

Untersuchung des intrazellulären Gliadintransports in Enterozyten von Zöliakie-Patienten und Nicht-Zöliakie-Patienten unter Einfluss von Immunglobulinen der Klasse G

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Georg Karl-Christoph Leonhardt
aus Villingen-Schwenningen

Gießen 2014

Aus der Abteilung für Allgemeinpädiatrie und Neonatologie
im Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus-Peter Zimmer

Gutachter: Prof. Dr. K.-P. Zimmer

Gutachter: Prof. Dr. W. Padberg

Tag der Disputation: 12.02.2015

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Zöliakie	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Geschichte	1
1.1.3 Klinisches Bild: Symptome und Klassifizierung	2
1.1.4 Spätkomplikationen und Mortalität	4
1.1.5 Diagnose	6
1.1.5.1 Klinische Untersuchung und Anamnese	6
1.1.5.2 Serologie	6
1.1.5.3 Ösophago-Gastro-Duodenoskopie (ÖGD) und Histologie	7
1.1.5.4 Genetik	9
1.1.5.5 Empfohlene Vorgehensweise	9
1.1.6 Differentialdiagnosen	10
1.1.7 Epidemiologie	11
1.1.7.1 Beeinflussende Faktoren	11
1.1.7.2 Prävalenz	11
1.1.7.3 Risikogruppen	12
1.1.8 Therapie	13
1.2 Pathogenese	13
1.2.1 Ätiologische Faktoren	13
1.2.1.1 Umweltfaktor Gluten	13
1.2.1.2 Andere Umweltfaktoren	14
1.2.2 Genetische Faktoren	15
1.2.2.1 HLA-Typus	15
1.2.2.2 Weitere genetische Faktoren	16
1.2.3 Immunpathogenetische Mechanismen	16
1.2.3.1 Kontaktaufnahme des Immunsystems mit Gluten	16
1.2.3.2 Reaktionen der angeborenen Immunantwort	17

1.2.3.3	Reaktionen der intraepithelialen Lymphozyten	17
1.2.3.4	Reaktionen der erworbenen Immunantwort	18
1.2.4	Orale Toleranz	20
1.2.5	Erkenntnisse mit unmittelbarer Bedeutung für die Hypothesenbildung	20
1.2.5.1	Antigenpräsentierung über HLA-Klasse-2-Moleküle, regulatorische T-Zellen	20
1.2.5.2	Immunologische Funktionen von Enterozyten	21
1.2.5.3	Das Gliadinpeptid 31-43	21
1.2.5.4	Modulation des intrazellulären Vesikelverkehrs von Enterozyten	22
1.2.5.5	Der neonatale Fc-Rezeptor für IgG	22
1.3	Die Fragestellung	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Aufbau der Studie	25
2.2	Material	25
2.2.1	Patienten	25
2.2.2	Geräte und Verbrauchsmaterial	25
2.2.3	Chemikalien	27
2.2.4	Primäre Antikörper	27
2.2.5	Sekundäre Antikörper	29
2.2.6	Lösungen und Puffer	29
2.3	Durchführung der Ösophago-Gastro-Duodenoskopie und Biopsiegewinnung	30
2.4	Probenaufbereitung und -verarbeitung	30
2.5	Immunelektronenmikroskopie	32
2.5.1	Vorbereitung der Proben	32
2.5.2	Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten	32
2.5.3	Beschichtung der Schnitte mit Antikörpern	33
2.5.4	Auswertung der antikörperbeschichteten EM-Netze	34
2.5.4.1	Auswertung der Verteilung der Gliadinmarkierung auf zelluläre Kompartimente	34
2.5.4.2	Untersuchung des spezifischen Bindungsverhaltens der anti-Gliadin Antikörper	36
2.6	Statistische Auswertung	38

3	Ergebnisse	39
3.1	Patienten	39
3.1.1	Patienteneinteilung	39
3.1.2	Nicht-Zöliakie-Patienten	39
3.1.3	Zöliakie-Patienten	39
3.1.4	Patientendaten	40
3.2	Spezifisches Bindungsverhalten der anti-Gliadin-Antikörper	41
3.3	Gliadintransport unter Einfluss von IgG	44
3.3.1	Gliadinmarkierung in frühen Endosomen	44
3.3.2	Gliadinmarkierung in späten Endosomen	47
3.3.3	Gliadinmarkierung in weiteren Zellkompartimenten	49
3.4	Gliadinmarkierung von Golgi-Apparat und apikaler Membran	49
4	Diskussion	53
4.1	Diskussion der Methoden	53
4.1.1	Biopsieinkubation und -verarbeitung, Durchführung der Markierungsversuche	53
4.1.2	Immunelektronenmikroskopie	54
4.1.3	Patienten	55
4.2	Diskussion der Ergebnisse	55
4.2.1	Spezifisches Bindungsverhalten der anti-Gliadin-Antikörper	55
4.2.2	Gliadintransport unter Einfluss von IgG	61
4.2.2.1	Gliadinmarkierung in frühen Endosomen	61
4.2.2.2	Gliadinmarkierung in späten Endosomen	61
4.2.2.3	Gliadinmarkierung in weiteren Zellkompartimenten	62
4.2.3	Gliadinmarkierung von Golgi-Apparat und apikaler Membran	62
4.3	Ausblick	65
5	Zusammenfassung	70
6	Summary	71
7	Anhang	72
7.1	Abkürzungsverzeichnis	72

7.2	Tabellenverzeichnis	74
7.3	Abbildungsverzeichnis	75
7.4	Quellenverzeichnis	76
7.5	Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation	93
7.6	Danksagung	94

1 Einleitung

1.1 Zöliakie

1.1.1 Definition

Die European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) definiert die Zöliakie als eine systemische, durch das Immunsystem vermittelte Erkrankung, die bei entsprechender genetischer Disposition durch Ingestion von Gluten und verwandten Prolaminen hervorgerufen wird [1]. Die Zöliakie ist charakterisiert durch eine glutenabhängige Symptomatik, spezifische Antikörper, die Haplotypen für HLA-DQ2 oder HLA-DQ8 (Humanes-Leukozyten-Antigen-DQ2/8) und eine Enteropathie.

1.1.2 Geschichte

Die erste Beschreibung eines Krankheitsbildes, welches der Zöliakie ähnelt, stammt von Aretaios von Kappadokien aus dem zweiten Jahrhundert nach Christus. In der Übersetzung der Werke des Aretaios von Francis Adams wird von einer Krankheit chronischer Natur berichtet, die mit dünnen und nur teilweise verdauten Stühlen, Muskelschwund, Blässe und Schwächegefühl einhergeht [2]. Der englische Arzt Samuel Gee lieferte 1888 die erste detaillierte und systematische Beschreibung der „coeliac affection“ und vermutete weiterhin: „If the patient can be cured at all, it must be by means of diet“ [3]. 1932 wurden erstmals Patienten erfolgreich durch Diät behandelt, allerdings ohne den eigentlichen Auslöser der Zöliakie zu kennen [4]. Der niederländische Kinderarzt Dicke war seit den frühen 1930er Jahren davon überzeugt, dass die Patienten vom Verzicht auf weizenhaltige Nahrungsmittel profitierten und hatte daraufhin erste Untersuchungen durchgeführt [5]. Nach einer Reihe von diätischen Experimenten mit Zöliakiepatienten am Juliana Kinderkrankenhaus in Den Haag und am Wilhelmina Kinderkrankenhaus in Utrecht stellte er 1950 fest, dass Weizen- und Roggenmehl Zöliakie auslösen können. Sein Kollege van de Kamer erkannte als auslösendes Agens darin schließlich das Gluten [6, 7]. Berger wies 1958 bei Zöliakiepatienten Antikörper gegen Gliadin nach [8]. 1965 galt es allgemein als akzeptiert, dass genetische Faktoren für die Entstehung der Zöliakie eine wichtige Rolle spielen [9]. Falchuk entdeckte 1972 auf serologischer Ebene den Zusammenhang mit

bestimmten HLA-Antigenen und Sollid wies auf genetischer Ebene nach, dass Zöliakiepatienten zu über 90% HLA-DQ2 positiv sind [10, 11]. 1975 wurde erkannt, dass Zytokine eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Zöliakie spielen [12]. Seit der Entdeckung von Antikörpern gegen ein endomysiales Autoantigen gilt die Zöliakie als Erkrankung mit autoimmunen Zügen [13]. Dieterich konnte 1997 die Gewebstransglutaminase (tTG) als das endomysiale Autoantigen der Zöliakie identifizieren [14].

1.1.3 Klinisches Bild: Symptome und Klassifizierung

Die Symptome der Zöliakie (**Tabelle 1**) sind unspezifisch und können nicht immer klar von den Zeichen einer mit der Zöliakie assoziierten Erkrankung abgegrenzt werden. Als typische Symptome der Zöliakie gelten vor allen Dingen Gedeihstörung, ein ausladendes Abdomen und Durchfälle bzw. voluminöse Fettstühle. Nicht-typische Symptome umfassen v.a. Folgeerscheinungen einer Malabsorption sowie komplexe extraintestinale Symptome wie Eisenmangelanämie, Osteoporose, periphere Neuropathie, Konzentrationsstörung [15-19].

Typische Symptome	Nicht-typische Symptome
<ul style="list-style-type: none"> • Gedeihstörung • Geblähtes Abdomen • Durchfälle/voluminöse Stühle 	<ul style="list-style-type: none"> • Eisenmangelanämie • Zahnschmelzdefekte • Verminderte Leistungsfähigkeit • Chronische Obstipation • Depressive Verstimmung • Periphere Neuropathie • Appetitverlust • Verzögerte Pubertät • Dermatitis herpetiformis • IgA-Nephropathie

Tabelle 1: Symptome der Zöliakie.

Modifizierte Darstellung nach [18] und [20].

Wird eine Zöliakie klinisch innerhalb der ersten 24 Lebensmonate manifest, dann überwiegen die typischen Symptome. Manifestiert sich die Erkrankung später, so liegen häufiger nicht-typische Symptome vor [21]. Zudem ist zu beobachten, dass der Anteil an Zöliakiepatienten mit typischen Symptomen abnimmt, wohingegen der Anteil an Patienten mit nicht-typischer Symptomatik zunimmt [18, 19, 22, 23]. Diese relativen Veränderungen könnten dadurch bedingt sein, dass mit der Einführung serologischer Tests für Zöliakie – durch die ESPGHAN 1990 erstmals empfohlen [24] – zunehmend auch milde bzw. oligosymptomatische Erkrankungsformen erfasst wurden. Die Symptomkombinationen können von Patient zu Patient stark variieren. Aus diesem Grund unterscheidet man verschiedene klinische Formen der Zöliakie (**Tabelle 2**). Die klassische Form ist gekennzeichnet durch die typischen, vorwiegend gastrointestinalen Symptome. Diese beginnen kurz nach der Einführung von Gluten in den Speiseplan des Säuglings, also meist zwischen 6 und 24 Monaten. Unter nicht-klassischer Zöliakie versteht man alle Formen der Zöliakie, die nicht der klassischen Form zugeordnet werden können [25]. Diese Patienten zeigen v.a. nicht-typische Symptome. Man unterscheidet verschiedene Unterformen der nicht-klassischen Zöliakie. Von einer stummen Zöliakie spricht man beim histomorphologischen Nachweis des typischen Schleimhautschadens ohne das Vorliegen von Beschwerden. Die latente Zöliakie umfasst alle HLA-DQ2/8-positiven Patienten ohne Schleimhautveränderungen, bei welchen in der Vergangenheit eine glutenabhängige Enteropathie bestanden hatte. Die potentielle Form der Zöliakie wird definiert durch einen positiven Serologie-Befund und passenden HLA-Status bei weitgehend intakter Duodenalschleimhaut. Den vorgestellten klinischen Formen der Zöliakie ist gemeinsam, dass Symptome, Schleimhautveränderungen und EMA/tTG-AK-Reaktivität bei glutenfreier Ernährung (GFD) zurückgehen. Bei Persistenz der malabsorptiven Symptomatik und der Zottenatrophie über 6-12 Monate trotz strikter GFD, spricht man von refraktärer Zöliakie (RCD) [26]. Diese kann weiter unterteilt werden in RCD I, bei welcher die IEL (Intraepitheliale Lymphozyten) phänotypisch normal sind und RCD II, bei welcher Ansammlungen klonaler IEL vorkommen.

Klinische Form	Befunde
Klassisch	HLA-DQ2/8-positiv
	Anti-EMA/tTG-AK-positiv
	Histologisch voll ausgebildete Enteropathie
	Typische Symptomatik
Nicht-klassisch - Atypisch -	HLA-DQ2/8-positiv
	Anti-EMA/tTG-AK-positiv
	Histologisch voll ausgebildete Enteropathie
	Nicht-typische (extraintestinale) Symptomatik
Nicht-klassisch - Stumm -	HLA-DQ2/8-positiv
	Anti-EMA/tTG-AK-positiv
	Histologisch voll ausgebildete Enteropathie
	Keine Symptome
Nicht-klassisch - Latent -	HLA-DQ2/8-positiv
	Anti-EMA/tTG-AK-negativ/-positiv
	In Vorgeschichte glutenabhängige, histologisch fassbare Enteropathie
	Symptome möglich
Nicht-klassisch - Potentiell -	HLA-DQ2/8-positiv
	Anti-EMA/tTG-AK-positiv
	Intakte Dünndarmschleimhaut
	Keine Symptome

Tabelle 2: Formen der Zöliakie.

Modifizierte Darstellung nach [1, 15].

1.1.4 Spätkomplikationen und Mortalität

Eine Auswahl von mit der Zöliakie assoziierten Erkrankungen und Symptomen, welche damit gleichzeitig die Zugehörigkeit zu einer Risikogruppe darstellen, sind in **Tabelle 1**

und **Tabelle 6** aufgeführt. Schon seit längerer Zeit ist bekannt, dass Zöliakiepatienten ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Lymphomen besitzen [27]. In der Literatur wird dieses Risiko häufig als SIR (Standardized incidence ratio; beobachtete Inzidenz in einer Gruppe geteilt durch die erwartete Inzidenz in dieser Gruppe) wiedergegeben. Die SIR entspricht einem relativen Risiko. In drei ausgewählten Studien (Diagnose Zöliakie stets histologisch gesichert) finden sich für die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) SIR-Angaben von 3,75 [28], 9,1 [29] und 42,7 [30]. Die neueste und von der Teilnehmerzahl her größte Studie zu diesem Thema gibt für die Entwicklung eines NHL bei rein histologisch diagnostizierter, nicht weiter klassifizierter Zöliakie ein relatives Risiko von 4,26 und für die Entwicklung eines Lymphoms irgendeiner Art ein Risiko von 2,82 im Vergleich zur Normalbevölkerung an [31]. Malignome anderer Art waren in dieser Studie nicht häufiger als in der Normalbevölkerung. Eine wichtige Erkenntnis dieser Studie ist weiterhin, dass bei latenter Zöliakie kein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Malignoms besteht. Innerhalb der mit der Zöliakie assoziierten NHL sind die T-Zell-NHL am weitaus häufigsten vertreten, man teilt diese daher den sogenannten EATL (Enteropathie-assoziierte-T-Zell-Lymphome) zu. Der Phänotyp der EATL lässt sich immunhistochemisch von dem der IEL ableiten. Innerhalb von 5 Jahren entwickeln Patienten mit refraktärer Zöliakie (RCD) I gelegentlich ein EATL, Patienten mit RCD II in bis zu 80% der Fälle [26]. Die Prognose bei EATL ist im Allgemeinen schlecht [32]. Al-Toma et al. ermittelten für RCD I- und -II-Patienten eine 5-Jahres-Überlebensrate von 96% bzw. 58% [33]. Die Todesursache bei RCD II-Patienten ist in 88,4% der Fälle ein EATL [33]. Zwei große Studien, welche die Sterblichkeit von Zöliakiepatienten (serologisch und histologisch diagnostiziert, nicht nach klinischen Erscheinungsformen stratifiziert) mit der Sterblichkeit der Normalbevölkerung verglichen, errechneten SMR (Standardized mortality ratio; Sterblichkeit in der beobachteten Gruppe geteilt durch die Sterblichkeit in der Allgemeinbevölkerung)-Werte von 2,0 [34] bzw. 1,3 [35]. Aus einer Studie von Corrao et al. [34] geht hervor, dass der Hauptgrund für die erhöhte Sterblichkeit von Zöliakiepatienten in der heutigen Zeit NHL sind. Es ist unumstritten, dass das Einhalten einer GFD die Sterblichkeit von Zöliakiepatienten senkt. Auch scheint es bei GFD weniger Tote durch Lymphome zu geben, allerdings findet man dazu widersprüchliche Literaturangaben [28, 30]. Wahrscheinlich spielt es eine Rolle, zu welchem Zeitpunkt im Leben das Antigen entfernt, d.h. die GFD eingeführt wird [36].

1.1.5 Diagnose

Nach den Vorschlägen der ESPGHAN [1] stehen vier Diagnosebausteine zur Verfügung: 1. Klinische Untersuchung und Anamnese, 2. Serologie, 3. Ösophago-Gastro-Duodenoskopie und Histologie, 4. Genetik.

1.1.5.1 Klinische Untersuchung und Anamnese

Da sich die wenigsten Fälle mit geblähtem Bauch, sehr dünnen Beinen und voluminösen Stühlen präsentieren und die Symptome ganz allgemein recht unspezifisch sind, ist eine allein auf klinische Zeichen gestützte Diagnose schwierig. Anamnestisch sollten Ernährung und Risikofaktoren erfragt werden.

1.1.5.2. Serologie

Die serologische Diagnostik umfasst verschiedene Arten von Antikörpertests auf Immunglobuline der Klassen A und G gegen Gliadin (IgA/G-AGA), gegen endomysiale Antigene (anti-EMA-IgA/G), gegen die Gewebstransglutaminase (anti-tTG-IgA/G) und gegen deamidierte Gliadinpeptide (anti-DGP-IgA/G).

Zur diagnostischen Aussagekraft der Antikörpertests liegen umfangreiche Studiendaten vor. Die Angaben in **Tabelle 3** sind einer Metaanalyse zu diesem Thema entnommen [37]. Die höchste Sensitivität und Spezifität sowie den höchsten Negativen und Positiven Vorhersagewert weist die Untersuchung der anti-EMA-IgA sowie der anti-tTG-IgA-Reaktivität auf. Aus diesem Grund beginnt die Diagnostik meist mit diesem Schritt. Dabei ist Folgendes zu beachten: 1. Der Patient muss sich glutenhaltig ernähren, da die Antikörperreaktivitäten bei einer glutenfreien Diät (GFD) Normalwerte annehmen können [38]. 2. Beim Vorliegen einer Selektiven IgA-Defizienz (SIgAD) sind die Reaktivitäten der entsprechenden IgG zu bestimmen. 3. 10-20% der Zöliakiepatienten mit positivem Biopsiefund können – trotz IgA-Kompetenz – anti-EMA-IgA-negativ sein [39]. Für die Beantwortung der Frage, ob die Untersuchung von IgA/G-AGA- und anti-DGP-IgG/A-Reaktivitäten bei kleinen Kindern der Bestimmung von EMA bzw. tTG gleichwertig oder überlegen ist, liegen noch nicht genug Studiendaten vor.

Test	Sensitivität [%]	Spezifität [%]
IgA-AGA	60,9-96,0	89,9
anti-tTGA-IgA (ELISA)	73,9-100	77,8-100
anti-tTGA-IgA (RBA)	89,0-100	95,9
anti-tTG-IgG (ELISA+RBA)	12,6-99,3	86,3-100
anti-EMA-IgA	82,6-100	98,2
anti-DGP-IgA	80,7-95,1	90,7
anti-DGP-IgG	80,1-98,6	86,0-96,9

Tabelle 3: Sensitivitäten und Spezifitäten wichtiger serologischer Tests.

Darstellung nach [37]. In dieser Studie wurden die Ergebnisse von 16 Studien zusammengefasst. In allen Studien wurde die Zöliakie histologisch bestätigt. Es sind Wertebereiche angegeben bzw., bei genügender Homogenität der Werte, ein Schätzwert der zentralen Tendenz. RBA: Radiobinding Assay. ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay.

1.1.5.3 Ösophago-Gastro-Duodenoskopie (ÖGD) und Histologie

Die histomorphologischen Veränderungen bei der Zöliakie sind typisch, aber keineswegs pathognomonisch und lassen Raum für viele Differenzialdiagnosen (**Tabelle 5**). Trotzdem gilt die Endoskopie und die mikroskopische Beurteilung des Schleimhautschadens bei vielen Autoren als diagnostischer Goldstandard im Falle der Verdachtsdiagnose Zöliakie [40]. Die Enteropathie im Rahmen der Zöliakie präsentiert sich dem Endoskopiker in mehr als 50% der Fälle als fleckförmig verteiltes Muster entzündlicher Läsionen („patchy lesions“), die histopathologisch verschiedene Schweregrade aufweisen können [41]. Dabei kommen die entzündlichen Läsionen bei bis zu 10% der Patienten ausschließlich im Bulbus duodeni vor. Um ein falsch negatives Ergebnis durch die Probenentnahme zu vermeiden, empfiehlt die ESPGHAN insgesamt mindestens fünf Biopsien zu entnehmen, davon mindestens vier aus dem distalen Duodenum und mindestens eine aus dem Bulbus duodeni [1].

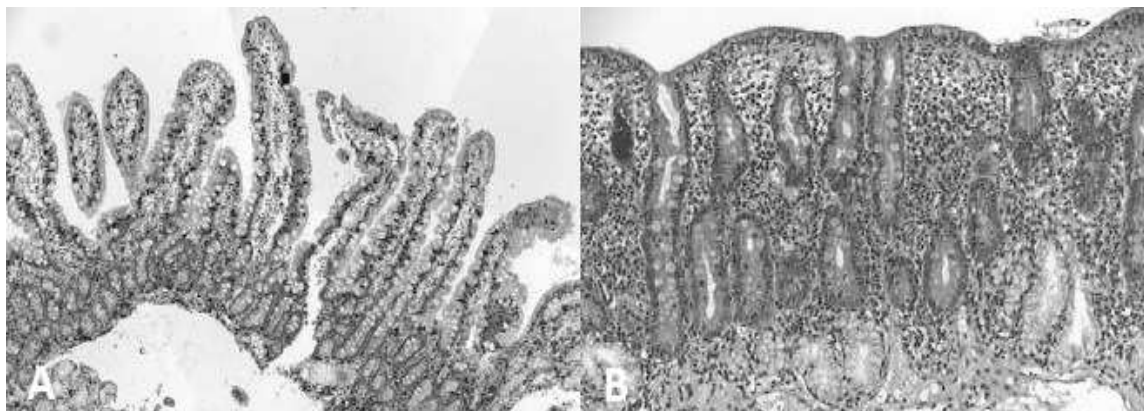


Abbildung 1: Histologischer Schleimhautbefund.

A: Duodenalschleimhaut einer gesunden Person (MARSH 0). B: Duodenalschleimhaut eines Zöliakiepatienten mit totaler Villusatrophie (MARSH 3c). Modifizierte Darstellung nach [42].

In die mikroskopische Beurteilung des Präparats gehen in erster Linie der Schweregrad der Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie sowie die Zahl der intraepithelialen Lymphozyten (IEL) pro 100 IEC ein. Die histologische Klassifikation und Schweregradeinteilung der Zöliakie, die ursprünglich von Marsh [43] stammt und von Oberhuber [44] und Corazza [45] überarbeitet wurde, orientiert sich an diesen Kriterien (**Tabelle 4**).

Zur Erleichterung der Identifizierung der IEL wird immunhistochemisch häufig der T-Zellmarker CD3 nachgewiesen. Darüber hinaus können, insbesondere zur Differenzierung von RCD I, RCD II und EATL, zusätzlich CD4, CD8, CD30 und CD103 immunhistochemisch markiert werden [32, 40, 46].

Grad	0	1	2	3 a	3 b	3 c
IEL/100 IEC	<25	>25	>25	>25	>25	>25
Krypten	Normal	Normal	Hypertrophie	Hypertrophie	Hypertrophie	Hypertrophie
Zotten	Normal	Normal	Normal	Geringe Atrophie	Ausgeprägte Atrophie	Totale Atrophie

Tabelle 4: Klassifizierung des histologischen Schleimhautbefundes.

Modifizierte Darstellung nach [47] und [1].

Es ist zu beachten, dass das Vorliegen einer Grad-1-Läsion äußerst unspezifisch ist und nur in 10% der Fälle auf eine Glutensensitivität zurückgeführt werden kann [48]. Analog zur serologischen Diagnostik gilt, dass der histologische Befund nur aussagekräftig ist, wenn sich der Patient glutenhaltig ernährt, da der Schleimhautschaden beim Einhalten einer GFD in Remission gehen kann.

1.1.5.4 Genetik

Mehr als 95% der Zöliakiepatienten sind Träger von HLA-DQ2, die verbleibenden Patienten sind meist HLA-DQ8-positiv [49]. HLA-DQ2 kommt in der kaukasischen Bevölkerung mit einer Häufigkeit von ungefähr 30% [11, 50-54] vor. Die Häufigkeit der Zöliakie beträgt jedoch nur ungefähr 1% [55], daher ist die Spezifität dieser Untersuchung sehr gering. Im Evidenzbericht des US-Gesundheitsministeriums von 2004 werden für die kombinierte Bestimmung der Haplotypen für HLA-DQ2/8 eine Sensitivität und ein Negativer Vorhersagewert von fast 100% angegeben [49]. Somit dient die Typisierung auf HLA-DQ2/8 vor allem dem Ausschluss der Verdachtsdiagnose Zöliakie.

1.1.5.5 Empfohlene Vorgehensweise

Die *ESPGHAN guidelines for the diagnosis of celiac disease in children and adolescents* sind ein weltweit in Forschung und Praxis angewendeter Standard zur Diagnose und Klassifikation der Zöliakie. Die neueste Version wurde 2012 veröffentlicht [1]. Danach liegt eine Zöliakie vor, wenn mindestens 3 der 4 Diagnosebausteine in charakteristischer Weise vorhanden sind: Typische Symptomatik, HLA-DQ2/8-Positivität, erhöhte anti-tTG-IgA-Aktivität, MARSH 2- oder -3-Läsion. Dadurch ergibt sich als wesentliche Neuerung, dass bei einem Patienten mit ausgeprägten, typischen Symptomen, stark erhöhter anti-tTG-IgA-Reaktivität (10x über dem Normwert) und HLA-DQ2/8-Positivität auch ohne Biopsie eine Zöliakie diagnostiziert werden kann. Gleichzeitig wird der HLA-Typisierung mehr Gewicht gegeben. Diese Modernisierung kann nicht nur ausgewählten Patienten die ÖGD ersparen, sondern besitzt auch Potential zur Kostensenkung [56].

1.1.6 Differenzialdiagnosen

Symptomatik, histologischer Befund und HLA-DQ2/8 sind nicht spezifisch für die Zöliakie. **Tabelle 5** listet Differenzialdiagnosen der Zottenatrophie auf. Äußerst schwierig ist die Differenzierung zwischen latenter Zöliakie und Glutensensitivität (GS). Die Glutensensitivität wird definiert durch das Vorliegen einer glutenabhängigen Symptomatik mit erhöhten IEL ohne Zottenatrophie und anti-tTG-IgA [57]. In diese Gruppe fallen beispielsweise Patienten mit Reizdarmsyndrom (Irritable bowel syndrome, IBS) oder Typ-1-Diabetes, welche glutenabhängig Symptome zeigen, ohne dass eine Zöliakie vorliegt [58].

Differenzialdiagnosen

- Gedeihstörung
- Geblähtes Abdomen
- Giardiasis
- Kollagene Sprue
- Strahleninduzierte Enteropathie
- Intestinale Tuberkulose
- Tropische Sprue
- Zollinger-Ellison-Syndrom
- Mb. Whipple
- HIV-Enteropathie
- Nahrungsmittelunverträglichkeit anderer Art

Tabelle 5: Differentialdiagnosen der Zottenatrophie.

Darstellung nach [40].

1.1.7 Epidemiologie

1.1.7.1 Beeinflussende Faktoren

Die Häufigkeit der Zöliakie ist von der Art der Diagnostik und der Selektion der beobachteten Population abhängig. So wird die wahre Häufigkeit der Zöliakie überschätzt, wenn sich die Diagnostik allein auf einen positiven Serologiebefund oder geringgradige Schleimhautläsionen (MARSH 1) stützt oder wenn die beobachtete Population verhältnismäßig viele Individuen einer Risikogruppe umfasst. Ging man früher davon aus, dass die Zöliakie eine äußerst seltene Krankheit ist, so ist heutzutage klar, dass es sich um eine der häufigsten lebenslangen Erkrankungen weltweit handelt.

1.1.7.2 Prävalenz

Dube et al. gehen in einer Metaanalyse von 2005, welche Studien aus den Jahren 1966-2003 auswertet, davon aus, dass die Prävalenz der Zöliakie in der westlichen Allgemeinbevölkerung knapp 1% beträgt [55]. Im *Evidence Report* des US-Gesundheitsministeriums von 2004 liegt der Mittelwert der zusammengefassten Studien bei 0,82% für die rein serologisch erfasste Prävalenz und bei 0,56% für die mittels Biopsie bestätigte Prävalenz [49]. In Deutschland liegt die Prävalenz – der serologisch erfassten und histologisch bestätigten Zöliakie – bei 0,3% [59]. In Skandinavien scheint die Prävalenz der Zöliakie tendenziell höher zu sein, wie Studien mit Angaben über 1% (serologisch erfasste Zöliakie) und knapp 1% (histologisch bestätigte Zöliakie) belegen [60-63]. Die höchste bekannte Prävalenz kommt beim Volk der Saharawi vor, welche in der nordwestlichen Sahara siedeln: Catassi et al. ermittelten dort serologisch eine Prävalenz von 5,6% [64]. Prävalenzangaben für Kinder und Erwachsene liegen ungefähr im gleichen Wertebereich. Mädchen sind häufiger von Zöliakie betroffen als Jungen [65]. Der Anteil der asymptomatischen Patienten an der Gesamtheit aller Zöliakiepatienten ist sehr viel größer als der Anteil an Patienten die Symptome zeigen. Um dieses Verhältnis zu verdeutlichen, wird oft vom „Eisberg der Zöliakie“ gesprochen [15]: Nur die sichtbare Spitze besteht aus den symptomatischen Patienten, der weitaus größere, nicht sichtbare Teil besteht aus Patienten mit stummer, latenter oder potentieller Zöliakie.

1.1.7.3 Risikogruppen

Liegt eine Verwandtschaft mit einem Zöliakiekranken vor, so besteht ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung an Zöliakie. Bei monozygoten Zwillingen, von welchen einer an Zöliakie erkrankt ist, beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass beide an Zöliakie erkranken (positive Serologie und Histologie) 71,4%, bei dizygoten Zwillingen 9,1% [66]. Für Verwandte ersten Grades beträgt die gemittelte Prävalenz der Zöliakie (positive Serologie und Histologie) 7,6%, für Verwandte zweiten Grades (nur positive Serologie) im Mittel 2,7% [49]. **Tabelle 6** listet eine Auswahl von Erkrankungen auf, welche mit einem erhöhten Risiko für Zöliakie einhergehen. Weitere Erkrankungen, die nicht immer klar von den Symptomen der Zöliakie getrennt werden können, sind in **Tabelle 1** zu finden.

Erkrankung		Prävalenz [%]
Autoimmunerkrankungen	Diabetes mellitus Typ 1	1,7-5,7*
	Thyreoiditis	2,9-3,29*
	Sjögren-Syndrom	4,54*
Genetische Erkrankungen	Down-Syndrom	4,6*
	Turner-Syndrom	6,4*
	Selektiver IgA-Mangel (SIgAD)	2,6 [§]
Epilepsie		0,8-2,3*
Kryptogene Hypertransaminasämie		9 [#]

Tabelle 6: Prävalenz der Zöliakie in ausgewählten Risikogruppen.

Die Tabelle zeigt eine Auswahl von Prävalenzangaben aus drei Studien. *: Daten aus [67]. §: Daten aus [68]. #: Daten aus [69]. Die Prävalenz der Zöliakie wurde in den zitierten Studien serologisch ermittelt.

1.1.8 Therapie

Die einzige verfügbare, dabei aber meist sicher wirksame und nebenwirkungsfreie Therapie ist die glutenfreie Ernährung (GFD). Das Einhalten der GFD kann schwierig sein, da Gluten in vielen Lebensmitteln zumindest in Spuren enthalten ist. Nach der EG-Verordnung Nr. 41/2009 [70], welche Zusammensetzung und Kennzeichnung von Lebensmitteln, die für Menschen mit einer Glutenunverträglichkeit geeignet sind, regelt, dürfen diese Lebensmittel einen Glutengehalt von höchstens 100mg/kg aufweisen. Derartige Lebensmittel können mit der Kennzeichnung „sehr geringer Glutengehalt“ versehen werden. Lebensmittel mit einem Glutengehalt von höchstens 20mg/kg dürfen mit der Bezeichnung „glutenfrei“ versehen werden [70]. Grundsätzlich sollten Zöliakiepatienten direkte Erzeugnisse der Landwirtschaft verarbeiteten Lebensmitteln und Fertiggerichten vorziehen, da letztere häufiger Spuren von Gluten enthalten [71]. Der Verzicht auf Weizen, Roggen, Gerste sowie andere glutenhaltige Nahrungsmittel erfordert eine strikte Diätdisziplin. Diese ist bei älteren Patienten, welche zum Diagnosezeitpunkt bereits erwachsen sind, höher als bei jüngeren Patienten, deren Diagnose bereits im Kindesalter gestellt wird [72]. Zur Therapie der RCD, welche auf eine GFD nicht anspricht, gibt es noch keinen wissenschaftlichen Konsens. Einzelne Zentren berichten über eine klinisch wirksame Behandlung durch immunsuppressive und zytostatische Chemotherapie [26].

1.2 Pathogenese

1.2.1 Ätiologische Faktoren

1.2.1.1 Umweltfaktor Gluten

Zöliakie kann bei disponierten Individuen durch Ingestion von Gluten ausgelöst werden und ist in den meisten Fällen durch den Entzug von Gluten vollständig therapierbar. Gluten bezeichnete ursprünglich den Teil eines Teiges aus Getreidemehl, welcher beim Waschen des Teiges mit Wasser übrig bleibt [73]. Dieser Rest besteht aus einem komplexen Proteingemisch und ist wesentlich für die Backfähigkeit des Teiges (lat. *gluten* = Leim) verantwortlich. Die genaue Nomenklatur des Glutens und seiner Bestandteile wird nicht einheitlich gehandhabt und unterliegt mit der Entwicklung neuer analytischer Methoden einem steten Wandel. In dieser Arbeit wird Gluten als Zöliakie

auslösendes Agens definiert und in diesem Sinne auch verwendet. Gluten findet sich demnach in Weizen, Roggen und Gerste aus dem Stamm der Triticeae [74]. Hafer aus dem Stamm Aveneae scheint harmloser zu sein, die Studienlage ist jedoch nicht eindeutig [75, 76]. Die Vertreter anderer, für die menschliche Ernährung bedeutender Körnerlieferanten aus der Familie der Süßgräser wie Reis, Mais und Hirse können von Zöliakiepatienten gefahrlos verzehrt werden [77]. Zum Gluten des Weizens kann Folgendes festgehalten werden [78-81]: 1. Es besteht unter anderem aus den vorwiegend monomeren, in Ethanol löslichen Gliadinen und den hochmolekularen, in Ethanol unlöslichen Gluteninen. 2. Gliadine und Glutenine können beide Zöliakie auslösen, die Gliadine stellen jedoch die in dieser Hinsicht potenteste Proteingruppe dar. 3. Gliadinpeptide können nach ihrer Aminosäuresequenz und ihrem Molekulargewicht in die Fraktionen α/β , γ , $\omega 1,2$ und $\omega 5$ eingeteilt werden. Diese Fraktionen enthalten wiederum über 100 verschiedene Komponenten. 4. Gliadinpeptide weisen einen hohen Glutamin- und Prolinanteil sowie typische wiederkehrende Sequenzmotive auf. 5. Einzelne Gliadinpeptide können Zöliakie auslösen, nicht aber einzelne Aminosäuren.

1.2.1.2 Andere Umweltfaktoren

Keiner der folgenden Faktoren ist notwendig für die Entwicklung einer Zöliakie, aber sie kommen bei Zöliakiepatienten häufiger vor als bei Gesunden. So erhöhen Infektionen des Neugeborenen im Allgemeinen und wiederholte Rotavirusinfektionen von Kindern im Speziellen das Zöliakierisiko [82, 83]. Bei Zöliakiepatienten wurden zudem Zeichen einer erhöhten Empfänglichkeit der enteralen Schleimhaut für bakterielle Infektionen gefunden, welche die Entwicklung einer Zöliakie unterstützen könnten [84]. Auf der anderen Seite wird – im Sinne der Hygienetheorie zur Entstehung von Allergien und Autoimmunerkrankungen – vermutet, dass gerade der hohe Hygienestandard in den westlichen Ländern die Entwicklung einer Zöliakie begünstigt [85].

Als Schutzfaktor vor der Entwicklung einer Zöliakie gilt die Ernährung des Neugeborenen mit Muttermilch [86].

1.2.2 Genetische Faktoren

1.2.2.1 HLA-Typus

Die Zöliakie ist hochgradig mit Genen des Haupt-Histocompatibilitätskomplexes (Major Histocompatibility Complex, MHC) auf Chromosom 6 assoziiert. Ganz allgemein werden bestimmte Gene dieses Komplexes als „ancestral haplotype“ vererbt, welcher assoziiert ist mit einer Reihe von Erkrankungen immunpathologischer Genese [87]. In der Chromosomenregion 6p21 hat man den wichtigsten Suszeptibilitätsloкус speziell für Zöliakie – CELIAC1 – definiert, welcher für bestimmte HLA-Klasse-2-Moleküle codiert [88]. Bei über 90% der Zöliakiepatienten findet sich HLA-DQ2 (codiert durch: DQA1*05 für die α -Kette und DQB1*02 für die β -Kette; genau genommen handelt es sich um die Isoform HLA-DQ2.5, da aber diese den Hauptanteil an HLA-DQ2 ausmacht, wird im Folgenden der Einfachheit halber nur von HLA-DQ2 gesprochen) [11], welches in der überwiegenden Zahl der Fälle als DR3DQ2 (codiert in *cis* durch: DRB1*03:01–DQA1*05:01–DQB1*02:01) oder als Kombination von DR5DQ7 und DR7DQ2 (codiert in *trans* durch: DRB1*11/12–DQA1*05:05–DQB1*03:01 und DRB1*07–DQA1*02:01–DQB1*02:02) vorkommt (**Abbildung 2**) [89-92]. Die jeweiligen α - und β -Ketten dieser beiden HLA-Moleküle unterscheiden sich nur in einer Aminosäure voneinander, weshalb man davon ausgeht, dass daraus kein funktioneller Unterschied resultiert [93].

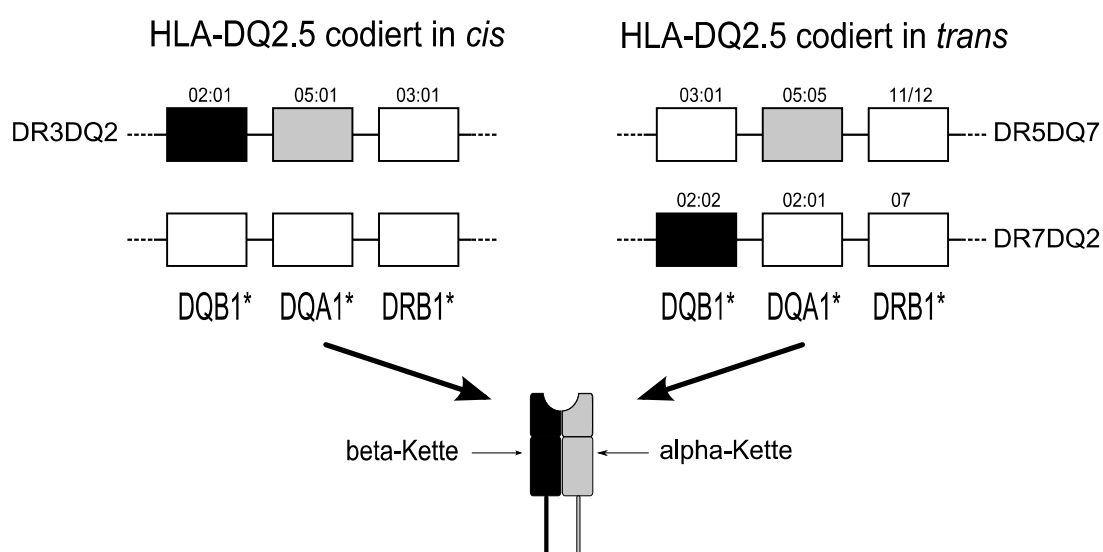


Abbildung 2: Codierung des HLA-DQ2.5 α/β -Heterodimers in *cis* und *trans*.

Darstellung nach [93] und [94].

Die wenigen HLA-DQ2-negativen Zöliakiepatienten sind in der Regel Träger von HLA-DQ8 in Form eines DR4DQ8-Haplotypen (codiert durch: DRB1*04-DQA1*03-QB1*0302) [95-97]. Zöliakiepatienten, die weder das HLA-DQ2- noch das HLA-DQ8-Molekül tragen, sind sehr selten, aber gut dokumentiert. Bei den meisten dieser Patienten findet sich jedoch entweder die α - oder die β -Kette des DQ2-Moleküls [98]. HLA-DQ2- und HLA-DQ8-negative Patienten, die weder die α - noch die β -Kette des DQ2-Moleküls tragen sind eine extreme Rarität [99].

1.2.2.2 Weitere genetische Faktoren

Da nur 4% der HLA-DQ2- oder HLA-DQ8-positiven Individuen an Zöliakie erkranken, gilt das Vorliegen dieser HLA-Typen als notwendige, aber nicht hinreichende Bedingung für die Entwicklung einer Zöliakie. Neben Umweltfaktoren wie Infektionen spielen wohl auch andere genetische Faktoren eine Rolle. Bisher war es jedoch nicht möglich, weitere Gene neben HLA zu identifizieren, die mit der Zöliakie assoziiert sind. Ein Zusammenhang konnte lediglich für bestimmte chromosomale Regionen gefunden werden, welche als Suszeptibilitätsloki CELIAC2-13 definiert wurden [100]. Es fällt auf, dass ein Großteil der Gene in diesen Regionen immunologische Funktionen ermöglicht [101-105].

1.2.3 Immunpathogenetische Mechanismen

1.2.3.1 Kontaktaufnahme des Immunsystems mit Gluten

Bei der Zöliakie liegt eine immunologische Fehlfunktion vor: Obwohl Gluten für den menschlichen Organismus keine Gefahr darstellt, leiten die Immunzellen eine Abwehrreaktion ein. Um einen ersten Kontakt mit diesen Zellen herzustellen, müssen die Glutenpeptide zunächst die Schicht der Darmepithelzellen überwinden und in die Lamina propria vordringen, wo sich der Hauptteil der Zellen mit immunologischer Funktion befindet [106]. Es gilt als sicher, dass die Zellzwischenräume für Makromoleküle wie das Gluten durch die Wirkung der *Tight Junctions* im Falle einer gesunden Schleimhaut nicht passierbar sind [107]. Im Zellkulturmodell und an duodenalen Biopsien konnte jedoch wiederholt gezeigt werden, dass Gliadin die epitheliale Permeabilität erhöht, indem es Veränderungen an der Proteinstruktur der

Tight Junctions und des Zytoskeletts bewirkt [108, 109] und dass diese Wirkung über den Chemokinrezeptor CXCR3 vermittelt werden kann [110, 111]. Ist die Schleimhaut bereits entzündet, so scheint die Permeabilität generell erhöht zu sein [112], was im Falle der Zöliakie demnach einen sekundären Effekt darstellt. An Mäusen wurde beschrieben, dass Dendritische Zellen (Dendritic cells, DC) der Lamina propria mit Zellausläufern parazellulär das Darmlumen erreichen, dort Makromoleküle phagozytieren und anschließend diese den Immunzellen präsentieren können [113]. Ein solcher Mechanismus, vermittelt über DC oder Microfold-Zellen (M-Zellen), ist auch beim Menschen vorstellbar. Auf der anderen Seite gibt es Hinweise für einen transzellulären Weg des Glutens in die Lamina propria. So wurde gezeigt, dass intestinale Epithelzellen Gliadinpeptide aufnehmen, diese zumindest teilweise durch Einwirkung von Proteasen weiter verdauen und dann basolateral wieder abgeben können [112, 114, 115]. Auch der transzelluläre Transport ist im Entzündungszustand der Schleimhaut verstärkt. In *ex-vivo*-Experimenten zeigte sich zudem, dass von B-Zellen der Lamina propria sezernierte Immunglobuline der Klasse A (SIgA) den transzellulären Transport von Gliadinpeptiden verstärken können [116].

1.2.3.2 Reaktionen der angeborenen Immunantwort

Wichtige zelluläre Vertreter dieses Systems sind die antigenpräsentierenden Zellen (Antigen presenting cells, APC) wie Makrophagen, Monozyten und DC, außerdem Granulozyten und Natürliche Killerzellen (NK). APC der Lamina propria phagozytieren Gluten und aktivieren daraufhin die intraepithelialen Lymphozyten (IEL), B- und T-Lymphozyten, aber auch Enterozyten [117-120]. Das zentrale Zytokin dieser Reaktion ist das Interleukin-15 (IL-15), welches in der Schleimhaut von Patienten mit aktiver Zöliakie in erhöhten Konzentrationen vorkommt [121-123].

1.2.3.3 Reaktionen der intraepithelialen Lymphozyten

Es wird vermutet, dass IEL durch eine dauerhafte Aktivierung dazu beitragen, die intestinale Schleimhaut zu zerstören [94]. Zwei IEL-Subpopulationen kommen bei der Zöliakie vermehrt vor: T-Zellen, welche die $\gamma\delta$ -Isoform des T-Zell-Rezeptors exprimieren (TCR $\gamma\delta^+$) und T-Zellen, welche neben dem CD8-Korezeptor die $\alpha\beta$ -

Isoform des T-Zell-Rezeptors exprimieren ($CD8^+TCR\alpha\beta^+$). Die Menge der $TCR\gamma\delta^+$ -IEL ist zwar in allen Krankheitsstadien der Zöliakie erhöht, trotzdem konnte ihnen bisher keine zerstörerische Wirkung nachgewiesen werden [124]. Als Hauptverantwortliche für den Zottenschaden gelten die $CD8^+TCR\alpha\beta^+$ -IEL. Die Aktivierung der $CD8^+TCR\alpha\beta^+$ -IEL erfolgt vermutlich durch IL-15, welches von Makrophagen, DC und Enterozyten ausgeschüttet wird [123]. Die Aktivierung führt zu einer verstärkten Expression der Proteine MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A) und HLA-E auf den Enterozyten [122, 125, 126], welche wiederum Liganden für die Rezeptorproteine NKG2D und NKG2C (Natürliche-Killerzell-Gruppe-2-D bzw. -C) auf den $CD8^+TCR\alpha\beta^+$ -IEL darstellen. Die Rezeptoren NKG2C und NKG2D werden bei Zöliakie ebenfalls verstärkt exprimiert. Die Enterozyten, welche die Liganden MICA oder HLA-E tragen, stellen nun ein Ziel für einen zytoziden Angriff dar, welcher zum einen zytolytisch – vermittelt durch Perforine und Granzyme – zum anderen apoptoseinduzierend – vermittelt durch Fas/FasL – erfolgen kann [121-123, 127].

1.2.3.4 Reaktionen der erworbenen Immunantwort

Eine mögliche Erklärung für die starke HLA-Assoziation der Zöliakie wurde 1993 gefunden. Lundin und seine Mitarbeiter isolierten T-Zellen aus Duodenalbiopsien von Zöliakie- und Kontrollpatienten, etablierten T-Zellklone mit einer Spezifität für Gluten, Gliadin und verschiedene synthetische Gliadinpeptide und wiesen dann nach, dass diese Klone nur aktiviert werden konnten, wenn das Gluten/Gliadin-Antigen von den APC über ein bestimmtes HLA-DQ2-Molekül präsentiert wurde [128]. Auch für HLA-DQ8 und die seltenen Zöliakie-assoziierten HLA-DQ-Moleküle liegt eine solche Restriktion vor [129-131]. Gliadinpeptide stellen ein bevorzugtes Substrat für die Gewebstransglutaminase, das Autoantigen der Zöliakie, dar [14]. Die Affinität von Gliadinpeptiden zu HLA-DQ2/8-Molekülen, welche eine in der Summe positiv geladene „Bindungstasche“ besitzen, wird gesteigert, indem die Transglutaminase die γ -Aminogruppe von Glutamin abspaltet und durch eine negativ geladene Carboxylgruppe ersetzt [132, 133]. T-Zellen erkennen ihre antigenen Epitope besser, wenn an bestimmten Positionen dieser Peptide Glutamin durch die Transglutaminase zu Glutamat deamidiert wird [134, 135]. Glutenspezifische T-Zellklone aus der Duodenalschleimhaut produzierten auf Antigenpräsentierung hin die Zytokine IFN- γ ,

TNF und TGF- β , passend zu einer Immunantwort, welche von T_{H1}-Zellen getragen wird [136]. Übereinstimmend damit wurde herausgefunden, dass in Biopsien von CD-Patienten die mRNA von IFN- γ in erhöhter Konzentration vorkommt [137]. Auf welche Weise genau glutenspezifische T-Zellen zur Entstehung der „celiac lesion“ beitragen, ist nicht klar. Es wird vermutet, dass diese T-Zellen durch Zytokine wie IFN γ IEL oder zytotoxische CD8⁺-T-Zellen aktivieren, welche dann die Schleimhaut zerstören [94].

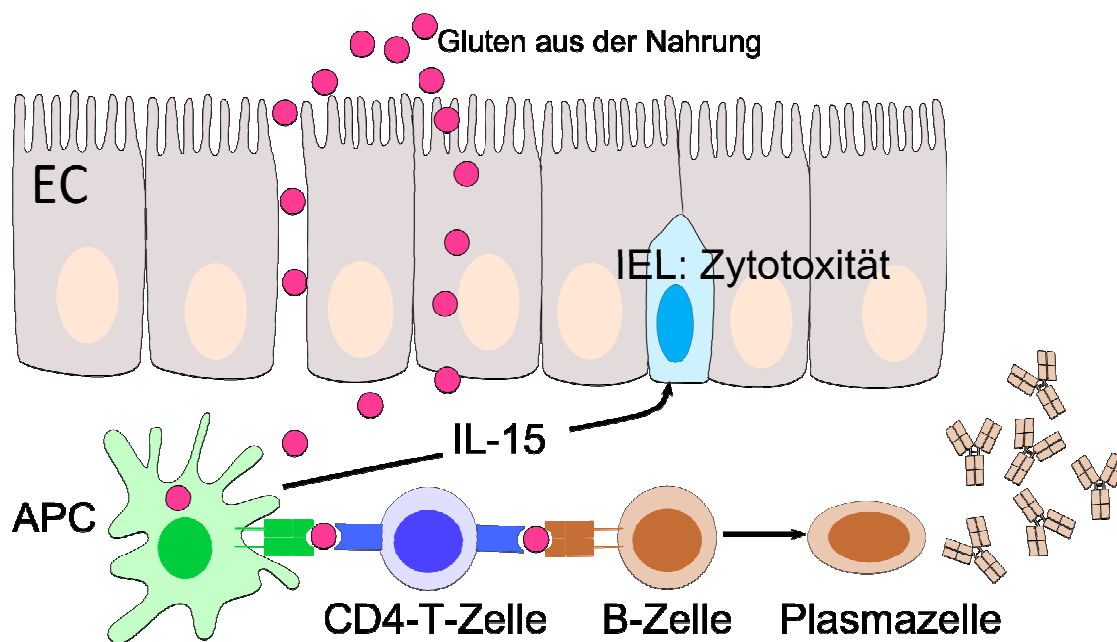


Abbildung 3: Pathogenetische Mechanismen bei Zöliakie.

Darstellung modifiziert nach [94] und [100]. Gluten gelangt in die Lamina propria der Duodenalschleimhaut, wo es von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufgenommen, prozessiert und an HLA-DQ2/8-Molekülen CD4⁺-T-Zellen präsentiert wird. Diese aktivieren B-Zellen, welche Antikörper gegen Gluten und die Gewebstransglutaminase produzieren. IL-15, welches von den APC ausgeschüttet wird, aktiviert intraepitheliale Lymphozyten (IEL). Diese IEL tragen die Rezeptoren NKG2C und NKG2D, welche durch Bindung von HLA-E bzw. MICA, die sich auf Enterozyten befinden, aktiviert werden und durch Granzyme, Perforin und Fas/FasL Zytotoxizität vermitteln.

Die bei Zöliakiepatienten vorkommenden Antikörper der Klassen G und A sind anti-Gliadin-Antikörper (AGA), anti-endomysiale Autoantikörper (EMA) und anti-Transglutaminase(tTG)-Autoantikörper [138]. Wird eine glutenfreie Diät eingehalten, so können sich die pathologischen Werte der Antikörper normalisieren [139]. Der Entstehungsmechanismus der anti-tTG-IgA ist nicht vollständig klar. Es wird vermutet,

dass Gluten, das während des Deamidierungsprozesses mit der Transglutaminase verbunden ist, bei der Immunisierung als Hapten fungiert [94]. Plasmazellen in der Duodenalschleimhaut von Zöliakiepatienten produzieren sekretorische anti-tTG-IgA (SIgA), welche in das Darmlumen sezerniert werden [140]. Deren pathogenetische Rolle ist noch unklar. Es gibt Hinweise, dass sie den Krankheitsprozess antreiben könnten, indem sie beispielsweise den transzellulären Transport von Gluten in die Lamina propria erleichtern [116]. Auf der anderen Seite ist bekannt, dass Menschen mit einer selektiven IgA-Defizienz überproportional häufig an Zöliakie leiden, so dass sekretorische anti-TG-IgA bei der Entstehung der „celiac lesion“ grundsätzlich verzichtbar scheinen [68].

1.2.4 Orale Toleranz

Unter oraler Toleranz versteht man das Phänomen, dass die Aufnahme oral aufgenommener Antigene keine abwehrende Immunantwort auslöst, sondern zur Entwicklung einer systemischen Unempfindlichkeit gegenüber dem Antigen führt [141]. Normalerweise ist eine solche Unempfindlichkeit gegenüber Autoantigenen, Nahrungsmittelantigenen und der Darmflora vorhanden. Im Falle von Autoimmunerkrankungen und Nahrungsmittelunverträglichkeiten wie der Zöliakie ist die orale Toleranz gestört. Orale Toleranz kann prinzipiell auf verschiedenen Wegen vermittelt werden, von besonderer Bedeutung scheinen dabei T-Zell-Anergie/Deletion sowie regulatorische T-Zellen zu sein (siehe **Abschnitt 1.2.5.1**).

1.2.5 Erkenntnisse mit unmittelbarer Bedeutung für die Hypothesenbildung

1.2.5.1 Antigenpräsentierung über HLA-Klasse-2-Moleküle, regulatorische T-Zellen

Der klassische Weg eines exogenen Antigens von der Kontaktaufnahme mit dem Immunsystem bis zur Immunreaktion beginnt mit der endozytotischen Aufnahme des Antigens in frühe Endosomen (EE) von APC, gefolgt von der anschließenden hydrolytischen Degradation im sauren Milieu der Lysosomen bzw. deren unmittelbarer Vorstufe, den späten Endosomen (LE) [141]. Hier erfolgt auch die Zusammenlagerung mit HLA-Klasse-2-Molekülen, an welchen dann das Antigen CD4⁺-T-Zellen präsentiert

werden kann. Werden die LE nicht erreicht, ist klassischerweise auch keine Präsentation an CD4⁺-Zellen möglich. Ungefährliche Nahrungsmittelantigene werden nicht ignoriert, sondern das Immunsystem entwickelt aktiv eine orale Toleranz. Diese wird häufig durch eine spezifische Subpopulation von CD4⁺-T-Zellen vermittelt. Diese T-Zellen werden auch regulatorische T-Zellen (T_{reg}) genannt. Sie stellen eine phänotypisch heterogene Gruppe dar, in vielen Fällen findet man aber neben CD4 auch CD25 sowie eine erhöhte Aktivität des FOXP3-Gens [142]. Zudem kann eine Abhängigkeit von den Zytokinen TGF- β und IL-10 bestehen. Die regulatorischen T-Zellen hemmen die Proliferation reaktiver CD4⁺-T-Zellen, sodass das betreffende Antigen toleriert wird [143].

1.2.5.2 Immunologische Funktionen von Enterozyten

Enterozyten exprimieren HLA-Klasse-2-Moleküle [144] und können darüber Antigene CD4⁺-T-Zellen präsentieren [145-149]. Sie besitzen damit die Eigenschaft antigenpräsentierender Zellen (APC). Enterozyten können wie professionelle APC CD4⁺-T-Zellen mit Suppressorfunktion (T_{reg}) induzieren [150, 151]. An einem Mausmodell wurde nachgewiesen, dass das Nahrungsmittelantigen Ovalbumin (OVA) nur bei den gesunden Kontrolltieren, welche eine OVA-Diät tolerieren, in die HLA-Klasse-2-Molekül-haltigen späten Endosomen (LE) bzw. Lysosomen gelangt. Bei SCID-Mäusen (Severe combined immunodeficiency), welche keine Toleranz gegenüber OVA entwickeln, gelangte OVA über HLA-Klasse-2-negative Endosomen in den parazellulären Raum [152]. Vor dem Hintergrund, dass die Präsentation eines exogenen AG nur nach Assoziation mit HLA-Klasse-2-Molekülen in LE möglich ist, kann dieses Ergebnis als Hinweis gewertet werden, dass Enterozyten und CD4⁺-T_{reg} an der Etablierung von Toleranz gegenüber Nahrungsmittelantigenen wie OVA beteiligt sein könnten.

1.2.5.3 Das Gliadinpeptid 31-43

Dieses Peptid besteht aus den Aminosäuren 31-43 des α -Gliadins. Genau wie die etwas längere Variante P31-49 löst auch das P31-43 bei Zöliakiepatienten, welche eine GFD einhalten, *in vivo* innerhalb weniger Stunden histomorphologische Veränderungen aus,

die denen bei aktiver Zöliakie entsprechen [153, 154]. Diese toxische Wirkung wird über das angeborene Immunsystem und dessen Mediator IL-15 vermittelt [118]. Das adaptive Immunsystem erkennt das P31-43 nicht, das heißt, es konnten bisher keine CD4⁺-T-Zellen mit Spezifität für dieses Peptid isoliert werden [155]. Man nennt es daher nicht-immunodominant im Gegensatz zu anderen α -Gliadinpeptiden wie beispielsweise dem P56-68, die vom erworbenen Immunsystem erkannt werden und daher immunodominant heißen [118, 154, 156]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen und den Ausführungen der vorangehenden Abschnitte ist herausgefunden worden, dass bei Zöliakiepatienten das nicht-immunodominante P31-49 LE mit HLA-Klasse-2-Molekülen nicht erreicht und damit der Antigenpräsentierung entgeht, während das immunodominante P56-68 in HLA-Klasse-2-Molekül-haltige LE gelangt [157].

1.2.5.4 Modulation des intrazellulären Vesikelverkehrs von Enterozyten

In der zuletzt genannten Studie gelang es bei Zöliakiepatienten weiterhin, durch Konjugation des P31-49 an die B-Untereinheit des Cholera-toxins, den Transport von P31-49 in LE umzuleiten und damit die Voraussetzung für die Assoziation an HLA-Klasse-2-Moleküle und die Präsentation an regulatorische CD4⁺-Zellen zu schaffen. Eine solche Veränderung des Transportwegs konnte kürzlich für das P31-43 auch durch die Einwirkung von Serum von Zöliakiepatienten (mit anti-Gliadin-IgG und -IgA) auf die Enterozyten erreicht werden [158].

1.2.5.5 Der neonatale Fc-Rezeptor für IgG

Der neonatale Fc-Rezeptor für IgG (FcRn) ist ein Glykoprotein, welches mit HLA-Klasse-1-Molekülen strukturell verwandt ist [159]. Er ist verantwortlich für den transzellulären Transport von IgG über die Plazentaschranke und damit wesentlich für passive Immunität des Neugeborenen [160, 161]. FcRn wird beim Menschen über die Neonatalperiode hinaus auch im adulten Organismus und neben vielen anderen Geweben auch von Enterozyten exprimiert [162]. FcRn-abhängiger Transport von IgG über Epithelien ist durch Bindung des F_c-Teils von IgG grundsätzlich sowohl von apikal nach basolateral als auch umgekehrt möglich [163, 164]. Es wurde gezeigt, dass FcRn

IgG von basolateral nach apikal transportieren kann, wo die Immunglobuline Antigene binden und dann mit dem gebundenen Antigen wieder nach basolateral zurück transportiert werden können [165]. Das Antigen steht dann in der Lamina propria zur Prozessierung und Antigenpräsentierung zur Verfügung. An DC der Maus wurde nachgewiesen, dass FcRn IgG mit gebundenen Antigenen in die späten Endosomen von APC transportieren kann, solange der Antigen-Antikörper-Komplex multimer ist, d.h. aus mehreren Antigen- und IgG-Molekülen besteht [166]. Über diese Erkenntnisse hinausgehend liegen Studien vor, die eine direkte Beteiligung von FcRn an der Toleranzentwicklung gegenüber Nahrungsmittelantigenen nahe legen. So wurde gezeigt, dass Mäuse ein Nahrungsmittelantigen – über einen Mechanismus, an welchem regulatorische $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen beteiligt sind – tolerieren, wenn das Antigen im multimeren Antigen-Antikörperkomplex vorliegt und FcRn-abhängig in Enterozyten aufgenommen wird [167, 168].

1.3 Die Fragestellung

Als Zusammenfassung der oben angeführten Studienergebnisse kann das Folgende festgehalten werden: Bei der Zöliakie liegt ein Versagen der Toleranzentwicklung gegenüber Gliadin vor. Enterozyten sind APC und können AG regulatorischen $CD4^+$ -T-Zellen präsentieren. Das Gliadinpeptid P31-43, welches allein Schleimhautveränderungen wie bei aktiver Zöliakie auslösen kann, ist nicht-immunodominant, d.h. es kann nicht (regulatorischen) $CD4^+$ -T-Zellen präsentiert werden, da es nicht in späte Endosomen gelangt. Die Korrektur des intrazellulären Transportwegs von Gliadin und besonders des P31-43 derart, dass diese die LE von Enterozyten erreichen, könnte ein wichtiger Schritt bei der Entwicklung von Toleranz gegenüber Gliadin sein. Durch die Einwirkung von Serum von Zöliakiepatienten, welches relativ hohe Reaktivitäten von anti-Gliadin-IgA und -IgG enthielt, ist diese Korrektur gelungen. In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, dass Stillen vor der Entwicklung einer Zöliakie schützt [86] und dass Muttermilch anti-Gliadin-IgG und -IgA enthält [169, 170]. Gegen eine Rolle von anti-Gliadin-IgA bei der Veränderung des intrazellulären Gliadintransportwegs spricht, dass IgA grundsätzlich verzichtbar scheinen bei der Entwicklung von Toleranz gegenüber Nahrungsmittelantigenen [171]. Dagegen liegen direkte Hinweise vor, welche für eine Bedeutung von spezifischen IgG

und FcRn in diesem Zusammenhang sprechen [167, 168]. Aus den Ergebnissen der angeführten Studien kann der Schluss gezogen werden, dass anti-Gliadin-IgG dazu beitragen könnten, den intrazellulären Transportweg von Gliadinpeptiden zu verändern. Insbesondere interessant ist hierbei der Transportweg des nicht-immunodominanten P31-43.

Die Hypothese lautet daher:

- Durch Einwirkung spezifischer anti-Gliadin-IgG wird die intrazelluläre Verteilung von Gliadinpeptiden in Enterozyten von CD-Patienten verändert.

Im Zusammenhang mit der möglichen Entwicklung von oraler Toleranz gegenüber Gliadin wird diese Hypothese spezifiziert:

- Durch Einwirkung von spezifischen anti-Gliadin-IgG wird der LE-ständige Anteil von Gliadinpeptiden in Enterozyten von CD-Patienten erhöht.

Und, da frühe Endosomen im Reifungsprozess der späten Endosomen diesen vorgeschaltet sind:

- Durch Einwirkung von spezifischen anti-Gliadin-IgG wird der EE-ständige Anteil von Gliadinpeptiden in Enterozyten von CD-Patienten erhöht.

2 Material und Methoden

2.1 Aufbau der Studie

Es handelt sich um eine experimentelle, explorative Studie. Zur Testung der Hypothese wurden Dünndarmbiopsien *ex vivo* einem experimentellen Procedere unterworfen und anschließend elektronenmikroskopisch ausgewertet.

2.2 Material

2.2.1 Patienten

In diese Studie wurden Proben von insgesamt 20 Kindern und Jugendlichen eingeschlossen, die zur Abklärung einer Verdachtsdiagnose oder zur Verlaufskontrolle einer vorbekannten Erkrankung (z.B. mit Glutenbelastung) im Jahr 2012 in der Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin der Deutschen Klinik für Diagnostik GmbH in Wiesbaden (Leitung: Prof. K.-M. Keller) eine Ösophago-Gastro-Duodenoskopie (ÖGD) inklusive Biopsieentnahme erhielten. Die Namen der Patienten wurden pseudonymisiert. Mithilfe eines standardisierten Bogens wurden weitere Patientendaten erhoben wie Geburtsmonat und -jahr, Diagnose(n), glutenfreie Diät (ja oder nein), anti-TGA-IgA-Aktivität und HLA-DQ2/8-Status (positiv oder negativ).

2.2.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller, Ort, Land
Deckgläser	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Elektronenmikroskopienetze FCF-100-Ni	Sciences Services, München, Deutschland
Filterpapier	Whatman, Maidstone, UK
Glasmesserbrecher KMR2	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Glaspasteurpipetten 230mm	VWR International, Radnor, USA

Impfösenhalter	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Kodak Electron image film SO-163	Kodak, Rochester, USA
Kryokammer Leica EM FC6	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kryoröhrchen (2ml)	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Kryotom Leica EM UC6	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop	Hund, Wetzlar, Deutschland
Mikropipetten (0-10; 10-100; 20-1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Objektträger mit Aufnahmebohrung	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Objektträger für Lichtmikroskopie	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Öse zum Probentransport	PLANO, Wetzlar, Deutschland
Parafilm „M“	Pechiney, Chicago, USA
pH-Meter	Hanna Instruments, Woonsocket, USA
Pinzette gebogen	PLANO, Wetzlar, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5; 1ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Scanner G4050	Hewlett-Packard, Böblingen, Deutschland
Schneidediamant cryo immuno 35° 3mm	Diatome AG, Biel, Schweiz
Stereomikroskop	Motic, Wetzlar, Deutschland
Thermomixer	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Tischzentrifuge Minispin plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transmissionselektronenmikroskop EM410	Philips, Eindhoven, Niederlande
Trimmdiamant Cryotrim 20	Diatome AG, Biel, Schweiz

Tabelle 7: Verwendete Geräte, Glas- und Plastikmaterialien.

2.2.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller, Ort, Land
CWFS (Cold Water Fish Skin) Gelatine	Aurion, Wageningen, Niederlande
DMEM	PAA, Pasching, Deutschland
Entionisiertes Wasser	Braun AG, Melsungen, Deutschland
Ethanol 70%	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
HEPES	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Methylcellulose	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
N ₂ (flüssig)	Linde, Pullach, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PVP-10/Polyvinylpyrolidone	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Saccharose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tissue-Tek	Takura, Tokyo, Japan
Toluidin Blau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Uranylacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien.

2.2.4 Primäre Antikörper

Es wurden zwei monoklonale primäre Antikörper und zwei polyklonale primäre Antikörper eingesetzt. Die monoklonalen AK wurden mit Hilfe von Maushybridomazelllinien produziert, die polyklonalen AK wurden aus dem Serum von Kaninchen gewonnen. Alle Antikörper waren Immunglobuline der Klasse G. Der m-Gliadin-AK und der p-Gliadin-AK wurden produziert durch Immunisierung der Wirte mit dem Peptid P31-44 aus der α -Gliadinfraktion bzw. der gesamten Fraktion der α -Gliadine. Sie wurden eingesetzt, um Bestandteile der FF (siehe **Abschnitt 4.2.1**) bzw. Gliadin in den IEC zu binden. Für den m-Gliadin-AK ist bekannt, dass seine Erkennungssequenz in jenem Bereich der α -Gliadine liegt, welcher dem toxischen P31-

43 entspricht. Für den p-Gliadin-AK existieren keine derartigen Daten. Antikörper gegen LAMP-2 (lysosomal associated membrane protein 2) und Cathepsin-D (eine lysosomale Protease) wurden produziert durch Immunisierung der Wirte mit Teilpeptiden der namensgebenden Proteine. Sie wurden eingesetzt, um die entsprechenden Proteine in den LE zu binden.

Bezeichnung	Wirt, Klonalität	Verdünnung	Hersteller, Ort, Land
m-Gliadin	Maus, monoklonal	1:5	Prof. Paul Ciclitira, London, UK
p-Gliadin*	Kaninchen, polyklonal	1:30	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
LAMP-2/CD 107b	Maus, monoklonal	1:5	BD Pharmingen, New Jersey, USA
Cathepsin-D	Kaninchen, polyklonal	unverdünnt	Abcam PLC, Cambridge, UK

Tabelle 9: Primäre Antikörper für die Immunelektronenmikroskopie.

*Der p-Gliadin-AK wurde in der Verdünnung 1:1000 auch als Zusatz zum Inkubationsmedium verwendet, um die Rolle spezifischer anti-Gliadin-IgG zu prüfen. Die Namen der AK wurden vereinfacht. Kommerziell ist der p-Gliadin-AK unter dem Namen α -Gliadin bei der Firma Sigma erhältlich. Der m-Gliadin-AK ist in Veröffentlichungen mit WB6/8 bezeichnet.

2.2.5 Sekundäre Antikörper

Alle sekundären Antikörper waren polyklonale IgG und wurden in Ziegen produziert. Diese waren mit schweren und leichten Ketten von Kaninchen- und Maus-IgG immunisiert worden. Sie wurden eingesetzt, um die primären AK auf dem Gewebe zu binden. Die sekundären AK trugen Goldpartikel (GP) mit 12 bzw. 6nm Durchmesser.

Bezeichnung	Wirt	Verdünnung	Hersteller, Ort, Land
Goat-anti-mouse (GaM) 12nm	Ziege	1:5	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Goat-anti-rabbit (GaR) 12nm	Ziege	1:40	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Goat-anti-mouse (GaM) 6nm	Ziege	1:2,5	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Goat-anti-rabbit (GaR) 6nm	Ziege	1:50	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper für die Immuielektronenmikroskopie.

2.2.6 Lösungen und Puffer

Frazer's Fraction III [172]:

- 100g Gluten und 0,5g Pepsin in 1l 1M HCl (pH = 1,8) lösen.
- Bei 37°C für 4h unter ständigem Rühren inkubieren.
- Einstellen des pH-Werts auf pH = 7,8 mit 1M NaOH.
- Zugabe von 0,5g Trypsin.
- Erneut bei 37°C für 4h unter ständigem Rühren inkubieren.
- Titration auf pH = 4,5 mit 1M HCl. Dabei bildet sich ein Niederschlag.
- Zentrifugation mit 2500U/min. FF III stellt den Überstand dar. Verdünnung mit DMEM 1/20.
- Der Einfachheit halber wird im Folgenden die Abkürzung FF verwendet, wenn die FF III gemeint ist.

5% Paraformaldehyd (PFA) in Pipes:

- Lösung A: Paraformaldehyd.
 - 100ml H₂O auf 60°C erwärmen.
 - Darin 10g Paraformaldehyd lösen.
 - Mit 1M NaOH titrieren, bis die Lösung klar ist.
- Lösung B: Pipes-Puffer.
 - 12,1mg Pipes in 80ml H₂O lösen.
 - Mit 5M NaOH titrieren bis pH = 7,0, wobei die Lösung klar wird.
 - Mit H₂O auf 100ml auffüllen.
- Lösung A und Lösung B mischen und bei -20°C lagern.

PVP-Saccharose:

- 30g PVP ad 24ml H₂O und 6ml 1,1M Na₂CO₃ unter Rühren zugeben.
- Wenn das PVP vollständig aufgelöst ist, 70ml einer 2,3M Saccharoselösung zugeben und bei RT über Nacht rühren.
- Vor der Verwendung mindestens eine Woche bei 4°C ruhen lassen.

2.3 Durchführung der Ösophago-Gastro-Duodenoskopie und Biopsiegewinnung

Bei allen Patienten wurde eine Ösophago-Gastro-Duodenoskopie (ÖGD) durchgeführt. Dazu wurden die Patienten mit 0,1-0,2mg/kg KG Midazolam i.v. über eine Venenverweilkanüle sediert. In Einzelfällen wurden zusätzlich 0,15-0,2mg/kg KG Etomidat i.v. verabreicht. Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung wurden fortlaufend überwacht, die gesamte Untersuchung dauerte maximal 5min. Es wurden Endoskope mit einem Außendurchmesser von 8,5mm (Kindergröße) und 9,5 bis 10,5mm (Erwachsenengrößen) verwendet. Insgesamt wurden mindestens 5 Zangenbiopsien mit einem Durchmesser von 1-2mm aus dem Duodenum entnommen.

2.4 Probenaufbereitung und -verarbeitung

Nach der Entnahme der Biopsien wurden diese in einer Petrischale mit 0,9% NaCl-Lösung unter dem Stereomikroskop begutachtet. Die Gewebestücke mit den

schwerwiegendsten Zottenschäden wurden für die histopathologische Diagnostik verwendet. Die restlichen Gewebestücke wurden nicht verworfen, sondern fanden Eingang in diese Studie. Bei insgesamt mindestens 5 entnommenen Biopsien wurden auf diese Weise 1-2 Biopsien für dieses Forschungsprojekt weiterverwendet. Diese Weiterverwendung von restlichem Probenmaterial aus einem diagnostischen Eingriff zu Forschungszwecken war von der Ethikkommission der Landesärztekammer Hessen unter dem Aktenzeichen MC 275/2011 gebilligt worden. Die Patienten bzw. deren Sorgeberechtigte wurden vor der Durchführung des Eingriffes über die geplante Weiterverwendung des Gewebes zu Forschungszwecken aufgeklärt und um Zustimmung gebeten.

Unter dem Stereomikroskop wurde das Gewebe mit einem Skalpell zerteilt, so dass insgesamt drei ungefähr gleich große Gewebestücke, die jeweils einen Abschnitt der apikalen Membran bzw. mikroskopisch sichtbare Zotten aufwiesen, vorlagen. Diese Gewebestücke wurden auf die verschiedenen Inkubationsansätze verteilt. Bei der Handhabung des Gewebes mit der Pinzette wurde darauf geachtet, dieses nicht zu quetschen, sondern es auf die Pinzette zu laden. Es gab drei verschiedene Ansätze (**Tabelle 11**): Eines der Gewebestücke wurde in ein Kryoröhrchen mit PFA gebracht (Nativ), eines in ein Kryoröhrchen mit FF 1:20 (-IgG) und eines in ein Kryoröhrchen mit FF 1:20 und polyklonalem Kaninchen-IgG gegen α -Gliadine in der Verdünnungsstufe 1:1000 (+IgG). Die Kryoröhrchen -IgG und +IgG wurden in den Thermomixer eingesetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

+IgG	-IgG	Nativ
FF 1:20 + p-rabbit-anti- α -Gliadin IgG 1:1000	FF 1:20	-

Tabelle 11: Inkubationsansätze.

Die Ansätze +IgG und -IgG wurden für 1h bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Der Nativansatz wurde nicht inkubiert, sondern direkt fixiert. FF wurde mit DMEM 1:20 verdünnt.

Das Röhrchen mit der Nativprobe wurde mehrfach geschwenkt, um das PFA zu verteilen und dann bei Raumtemperatur gelagert. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Proben mit und ohne IgG ebenfalls jeweils in ein Kryoröhrchen mit PFA gebracht und darin eine Stunde bei Raumtemperatur belassen zur Fixation.

Anschließend wurden alle Röhren über Nacht bei 4°C gelagert und danach ungekühlt per Post nach Gießen versandt.

2.5 Immunoelektronenmikroskopie

Die methodische Grundlage zu allen Arbeitsschritten dieses Abschnitts stellt das Lehrbuch von Griffiths [173] dar.

2.5.1 Vorbereitung der Proben

Das fixierte Gewebe wurde den Kryoröhren entnommen und für eine Stunde in PVP-Saccharose inkubiert. Dieser Schritt dient nach Tokuyasu [174] dazu, eine verbesserte Schnittqualität zu erreichen und den zellulären Strukturhalt zu erhöhen (Kryoprotektion). Anschließend wurde das Gewebe unter stereomikroskopischer Kontrolle erneut geteilt, so dass für jeden Inkubationsansatz mindestens 3 Gewebestücke vorlagen. Jedes einzelne Gewebestück wurde nun durch vorsichtiges Rollen auf einem Filterpapier so gut wie möglich von der PVP-Saccharose befreit und dann auf einen nagelförmigen Objektträger mit Aufnahmebohrung, der mit dem Gewebeklebstoff Tissue-Tek benetzt war, aufgesetzt. Die Orientierung des Gewebes auf dem Objektträger war derart, dass die apikale Membran – in der Längsachse des Objektträgers gesehen – an dessen äußerstem Pol lag. Der Objektträger mit der Probe wurde anschließend in Flüssigstickstoff gelagert.

2.5.2 Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten

Für die Herstellung von Schnitten wurden die Temperatur der Kammer des Gefriermikrotoms und die Präparatblocktemperatur auf -110°C, die Temperatur des Messers auf -100°C eingestellt. Da für die Auswertung der Versuche das Vorhandensein von apikaler Membran nötig war, wurden vor der Herstellung der ultradünnen Schnitte zuerst 160nm dicke „Semi“-dünnschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit einer Öse und einem Tropfen 2,3M Saccharose (gelöst in H₂O) vom Messer aufgenommen und auf einen Objektträger überführt. Dieser Objektträger wurde auf einer Heizplatte platziert, wo dem Gewebe für einige Sekunden Zeit gelassen wurde zu sedimentieren.

Dann wurden die Schnitte mit Toluidinblau gefärbt, getrocknet und unter dem Lichtmikroskop begutachtet. Für den Fall, dass ausreichend apikale Membran vorhanden war, wurde dieser angeschnittene Bereich des Gewebeblocks mit dem Trimmdiamanten herausgetrimmt, so dass man einen pyramidenförmigen Block mit einer Neigung der Seitenflächen von 20° erhielt. Von diesem getrimmten Block wurden mithilfe des Schneidediamanten 55nm dicke Ultradünnschnitte angefertigt. Die Schnittbänder wurden mit einer Wimper kontrolliert, ggfs. angeordnet und mit einer Öse und einem Tropfen 2,3M Saccharose vom Diamantmesser auf ein Elektronenmikroskopienetz übertragen. Die Netze wurden anschließend mit der Öse weitertransportiert auf PBS, welches sich in einer Petrischale auf Eis befand. Die Netze kamen dabei schwimmend auf dem PBS zum Liegen, derart, dass die Seite mit den Schnitten dem PBS zugewandt war. Auf diese Weise wurden die Netze bis zum Beginn der Markierungsexperimente gelagert.

2.5.3 Beschichtung der Schnitte mit Antikörpern zur Gliadinmarkierung

Grundsätzlich wurden Doppelmarkierungsexperimente mit Antikörpern gegen Gliadin und gegen LE durchgeführt. Dabei wurden die AK so kombiniert, dass immer ein polyklonaler Kaninchen-AK mit einem monoklonalen Maus-AK zusammen eingesetzt wurde. Die sekundären AK wurden so verwendet, dass die primären AK gegen Gliadin stets durch sekundäre AK mit GP 12nm und die primären AK gegen LE stets durch sekundäre AK mit GP 6nm gebunden werden konnten. **Tabelle 12** gibt die genauen Kombinationen an.

Primäre Antikörperkombination	Sekundäre Antikörperkombination
m-Gliadin + Cathepsin-D	————→ GaM 12nm + GaR 6nm
p-Gliadin + LAMP2	————→ GaR 12nm +GaM 6nm

Tabelle 12: Kombinationen primärer und sekundärer Antikörper.

Die Netze mit den Schnitten der 3 Inkubationsansätze Nativ, -IgG und +IgG eines Patienten wurden nun mit den in **Tabelle 12** genannten Kombinationen aus primären und sekundären AK beschichtet. Dafür wurden die Netze mit einer Pinzette über

Tropfen der Antikörperverdünnung, des Blockmediums und der Waschlösungen transportiert, welche sich auf Parafilm befanden. Dabei wurde das folgende Protokoll eingehalten:

- 15 min Blocken mit CWFS
- 45 min Inkubation mit primären AK (5µl pro Netz; verdünnt in CWFS).
- 15 min Waschen über 5 Tropfen PBS.
- 45 min Inkubation mit sekundärem AK (5µl pro Netz; verdünnt in CWFS).
- 30 min Waschen über 6 Tropfen PBS.
- 5 min Waschen über 3 Tropfen H₂O.
- 5 min Kontrastierung über 3 Tropfen Uranylacetat (0,4%, verdünnt in Methylcellulose 2%) auf Eis.
- Netz mit Öse aufnehmen und überschüssiges Uranylacetat auf Filterpapier abstreifen.
- Netze lufttrocknen.

2.5.4 Auswertung der antikörperbeschichteten EM-Netze

2.5.4.1 Auswertung der Verteilung der Gliadinmarkierung auf zelluläre Kompartimente

Die Auswertung erfolgte an einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) von Philips, Model EM 401. Netze, die in der Übersichtsvergrößerung eine zu starke Verschmutzung oder Verdunklung durch Uranylacetat oder eine starke Überlappung der Schnitte aufwiesen, wurden nicht zur Auswertung verwendet. Schnitte, die frei von solchen Artefakten waren, wurden bei einer 13800-fachen Vergrößerung untersucht. Die kugelförmigen Goldpartikel (GP), mit welchen die sekundären AK verbunden waren, stellten sich in der elektronenmikroskopischen Auswertung als runde elektronendichte Strukturen dar. Zur Auswertung wurden beliebige duodenale Epithelzellen eines Schnittes angesteuert und die relative Verteilung von 12nm Goldpartikeln, als Maß für die Verteilung von Gliadin, erfasst. Pro Ansatz wurden 100 GP 12nm abgezählt und auf standardisierten Bögen notiert, in welchem zellulären Kompartiment sich diese befanden. Um eine wiederholte Zählung der gleichen GP zu vermeiden, wurden die Epithelzellen mäanderförmig (**Abbildung 4**) abgefahren. War

eine Epithelzelle mit weniger als 100 GP 12nm markiert, wurde die Zählung auf gleiche Art und Weise in der benachbarten Zelle fortgeführt.

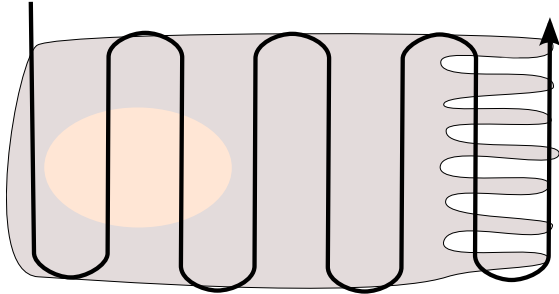


Abbildung 4: Mäanderförmigen Führung des mikroskopischen Gesichtsfeldes.

Die Identifizierung zellulärer Strukturen bzw. Kompartimente erfolgte anhand morphologischer Merkmale, im Fall von LE auch anhand der Markierung durch GP 6nm (**Tabelle 13**). Fotografien wurden in Einzelfällen angefertigt, waren aber grundsätzlich kein Bestandteil der Quantifizierung

Zelluläres Kompartiment	Abkürzung	Kriterien zur Identifizierung
Frühe Endosomen	EE	Membranbegrenzt; markiert durch <4 GP 6nm
Späte Endosomen	LE	Membranbegrenzt; markiert durch ≥ 4 GP 6nm
Zellkerne	Zk	Membranbegrenzt; relativ elektronendicht; Eu- und Heterochromatin; basale Lage in der Zelle
Golgi-Apparat	Go	Membranstapel mit Vesikeln; Nähe zum Zellkern
Mitochondrien	Mi	Membranbegrenzt; Tubuli und Cristae
Apikale Membran	AM	Apikaler Zellpol mit Mikrovilli; begrenzt durch Tight Junctions
Basolaterale Membran	Bl	Basale und laterale Membranbegrenzung der Zelle; von AM durch Tight Junctions abgetrennt
Zytosol	Zyt	Kontrastarm; umgibt o.g. intrazelluläre Strukturen

Tabelle 13: Identifizierte zelluläre Strukturen und deren Definition.

2.5.4.2 Untersuchung des spezifischen Bindungsverhaltens der anti-Gliadin-Antikörper

Die Untersuchung des spezifischen Bindungsverhaltens der Antikörper m-Gliadin und p-Gliadin gegenüber den Bestandteilen der FF auf Gefrierschnitten mit 55nm Dicke orientierte sich an den Vorschlägen einer methodischen Übersichtsarbeit von Lucocq und Gawden-Bone [175]. Grundsätzlich wird zwischen zwei Arten von unspezifischen Bindungen unterschieden: Zum einen gibt es Interaktionen der Antikörper mit Gewebskomponenten, die keine Ähnlichkeit mit der Zielstruktur besitzen. Zum anderen gibt es Interaktionen der Antikörper mit Gewebskomponenten, welche dem Zielantigen strukturell ähnlich sind, v.a. aufgrund ähnlicher Aminosäuresequenzen. Die erstgenannte Art der unspezifischen Bindungen kann durch Weglassen des primären Antikörpers ermittelt werden, wobei die Versuchsdurchführung ansonsten unverändert bleibt. Dies war in Vorversuchen untersucht worden. Die zweite Art kann durch Zugeben (positive Kontrolle) bzw. Weglassen (negative Kontrolle) des Zielantigens untersucht werden. Das unterschiedliche Markierungsverhalten der AK auf positiven und negativen Kontrollen wurde auf dreierlei Arten untersucht. Grundsätzlich wurden dazu die Markierungsdichten der Antikörper auf Schnitten von Gewebeproben, die mit FF (+FF, Positivkontrolle) inkubiert worden waren, mit den Markierungsdichten auf Schnitten von Gewebeproben, die nicht mit FF (-FF, Negativkontrolle) inkubiert worden waren, verglichen. Zur Ermittlung einer Spezifität wurden bei einem der 20 Patienten (GL007WI) für jeden der beiden Antikörper gegen Gliadin bei einer 17700-fachen Vergrößerung jeweils 10 Fotografien von Enterozyten auf Netzen +FF und -FF angefertigt. Fotografiert wurde dabei stets ein Bereich, der relativ nah an der apikalen Membran lag, diese aber nicht berührte (subapikal, **Abbildung 5**). Auf zellulärer Ebene entspricht dieser Bereich einer Fläche (A) von $0,27\mu\text{m}^2$. Wenn diese Fläche durch eine Zelle allein nicht abgedeckt werden konnte, so wurde der fotografierte Bereich über die lateralen Begrenzungen dieser Zelle auf den subapikalen Bereich der benachbarten Zelle ausgedehnt.

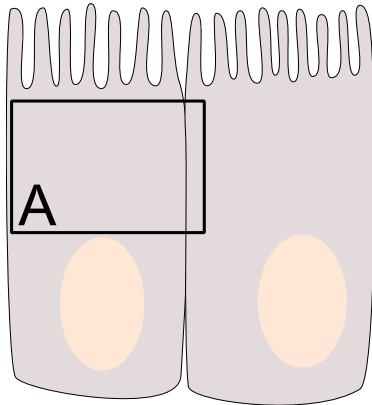


Abbildung 5: Zellulärer Bereich zur Bestimmung der Markierungsdichte.

$A=0,27\mu\text{m}^2$.

Die Auswahl der Zellen, die fotografiert wurden, erfolgte zufällig, durch Ansteuerung von zellulären Bereichen aus der Übersichtsvergrößerung, wenn diese frei von Artefakten waren. Die Spezifität $f(s)$, als Anteil der Goldpartikel (GP) auf einem Netz mit Gewebe, welches mit FF inkubiert wurde, der tatsächlich FF darstellt, wurde errechnet nach:

$$f(s) = \frac{D(+FF) - D(-FF)}{D(+FF)}, \text{ wobei } D = \frac{n}{A}$$

Abbildung 6: Gleichung zur Errechnung der Spezifität.

D: Markierungsdichte. n: Anzahl GP 12nm. A: Fläche $A=0,27\mu\text{m}^2$. D(+FF): Markierungsdichte auf einem EM-Netz, dessen Gewebe mit FF inkubiert worden war. D(-FF): Markierungsdichte auf einem EM-Netz, dessen Gewebe nicht mit FF inkubiert worden war.

Als weiterer Indikator für die Spezifität der Antikörper wurden in der oben beschriebenen Art und Weise die Markierungsdichten auf Schnitten von Säuglingsdarmbiopsien (Alter ein und zwei Monate; Diagnose Microvillus inclusion disease, MVID) bestimmt, bei welchen von einer vollständig glutenfreien Ernährung ausgegangen werden kann. Für diese Säuglinge lagen nur native, das heißt nicht mit FF inkubierte Proben vor. Daher konnte hier kein Spezifitätswert bestimmt werden. Das Gewebe der beiden MVID-Patienten diente nicht zur Testung der Hypothese, daher gehörten diese nicht zum Studienkollektiv. Zuletzt wurde die Anzahl der Zellen

zwischen +FF und -FF verglichen, die ausgezählt werden mussten, um auf 100 GP 12nm zu kommen. Man kann von einer Ermittlung der Markierungsdichte pro Zelle sprechen. Dies wurde für alle Patienten durchgeführt. Die Spezifität der Antikörper für LE wurde nicht untersucht.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS in der Version 21. Mit SPSS wurde mittels des Shaipiro-Wilk-Tests geprüft, ob die gemessenen Merkmalsausprägungen normalverteilt waren. Im Ergebnisteil findet sich neben den Daten die Angabe, ob eine Normalverteilung vorlag oder nicht. Bei normalverteilten Daten wurde die Testung eines Unterschieds mit dem *t-Test* vorgenommen, ansonsten wurden nicht-parametrische Tests ausgewählt. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von 0,05 festgelegt. Der *Spearman-rho*-Test wurde verwendet um Korrelationen zu überprüfen. Die Diagramme wurden mit Hilfe von SPSS erstellt. Es ist jeweils der arithmetische Mittelwert angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Patienten

3.1.1 Patienteneinteilung

Das Studienkollektiv von 20 Patienten wurde den zwei Diagnosegruppen Zöliakie (CD) und Nicht-Zöliakie (N-CD) zugeteilt (**Abbildung 7**).

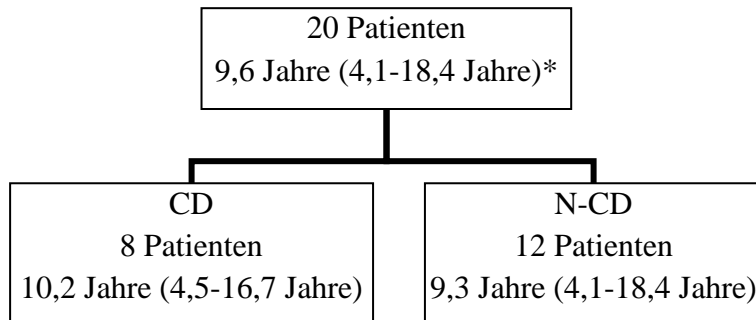


Abbildung 7: Aufteilung der Patienten.
Median (Spannweite).

3.1.2 Nicht-Zöliakie-Patienten

Diese Gruppe (n=12) umfasste die folgenden Erkrankungen:

- Ösophagitis (n=2)
- Helicobacter pylori assoziierte Gastritis (n=6)
- Hiatushernie (n=1)

Zwei der Patienten litten an rezidivierenden gastrointestinalen Beschwerden, ohne dass eine Diagnose gestellt werden konnte. Bei drei Patienten konnte eine Zöliakie nicht bestätigt werden, wobei der Verdacht auf Zöliakie weiterhin bestand. Bei zwei dieser Patienten wiederum bestand gleichzeitig eine H.p.-assoziierte Gastritis.

3.1.3 Zöliakie-Patienten

Alle Zöliakie-Patienten (n=8) waren HLA-DQ2/8 positiv. Bei glutenhaltiger Ernährung wiesen alle Zöliakiepatienten hohe anti-tTG-IgA-Aktivitäten und Schleimhautläsionen der Gradierung MARSH 3c auf. Die Diagnose Zöliakie wurde entsprechend den Empfehlungen der ESPGHAN gestellt [1].

3.1.4 Patientendaten

Patient	Alter	Diagnose	GFD	Anti-tTG-IgA [U/ml]	Klassifikation	HLA-DQ 2/8
GL005WI	11 J	N-CD	nein	<1	MARSH 0	nicht untersucht
GL006WI	13 J	N-CD	nein	<1	MARSH 0	nicht untersucht
GL007WI	18 J	CD	ja	<1	MARSH 0	HLA DQ2+8 pos.
GL008WI	7 J	N-CD	nein	<1	MARSH 0	neg.
GL009WI	5 J	CD	nein	<1200	MARSH 3c	DQ2 pos.
GL010WI	8 J	N-CD	nein	<1	MARSH 0	nicht untersucht
GL011WI	6 J	N-CD	ja	2	MARSH 1	DQ2 pos., DQ 8 neg.
GL012WI	10 J	CD	nein	600	MARSH 3c	DQ8 pos.
GL013WI	16 J	N-CD	nein	<1	MARSH 0	nicht untersucht
GL014WI	8 J	CD	ja	<1	MARSH 0	DQ2 pos.
GL016WI	4 J	N-CD	nein	<1	MARSH 0	nicht untersucht
GL018WI	9 J	N-CD	nein	<1	MARSH 0	nicht untersucht
GL019WI	12 J	N-CD	nein	<1	MARSH 0	nicht untersucht
GL020WI	12 J	N-CD	nein	12	MARSH 1	DQ2+8 pos.
GL021WI	6 J	N-CD	nein	15	MARSH 0	DQ2 pos.
GL022WI	7 J	CD	nein	107	MARSH 3c	DQ8 pos.
GL023WI	4 J	CD	ja	<1	MARSH 1	DQ2 pos.
GL024WI	15 J	N-CD	nein	<1	MARSH 0	nicht untersucht
GL025WI	11 J	CD	nein	>1200	MARSH 3c	DQ8 pos.
GL026WI	10 J	CD	nein	25	MARSH 3c	DQ2 pos.

Tabelle 14: Patientendaten.

CD: Zöliakie. N-CD: Nicht-Zöliakie. GFD: Glutenfreie Diät.

3.2 Spezifisches Bindungsverhalten der anti-Gliadin-Antikörper

Als Grundlage für die Interpretation der Ergebnisse wurde untersucht, wie sich das Bindungsverhalten der Antikörper m-Gliadin und p-Gliadin – vermittelt durch die entsprechenden, an GP 12nm gekoppelten, sekundären AK – auf Proben mit FF vom Bindungsverhalten auf Proben ohne FF unterscheidet. **Tabelle 15** und **Abbildung 8** zeigen die Markierungsdichten von GP 12nm, wie sie durch den Einsatz der AK (**Abschnitt 2.5.3**) auf verschiedenen Proben hervorgerufen wurden.

Patient	Antikörper	Inkubation	D [n/A]	SD
GL007WI	m-Gliadin	+FF	10,8	2,9
	m-Gliadin	-FF	5,7	2,1
	p-Gliadin	+FF	21,8	6,1
	p-Gliadin	-FF	9,8	3,0
MVID1	m-Gliadin	-	3,1	2,7
	p-Gliadin	-	9,3	3,2
MVID2	m-Gliadin	-	1,9	1,4
	p-Gliadin	-	8,5	4,2

Tabelle 15: Markierungsdichten der anti-Gliadin-Antikörper.

D: Mittelwert der Markierungsdichte errechnet aus den Einzelwerten der Markierungsdichten D_i auf 10 Fotografien. Die Einzelwerte D_i waren normalverteilt. $D=n/A$: Markierungsdichte als Anzahl von GP 12nm pro Fläche $A=0,27\mu\text{m}^2$ (siehe **Abschnitt 2.5.4.2**). MVID1/2: Zwei Patienten im Säuglingsalter mit der Diagnose microvillus inclusion disease.

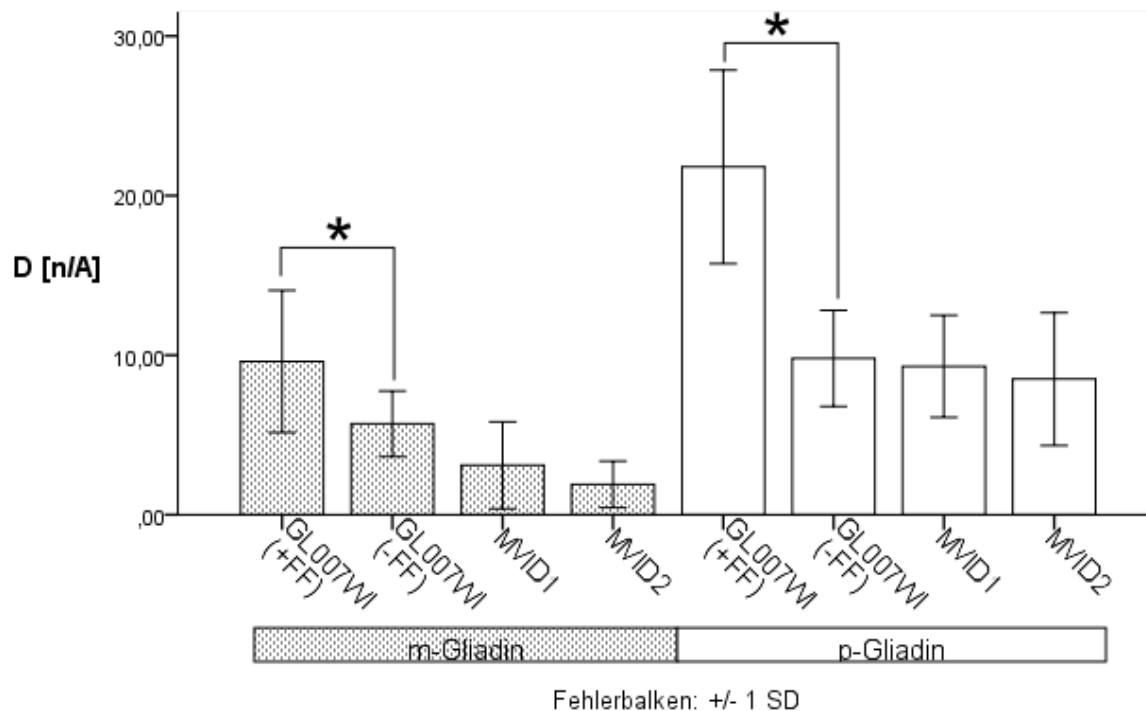


Abbildung 8: Markierungsdichten der anti-Gliadin-Antikörper.

Grafische Darstellung der Mittelwerte der Markierungsdichten D aus **Tabelle 16**. * $p < 0,05$.

Proben, die mit FF inkubiert worden waren (+FF), wiesen bei beiden Antikörpern höhere Markierungsdichten auf als Proben, die nicht mit FF inkubiert worden waren (-FF). Die Markierungsdichten auf Schnitten der Säuglinge mit MVID lagen noch unter der Markierungsdichte auf -FF-Schnitten von Patient GL007WI. Der Unterschied zwischen +FF und MVID1/2 war signifikant, wurde jedoch nicht für die Errechnung der Spezifität herangezogen, da die Werte von unterschiedlichen Patienten stammten (siehe unten). Der p-Gliadin-Antikörper führte zu grundsätzlich höheren Markierungsdichten als der m-Gliadin-Antikörper.

GL007WI	D(+FF)- D(-FF)	SD	p	Spezifität f(s) [%]
m-Gliadin	3,9	4,5	0,024	50
p-Gliadin	12,0	7,8	0,01	55

Tabelle 16: Spezifität der anti-Gliadin-Antikörper.

D(+FF)-D(-FF): Differenz der Mittelwerte der Markierungsdichten mit und ohne FF. Diese Differenz wurde anschließend durch $\bar{D}(+FF)$ geteilt, um nach der Gleichung $f(s) = \frac{\bar{D}(+FF) - \bar{D}(-FF)}{\bar{D}(+FF)}$ die Spezifität zu erhalten (siehe Formel 1 in **Abschnitt 2.5.4.2**).

Für beide anti-Gliadin-Antikörper zeigten die Markierungsdichten D(+FF) und D(-FF) eine signifikante Differenz. Für die Verwendung in der Immunelektronenmikroskopie zum Nachweis von FF ergab sich aus der Differenz der Markierungsdichten für den m-Gliadin-AK eine Spezifität von 50% und für den p-Gliadin-AK eine Spezifität von 55%. Wurden die primären Antikörper bei ansonsten gleicher Versuchsdurchführung weggelassen, so ergaben sich Schnitte, die vollkommen frei von einer Markierung durch GP 12nm waren. **Tabelle 17** zeigt die Ergebnisse der Zellzahlbestimmung. Die Unterschiede zwischen +FF und -FF waren nicht signifikant.

m-Gliadin		p-Gliadin	
+FF	-FF	+FF	-FF
9 (1-35)	10 (1-51)	4 (1-25)	4 (1-29)

Tabelle 17: Zellzahlen pro 100 GP 12nm.

Median (Spannweite) der Anzahl an Zellen, die ausgezählt werden mussten, um auf 100 GP 12nm zu kommen.

3.3 Gliadintransport unter Einfluss von IgG

3.3.1 Gliadinmarkierung in frühen Endosomen

Es wurde untersucht, ob durch die Inkubation mit IgG der relative Anteil der Gliadinmarkierung (erfasst als GP 12nm) in EE erhöht werden kann.

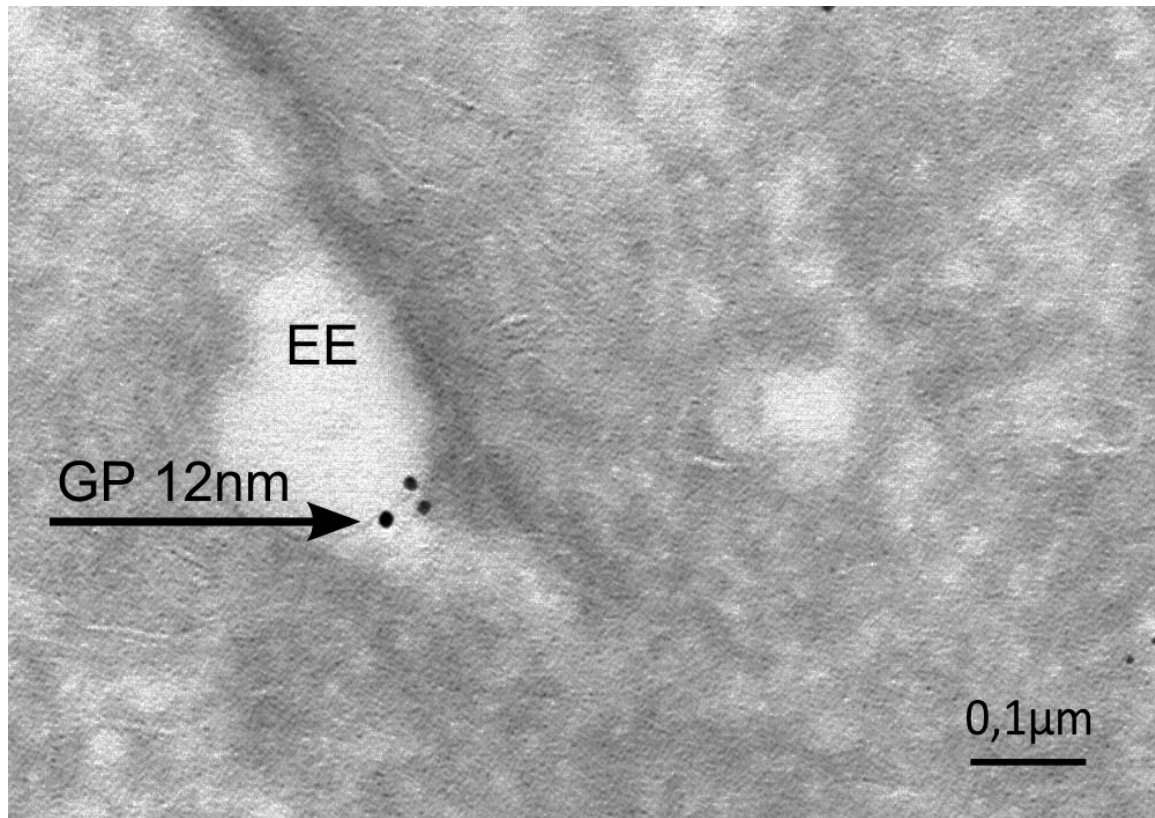


Abbildung 9: Gliadinmarkierung in frühen Endosomen.

Gezeigt ist ein frühes Endosom (EE; Definition siehe **Tabelle 14** in **Abschnitt 2.5.4.1**) mit drei GP 12nm. Primärer Antikörper: α -Gliadin. GP 12nm: Marker für Gliadin (siehe **Abschnitte 2.2.4** und **2.2.5**).

Tabelle 18 zeigt die Mittelwerte der Gliadinmarkierung in EE und deren Differenz für die Gruppen CD/N-CD sowie +IgG/-IgG. Die Werte waren normal verteilt, daher wurde der *t-Test* für verbundene Stichproben für die Überprüfung des Unterschieds verwendet.

Diagnose	Inkubation	N	EE	SD	EE (+IgG)- EE (-IgG)		
					Mittelwert	SD	<i>p</i>
m-Gliadin							
Alle	+IgG	20	20,3	8,5	0,2	7,0	0,9
	-IgG	20	20,5	9,3			
CD	+IgG	8	18,1	6,5	2,9	5,9	0,2
	-IgG	8	15,2	5,1			
N-CD	+IgG	12	21,8	9,6	2,3	7,2	0,3
	-IgG	12	24,1	9,8			
p-Gliadin							
Alle	+IgG	20	25,3	10,6	3,0	10,4	0,2
	-IgG	20	22,3	11,6			
CD	+IgG	8	20,8	8,0	3,1	10,1	0,4
	-IgG	8	17,6	7,5			
N-CD	+IgG	12	28,3	11,4	3,1	11,1	0,3
	-IgG	12	25,4	13,0			

Tabelle 18: Gliadinmarkierung in frühen Endosomen.

N: Patientenzahl. EE: Mittelwert des relativen Anteils von GP 12nm in EE für alle Patienten bzw. die Gruppen Zöliakie (CD) und Nicht-Zöliakie (N-CD). EE(+IgG)-EE(-IgG): Differenz der Mittelwerte EE der Gruppen +IgG und -IgG für alle Patienten, CD und N-CD.

Die Differenz der Gruppen +/-IgG war mit beiden Antikörpern nicht signifikant. Auch die Stratifizierung nach der Diagnose ergab keine signifikanten Differenzen. **Abbildung 10** gibt die in **Tabelle 18** gezeigten Ergebnisse für alle Patienten grafisch wieder.

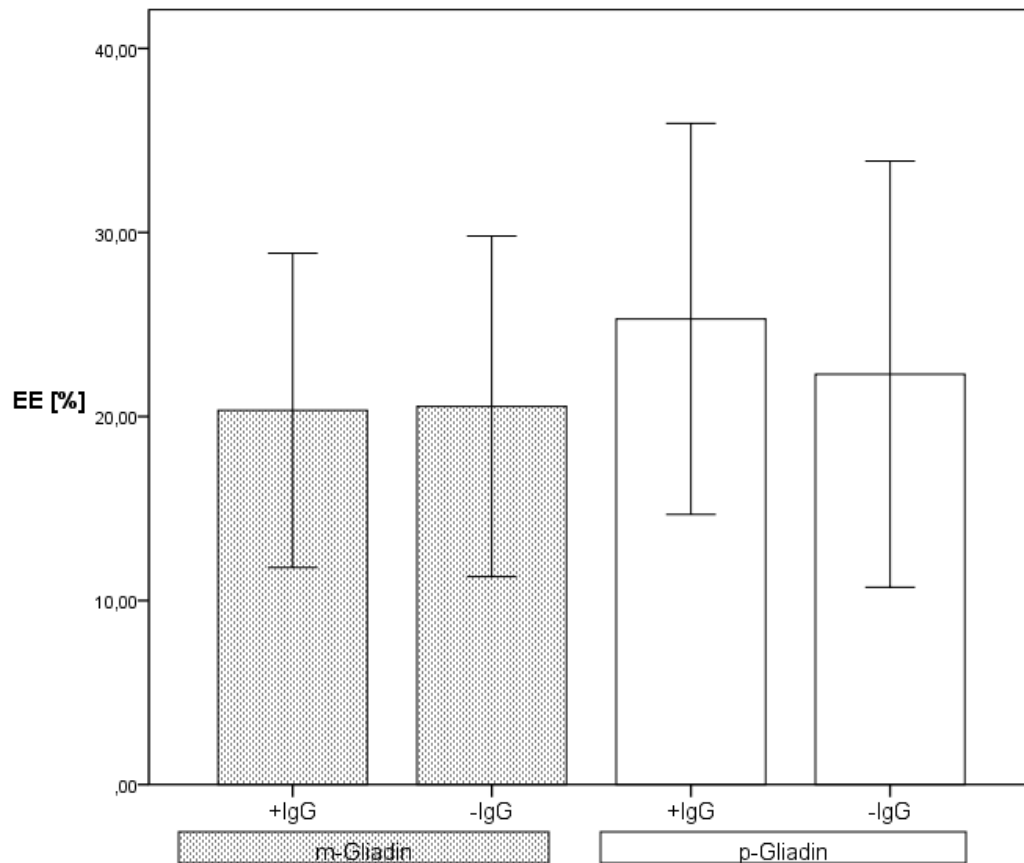


Abbildung 10: Gliadinmarkierung in frühen Endosomen.

Grafische Darstellung der Werte aus Tabelle 18, ohne dabei die Diagnosen zu unterscheiden.

3.3.2 Gliadinmarkierung in späten Endosomen

Die Werte des relativen Anteils der Gliadinmarkierung in LE waren mit beiden Antikörpern nicht normal verteilt. Im Falle des m-Gliadin-AK traten nur zwei Merkmalsausprägungen auf. **Tabelle 19** gibt die absoluten Häufigkeiten dieser Merkmalsausprägungen in den Gruppen +IgG und -IgG und das Ergebnis des *McNemar-Tests* an.

Relativer Anteil in LE	Absolute Häufigkeit		McNemar Test
	+IgG	-IgG	
0%	16	20	$p = 0,125$
1%	4	0	

Tabelle 19: Gliadinmarkierung in späten Endosomen.

Absolute Häufigkeiten der Werte 0% und 1% unter den Bedingungen +IgG/-IgG, ohne die Diagnosen zu unterscheiden. Zur Überprüfung des Unterschieds der Merkmalsverteilung zwischen +IgG und -IgG wurde der *McNemar-Test* für verbundene Stichproben bei dichotomer Verteilung der Werte durchgeführt.

Mit dem *McNemar-Test* wurde überprüft, ob in einer der Gruppen +IgG oder -IgG die Werte 1% oder 0% signifikant häufiger vorkamen als in der anderen Gruppe. Das war nicht der Fall. Bei Einsatz des p-Gliadin-Antikörpers erlaubte die Verteilung der Werte (Median für GP 12nm in LE bei +IgG und -IgG betrug 0%, bei einer Spannweite von 0-3% für +IgG und 0-8% für -IgG) die Bildung von Rängen und damit die Durchführung des *Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests* bei verbundenen Stichproben. Die Durchführung des Tests ergab einen p -Wert von 0,4 und damit keinen signifikanten Unterschied der Gruppen +IgG und -IgG bezüglich der Gliadinmarkierung in LE.

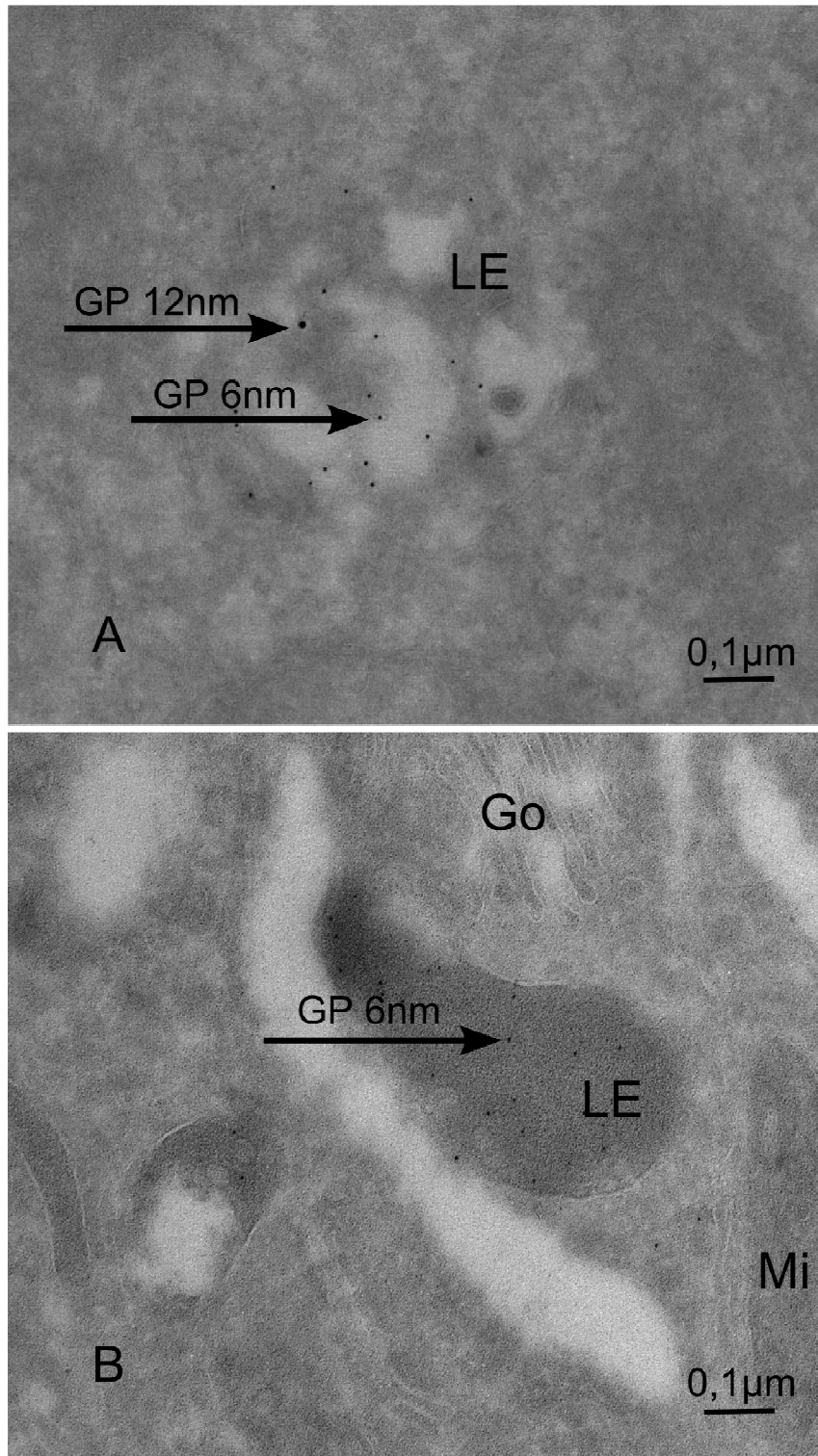


Abbildung 11: Gliadinmarkierung in späten Endosomen.

A: Gezeigt ist spätes Endosom (LE; Definition siehe **Tabelle 13** in **Abschnitt 2.5.4.1**), in welchem sich ein GP 12nm befindet. Primäre Antikörper: p-Gliadin und LAMP-2. B: Gezeigt ist ein LE ohne GP 12nm-Markierung. In der Umgebung befinden sich ein Teil des Golgi-Apparats (Go) sowie ein Mitochondrium (Mi). Primäre Antikörper: m-Gliadin und Cathepsin-D. GP 12nm: Marker für Gliadin. GP 6nm: Marker für LE (siehe **Abschnitte 2.2.4** und **2.2.5**).

3.3.3 Gliadinmarkierung in weiteren Zellkompartimenten

Es wurde anhand der -IgG-Proben untersucht, wie die Verteilung der Gliadinmarkierung auf die übrigen Zellkompartimente war (**Tabelle 20**). Es bestanden in dieser Hinsicht keine signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen -IgG/+IgG und CD/N-CD (Daten nicht gezeigt).

Kompartiment	AM	Zk	Mi	Go	Bl	Zyt
m-Gliadin	4,8	5,5	1,4	*/#	3,6	47,2
p-Gliadin	#	4,8	1,9	*	4,0	54,0

Tabelle 20: Gliadinmarkierung in weiteren Zellkompartimenten.

Dargestellt sind die Mittelwerte des relativen Anteils der GP 12nm-Markierung im entsprechenden Zellkompartiment, die aus den Einzelwerten aller Patienten berechnet wurden. *: Keine Normalverteilung der Merkmalsausprägungen, daher keine Mittelwertsangabe (Angabe Median: siehe Text). #: Gesonderte Darstellung in **Abschnitt 3.4**.

Der größte Teil der Gliadinmarkierung war im Zytosol zu finden, dann folgten die EE. Die Zellkerne wiesen im Mittel einen Anteil von 5% der Gliadinmarkierung auf. Die Werte für die basolaterale Membran waren am geringsten. Die Golgi-Apparate wiesen bei Benutzung des p-Gliadin-AK im Median einen Anteil von 0% der Gliadinmarkierung auf.

3.4 Gliadinmarkierung von Golgi-Apparat und apikaler Membran

Einige Patienten wiesen eine ausgeprägte Markierung der Golgi-Apparate mit dem m-Gliadin-AK und der apikalen Membran mit dem p-Gliadin-AK auf. Anhand dieser Abweichungen wurde das Kollektiv von 20 Patienten erneut in zwei Gruppen eingeteilt (mit und ohne ausgeprägter Markierung von Golgi-Apparat und AM). Grundsätzlich ergab sich die verstärkte Markierung in allen drei Inkubationsansätzen und es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Inkubationsansätzen (Daten nicht gezeigt). Im Folgenden werden daher stellvertretend nur die Ergebnisse des -IgG-

Inkubationsansatzes dargestellt. **Tabelle 21** zeigt die Mittelwerte der Markierung in den Golgi-Apparaten für den m-Gliadin-Antikörper.

Gruppe	N	Diagnose	Go Mittelwert [%]	Max-Min [%]	SD
1	14	6 CD	-*	0-0*	-*
		8 N-CD			
2	6	2 CD	57,0	45-87	16,7
		4 N-CD			

Tabelle 21: Gliadinmarkierung im Golgi-Apparat.

Die Gruppe 1 wurde definiert als alle Patienten, bei denen der relative Anteil der GP 12nm-Markierung im Golgi-Apparat $\leq 5\%$ war. Gruppe 2 wurde definiert als alle übrigen Patienten. *: Die Werte in Gruppe 1 waren alle Null, daher keine Angabe von Mittelwert und SD möglich. In Gruppe 2 waren die Werte normalverteilt. N: Patientenzahl.

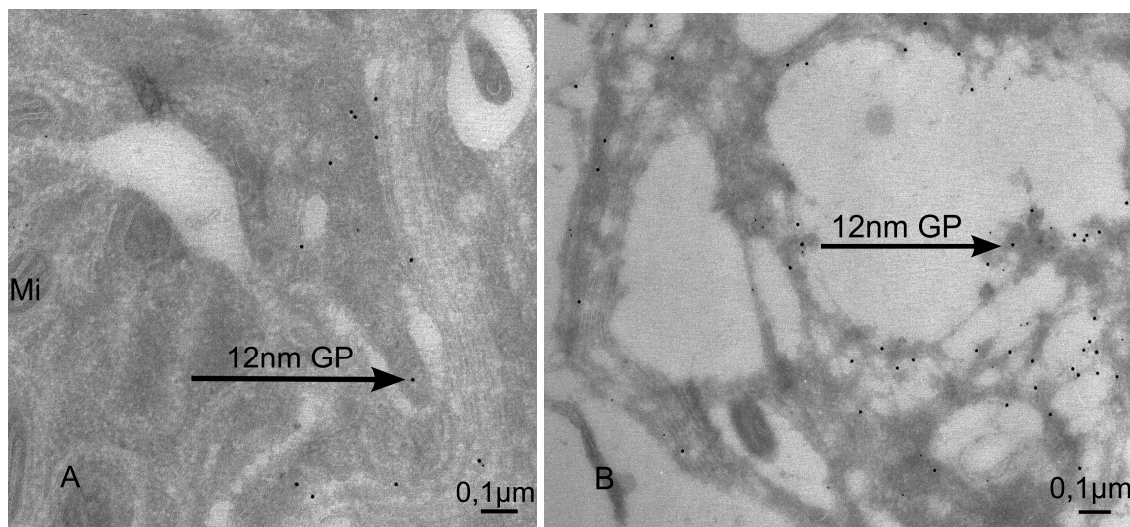


Abbildung 12: Gliadinmarkierung des Golgi-Apparats.

A: Gezeigt ist die GP 12nm-Markierung im Bereich der Golgi-Membranstapel (Definition siehe **Tabelle 13** in **Abschnitt 2.5.4.1**). B: Gezeigt ist die GP 12nm-Markierung im Bereich der Golgi-Vesikel. Primärer Antikörper: m-Gliadin. GP 12nm: Marker für Gliadin (siehe **Abschnitte 2.2.4** und **2.2.5**).

Tabelle 22 zeigt die Ergebnisse für die Markierung der AM mit dem p-Gliadin-Antikörper.

Gruppe	N	Diagnose	AM Mittelwert [%]	Max-Min [%]	SD
1	14	6 CD	3,9	0-8	2,0
		8 N-CD			
2	6	2 CD	32,3	20-62	21,1
		4 N-CD			

Tabelle 22: Gliadinmarkierung der apikalen Membran.

Die Gruppe 1 wurde definiert als alle Patienten, bei denen der relative Anteil der GP 12nm-Markierung an der apikalen Membran $\leq 8\%$ war. Gruppe 2 wurde definiert als alle übrigen Patienten. Die Werte beider Gruppen waren normalverteilt. N: Patientenzahl.

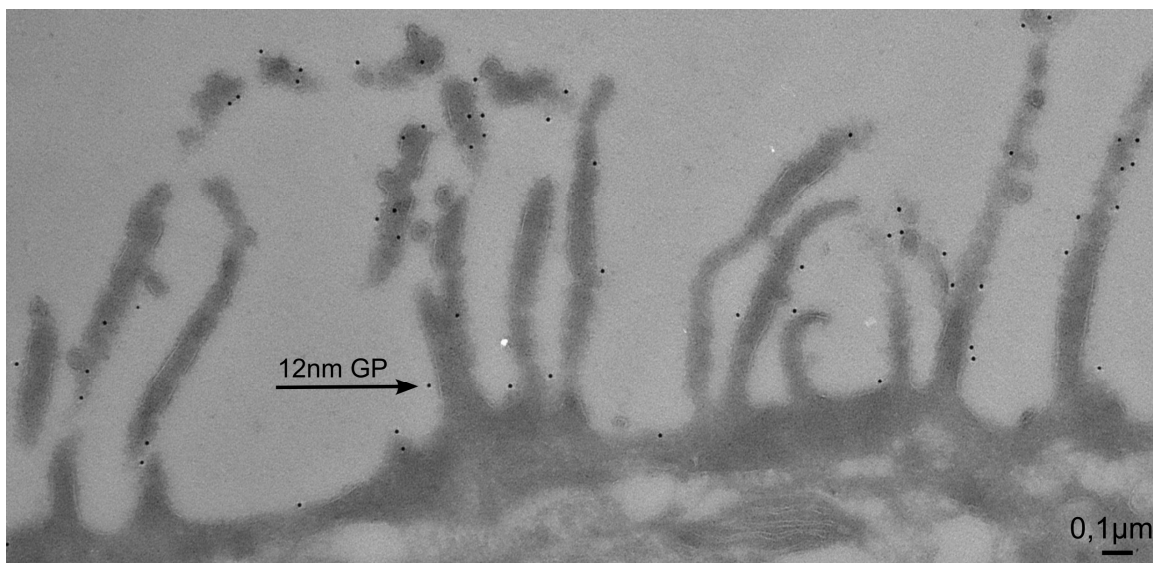


Abbildung 13: Gliadinmarkierung der apikalen Membran.

Primärer Antikörper: p-Gliadin. GP 12nm: Marker für Gliadin (siehe **Abschnitte 2.2.4** und **2.2.5**).

Bei den gewählten Grenzwerten für die Einteilung in Gruppe 1 und 2 anhand der relativen Markierung von Golgi-Apparat und apikaler Membran waren die Patienten dieser Gruppe 2 – mit ausgeprägter Markierung der Golgi-Apparate – und die Patienten jener Gruppe 2 – mit ausgeprägter Markierung der apikalen Membran – identisch. Das Markierungsverhalten der beiden primären Antikörper wurde ausgehend von diesen Befunden miteinander korreliert. Dazu wurde ein Zusammenhang aller Werte des

relativen Anteils von GP 12nm im Golgi-Apparat bei Einsatz des m-Gliadin-AK mit den Werten des relativen Anteils von GP 12nm an der apikalen Membran bei Einsatz des p-Gliadin-AK mithilfe des Korrelationsverfahrens *Spearman-rho* geprüft. Es ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,465 bei $p = 0,039$.

4 Diskussion

Ziel der Studie war es, neue Erkenntnisse zur Pathogenese der Zöliakie zu gewinnen. Dazu wurde die intrazelluläre Verteilung von Gliadin in Enterozyten untersucht. Die Hypothese lautete: Durch Einwirkung von spezifischen anti-Gliadin-IgG wird die intrazelluläre Verteilung von Gliadinpeptiden in Enterozyten von CD-Patienten, insbesondere in den LE, verändert. Dieser Schritt könnte für die Entwicklung von oraler Toleranz gegenüber Gliadin von besonderer Bedeutung sein, da dieses nur dann regulatorischen T-Zellen präsentiert werden kann, wenn es zuvor die HLA-Klasse-2-Molekül-positiven LE erreicht. Der Gliadinanteil in den Zellorganellen sollte durch Einsatz von AK, welche mit GP 12nm gekoppelt waren, messbar gemacht werden. Unter Berücksichtigung der weiteren verwendeten Materialien und Methoden lautet die Hypothese in der operationalisierten Form: Durch Zusatz von polyklonalen Kaninchen-IgG mit einer Spezifität gegen α -Gliadinpeptide in der Verdünnung 1:1000 zum Inkubationsmedium (FF) lässt sich im Gewebe von CD-Patienten der Anteil der GP 12nm in den intrazellulären Kompartimenten verändern. Insbesondere lässt sich der Anteil der GP 12nm in EE und LE erhöhen.

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Biopsieinkubation und -verarbeitung, Durchführung der Markierungsversuche

In dieser Studie wurde ein experimenteller Ansatz angewandt, um die Hypothese zu testen. Dazu wurden Inkubationsversuche mit Duodenalschleimhaut *ex vivo* durchgeführt. Die Inkubation von frisch entnommenem Dünndarmgewebe stellt den Versuch dar, die Situation *in vivo* möglichst genau zu imitieren. Dieses Modell hat Vorteile gegenüber anderen Modellen. Bei Verwendung isolierter und kultivierter Zelllinien führt die Trennung der Zellen von der Basalmembran zu Veränderungen zellulärer Signaltransduktionswege [176]. Immortale Zelllinien besitzen darüber hinaus v.a. weitreichende Erbgutveränderungen, was die Übertragbarkeit von Ergebnissen auf die Situation *in vivo* limitiert. Das Zellkulturmedium, in welchem die Biopsien direkt nach der Entnahme inkubiert wurden, bietet den Zellen Substrate zur Versorgung von Energie- und Strukturstoffwechsel. Man kann davon ausgehen, dass die meisten Zellen

des Gewebeverbands für die Inkubationszeit von 1h vital blieben. Mit Experimenten *in vivo* [153] könnten Ergebnisse mit größerer Aussagekraft erzielt werden, allerdings ist die Durchführung kompliziert und birgt Risiken für die Patienten. Da die Biopsien vollständig vom Kulturmedium umgeben waren, bestand prinzipiell die Möglichkeit, dass auch subepitheliale Zellen Proteine der FF aufnahmen. Man kann aber davon ausgehen, dass dieser Umstand wenig ins Gewicht fällt, da nur die am Geweberand gelegenen Zellen davon betroffen waren. Insgesamt sollten die erhaltenen Ergebnisse gut auf die Situation *in vivo* übertragbar sein.

4.1.2 Immunelektronenmikroskopie

Die Immunelektronenmikroskopie in der Variation nach Tokuyasu [174] ist ein etabliertes und bewährtes Verfahren zur Detektion zellulärer Antigene. In dieser Arbeit wird sie zum Nachweis eines exogenen, löslichen Antigens genutzt. Die Methode basiert wesentlich auf der Beurteilung der zellulären Morphologie durch den Betrachter. Um eine Verzerrung durch Voreingenommenheit zu vermeiden, wurde die Auswertung der Versuche verblindet, d.h. ohne Kenntnis der Patientendaten, durchgeführt. Die Spezifität der Antikörper gegen Cathepsin-D und LAMP-2 wurde nicht überprüft. Es wurde lediglich rein qualitativ festgestellt, dass beide AK eine stark lokal konzentrierte Markierung morphologisch nicht voneinander unterscheidbarer Strukturen hervorrufen. Diese Übereinstimmung spricht für ein spezifisches Bindungsverhalten. Beides sind außerdem verbreitete, kommerziell erhältliche Antikörper. Im Unterschied zur Vorgänger-Studie [158] wurde jedoch ein anderer Cathepsin-D-Antikörper verwendet. Der in der vorliegenden Studie verwendete AK wurde durch Immunisierung der Wirte mit einem synthetischen Teilpeptid des Cathepsin-D hergestellt. Lübbling et al. verwendeten einen AK gegen das Gesamtpeptid. Die absolute Anzahl der LE war in den Versuchen der vorliegenden Arbeit viel geringer als bei Lübbling. Diese Tatsache hat indirekt auch Einfluss auf den relativen Anteil der GP 12nm in LE (siehe **Abschnitt 4.2.3**).

4.1.3 Patienten

Die Gruppe der Zöliakie-Patienten stellt eine relativ gut definierte, homogene Gruppe dar. Die Diagnose Zöliakie kann als sehr sicher gelten, da alle vier diagnostischen Kriterien – was über das von der EPGHAN geforderte Maß hinaus geht (siehe Abschnitt **1.1.5**) – zur Bewertung herangezogen wurden. Neben der Diagnose Zöliakie lagen keine weiteren Diagnosen vor. Aus diesen Gründen kann man davon ausgehen, dass relativ wenige unerkannte Störfaktoren in dieser Gruppe vorhanden waren. Die Gruppe der Nicht-Zöliakie-Patienten ist heterogener: Es lagen verschiedene Diagnosen vor, zwei Patienten besaßen gar keine organischen Auffälligkeiten, bei drei Patienten bestand weiterhin Verdacht auf Zöliakie. Da sich jedoch alle entzündlichen Vorgänge bei diesen Patienten außerhalb des Dünndarms abspielten, ist davon auszugehen, dass auch hier keine allzu große Verzerrung durch Störfaktoren vorlag.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Spezifisches Bindungsverhalten der anti-Gliadin-Antikörper

Die Antikörper m-Gliadin und p-Gliadin werden in Western-Blot-Verfahren zum Nachweis von Glutenbestandteilen in Lebensmitteln verwendet [177, 178]. Der m-Gliadin-AK wurde im Labor eines Kooperationspartners produziert, der p-Gliadin-AK ist kommerziell erhältlich. Die Anwendung in der Immunelektronenmikroskopie zum Nachweis von Bestandteilen der FF ist von unserer Arbeitsgruppe veröffentlicht worden.

Das Bindungsverhalten der primären AK wurde anhand der unterschiedlichen Markierungsdichten auf positiven und negativen Kontrollen untersucht. Dazu wurden die Schnitte eines Zöliakiepatienten (GL007WI), der eine GFD einhielt, und zweier Patienten im Säuglingsalter (Diagnose MVID) analysiert. Die mit FF inkubierte Probe des Patienten GL007WI diente als positive Kontrolle, die nicht mit FF inkubierte Probe und das Gewebe der beiden MVID-Patienten dienten als Negativkontrolle. Unter Annahme einer guten Diätcompliance konnte man davon ausgehen, dass die Enterozyten von Patient GL007WI (-FF) tatsächlich kaum oder gar kein Gluten mehr enthielten. Die MVID-Patienten wurden von Geburt an parenteral glutenfrei ernährt und nicht gestillt. Daher kann auch dieses Gewebe als glutenfrei gelten.

Die Spezifität wurde nicht für Gluten bestimmt, sondern für FF bzw. die enthaltenen Proteine. Die Einzelkomponenten der FF sind aufgrund des Herstellungsprozesses schwierig zu charakterisieren. Ausgangssubstanz ist das heterogen zusammengesetzte Gluten, welches zuerst unter Anpassung des pH-Werts durch die Verdauungsenzyme Pepsin und Trypsin in Peptidfragmente hydrolysiert wird [172]. Pepsin spaltet Peptidbindungen ohne strenge Spezifität, aber vor allem nach (vom N-Terminus betrachtet) großen und hydrophoben Aminosäuren (AS) wie Leucin (L) und Phenylalanin (F), wobei auf der C-terminalen Seite der Spaltungsstelle bevorzugt Tryptophan (W) und Tyrosin (Y) liegen [179]. Trypsin spaltet ausschließlich nach den basischen AS Lysin (K) und Arginin (R) [180]. Gliadine und auch die α -Gliadine, welche die Epitope der verwendeten anti-Gliadin-AK tragen, sind in Wasser nicht löslich, sondern lösen sich nur in wässrigem Ethanol (z.B. 60% Ethanol in Wasser) [81]. Trypsin und vor allem Pepsin besitzen jedoch eine Vielzahl möglicher Spaltungsstellen in den α -Gliadinen (und auch allen anderen Bestandteilen des Glutens), wenn man deren von Wieser veröffentlichte Sequenz betrachtet [79]. Bei der Herstellung der FF entsteht auf diese Weise eine Vielzahl von Peptidfragmenten, im kleinsten Fall einzelne AS (nach Frazer ungefähr 8% des Gesamtmaterials [172]). Diese sind zu 75% in Wasser löslich und stellen damit die FF dar.

Der m-Gliadin-AK wurde produziert durch Immunisierung von Mäusen mit dem P31-44 aus den α -Gliadinen, Selektion geeigneter B-Zellklone und Schaffung einer Maushybridomzelllinie, die den monoklonalen AK produziert. Die Sequenzen der α -Gliadine, an welche der m-Gliadin-AK mit höchster Affinität bindet, lauten -GQQQPFPPQ- (Position 32-40) und -QPQPFPSQ- (Position 45-52) [157]. In beiden Erkennungssequenzen und den Sequenzen davor und danach liegen Spaltstellen des Pepsin, so dass – bei maximaler Spaltungsaktivität – Peptide von 6-7 AS entstehen könnten. Beim Dialysieren der FF wurde eine Dialysemembran genutzt, deren Porengröße den Durchtritt von Molekülen mit einem Molekulargewicht >1000 Da verhinderte. Die kleinsten Peptidfragmente mit 6-7 AS wurden durch das Dialysieren ausgewaschen. Untersuchungen in unserem Labor ergaben jedoch, dass die Fragmentgrößen von Verdau zu Verdau unterschiedlich sind, d.h. es wird nicht grundsätzlich an allen potentiellen Spaltungsstellen tatsächlich die Peptidbindung hydrolysiert. Fragmente mit der Erkennungssequenz des m-Gliadin-AK, welche eine Länge von 12-14 AS aufwiesen, wurden schon nicht mehr ausgewaschen. Man kann vor

diesem Hintergrund davon ausgehen, dass beim Pepsin/Trypsin-Verdau die meisten Fragmente, welche die Erkennungssequenzen des m-Gliadin-AK enthielten, ein zu hohes Molekulargewicht besaßen, um ausgewaschen zu werden. Es ist möglich, dass das P31-43 in seiner kleinstmöglichen Form in der FF vorhanden war (das heißt als P31-49, da flankiert durch Pepsin-Spaltungsstellen), allerdings dürften auch viele längere Peptide entstanden sein, die neben der Sequenz des P31-43 z.B. auch die Sequenz des immunogenen P56-68 enthalten haben könnten.

Der polyklonale p-Gliadin-AK wurde produziert durch Immunisierung von Kaninchen mit p-Gliadin in nativer und hitzedenaturierter Form und stellt ein fraktioniertes Antiserum dar. Für den p-Gliadin-AK gilt demnach, dass er viele Epitope der α -Gliadine erkennt und theoretisch Bindungsstellen auf jedem der Fragmente besitzen könnte, falls diese nicht zu kurz sind. Dies ist ein Unterschied zum m-Gliadin-AK. Bei der Vielzahl der Spaltungsstellen ist sehr unwahrscheinlich, dass alle Peptidfragmente der α -Gliadine in der FF die Bindungsstelle des m-Gliadin-AK tragen. Für den m-Gliadin-AK wurden jedoch mittels ELISA eine Reihe von schwächeren Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen des Glutens wie ω -Gliadinen und Prolaminen von Roggen, Hafer und Gerste beschrieben [177]. Kreuzreaktionen in gleicher Stärke wie gegen die α -Gliadine wurden für β - und γ -Gliadine festgestellt. Das wird darauf zurückgeführt, dass in diesen Proteinen Teile der Erkennungssequenz des m-Gliadin-AK wie z.B. QQQP – häufig in Form repetitiver Elemente – vorkommen. Gleichzeitig wurde von denselben Autoren gezeigt, dass der m-Gliadin-AK eine positive Reaktion mit FF zeigt. Das heißt, dass die Erkennungssequenzen des m-Gliadin-AK, die auf den eigentlich wasserunlöslichen α -Gliadinen liegen, sich auch in der wasserlöslichen FF finden. In unserem Labor wurde im Slot-Blot-Verfahren getestet, ob der p-Gliadin-AK Peptide der FF binden konnte. Dabei wurde für FF und für unverdautes Gliadin eine positive Reaktion, auf Pepsin und Trypsin dagegen keine Reaktion beobachtet [181]. Daraus kann geschlossen werden, dass auch die Erkennungssequenzen des p-Gliadin-AK in der wasserlöslichen FF vorhanden sind.

Über Kreuzreaktionen des p-Gliadin-AK mit anderen Gliadin-Subfraktionen ist nichts bekannt. Man kann jedoch davon ausgehen, dass er prinzipiell ähnliche Kreuzreaktionen zeigt wie der m-Gliadin-AK. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Antigene, die mit den primären AK m-Gliadin und p-Gliadin in der FF prinzipiell nachweisbar sind, begrenzt werden können auf die Gruppe der

Gliadinpeptidfragmente. Im Falle des m-Gliadin-AK ist es wahrscheinlich, dass die Sequenz des P31-43 enthalten ist. Für den einfacheren Sprachgebrauch wird in dieser Arbeit statt von Gliadinpeptidfragmenten nur von Gliadin oder Gliadinpeptiden gesprochen.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, wie spezifisch sich Gliadin auf den EM-Schnitten mit dem m-Gliadin- und dem p-Gliadin-AK nachweisen lässt. Laut den Ausführungen in **Abschnitt 2.5.4.2** lassen sich zweierlei Arten unspezifischer Bindungen unterscheiden, die auf verschiedene Arten untersucht werden können.

Das Weglassen der primären AK m-Gliadin und p-Gliadin unter ansonsten gleichen Versuchsbedingungen führte dazu, dass gar keine GP 12nm-Markierung – als Maß für die Gliadinmarkierung – auf den Schnitten vorhanden war. Das bedeutet, dass die sekundären Antikörper keine unspezifischen Bindungen verursachen. Nicht abgedeckt wurde durch diesen Test die Frage, ob die primären AK mit anderen Teilen als dem F_{ab}-Teil an Bestandteile des Gewebes binden. Dafür müsste man primäre AK einsetzen, deren F_{ab}-Teil die Zielstruktur nicht erkennen kann, die ansonsten aber dem Wildtyp-AK entsprechen. Ein solches Konstrukt stand uns allerdings nicht zur Verfügung.

Unspezifische Bindungen, die durch Interaktion von F_{ab} mit Gewebebestandteilen, die dem Zielantigen strukturverwandt sind, verursacht wurden, waren durch den Vergleich der positiven und negativen Kontrollen analysiert worden. Grundsätzlich waren dabei die Markierungsdichten der GP 12nm, die durch Einsatz der primären anti-Gliadin-AK erreicht wurden, auf Proben mit FF höher als auf Proben ohne FF. Dieser Unterschied war für +FF/-FF bei Patient GL007WI signifikant. Die niedrigsten Markierungsdichten fanden sich bei den beiden MVID-Patienten, die Differenz zur Inkubation +FF von Patient GL007WI war signifikant. Diese Ergebnisse sprechen ganz grundsätzlich für eine spezifische Bindungsaktivität der AK gegenüber Gliadinpeptiden auf den Gefrierschnitten. Die Tatsache, dass die Schnitte der MVID-Patienten die geringsten Markierungsdichten aufwiesen, kann damit erklärt werden, dass dieses Gewebe aufgrund der am ersten Lebenstag begonnenen parenteralen Ernährung den geringsten Gehalt an Gliadin besaß. Uns sind keine Untersuchungen bekannt, die Gliadin in der Amnionflüssigkeit nachweisen, daher kann das Gewebe der MVID-Patienten als glutenfrei gelten. Die gesamte GP 12nm-Markierung auf diesen Schnitten sollte auf Bindungen unspezifischer Natur zurückzuführen sein. Bei Patient GL007WI ist auch bei guter Diätcompliance anzunehmen, dass dieser geringste Mengen an Gluten

aufgenommen hat, da Lebensmittel, die als glutenfrei deklariert werden dürfen, nicht unbedingt vollkommen frei von Gluten sein müssen (siehe **Abschnitt 1.1.8**). Diese Überlegung ist eine mögliche Erklärung sein für die höheren Markierungsdichten von GL007WI -FF im Vergleich zu den MVID-Patienten.

Die Bestimmung der eigentlichen Spezifität (siehe **Tabelle 16** in **Abschnitt 3.2**) der primären AK wurde anhand der GP 12nm-Markierung auf Fotografien von +FF- und -FF-Proben von Patient GL007WI vorgenommen. Streng genommen gelten die ermittelten Werte der Spezifitäten nur für diesen einen Patient. Die Erweiterung des Geltungsbereichs auf alle untersuchten Patienten kann dadurch gerechtfertigt werden, dass die rein qualitative Untersuchung der Markierungsdichten von +FF/-FF der übrigen Patienten keinen subjektiv feststellbaren Unterschied zu GL007WI ergab. Die Werte der Spezifität betragen 50% für den m-Gliadin- und 55% für den p-Gliadin-AK. Dieses Ergebnis kann nach den obigen Ausführungen dahingehend interpretiert werden, dass ungefähr jeder zweite vorgefundene GP 12nm tatsächlich das elektronenmikroskopisch sichtbare Korrelat eines Gliadinpeptidfragments darstellte. Auf der anderen Seite stellten ungefähr 50% der GP 12nm das Ergebnis unspezifischer Interaktionen dar. Vor dem Hintergrund, dass die sekundären AK keine derartigen Interaktionen eingehen (siehe oben), muss gefolgert werden, dass sie das Ergebnis der Bindung des F_{ab}-Teils der primären AK an Gewebekomponenten sind, die den Gliadinpeptidfragmenten strukturell ähnlich sind.

Um die Frage zu untersuchen, ob im menschlichen Organismus Proteine produziert werden, die den Gliadinpeptidfragmenten gleichen, wurde das Programm BLAST des NCBI benutzt. Die Suchanfrage wurde durchgeführt mit der Erkennungssequenz GQQQFPFQQ des m-Gliadin-AK, wobei nur menschliche Proteinsequenzen in der Datenbank „non-redundant protein sequences (nr)“ unter Benutzung des BLASTP-Algorithmus untersucht wurden (Datum der Datenbankabfrage: 01.11.2012). Ansonsten erfolgten keine weiteren Eingaben in die Suchmaske. Die Ausgabe ergab 268 Treffer, wobei der geringste Grad an Übereinstimmung (Max identity) bei 60% lag. Für kürzere Teilsequenzen der Erkennungssequenz wie z.B. QQFPFQQ wurden vollständig identische Sequenzen in humanen Proteinen gefunden. Der Erwartungswert (E-value) lag für alle 268 Treffer zwischen 0,6 und 18. Die BLAST-Suche zeigt, dass es im menschlichen Organismus viele Proteine gibt, die zumindest teilweise mit der Erkennungssequenz des m-Gliadin-AK übereinstimmen. Es ist möglich, dass die GP

12nm-Markierung auf den Schnitten ohne FF und auf dem Gewebe der MVID-Säuglinge durch Bindung des m-Gliadin an humane Gewebsproteine verursacht wurde. Man kann davon ausgehen, dass die unspezifischen Markierungen des p-Gliadin-AK durch ähnliche Mechanismen zu Stande kamen.

Es war zu beobachten, dass die Markierungsdichten bei Verwendung des polyklonalen p-Gliadin-AK grundsätzlich höher waren als bei Verwendung des m-Gliadin-AK. Der Grund dafür könnte sein, dass der p-Gliadin-AK mehr Epitope auf Gliadinpeptidfragmenten erkennt als der m-Gliadin-AK, wie oben ausgeführt. Man kann schlussfolgern, dass die Empfindlichkeit des p-Gliadin-AK gegenüber Gliadinpeptidfragmenten höher ist als die des m-Gliadin-AK.

Als letzter Indikator für das spezifische Bindungsverhalten der primären AK wurde untersucht, ob für das Abzählen von 100 GP 12nm im Falle der Proben ohne FF mehr Zellen ausgezählt werden mussten als im Falle der Proben mit FF. Der Median der Anzahl von IEC, die ausgezählt werden mussten, um auf 100 GP 12nm zu kommen, ergab 9/10 für den m-Gliadin- und 3,5/3,5 für den p-Gliadin-AK für +FF/-FF. Die Differenz zwischen +FF und -FF war nicht signifikant. Darüber hinaus waren bei einzelnen Patienten/Markierungsversuchen auch in der -FF-Inkubation bereits in einer Zelle >100 GP 12nm zu finden. Dies war für beide anti-Gliadin-AK zu beobachten. Dieses Ergebnis widerspricht dem Ergebnis der Spezifitätsberechnung. Allerdings ist die Zahl der Zellen, die ausgezählt werden muss, um auf 100 GP 12nm zu kommen stark abhängig von der Größe der betrachteten Zellen bzw. der Fläche der Zelle, die sich durch den Anschnitt ergibt. So wird man weniger Zellen auszählen müssen, wenn diese sehr groß sind, d.h. viel Fläche bieten. Die Fläche wiederum ist abhängig von der Anschnittsrichtung des Gewebeblocks. Wird eine Zelle quer zur eigenen Längsachse geschnitten, so erhält man eine viel kleinere Fläche, als wenn diese längs angeschnitten würde. Aus diesem Grund ist die Zellzahl, die nötig ist, um auf 100 GP 12nm zu kommen, stark durch die Richtung des Anschnitts konfundiert und die erhaltenen Ergebnisse dadurch in ihrer Aussagekraft begrenzt. Die Ergebnisse der Zellzahlbestimmung bestätigen allerdings die Ergebnisse der Markierungsdichten, was die Unterschiede der beiden anti-Gliadin-AK angeht. Die Markierungsdichten der GP 12nm waren für den p-Gliadin-AK ungefähr doppelt so hoch wie für den m-Gliadin-AK und übereinstimmend damit mussten bei Einsatz des m-Gliadin-AK ungefähr doppelt so viele Zellen ausgezählt werden, um auf 100 GP 12nm zu kommen, wie bei Einsatz des

p-Gliadin-AK. Auf diese Weise bestätigen die Ergebnisse der Zellzahlen die höhere Sensitivität des p-Gliadin-AK, wie sie auch durch Vergleich der Markierungsdichten vorgefunden wurde.

4.2.2 Gliadintransport unter Einfluss von IgG

4.2.2.1 Gliadinmarkierung in frühen Endosomen

Der mittlere Anteil der Gliadinmarkierung in EE lag für den m-Gliadin-AK bei ungefähr 20% und für den p-Gliadin-AK bei ungefähr 25%. Es traten gewisse Unterschiede auf zwischen den Inkubationen +IgG und -IgG, aufgrund des Signifikanzniveaus müssen diese jedoch als Zufallsergebnisse gewertet werden. Die getrennte Untersuchung der Gruppen CD und N-CD erbrachte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen +IgG und -IgG. Diese Ergebnisse entsprechen den Ergebnissen der in unserem Labor durchgeführten Vorgänger-Studie von Lübbling et al. [181]. Auch hier waren keine signifikanten Unterschiede im Gliadinanteil in EE zwischen mit Serum von Zöliakiepatienten inkubierten Biopsien und nicht mit Serum inkubierten Biopsien zu finden. Aus diesen Ergebnissen muss man insgesamt schließen, dass die Inkubation mit IgG keinen Einfluss auf den Gliadinanteil in EE hatte.

4.2.2.2 Gliadinmarkierung in späten Endosomen

Die Gliadinmarkierung in LE war äußerst gering, in den meisten Fällen sogar nicht vorhanden. Mittels des *McNemar-Tests* und des *Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests* wurde versucht herauszufinden, ob ein signifikanter Unterschied im Anteil der Gliadinmarkierung in LE zwischen den Inkubationen +IgG und -IgG bestand. Dies war jedoch nicht der Fall. In der direkten Vorgängerarbeit von Lübbling lag der mediane Anteil von Gliadin in LE – zusammengenommen für alle eingesetzten anti-Gliadin-AK – bei ungefähr 3% (ausgenommen CD-Patienten mit Seruminkubation) [181]. Ein wesentlicher Faktor für diesen Unterschied war vermutlich der Wechsel des Cathepsin-D-AK (siehe **Abschnitt 4.1.2**). So war die absolute Anzahl GP 6nm-markierter Kompartimente (welche als LE gedeutet wurden) in den IEC in dieser Studie viel geringer als in der Vorgänger-Studie. Man kann davon ausgehen, dass sich damit auch die Wahrscheinlichkeit, einen GP 12nm in einem GP 6nm-markierten Kompartiment

vorzufinden, verringert hat. Bei Einsatz des p-Gliadin-AK hatte bei Lübbing der mediane Anteil der Gliadinmarkierung in LE ungefähr 2% betragen (ausgenommen CD-Patienten mit Seruminkubation), während er in dieser Studie bei 0% lag. Dieser Unterschied kam trotz Einsatz der gleichen AK-Kombinationen (m-Gliadin-AK/Cathepsin-D-AK und p-Gliadin-/LAMP-2-AK; siehe **Tabelle 13**) zustande. Insgesamt muss aus diesen Ergebnissen gefolgert werden, dass die Inkubation mit IgG keinen Einfluss auf den Gliadinanteil in LE hatte.

4.2.2.3 Gliadinmarkierung in weiteren Zellkompartimenten

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Anteil der Gliadinmarkierung in den übrigen zellulären Kompartimenten unter +IgG/-IgG-Inkubationsbedingungen. Daraus muss geschlossen werden, dass die Inkubation mit IgG insgesamt keine Veränderungen der intrazellulären Gliadinverteilung hervorgerufen hat, die Hypothese muss abgelehnt werden. Es liegt somit kein Hinweis für eine Veränderung intrazellulärer Gliadintransportprozesse durch spezifische anti-Gliadin-IgG vor.

4.2.3 Gliadinmarkierung von Golgi-Apparat und apikaler Membran

Bei insgesamt sechs Patienten (Gruppe 2, siehe **Tabelle 21** in **Abschnitt 3.6**) trat bei Einsatz des m-Gliadin-AK eine ausgeprägte Markierung der Golgi-Apparate durch GP 12nm auf. Von diesen sechs Patienten waren vier Nicht-Zöliakie-Patienten und zwei Zöliakie-Patienten. Die Definition der Gruppen 1 und 2 erfolgte auf die im Ergebnisteil beschriebenen Weise, da derart zwei gut voneinander unterscheidbare Gruppen entstanden. Die starke Markierung befand sich auf der Membran der Golgi-Vesikel bzw. Zisternen und nur vereinzelt in deren Lumen. Neben dem Golgi-Apparat waren keine weiteren zellulären Strukturen stärker markiert als bei den Patienten der Gruppe 1. Der Anteil der GP 12nm in den Golgi-Apparaten lag bei den Patienten der Gruppe 2 zwischen 40% und 80% mit einem Mittelwert von 60%. Um in Gruppe 1 auf 100 GP 12nm zu kommen, mussten im Median 15 Zellen ausgezählt werden. In Gruppe 2 lag dieser Wert bei 3,5. Bei einigen Patienten war die Markierungsdichte infolge der verstärkten Golgi-Markierung pro Zelle so hoch, dass in einer einzigen Zelle >100 GP 12nm vorgefunden wurden. Dies macht deutlich, dass die Markierungsdichte der Golgi-

Apparate bei den Patienten der Gruppe 2 äußerst hoch war. Bei denselben Patienten war bei Verwendung des p-Gliadin als Primär-AK eine ausgeprägte Markierung der apikalen Membran durch GP 12nm zu beobachten. So lag der Anteil der GP 12nm-Markierung an der AM bei diesen Patienten zwischen 20% und 60%. Die Patienten der Gruppe 1 besaßen Werte zwischen 0% und 8%. Die Markierungsdichten pro Zelle waren in dieser Gruppe ebenfalls erhöht, wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei Einsatz des m-Gliadin-AK. Der Zusammenhang der Markierung der Golgi-Apparate bei Verwendung des m-Gliadin-AK mit der Markierung der AM bei Verwendung des p-Gliadin-AK wurde mithilfe des Korrelationsverfahrens *Spearman-rho* untersucht und ergab einen Korrelationskoeffizient von 0,465 bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit <5%. Dies stellt einen mittelstarken Zusammenhang dar [182]. Das Phänomen der ausgeprägten Markierung von Golgi-Apparat und apikaler Membran bei bestimmten Patienten war schon in der Vorgänger-Studie [181] gefunden worden, allerdings nicht in der hier vorgefundenen Deutlichkeit und ohne die Korrelation des Markierungsverhaltens.

Im Folgenden soll diskutiert werden, welche Ursachen für die starke Markierung von Golgi-Apparat und AM sowie deren Korrelation in Frage kommen. Prinzipiell vorstellbar sind: Artefakte durch Fehler bei der Versuchsdurchführung, verstärktes Vorkommen von Gliadin im Golgi-Apparat und an der AM sowie Kreuzreaktionen der AK mit Proteinen, die von den Patienten der Gruppe 2 verstärkt exprimiert werden.

Artefakte aus lokal stark konzentrierten Ansammlungen von GP 12nm sind ein bekanntes Phänomen der Immunelektronenmikroskopie. Es ist unklar, wodurch solche Artefakte entstehen. Da die Versuche zu vier der sechs Patienten aus Gruppe 2 in Folge durchgeführt wurden, wäre es denkbar, dass etwa das Anbrechen eines neuen (möglicherweise schadhafte) Antikörper- oder Blockmedium-Aliquots die Veränderungen ausgelöst haben könnte. Dagegen spricht allerdings, dass das Phänomen der starken Markierung von AM und Golgi-Apparat sicher wiederholbar ist. Zudem sind die natürlicherweise vorkommenden Artefakte zufällig über die Schnitte verteilt. Die gefundene Markierung konzentriert sich dagegen auf definierte zelluläre Kompartimente. Insgesamt scheint es daher unwahrscheinlich, dass es sich bei der gefundenen Markierung um Artefakte handelt.

Proteine können nach der Aufnahme in endozytotische Vesikel retrograd in den Golgi-Apparat transportiert werden [183]. Auf diesem Wege wäre auch eine Anreicherung

von Gliadin im Golgi-Apparat vorstellbar. Dann allerdings müsste man annehmen, dass die Markierungsdichte der Golgi-Apparate der Nativprobe geringer ist als die der mit FF inkubierten Probe, was (subjektiv beurteilt) jedoch nicht der Fall war. Für den Fall, dass die Markierung durch Gliadin hervorgerufen wurde, sollten die Markierungsdichten der Golgi-Apparate der Nativprobe nicht nur geringer sein, sondern es sollte in dieser Gruppe überhaupt keine Tendenz zum Anstieg der Markierung geben. Gegen Gliadin spricht auch, dass beide primäre AK zwar überzufällig häufig bei denselben Patienten eine verstärkte Markierung hervorriefen, aber keine Übereinstimmung bezüglich des Markierungsortes zu finden war. So war bei den Patienten der Gruppe 2 die Markierung der AM durch den m-Gliadin-AK und die Markierung der Golgi-Apparate durch den p-Gliadin-AK nicht stärker ausgeprägt als bei den Patienten der Gruppe 1. Wenn es sich um Gliadin handelte, so wäre zu erwarten gewesen, dass die AK zumindest eine gewisse Übereinstimmung des Markierungsortes aufweisen würden, da beide wahrscheinlich relativ ähnliche Zielstrukturen erkennen (siehe **Abschnitt 4.2.1**).

Für eine Kreuzreaktion mit endogen exprimierten Proteinen spricht, dass die Markierungsdichten der Golgi-Apparate und AM auf Schnitten der Proben ohne FF subjektiv nicht von den Markierungsdichten auf den Schnitten der Proben mit FF zu unterscheiden waren. Es ist schwierig zu ermitteln, um welches Protein es sich handeln könnte, da sich die Patienten der Gruppe 2 hinsichtlich der erhobenen Patientendaten nicht von den Patienten der Gruppe 1 unterscheiden und aus diesen Daten (v.a. Alter, Diagnose, HLA) somit kein Hinweis gewonnen werden kann. Mittels Pubmed-Recherche wurde untersucht, ob für einige der Proteine, welche die oben erwähnte BLAST-Suche (**Abschnitt 4.2.1**) ergeben hatte, ein Zusammenhang mit dem Immunsystem oder dem intrazellulären Vesikeltransport bekannt war. Der höchstrangige Treffer (Max score) der BLAST-Suche unter diesen Gesichtspunkten war das Protein Fibrocystin-L (Gen: PKHDL1). Dieses weist die Sequenz QPFPQQ auf, was einer 100% Identität (Max identity) bei einer Abdeckung der Erkennungssequenz des m-Gliadin-AK (Query coverage) von 66% entspricht. Man geht davon aus, dass es sich um ein Rezeptorprotein handelt, die höchsten mRNA-Konzentrationen fand man in (murinen) aktivierten CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen [184]. Die Autoren diskutieren den Faktor einer verstärkten T-Zell-Aktivierung im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen. Den zweiten Rang belegte das F-box only protein 11 (Gen:

FBXO11) mit einer Sequenzdeckung von 88% und einer maximalen Identität von 100%. Dieses ist in klinischen Studien mit einem erhöhten Vorkommen der Otitis media bei Kindern assoziiert worden, die genauen Ursachen sind jedoch unklar [185]. Ein drittes Protein (Query coverage: 88%; Max identity: 88%) stellt das phosphurin acidic cluster sorting protein-1 (Gen: PACS-1) dar. Über dieses ist bekannt, dass es eine wichtige Rolle bei der Sortierung des intrazellulären Vesikelverkehrs spielt. Es ist verantwortlich für den vesikulären Transport verschiedener Proteine von den EE in den Golgi-Apparat und umgekehrt [186]. Die drei genannten möglichen Proteine wurden anhand der Übereinstimmung mit der Erkennungssequenz des m-Gliadin-AK ermittelt. Da für den p-Gliadin-AK eine solche Erkennungssequenz nicht bekannt ist, war eine entsprechende Suche nach kreuzreaktiven humanen Proteinen nicht möglich. Um zu prüfen, ob tatsächlich eines der genannten Proteine mit der verstärkten Markierung korreliert sein könnte, könnte man z.B. versuchen, dieses im Gewebe der Patienten von Gruppe 2 nachzuweisen. Gegen eine Kreuzreaktion mit einem endogenen Protein spricht allerdings die schon oben erwähnte Tatsache, dass der p-Gliadin-AK fast keine Markierung der Golgi-Apparate und der m-Gliadin-AK keine Verstärkung der Markierung der AM hervorruft. Auch wenn die Erkennungssequenzen der AK in unterschiedlichen Bereichen dieses Proteins lägen, so wäre trotzdem eine gewisse Übereinstimmung des Markierungsverhaltens zu erwarten. Erklärbar wäre dieser Befund dann nur durch die gleichzeitig verstärkte Expression zweier Proteine bei den Patienten der Gruppe 2.

4.3 Ausblick

Diese Studie konnte keinen IgG-abhängigen Transport in LE nachweisen. Allerdings könnte ein solcher Transport trotzdem existieren. Der FcRn transportiert IgG bidirektional über Epithelien und kann multimere AG-AK-Komplexe in LE leiten (siehe **Abschnitt 1.2.5.5**). Die Bindung des F_c-Teils von IgG an FcRn ist abhängig vom pH-Wert. So findet bei einem pH-Wert >6,5 keine Bindung mehr statt [187]. Das in dieser Studie eingesetzte Inkubationsmedium besaß einen pH-Wert von ungefähr 7. Eine Bindung an FcRn schien möglich, da der Natrium-Protonen-Austauscher NHE3 für ein saures Milieu direkt an der Darmschleimhaut sorgen kann [188, 189]. Möglicherweise war diese lokale Ansäuerung jedoch nicht ausreichend. Daher könnte in einer

zukünftigen Versuchsreihe der pH-Wert des Inkubationsmediums auf pH=6 eingestellt werden, um die Bindung der IgG an FcRn sicherzustellen.

Es wäre weiterhin möglich, dass die eingesetzte Menge an anti-Gliadin-IgG zu gering war. In dieser Studie konnte kein Unterschied in der relativen Verteilung der Gliadinmarkierung unter Einfluss spezifischer IgG nachgewiesen werden. Um einen Verdünnungseffekt auszuschließen könnte eine Verdünnungsreihe durchgeführt werden. Es ist ebenfalls nicht ausgeschlossen, dass die von Lübbing beschriebenen Effekte [181] durch anti-Gliadin-IgA oder andere Serumfaktoren verursacht wurden. Es könnte versucht werden, anti-Gliadin-IgA aus dem Serum von Zöliakiepatienten zu isolieren, um dieses dem Inkubationsmedium zuzusetzen. Eine eingehendere Literatur-Recherche wäre notwendig, um andere verdächtige Serumfaktoren zu identifizieren. Letztendlich wäre es auch einen Versuch wert, Biopsien mit Muttermilch zu inkubieren, um auf diese Weise einen direkten Zusammenhang zwischen Toleranzinduktion und intrazellulärem Gliadintransport herzustellen. Besonders wertvolle Ergebnisse könnten auf diese Weise mit Gewebe von Neugeborenen gewonnen werden. Es wird vermutet, dass in der Neugeborenenperiode eine Art „Priming“ des Immunsystems – welches auch zur Toleranz führen könnte – stattfindet [190].

Für die ausgeprägte Dichte der Gliadinmarkierung in Golgi-Apparaten und an der AM von Patienten der Gruppe 2 konnte keine Erklärung gefunden werden. Ein durch Versuchsfehler bedingtes Artefakt als Ursache der starken Markierung scheint sehr unwahrscheinlich. Um eingehender zu prüfen, ob es sich bei der Markierung um Gliadin handelt, könnten mit Hilfe eines Vergleichs der Markierungsdichten von -FF/+FF nach der von Lucocq und Gawden-Bone vorgeschlagenen Methode Organellen-bezogene Spezifitätswerte ermittelt werden [175]. Weiterhin könnte untersucht werden, ob beispielsweise die Proteine, die für Kreuzreaktionen in Frage kommen (siehe **Abschnitt 4.2.1**), mittels Western Blot oder auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden können.

Die Induktion oraler Toleranz gegenüber Gluten bei Zöliakiepatienten ist ein erstrebenswertes Ziel, da die Patienten, die eine GFD einhalten, eine verringerte Lebensqualität besitzen [191]. In dieser Studie war versucht worden, Gliadin in LE von Enterozyten umzuleiten, um so die Präsentation an regulatorische CD4⁺-T-Zellen (siehe **Abschnitte 1.2.5.1** und **1.2.5.2**) prinzipiell zu ermöglichen. Das Vorkommen von CD4⁺-CD25⁺-Zellen im Serum, welche die Proliferation von CD4⁺-CD25⁻-T-Zellen

hemmen, ist bei Menschen bestätigt [192-195]. Es ist allerdings nicht klar, welche Rolle solche T_{reg} bei der Zöliakie spielen. So konnten bei gesunden, HLA-DQ2/8-positiven Individuen bisher keine derartigen, glutenspezifischen T-Zellen isoliert werden. Hinweise auf deren mögliche Bedeutung gibt es jedoch aus Studien, die sich mit Lebensmittelallergien bei Kindern befassen. So sezernieren isolierte, duodenale T-Zellen von Patienten mit Kuhmilchallergie auf die Stimulation mit Kuhmilch hin nur geringe Mengen der Zytokine TGF- β und IL-10, welche supprimierend auf die T-Zell-Proliferation wirken [196]. In einer anderen Studie bei Kindern mit nicht-IgE-vermittelter Kuhmilchallergie war die spontane Entwicklung von Toleranz von einem Anstieg der $CD4^+$ - $CD25^+$ -T-Zellen im Serum begleitet [197]. Diese Kinder wiesen eine höhere Anzahl $CD4^+$ - $CD25^+$ -T-Zellen im Serum auf als Kinder mit persistierender Allergie. Bei Stimulation mit bovinem β -Laktoglobulin zeigte sich außerdem, dass die $CD4^+$ - $CD25^+$ -T-Zellen der Kinder mit Spontanregression *in vitro* die Proliferation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (Peripheral blood mononuclear cells, PBMC; diese Gruppe beinhaltet T-Zellen) stärker hemmten als die $CD4^+$ - $CD25^+$ -T-Zellen von Kindern mit persistierender Allergie. Nach der Depletion der $CD4^+$ - $CD25^+$ -T-Zellen von Kindern mit Spontanregression zeigte sich eine um das fünffache erhöhte Proliferation der mononukleären Zellen. Angesichts dieser Befunde scheint es gerechtfertigt davon auszugehen, dass auch bei der Glutentoleranz eine Präsentation von Gliadin an T_{reg} eine Rolle spielen könnte. In einem Mausmodell des allergischen Asthmas ist es gelungen, $CD4^+$ - $CD25^+$ -T-Zellen und Toleranz bei den gesügten Nestlingen durch Immunkomplexe aus IgG und dem allergieauslösenden AG in der Muttermilch über einen FcRn-abhängigen Mechanismus zu induzieren [167, 168]. Eingedenk der Tatsache, dass das Stillen des Säuglings diesen vor der Entwicklung einer Zöliakie schützen kann [86], ist gut vorstellbar, dass beim Menschen die orale Toleranz gegenüber Gluten auf einem ähnlichen Weg vermittelt wird. Tatsächlich findet sich ein solcher Modellvorschlag auch in der Literatur [198]. In Übersichtsartikeln zu den Mechanismen der oralen Toleranz wird allerdings häufig die Bedeutung der professionellen APC, v.a. $CD103^+$ -DC, bei der Präsentation des AG an die T_{reg} [199-201] betont. Insofern könnten die Ergebnisse dieser Studie – keine Erhöhung des Gliadinanteils in LE von Enterozyten durch IgG-Inkubation – zu jenen Literaturangaben passen. Man könnte in einer zukünftigen Untersuchung den Gliadinanteil in LE von DC bei IgG-Inkubation erfassen. Auf der anderen Seite war in Studien unseres Labors

gezeigt worden, dass das P31-49, an die B-Untereinheit des Choleratoxin (CTB) gekoppelt, in die LE von Enterozyten gelangt. Durch Konjugation eines AG an CTB konnte in vielen tierexperimentellen Modellen von Autoimmunerkrankungen und Allergien die Induktion oraler Toleranz bewirkt werden [202-206]. Über CTB ist bekannt, dass sie an der Zellmembran innerhalb sogenannter „lipid rafts“ an den Gangliosidrezeptor GM1 bindet, cholesterolabhängig endozytiert wird und entlang eines retrograden Transportwegs über das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) schließlich das Endoplasmatische Retikulum (ER) erreicht [207]. Vom TGN aus existiert ein durch das kleine G-Protein Rab7b vermittelter Austausch mit LE, welcher einen möglichen Transportweg für das CTB-gekoppelte P31-49 darstellen könnte [208]. Auf diesem Wege könnte den LE von Enterozyten Bedeutung bei der Toleranzinduktion zukommen. IEC und DC könnten in Anbetracht dieser Ergebnisse beide für die Präsentation von Gliadinpeptiden an T_{reg} verantwortlich sein. Unabhängig davon, welche der beiden Zellarten die wichtigere Rolle bei der AG-Präsentation spielt, sind IEC wahrscheinlich unverzichtbar für die Etablierung oraler Toleranz, da sie v.a. durch Sekretion von TGF- β und IL-10 dazu beitragen, eine „tolerogene“ Umgebung zu schaffen [199]. Auch von anderen Forschergruppen gibt es Versuche, dauerhafte Toleranz gegenüber Gluten im Sinne einer Impfung zu induzieren. An einem Mausmodell mit HLA-DQ2-abhängiger Glutenintoleranz wurde durch intradermale Verabreichung des immunodominanten α -Gliadinpeptids P57-73 eine abgeschwächte T-Zell-Proliferation und ein Anstieg regulatorischer Marker erreicht [209]. Unerwünschte Effekte wurden nicht berichtet. Dieses präklinische Modell wurde direkt in eine Phase-I-Studie an HLA-DQ2-positiven Zöliakiepatienten, welche eine GFD einhielten, übersetzt [210]. Die Autoren geben an, angesichts der akzeptablen Verträglichkeit des Präparats Nexvax2®, dieses in weiteren klinischen Studien untersuchen zu wollen. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass es verschiedene Ansätze gibt, mit welchen versucht wird, eine Glutentoleranz zu induzieren, die auf unterschiedlichen Teilaspekten des noch nicht vollständig geklärten Pathogenesmodells beruhen.

Die Aussagen dieser Studie zur Spezifität der verwendeten AK sind begrenzt. Um eine möglichst sichere Aussage zu ermöglichen, sollten vor allen Dingen mehr Patienten für die Spezifitätsbestimmung verwendet werden. Um größtmögliche Sicherheit bezüglich der Gliadinaufnahme in die Zellen zu erlangen, könnten in die Spezifitätsuntersuchung zudem Inkubationszeitreihen (FF-Inkubation z.B. für 5, 10, 30, 60min) integriert

werden. Weiterhin wäre es denkbar, Gewebe von Neugeborenen zu gewinnen, welche noch niemals Kontakt mit Gluten hatten, und dieses ebenfalls mit FF zu inkubieren. Die Nativprobe dieser Patienten wäre als absolut glutenfrei anzusehen. Zu bevorzugen wäre Material von Neugeborenen ohne intestinale inflammatorische Prozesse, wie z.B. Patienten, die wegen gastrointestinaler Fehlbildungen operiert werden müssen. Die Nativprobe könnte zusätzlich mit Zellkulturmedium (Medium, mit welchem die FF verdünnt wurde) inkubiert werden. In dieser Studie war die Nativprobe direkt in PFA fixiert worden und somit konnte ein Effekt des Zellkulturmediums – wenn auch unwahrscheinlich – nicht ausgeschlossen werden.

5 Zusammenfassung

Die Zöliakie (CD) ist eine systemische, entzündliche Erkrankung, die durch den Verlust der physiologischen Toleranz gegenüber Gluten gekennzeichnet ist. Die einzige Therapie besteht in einer lebenslangen glutenfreien Ernährung (GFD). Obwohl eine strikte GFD notwendig ist, um Langzeitkomplikationen zu verhindern, wird diese nicht von allen Patienten eingehalten. Daher ist die Entwicklung einer langfristig wirksamen Therapie/Prävention wünschenswert. Enterozyten können als unkonventionelle antigenpräsentierende Zellen fungieren. Toleranz gegenüber Gluten könnte (wieder-) hergestellt werden, indem Gliadin in die späten Endosomen der Enterozyten geleitet wird, da auf diese Weise die Assoziation mit HLA-Klasse-2-Molekülen und die Präsentation an regulatorische CD4⁺-T-Zellen ermöglicht wird. Eine solche Veränderung des Gliadintransportwegs ist durch Serum von CD-Patienten, welches anti-Gliadin-IgG und -IgA enthielt, bereits gelungen. Muttermilch enthält ebenfalls anti-Gliadin-IgG und -IgA und das Stillen des Säuglings kann diesen vor der Entwicklung einer Zöliakie schützen. Daher lautete die Hypothese dieser Arbeit: Anti-Gliadin-IgG können die Verteilung intrazellulärer Gliadinpeptide in Enterozyten verändern. Insbesondere stellten wir die Hypothese auf, dass durch anti-Gliadin-IgG der Gliadinpeptidanteil in frühen und späten Endosomen erhöht werden kann. Zur Überprüfung der Hypothese wurden Duodenalbiopsien von 12 CD- und 8 Nicht-CD-Patienten mit Gliadin und anti-Gliadin-IgG inkubiert und anschließend immunelektronenmikroskopisch ausgewertet. Dabei konnten keine signifikanten Veränderungen der intrazellulären Gliadinpeptidverteilung festgestellt werden. Offen geblieben ist, ob die eingesetzten IgG-Konzentrationen zu niedrig waren oder ob der neonatale Fc-Rezeptor für IgG, anti-Gliadin-IgA oder weitere Faktoren in Serum oder Muttermilch für eine erhöhte Gliadinpeptidaufnahme in späte Endosomen verantwortlich gemacht werden können. Neben der untersuchten Fragestellung zeigte sich bei einem Teil der Patienten eine deutliche Markierung von apikaler Membran und Golgi-Apparat durch die beiden eingesetzten anti-Gliadin-Antikörper. Ursache dieser verstärkten Markierung könnten eine gesteigerte Gliadinpeptidaufnahme oder Kreuzreaktionen der anti-Gliadin-Antikörper mit endogenen Proteinen sein. Diese offenen Fragen und auch das Bindungsverhalten der eingesetzten Antikörper könnten in weiteren Studien genauer untersucht werden.

6 Summary

Celiac disease (CD) is a systemic, inflammatory disorder characterized by the loss of tolerance to dietary gluten. The only treatment currently available is a gluten free diet (GFD) for life. Strict dietary compliance is necessary to prevent future complications. Nevertheless some patients stop following GFD. Therefore, the development of a curative treatment or prevention is desirable. Enterocytes being non-conventional antigen presenting cells can present exogenous antigens to CD4⁺ T cells. Tolerance might be (re-)established by directing gliadin into late endosomes of enterocytes and thus enabling association with HLA class 2 and presentation to regulatory CD4⁺ T cells. Routing of gliadin into late endosomes can be achieved by adding serum of CD patients containing anti-gliadin IgG and IgA. Breast milk also contains anti-gliadin IgG and IgA and breast feeding has been shown to prevent development of celiac disease. Hence, we hypothesized that anti-gliadin IgG can alter the intracellular distribution of gliadin, and in particular that the gliadin content in early and late endosomes can be increased in such way. In order to test the hypothesis, duodenal biopsy specimen from 12 CD and 8 non-CD patients were incubated with gliadin and anti-gliadin IgG followed by evaluation using immunoelectron microscopy. Significant changes regarding the intracellular distribution of gliadin were not observed. However, a role of anti-gliadin IgG and FcRn cannot be excluded. Furthermore, anti-gliadin IgA or other serum factors might be able to cause uptake of gliadin into late endosomes. Aside from the hypothesis we found remarkably intense labeling of golgi apparatus and apical membrane in some of the patients that cannot be explained. Further investigations are needed to address these questions including a detailed assessment of the specific labeling properties of the anti-gliadin antibodies.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
AGA	Anti-Gliadin-Antikörper
AK	Antikörper
AM	Apikale Membran
APC	Antigen presenting cell, Antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäuren
°C	Grad Celsius
CD	Celiac disease, Zöliakie
CTB	Choleratoxin Untereinheit B
DC	Dendritic cells, Dendritische Zellen
DGP	Deamidierte Gliadinpeptide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EATL	Enteropathie-assoziiertes T-Zell-Lymphom
EE	Frühes Endosom
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMA	Endomysiales Antigen
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESPGHAN	European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition
FcRn	Neonatal Receptor for IgG
FF	Frazer's Fraction
GaM	Goat-anti-mouse
GaR	Goat-anti-rabbit
GFD	Glutenfreie Diät
GP	Goldpartikel
GS	Glutensensitivität
HLA	Humanes-Leukozyten-Antigen
IBS	Irritable Bowel Syndrome, Reizdarmsyndrom
IEC	Intestinal epithelial cell, Enterozyt
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten

IgA	Immunglobulin Klasse A
IgG	Immunglobulin Klasse G
IL-10	Interleukin 10
i.v.	Intravenös
KG	Körpergewicht
LAMP	Lysosomal-associated Membrane Protein
LE	Spätes Endosom
m	Meter
MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A
mRNA	Messenger RNA
N	Patientenanzahl
N-CD	Nicht-Zöliakie
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NKG	Natürliche-Killerzell-Gruppe
Nm	Nanometer
OVA	Ovalbumin
<i>p</i>	Irrtumswahrscheinlichkeit, Signifikanzniveau
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
RBA	Radiobinding Assay
RCD	Refractory Celiac Disease
RT	Raumtemperatur
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SD	Standardabweichung
SIR	Standardized incidence ratio
tTG	Tissue transglutaminase, Gewebstransglutaminase
TGF- β	Tumor Growth Factor β
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle

7.2 Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Symptome der Zöliakie.	2
Tabelle 2: Formen der Zöliakie.	4
Tabelle 3: Sensitivitäten und Spezifitäten wichtiger serologischer Tests.	7
Tabelle 4: Klassifizierung des histologischen Schleimhautbefundes.	8
Tabelle 5: Differentialdiagnosen der Zottenatrophie.	10
Tabelle 6: Prävalenz der Zöliakie in ausgewählten Risikogruppen.	12
Tabelle 7: Verwendete Geräte, Glas- und Plastikmaterialien.	26
Tabelle 8: Verwendete Chemikalien.	27
Tabelle 9: Primäre Antikörper für die Immunelektronenmikroskopie.	28
Tabelle 10: Sekundäre Antikörper für die Immunelektronenmikroskopie.	29
Tabelle 11: Inkubationsansätze.	31
Tabelle 12: Kombinationen primärer und sekundärer Antikörper.	33
Tabelle 13: Identifizierte zelluläre Strukturen und deren Definition.	35
Tabelle 14: Patientendaten.	40
Tabelle 15: Markierungsdichten der anti-Gliadin-Antikörper.	41
Tabelle 16: Spezifität der anti-Gliadin-Antikörper.	42
Tabelle 17: Zellzahlen pro 100 GP 12nm.	43
Tabelle 18: Gliadinmarkierung in frühen Endosomen.	45
Tabelle 19: Gliadinmarkierung in späten Endosomen.	47
Tabelle 20: Gliadinmarkierung in weiteren Zellkompartimenten.	49
Tabelle 21: Gliadinmarkierung im Golgi-Apparat.	50
Tabelle 22: Gliadinmarkierung der apikalen Membran.	51

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histologischer Schleimhautbefund.	8
Abbildung 2: Codierung des HLA-DQ2.5 α/β -Heterodimers in <i>cis</i> und <i>trans</i> .	15
Abbildung 3: Pathogenetische Mechanismen bei Zöliakie.	19
Abbildung 4: Mäanderförmigen Führung des mikroskopischen Gesichtsfeldes.	35
Abbildung 5: Zellulärer Bereich zur Bestimmung der Markierungsdichte.	37
Abbildung 6: Gleichung zur Errechnung der Spezifität.	37
Abbildung 7: Aufteilung der Patienten.	39
Abbildung 8: Markierungsdichten der anti-Gliadin-Antikörper.	42
Abbildung 9: Gliadinmarkierung in frühen Endosomen.	44
Abbildung 10: Gliadinmarkierung in frühen Endosomen.	46
Abbildung 11: Gliadinmarkierung in späten Endosomen.	48
Abbildung 12: Gliadinmarkierung des Golgi-Apparats.	50
Abbildung 13: Gliadinmarkierung der apikalen Membran.	51

7.4 Quellenverzeichnis

1. Husby, S., et al., *European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2012. **54**(1): p. 136-60.
2. Adams, F., *The Extant Works of Aretaeus the Cappadocian*. The Sydenham Society, London, 1856.
3. Gee, S., *On the coeliac affection*. St Bartholomews Hosp Rep 1888: **24**: p. 17–20.
4. Haas, S.V., *Celiac disease, its specific treatment and cure without nutritional relapse*. JAMA, 1932. **99**(6): p. 448-452.
5. van Berge-Henegouwen, G.P. and C.J. Mulder, *Willem-Karel Dicke 1905–1962, over 50 years of gluten free diet*. Gut, 1993. **34**(11): p. 1473-5.
6. van De Kamer, J.H., H.A. Weijers, and W.K. Dicke, *Coeliac disease. IV. An investigation into the injurious constituents of wheat in connection with their action on patients with coeliac disease*. Acta Paediatr, 1953. **42**(3): p. 223-31.
7. Dicke, W.K., *Investigation of the harmful effects of certain types of cereal on patients suffering from coeliac disease [Doctor of Medicine]*. State University of Utrecht, Faculty of Medicine, 1950.
8. Berger, E., *Zur allergischen Pathogenese der Cöliakie*. Bibliotheca Paediatrica Fasc. 67, S. Karger AG, Basel, New York, 1958.
9. Macdonald, W.C., W.O. Dobbins, 3rd, and C.E. Rubin, *Studies of the Familial Nature of Celiac Sprue Using Biopsy of the Small Intestine*. N Engl J Med, 1965. **272**: p. 448-56.
10. Falchuk, Z.M., G.N. Rogentine, and W. Strober, *Predominance of histocompatibility antigen HL-A8 in patients with gluten-sensitive enteropathy*. J Clin Invest, 1972. **51**(6): p. 1602-5.
11. Sollid, L.M., et al., *Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer*. The Journal of experimental medicine, 1989. **169**(1): p. 345-50.
12. Ferguson, A., et al., *Cell-mediated immunity to gliadin within the small-intestinal mucosa in coeliac disease*. Lancet, 1975. **1**(7912): p. 895-7.

13. Chorzelski, T.P., et al., *IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and coeliac disease*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1983. **420**: p. 325-34.
14. Dieterich, W., et al., *Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease*. Nature medicine, 1997. **3**(7): p. 797-801.
15. Fasano, A., *Clinical presentation of celiac disease in the pediatric population*. Gastroenterology, 2005. **128**(4 Suppl 1): p. S68-73.
16. Tack, G.J., et al., *The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment*. Nature reviews. Gastroenterology & hepatology, 2010. **7**(4): p. 204-13.
17. Mozer-Glassberg, Y., et al., *Follow-up of children with celiac disease - lost in translation?* Digestion, 2011. **83**(4): p. 283-7.
18. Garampazzi, A., et al., *Clinical pattern of celiac disease is still changing*. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition, 2007. **45**(5): p. 611-4.
19. Steens, R.F., et al., *A national prospective study on childhood celiac disease in the Netherlands 1993-2000: an increasing recognition and a changing clinical picture*. The Journal of pediatrics, 2005. **147**(2): p. 239-43.
20. Schuppan, D. and K.P. Zimmer, *The diagnosis and treatment of celiac disease*. Dtsch Arztebl Int, 2013. **110**(49): p. 835-46.
21. D'Amico, M.A., et al., *Presentation of pediatric celiac disease in the United States: prominent effect of breastfeeding*. Clinical pediatrics, 2005. **44**(3): p. 249-58.
22. Roma, E., et al., *Changing pattern in the clinical presentation of pediatric celiac disease: a 30-year study*. Digestion, 2009. **80**(3): p. 185-91.
23. Lo, W., et al., *Changing presentation of adult celiac disease*. Digestive diseases and sciences, 2003. **48**(2): p. 395-8.
24. *Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition*. Arch Dis Child, 1990. **65**(8): p. 909-11.
25. Zimmer, K.P., *Klinische Bedeutung nichtklassischer Zöliakieformen*. Dtsch Arztebl, 2001. **98**(49): p. A 3285-92.
26. Rubio-Tapia, A. and J.A. Murray, *Classification and management of refractory coeliac disease*. Gut, 2010. **59**(4): p. 547-57.

27. Cornes, J.S., *Hodgkin's disease of the gastrointestinal tract*. Proceedings of the Royal Society of Medicine, 1967. **60**(8): p. 732-3.
28. Cottone, M., et al., *Mortality and causes of death in celiac disease in a Mediterranean area*. Digestive diseases and sciences, 1999. **44**(12): p. 2538-41.
29. Green, P.H., et al., *Risk of malignancy in patients with celiac disease*. The American journal of medicine, 2003. **115**(3): p. 191-5.
30. Holmes, G.K., et al., *Malignancy in coeliac disease--effect of a gluten free diet*. Gut, 1989. **30**(3): p. 333-8.
31. Elfstrom, P., et al., *Risk of lymphoproliferative malignancy in relation to small intestinal histopathology among patients with celiac disease*. Journal of the National Cancer Institute, 2011. **103**(5): p. 436-44.
32. Delabie, J., et al., *Enteropathy-associated T-cell lymphoma: clinical and histological findings from the international peripheral T-cell lymphoma project*. Blood, 2011. **118**(1): p. 148-55.
33. Al-Toma, A., et al., *Survival in refractory coeliac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma: retrospective evaluation of single-centre experience*. Gut, 2007. **56**(10): p. 1373-8.
34. Corrao, G., et al., *Mortality in patients with coeliac disease and their relatives: a cohort study*. Lancet, 2001. **358**(9279): p. 356-61.
35. Grainge, M.J., et al., *Causes of death in people with celiac disease spanning the pre- and post-serology era: a population-based cohort study from Derby, UK*. The American journal of gastroenterology, 2011. **106**(5): p. 933-9.
36. Hill, I.D., et al., *Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition, 2005. **40**(1): p. 1-19.
37. Giersiepen, K., et al., *Accuracy of diagnostic antibody tests for coeliac disease in children: summary of an evidence report*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2012. **54**(2): p. 229-41.
38. Sulkanen, S., et al., *Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease*. Gastroenterology, 1998. **115**(6): p. 1322-8.

39. Evans, K.E. and D.S. Sanders, *What is the use of biopsy and antibodies in coeliac disease diagnosis?* Journal of internal medicine, 2011. **269**(6): p. 572-81.
40. Green, P.H. and C. Cellier, *Celiac disease*. The New England journal of medicine, 2007. **357**(17): p. 1731-43.
41. Weir, D.C., et al., *Variability of histopathological changes in childhood celiac disease*. The American journal of gastroenterology, 2010. **105**(1): p. 207-12.
42. Bonamico, M., et al., *Duodenal bulb biopsies in celiac disease: a multicenter study*. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition, 2008. **47**(5): p. 618-22.
43. Marsh, M.N., *Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue')*. Gastroenterology, 1992. **102**(1): p. 330-54.
44. Oberhuber, G., G. Granditsch, and H. Vogelsang, *The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists*. European journal of gastroenterology & hepatology, 1999. **11**(10): p. 1185-94.
45. Corazza, G.R. and V. Villanacci, *Coeliac disease*. Journal of clinical pathology, 2005. **58**(6): p. 573-4.
46. Ravelli, A., et al., *Variability of histologic lesions in relation to biopsy site in gluten-sensitive enteropathy*. The American journal of gastroenterology, 2005. **100**(1): p. 177-85.
47. Holtmeier, W. and W.F. Caspary, *Celiac disease*. Orphanet journal of rare diseases, 2006. **1**: p. 3.
48. Kakar, S., et al., *Significance of intraepithelial lymphocytosis in small bowel biopsy samples with normal mucosal architecture*. The American journal of gastroenterology, 2003. **98**(9): p. 2027-33.
49. Rostom, A., et al., *Celiac disease*. Evidence report/technology assessment, 2004(104): p. 1-6.
50. Balas, A., et al., *Absolute linkage of celiac disease and dermatitis herpetiformis to HLA-DQ*. Tissue antigens, 1997. **50**(1): p. 52-6.
51. Dorman, J.S. and C.H. Bunker, *HLA-DQ locus of the human leukocyte antigen complex and type 1 diabetes mellitus: a HuGE review*. Epidemiologic reviews, 2000. **22**(2): p. 218-27.

52. Sacchetti, L., et al., *Discrimination between celiac and other gastrointestinal disorders in childhood by rapid human lymphocyte antigen typing*. Clinical chemistry, 1998. **44**(8 Pt 1): p. 1755-7.
53. Iltanen, S., et al., *Expression of HSP-65 in jejunal epithelial cells in patients clinically suspected of coeliac disease*. Autoimmunity, 1999. **31**(2): p. 125-32.
54. Hoffenberg, E.J., et al., *A prospective study of the incidence of childhood celiac disease*. The Journal of pediatrics, 2003. **143**(3): p. 308-14.
55. Dube, C., et al., *The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systematic review*. Gastroenterology, 2005. **128**(4 Suppl 1): p. S57-67.
56. Dorn, S.D. and D.B. Matchar, *Cost-effectiveness analysis of strategies for diagnosing celiac disease*. Digestive diseases and sciences, 2008. **53**(3): p. 680-8.
57. Verdu, E.F., D. Armstrong, and J.A. Murray, *Between celiac disease and irritable bowel syndrome: the "no man's land" of gluten sensitivity*. The American journal of gastroenterology, 2009. **104**(6): p. 1587-94.
58. Troncone, R. and B. Jabri, *Coeliac disease and gluten sensitivity*. Journal of internal medicine, 2011. **269**(6): p. 582-90.
59. Mustalahti, K., et al., *The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project*. Ann Med, 2010. **42**(8): p. 587-95.
60. Kolho, K.L., M.A. Farkkila, and E. Savilahti, *Undiagnosed coeliac disease is common in Finnish adults*. Scandinavian journal of gastroenterology, 1998. **33**(12): p. 1280-3.
61. Maki, M., et al., *Prevalence of Celiac disease among children in Finland*. The New England journal of medicine, 2003. **348**(25): p. 2517-24.
62. Sjoberg, K., et al., *Prevalence and clinical significance of gliadin antibodies in healthy children and adults*. Scandinavian journal of gastroenterology, 1994. **29**(3): p. 248-54.
63. Csizmadia, C.G., et al., *An iceberg of childhood coeliac disease in the Netherlands*. Lancet, 1999. **353**(9155): p. 813-4.
64. Catassi, C., et al., *Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara?* Lancet, 1999. **354**(9179): p. 647-8.

65. Bingley, P.J., et al., *Undiagnosed coeliac disease at age seven: population based prospective birth cohort study*. *BMJ*, 2004. **328**(7435): p. 322-3.
66. Nistico, L., et al., *Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins*. *Gut*, 2006. **55**(6): p. 803-8.
67. *Recognition and assessment of coeliac disease. NICE Clinical Guideline 86*. National Institute for Health and Clinical Excellence, London, 2009.
68. Cataldo, F., et al., *Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. Italian Society of Paediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP) and "Club del Tenue" Working Groups on Coeliac Disease*. *Gut*, 1998. **42**(3): p. 362-5.
69. Volta, U., et al., *Coeliac disease hidden by cryptogenic hypertransaminasaemia*. *Lancet*, 1998. **352**(9121): p. 26-9.
70. *Verordnung (EG) Nr. 41/2009 DER KOMMISSION vom 20. Januar 2009 zur Zusammensetzung und Kennzeichnung von Lebensmitteln, die für Menschen mit einer Glutenunverträglichkeit geeignet sind*. Rechtsvorschrift L 16/3, Amtsblatt der Europäischen Kommission, Brüssel, 2009. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:016:0003:0005:DE:PDF> (abgerufen am 22.12.2013).
71. Crowe, S.E., *In the clinic. Celiac disease*. *Annals of internal medicine*, 2011. **154**(9): p. ITC5-1-ITC5-15; quiz ITC5-16.
72. Hopman, E.G., et al., *Dietary compliance and health-related quality of life in patients with coeliac disease*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2009. **21**(9): p. 1056-61.
73. Osborne, T.B., *Our Present Knowledge of Plant Proteins*. *Science*, 1908. **28**(718): p. 417-27.
74. Anand, B.S., J. Piris, and S.C. Truelove, *The role of various cereals in coeliac disease*. *Q J Med*, 1978. **47**(185): p. 101-110.
75. Dissanayake, A.S., S.C. Truelove, and R. Whitehead, *Lack of harmful effect of oats on small-intestinal mucosa in coeliac disease*. *Br Med J*, 1974. **4**(5938): p. 189-91.
76. Baker, P.G. and A.E. Read, *Oats and barley toxicity in coeliac patients*. *Postgrad Med J*, 1976. **52**(607): p. 264-8.

77. Kagnoff, M.F., *Overview and pathogenesis of celiac disease*. Gastroenterology, 2005. **128**(4 Suppl 1): p. S10-8.
78. Woychik, J.H., J.A. Boundy, and R.J. Dimler, *Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea*. Arch Biochem Biophys, 1961. **94**: p. 477-82.
79. Wieser, H., *The precipitating factor in coeliac disease*. Baillieres Clin Gastroenterol, 1995. **9**(2): p. 191-207.
80. Shewry, P.R., M.J. Miles, and A.S. Tatham, *The prolamin storage proteins of wheat and related cereals*. Progress in biophysics and molecular biology, 1994. **61**(1): p. 37-59.
81. Wieser, H., *Chemistry of gluten proteins*. Food Microbiol, 2007. **24**(2): p. 115-9.
82. Sandberg-Bennich, S., G. Dahlquist, and B. Kallen, *Coeliac disease is associated with intrauterine growth and neonatal infections*. Acta Paediatr, 2002. **91**(1): p. 30-3.
83. Stene, L.C., et al., *Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study*. Am J Gastroenterol, 2006. **101**(10): p. 2333-40.
84. Forsberg, G., et al., *Presence of bacteria and innate immunity of intestinal epithelium in childhood celiac disease*. Am J Gastroenterol, 2004. **99**(5): p. 894-904.
85. Croese, J., S.T. Gaze, and A. Loukas, *Changed gluten immunity in celiac disease by *Necator americanus* provides new insights into autoimmunity*. Int J Parasitol, 2013. **43**(3-4): p. 275-82.
86. Akobeng, A.K., et al., *Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies*. Archives of disease in childhood, 2006. **91**(1): p. 39-43.
87. Price, P., et al., *The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases*. Immunol Rev, 1999. **167**: p. 257-74.
88. Wolters, V.M. and C. Wijmenga, *Genetic background of celiac disease and its clinical implications*. Am J Gastroenterol, 2008. **103**(1): p. 190-5.

89. Mearin, M.L., et al., *HLA-DR phenotypes in Spanish coeliac children: their contribution to the understanding of the genetics of the disease*. Gut, 1983. **24**(6): p. 532-7.
90. Ek, J., et al., *Strong association between the HLA-Dw3-related B cell alloantigen -DRw3 and coeliac disease*. Scand J Gastroenterol, 1978. **13**(2): p. 229-33.
91. Keuning, J.J., et al., *HLA-DW3 associated with coeliac disease*. Lancet, 1976. **1**(7958): p. 506-8.
92. Tosi, R., et al., *Evidence that celiac disease is primarily associated with a DC locus allelic specificity*. Clin Immunol Immunopathol, 1983. **28**(3): p. 395-404.
93. Sollid, L.M., *Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder*. Nature reviews. Immunology, 2002. **2**(9): p. 647-55.
94. Meresse, B., G. Malamut, and N. Cerf-Bensussan, *Celiac disease: an immunological jigsaw*. Immunity, 2012. **36**(6): p. 907-19.
95. Spurkland, A., et al., *HLA-DR and -DQ genotypes of celiac disease patients serologically typed to be non-DR3 or non-DR5/7*. Human immunology, 1992. **35**(3): p. 188-92.
96. Mantovani, V., et al., *Asp57-negative HLA DQ beta chain and DQA1*0501 allele are essential for the onset of DQw2-positive and DQw2-negative coeliac disease*. Clinical and experimental immunology, 1993. **91**(1): p. 153-6.
97. Tighe, M.R., et al., *Celiac disease among Ashkenazi Jews from Israel. A study of the HLA class II alleles and their associations with disease susceptibility*. Hum Immunol, 1993. **38**(4): p. 270-6.
98. Polvi, A., et al., *HLA-DQ2-negative celiac disease in Finland and Spain*. Hum Immunol, 1998. **59**(3): p. 169-75.
99. Karell, K., et al., *HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease*. Hum Immunol, 2003. **64**(4): p. 469-77.
100. Schuppan, D., Y. Junker, and D. Barisani, *Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies*. Gastroenterology, 2009. **137**(6): p. 1912-33.
101. Greco, L., et al., *Existence of a genetic risk factor on chromosome 5q in Italian coeliac disease families*. Ann Hum Genet, 2001. **65**(Pt 1): p. 35-41.

102. van Heel, D.A., et al., *A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21*. *Nat Genet*, 2007. **39**(7): p. 827-9.
103. Hunt, K.A., et al., *Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response*. *Nat Genet*, 2008. **40**(4): p. 395-402.
104. Garner, C.P., et al., *Replication of celiac disease UK genome-wide association study results in a US population*. *Hum Mol Genet*, 2009. **18**(21): p. 4219-25.
105. Dubois, P.C., et al., *Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression*. *Nat Genet*, 2010. **42**(4): p. 295-302.
106. Schuppan, D., *Current concepts of celiac disease pathogenesis*. *Gastroenterology*, 2000. **119**(1): p. 234-42.
107. Schneeberger, E.E. and R.D. Lynch, *The tight junction: a multifunctional complex*. *American journal of physiology. Cell physiology*, 2004. **286**(6): p. C1213-28.
108. Clemente, M.G., et al., *Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function*. *Gut*, 2003. **52**(2): p. 218-23.
109. Drago, S., et al., *Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines*. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 2006. **41**(4): p. 408-19.
110. Lammers, K.M., et al., *Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3*. *Gastroenterology*, 2008. **135**(1): p. 194-204 e3.
111. Lammers, K.M., et al., *Identification of a novel immunomodulatory gliadin peptide that causes interleukin-8 release in a chemokine receptor CXCR3-dependent manner only in patients with coeliac disease*. *Immunology*, 2011. **132**(3): p. 432-40.
112. Schumann, M., et al., *Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue*. *Gut*, 2008. **57**(6): p. 747-54.
113. Niess, J.H., et al., *CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance*. *Science*, 2005. **307**(5707): p. 254-8.
114. Zimmer, K.P., et al., *Translocation of gliadin into HLA-DR antigen containing lysosomes in coeliac disease enterocytes*. *Gut*, 1995. **36**(5): p. 703-9.

115. Matysiak-Budnik, T., et al., *Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease*. *Gastroenterology*, 2003. **125**(3): p. 696-707.
116. Matysiak-Budnik, T., et al., *Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease*. *The Journal of experimental medicine*, 2008. **205**(1): p. 143-54.
117. Tuckova, L., et al., *Activation of macrophages by gliadin fragments: isolation and characterization of active peptide*. *J Leukoc Biol*, 2002. **71**(4): p. 625-31.
118. Maiuri, L., et al., *Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease*. *Lancet*, 2003. **362**(9377): p. 30-7.
119. Palova-Jelinkova, L., et al., *Gliadin fragments induce phenotypic and functional maturation of human dendritic cells*. *J Immunol*, 2005. **175**(10): p. 7038-45.
120. Thomas, K.E., et al., *Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease*. *J Immunol*, 2006. **176**(4): p. 2512-21.
121. Hue, S., et al., *A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease*. *Immunity*, 2004. **21**(3): p. 367-77.
122. Meresse, B., et al., *Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease*. *Immunity*, 2004. **21**(3): p. 357-66.
123. Di Sabatino, A., et al., *Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease*. *Gut*, 2006. **55**(4): p. 469-77.
124. Meresse, B., et al., *Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis*. *Mucosal immunology*, 2009. **2**(1): p. 8-23.
125. Meresse, B., et al., *Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease*. *J Exp Med*, 2006. **203**(5): p. 1343-55.
126. Burgess, S.J., et al., *The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications*. *Immunol Res*, 2008. **40**(1): p. 18-34.
127. Ciccocioppo, R., et al., *Cytolytic mechanisms of intraepithelial lymphocytes in coeliac disease (CoD)*. *Clin Exp Immunol*, 2000. **120**(2): p. 235-40.

128. Lundin, K.E., et al., *Gliadin-specific, HLA-DQ(alpha 1*0501,beta 1*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients*. The Journal of experimental medicine, 1993. **178**(1): p. 187-96.
129. Lundin, K.E., et al., *T cells from the small intestinal mucosa of a DR4, DQ7/DR4, DQ8 celiac disease patient preferentially recognize gliadin when presented by DQ8*. Hum Immunol, 1994. **41**(4): p. 285-91.
130. Bodd, M., et al., *T-cell response to gluten in patients with HLA-DQ2.2 reveals requirement of peptide-MHC stability in celiac disease*. Gastroenterology, 2012. **142**(3): p. 552-61.
131. Kooy-Winkelaar, Y., et al., *Gluten-specific T cells cross-react between HLA-DQ8 and the HLA-DQ2alpha/DQ8beta transdimer*. J Immunol, 2011. **187**(10): p. 5123-9.
132. Lorand, L. and R.M. Graham, *Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(2): p. 140-56.
133. Abadie, V., et al., *Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 493-525.
134. Molberg, O., et al., *Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease*. Nat Med, 1998. **4**(6): p. 713-7.
135. van de Wal, Y., et al., *Small intestinal T cells of celiac disease patients recognize a natural pepsin fragment of gliadin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(17): p. 10050-4.
136. Nilsen, E.M., et al., *Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma*. Gut, 1995. **37**(6): p. 766-76.
137. Nilsen, E.M., et al., *Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease*. Gastroenterology, 1998. **115**(3): p. 551-63.
138. Leffler, D.A. and D. Schuppan, *Update on serologic testing in celiac disease*. Am J Gastroenterol, 2010. **105**(12): p. 2520-4.
139. Vahedi, K., et al., *Reliability of antitransglutaminase antibodies as predictors of gluten-free diet compliance in adult celiac disease*. Am J Gastroenterol, 2003. **98**(5): p. 1079-87.

140. Di Niro, R., et al., *High abundance of plasma cells secreting transglutaminase 2-specific IgA autoantibodies with limited somatic hypermutation in celiac disease intestinal lesions*. Nat Med, 2012. **18**(3): p. 441-5.
141. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, eds. *Janeway Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009.
142. Dubois, B., et al., *Oral tolerance and regulation of mucosal immunity*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2005. **62**(12): p. 1322-32.
143. Groux, H., et al., *A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 737-42.
144. Mayrhofer, G. and L.D. Spargo, *Subcellular distribution of class II major histocompatibility antigens in enterocytes of the human and rat small intestine*. Immunology and cell biology, 1989. **67** (Pt 4): p. 251-60.
145. Hershberg, R.M., et al., *Intestinal epithelial cells use two distinct pathways for HLA class II antigen processing*. The Journal of clinical investigation, 1997. **100**(1): p. 204-15.
146. Hershberg, R.M., et al., *Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells*. The Journal of clinical investigation, 1998. **102**(4): p. 792-803.
147. Hershberg, R.M. and L.F. Mayer, *Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity*. Immunology today, 2000. **21**(3): p. 123-8.
148. Snoeck, V., B. Goddeeris, and E. Cox, *The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake*. Microbes and infection / Institut Pasteur, 2005. **7**(7-8): p. 997-1004.
149. Telega, G.W., D.C. Baumgart, and S.R. Carding, *Uptake and presentation of antigen to T cells by primary colonic epithelial cells in normal and diseased states*. Gastroenterology, 2000. **119**(6): p. 1548-59.
150. Bland, P.W. and L.G. Warren, *Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. II. Selective induction of suppressor T cells*. Immunology, 1986. **58**(1): p. 9-14.
151. Westendorf, A.M., et al., *Intestinal epithelial antigen induces CD4+ T cells with regulatory phenotype in a transgenic autoimmune mouse model*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2006. **1072**: p. 401-6.

152. Zimmer, K.P., et al., *Modulation of antigen trafficking to MHC class II-positive late endosomes of enterocytes*. Gastroenterology, 2000. **118**(1): p. 128-37.
153. Sturges, R., et al., *Wheat peptide challenge in coeliac disease*. Lancet, 1994. **343**(8900): p. 758-61.
154. Marsh, M.N., et al., *In vivo activity of peptides 31–43, 44–45, 56–68 of α -gliadin in gluten sensitive enteropathy (GSE)*. Gastroenterology, 1995. **108**(4): p. 834-1412.
155. Sollid, L.M., et al., *Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules*. Immunogenetics, 2012. **64**(6): p. 455-60.
156. Arentz-Hansen, H., et al., *The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase*. J Exp Med, 2000. **191**(4): p. 603-12.
157. Zimmer, K.P., et al., *Endocytotic segregation of gliadin peptide 31-49 in enterocytes*. Gut, 2010. **59**(3): p. 300-10.
158. Lubbing, N., et al., *Correction of gliadin transport within enterocytes through celiac disease serum*. Pediatric research, 2011. **70**(4): p. 357-62.
159. Simister, N.E. and K.E. Mostov, *An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens*. Nature, 1989. **337**(6203): p. 184-7.
160. Jones, E.A. and T.A. Waldmann, *The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat*. Gut, 1971. **12**(10): p. 855-6.
161. Abrahamson, D.R. and R. Rodewald, *Evidence for the sorting of endocytic vesicle contents during the receptor-mediated transport of IgG across the newborn rat intestine*. The Journal of cell biology, 1981. **91**(1): p. 270-80.
162. Israel, E.J., et al., *Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells*. Immunology, 1997. **92**(1): p. 69-74.
163. Claypool, S.M., et al., *Functional reconstitution of human FcRn in Madin-Darby canine kidney cells requires co-expressed human beta 2-microglobulin*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(31): p. 28038-50.
164. Dickinson, B.L., et al., *Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line*. The Journal of clinical investigation, 1999. **104**(7): p. 903-11.

165. Yoshida, M., et al., *Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells*. *Immunity*, 2004. **20**(6): p. 769-83.
166. Qiao, S.W., et al., *Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008. **105**(27): p. 9337-42.
167. Verhasselt, V., et al., *Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma*. *Nature medicine*, 2008. **14**(2): p. 170-5.
168. Mosconi, E., et al., *Breast milk immune complexes are potent inducers of oral tolerance in neonates and prevent asthma development*. *Mucosal immunology*, 2010. **3**(5): p. 461-74.
169. Chirido, F.G., et al., *Presence of high levels of non-degraded gliadin in breast milk from healthy mothers*. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 1998. **33**(11): p. 1186-1192.
170. Rumbo, M., et al., *Detection and characterization of antibodies specific to food antigens (gliadin, ovalbumin and beta-lactoglobulin) in human serum, saliva, colostrum and milk*. *Clinical and experimental immunology*, 1998. **112**(3): p. 453-8.
171. Karlsson, M.R., et al., *Hypersensitivity and oral tolerance in the absence of a secretory immune system*. *Allergy*, 2010. **65**(5): p. 561-70.
172. Frazer, A.C., et al., *Gluten-induced enteropathy: the effect of partially digested gluten*. *Lancet*, 1959. **2**(7097): p. 252-5.
173. Griffiths, G., *Fine structure immunocytochemistry*. Vol. 1, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1993.
174. Tokuyasu, K.T., *A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues*. *J Cell Biol*, 1973. **57**(2): p. 551-65.
175. Lucocq, J.M. and C. Gawden-Bone, *Quantitative assessment of specificity in immunoelectron microscopy*. *J Histochem Cytochem*, 2010. **58**(10): p. 917-27.
176. Allen, T.C. and P.T. Cagle, eds. *Basic Concepts of Molecular Pathology*. *Molecular Pathology Library*, ed. P.T. Cagle. 2009, Springer: Dordrecht, Heidelberg, London, New York.

177. Ellis, H.J., et al., *Specificities of monoclonal antibodies to domain I of alpha-gliadins*. Scand J Gastroenterol, 1993. **28**(3): p. 212-6.
178. Kempainen, T.A., et al., *Unkilned and large amounts of oats in the coeliac disease diet: a randomized, controlled study*. Scand J Gastroenterol, 2008. **43**(9): p. 1094-101.
179. Palashoff, M.H., *Determining the specificity of pepsin for proteolytic digestion [Chemistry Master's Thesis]. Paper 1*. <http://hdl.handle.net/2047//d10016636> (abgerufen 22.12.2013).
180. Olsen, J.V., S.E. Ong, and M. Mann, *Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(6): p. 608-14.
181. Lübbling, N., *Intrazelluläre Transportprozesse von Gliadin in Enterozyten und deren Modulation durch Zöliakieserum [Doctor of Medicine]*. Universität Gießen, Medizinische Fakultät, 2011. *Urn:nbn:de:hebis:26-opus-86252*. <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2012/8625/> (abgerufen am 22.12.2013)
182. Brosius, F., *SPSS 19.*, mitp-Verlag, Heidelberg, 2011.
183. Huotari, J. and A. Helenius, *Endosome maturation*. EMBO J, 2011. **30**(17): p. 3481-500.
184. Hogan, M.C., et al., *PKHD1, a homolog of the autosomal recessive polycystic kidney disease gene, encodes a receptor with inducible T lymphocyte expression*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(6): p. 685-98.
185. Rye, M.S., J.M. Blackwell, and S.E. Jamieson, *Genetic susceptibility to otitis media in childhood*. Laryngoscope, 2012. **122**(3): p. 665-75.
186. Thomas, G., *Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(10): p. 753-66.
187. Raghavan, M., et al., *Analysis of the pH dependence of the neonatal Fc receptor/immunoglobulin G interaction using antibody and receptor variants*. Biochemistry, 1995. **34**(45): p. 14649-57.
188. Noel, J., D. Roux, and J. Pouyssegur, *Differential localization of Na⁺/H⁺ exchanger isoforms (NHE1 and NHE3) in polarized epithelial cell lines*. J Cell Sci, 1996. **109** (Pt 5): p. 929-39.
189. Tse, C.M., et al., *Functional characteristics of a cloned epithelial Na⁺/H⁺ exchanger (NHE3): resistance to amiloride and inhibition by protein kinase C*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(19): p. 9110-4.

190. Strobel, S. and A.M. Mowat, *Immune responses to dietary antigens: oral tolerance*. Immunology today, 1998. **19**(4): p. 173-81.
191. Lee, A.R., et al., *Living with coeliac disease: survey results from the U.S.A.* J Hum Nutr Diet, 2012. **25**(3): p. 233-8.
192. Baecher-Allan, C., et al., *CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1245-53.
193. Dieckmann, D., et al., *Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood*. J Exp Med, 2001. **193**(11): p. 1303-10.
194. Jonuleit, H., et al., *Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood*. J Exp Med, 2001. **193**(11): p. 1285-94.
195. Levings, M.K., R. Sangregorio, and M.G. Roncarolo, *Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function*. J Exp Med, 2001. **193**(11): p. 1295-302.
196. Beyer, K., et al., *Human milk-specific mucosal lymphocytes of the gastrointestinal tract display a TH2 cytokine profile*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **109**(4): p. 707-13.
197. Karlsson, M.R., J. Rugtveit, and P. Brandtzaeg, *Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy*. J Exp Med, 2004. **199**(12): p. 1679-88.
198. Verhasselt, V., *Neonatal tolerance under breastfeeding influence*. Current opinion in immunology, 2010. **22**(5): p. 623-30.
199. Weiner, H.L., et al., *Oral tolerance*. Immunol Rev, 2011. **241**(1): p. 241-59.
200. Pabst, O. and A.M. Mowat, *Oral tolerance to food protein*. Mucosal Immunol, 2012. **5**(3): p. 232-9.
201. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annual review of immunology, 2003. **21**: p. 685-711.
202. Sun, J.B., J. Holmgren, and C. Czerkinsky, *Cholera toxin B subunit: an efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 10795-9.

203. Sun, J.B., et al., *Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by feeding myelin basic protein conjugated to cholera toxin B subunit*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(14): p. 7196-201.
204. Bergerot, I., et al., *A cholera toxoid-insulin conjugate as an oral vaccine against spontaneous autoimmune diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4610-4.
205. Rask, C., et al., *Prolonged oral treatment with low doses of allergen conjugated to cholera toxin B subunit suppresses immunoglobulin E antibody responses in sensitized mice*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(7): p. 1024-32.
206. Phipps, P.A., et al., *Prevention of mucosally induced uveitis with a HSP60-derived peptide linked to cholera toxin B subunit*. Eur J Immunol, 2003. **33**(1): p. 224-32.
207. Doherty, G.J. and H.T. McMahon, *Mechanisms of endocytosis*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 857-902.
208. Progida, C., et al., *Rab7b controls trafficking from endosomes to the TGN*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 9): p. 1480-91.
209. Keech, C., et al., *Immune Tolerance Induced By Peptide Immunotherapy in An HLA Dq2-Dependent Mouse Model of Gluten Immunity*. Gastroenterology, 2009. **136**(5): p. A-57, Supplement 1.
210. Brown, G., et al., *A Phase I Study to Determine Safety, Tolerability and Bioactivity of Nexvax2® in HLA DQ2+ Volunteers With Celiac Disease Following a Long-Term, Strict Gluten-Free Diet* Gastroenterology, 2011. **140**(5): p. S-437-S-438.

7.5 Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

7.6 Danksagung

Meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. K.-P. Zimmer danke ich dafür, dass er mir die Promotion ermöglicht hat. Ich bedanke mich für die Bereitstellung einer Fragestellung, die Überlassung von Material und Gerätschaften sowie die Beratung während der Durchführung der Versuche. Prof. Zimmer hat sich immer Zeit für mich genommen und mich äußerst großzügig gefördert.

Ich bedanke mich bei meiner Zweitbetreuerin Frau Prof. Dr. S. Rudloff für die vielen Ratschläge zur Methodik der Versuche, die konstruktive Diskussion der Ergebnisse und die Durchsicht der Arbeit.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern der Forschungsgruppe für die gute Aufnahme ins Team bedanken. Bei Frau B. Goritzka und Frau L. Thiessen bedanke ich mich für eine ausführliche methodische Einarbeitung, die kollegiale Atmosphäre und die aktive Unterstützung bei der Durchführung der letzten Versuche in der Endphase des Projekts. Ich danke Frau N. Metz und Frau B. Walber für die zuverlässige Vorbereitung vieler meiner Experimente. Frau T. Weidenhausen danke ich für die Hilfe bei der Beantragung des Ethikvotums. Herr C. Zimmermann bin ich sehr dankbar für seine geduldige und hilfsbereite Art bei der Diskussion methodischer und immunologischer Fragestellungen, sowie das Korrekturlesen der Arbeit.

Besonderer Dank gilt Herr Prof. Dr. K.-M. Keller und Herr Dr. P. Lauenstein. Innerhalb kürzester Zeit stellten sie mir das Probenmaterial zur Verfügung, ohne welches das Projekt so nicht durchführbar gewesen wäre. Unbekannterweise möchte ich damit auch allen Patienten bzw. deren Sorgeberechtigten danken, die das Probenmaterial zu Forschungszwecken freigegeben haben.

Bei Dr. J. Herrmann bedanke ich mich für die statistische Beratung.

Ausgesprochen dankbar bin ich meiner Frau Hanna für ihre Geduld und Unterstützung während meiner gesamten Tätigkeit als Doktorand.