den intakten Proteinen. Keine Reaktion wurde dagegen mit hydrolysiertes und hypoallergener Säuglingsnahrung oder mit Weizenmehl und Geflügelfleischmehl nachgewiesen. Da bei den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Kindern mit milchreaktiven IAA innerhalb des Nachverfolgungszeitraums kein Typ 1 Diabetes auftrat, besteht die Möglichkeit, dass IAA, die persistierend eine hohe Affinität zu Casein oder eventuell einem anderen (hier nicht untersuchten) Nahrungsbestandteil aufweisen,

sich nur sekundär gegen humanes Insulin richten und die pathogene Immunkaskade, die mit der Entwicklung weiterer Autoantikörper zum Typ 1 Diabetes führen kann, unterbrochen wird. Sollte es möglich sein, diese Vermutung durch weitere Analysen an einem sehr großen Probandenkollektiv mit entsprechender Nachverfolgung zu verifizieren, wäre es möglich, mit einem relativ einfachen Test beim Auftreten von IAA Aussagen bezüglich der Wahrscheinlichkeit einer nachfolgenden Typ 1 Diabetes Erkrankung zu treffen.

5.4 Zukunftsaussichten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es erstmalig möglich, für die Ernährungsversuche im NOD-Mausmodell speziell konzipierte Diäten zu nutzen, die sich nur in der jeweils untersuchten Komponente unterschieden und zudem in der Zusammensetzung sehr einfach aufgebaut waren. Aus den Ergebnissen dieser Experimente mit Casein, Weizen in unterschiedlichen Anteilen, den Weizenproteinfraktionen und weiteren Nahrungsbestandteilen der frühkindlichen Ernährung geht klar hervor, dass ein einzelner Nahrungsbestandteil nicht in der Lage zu sein scheint, im NOD-Modell Autoimmundiabetes auszulösen oder zu verhindern. Bezüglich der Weizenzulage ergab sich ein interessanter, invers dosisabhängiger Effekt. Hier sollte in zukünftigen Ernährungsexperimenten überprüft werden, ob z.B. Vitamin E oder das Fettsäuremuster des Weizens zu einer Modulation inflammatorischer Reaktionen auf der Ebene von Cytokinen führen kann. Ebenso wären Untersuchungen erforderlich, um den additiven Effekt von Proteinen auf die Diabetesentwicklung zu überprüfen wie er für die Kombination von Weizen mit Casein beobachtet wurde. Möglicherweise könnte in diesem Zusammenhang eine veränderte Reaktion des Darm-assoziierten Immunsystems eine entscheidende Rolle spielen. Anknüpfend an die Hypothese zu einer mukosalen Lokalisation der Erstimmunisierung wäre es außerdem interessant, die Wirkung von intakten Proteinen im direkten Vergleich zu hydrolisierten Proteinen auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes im Tiermodell ausführlicher zu erforschen.

Die vorliegenden Untersuchungen zu den Bindungseigenschaften der IAA in humanen Seren mit Hühnerinsulin einerseits und mit Milch und Casein

andererseits zeigten, dass persistierende IAA nachweisbar sind, die sowohl eine IgA-Komponente aufweisen, als auch eine starke Bindung an das untersuchte Casein. Daher erscheint es sinnvoll, die IAA eines großen Probandenkollektivs auf diese Eigenschaften hin zu untersuchen. Da die Probanden mit den als Casein-reaktiv identifizierten IAA in der Nachverfolgung keinen Typ 1 Diabetes entwickelten, sollten die dem häufig in der Literatur beschriebenen diabetogenen Potenzials des Caseins zugrunde liegenden Mechanismen erforscht werden. Dies könnte z.B. Konsequenzen bezüglich des Zeitpunktes der Einführung von Kuhmilch in die kindliche Ernährung bzw. auf Empfehlungen zur Stilldauer von Säuglingen und haben.

Außerdem könnten einfache Tests über den Nachweis von reaktiven IAA, wie hier beispielhaft für Casein dargestellt, neben den bisher etablierten Testverfahren zusätzlich dazu beitragen, weitere prädiktive Aussagen über die Wahrscheinlichkeit einer Typ 1 Diabetes Entwicklung zu treffen.

6 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Typ 1 Diabetes mellitus ist eine chronische, multifaktorielle Autoimmunerkrankung, die aus einer selektiven Zerstörung der insulinproduzierenden pankreatischen β -Zellen resultiert. Inselautoantikörper, die bereits viele Jahre vor der Manifestation der Erkrankung im Blut nachgewiesen werden können, repräsentieren ein spezifisches Charakteristikum im Typ 1 Diabetes und werden für die Diagnostik und Prädiktion des Autoimmundiabetes genutzt. Im Kindesalter sind als erste Antikörper vor allem Insulinautoantikörper (IAA) nachweisbar, weshalb postuliert wurde, dass Insulin das primäre Antigen des Typ 1 Diabetes ist. Im Rahmen einer initialen Immunantwort bei der Pathogenese des Typ 1 Diabetes rückt zunehmend das Darm-assoziierte Immunsystem in den Fokus der Forschung. IgA-Antikörper sind gegen exogene Noxen gerichtet und werden unter anderem auch in der Darmmucosa gebildet. IAA des IgA-Isotyps könnten möglicherweise in der Darmmucosa ursprünglich gegen Nahrungsbestandteile synthetisiert werden und sich im weiteren Verlauf über Mechanismen der molekularen Mimikry gegen körpereigene Proteine, wie das Insulin, richten. Dieser Mechanismus könnte ein Bindeglied zwischen ersten IAA gegen Nahrungsbestandteile, der nachfolgenden Entwicklung weiterer IAA-Antikörper des IgG-Isotyps und der Entstehung von Autoimmundiabetes darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei aufeinander aufbauende Experimente durchgeführt, wobei im ersten Teil mittels Fütterungsversuchen im Nagermodell untersucht wurde, welche Nahrungsbestandteile als erstimmunisierende Antigene im Autoimmundiabetes bedeutsam sein könnten.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Frage der möglichen Lokalisation einer initialen Immunantwort. Dazu wurden in humanen Seren IgA-IAA und die Bindungseigenschaften von IAA an nicht humane Insuline gemessen. Im dritten Teil wurden IAA ausgewählter Seren mit Nahrungsbestandteilen, die einerseits in der frühkindlichen Ernährung eingesetzt werden und andererseits im Verdacht stehen, eine diabetogene Wirkung zu besitzen, auf eine Kreuzreaktivität im Vergleich zu humanem Insulin getestet.

Gemäß der ersten Fragestellung wurden unter Verwendung definierter Diäten, welche sich nur in einem Nahrungsbestandteil unterschieden, Fütterungsversuche mit NOD-Mäusen (ein Inzuchtstamm, dessen weibliche Tiere bis zur dreißigsten Lebenswoche mit einer kumulativen Häufigkeit von 80% spontan Autoimmundiabetes entwickeln) durchgeführt. Die in der Literatur beschriebenen adversen Effekte von Weizen und speziell von Weizengluten auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes konnten in der vorliegenden Untersuchung nicht eindeutig reproduziert werden. Die Kombination von Weizen und Casein zeigte eine additive Wirkung und resultierte in einem frühzeitigen Diabetesausbruch bei den NOD-Mäusen. Hohe Weizenzusätze und hieran angepasste Zusätze von Weizengluten, Weizenalbuminen und -globulinen verlangsamten den Ausbruch von Autoimmundiabetes und reduzierten die Diabetesinzidenz. Der Zusatz von Mais bewirkte eine beschleunigte Diabetesentwicklung. Durch den Einsatz der selbst entwickelten, definierten Versuchsdiäten, war es möglich zu zeigen, dass einerseits ein Nahrungsbestandteil allein wahrscheinlich nicht ausreicht, die Diabetesentwicklung auszulösen oder völlig zu verhindern. Andererseits scheint die Kombination bestimmter Nahrungsbestandteile (z.B. Weizen + Casein) die Diabetesentwicklung zu begünstigen und impliziert Forschungsbedarf für die Zukunft.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden ausgewählte Seren IAA-positiver Kinder mit dem Ziel untersucht, IAA des IgA-Isotyps zu identifizieren, welche möglicherweise ursprünglich durch eine Reaktion gegen bestimmte Nahrungsbestandteile synthetisiert wurden. Darüber hinaus wurden die Seren auf IAA hin untersucht, die bevorzugt an von humanem Insulin verschiedene Moleküle (in diesem Fall Hühnerinsulin) binden und für die somit möglicherweise nicht humanes Insulin das primäre Zielantigen war. Dabei wiesen einzelne Seren relativ hohe IAA-Titer auf, bei denen der IgA-IAA-Isotyp überwog. Dies stützt die Hypothese, dass durch eine mucosale Exposition gegenüber Antigenen eine Immunreaktion stattfinden kann, aus der IAA hervorgehen. Analog zu den Ergebnissen vorausgegangener Studien bezüglich der Bindungseigenschaften von IAA mit Insulinen anderer Spezies, banden die Diabetes-relevanten IAA mit hoher Affinität zu humanem Insulin nur schlecht an Hühnerinsulin. IAA mit niedriger Affinität zu humanem Insulin

hingegen banden bevorzugt an Hühnerinsulin, jedoch scheint Hühnerinsulin nicht das primär immunisierende Antigen zu sein, an das diese IAA ursprünglich hoch affin binden. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse des zweiten Teils auf einen Mechanismus in der gegen Insulin gerichteten humoralen Immunreaktion hin, der mit hoher Wahrscheinlichkeit exogene Antigene involviert. Somit können die Mukosaoberflächen des Gastrointestinaltraktes als Ort der Bildung Diabetes-assoziiertes Antikörper relevant sein. Abhängig davon, ob dieser Mechanismus kausal oder protektiv für Typ 1 Diabetes ist, könnte die Identifizierung von Zielantigenen dieser mukosalen Immunisierung neue Erkenntnisse bezüglich der Ursachen der Autoimmunreaktion gegen Insulin erbringen oder neue Wege für die Diabetesprotektion eröffnen.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die Hypothese untersucht, ob die vorliegenden IAA in ausgewählten humanen Seren eine mögliche Kreuzreaktivität mit verschiedenen Nahrungsbestandteilen der frühkindlichen Ernährung aufweisen. Die Experimente hierzu zeigten, dass sich die IAA-Bindung einzelner Seren an markiertes humanes [¹²⁵I] Insulin deutlich durch die Zugabe von Milchpulverextrakt inhibieren lässt. Mit Weizenmehlextrakt, Geflügelfleischmehlextrakt, hydrolysiertem oder hypoallergenem Milchpulver der Säuglingsernährung war hingegen nur eine geringe Reaktivität der IAA nachweisbar. Die identifizierten milchreaktiven IAA-Proben gingen nur eine niedrig affine Bindung mit humanem Insulin ein, was im Einklang mit den vorher beschriebenen Ergebnissen steht, bei denen ebenfalls alle Hühnerinsulin-reaktiven IAA-Proben eine niedrige Bindungsaffinität zu humanem Insulin hatten. Zusätzliche Messungen mit einzelnen Proteinfractionen der Kuhmilch wurden durchgeführt, um die als Antigen in Frage kommende Milchkomponente zu identifizieren. Daraus ergab sich, dass die IAA-Bindung der milchreaktiven IAA an markiertes humanes [¹²⁵I] Insulin deutlich stärker mit α - und β -Casein inhibiert werden konnte als mit humanem Insulin, jedoch nicht mit Lactoglobulin oder BSA.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass IAA, die mit Casein oder einem anderen Nahrungsbestandteil reagieren, ursprünglich aus einer Immunantwort gegen diese Nahrungsbestandteile hervorgegangen sind. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Kinder mit milchreaktiven IAA entwickelten innerhalb des

Nachverfolgungszeitraums keinen Typ 1 Diabetes. Dies zeigt die Möglichkeit auf, dass IAA, die eine hohe Affinität zu Casein oder anderen im Rahmen dieser Arbeit nicht untersuchten Nahrungsbestandteilen aufweisen, sich nur sekundär gegen humanes Insulin richten. Damit wird die folgende pathogene Immunkaskade, die mit der Entwicklung weiterer Autoantikörper zum Typ 1 Diabetes führen kann, nicht in Gang gesetzt. Sollte sich diese Vermutung durch weitere Analysen an einem großen Probandenkollektiv mit entsprechender Nachverfolgung verifizieren lassen, wäre es möglich, durch einen relativ einfachen Test beim Auftreten von IAA zusätzlich zu den bereits etablierten Testverfahren, Aussagen bezüglich der Wahrscheinlichkeit einer nachfolgenden Typ 1 Diabetes Erkrankung zu treffen.

Zusammenfassend erbrachte die vorliegende Arbeit folgende neue Erkenntnisse bezüglich des Einflusses der Ernährung auf die Entstehung und Behandlung von Typ 1 Diabetes:

- Durch den Einsatz definierter Diäten, die sich nur im jeweils untersuchten Nahrungsbestandteil unterschieden, zeigten die Ernährungsversuche mit NOD-Mäusen einen invers dosisabhängigen Effekt einer Weizenzulage auf die Diabetesentwicklung. Sowohl dieser Aspekt als auch die additive Wirkung von Weizen und Casein auf die Diabetesentwicklung wurden bislang noch nicht beschrieben.
- Die Untersuchungen zu den Bindungseigenschaften der IAA in humanen Seren zeigten, dass persistierende IAA nachweisbar sind, die sowohl eine IgA-Komponente aufweisen als auch eine starke Bindung an das Hühnerinsulin bzw. Kuhmilchproteine. Die Bindung von IAA an einen Nahrungsbestandteil wurde in dieser Arbeit erstmalig beschrieben. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Seren, deren IAA an Moleküle binden, die verschieden von humanem Insulin sind, in den meisten Fällen Antikörper mit niedriger Bindungsaffinität zu humanem Insulin aufweisen. In diesen Seren sind darüber hinaus IAA vom IgA-Isotyp nachweisbar. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die durch aufeinander aufbauenden Untersuchungen gewonnen wurden, unterstützen klar die Hypothese einer mucosalen Erstimmunisierung.

Damit könnten sich über weitere Untersuchungen möglicherweise neue Wege der Diabetesprävention auf Ebene der Ernährung ergeben.

Literatur

- Abiru N**, Yu L, Miao D, Maniatis A K, Liu E, Moriyama H, Eisenbarth G S: Transient insulin autoantibody expression independent of development of diabetes: comparison of NOD and NOR strains. (2001) *Journal of Autoimmunity* 17: 1-6
- Achenbach P**, Bonifacio E, Koczwara K, Ziegler A G: Natural History of Type 1 Diabetes. *Diabetes* (2005) 54: s1-s7
- Achenbach P**, Koczwara K, Knopff A, Naserke H, Ziegler A G, Bonifacio E: Mature high-affinity immune responses to (pro)insulin anticipate the autoimmune cascade that leads to type 1 diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* (2004) 114: 2-10
- Achenbach P**, Warncke K, Reiter J, Naserke H E, Williams A J K, Bingley P J, Bonifacio E; Ziegler A G: Stratification of Type 1 Diabetes Risk on the Basis of Islet Autoantibody Characteristics. *Diabetes* (2004) 53: 384-392
- Agostoni C**, Decsi T, Fewtrell M, Goulet O, Kolacek S, Koletzko B, Michaelsen K F, Moreno L, Puntis J, Rigo J, Shamir R, Szajewska H, Turck D, van Goudoever J; ESPGHAN Committee on Nutrition: Complementary feeding: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *Journal of Pediatrics, Gastroenterology and Nutrition* (2008) 46(1): 99-110
- Akerblom H K**, Virtanen S M, Ilonen J, Savilahti E, Vaarala O, Reunanen A, Teramo K, Hämäläinen A-M, Paronen J, National TRIGR Study Groups: Dietary manipulation of beta cell autoimmunity in infants at increased risk of type 1 diabetes: a pilot study. *Diabetologia* (2005) 48: 829-837
- Arentz-Hansen H**, Fleckenstein B, Molberg O, Scott H, Koning F, Jung G, Roepstorff P, Lundin K E A, Sollid L M: The Molecular Basis for Oat Intolerance in Patients with Celiac Disease. *PLOS Medicine* (2004) 1: 84-92
- Asero R**, Mistrello G, Roncarolo D, Antoniotti P, Cislighi C, Falagiani P: A new apple extract. *Allergy* (1999) 54: 87-88
- Atkinson A**, Eisenbarth G S: Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *The Lancet* (2001) 358: 221-229
- Atkinson A**, Leiter E H: The NOD mouse model of type 1 diabetes: As good as it gets? *Nature Medicine* (1999) 5: 601-604

- Atkinson A**, Maclaren N K: Autoantibodies in nonobese diabetic mice immunoprecipitate 64,000-M islet antigen. *Diabetes* (1988) 37: 1587-1590
- Bach J-F**: Insulin-Dependent Diabetes Mellitus as an Autoimmune Disease. *Endocrine Reviews* (1994) 15: 516-542
- Bardella M T**, Marino R, Meroni P L: Celiac disease during interferon treatment. *Annals of Internal Medicine* (1999) 131: 157-158
- Barker M J**, Barriga K J, Yu L, Miao D, Erlich H, Norris J M, Eisenbarth G S, Rewers M: Prediction of Autoantibody Positivity and Progression to Type 1 Diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (2004) 89: 3396-3902
- Barnett A H**, Eff C, Leslie R D G, Pyke D A: Diabetes in Identical Twins. *Diabetologia* (1981) 20: 87-93
- Battais F**, Pineau F, Popineau Y, Aparicio C, Kanny G, Guerin L, Moneret-Vautrin D A, Denery-Papini S: Food allergy to wheat: identification of immunoglobulin E and immunoglobulin G-binding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour. *Clinical and Experimental Allergy* (2003) 33: 962-970
- Baxter A G**, Cooke A: Complement lytic activity has no role in the pathogenesis of autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* (1993) 11: 1574-1578
- Beales P E**, Elliott R B, Flohé S, Hill J P, Pozzilli P, Wang G-S, Wasmuth H, Scott F W: A multi-centre, blinded international trial of the effect of A¹ and A² β -casein variants on diabetes incidence in two rodent models of spontaneous Type 1 diabetes. *Diabetologia* (2002) 45: 1240-1246
- Belitz H D**, Grosch W, Schieberle P: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 5. Auflage 2001; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- Bell G I**, Horita S, Karam J H: A Polymorphic Locus Near the Human Insulin Gene Is Associated with Insulin-dependent Diabetes Mellitus. *Diabetes* (1984) 33: 176-183
- Bingley P J**, Bonifacio E, Williams A J K, Genovese S, Bottazo G F, Gale E A M: Prediction of IDDM in the General Population. Strategies Based on Combinations of Autoantibody Markers. *Diabetes* (1997) 46: 1701-1710
- Bonifacio E**, Atkinson M, Eisenbarth G, Serreze D, Kay T W H, Lee-Chan E, Singh B: International Workshop on Lessons From Animal Models for

- Human Type 1 Diabetes. Identification of Insulin but Not Glutamic Acid Decarboxylase or IA-2 as Specific Autoantigens of Humoral Autoimmunity on Nonobese Diabetic Mice. *Diabetes* (2001) 50: 2451-2458
- Bonifacio E**, Schmid S, Hummel M, Ziegler A G, Walter M: IDDM1 and Multiple Family History of Type 1 Diabetes Combine to Identify Neonates at High Risk for Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* (2004) 27: 2695-2700
- Bonifacio E**, Ziegler A G, Hummel M, Dittler J, Lampasona V, Pastore M R, Bosi E: Gluten: is it also a determinant of islet autoimmunity? *Diabetes Metabolic Reviews* (1998) 24: 259-260
- Bosi E**, Molteni L, Radaelli M G, Folini L, Fermo I, Bazzigaluppi E, Piemonti L, Pastore M R, Parone R: Increased intestinal permeability precedes clinical onset of type 1 diabetes. *Diabetologia* (2006) 49: 2824-2827
- Bruno G**: Prevalence of Type 1 Diabetes-Related Autoantibodies in Adults With Celiac Disease. *Diabetes Care* (2003) 26: 1644
- Bürk K**, Bösch S, Müller C A, Melms A, Zühlke C, Stern M, Besenthal I, Skalej M, Ruck P, Ferber S, Klockgether T, Dichgans J: Sporadic cerebellar ataxia associated with gluten sensitivity. *Brain* (2001) 124:1013-9
- Cavallo M G**, Fava D, Monetini L, Barone F, Pozzilli P: Cell-mediated immune response to beta casein in recent-onset insulin-dependent diabetes: implications for disease pathogenesis. *Lancet* (1996) 348: 926-8
- Cehade M**, Mayer L: Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2005) 115: 3-12
- Ciccocioppo R**, Di Sabatino A, Corazza G R: The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clinical and Experimental Immunology* (2005)140: 408-416
- Cima I**, Corazza N, Dick B, Fuhrer A, Herren S, Jakob S, Ayuni E, Mueller C, Brunner T: Intestinal Epithelial Cells Synthesize Glucocorticoids and Regulate T Cell Activation. *J Exp Med* (2004) Vol 200, Nr. 12, 1635-1646
- Clemente M G**, De Virgiliis S, Kang J S, Macatagney R, Musu M P, Di Pierro M R, Drago S, Congio M, Fasano A: Early effects fo gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut* (2003) 52: 218-223
- Coleman D L**, Kuzava J E, Leiter E H: Effect of Diet on Incidence of Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *Diabetes* (1990) 39: 432-436

- Coppo R**, Mazzucco G, Martina G, Roccatello D, Amore A, Novara R, Bargoni A, Piccoli G, Sena L M: Gluten-Induced Experimental IgA Glomerulopathy. Laboratory Investigation (1989) Vol. 60, Nr. 4, 499-506
- Couper J J**, Steele C, Beresford S, Powell T, Mccaul K, Pollard A, Gellert S, Tait B, Harrison L C, Colman P G: Lack of Association Between Duration of Breast-Feeding or Introduction of Cow's Milk and Development of Islet Autoimmunity. Diabetes (1999) 18: 2145-2149
- Davies J L**, Kawaguchi Y, Bennet S T, Copeman J B, Cordell H J, Pritchard L E, Reed P W, Gough S C L, Jenkins S C, Palmer S M, Balfour K M, Rowe B R, Farral M, Barnett A H, Bain S C, Todd J A: A genome-wide search for human type 1 diabetets susceptibility genes. Nature (1994) 371: 130-136
- Delovitch T L**, Singh B: The Nonobese Diabetic Mouse as a Model of Autoimmune Diabetes: Immune Dysregulation Gets the NOD. Immunity (1997) 7:727-738
- Désormeaux A**, Blochet J-E, Pézolet M, Marion D: Amino acid sequence of a non-specific wheat phospholipid transfer protein and its conformation as revealed by infrared and Raman spectroscopy. Role of disulfide bridges and phospholipids in the stabilization fo the α -helix structure. Biochimica Biophysica Acta (1992) 1121: 137-152
- Dieterich W**, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken E O, Schuppan D: Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nature Medicine (1997) 3: 797-801
- Dieterich W**, Esslinger B, Schuppan D: Pahtomechanisms in Celiac Disease. International Archives of Allergy and Immunology (2003) 132: 98-108
- Dilworth L L**, Omoruyi F O, Simon O R, Morrison E Y, Asemota H N: The effect of phytic acid on the levels of blood glucose and some enzymes of carbohydrate and lipid metabolism. West Indian Medicine Journal (2005) 54: 102-106
- Dosch H M**, Becker DJ: Infant feeding and autoimmune diabetes. Advances in Experimental Medicine and Biology (2002) 503:133-140
- Elliott R B**, Reddy S N, Bibby N J, Kida K: Dietary prevention of diabetes in the non-obese diabetic mouse. Diabetologia (1988) 31(1): 62-64

- Fasano A**, Not T, Wang W, Uzzau S, Berti I, Tomassini A, Goldblum S: Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet* (2000) 355: 1518-1519
- Field L L**: Genetic linkage and association studies of Type 1 diabetes: challenges and rewards. *Diabetologia* (2002) 45: 21-35
- Filippi C**, Von Herrath M: How viral infections affect the autoimmune process leading to type 1 diabetes. *Cellular Immunology* (2005) 233: 125-132
- Flohé S B**, Wasmuth H E, Kerad J B, Beales P E, Pozzilli P, Elliott R B, Hill J P, Scott F W, Kolb H: A wheat-based, diabetes promoting diet induces a Th1-type cytokine bias in the gut of NOD mice. *Cytokine* (2003) 149-154
- Foulis A K**, Liddle C N, Farquaharson M A, Richmond J A, Weir R S: The histopathology of the pancreas in Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia* (1986) 29: 267-274
- Fu B X**, Sapirstein H D, Bushuk W: Salt-Induced Disaggregation/ Solubilization of Gliadin and Glutenin Proteins in Water. *Journal of Cereal Science* (1996) 24: 241-246
- Funda D P**, Kaas A, Bock T, Tlaskalová-Hogenová H, Buschard K: Gluten-free Diet Prevents Diabetes in NOD Mice. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* (1999) 15: 323-327
- Funda D P**, Kaas A, Tlaskalová-Hogenová H, Buschard K. Gluten-free but also gluten-enriched (gluten+) diet prevent diabetes in NOD mice; the gluten enigma in type 1 diabetes. *Diabetes Metabolism Research Reviews* (2008) 1: 59-63.
- Gepts W**: Pathologic Anatomy of the Pancreas in Juvenile Diabetes Mellitus. *Diabetes* (1965) 14: 619-632
- Gianani R**, Eisenbarth G S: The stages of type 1A diabetes 2005. *Immunological Reviews* (2005) 204: 232-249
- Gillespie K M**, Bain S C, Barnett A H, Bingley P J, Christie M R, Gill G V, Gale E A M: The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution fo high-risk HLA haplotypes. *Lancet* (2004) 364:1699-1700

- Hadjivassiliou M**, Gibson A, Davies-Jones G A, Lobo A J, Stephenson T J, Milford-Ward A: Does cryptic gluten sensitivity play a part in neurological illness? *Lancet* (1996) 8998: 369-71
- Harrison L C**, Honeyman M C: Cow's Milk and Type 1 Diabetes The Real Debate Is About Mucosal Immune Function. *Diabetes* (1999) 48: 1501-1507
- Haskins K**, Wegmann D: Diabetogenic T-Cell Clones. *Diabetes* (1996) 45: 1299-1305
- Hattori M**, Buse Jb, Jackson R A, Glimcher L, Dorf M E, Minami M, Makino S, Morikawa K, Kuzuya H, Imura H et al.: The NOD mouse: recessive diabetogenic gene in the major histocompatibility complex. *Science* (1986) 231: 733-735
- Helms S**: Celiac Disease and Gluten-Associated Diseases. *Alternative Medicine Review* 2005; 10:172-192
- Hermann R**, Laine A P, Veijola R, Vahlberg T, Simell S, Lähde J, Simell O, Knip M: The effect of HLA class II, insulin and CTLA4 gene regions on the development of humoral beta cell autoimmunity. *Diabetologia* (2005) 48: 1766-1775
- Hilger C**, Grigioni F, De Beaufort C, Michel G, Freilinger J, Hentges F: Differential binding of IgG and IgA antibodies to antigenic determinants of bovine serum albumin. *Clinical Experimental Immunology* (2001) 3: 387-94.
- Hoffmann A**, Jamin A, Foetisch K, May S, Aulepp H, Hausteiner D, Vieths S: Determination of the allergenic activity of birch pollen and apple prick test solutions by measurement of β -hexosaminidase release from RBL-2H₃ cells. Comparison with classical methods in allergen standardization. *Allergy* (1999) 54: 446-454
- Hoorfar J**, Buschard K, Brogren C-H: Impact of Dietary Protein and Fat Source on the Development of Insulin-Dependent Diabetes in the BB Rat. *Diabetes Research* (1992) 20: 33-41
- Hoorfar J**, Buschard K, Dagnaes-Hansen F: Prophylactic nutritional modification for the incidence of diabetes in autoimmune non-obese diabetic (NOD) mice. *British Journal of Nutrition* (1993) 69: 597-607
- Hummel M**, Bonifacio E, Schmid S, Walter M, Knopff A, Ziegler A G: Early Appearance of Islet Autoantibodies Predicts Childhood Type 1 Diabetes in

- Offspring of Diabetic Parents. *Annals of Internal Medicine* (2004) 140: 882-886
- Hummel M**, Bonifacio E, Stern M, Dittler J, Schimmel A, Ziegler A G: Development of celiac disease-associated antibodies in offspring of parents with Type 1 Diabetes. *Diabetologia* (2000) 43: 1005-1011
- Hummel M**, Naserke H E, Bonifacio E, Ziegler A G: Elimination of Dietary Gluten Does Not Reduce Titers of Type 1 Diabetes-Associated Autoantibodies in High-Risk Subjects. *Diabetes Care* (2002) 25: 1111-1116
- Hummel M**, Ziegler A G: Genetik, Autoimmunphänomene und Umweltfaktoren des Prä-Typ-1-Diabetes. *Diabetes und Stoffwechsel* (2002) 11:77-84
- Hummel M**, Ziegler A G: Prädiktion des Typ 1 Diabetes. *Diabetes, Stoffwechsel und Herz* (2006) 1: 55-64
- Hummel S**, Hummel M, Banholzer J, Hanak D, Mollenhauer U, Bonifacio E, Ziegler A G: Development of autoimmunity to transglutaminase C in children of patients with type 1 diabetes: relationship to islet autoantibodies and infant feeding. *Diabetologia* 2007; 50: 390-394
- Hyppönen E**: Micronutrients and the risk of type 1 diabetes: vitamin D, vitamin E, and nicotinamide. *Nutrition Reviews* (2004) 9: 340-7
- Hyttinen V**, Kaprio J, Kinnunen L, Koskenvuo M, Tuomiheto J: Genetic Liability of Type 1 Diabetes and Onset Age Among 22,650 Young Finnish Twin Pairs. *Diabetes* (2003) 52: 1052-1055
- Idris W H**, Babiker E E, El Tinay A H: Fractionation, solubility and functional properties of wheat bran proteins as influenced by pH and/or salt concentration. *Food* (2003) 47: 425-429
- Ivarsson A**, La Persson, L Nyström, H Ascher, B Cavell, L Danielsson, A Dannaeus, T Lindberg, B Lindquist, L Stenhammer, O Hernell: Epidemic of coeliac disease in Swedish children. *Acta Paediatrica* (2000) 89: 165-171
- James S P**: Prototypic disorders of gastrointestinal mucosal immune function: Celiac disease and Crohn's disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2005) Vol. 115, Nr. 1, 25-30
- Jones R W**, Taylor N W, Senti F R: Electrophoresis and fractionation of wheat gluten. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1959) 84: 363-376

- Karges W**, Hammond-McKibben D, Cheung R K, Visconti M, Shibuya N, Kemp D, Dosch H M: Immunological aspects of nutritional diabetes prevention in NOD mice: a pilot study for the cow's milk-based IDDM prevention trial. *Diabetes* (1997) 4: 557-64
- Karjalainen J**, Martin J M, Knip M, Ilonen J, Robinson B H, Savilahti E, Akerblom H K, Dosch H M: A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* (1992) 5 :302-7
- Katz J**, Benoist C, Mathis D: T Helper Cell Subsets in Insulin-Dependent Diabetes. *Science* (1995) 268: 1185-1188
- Kersting M**: Ernährung des gesunden Säuglings. *Monatsschrift Kinderheilkunde* (2001) 149: 4-10
- Kielwein G**: Leitfaden der Milchkunde und Milchhygiene. 3. neubearbeitete Auflage, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin 1994
- Kimpimäki T**, Erkkola M, Korhonen S, Kupila A, Virtanen S M, Ilonen J, Simell O, Knip M: Short-term exclusive breastfeeding predisposes young children with increased genetic risk of Type 1 diabetes to progressive beta-cell autoimmunity. *Diabetologia* (2001) 44: 63-69
- Klemetti P**, Savilahti E, Ilonen J, Akerblom Hk, Vaarala O: T-Cell Reactivity to Wheat Gluten in Patients with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Scandinavian Journal of Immunology* (1998) 47: 48-53
- Koczwara K**, Mueller D, Achenbach P, Ziegler A G, Bonifacio E: Identification of insulin autoantibodies of IgA isotype that preferentially target non-human insulin. *Clinical Immunology* (2007) 1: 77-82
- Koning F**: Celiac Disease. Caught Between a Rock and a Hard Place. *Gastroenterology* (2005) 129: 1294-1301
- Kreft D**, Bauer R, Goerlich R: Nahrungsmittelallergene. Charakteristika und Wirkungsweisen. (1995) Walter de Gruyter, Berlin, New York
- Kristjánsson G**, Högman M, Venge P, Hällgren R: Gut mucosal granulocyte activation precedes nitric oxide production: studies in coeliac patients challenged with gluten and corn. *Gut* (2005) 54: 769-774
- Lampasona V**, Bonfanti R, Bazzigaluppi E, Venerando A, Chiumello G, Bosi E, Bonifacio E: Antibodies to tissue transglutaminase C in Type 1 diabetes. *Diabetologia* (1999) 42: 1195-1198

- Lee S Y**, Park H J, Chun H K, Cho S Y, Cho S M, Hyun S L:
- Lefebvre D E**, Powell K L, Strom A, Scott F W: Dietary proteins as environmental modifiers of type 1 diabetes mellitus. *Annual Reviews of Nutrition* (2006) 26: 175-202
- Leslie D**, Lipsky P, Notkins A L: Autoantibodies as predictors of disease. *The Journal of Clinical Investigation* (2001) 108: 1417-1422
- Linn T**, Strate C, Schneider K: Diet Promotes β -Cell Loss by Apoptosis in Prediabetic Nonobese Diabetic Mice. *Endocrinology* (1999) 140: 3767-3773
- Londei M**, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Quarantino S, Maiuri L: Gliadin as a stimulator of innate responses in celiac disease. *Molecular Immunology* (2005) 42: 913-918
- Lundin K E A**, Nilsen E M, Scott H G, Løberg E M, Gjøen A, Bratlie J, Skar V, Mendez E, Løvik A, Kett K: Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut* (1993) 52: 1649-1652
- MacFarlane A J**, Burghardt K M, Kelly J, Simell T, Simell O, Altosaar I, Scott F W: A Type 1 Diabetes-related Protein from Wheat (*Triticum aestivum*). *The Journal of Biological Chemistry* (2003) 278: 54-63
- Mäkelä M**, Vaarala O, Hermann R, Salminen K, Vahlberg T, Veijola R, Hyöty H, Knip M, Simell O, Ilonen J: Enteral virus infections in early childhood and an enhanced type 1 diabetes-associated antibody response to dietary insulin. *Journal of Autoimmunity* (2006) 1: 54-61
- Makino S**, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y: Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* (1980) 29: 1-13
- Malaisse W J**, Courtois P, Scott F W: Insulin-dependent diabetes and gut dysfunction: the BB-rat model. *Hormone Metabolism Research* (2004) 36: 585-594
- Marsh M N**: Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. *Gastroenterology* (1992) 102: 330-54
- Maurano F**, Mazzarella G, Stefanile R, D'ariento R, Rossi M, Auricchio S, Troncone R: Small intestinal enteropathy in non-obese diabetic mice fed a diet containing wheat. *Diabetologia* (2005) 48: 931-937

- Meddings J B**, Jarand J, Urbanski J, Hardin J, Gall D G: Increased gastrointestinal permeability is an early lesion in the spontaneously diabetic BB rat. *American Journal of Physiology* (1999) 276: 951-957
- Meize-Grochowski R**: Celiac Disease. A Multisystem Disorder. *Gastroenterology Nursing* (2005) 28: 394-402
- Metcalfe K A**, Hitman G A, Rowe R E, Hawa M, Huang X, Stewart T, Leslie R D G: Concordance for Type 1 Diabetes in Identical Twins Is Affected by Insulin Genotype. *Diabetes Care* (2001) 24: 838-842
- Mimouni B**, Robin J M, Azanza J-L, Raymond J: Wheat Flour Proteins: Isolation and Functionality of Gliadin and HMW-Glutenin Enriched Fractions. *Journal of Food Science and Agriculture* (1998) 78: 423-428
- Miyazaki A**, Hanafusa T, Yamada K, Miyagawa J, Fujino-Kurihara H, Nakajima H, Nonaka K, Tarui S: Predominance of T lymphocytes in pancreatic islets and spleen of pre-diabetic non-obese diabetic (NOD) mice: a longitudinal study. *Clinical Experimental Immunology* (1985) 60: 622-630
- Murray J A**: The widening spectrum of celiac disease. *American Journal of Clinical Nutrition* (1999) 69: 354-365
- Myers M A**, Hettiarachchi K D, Ludeman J P, Wilson A J, Wilson C R, Zimmet P Z: Dietary Microbial Toxins and Type 1 Diabetes. *Annals of the N.Y. Academic Sciences* (2003) 1005: 418-422
- Nash A M**, Eldridge A C, Wolf W J: Fractionation and Characterization of Alcohol Extractables Associated with Soybean Proteins. Nonprotein Components. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* (1967) 15: 102-108
- newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet* (2000) 355: 1518-1519
- Nicolas Y**, Martinant J-P, Denery-Papini S, Popineau Y: Analysis of Wheat Storage Proteins by Exhaustive Sequential Extraction Followed by RP-HPLC and Nitrogen Determination. *Journal Sci Food Agric* (1998) 77: 96-102
- Noorchashm H**, Noorchashm N, Kern J, Rostani S Y, Barker C F, Naji A: B-Cells Are Required for the Initiation of Insulinitis and Sialitis in Nonobese Diabetic Mice. *Diabetes* (1997) 46: 941-946

- Norris J M**, Barriga K, Klingensmith G, Hoffman M, Eisenbarth G S, Erlich H A, Rewers M: Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA* (2003) 290: 1721-1728
- Norris J M**, Beaty B, Klingensmith G, Yu Liping, Hoffman M, Chase H P, Erlich H A, Hamman R F, Eisenbarth G S, Rewers M: Lack of association between early exposure to cow's milk protein and beta-cell autoimmunity. Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *JAMA* (1996) 8: 609-14
- Olmos P**, A'hern R, Heaton D A, Millward B A, Risley D, Pyke D A, Leslie R D G: The significance of the concordance rate for Type 1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins. *Diabetologia* (1998) 31: 747-750
- Osborne T B**: The proteins of the wheat kernel. Carnegie Institution Publications (1907) 84
- Panlasigui L N**, Thompson L U: Blood glucose lowering effects of brown rice in normal and diabetic subjects. *International Journal of Food Science and Nutrition* (2006) 57: 151-158
- Paronen J**, Knip M, Savilahti E, Virtanen S M, Ilonen J, Åkerblom H K, Vaarala O: Finnish Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk Study Group: Effect of Cow's Milk Exposure and Maternal Type 1 Diabetes on Cellular and Humoral Immunization to Dietary Insulin in Infants at Genetic Risk for Type 1 Diabetes. *Diabetes* (2000) 49: 1657-1665
- Paxson J A**, Weber J G, Kulczycki A: Cow's Milk-Free Diet Does Not Prevent Diabetes in NOD Mice. *Diabetes* (1997) 46: 1711-1717
- Persaud D R**, Barranco-Mendoza A: Bovine serum albumin and insulin-dependent diabetes mellitus; is cow's milk still a possible toxicological causative agent of diabetes? *Food Chemistry and Toxicology* (2004) 5: 707-14
- Polizzi A**, Finocchiaro M, Parano E, Pavone P, Musumeci S, Polizzi A: Recurrent peripheral neuropathy in a girl with celiac disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* (2000) 1: 104-5
- Pugliese A**, Eisenbarth G S: Type 1 Diabetes Mellitus of Man: Genetic Susceptibility and Resistance. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. (2004) 552:170-203

- Rami B**, Schober E: Diabetes Mellitus und Zöliakie. *Kinder und Jugendmedizin* (2005) 4: 193-196
- Reddy S**, Bibby N J, Elliott R B: Ontogeny of islet cell antibodies, insulin autoantibodies and insulinitis in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia* (1998) 31: 322-328
- Redondo M J**, Yu L, Hawa M, Mackenzie T, Pyke D A, Eisenbarth G S, Leslie R D G: Heterogeneity of Type 1 Diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States. *Diabetologia* (2001) 44: 354-362
- Reif S**, Lerner A: Tissue transglutaminase - the key player in celiac disease: a review. *Autoimmunity* (2004) 3: 40-45
- Sampson H A**: Food allergy: When mucosal immunity goes wrong. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2005) 115: 139-141
- Sapone A**, De Magistris L, Pietzak M, Clemente Mg, Tripathgi A, Cucca F, Öamis R, Kryszak D, Carteni M, Generoso M, Iafusco D, Prisco F, Laghi F, Tiegler G, Carratu R, Counts D, Fasano A: Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes* (2006) 55:1443-1449
- Saruger E**, Dozio N, Meschi F, Pastore M R, Bonifacio E: Cellular and Humoral Immunity against Cow's Milk Proteins in Type 1 Diabetes. *Journal of Autoimmunity* (1999) 13: 365-373
- Schenker M**, Hummel M, Ferber K, Walter M, Keller E, Albert E D, Janka H-U, Kastendiek C, Sorger M, Louwen F, Ziegler A G: Early expression and high prevalence of islet autoantibodies for DR3/4 heterozygous and DR4/4 homozygous offspring of parents with Type 1 diabetes: The German BABYDIAB study. *Diabetologia* (1999) 42:671-677
- Schmid S**, Buuck D, Knopff A, Bonifacio E, Ziegler A G: BABYDIET, a feasibility study to prevent the appearance of islet autoantibodies in relatives of patients with Type 1 diabetes by delaying the exposure to gluten. *Diabetologia* (2004) 47:1130-1131
- Schmid S**, Koczwara K, Schwinghammer S, Lampasona V, Ziegler A G, Bonifacio E: Delayed exposure to wheat and barley proteins reduces diabetes incidence in non-obese diabetic mice. *Clinical Immunology* (2004) 111: 108-118

- Scott F W**, Daneman D, Martin J M: Evidence for a critical role fo diet in the development of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Research* (1998) 7: 153-157
- Scott F W**, Roswell P, Wang G-S, Burghardt K, Kolb H, Flohé S: Oral Exposure to Diabetes-Promoting Food or Immunomodulators in Neonates Alters Gut Cytokines and Diabetes. *Diabetes* (2002) 51: 73-78
- Secondulfo M**, Iafusco D, Carratu R, Demagistris L, Sapone A, Generoso M, Mezzogiomo A, Sasso F C, Carteni M, De Rosa R, Prisco F, Esposito V: Ultrastructural mucosal alterations and increased intestinal permeability in non-celiac, type 1 diabetic patients. *Digestive and Liver Disease* (2004) 36: 35-45
- Serreze D V**, Fleming S A, Chapman H D, Richard S D, Leiter E H, Tisch R M: B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Journal of Immunology* (1998) 8: 3912-8
- Shewry P R**, Napier J A, Tatham A S: Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. *The Plant Cell* (1995) 7: 945-956
- Shewry P R**, Tatham A S: Disulphide Bonds in Wheat Gluten Proteins. *Journal of Cereal Science* (1997) 25: 207-227
- Sollid L M**: Celiac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature Reviews of Immunology* (2002) 348: 2517-2524
- Somoza N**, Vargas F, Roura-Mir C, Vives-Pi M, Fernández-Figueras M T, Ariza A, Gomis R, Bragado R, Martí M, Jaraquemada D, et al. Pancreas in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. Changes in HLA, adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor V beta usage, and cytokine profile. *Journal of Immunology* (1994) 3:1360-77
- Souci S W**, Fachmann W, Kraut H: Die Zusammensetzung der Lebensmittel Nährwert-Tabellen 1989/90. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 4. Auflage 1989
- Spinas G A**, Lehmann R: Der Diabetes mellitus: Diagnose, Klassifikation und Pathogenese. *Schweiz Medizinisches Forum* (2001) 20: 519-525
- Steck A K**, Bugawan T L, Valdes A M, Emery L M, Blair A, Norris J M, Redono M J, Babu S R, Erlich H A, Eisenbarth G S, Rewers M J: Association of

- Non-HLA Genes With Type 1 Diabetes Autoimmunity. *Diabetes* (2005) 54: 2482-2486
- Strobel S**, Mowat AM: Immune responses to dietary antigens: oral tolerance *Immunology Today* (1998) 4: 173-81
- Sutherland D E**, Sibley R, Xu X Z, Michael A, Srikanta A M, Taub F, Najarian J, Goetz F C: Twin-to-twin pancreas transplantation: reversal and reenactment of the pathogenesis of type I diabetes. *Transplantation Association of American Physicians* (1984) 97:80-7.
- Thorsdottir I**, Birgisdottir B E, Johannsdottir I M, Harris D P, Hill J, Steingrimsdottir L, Thorsson A V: Different beta-casein fractions in Icelandic versus Scandinavian cow's milk may influence diabetogenicity of cow's milk in infancy and explain low incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in Iceland. *Pediatrics* (2000) 4: 719-24.
- Tiittanen M**, Paronen J, Savilahti E, Virtanen S M, Ilonen J, Knip M, Akerblom H K, Vaarala O; Finnish TRIGR Study Group: Dietary insulin as an immunogen and tolerogen. *Pediatric Allergy and Immunology* (2006) 7: 538-43
- Todd J A**, Walker N M, Cooper J D, Smyth D J, Downes K, Plagnol V, Bailey R, Nejentsev S, Field S F, Payne F, Lowe C E, Szeszko J S, Hafler J P, Zeitels L, Yang J H, Vella A, Nutland S, Stevens H E, Schuilenburg H, Coleman G, Maisuria M, Meadows W, Smink L J, Healy B, Burren O S, Lam A A, Ovington N R, Allen J, Adlem E, Leung H T, Wallace C, Howson J M, Guja C, Ionescu-Tîrgoviște C; Genetics Of Type 1 Diabetes In Finland, Simmonds M J, Heward J M, Gough S C; Wellcome Trust Case Control Consortium, Dunger D B, Wicker L S, Clayton D G: Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nature Genetics* (2007) 39: 857-64.
- Truswell A S**: The A2 milk case: a critical review. *European Journal of Clinical Nutrition* (2005) 59: 623-631
- Turley S J**, Lee J-W, Dutton-Swain N, Mathis D, Benoist C: Endocrine self and gut non-self intersect in the pancreatic lymph nodes. *PNAS* (2005) 102: 17729-17733

- Usai P**, Usai Satta P, Lai M, Corda M G, Piras E, Calcara C, Boy M F, Morelli A, Balestrieri A, Bassotti G. Autonomic dysfunction and upper digestive functional disorders in untreated adult coeliac disease. *European Journal of Clinical Investigation* (1997) 12: 1009-15.
- Vaarala O**, Knip M, Paronen J, Hämäläinen A-M, Muona P, Väättäin M, Ilonen J, Simell O, Åkerblom H K: Cow's Milk Formula Feeding Induces Primary Immunization to Insulin in Infants at Genetic Risk for Type 1 Diabetes. *Diabetes* (1999) 48: 1389-1392
- Vaarala O**, Saukkonen T, Savilahti E, Klemola T, Akerblom H K: Development of immune response to cow's milk proteins in infants receiving cow's milk or hydrolyzed formula. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (1995) 96: 917-23.
- Vaarala O**: Is it dietary insulin? *Annals of the New York Academy of Science* (2006) 1079 :350-9
- Vaarala O**: The role of the gut in beta-cell autoimmunity and type 1 diabetes: a hypothesis. *Pediatric Diabetes* (2000) 4: 217-25
- Vader W L**, Stepniak D T, Bunnik E M, Kooy Y M, De Haan W, Drijfhout J W, Van Veelen P A, Koning F: Characterization of Cereal Toxicity for Celiac Disease Patients Based on Protein Homology in Grains. *Gastroenterology* (2003) 125: 1105-1113
- Van Niel G**, Mallegol J, Bevilacqua C, Candalh C, Brugiere S, Tomaskovic-Crook E, Heath Jk, Cerf-Bensussan N, Heyman M: Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut* (2003) 52: 1690-1697
- Van Odijk J**, Hulthén L, Ahlstedt S, Borres M P: Introduction of food during the infant's first year: a study with emphasis on introduction of gluten and of egg, fish and peanut in allergy-risk families. *Acta Pædiatr* (2004) 93: 464-470
- Ventura A**, Magazzu G, Greco L: Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. *Gastroenterology* (1999) 117: 297-303

- Ventura A**, Neri E, Ughi C, Leopaldi A, Città A, Not T: Gluten-dependent diabetes-related and thyroid-related autoantibodies in patients with celiac disease. *The Journal of Pediatrics* (2000) 137: 263-265
- Virtanen S M**, Knip M: Nutritional risk predictors of β cell autoimmunity and type 1 diabetes at a young age. *American Journal of Clinical Nutrition* (2003) 78: 1053-1067
- Virtanen S M**, Läärä E, Hyppönen E, Reijonen H, Räsänen L, Aro A, Knip M, Ilonen J, Åkerblom H K: Childhood Diabetes in Finland Study Group: Cow's Milk Consumption, HLA-DQB1 Genotype, and Type 1 Diabetes. *Diabetes* (2000) 49: 912-917
- Wahlberg J**, Vaarala O, Ludvigsson J, ABIS-study group: Dietary risk factors for the emergence of type 1 diabetes-related autoantibodies in 21/2 year-old Swedish children. *British Journal of Nutrition* (2006) 3: 603-8
- Wasmuth H E**, Kolb H: Cow's milk and immune-mediated diabetes. *Proceedings of the Nutrition Society* (2000) 4: 573-9
- Watts T**, Berti I, Sapone A, Gerarduzzi T, Not T, Zielke R, Fasano A: Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type 1 diabetes in BB diabetic-prone rats. *PNAS* (2005) 102: 2916-2921
- Wenzlau J M**, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar S A, Gottlieb P, Rewers M, Eisenbarth G S, Jensen J, Davidson H W, Hutton J C: The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *PNAS* (2007) 43: 17040-17045
- Wilson K**, Goulding K H: *Methoden der Biochemie*. (1991) 3. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- Yu L**, Robles D T, Abiru N, Kaur P, Rewers M, Kelemen K, Eisenbarth G S : Sexual dimorphism in transmission of expression of islet autoantibodies to offspring. *Diabetologia* (1995) 38: 1353-1357
- Ziegler A G**, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E: Autoantibody Appearance and Risk for Development of Childhood Diabetes in Offspring of Parents With Type 1 Diabetes. *Diabetes* (1999) 48:460-468
- Ziegler A G**, Hummel M: Entstehung des Typ-1-Diabetes - Die ersten Lebensjahre sind entscheidend. *Deutsches Ärzteblatt* (2001) 19: c1003-c1008

- Ziegler A G**, Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E: Early Infant Feeding and Risk of Developing Type 1 Diabetes-Associated Autoantibodies. *JAMA* (2003) 290: 1721-1728
- Ziegler A G**, Vardi P, Gross D J, Bonner-Weir S, Villa-Komaroff L, Halban P A, Ikegami H, Soeldner J S, Eisenbarth G S: Production of insulin antibodies by mice rejecting insulin transfected cells. *Journal of Autoimmunity* (1989 a) 3: 219-27
- Ziegler A G**, Vardi P, Ricker A T, Hattori M, Soeldner J S, Eisenbarth G S: Radioassay determination of insulin autoantibodies in NOD mice. Correlation with increased risk of progression to overt diabetes. *Diabetes* (1989 b) 3: 358-63

Vorveröffentlichungen

Development of autoimmunity to transglutaminase C in children of patients with type 1 diabetes: relationship to islet autoantibodies and infant feeding.

Hummel S, Hummel M, Banholzer J, Hanak D, Mollenhauer U, Bonifacio E, Ziegler AG. Diabetologia 2007, 50: 390-4. Epub 2006 Dec 14.

Identification of insulin autoantibodies of IgA isotype that preferentially target non-human insulin. Kerstin Koczwar, Daniela Müller, Peter Achenbach,

Anette-G. Ziegler, Ezio Bonifacio. Clin Immun 2007, 124: 77-82

Gluten und Immunerkrankungen. Daniela B. Müller, Sandra Hummel, Anette-Gabriele Ziegler, Michael Hummel. Aktuel Ernaehr Med 2007, 32: 1-8

Influence of early nutritional components on the development of murine autoimmune diabetes. Daniela B. Mueller, Kerstin Koczwar, Andreas S.

Mueller, Josef Pallauf, Anette-G. Ziegler, Ezio Bonifacio. Annals of Nutrition and Metabolism 2009, 54:208-217 – published online 27.05.2009

Inulin autoantibodies that cross react with casein. In Vorbereitung

Persönliche Daten

Name	Daniela Bettina Müller, geb. Hanak
Geburtsdatum	07.02.1977
Geburtsort	Hilden
Familienstand	verheiratet, zwei Kinder

Promotion

08/2004 – 10/2006	Doktorandin von Frau Professor Dr. H. Daniel; tätig am Institut für Diabetesforschung in der Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. A-G. Ziegler; Thema: „Nahrungsbestandteile und deren Einfluss auf die Pathogenese von Autoimmundiabetes bei Mensch und Maus“
-------------------	---

Studium

05/2004	Diplomprüfung in der Fachrichtung Ernährungswissenschaft (Note:1.7)
04/1998 – 04/2004	Studium der Ernährungs- und Haushaltswissenschaften an der Justus-Liebig-Universität in Gießen Im Rahmen des Hauptstudiums Anfertigung einer experimentellen Diplomarbeit am Institut für Lebensmittelwissenschaften der Justus-Liebig-Universität in Gießen unter Leitung von Prof. Dr. Brückner zum Thema: „Gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung von Aminosäureenantiomeren in pflanzlichen Lebensmitteln“
04/2003 – 02/2004	Betreuung der Praktika „Tierernährung und Futtermittelkunde“ sowie „Ernährungsphysiologie“ als studentische Hilfskraft Betreuung von Studenten im Rahmen der „Einführungswoche“
10/2001 – 03/2002	Studium an der University of Newcastle upon Tyne, Großbritannien
10/1996 – 10/1998	Lehramtstudium an der Justus-Liebig-Universität in Gießen

Schulbildung

06/1996	Abitur (Note 1,8)
07/1993 – 06/1996	Goetheschule in Wetzlar (Gymnasiale Oberstufe)
08/1987 – 07/1993	Gesamtschule Schwingbach in Rechtenbach
01/1986 – 08/1987	Grundschule Rechtenbach
08/1983 – 12/1985	Grundschule Neuhäusel

Nauendorf, den 28.12.2009

Danksagung

Frau Professor Anette-G. Ziegler und Herrn Professor Ezio Bonifacio möchte ich ganz herzlich danken, da sie mir das Thema zur Bearbeitung überlassen haben und die Durchführung und das Gelingen dieser Arbeit am Institut für Diabetesforschung in München ermöglicht haben. Ebenso möchte ich mich für die Hilfe und Diskussion bezüglich der vorliegenden Niederschrift der Dissertation bedanken.

Für die universitäre Betreuung der Arbeit als Doktormutter, die organisatorische Hilfe, die konstruktive Kritik und letztendlich für die Beurteilung der Dissertation bedanke ich mich sehr herzlich bei Frau Professor Hannelore Daniel.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Kerstin Koczvara, die mich sehr geduldig in der Versorgung, Pflege und Untersuchung der NOD-Mäuse unterwiesen hat. Weiter danke ich Ihr für die unermüdliche Diskussionsbereitschaft, die mir schon während des experimentellen Teils dieser Arbeit sehr geholfen hat. Frau Dr. Kerstin Koczvara stand mir mit Ihren wertvollen Hinweisen und Ihrer ruhigen, hilfsbereiten Art auch bei der Niederschrift der Dissertation immer zur Seite.

Ich möchte mich auch bei den Mitarbeitern des Instituts ganz herzlich bedanken, die Fragen zu Patientenseren oder Laborvorschriften immer bereitwillig beantworteten und eine nette Arbeitsatmosphäre schufen.

Vielen Dank an Frau Dr. Christiane Winkler und Frau Maren Pflüger für die lustigen Stunden und das gemeinsame Lachen während meiner Zeit in München.

Besonders herzlicher Dank gilt meiner gesamten Familie:

- Meinem Mann für die fachliche Unterstützung und für alles, was ein Familienvater zum Gelingen einer Dissertation beitragen kann.
- Meinen Schwiegereltern für Ihre Hilfe mit den Kindern.
- Und meinen Eltern und Brüdern, die mich immer samt Nachwuchs beherbergt haben und sich Tag und Nacht eingebracht haben, um diese Arbeit zu einem guten Ende bringen zu können.