Wertigkeit von A1- und A2-Antikörpern gegen ß-Casein beim Typ 1-Diabetes mellitus: Eine prospektive Familienstudie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Silvia Seebaum
aus Hamburg

Gießen 1998

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik III und Poliklinik
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Drs. h. c. Federlin
Gutachter: Prof. Dr. Bein

Tag der Disputation: 29.09.1998

“If a man will begin with certainties,
he shall end in doubts;
but if he will be content to begin with doubts,
he shall end in certainties.“

(Francis Bacon)

Meinen Eltern in Liebe
und Dankbarkeit gewidmet

1. EINLEITUNG 7

1.1 Ätiologie des Typ 1-Diabetes mellitus 7

1.2 Genetik des Typ 1-Diabetes mellitus 8

1.3 Immunologische Marker des Typ 1-Diabetes mellitus 10

1.3.1 Inselzellantikörper (ICA) 10
1.3.2 Insulinautoantikörper (IAA) 11
1.3.3 Antikörper gegen das 64 KD Antigen (GAD) 12
1.3.4 Weitere Autoantikörper 13

1.4 Tiermodelle des Typ 1-Diabetes mellitus 13

1.5 Kuhmilch 14

1.5.1 Proteinzusammensetzung der Kuhmilch 14
1.5.2 Genetische Varianten des ß-Caseins in der Kuhmilch 15
1.5.3 Immunologische Bedeutung des Caseins 16

1.6 Antikörper gegen Kuhmilchproteine 16

1.6.1 Bovines Serumalbumin (BSA) 17
1.6.2 ß-Laktoglobulin 18
1.6.3 Casein 19

1.7 Kuhmilch und Typ 1-Diabetes mellitus 19

1.7.1 Kuhmilchkonsum 19
1.7.2 Stilldauer 20
1.7.3 Diät 21

1.8 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit 23

2. MATERIAL UND METHODEN 24

2.1 Familienstudie 24

2.1.1 Aufbau
24
2.1.2 Population 24
2.1.3 Kontrollpersonen 25
2.1.4 ICA und IAA 26

2.2 Material 26

2.2.1 Puffer und Substratlösungen 26
2.2.2 Chemikalien und Reagenzien 27
2.2.3 Material und Geräte 29

2.3 ELISA 31

2.3.1 Testprinzip 31
2.3.2 ß-Casein A1- und A2-ELISA 33
2.3.3 Standardkurve 36

2.4 Statistische Methoden 37

2.4.1 Statistische Auswertung 37
2.4.2 Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizient 38

3. ERGEBNISSE 39

3.1 Deskriptive Statistik 39

3.1.1 ß-Casein A1-Antikörper bei Typ 1-Diabetikern 39

3.1.1.1 Alter und Geschlecht 39
3.1.1.2 Manifestationsalter 40
3.1.1.3 Diabetesdauer 41
3.1.1.4 ICA und IAA 41

3.1.2 ß-Casein A1-Antikörper bei Geschwistern der Typ 1-Diabetiker 43

3.1.2.1 Alter und Geschlecht 43
3.1.2.2 ICA und IAA 44

3.1.3 ß-Casein A1-Antikörper bei Eltern der Typ 1-Diabetiker 45

3.1.3.1 Alter und Geschlecht 45
3.1.3.2 ICA und IAA 46

3.1.4 ß-Casein A1-Antikörper bei Kontrollpersonen 47

3.1.4.1 Alter und Geschlecht 47

3.1.5 ß-Casein A2-Antikörper bei Typ 1-Diabetikern 48

3.1.5.1 Alter und Geschlecht 48
3.1.5.2 Manifestationsalter 49
3.1.5.3 Diabetesdauer 50
3.1.5.4 ICA und IAA 50

3.1.6 ß-Casein A2-Antikörper bei Geschwistern der Typ 1-Diabetiker 52

3.1.6.1 Alter und Geschlecht 52
3.1.6.2 ICA und IAA 53

3.1.7 ß-Casein A2-Antikörper bei Eltern der Typ 1-Diabetiker 54

3.1.7.1 Alter und Geschlecht 54
3.1.7.2 ICA und IAA 55

3.1.8 ß-Casein A2-Antikörper bei Kontrollpersonen 56

3.1.8.1 Alter und Geschlecht 56

3.2 Inferenzstatistik 57

3.2.1 Vergleichende Darstellung der ß-Casein A1-Antikörper 57

3.2.1.1 Typ 1-Diabetiker und ihre Geschwister 57
3.2.1.2 Typ 1-Diabetiker und ihre Eltern 59
3.2.1.3 Typ 1-Diabetiker und Kontrollpersonen 60
3.2.1.4 Geschwister und ihre Eltern 62
3.2.1.5 Geschwister und Kontrollpersonen 63
3.2.1.6 Eltern und Kontrollpersonen 64

3.2.2 Vergleichende Darstellung der ß-Casein A2-Antikörper 66

3.2.2.1 Typ 1-Diabetiker und ihre Geschwister 66
3.2.2.2 Typ 1-Diabetiker und ihre Eltern 67
3.2.2.3 Typ 1-Diabetiker und Kontrollpersonen 68
3.2.2.4 Geschwister und ihre Eltern 70
3.2.2.5 Geschwister und Kontrollpersonen 70
3.2.2.6 Eltern und Kontrollpersonen 72

3.2.3 Unterschiedliche Bindung der Seren an die A1- oder A2-Variante des ß-Caseins 74

4. DISKUSSION 75

4.1 ELISA zum Nachweis von ß-Casein Antikörpern 75

4.2 ß-Casein A1- und A2-Antikörper 77

4.3 Unterschiedliche Bindung der Seren an die A1- oder A2-Variante des ß-Caseins 81

4.4 Mögliche pathogenetische Bedeutung von ß-Casein A1 im Zusammenhang mit dem Typ 1-Diabetes mellitus 85

5. ZUSAMMENFASSUNG 87

6. LITERATUR 90

7. ANHANG 117

Danksagung 117
Lebenslauf 118

ABKÜRZUNGEN

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

1. EINLEITUNG

1.1 Ätiologie des Typ 1-Diabetes mellitus

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

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

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

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

1.2 Genetik des Typ 1-Diabetes mellitus

Die Empfänglichkeit für den insulinpflichtigen Diabetes mellitus ist an bestimmte Gene in der HLA-Region des kurzen Arms von Chromosom 6 gekoppelt.
Die Bedeutung genetischer Faktoren beim Typ 1-Diabetes ergibt sich aus einer Konkordanzrate von 30-40 % bei eineiigen Zwillingen (*Barnett et al. 1981*). Das Erkrankungsrisiko für Geschwister eines Typ 1-Diabetikers ist bei HLA-identischen Geschwistern 15-25 % (*Deschamps et al. 1984*), während HLA-verschiedene Geschwister kaum ein erhöhtes Risiko haben, an einem Typ 1-Diabetes zu erkranken (*Tarn et al. 1988*).
Mitte der 70-ger Jahre wurden zunächst die HLA-Klasse I-Antigene B8 und B15 mit dem Diabetes assoziiert (*Singal et al. 1973, Nerup et al. 1974*). Spätere Untersuchungen zeigten eine wesentlich stärkere Korrelation des Typ 1-Diabetes mit dem DR-Locus der HLA-Klasse II-Antigene (*Platz et al. 1981*). In 90-95 % der Fälle wurden bei Diabetikern HLA-DR3 und- / oder- DR4 gefunden (*Wolf et al. 1983*). In der Normalbevölkerung wurden diese HLA-Antigene in weniger als 40 % der Fälle nachgewiesen (*Thomson et al. 1989*). Eine schwächere positive Assoziation des insulinpflichtigen Diabetes mellitus mit den HLA-Merkmalen DR1, DR6 und DR8 fanden Awata und Mitarbeiter (*Awata et al. 1990*).
Im Gegensatz dazu sind das HLA-Antigen DR2 und in geringerem Ausmaß auch HLA-DR5 nicht bzw. in geringerer Frequenz bei Diabetikern anzutreffen und scheinen einen Schutz gegenüber der Erkrankung zu vermitteln (*Platz et al. 1981, Thomson et al. 1988*).
Durch weitere Differenzierung der HLA-Region mit Hilfe der Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP) konnte ein weiteres

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

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

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

1.3 Immunologische Marker des Typ 1-Diabetes mellitus

1.3.1 Inselzellantikörper (ICA)

Inselzellantikörper (ICA) sind erstmals 1974 von Bottazzo und Mitarbeitern beschrieben worden (*Bottazzo et al. 1974*). Zytoplasmatische ICA sind organspezifische Antikörper der Klasse IgG, die mit allen endokrinen Inselzellen des Pankreas reagieren und nicht B-Zell spezifisch sind (*Ziegler et al. 1990*).
Verschiedene Familienstudien zeigen, daß bei 65-85 % der frisch manifestierten Typ 1-Diabetiker (*Kolb 1991*) sowie bei 1-7 % der Familienangehörigen 1. Grades (*Federlin et al. 1987, Becker et al. 1990*) und bei nur etwa 0.5 % der Kontrollpopulation Inselzellantikörper nachweisbar sind (*Irvine et al. 1977*). Im weiteren Verlauf der Erkrankung sinkt die Prävalenz der ICA-positiven Diabetiker jedoch auf weniger als 20 % ab. ICA sind bei beiden Geschlechtern gleich häufig und unabhängig vom Alter anzutreffen (*Lendrum et al. 1976*).
Antikörper-positive Personen tragen im Vergleich zu Antikörper-negativen Personen ein 50-200 -faches höheres Risiko, einen Diabetes zu entwickeln, so daß das Vorliegen von ICA als ein potentieller Risikofaktor angesehen werden muß (*Lipton et al. 1989*).
Mit Hilfe eines indirekten Immunfluoreszenztests gelang Lernmark und Mitarbeitern der Nachweis von Inselzelloberflächen-Antikörpern (ICSA) (*Lernmark et al. 1987*). Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte die Spezifität der ICSA für B-Zellen nachgewiesen werden (*van de Winkel et al. 1982*). Bei frisch manifestierten Diabetikern waren ICSA in bis zu 67 % der Fälle nachweisbar, wohingegen nur 2-3 % der Kontrollpersonen ICSA-positiv waren (*Freedmann et al. 1979*).
Ein Teil der ICA fixiert im indirekten Fluoreszenztest Komplement, sogenannte CF (complement fixing) -ICA. Es handelt sich dabei offenbar nicht um eine besondere Variante, da in der Regel nur ICA aus hochtitrigen Patientenseren im Test Komplement fixieren. Vielmehr ist die Komplementfixierung Ausdruck hoher zytoplasmatischer ICA-Titer. Bottazzo zeigte 1980 eine Komplementfixierung bei 50 % der ICA-positiven Seren (*Bottazzo et al. 1980*).
In einer Studie von Johnston und Mitarbeitern an 29 eineiigen Zwillingen, von denen der eine gesund und der andere an Diabetes mellitus erkrankt war, betrug die

Sensitivität für IgG-ICA 100 %, für CF-ICA 88 % und die Spezifität lag für IgG-ICA bei 84 % , für CF-ICA bei 100 % (*Johnston et al. 1989*). Der positive Vorhersagewert für die Entwicklung eines Diabetes mellitus betrug für IgG-ICA 77 % und für CF-ICA 100 %. Auch Karjalainen kam ein Jahr später in einer Studie an finnischen Kindern zu ähnlichen Ergebnissen. Er zeigte jedoch, daß nur hohe (> 18 JDF Einheiten) und persistierende ICA-Titer, insbesondere wenn sie Komplement-fixierend waren, einen Diabetes mellitus bei gesunden Kindern voraussagen können (*Karjalainen 1990*).
Durch die Bemühungen der letzten Jahre, die ICA-Assays durch internationale Workshops zu standardisieren (*Bottazzo et al. 1986, Bonifacio et al. 1987, Boitard et al. 1988*), und somit die Reproduzierbarkeit, Spezifität und Sensibilität zu erhöhen, sowie mit den Ergebnissen aus zahlreich durchgeführten Familien- und Zwillingsstudien zählen Inselzellantikörper (IgG-ICA und auch CF-ICA) zu anerkannten Markern der prädiabetischen Phase mit bewiesenem hohem positivem Vorhersagewert.

1.3.2 Insulinautoantikörper (IAA)

Antikörper gegen Insulin (Insulinautoantikörper, IAA) wurden erstmals 1983 von Palmer und Mitarbeitern bei frisch manifestierten Typ 1-Diabetikern ohne eine vorherige Insulintherapie nachgewiesen (*Palmer et al. 1983*). Die Prävalenz bei Manifestation liegt zwischen 20 - 50 % im Gegensatz zu 0.1 - 5 % bei Normalpersonen (*Kolb 1991*). Die zum Teil voneinander abweichenden Ergebnisse lassen sich im wesentlichen auf die zwei unterschiedlichen Testverfahren zur Messung von IAA zurückführen. Studien der letzten Jahre, in denen beide Testmethoden verglichen wurden, zeigten eine Überlegenheit des RIA (Radio Immuno Assay) gegenüber des ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (*Levy-Marshal et al. 1991, Greenbaum et al. 1992*). In Familienstudien konnten bei 15 % der Geschwister sowie bei 8 % der Eltern von Typ 1-Diabetikern IAA nachgewiesen werden (*Federlin et al. 1987, Kuglin et al. 1989*).
Es werden IAA der Klasse IgM und IgG unterschieden (*Dean et al. 1986*). IgM-IAA treten vorübergehend nach einer Reihe von Virusinfektionen auf und sind daher kaum als krankheitsspezifisch anzusehen (*Bodansky et al. 1986*).

Insulinautoantikörper sind invers korreliert zum Alter, d. h. sie wurden in weitaus höheren Konzentrationen bei Kindern unter 3 Jahren als bei älteren Kindern und Erwachsenen gefunden (*Vardi et al. 1988*).
Untersuchungen von Eisenbarth und Mitarbeitern zeigten eine Korrelation der IAA-Titer mit der Progression des Diabetes (*Eisenbarth et al. 1992*). IAA in Kombination mit ICA und CF-ICA sind als größere Risikofaktoren zu werten, einen Typ 1-Diabetes zu entwickeln, als das Vorhandensein eines einzelnen Antikörpers (*Ziegler et al. 1989, Landin-Olsson et al. 1992*). Bei Vorliegen der genetischen Risikokonstellation bezüglich der HLA-Antigene, insbesondere HLA-DR4, entwickeln Verwandte ersten Grades von Diabetikern signifikant häufiger IAA als Personen, die diese Merkmale nicht tragen (*Kuglin et al. 1989, Ziegler et al. 1991*).

1.3.3 Antikörper gegen das 64 KD-Antigen (GAD)

1982 konnte durch Immunpräzipitation erstmals ein Inselzellprotein mit einer Molekularmasse von 64 KD als primäres Zielantigen pankreatischer Inselzellen nachgewiesen werden (*Baekkeskov et al. 1982*). Dieses 64 KD-Autoantigen wurde 1990 von Baekkeskov und Mitarbeitern als das Enzym Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD), welches den Neurotransmitter γ-Aminobuttersäure (GABA) synthetisiert, identifiziert (*Baekkeskov et al. 1990*).
Es existieren zwei Isoformen des Enzyms mit der Größe 65 KD und 67 KD (*Erlander et al. 1991*), wobei sich jedoch die Hauptimmunantwort gegen 65 KD richtet (*Hagopian et al. 1993*).
Antikörper gegen das 64 KD-Antigen sind sogar schon bis zu acht Jahre vor der Manifestation eines Diabetes Typ 1 nachzuweisen (*Baekkeskov et al. 1987*) und bei frisch manifestierten Diabetikern in 84 % der Fälle vorhanden, so daß sie als ein sehr früher und nützlicher prädiktiver Marker hinsichtlich der Entstehung eines Diabetes mellitus zu werten sind (*Atkinson et al. 1990*). Vor wenigen Jahren konnten Seißler und Mitarbeiter in einer ICA-positiven Population eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von 64 KD-Autoantikörpern, CF-ICA und IAA mit HLA-DR4 und der Abwesenheit von Asparaginsäure an Position 57 der $DQ_{ß}$-Kette zeigen. Im Gegensatz zu ICA-Antikörpern, deren Konzentration nach Diabetesmanifestation abnimmt, persistieren 64 KD-Antikörper über Jahre (*Seißler et al. 1992*). Weiterhin

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

1.3.4 Weitere Autoantikörper

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

1.4 Tiermodelle des Typ 1-Diabetes mellitus

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

HLA-DQß non-Asp an Position 57) als auch die Abwesenheit von I-E, was dem humanen DR entspricht (*Hattori et al. 1986*), sind notwendig, um einen autoimmunen Diabetes entstehen zu lassen (*Kikutani et al. 1992*).
Trotz der stark ingezüchteten Linien liegt die Diabetesinzidenz weit unter 100 %. Umweltfaktoren wie Streß (*Carter et al. 1987*), Viren (*Like et al. 1991*), Temperatur (*Williams et al. 1990*) und insbesondere Diäten (*Elliott et al. 1984, 1988, Coleman et al. 1990*) modulieren das Erkrankungsrisiko und den Erkrankungszeitpunkt. Auch hier sind in den letzten Jahren verschiedene Nahrungsbestandteile, wie z. B. die Kuhmilch, Schwerpunkt des Interesses geworden.

1.5 Kuhmilch

1.5.1 Proteinzusammensetzung der Kuhmilch

Die Proteine der Kuhmilch setzen sich aus Caseinen und Molkenproteinen zusammen. Der Anteil der Caseine am Gesamt-Proteingehalt der Kuhmilch beträgt etwa 80 %, der an Molkenproteinen etwa 20 %.
Seit 1952 ist bekannt, daß bei den einzelnen Caseinen genetische Varianten vorliegen, die sich in der Aminosäuresequenz unterscheiden.
Die Synthese der Milchproteine findet an den Polyribosomen des endoplasmatischen Retikulums der Milchdrüse statt. Eine Ausnahme bilden die aus dem Blut übertretenden Serumalbumine und Immunglobuline der Klasse IgG. Die nachstehende Tabelle zeigt die Charakteristika der einzelnen Eiweiße auf (*Kielwein 1994*), von denen vor allem den ß-Caseinen hinsichtlich der Diabetes mellitus-Entstehung eine besondere Bedeutung zuzukommen scheint.

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

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

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

1.5.2 Genetische Varianten des ß-Caseins in der Kuhmilch

Die verschiedenen genetischen Varianten des Caseins lassen sich durch isoelektrische Fokussierung voneinander trennen (*Bovenhuis et al. 1989*). Eine gebräuchliche Methode, die Aminosäuresequenzen des ß-Caseins zu analysieren, ist die PCR (*Lindersson et al. 1995*). Es sind bisher mehrere Varianten des ß-Caseins entdeckt worden, wobei laut COGNOSAG Workshop-Report (*Larsen et al. 1992*) die A1-, A2-, A3-, A4-, B-, D-, E-, C-, A3M- und die B2-Varianten unterschieden werden. Ein Jahr später identifiziert Lien die A5-Variante und Visser 1995 das ß-Casein F-5P (*Lien et al. 1993, Visser et al. 1995*).
Die beiden häufigsten genetischen Varianten des ß-Caseins sind die A1- und A2-Varianten (*Van Eenennaam et al. 1991*). ß-Casein A1 und A2 unterscheiden sich nur in einer einzigen Aminosäure an Position 67, wobei A1 Histidin und A2 Prolin enthält (*Eigel et al. 1984*).

1.5.3 Immunologische Bedeutung des Caseins

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

1.6 Antikörper gegen Kuhmilchproteine

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

wobei das Maximum für IgA-Antikörper bei 28 Monaten und das für IgM-Antikörper bei 6 Monaten liegt (*Taino et al. 1988*).
Auf einen Zusammenhang von Kuhmilchantikörpern und Typ 1-Diabetes weisen verschiedene Arbeitsgruppen hin. So haben z. B. Savilahti und Mitarbeiter in mehreren Studien bei frisch manifestierten Diabetikern signifikant höhere Konzentrationen von IgA- und IgG-Antikörpern gegen Kuhmilch nachgewiesen als bei Kontrollen (*Savilahti et al. 1988, 1993*). Auch andere Arbeitsgruppen fanden IgA-Antikörper erhöht. Die Konzentration dieser Antikörper ist negativ zur Stilldauer und positiv zum Kuhmilchkonsum korreliert. Der Antikörpertiter war signifikant assoziiert mit dem Risiko, einen Typ 1-Diabetes zu entwickeln (*Dahlquist et al. 1992, Virtanen et al. 1994*).

1.6.1 Bovines Serumalbumin (BSA)

Serumkonzentrationen von BSA-Antikörpern in diabetischen Tiermodellen (NOD-Maus und BB-Ratte) waren signifikant höher als in Kontrolltieren (*Beppu et al. 1987, Scott et al. 1989*). Weiterhin konnte im Tierversuch ein Betazell-Oberflächenprotein (p69) aufgezeigt werden, an das die BSA-Antikörper binden. Ein Vergleich der Primärstruktur von bovinem Serumalbumin mit der DR- und DQ-ß-Kette ließen eine Region der Übereinstimmung zwischen den Aminosäuren 157-175 der MHC-Klasse II-Antigene erkennen (*Glerum et al. 1989*).
Karjalainen und Mitarbeiter führten Immuno-Assays und Western-Blots zur Erfassung von BSA-Antikörpern bei 142 Kindern mit Typ 1-Diabetes durch. Alle Diabetespatienten hatten erhöhte Serumkonzentrationen von IgG-Antikörpern gegen BSA, jedoch nicht von Antikörpern gegen andere Milchproteine. Somit konnte hier von einer spezifischen Immunantwort ausgegangen werden. Die Antikörperkonzentration sank nach der Diagnosestellung ab und erreichte innerhalb von 1-2 Jahren Normalspiegel. Ein Großteil der Antikörper war gegen ABBOS, eine bestimmte Sequenz des BSA-Moleküls bestehend aus 17 Aminosäuren von Position 152-168, gerichtet. Antikörper gegen dieses Peptid reagierten mit p69 und könnten so an der Entwicklung der Inselzelldysfunktion bei Typ 1-Diabetikern beteiligt sein (*Karjalainen et al. 1992*). Auch andere Arbeitsgruppen haben ähnliche signifikante Ergebnisse bei finnischen, französischen und brasilianischen diabetischen Kindern

gefunden, jedoch nicht mit einer so hohen Frequenz wie Karjalainen (*Saukkonen et al. 1994, Levy-Marchal et al. 1995, Pardini et al. 1996*). Krokowski und Mitarbeiter wiesen auch bei Patienten, deren Typ 1-Diabetes sich erst im Erwachsenenalter manifestierte, höhere Antikörper-Titer gegen BSA nach, insbesondere wenn die Patienten HLA-DR3 positiv waren (*Krokowski et al. 1995*).
Dennoch sind die Daten in der Literatur kontrovers. So konnten Atkinson und Mitarbeiter keinen Unterschied bezüglich der Prävalenz von Antikörpern gegen bovines Serumalbumin bei Diabetikern und Kontrollpersonen finden (*Atkinson et al. 1993*). Die Diskrepanzen könnten zum einen auf verschiedenen Nachweismethoden (ELISA, IFT, RIA) beruhen, wobei jede Assay-Technik eine andere Teilmenge von BSA-Antikörpern mit einer geringen IgG- oder IgA-Überlappung nachweist (*Karjalainen et al. 1992*). Zum anderen könnten auch Unterschiede von Alter und Dauer des Diabetes, aber auch die verschiedenen Nationalitäten eine Mitursache sein (*Pardini et al. 1996*). Die Bedeutsamkeit von BSA-Antikörpern in der prädiabetischen Phase ist letztendlich noch nicht geklärt.

1.6.2 ß-Laktoglobulin

IgG- (*Savilahti et al. 1993, Ahmed et al. 1997*) und IgA- (*Dahlquist et al. 1992*) Antikörper gegen ß-Laktoglobulin sind bei Diabetikern im Vergleich zu Kontrollpersonen in signifikant höheren Konzentrationen nachzuweisen, wobei die jüngsten Patientengruppen die höchsten Werte erreichen.
Bei kurzer Stilldauer und früher Einführung von Milchprodukten in die Säuglingsnahrung treten häufiger und in höheren Konzentrationen Antikörper gegen ß-Laktoglobulin auf, die mit einem erhöhten Risiko eines Typ 1-Diabetes assoziiert sind (*Dahlquist et al. 1992*).

1.6.3 Casein

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

1.7 Kuhmilch und Typ 1-Diabetes

1.7.1 Kuhmilchkonsum

Es ist eine enge Assoziation zwischen dem durchschnittlichen jährlichen Kuhmilchkonsum pro Person und der jährlichen Diabetesinzidenz bei Kindern im Alter von 0-14 Jahren in verschiedenen Ländern festgestellt worden. Die Korrelation zwischen Kuhmilchkonsum und Diabetesinzidenz beträgt 0.96, was einer linearen Regression entspricht. Eine Analyse der Daten zeigt, daß 94 % der geographischen Varianz der Inzidenz durch den unterschiedlichen Kuhmilchkonsum erklärt werden kann (*Dahl-Jorgensen et al. 1991*). Diese Ergebnisse konnten auch durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden (*Scott 1990, Muntoni et al. 1994*). So fanden Fava und Mitarbeiter den gleichen Zusammenhang zwischen Kuhmilchkonsum und Inzidenz des Typ 1-Diabetes für neun verschiedene Regionen innerhalb Italiens (*Fava et al. 1994*).
Die Diabetesinzidenz variiert geographisch sehr stark. So beträgt sie in Japan 0.6 Fälle pro 100.000 Personen und Jahr bei einem Kuhmilchkonsum von ca. 40 l / Person / Jahr, während Finnland die weltweit höchste Inzidenzrate mit 42.9 Fällen pro 100.000 Personen und Jahr bei einem Kuhmilchkonsum von ca. 225 l / Person / Jahr aufweist (*DERI Group 1988 , Green et al. 1992, Muntoni et al. 1994*).

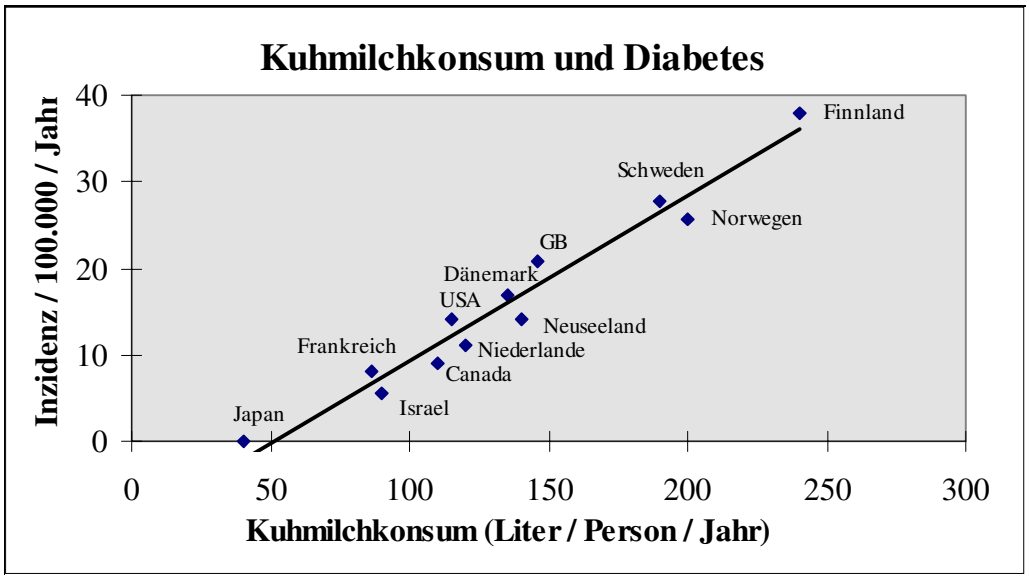

Abb. 1.1: Kuhmilchkonsum und Diabetesinzidenz in verschiedenen Ländern (Daten aus Scott 1990, Dahl-Jorgensen 1991, Muntoni 1994)

1.7.2 Stilldauer

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

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

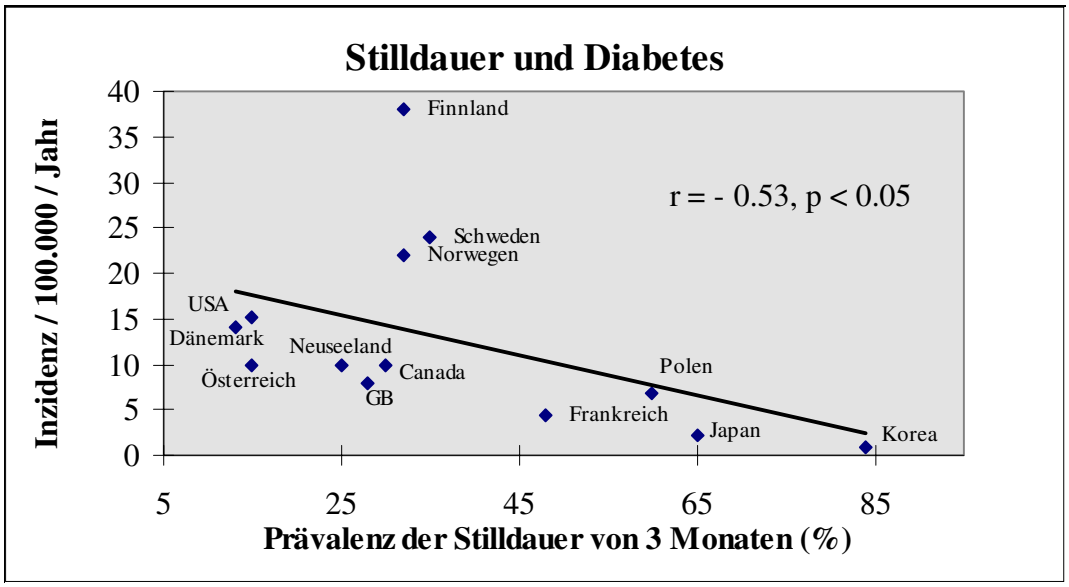

Abb. 1.2: Stilldauer und Diabetesinzidenz (Daten aus Scott 1990)

1.7.3 Diät

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

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

Diäten, die hydrolysiertes Casein als einzige Proteinquelle beinhalten, bewirkten eine drastische Senkung der Diabetesinzidenz. Dies trat aber nur ein, wenn die Diät vor dem 30. Lebenstag zugeführt wurde. Gleichzeitig wurde die Expression der MHC-Klasse I-Antigene auf den endokrinen Zellen des Pankreas reduziert. Ratten mit deutlicher Reduktion der Expression entwickelten keine Insulitis und keinen Diabetes. Andere Nahrungszusätze hingegen konnten die Diabetesinzidenz nicht beeinflussen (*Issa-Chergui et al. 1988, Hoorfar et al. 1991,1992, Li et al. 1995*).

Analog der Diät der BB-Ratten wurden entsprechende Ergebnisse bei NOD-Mäusen erzielt. Auch hier ließ sich mit hydrolysiertem Casein die Diabetesinzidenz deutlich verringern bzw. sogar komplett verhindern. Zusätzlich war der Schweregrad der

Insulitis geringer ausgeprägt bei den Mäusen, die an einem Diabetes erkrankt waren (*Coleman et al. 1990, Hoorfar et al. 1993, Hermitte et al. 1995*).
Interessanterweise entwickelten Mäuse, denen Casein von indischen Kühen (Bos indicus) zugeführt wurde, keinen Diabetes. Im Gegensatz dazu stieg die Diabetesinzidenz bei Verwendung von Casein europäischer Kühe (Bos taurus). Die zwei genetischen Varianten des ß-Caseins (A1 und A2) wurden in vergleichbaren Untersuchungen getestet, wobei nur die A1-Variante einen Diabetes mellitus verursachte, während die A2-Variante die Diabetesmanifestation verhinderte (*Elliott 1994*).

1.8 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

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

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

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

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

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Familienstudie

2.1.1 Aufbau

Die Grundlage der vorliegenden Arbeit bildeten Serumproben der 1985 begonnenen Gießen- / Bad Oeynhausen-Studie.
Es handelte sich hierbei um eine prospektive Familienstudie in Zusammenarbeit mit der Diabetesklinik Bad Oeynhausen und der III. Medizinischen und Poliklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Erforschung des insulinpflichtigen Diabetes mellitus. Neben der Untersuchung von organspezifischen Autoantikörpern gegen Parietalzellen, Nebenniere, Schilddrüse und antinukleären Antikörpern galt die Bedeutung vor allem der pankreasspezifischen Autoimmunität (*Federlin et al. 1987, Becker et al. 1990, 1991*).
Die Seren der an der Studie teilnehmenden Diabetiker und Verwandten ersten Grades wurden in halbjährlichen Abständen abgenommen. Die Vollblutproben wurden nach der Entnahme zentrifugiert und in mehreren Aliquots bei - 20 Grad Celsius konserviert. Zur Bestimmung von Meßwerten wurden jeweils nur geringe Mengen einer Serumprobe aufgetaut, um die Qualität der Proben möglichst wenig zu beeinträchtigen.
In dieser Arbeit wurden die Seren auf die Anwesenheit von Kuhmilchproteinen untersucht.

2.1.2 Population

Die Population setzte sich aus jeweils einem Typ 1-Diabetiker als Indexperson, dessen Eltern sowie mindestens einem Geschwisterteil im Alter unter 16 Jahren zusammen.
Insgesamt wurden die Seren von 1257 Personen (inklusive Kontrollpersonen, siehe 2.1.3) auf die Anwesenheit von ß-Casein-Antikörpern untersucht. Davon waren 287 Teilnehmer Typ 1-Diabetiker (140 männlich, 147 weiblich, Durchschnittsalter 16

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

Tab. 2.1: Altersverteilung der Studienteilnehmer und Kontrollpersonen

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

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

2.1.3 Kontrollpersonen

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

2.1.4 ICA und IAA

Alle in halbjährlichen Abständen eingehenden Proben der Gießen- / Bad Oeynhausen-Studie wurden mit der Immunfluoreszenztechnik auf Inselzellantikörper untersucht (*Becker et al. 1988, 1989*). Weiterhin wurden Insulinautoantikörper sowie Insulinantikörper der Klassen IgM und IgG mit Hilfe der ELISA-Technik bestimmt (*Kräuter et al. 1988, 1989, Schmelling et al. 1989*).
Die in dieser Arbeit verwendeten Werte für ICA und IAA wurden den vorgenannten Arbeiten entnommen.

2.2 Material

2.2.1 Puffer und Substratlösungen

Coatingpuffer

2.94 g $NaHCO_3$ + 1.59 g Na_2CO_3 in Aqua dest. auflösen
mit 1 mol Salzsäure auf pH 9.5 einstellen

ß-Casein A1- und A2-Stammlösung

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

Waschpuffer

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

Proben

Verdünnung des Serums 1 : 100 mit Waschpuffer

Zweiter Antikörper

Verdünnung des zweiten Antikörpers 1 : 1000 mit Waschpuffer

Diethanolaminpuffer

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

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

Substratpuffer

Substrat $C_6H_4NNa_2O_6P*6H_2O$ in einer Konzentration von 1 mg / ml in Diethanolaminpuffer auflösen

2.2.2 Chemikalien und Reagenzien

Natriumkarbonat (Na_2CO_3)

zur Analyse

Best.Nr.: 6392

Fa. Merck

Natriumhydrogenkarbonat ($NaHCO_3$)

zur Analyse

Best.Nr.: 6329

Fa. Merck

Aqua ad iniectabilia

1000 ml

Fa. B. Braun Melsungen AG

PBS-Phosphatpufferkonzentrat

pH 7.4 $\pm$ 0.1

Best.Nr.: 3613

Fa. Biologische Arbeitsgemeinschaft GmbH, Lich

Tween 20 Polyaethylenglycolsorbitanmonolaurat

Best.Nr.: 3472

Fa. Caesar & Loretz

Alkalische Phophatase konjugierter Anti-Human IgG-Antikörper

γ-Ketten-spezifisch, affinitätsgereingt, aus Kaninchen

Best.Nr.: 309055008

Fa. Dianova

4-Nitrophenylphosphatdinatriumsalz-Hexahydrat ($C_6H_4NNa_2O_6P*6H_2O$)

für biochemische Zwecke

Best.Nr.: 6850

Fa. Merck

Diethanolamin ($C_4H_{11}NO_2$)

zur Synthese

Best.Nr.: 803116

Fa. Merck-Schuchardt

Natriumazid (NaN_3)

reinst

Best.Nr.: 6688

Fa. Merck

Magnesiumchlorid ($MgCl_2*6H_2O$)

zur Analyse

Best.Nr.: 5833

Fa. Merck

Salzsäure (HCl)

1 mol / l

1 N Lösung

Best.Nr.: 9060

Fa. Merck

Natronlauge (NaOH)

3 N Lösung

Best.Nr.: 9913

Fa. Merck

ß-Casein A1 und A2

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

2.2.3 Material und Geräte

pH-Meter

Präzisions-pH-Meter

Fa. Wissenschaftl. Technische Werkstätten

Combitips (Eppendorf)

12.5 ml

Best.Nr. 146947805

Fa. Kalensee

Handdispenser (Eppendorf)

Eppendorf Multipipette

Typ 4780

Best.Nr.: 146947800

Fa. Kalensee

Pipettenspitzen blau

100-1000 µl

Best.Nr.: 210061

Fa. Müller-ratiolab

Pipettenspitzen gelb

10-100 µl

Best.Nr.: 210060

Fa. Müller-ratiolab

Pipettenspitzen weiß

0.5-200 µl

Best.Nr.: 77-898-C2

Fa. Titertek

Mikrotiterplatten 96K

F-Form, erhöhter Rand

Best.Nr.: 655101

Fa. Greiner

Röhrchen-Tubes

500 Stck.; 3.5 ml

Best.Nr.: 55484

Fa. Sarstedt

Bechergläser

verschiedene Größen

Fa. Braun

Laborrührer

Typ RM 18

IKA-Werk

Multipipette

2-200 µl; 8 Kanal

Fa. Titertek

Titertek Multiskan Plus ELISA Reader

Typ 311 AO

Serie 1122-032, EFLAB

Fa. Flow

2.3 ELISA

2.3.1 Testprinzip

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

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

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

ELISA Testprinzip

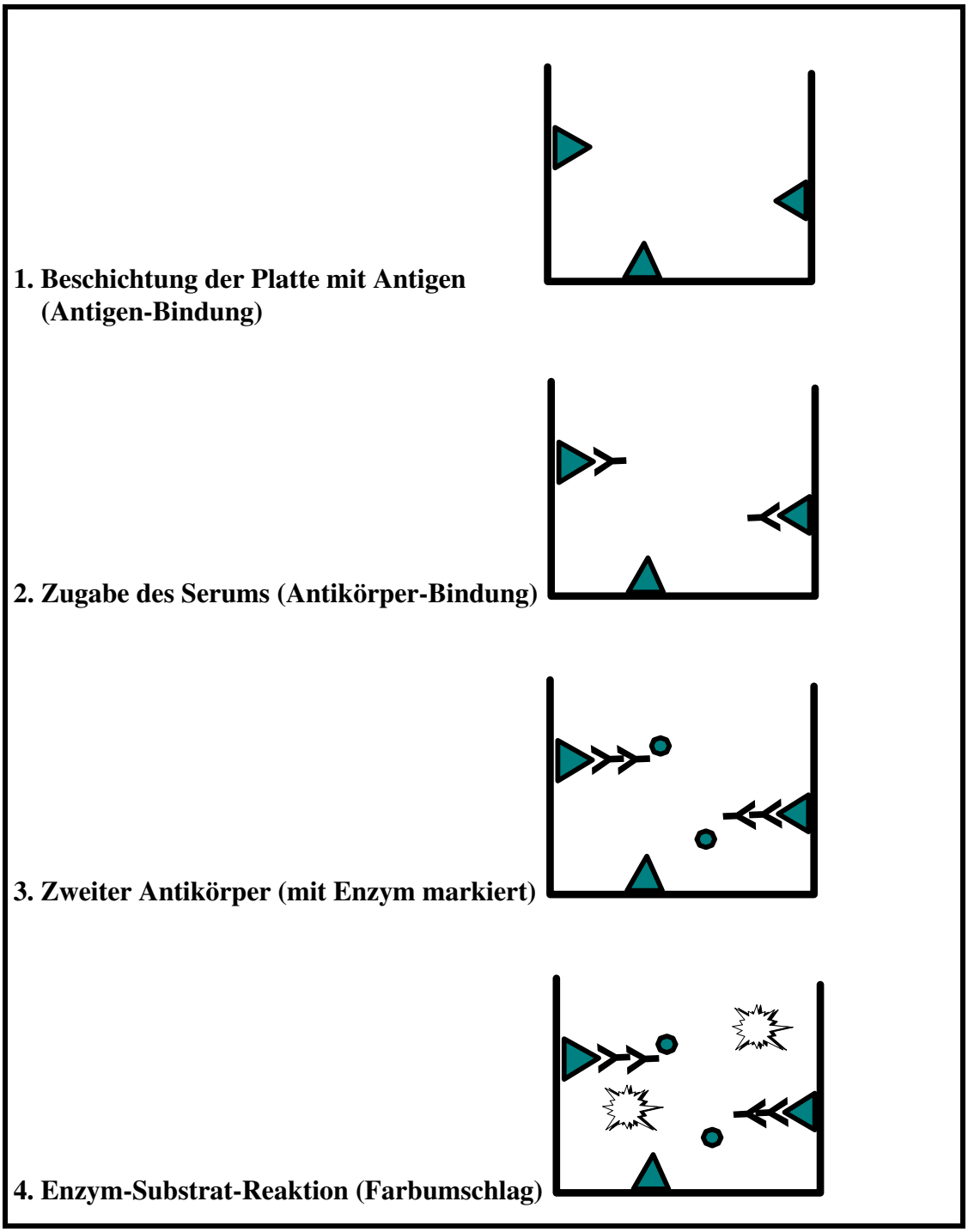

Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Testprinzips eines ELISA

2.3.2 ß-Casein A1- und A2-ELISA

Antikörper gegen die beiden häufigsten genetischen Varianten des ß-Caseins wurden mittels eines von Hermann E. Wasmuth bereits etablierten ELISA im Immunologischen Labor der Medizinischen Klinik III und Poliklinik bestimmt (*Disputationsarbeit Wasmuth, eingereicht*). In der folgenden Beschreibung wird die angewandte Testmethode dargestellt.
Zum Beschichten der Mikrotiterplatten wird ß-Casein A1 bzw. A2 mit einem frisch zubereiteten Coating-Puffer auf eine Konzentration von 10 µg / ml verdünnt. Da sich ß-Casein nur sehr schlecht in Aqua dest. auflöst, wird es für jeden Versuch neu in Coating-Puffer aufgelöst. Die Reihen 1,2,5,6,9 und 10 der Mikrotiterplatten werden mit je 100 µl der Verdünnung pro Vertiefung beschichtet. In die Reihen 3,4,7,8,11 und 12 werden je 100 µl Coating-Puffer ohne ß-Casein pro Vertiefung einpipettiert. Anschließend werden die Platten bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

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

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

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

= unbeschichtete Reihen

Abb. 2.2: Pipettierschema des ß-Casein ELISA
Nach Abschütten der Überstände erfolgt ein dreifaches Waschen der Platten mit 200 µl Waschpuffer pro Vertiefung. Anschließend werden die zu untersuchenden

Serumproben (100 µl / well) in einer Verdünnung von 1:100 in PBS / Tween 20 auf die Mikrotiterplatte aufgetragen.
Die Serumproben werden in jeweils vier nebeneinander liegenden Wells der Platten pipettiert, so daß spezifische und unspezifische Bindung nebeneinander zu sehen sind. Es werden jeweils Doppelbestimmungen der spezifischen und der unspezifischen, d. h. der durch die Affinität von Serum an die Mikrotiterplatte hervorgerufenen Hintergrundbindung, durchgeführt. Aus beiden Doppelbestimmungen wird jeweils der Mittelwert gebildet. Die unspezifische Hintergrundbindung wird dann von der spezifischen Bindung als absoluter Wert subtrahiert, um nur die tatsächlichen Antikörperspiegel im Serum der Probanden zu beurteilen. Diese werden dann als Δ Units / ml wiedergegeben.
Nach einer Inkubation der Seren von einer Stunde bei 37°C und darauffolgenden dreimaligem Waschen mit PBS / Tween 20 werden die Antikörper mit einem zweiten Antikörper (mit alkalischer Phosphatase konjugierter anti-human IgG-Antikörper aus Kaninchen) in einer Verdünnung von 1:1000 nachgewiesen. Die Inkubationszeit des zweiten Antikörpers beträgt ebenfalls eine Stunde bei 37°C.
Vor der abschließenden Enzymreaktion wird erneut dreimal für je 2 Minuten gewaschen. Es wird zunächst das Substrat NPD in einer Konzentration von 1 mg / ml in Substratpuffer hinzugegeben. Der Substratpuffer wird sofort nach Fertigstellung mit 150 µl / well auf die Platte pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit erfolgt der Stop der Enzymreaktion mit 50 µl 1 molarer Natronlauge.
Abschließend wird von den einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm die Extinktion gemessen.

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

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

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

2.3.3 Standardkurve

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

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

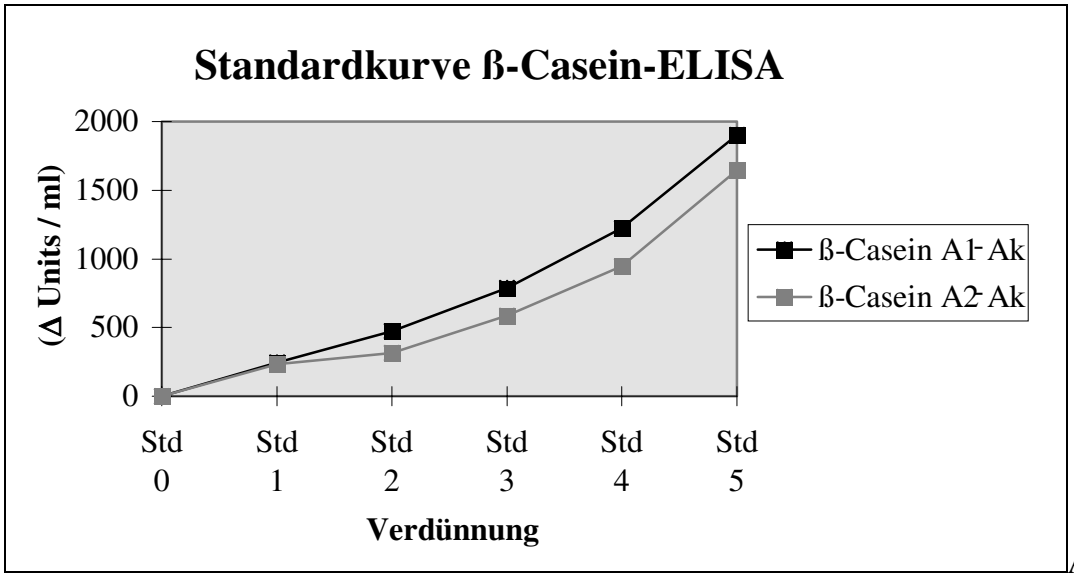

Abb. 2.3.: Standardkurve der ß-Casein A1- und A2-Antikörper

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

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

2.4 Statistische Methoden

2.4.1 Statistische Auswertung

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

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

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

Zusammenhänge zwischen qualitativen Merkmalen wurden durch Kontingenztafeln dargestellt und mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests bewertet.
Unterschiede zwischen den Verwandtschaftsgraden wurden altersbereinigt mit Hilfe der einfachen Covarianzanalyse getestet.

2.4.2 Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizient

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

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

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

3. ERGEBNISSE

3.1 Deskriptive Statistik

3.1.1 ß-Casein A1-Antikörper bei Typ 1-Diabetikern

3.1.1.1 Alter und Geschlecht

ß-Casein A1-Antikörper wurden bei 287 Typ 1-Diabetikern mit Hilfe des ELISA nachgewiesen. Es besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter der Typ 1-Diabetiker und den Titern der Casein A1-Antikörper (p = 0.001, r = - 0.1881). Je jünger die Typ 1-Diabetiker sind, desto höher sind die Antikörperkonzentrationen. Zur Veranschaulichung beschreibt folgende Tabelle (Tab. 3.1) und Graphik (Abb. 3.1) den Zusammenhang.

Tab. 3.1 : ß-Casein A1-Antikörperkonzentrationen (Mittelwerte) bei Typ 1-Diabetikern in verschiedenen Altersklassen.

Typ 1-Diabetiker	Alter in Jahren					
	1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	>50
Casein A1 =	1421	1266	1052	940	1218	926
SEM (+/-) =	152	74	352	757	635	600
n =	45	214	17	3	6	2

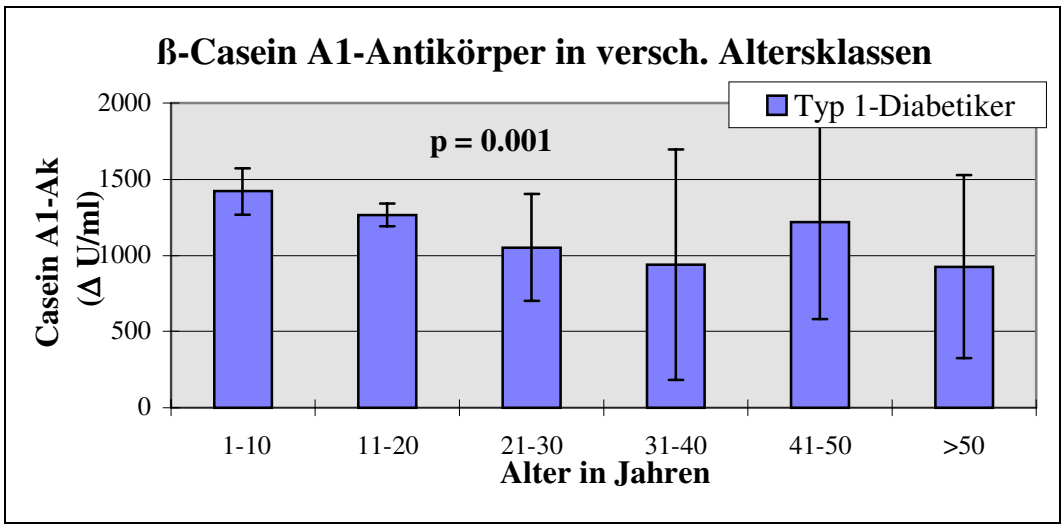

Abb. 3.1 : ß-Casein A1-Antikörper bei Typ 1-Diabetikern in verschiedenen Altersklassen. Angegeben sind Mittelwerte und SEM, p = 0.001.

Die Konzentration der ß-Casein A1-Antikörper war nicht mit dem Geschlecht der Patienten assoziiert (p = 0.754).

3.1.1.2 Manifestationsalter

Eine stark ausgeprägte Abhängigkeit ließ sich zwischen dem Manifestationsalter der Typ 1-Diabetiker und der ß-Casein A1-Antikörperkonzentration nachweisen. Antikörper gegen das Casein A1 zeigten sich bei den Diabetikern mit einem frühen Manifestationsalter in weitaus höheren Konzentrationen als bei den später Erkrankten (p = 0.006, r = -0.164, Abb. 3.5).

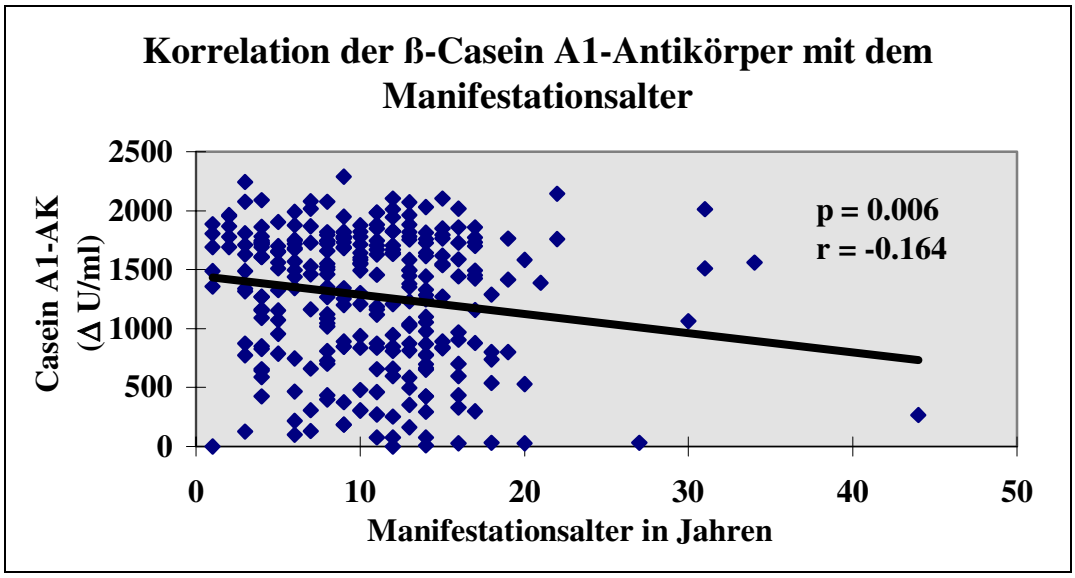

Abb. 3.2 : Korrelation der ß-Casein A1-Antikörper mit dem Manifestationsalter. Angegeben sind Einzelwerte und die Korrelationsgerade, p = 0.006.

3.1.1.3 Diabetesdauer

Die Diabetesdauer steht in keinem statistisch signifikanten Zusammenhang mit der ß-Casein A1-Antikörperkonzentration (p = 0.322, r = -0.0599, Abb. 3.3).

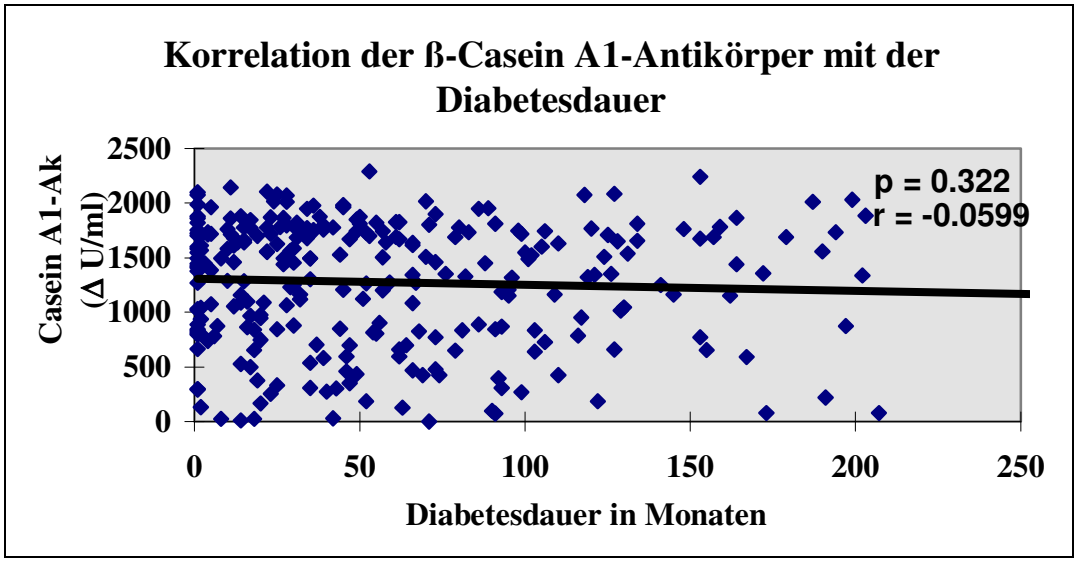

Abb. 3.3 : Korrelation der ß-Casein A1-Antikörper mit der Diabetesdauer. Angegeben sind Einzelwerte und die Korrelationsgerade, p = 0.322.

3.1.1.4 ICA und IAA

In dieser Studie konnte kein Zusammenhang zwischen der Konzentration der ß-Casein A1-Antikörper und dem Krankheitsmarker ICA nachgewiesen werden (p = 0.434, r = 0.047, Abb. 3.4).

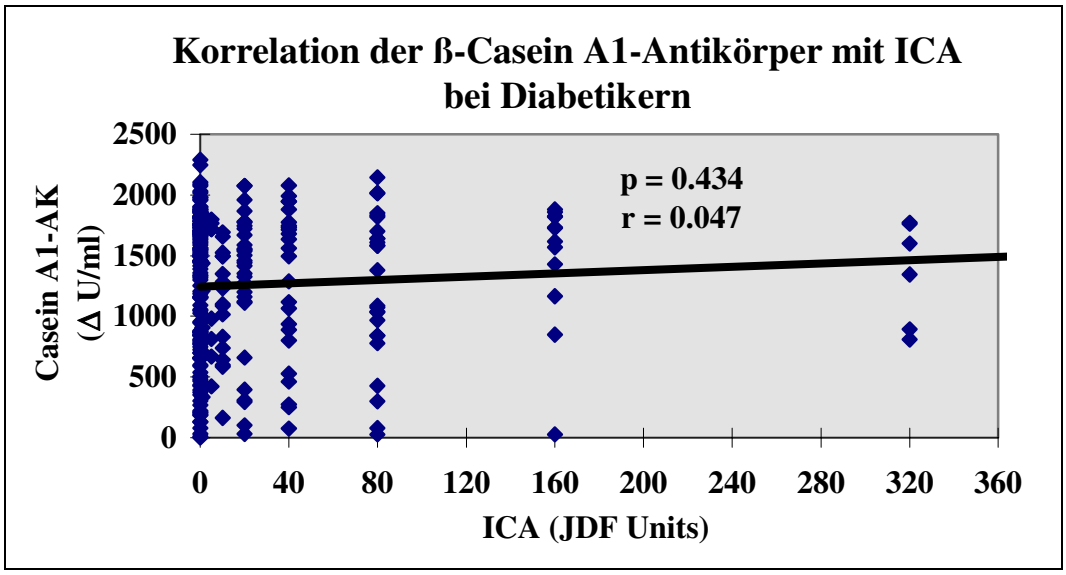

Abb. 3.4 : Korrelation der ß-Casein A1-Antikörper mit Inselzellantikörpern (ICA). Angegeben sind Einzelwerte und die Korrelationsgerade, p = 0.434.

Eine Korrelation der Antikörper mit Insulinautoantikörpern konnte ebenfalls nicht dargestellt werden (p = 0.352, r = 0.0586, Abb. 3.5).

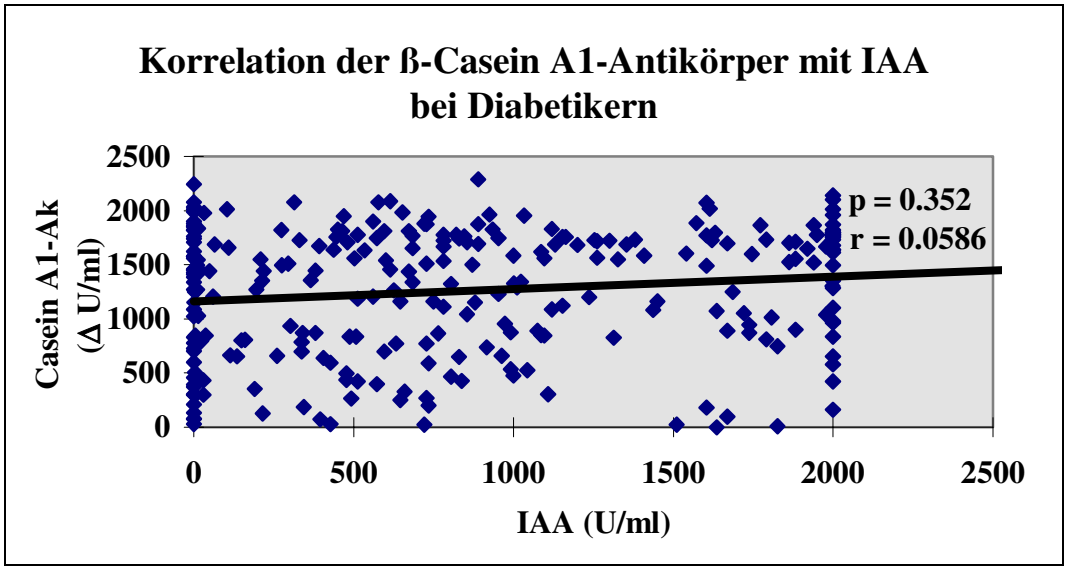

Abb. 3.5 : Korrelation der ß-Casein A1-Antikörper mit Insulinautoantikörpern (IAA). Angegeben sind Einzelwerte und die Korrelationsgerade, p = 0.352.

3.1.2 ß-Casein A1-Antikörper bei Geschwistern der Typ 1-Diabetiker

3.1.2.1 Alter und Geschlecht

Bei 380 Geschwistern der Typ 1-Diabetiker wurden ß-Casein A1-Antikörper getestet. Insgesamt waren Antikörper gegen das ß-Casein A1 in hoch signifikantem Zusammenhang mit dem Alter korreliert ($p < 0.001$, $r = -0.2725$). Eine Korrelation zwischen der Casein-Antikörperkonzentration und dem Geschlecht besteht nicht ($p = 0.177$). Die folgende Tabelle zeigt die Mittelwerte der Casein A1-Titer in den jeweiligen Altersklassen (Tab. 3.2 und Abb. 3.6).

Tab. 3.2 : ß-Casein A1-Antikörperkonzentrationen (Mittelwerte) bei Geschwistern der Typ 1-Diabetiker in verschiedenen Altersklassen.

Geschwister	Alter in Jahren			
	1-10	11-20	21-30	31-40
Casein A1 =	1449	1207	921	1014
SEM (+/-) =	104	85	136	414
n =	89	204	80	7

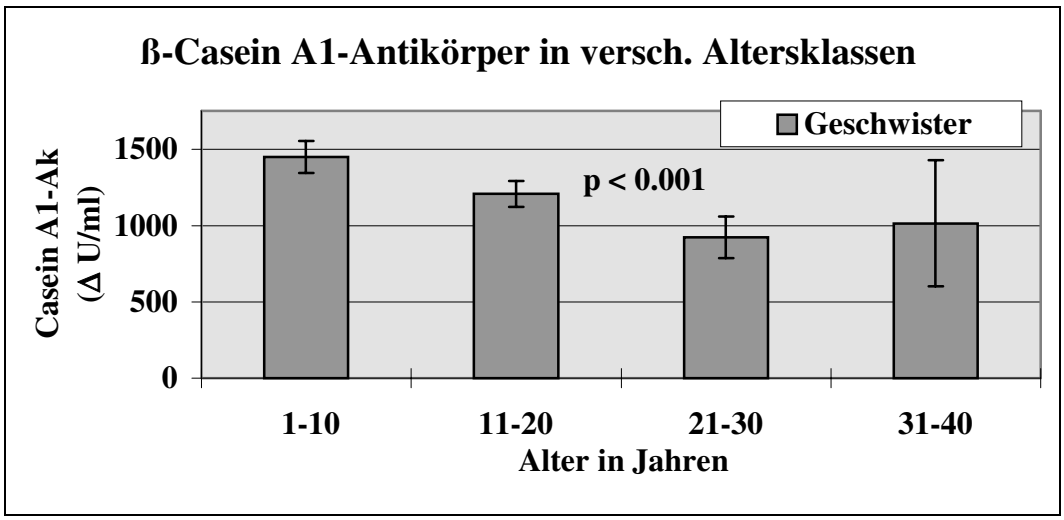

Abb. 3.6 : ß-Casein A1-Antikörper bei Geschwistern der Typ 1-Diabetiker in verschiedenen Altersklassen. Angegeben sind Mittelwerte und SEM, $p < 0.001$.

3.1.2.2 ICA und IAA

Eine Korrelation der ß-Casein A1-Antikörper mit den Krankheitsmarkern ICA und IAA konnte nicht nachgewiesen werden (p = 0.394, r = 0.0442 für ICA (Abb. 3.7) und p = 0.907, r = 0.0063 für IAA (Abb. 3.8)).

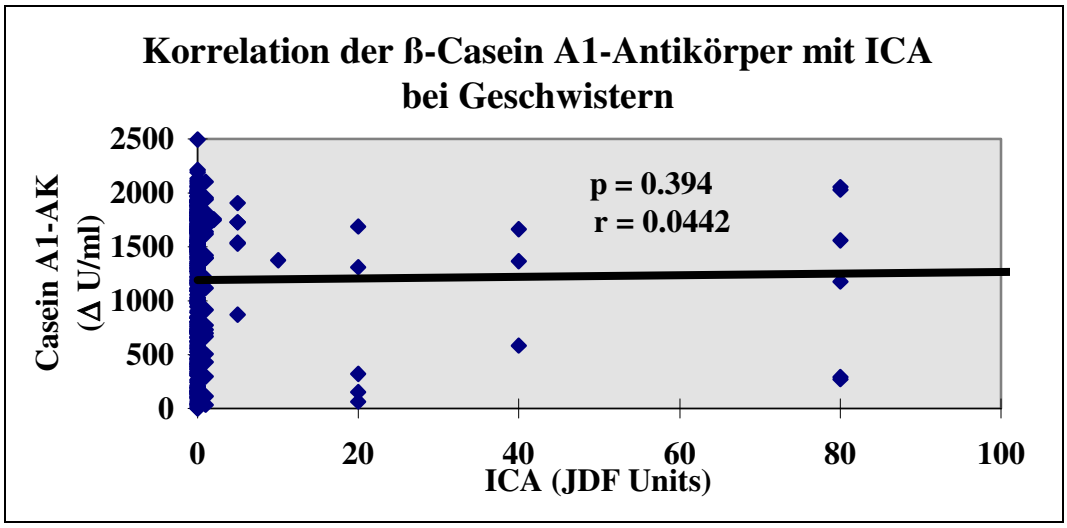

Abb. 3.7 : Korrelation der ß-Casein A1-Antikörper mit Inselzellantikörpern (ICA). Angegeben sind Einzelwerte und die Korrelationsgerade, p = 0.394.

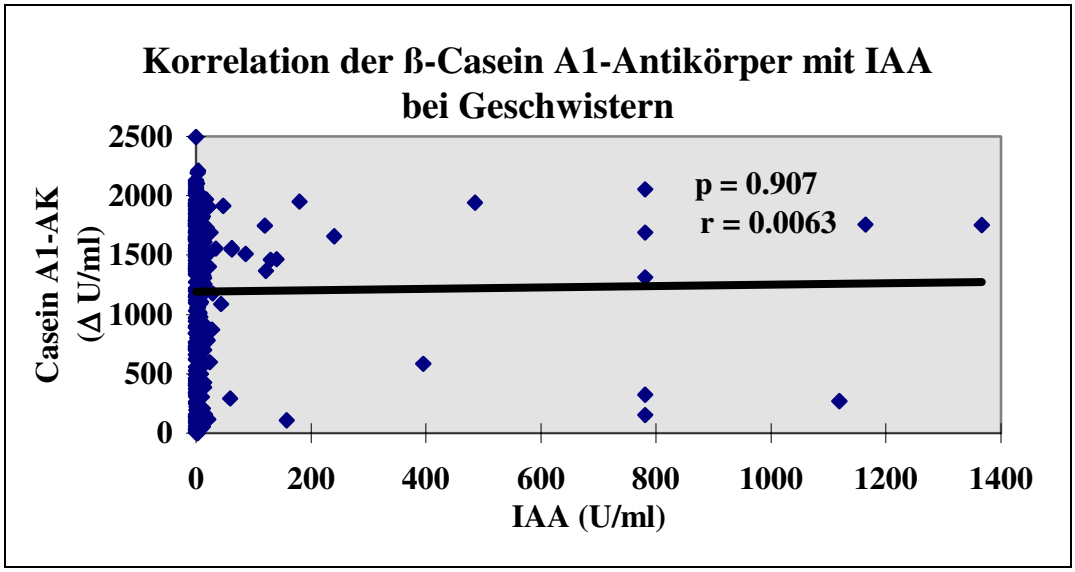

Abb. 3.8 : Korrelation der ß-Casein A1-Antikörper mit Insulinautoantikörpern (IAA). Angegeben sind Einzelwerte und die Korrelationsgerade, p = 0.907.

3.1.3 ß-Casein A1-Antikörper bei Eltern der Typ 1-Diabetiker

3.1.3.1 Alter und Geschlecht

ß-Casein A1-Antikörper wurden bei 473 Eltern der Typ 1-Diabetiker nachgewiesen. Auch hier konnte eine Altersabhängigkeit der Antikörper gefunden werden. Es besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter der Eltern und der Antikörperkonzentration gegen die A1-Variante des ß-Caseins ($p = 0.014$, $r = - 0.1131$, Tab. 3.3 und Abb. 3.9).

Tab. 3.3 : ß-Casein A1-Antikörperkonzentrationen (Mittelwerte) bei Eltern der Typ 1-Diabetiker in verschiedenen Altersklassen

Eltern	Alter in Jahren			
	21-30	31-40	41-50	>50
Casein A1 =	619	710	559	605
SEM (+/-) =	352	94	67	175
n =	8	157	257	51

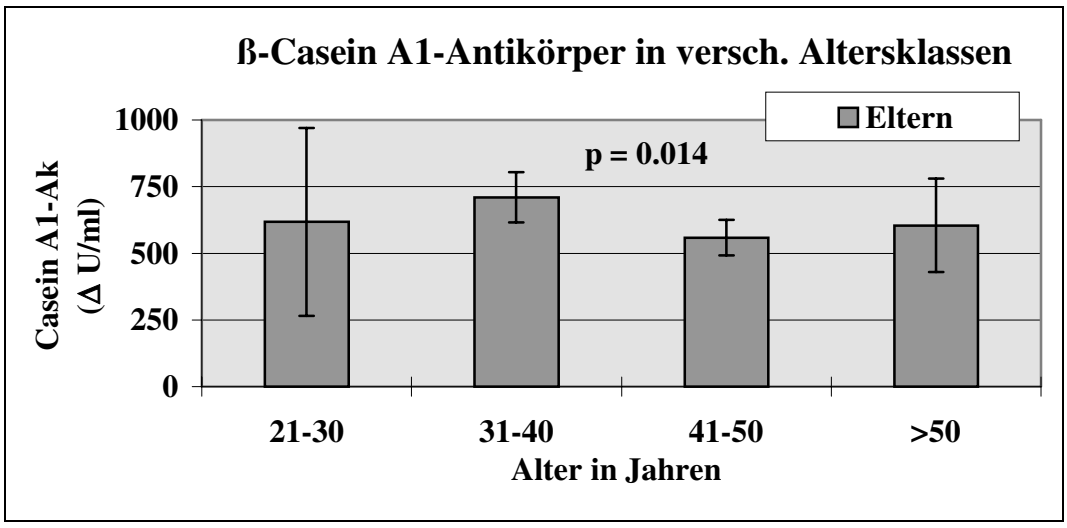

Abb. 3.9 : ß-Casein A1-Antikörper bei Eltern der Typ 1-Diabetiker in verschiedenen Altersklassen. Angegeben sind Mittelwerte und SEM, $p = 0.014$.

Bezüglich des Geschlechts ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Casein A1-Antikörper aufzeigen ($p = 0.076$).

3.1.3.2 ICA und IAA

Eine Korrelation der ß-Casein A1-Antikörper mit den Inselzellantikörpern (ICA) und den Insulinautoantikörpern (IAA) konnte nicht nachgewiesen werden (p = 0.546, r = 0.028 für ICA (Abb. 3.10) und p = 0.712, r = 0.0179 für IAA (Abb. 3.11)).

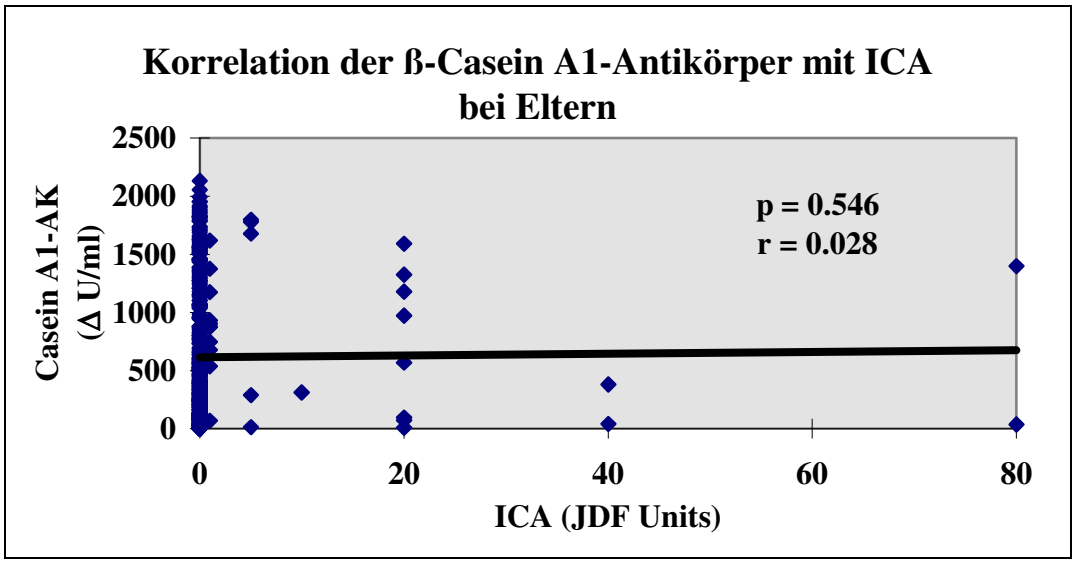

Abb. 3.10 : Korrelation der ß-Casein A1-Antikörper mit Inselzellantikörpern (ICA). Angegeben sind Einzelwerte und die Korrelationsgerade, p = 0.546.

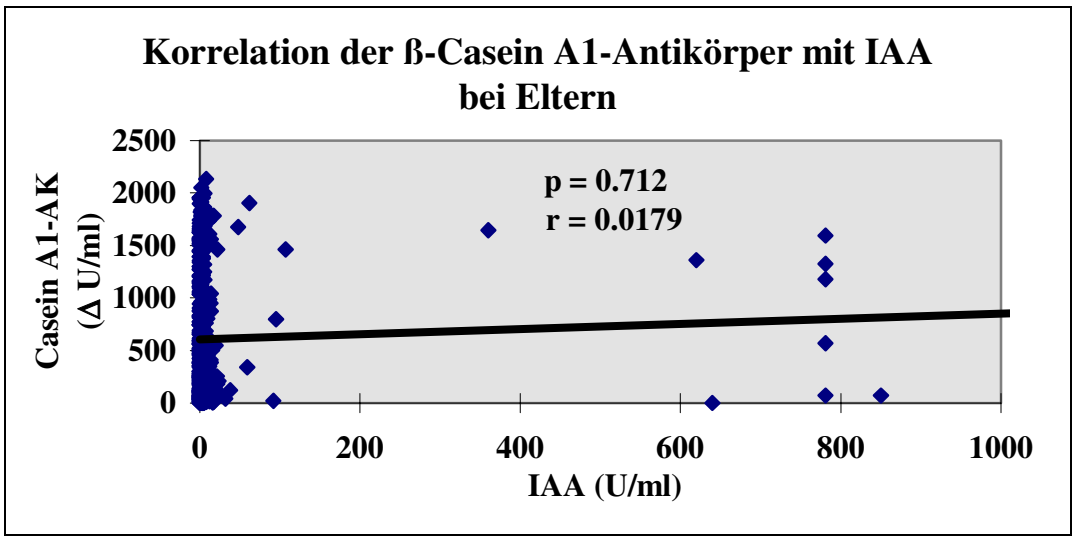

Abb. 3.11 : Korrelation der ß-Casein A1-Antikörper mit Insulinautoantikörpern (IAA). Angegeben sind Einzelwerte und die Korrelationsgerade, p = 0.712.

3.1.4 ß-Casein A1-Antikörper bei Kontrollpersonen

3.1.4.1 Alter und Geschlecht

Bei 97 Kontrollpersonen wurden ß-Casein A1-Antikörper bestimmt. Wie bei den anderen Gruppen besteht auch hier ein statistisch hoch signifikanter Zusammenhang zwischen der A1-Antikörperkonzentration und dem Alter. Im folgenden ist graphisch der Abfall der Antikörperkonzentration mit zunehmendem Alter dargestellt ($p < 0.001$, $r = -0.402$, Tab. 3.4 und Abb. 3.12).

Tab. 3.4 : ß-Casein A1-Antikörperkonzentrationen (Mittelwerte) bei Kontrollpersonen in verschiedenen Altersklassen.

Kontrollpersonen	Alter in Jahren					
	1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	>50
Casein A1 =	1103	973	765	543	645	364
SEM (+/-) =	190	213	275	251	476	324
n =	33	24	14	10	8	8

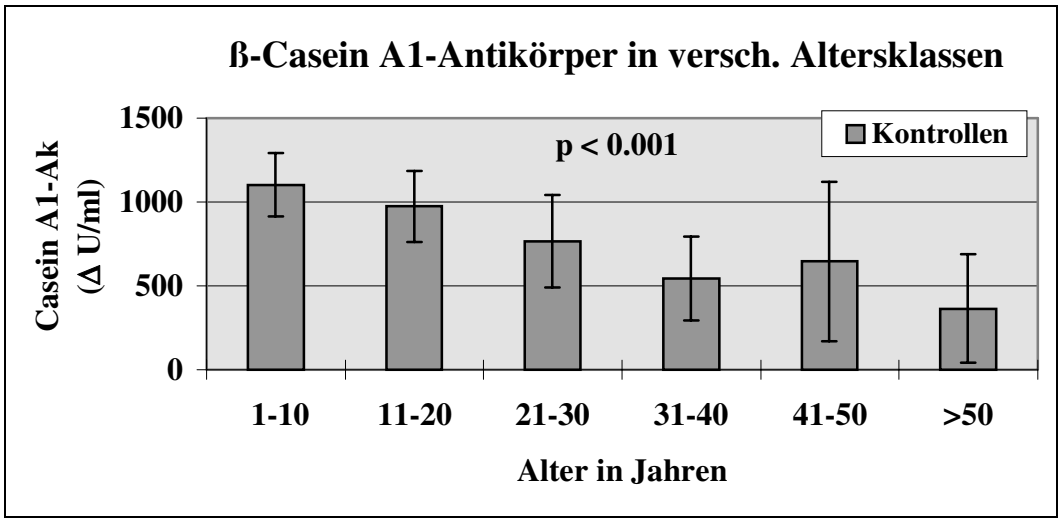

Abb. 3.12 : ß-Casein A1-Antikörper bei Kontrollpersonen in verschiedenen Altersklassen. Angegeben sind Mittelwerte und SEM, $p < 0.001$.

Die Konzentrationen der Antikörper gegen die A1-Variante des ß-Caseins waren auch hier nicht mit dem Geschlecht der Kontrollpersonen assoziiert ($p = 0.401$).

3.1.5 ß-Casein A2-Antikörper bei Typ 1-Diabetikern

3.1.5.1 Alter und Geschlecht

Antikörper gegen die A2-Variante des ß-Caseins wurden bei 287 Typ 1-Diabetikern bestimmt und wiesen einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Antikörperkonzentration und dem Alter auf. Mit zunehmendem Alter der Diabetiker zeigt sich auch hier der Abfall der ß-Casein A2-Antikörper ($p = 0.002$, $r = -0.1844$).

Folgende Tabelle (Tab. 3.5) und Graphik (Abb. 3.13) veranschaulicht den Zusammenhang.

Tab. 3.5 : ß-Casein A2-Antikörperkonzentrationen (Mittelwerte) bei Typ 1-Diabetikern in verschiedenen Altersklassen.

Typ 1-Diabetiker	Alter in Jahren					
	1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	>50
Casein A2 =	1394	1220	1023	982	1240	860
SEM (+/-) =	147	72	332	826	625	500
n =	45	214	17	3	6	2

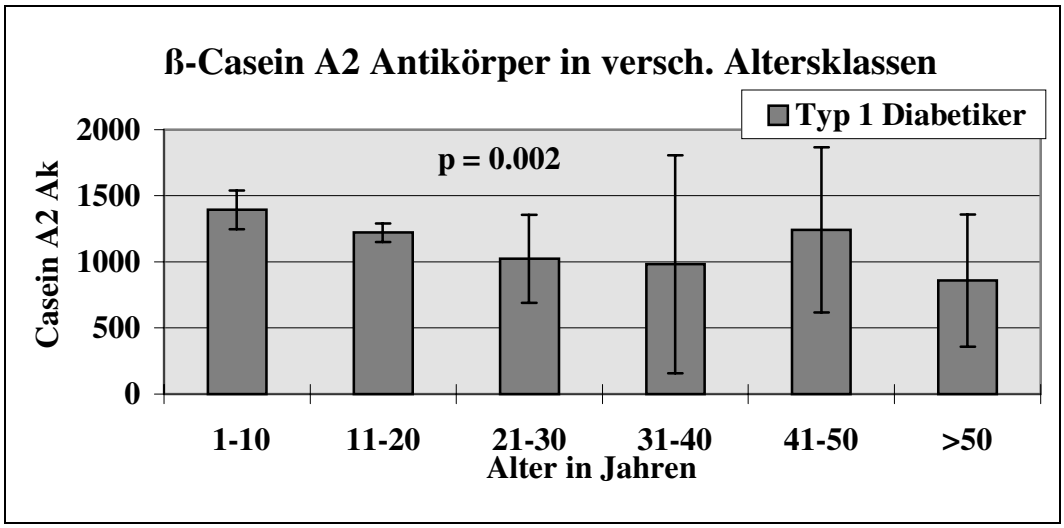

Abb. 3.13 : ß-Casein A2-Antikörper bei Typ 1-Diabetikern in verschiedenen Altersklassen. Angegeben sind Mittelwerte und SEM, $p = 0.002$.

Auch bei den ß-Caseins A2-Antikörpern der Diabetiker konnte kein Zusammenhang mit dem Geschlecht aufgezeigt werden (p = 0.756).

3.1.5.2 Manifestationsalter

Antikörper gegen die A2-Variante des ß-Caseins ließen sich bei Diabetikern mit einem frühen Manifestationsalter in weitaus höheren Konzentrationen nachweisen als bei einem späten Manifestationsalter des Typ 1-Diabetes. Insgesamt ließ sich eine statistisch signifikante Abhängigkeit des Manifestationsalters vom Antikörpertiter zeigen (p = 0.012, r = - 0.152, Abb. 3.14).

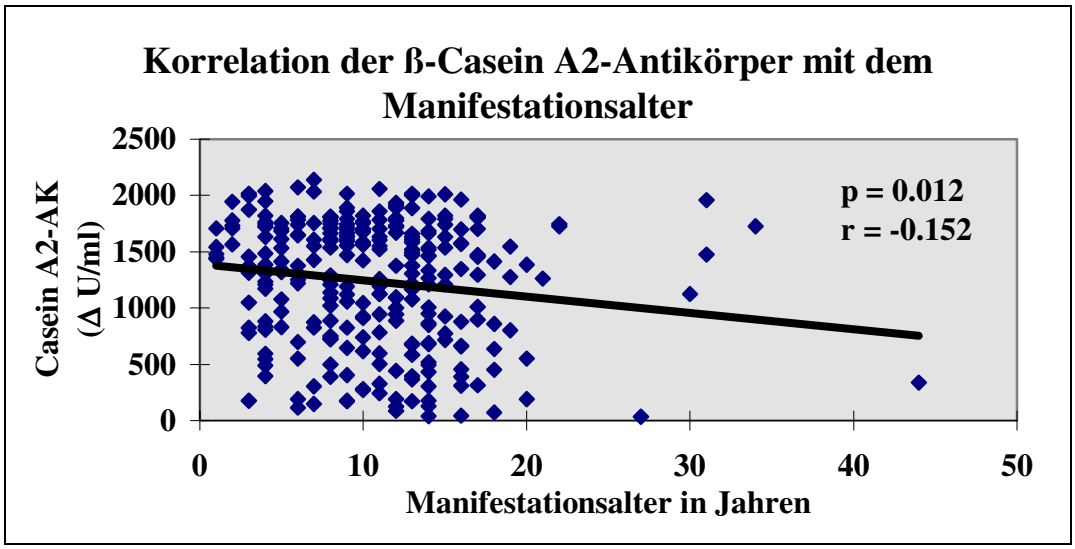

Abb. 3.14 : Korrelation der ß-Casein A2-Antikörper mit dem Manifestationsalter. Angegeben sind Einzelwerte und die Korrelationsgerade, p = 0.012.

3.1.5.3 Diabetesdauer

Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der ß-Casein A2-Antikörperkonzentration und der Diabetesdauer festgestellt werden (p = 0.241, r = - 0.071, Abb. 3.15).

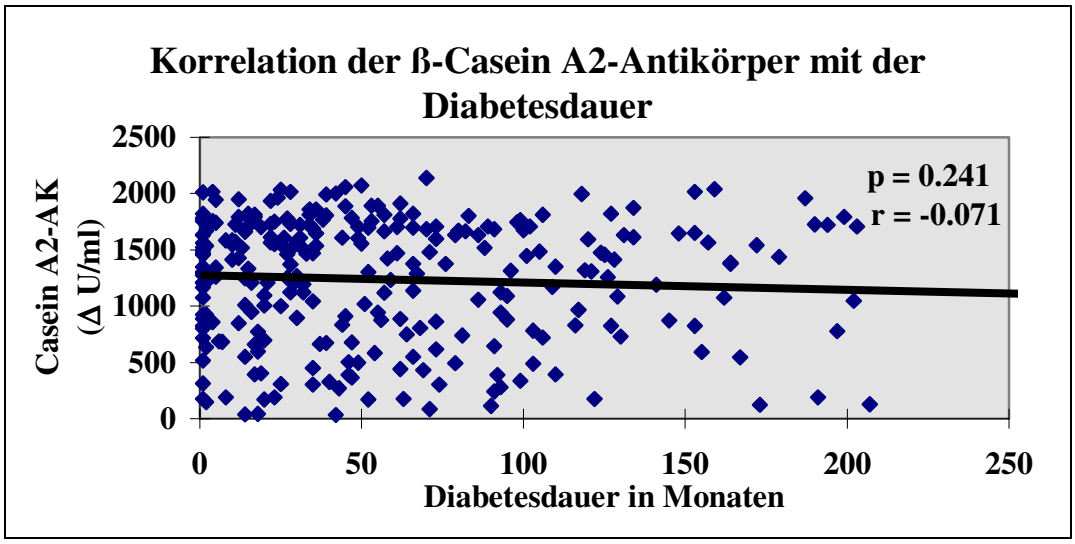

Abb. 3.15 : Korrelation der ß-Casein A2-Antikörper mit der Diabetesdauer. Angegeben sind Einzelwerte und die Korrelationsgerade, p = 0.241.

3.1.5.4 ICA und IAA

Eine Verbindung zwischen den Inselzellantikörpern (ICA) und den nachgewiesenen Antikörperkonzentrationen gegen ß-Casein A2 bestand nicht (p= 0.221, r = 0.0734, Abb. 3.16).

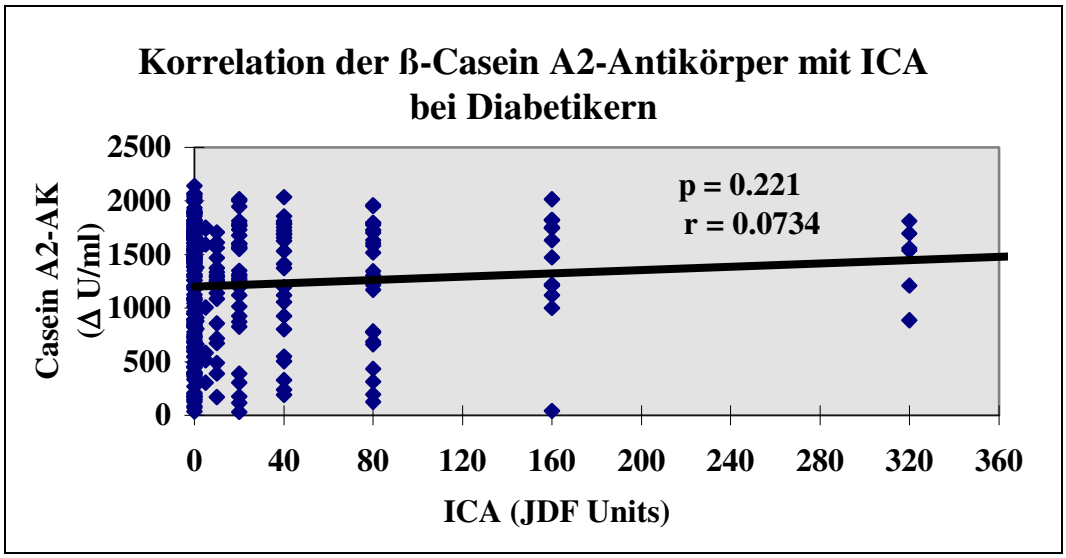

Abb. 3.16 : Korrelation der ß-Casein A2-Antikörper mit Inselzellantikörpern (ICA). Angegeben sind Einzelwerte und die Korrelationsgerade, p = 0.221.

Eine Korrelation der Insulinautoantikörper mit den ß-Casein A2-Antikörpern konnte ebenfalls nicht dargestellt werden (p = 0.225, r = 0.0764, Abb. 3.17).

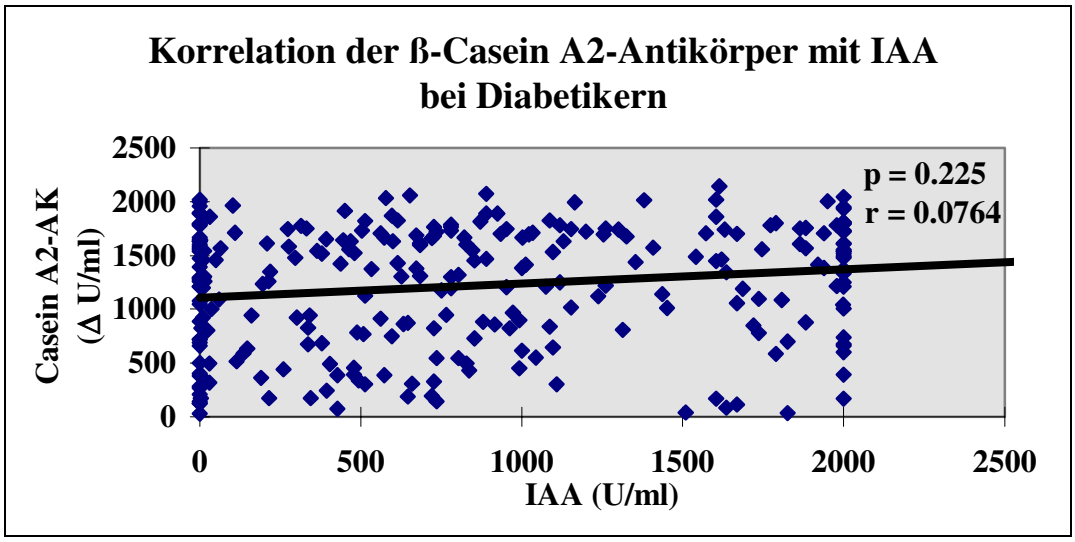

Abb. 3.17 : Korrelation der ß-Casein A2-Antikörper mit Insulinautoantikörpern (IAA). Angegeben sind Einzelwerte und die Korrelationsgerade, p = 0.225.

3.1.6 ß-Casein A2-Antikörper bei Geschwistern der Typ 1-Diabetiker

3.1.6.1 Alter und Geschlecht

ß-Casein A2-Antikörper wurden bei 380 Geschwistern der Typ 1-Diabetiker nachgewiesen. Die Antikörperkonzentration nimmt auch hier mit steigendem Alter ab. Es besteht ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen den Casein A2-Antikörpern und dem Alter der Geschwister ($p < 0.001$, $r = -0.2767$). Im folgenden sind tabellarisch (Tab. 3.6) und graphisch (Abb. 3.18) die Casein A2-Mittelwerte dargestellt.

Tab. 3.6 : ß-Casein A2-Antikörperkonzentrationen (Mittelwerte) bei Geschwistern der Typ 1-Diabetiker in verschiedenen Altersklassen.

Geschwister	Alter in Jahren			
	1-10	11-20	21-30	31-40
Casein A2 =	1440	1171	893	1078
SEM (+/-) =	97	82	135	201
n =	89	204	80	7

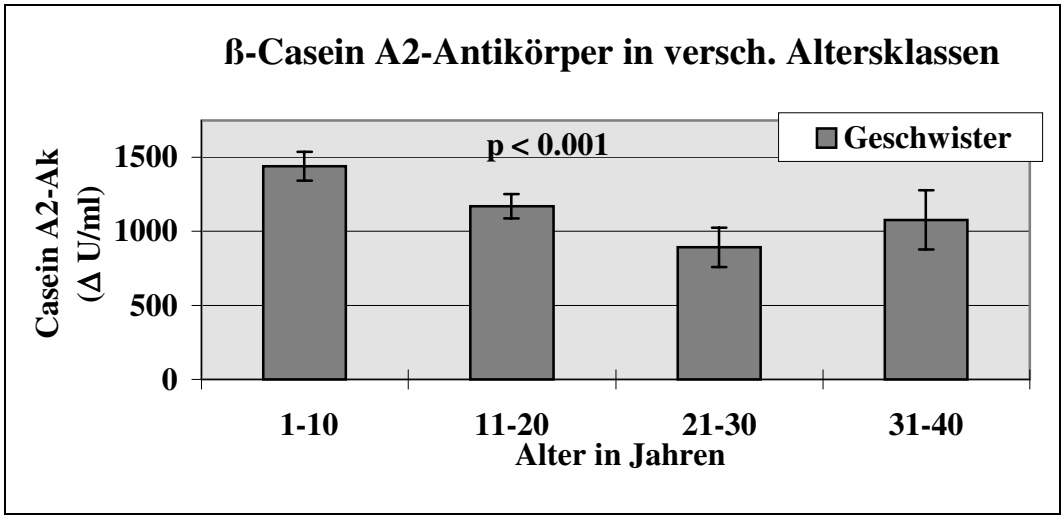

Abb. 3.18 : ß-Casein A2-Antikörper bei Geschwistern der Typ 1-Diabetiker in verschiedenen Altersklassen. Angegeben sind Mittelwerte und SEM, $p < 0.001$.

ß-Casein A2-Antikörper der Geschwister waren nicht mit dem Geschlecht assoziiert ($p = 0.177$).

3.1.6.2 ICA und IAA

Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Konzentration der ß-Casein A2-Antikörper und dem Auftreten sowohl von Inselzellantikörpern (ICA) als auch von Insulinautoantikörpern (IAA) in den untersuchten Seren nachgewiesen werden (p = 0.443, r = 0.0398 für ICA (Abb. 3.19) und p = 0.842, r = -0.0107 für IAA (Abb. 3.20)).

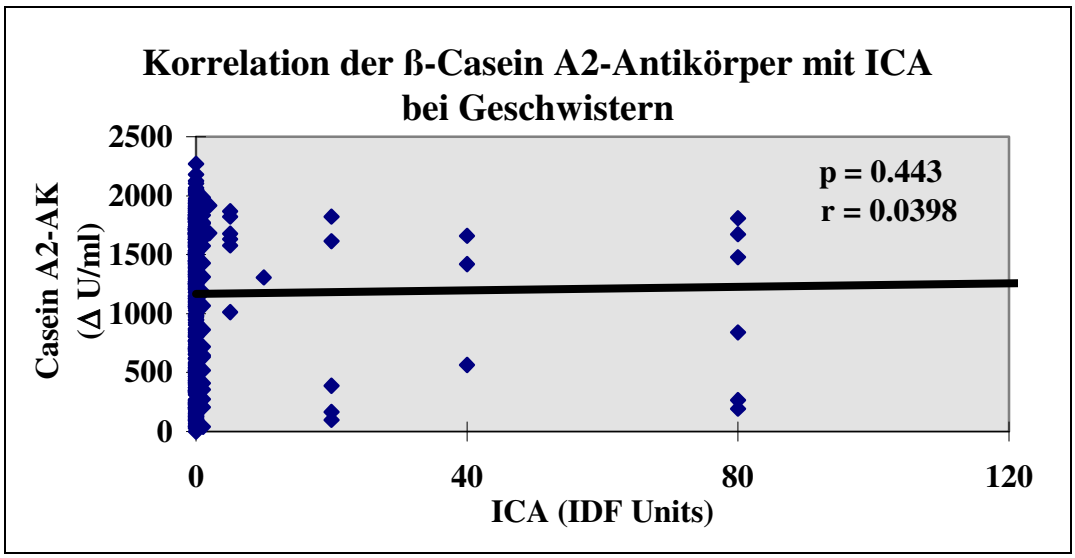

Abb. 3.19 : Korrelation der ß-Casein A2-Antikörper mit Inselzellantikörpern (ICA). Angegeben sind Einzelwerte und die Korrelationsgerade, p = 0.443.

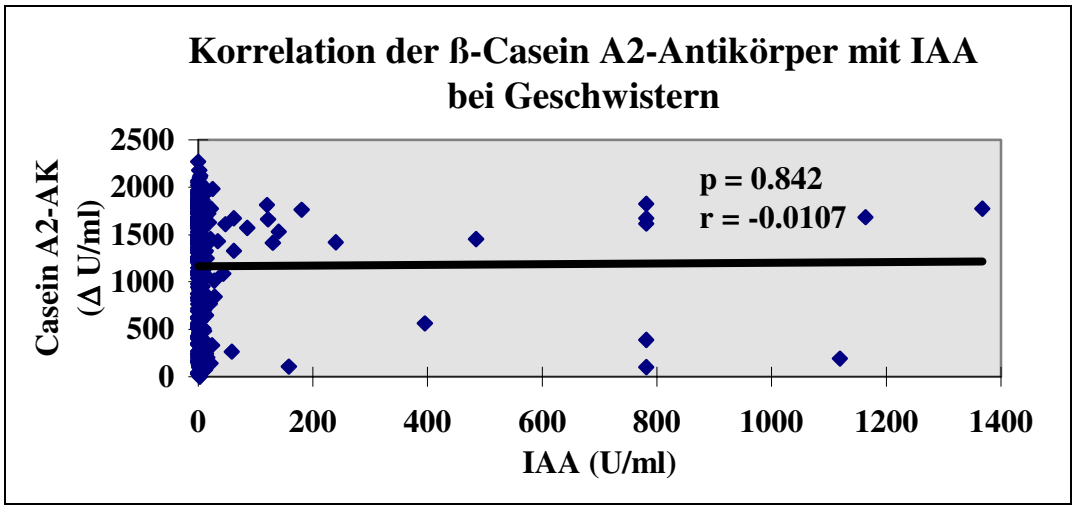

Abb. 3.20 : Korrelation der ß-Casein A2-Antikörper mit Insulinautoantikörpern (IAA). Angegeben sind Einzelwerte und die Korrelationsgerade, p = 0.842.

3.1.7 ß-Casein A2-Antikörper bei Eltern der Typ 1-Diabetiker

3.1.7.1 Alter und Geschlecht

Es wurden bei 473 Eltern der Typ 1-Diabetiker ß-Casein A2-Antikörper bestimmt. Eine Korrelation zwischen dem Alter der Eltern und der Antikörperkonzentration konnte nachgewiesen werden ($p = 0.012$, $r = -0.1153$) In der Tabelle 3.7 und Abbildung 3.21 sind die Mittelwerte der Antikörperkonzentrationen dargestellt. Das Geschlecht der Eltern ist nicht mit der A2-Variante des ß-Caseins assoziiert.

Tab. 3.7 : ß-Casein A2-Antikörperkonzentrationen (Mittelwerte) bei Eltern der Typ 1-Diabetiker in verschiedenen Altersklassen.

Eltern	Alter in Jahren			
	21-30	31-40	41-50	>50
Casein A2 =	615	713	558	618
SEM (+/-) =	324	90	65	172
n =	8	157	257	51

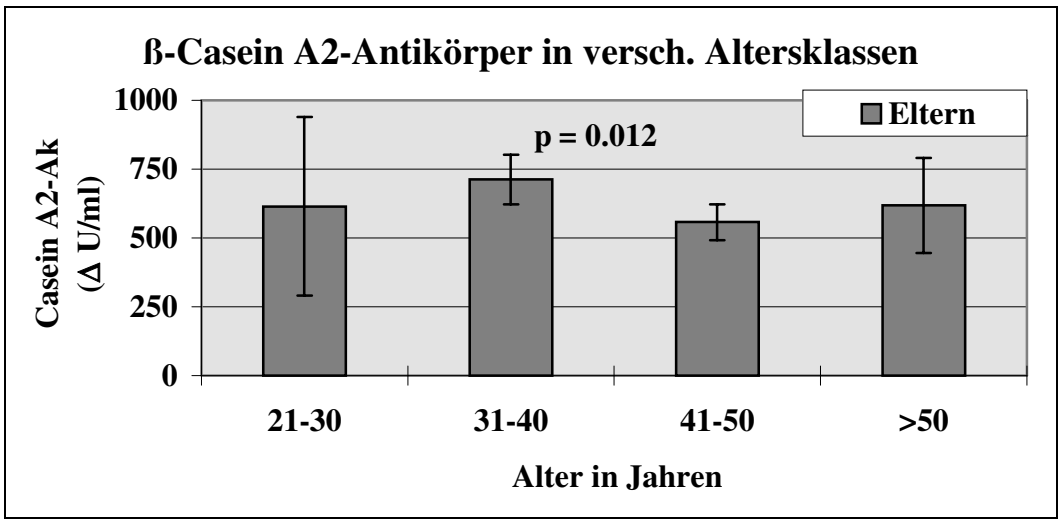

Abb. 3.21 : ß-Casein A2-Antikörper bei Eltern der Typ 1-Diabetiker in verschiedenen Altersklassen. Angegeben sind Mittelwerte und SEM, $p = 0.012$.

3.1.7.2 ICA und IAA

Es konnte kein Zusammenhang zwischen der ß-Casein A2-Antikörperkonzentration und dem Auftreten von ICA in den untersuchten Seren nachgewiesen werden (p = 0.72, r = 0.0166, Abb. 3.22).

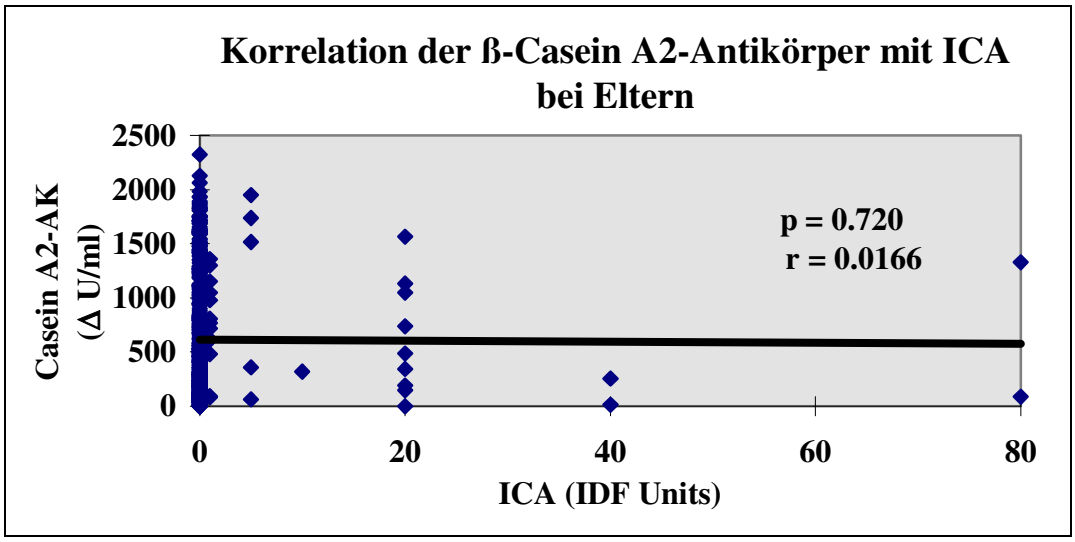

Abb. 3.22 : Korrelation der ß-Casein A2-Antikörper mit Inselzellantikörpern (ICA). Angegeben sind Einzelwerte und die Korrelationsgerade, p = 0.72.

Eine Korrelation der Antikörper mit Insulinautoantikörpern (IAA) konnte ebenfalls nicht dargestellt werden (p = 0.724, r = 0.0171, Abb. 3.23).

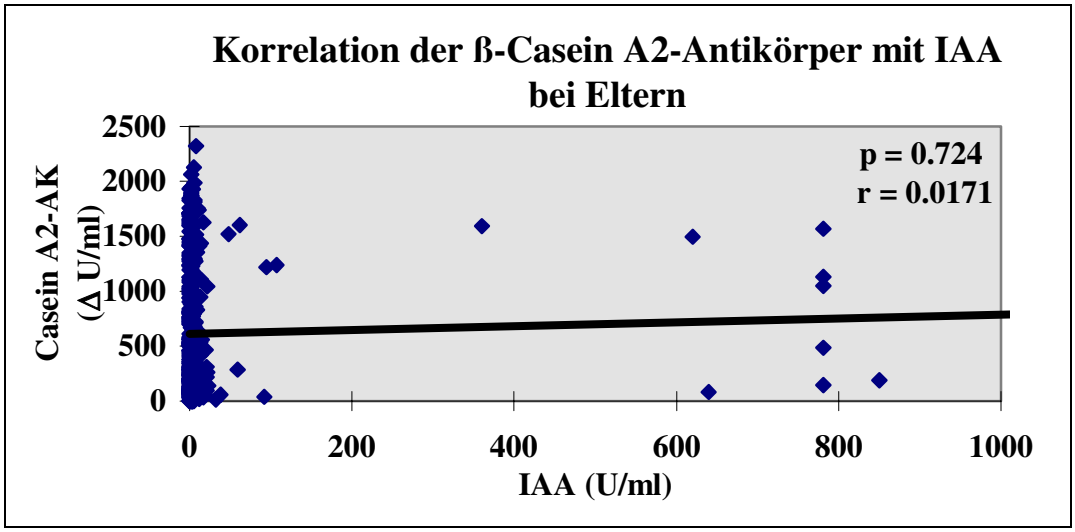

Abb. 3.23 : Korrelation der ß-Casein A2-Antikörper mit Insulinautoantikörpern (IAA). Angegeben sind Einzelwerte und die Korrelationsgerade, p = 0.724.

3.1.8 ß-Casein A2-Antikörper bei Kontrollpersonen

3.1.8.1 Alter und Geschlecht

Bei 97 Kontrollpersonen wurden ß-Casein A2-Antikörper bestimmt. Die Antikörperkonzentration fällt mit zunehmendem Alter der Kontrollen ab. Es besteht ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Lebensalter und der A2-Antikörperkonzentration. Graphisch ist dies in der Tabelle 3.8 und Abbildung 3.24 dargestellt.

Tab. 3.8 : ß-Casein A2-Antikörperkonzentrationen (Mittelwerte) bei Kontrollpersonen in verschiedenen Altersklassen.

Kontrollpersonen	Alter in Jahren					
	1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	>50
Casein A2 =	1207	1135	894	690	764	410
SEM (+/-) =	188	226	251	289	432	274
n =	33	24	14	10	8	8

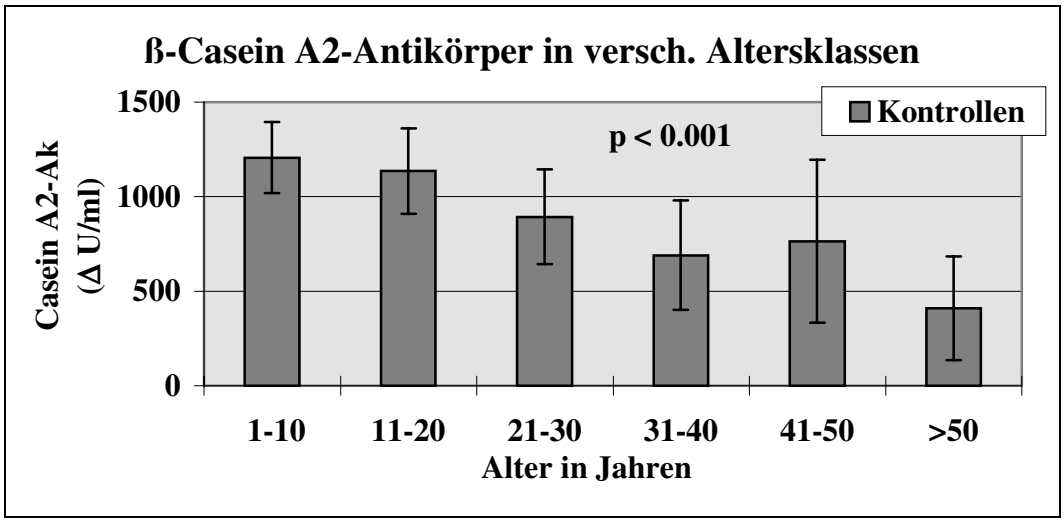

Abb. 3.24 : ß-Casein A2-Antikörper bei Kontrollpersonen in verschiedenen Altersklassen. Angegeben sind Mittelwerte und SEM, $p < 0.001$.

Auch die Kontrollpersonen wiesen keine Korrelation bezüglich der A2-Antikörper und ihres Geschlechts auf ($p = 0.493$).

3.2 Inferenzstatistik

3.2.1 Vergleichende Darstellung der ß-Casein A1-Antikörper

3.2.1.1 Typ 1-Diabetiker und ihre Geschwister

Antikörper gegen das ß-Casein A1 waren bei Typ 1-Diabetikern statistisch nicht in höheren Konzentrationen nachzuweisen als bei ihren Geschwistern (p = 0.14, Tab. 3.9, Abb. 3.25).

Tab. 3.9: ß-Casein A1-Antikörperkonzentrationen (Mittelwerte) bei Diabetikern und ihren Geschwistern.

	Typ 1-Diabetiker	Geschwister
Casein A1 =	1145	1077
SEM (+/-) =	66	62
n =	287	380

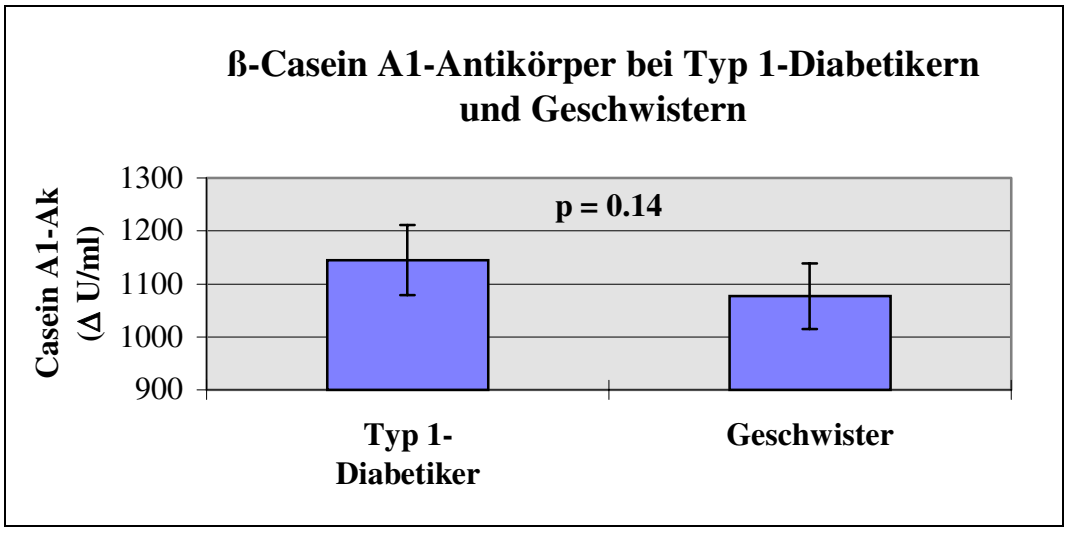

Abb. 3.25: ß-Casein A1-Antikörper bei Diabetikern und ihren Geschwistern. Angegeben sind Mittelwerte und SEM.

Auch in den verschiedenen Altersklassen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Diabetikern und ihren Geschwistern nachgewiesen werden. Abbildung 3.26 verdeutlicht die Antikörperkonzentrationen in den verschiedenen Altersklassen.

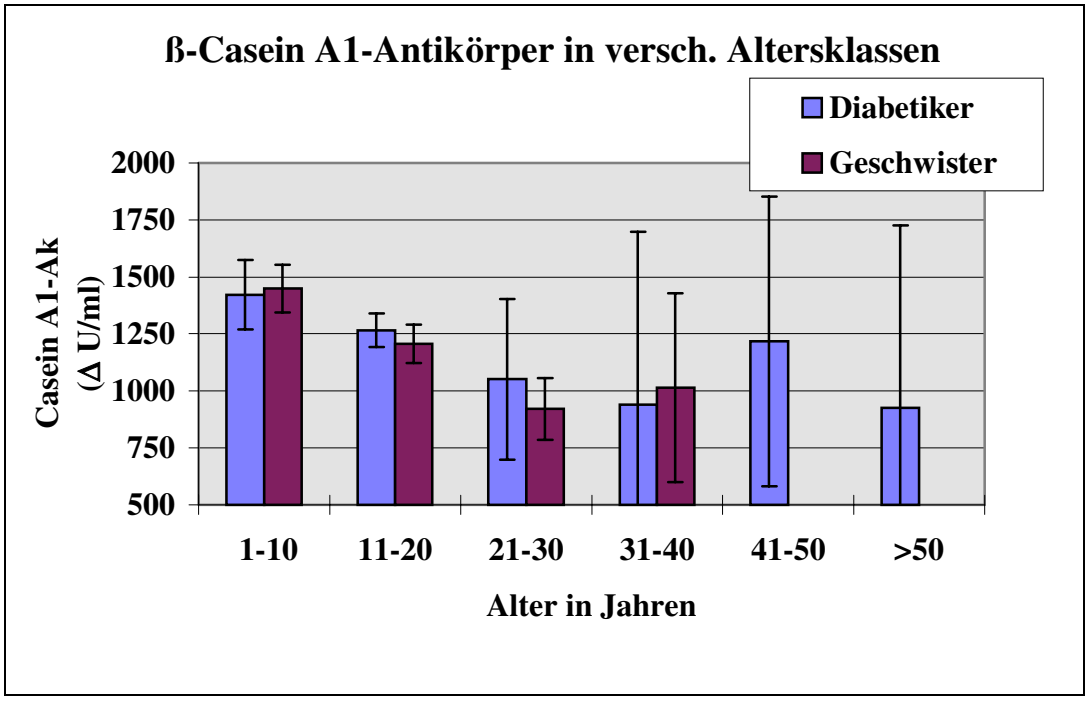

Abb. 3.26: ß-Casein A1-Antikörper in verschiedenen Altersklassen bei Diabetikern und ihren Geschwistern. Angegeben sind Mittelwerte und SEM.

3.2.1.2 Typ 1-Diabetiker und ihre Eltern

Antikörper gegen die A1-Variante des ß-Caseins der Kuhmilch ließen sich bei Typ 1-Diabetikern im Vergleich zu ihren Eltern in statistisch signifikant höheren Konzentrationen nachweisen ($p < 0.001$, Tab. 3.10, Abb. 3.27).

Tab. 3.10: ß-Casein A1-Antikörperkonzentrationen (Mittelwerte) bei Diabetikern und ihren Eltern.

	Typ 1-Diabetiker	Eltern
Casein A1 =	1145	900
SEM (+/-) =	66	52
n =	287	473

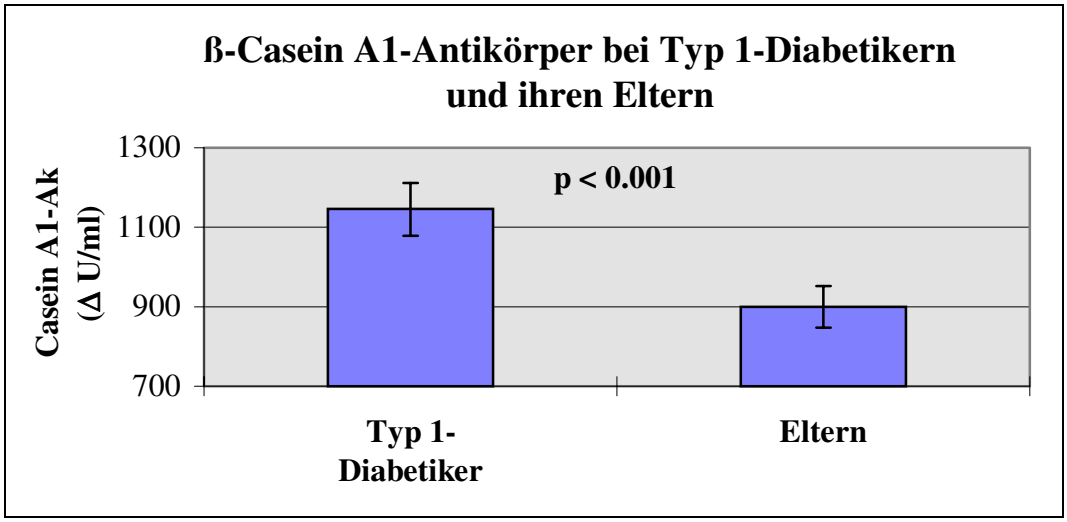

Abb. 3.27: ß-Casein A1-Antikörper bei Diabetikern und ihren Eltern. Angegeben sind Mittelwerte und SEM.

3.2.1.3 Typ 1-Diabetiker und Kontrollpersonen

Ein statistisch hoch signifikanter Unterschied bezüglich der ß-Casein A1-Antikörperkonzentration ließ sich zwischen Typ 1-Diabetikern und Kontrollpersonen nachweisen ($p < 0.001$, Tab. 3.11, Abb. 3.28).

Tab. 3.11: ß-Casein A1-Antikörperkonzentrationen (Mittelwerte) bei Diabetikern und Kontrollpersonen.

	Typ 1-Diabetiker	Kontrollpersonen
Casein A1 =	1145	830
SEM (+/-) =	66	118
n =	287	97

Während die Diabetiker hinsichtlich ihres Mittelwertes die höchste Konzentration gegen ß-Casein A1-Antikörper innerhalb der vier untersuchten Gruppen (Diabetiker, Geschwister, Eltern, Kontrollen) aufwiesen, zeigten sich bei Kontrollpersonen die niedrigsten Werte (Tab. 3.9, 3.10 und 3.11).

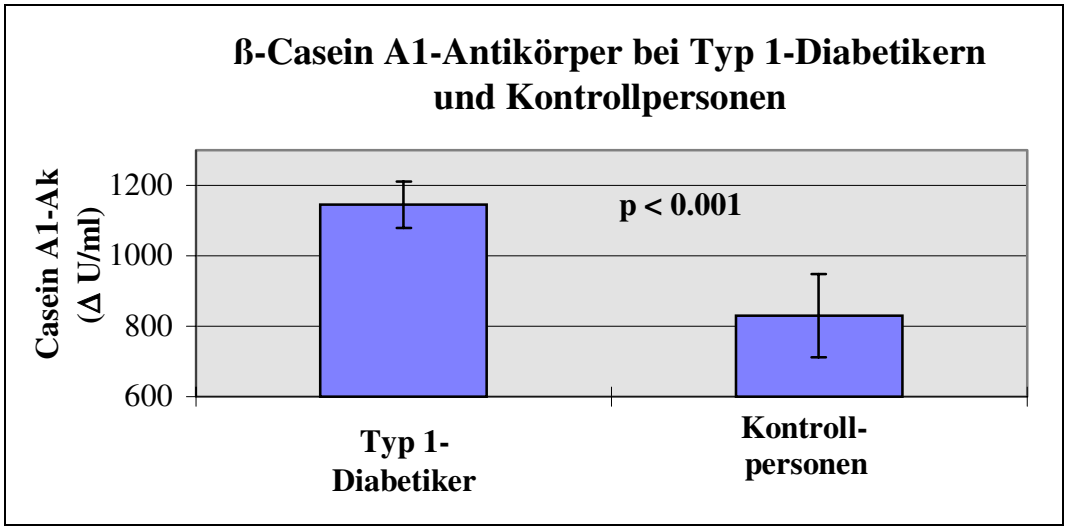

Abb. 3.28: ß-Casein A1-Antikörper bei Diabetikern und Kontrollpersonen. Angegeben sind Mittelwerte und SEM.

In allen untersuchten Altersklassen lagen die Antikörper gegen die A1-Variante des ß-Caseins bei Typ 1-Diabetikern verglichen mit den Kontrollpersonen in höheren Konzentrationen vor (Abb. 3.29). Ein statistisch signifikantes Niveau innerhalb der Altersklassen ließ sich aufgrund der großen Schwankungsbreite trotz tendentiell höherer Spiegel bei den Diabetikern nicht sichern.

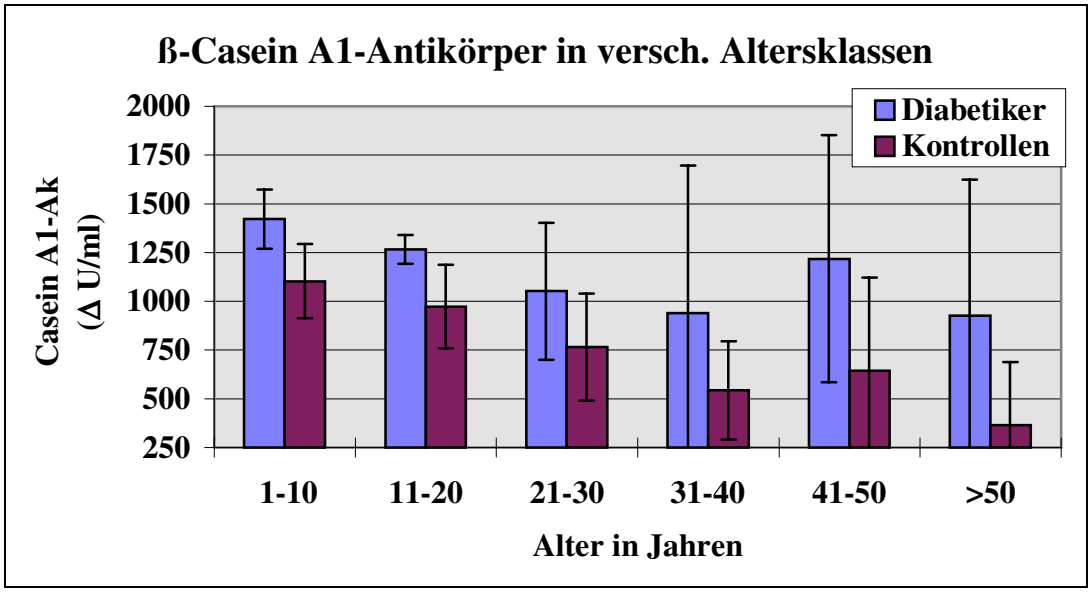

Abb. 3.29: ß-Casein A1-Antikörper in verschiedenen Altersklassen bei Diabetikern und Kontrollpersonen. Angegeben sind Mittelwerte und SEM.

3.2.1.4 Geschwister und ihre Eltern

Wie schon bei den Diabetikern und ihren Eltern ließen sich auch bei den Geschwistern, verglichen mit ihren Eltern, ß-Casein A1-Antikörper statistisch signifikant in höheren Konzentrationen nachweisen ($p < 0.001$, Tab. 3.12, Abb. 3.30).

Tab. 3.12: ß-Casein A1-Antikörperkonzentrationen (Mittelwerte) bei Geschwistern und ihren Eltern.

	Geschwister	Eltern
Casein A1 =	1077	900
SEM (+/-) =	62	52
n =	380	473

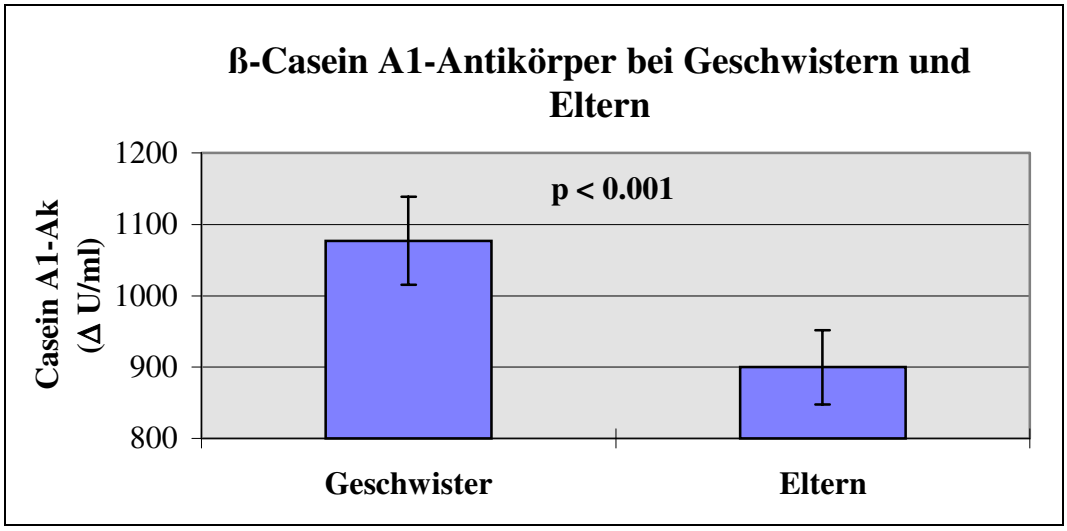

Abb. 3.30: ß-Casein A1-Antikörper bei Geschwistern und ihren Eltern. Angegeben sind Mittelwerte und SEM.

3.2.1.5 Geschwister und Kontrollpersonen

Antikörper gegen die A1-Variante des ß-Caseins der Kuhmilch ließen sich bei Geschwistern der Typ 1-Diabetiker im Vergleich zu Kontrollpersonen statistisch in höheren Konzentrationen nachweisen ($p < 0.001$, Tab. 3.13, Abb. 3.31).

Tab. 3.13: ß-Casein A1-Antikörperkonzentrationen (Mittelwerte) bei Geschwistern und Kontrollpersonen.

	Geschwister	Kontrollpersonen
Casein A1 =	1077	830
SEM (+/-) =	62	118
n =	380	97

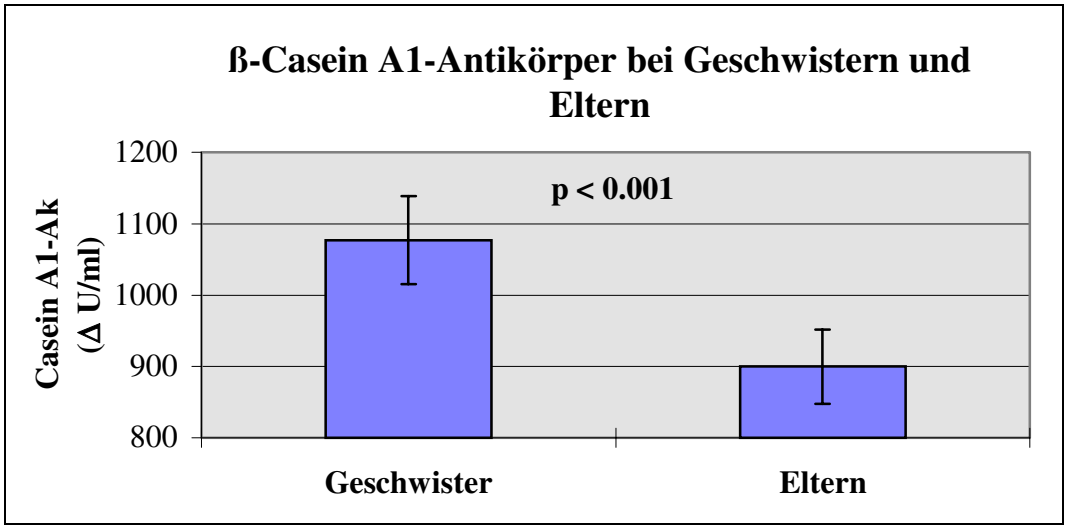

Abb. 3.31: ß-Casein A1-Antikörper bei Geschwistern und Kontrollpersonen. Angegeben sind Mittelwerte und SEM.

In allen untersuchten Altersklassen waren ß-Casein A1-Antikörper in höheren Konzentrationen bei Geschwistern der Typ 1-Diabetiker verglichen mit Kontrollpersonen nachzuweisen. Statistisch signifikant war dieser Unterschied in der Altersklasse 1-10 Jahre ($p = 0.01$, Abb. 3.32).

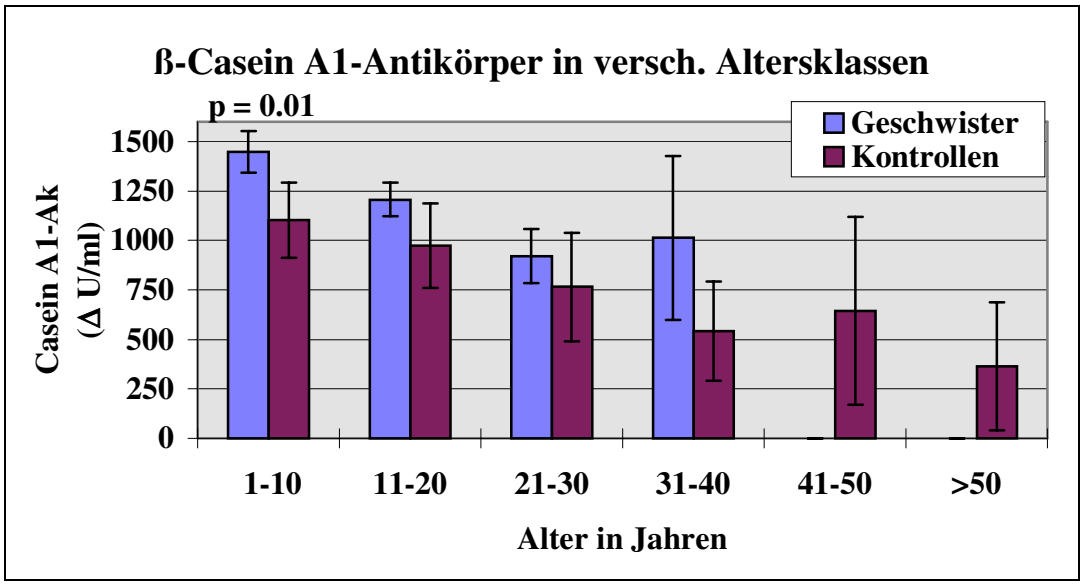

Abb. 3.32: ß-Casein A1-Antikörper in verschiedenen Altersklassen bei Geschwistern und Kontrollpersonen. Angegeben sind Mittelwerte und SEM. In der Altersklasse 1-10 Jahre war der Unterschied statistisch signifikant (p = 0.01).

3.2.1.6 Eltern und Kontrollpersonen

ß-Casein A1-Antikörper ließen sich bei den Eltern der Typ 1-Diabetiker nicht häufiger und nicht in höheren Konzentrationen nachweisen als bei Kontrollpersonen. Insgesamt ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Untersuchungskollektiven für diese Antikörper zeigen (p = n. s., Tab. 3.14, Abb. 3.33).

Tab. 3.14: ß-Casein A1-Antikörperkonzentrationen (Mittelwerte) bei Eltern und Kontrollpersonen.

	Eltern	Kontrollpersonen
Casein A1 =	900	830
SEM (+/-) =	52	118
n =	473	97

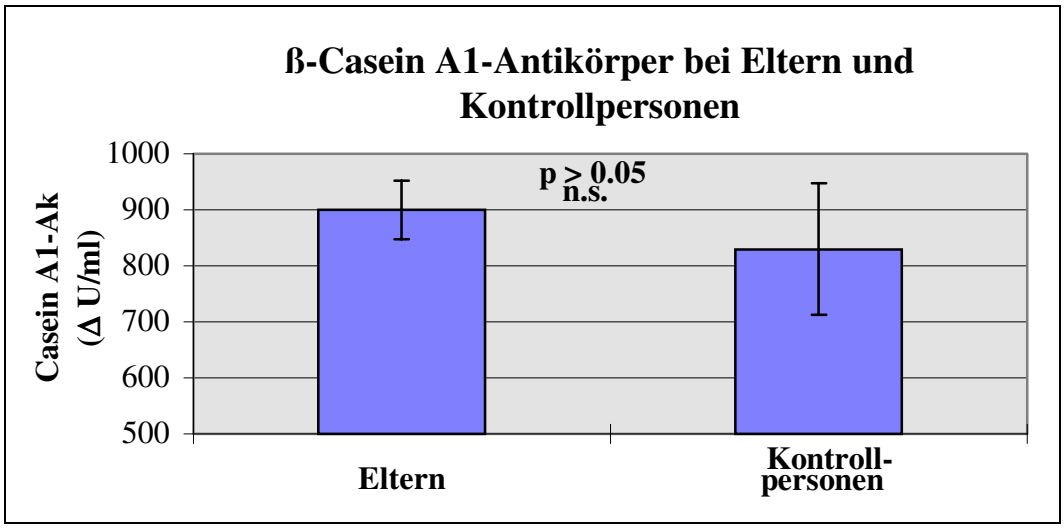

Abb. 3.33: ß-Casein A1-Antikörper bei Eltern und Kontrollpersonen. Angegeben sind Mittelwerte und SEM.

Auch in den verschiedenen Altersklassen zeigten Eltern der Typ 1-Diabetiker im Vergleich zu Kontrollpersonen keinen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich der Casein A1-Antikörper. Abbildung 3.34 stellt die Antikörperkonzentrationen in den verschiedenen Altersklassen dar.

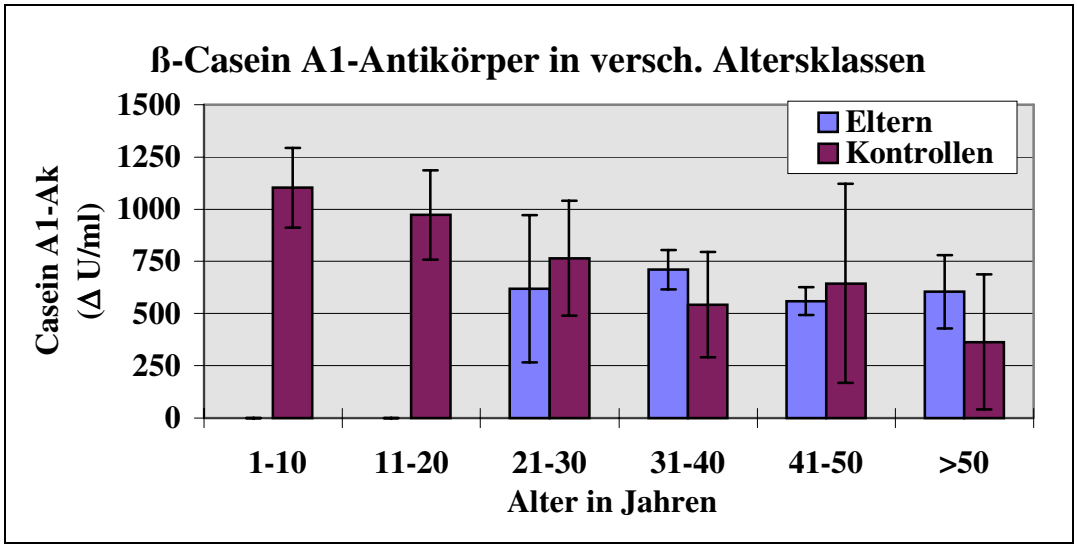

Abb. 3.34: ß-Casein A1-Antikörper in verschiedenen Altersklassen bei Eltern und Kontrollpersonen. Angegeben sind Mittelwerte und SEM.

3.2.2 Vergleichende Darstellung der ß-Casein A2-Antikörper

3.2.2.1 Typ 1-Diabetiker und ihre Geschwister

Typ 1-Diabetiker und ihre Geschwister unterscheiden sich bezüglich der A2-Variante des ß-Caseins nicht. Zwischen den beiden Untersuchungskollektiven ließ sich wie auch bei der A1-Variante des ß-Caseins kein statistisch signifikanter Unterschied feststellen (p = 0.227, Tab. 3.15, Abb. 3.35).

Tab. 3.15: ß-Casein A2-Antikörperkonzentrationen (Mittelwerte) bei Diabetikern und ihren Geschwistern.

	Typ 1-Diabetiker	Geschwister
Casein A2 =	1104	1050
SEM (+/-) =	64	60
n =	287	380

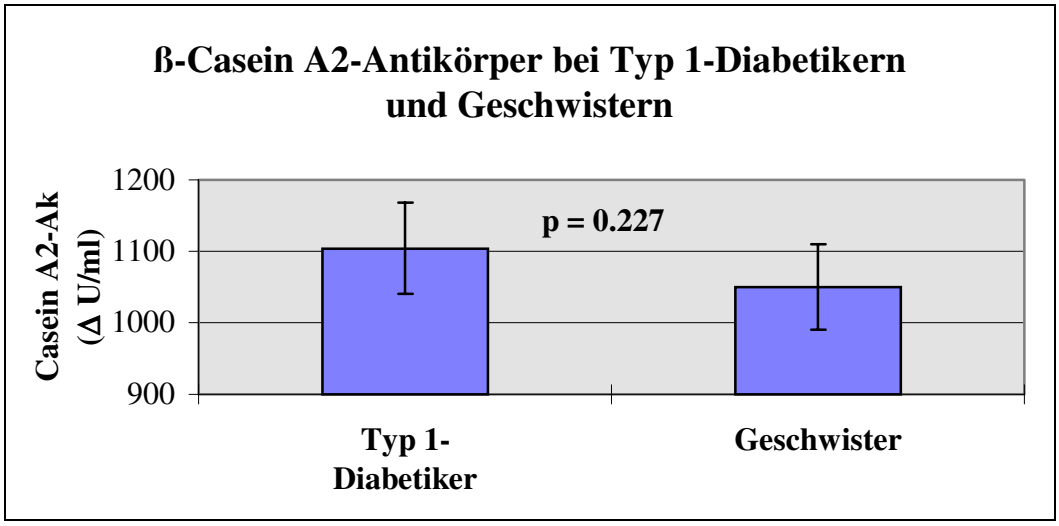

Abb. 3.35: ß-Casein A2-Antikörper bei Diabetikern und ihren Geschwistern. Angegeben sind Mittelwerte und SEM.

In keiner untersuchten Altersklasse waren die ß-Casein A2 Antikörper bei Typ 1-Diabetikern in statistisch signifikant höheren Konzentrationen nachzuweisen als bei ihren Geschwistern. Graphisch dargestellt ist dies in Abbildung 3.36.

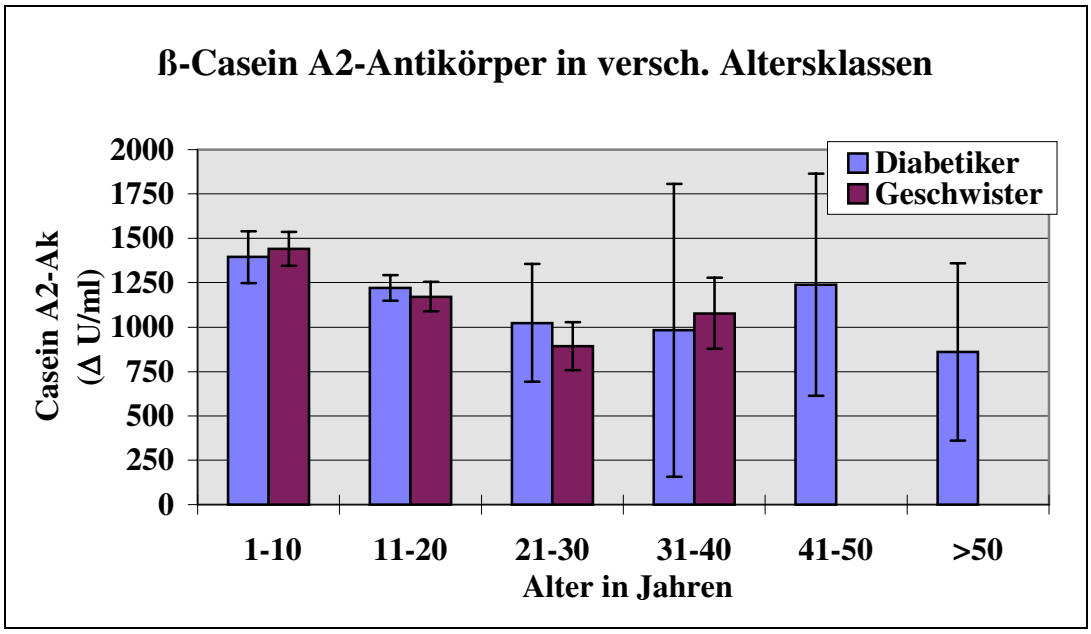

Abb. 3.36: ß-Casein A2-Antikörper in verschiedenen Altersklassen bei Diabetikern und ihren Geschwistern. Angegeben sind Mittelwerte und SEM.

3.2.2.2 Typ 1-Diabetiker und ihre Eltern

Antikörper gegen die A2-Variante des ß-Caseins der Kuhmilch ließen sich bei Typ 1-Diabetikern im Vergleich zu ihren Eltern statistisch signifikant in höheren Konzentrationen nachweisen (p = 0.015, Tab. 3.16, Abb. 3.37).

Tab. 3.16: ß-Casein A2-Antikörperkonzentrationen (Mittelwerte) bei Diabetikern und ihren Eltern.

	Typ 1-Diabetiker	Eltern
Casein A2 =	1104	904
SEM (+/-) =	64	50
n =	287	473

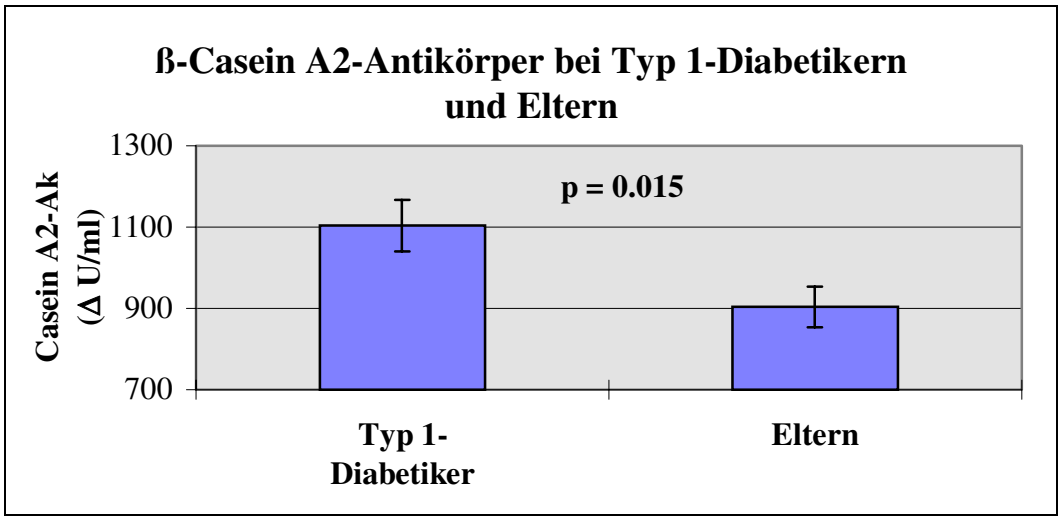

Abb. 3.37: ß-Casein A2-Antikörper bei Diabetikern und ihren Eltern. Angegeben sind Mittelwerte und SEM.

3.2.2.3 Typ 1-Diabetiker und Kontrollpersonen

Typ 1 Diabetiker im Vergleich zu Kontrollpersonen wiesen im Titer einen statistisch signifikanten Unterschied gegen das ß-Casein A2 der Kuhmilch auf (p = 0.015, Abb. 3.38). Verglichen mit den Konzentrationen der ß-Casein A1-Antikörper waren die ß-Casein A2-Antikörper bei Diabetikern niedriger, während sie sich bei den Kontrollpersonen in höheren Konzentrationen nachweisen ließen (Tab. 3.11 und 3.17).

Tab. 3.17: ß-Casein A2-Antikörperkonzentrationen (Mittelwerte) bei Diabetikern und Kontrollpersonen.

	Typ 1-Diabetiker	Kontrollpersonen
Casein A2 =	1104	952
SEM (+/-) =	64	119
n =	287	97

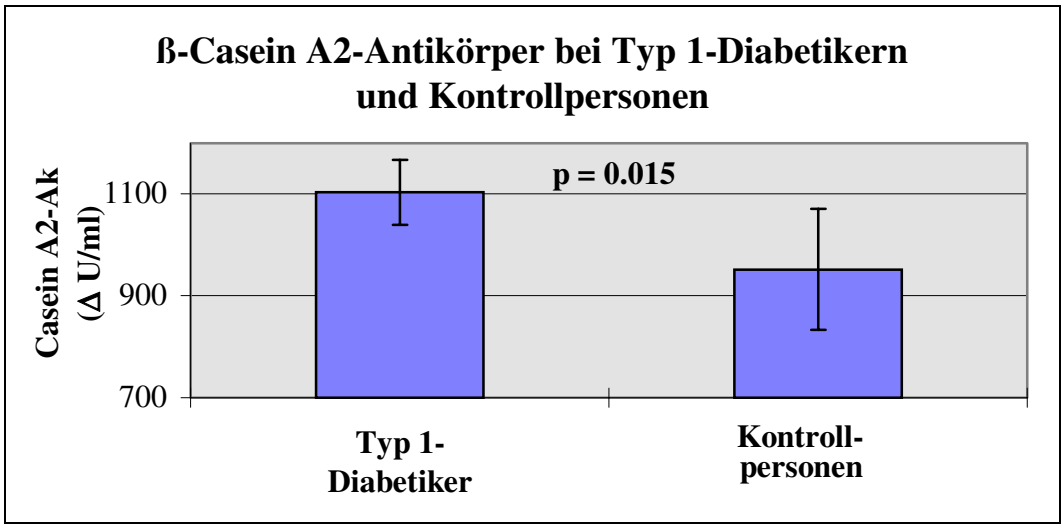

Abb. 3.38: ß-Casein A2-Antikörper bei Diabetikern und Kontrollpersonen. Angegeben sind Mittelwerte und SEM.

Auch in den verschiedenen Altersklassen konnten höhere Antikörperkonzentrationen gegen die A2-Variante des ß-Caseins bei Typ 1-Diabetikern als bei Kontrollpersonen nachgewiesen werden. In jeder einzelnen Altersklasse zeigten die Diabetiker höhere Konzentrationen als die Kontrollen, wobei die Differenzen ein statistisch signifikantes Niveau jedoch nicht erreichten. Der Zusammenhang wird in Abbildung 3.39 gezeigt.

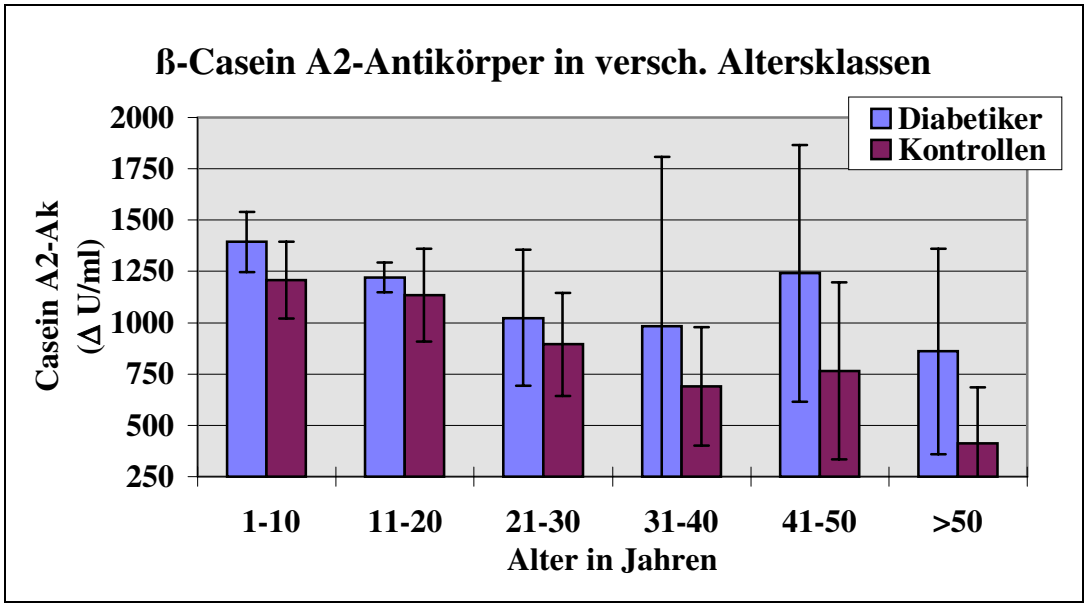

Abb. 3.39: ß-Casein A2-Antikörper in verschiedenen Altersklassen bei Diabetikern und Kontrollpersonen. Angegeben sind Mittelwerte und SEM.

3.2.2.4 Geschwister und ihre Eltern

So wie sich Typ 1-Diabetiker von ihren Eltern unterscheiden (Abb. 3.37), differieren auch die Geschwistern der Typ 1-Diabetiker von ihren Eltern. Antikörper gegen das ß-Casein A2 konnten auch hier in statistisch signifikant höheren Konzentrationen bei den Geschwistern demonstriert werden als bei ihren Eltern (p = 0.015, Tab. 3.18, Abb. 3.40).

Tab. 3.18: ß-Casein A2-Antikörperkonzentrationen (Mittelwerte) bei Geschwistern und ihren Eltern.

	Geschwister	Eltern
Casein A2 =	1050	904
SEM (+/-) =	60	50
n =	380	473

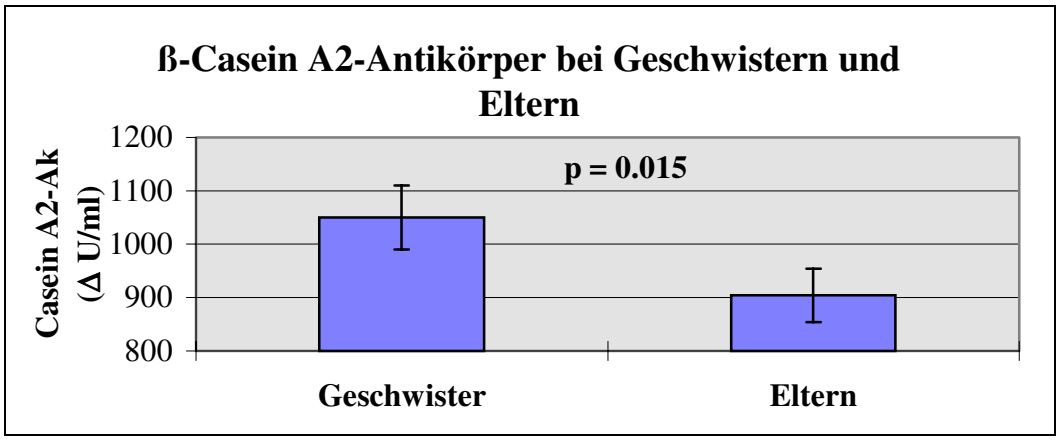

Abb. 3.40: ß-Casein A2-Antikörper bei Geschwistern und ihren Eltern. Angegeben sind Mittelwerte und SEM.

3.2.2.5 Geschwister und Kontrollpersonen

Antikörper gegen die A2-Variante des ß-Caseins ließen sich bei Geschwistern im Vergleich zu Kontrollpersonen in höheren Konzentrationen nachweisen. Dieser Unterschied zeigte statistische Signifikanz (p = 0.015,Tab. 3.19, Abb. 3.41).

Tab. 3.19: ß-Casein A2-Antikörperkonzentrationen (Mittelwerte) bei Geschwistern und Kontrollpersonen.

	Geschwister	Kontrollpersonen
Casein A2 =	1050	952
SEM (+/-) =	60	119
n =	380	97

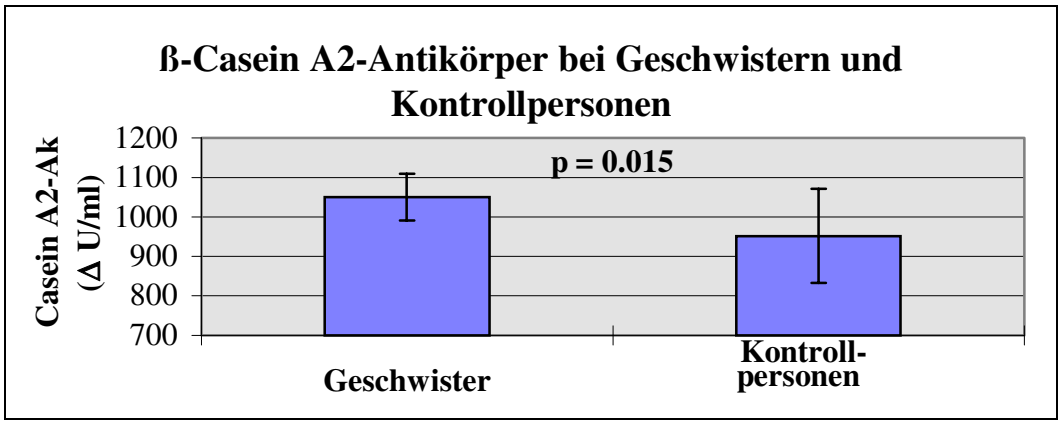

Abb. 3.41: ß-Casein A2-Antikörper bei Geschwistern und Kontrollpersonen. Angegeben sind Mittelwerte und SEM.

In der Abbildung 3.42 sind die ß-Casein A2-Antikörperkonzentrationen in den verschiedenen Altersklassen dargestellt. Obwohl eine Tendenz zu höheren Konzentrationen insbesondere in der Altersklasse 31-40 Jahre zu beobachten war, erreichten die Differenzen kein statistisch signifikantes Niveau.

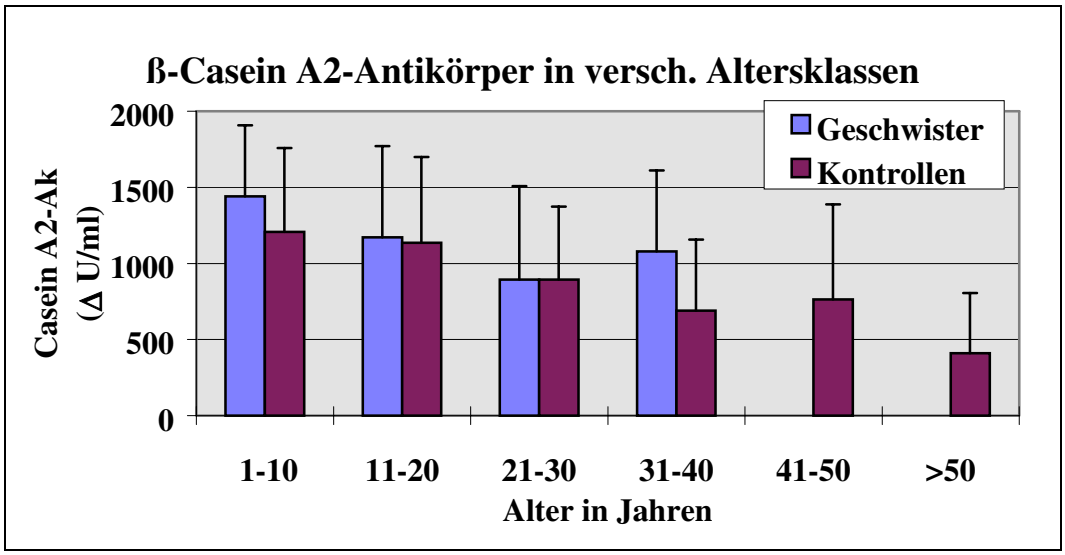

Abb. 3.42: ß-Casein A2-Antikörper in verschiedenen Altersklassen bei Geschwistern und Kontrollpersonen. Angegeben sind Mittelwerte und SEM.

3.2.2.6 Eltern und Kontrollpersonen

Antikörper gegen die A2-Variante des ß-Caseins waren, wie auch schon gegen die A1-Variante, bei Eltern statistisch nicht in höheren Konzentrationen nachzuweisen als bei Kontrollpersonen ($p > 0.05$, Tab. 3.20, Abb. 3.43).

Tab. 3.20: ß-Casein A2-Antikörperkonzentrationen (Mittelwerte) bei Eltern und Kontrollpersonen.

	Eltern	Kontrollpersonen
Casein A2 =	904	952
SEM (+/-) =	50	119
n =	473	97

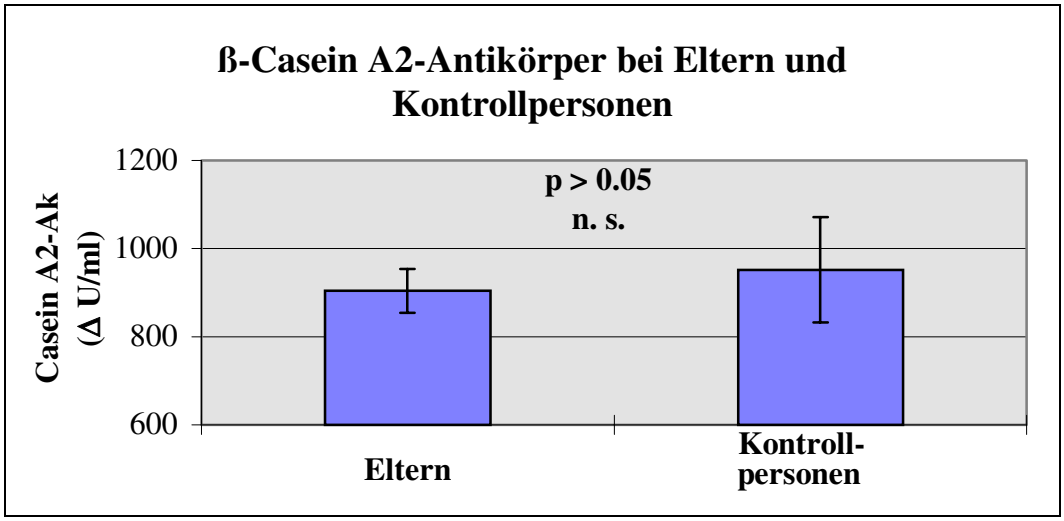

Abb. 3.43: ß-Casein A2-Antikörper bei Eltern und Kontrollpersonen. Angegeben sind Mittelwerte und SEM.

Auch in den verschiedenen Altersklassen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Eltern und Kontrollpersonen nachgewiesen werden. Abbildung 3.44 verdeutlicht die Antikörperkonzentrationen in den verschiedenen Altersklassen.

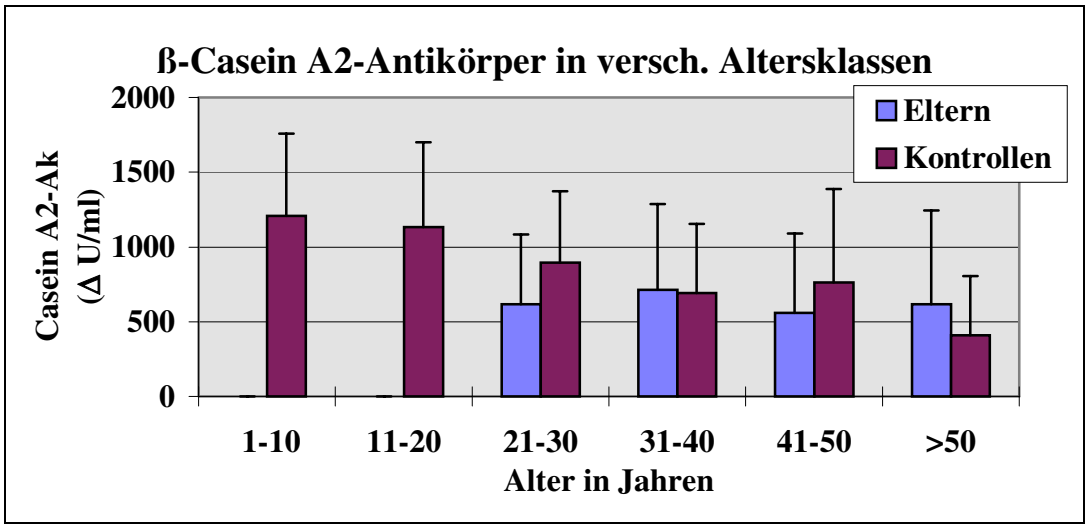

Abb. 3.44: ß-Casein A2-Antikörper in verschiedenen Altersklassen bei Eltern und Kontrollpersonen. Angegeben sind Mittelwerte und SEM.

3.2.3 Unterschiedliche Bindung der Seren an die A1- oder A2-Variante des ß-Caseins

Die jeweiligen Höhen der ß-Casein A1- und A2-Antikörperkonzentrationen differierten in allen vier untersuchten Gruppen (Typ 1-Diabetiker, Geschwister, Eltern und Kontrollpersonen) voneinander.

Deshalb wurden die Mittelwerte der ß-Casein A1-Antikörperkonzentrationen von den Mittelwerten der ß-Casein A2-Antikörperkonzentrationen in den einzelnen Gruppen subtrahiert.

Sowohl für die Diabetiker als auch für die Geschwister ließ sich eine positive Differenz ermitteln, d.h. ß-Casein A1-Antikörper waren hier in einer höheren Konzentration vorhanden als ß-Casein A2-Antikörper. Im Gegensatz dazu wiesen Eltern und insbesondere die Kontrollpersonen eine negative Differenz auf. Hier war die Bindung an die ß-Casein A2-Variante größer als an die ß-Casein A1-Variante.

Die minimale negative Differenz der Seren von Eltern zeigt, daß eine bevorzugte Bindung an die A1- bzw. A2-Variante nicht so deutlich ausgeprägt ist wie bei den Diabetikern, Geschwistern oder Kontrollpersonen.

Insgesamt war der Unterschied einer präferentiellen Bindung entweder an das ß-Casein A1 oder A2 zwischen den vier untersuchten Gruppen statistisch hoch signifikant ($p < 0.001$).

In der Abbildung 3.45 ist dieser Zusammenhang graphisch dargestellt.

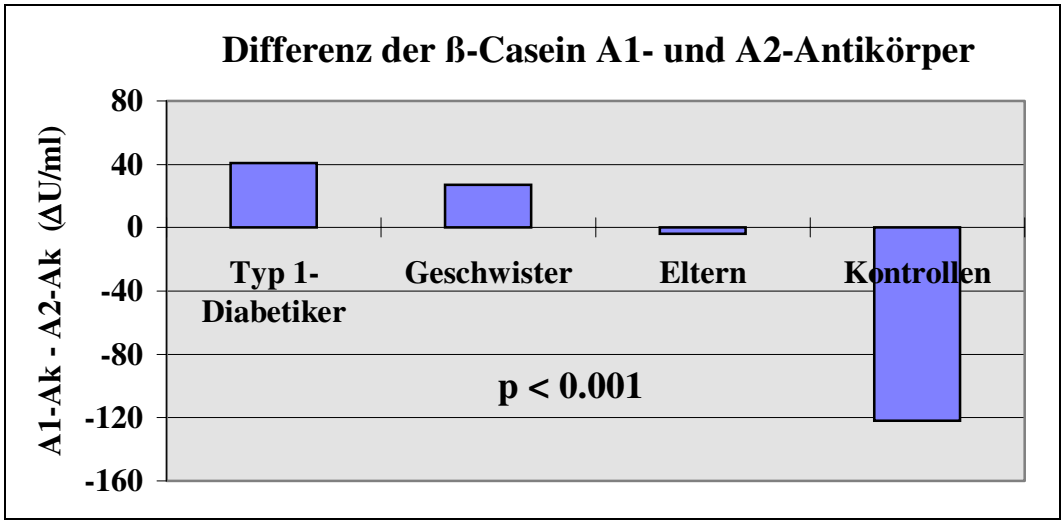

Abb. 3.45: Differenz der ß-Casein A1- und A2-Antikörper in den verschiedenen Gruppen. Angegeben sind die Differenzen der Mittelwerte, $p < 0.001$.

4. DISKUSSION

4.1 ELISA zum Nachweis von ß-Casein-Antikörpern

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

ß-Casein A1- und A2-Antikörper sind zuvor bei Diabetikern jedoch noch nie im Rahmen einer prospektiven Familienstudie untersucht worden. In der vorliegenden Arbeit wurden die ß-Casein-Antikörper mit Hilfe eines ELISA bestimmt.
Hierbei handelt es sich um einen Festphasenassay, bei dem es nach der Antigenbindung an die Festphase zu einer Bindung der Antikörper an das Antigen kommt. Vorversuche zu diesem ELISA, der die valide und spezifische Bestimmung der ß-Casein A1- und A2-Antikörper ermöglicht, sind in der Dissertationsarbeit von Hermann E. Wasmuth beschrieben, wobei die wichtigsten Einflußgrößen im folgenden kurz erwähnt werden.

Wichtig für die Spezifität des Assays erscheint insbesondere die optimale Antigenkonzentration, die in dieser Studie bei 10 µg Casein / ml lag und so zur maximalen Bindung der Antikörper führte.
Ein Problem aller Antikörper-Bestimmungen mit einem ELISA stellt die unspezifische Bindung dar. Diese Problematik wurde schon in anderen Publikationen erörtert (*Goldman et al. 1978, Reeves 1980*). Einige Autoren führten eine Korrektur der unspezifischen Bindung durch (*Goldman et al. 1978*), während andere ihre Ergebnisse ohne Berichtigung beließen (*Reeves 1980*). Da die unspezifische Bindung von Patient zu Patient und selbst auch bei demselben Patienten variieren kann (*Storms et al. 1986*), wurden in dieser Arbeit zum einen Doppelbestimmungen sowohl der spezifischen als auch der unspezifischen Bindung durchgeführt, um größere Schwankungen in der Antikörperbindung

rechtzeitig zu bemerken. Zum anderen wurde jede einzelne Serumprobe durch Subtraktion des arithmetischen Mittelwertes der unspezifischen von der spezifischen Bindung korrigiert. Das Ergebnis der Antikörperbindung der jeweiligen Serumprobe wurde dann in Δ Units / ml wiedergegeben.
Zusätzlich wurde eine hohe Serumverdünnung (1:100) gewählt, um die unspezifische Bindung möglichst auf ein Minimum zu reduzieren.

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

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

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

4.2 ß-Casein A1- und A2-Antikörper

In dieser Studie wurden erstmals bei Typ 1-Diabetikern und ihren Verwandten ersten Grades Antikörper gegen die zwei häufigsten genetischen Varianten des ß-Caseins systematisch untersucht.
ß-Casein A1 und A2 unterscheiden sich nur in einer Aminosäure an Position 67. An der A1-Variante befindet sich die Aminosäure Histidin, die bei der A2-Variante durch die Aminosäure Prolin ersetzt ist (*Eigel et al. 1984*).

Aufgrund der selektiven Durchlässigkeit der Darmmukosa für tryptische Fragmente des bovinen ß-Caseins in den ersten Lebensmonaten ist eine Immunisierung des Individuums mit dem Hexapeptid des ß-Casein Moleküls, welches sich an Position 63 - 68 befindet, möglich. Wegen der bekannten immunologischen Aktivität wird es auch als „immunmodulatorisches Peptid“ bezeichnet (*Migliore-Samour et al. 1988*). Eine Bindung dieser Hexapeptide an immunkompetente Zellen wurde bereits dargestellt (*Jaziri et al. 1992*).
Es kann deshalb prinzipiell von einer Antikörperantwort gegen das ß-Casein ausgegangen werden. Da die beiden ß-Casein Varianten A1 und A2 in der Aminosäurebesetzung der Position 67 variieren, besteht die Möglichkeit, daß dieses „immunmodulatorische Peptid“ eine verschieden stark ausgeprägte Antikörper-Antwort induziert. Deshalb ist es sinnvoll, ß-Casein A1- und A2-Antikörper getrennt voneinander zu bestimmen.

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

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

Mit steigendem Lebensalter nahm die ß-Casein A1- und A2-Antikörperkonzentration ab.
Der Grund für diese Altersabhängigkeit ist vermutlich in der generellen kindlichen Reaktion auf immunologische Stimuli zu suchen. Verschiedene Untersuchungen belegen, daß die Immunantwort auf unterschiedliche Antigene bei Kindern im allgemeinen verstärkt ist (*Karjalainen et al. 1986, Mc Evoy et al. 1986*). Die Ergebnisse einer verstärkten kindlichen Immunantwort werden dadurch unterstützt, daß in der Gruppe der Eltern die Altersabhängigkeit zwar auch vorhanden, jedoch weitaus geringer ausgeprägt ist.

Die zweite zentrale Aussage dieser Studie ist der unterschiedlich hohe Antikörper-Titer in den einzelnen Gruppen. In absteigender Reihenfolge präsentieren sich die vier untersuchten Gruppen auf folgende Weise: Diabetiker, Geschwister, Eltern und Kontrollen. Die Typ 1-Diabetiker haben die höchsten ß-Casein A1- und A2-Antikörperkonzentrationen, während bei der Kontrollgruppe die niedrigsten Werte gemessen wurden.
Die negative Korrelation von ß-Casein A1- und A2-Antikörpern mit dem Lebensalter der Probanden kann zum Teil die höhere Prävalenz dieser Antikörper bei Diabetikern und Geschwistern im Vergleich zu Eltern und Kontrollpersonen erklären, da den beiden erstgenannten Gruppen auch die jüngsten Teilnehmer der Studie angehören.
Daß diese Abhängigkeit aber dennoch einen eigenständigen, unabhängigen Faktor darstellt und nicht nur durch die Altersabhängigkeit erklärt werden kann, läßt sich aus folgenden Beobachtungen herleiten: Bei gleichem Durchschnittsalter der Diabetiker und Geschwister liegt die Antikörperkonzentration der Diabetiker tendentiell höher, wenn auch nicht statistisch signifikant. Außerdem weisen auch Eltern mit einem Durchschnittsalter von 43 Jahren tendentiell höhere (aber statistisch nicht signifikante) Antikörperkonzentrationen auf als die jüngere Kontrollgruppe mit einem Durchschnittsalter von 22 Jahren, obwohl bei alleiniger Altersabhängigkeit ein umgekehrtes Ergebnis erwartet worden wäre.

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

voraussichtlich Resultat einer von diesen Antikörpern unabhängigen Immunantwort.

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

Bei einem Vergleich der ß-Casein A1- und A2-Antikörper zwischen den verschiedenen Gruppen, in denen der Einfluß des Alters durch eine entsprechende Alterskorrektur in einer Covarianzanalyse aufgehoben wurde, unterschieden sich Diabetiker von ihren Eltern und Kontrollpersonen hoch signifikant bzw. signifikant. Ebenso unterschieden sich die Geschwister verglichen mit ihren Eltern und Kontrollpersonen hoch signifikant bzw. signifikant.
Im Gegensatz dazu war zwischen Diabetikern und ihren Geschwistern sowie zwischen Eltern und Kontrollpersonen statistisch kein Unterschied bezüglich der ß-Casein A1- und A2-Antikörperkonzentrationen nachweisbar.

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

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

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

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

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

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

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

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

4.3 Unterschiedliche Bindung der Seren an die A1- oder A2-Variante des ß-Caseins

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Typ 1-Diabetikern und ihren Geschwistern vermehrt Antikörper gegen die A1-Variante des ß-Caseins aufweisen, deuten möglicherweise darauf hin, daß vor allem der A1-Variante eine besondere Rolle in Bezug auf die Pathogenese des Diabetes zuzuschreiben ist.
Dagegen könnte der A2-Variante des ß-Caseins, die bei Supplementierung zur Nahrung die Manifestation des Diabetes im Tiermodell verhindert, und die in dieser Studie bevorzugt an Seren von gesunden Kontrollpersonen bindet, unter Umständen eine protektive Rolle zukommen.
Es wäre mit Sicherheit interessant, ß-Casein Antikörper bei der mit A1 bzw. A2 gefütterten NOD-Maus zu bestimmen, um so einen engeren Zusammenhang zwischen alimentär zugeführten ß-Casein und der humoralen Immunantwort der Maus herzustellen.

Weitere Hinweise auf eine Beteiligung von Kuhmilchbestandteilen an der Pathogenese des Typ 1-Diabetes mellitus liefern Beobachtungen epidemiologischer Art.
Eine starke Korrelation zwischen steigendem Kuhmilchkonsum und der gleichzeitig steigenden Diabetesinzidenz ist festgestellt worden (*Dahl-Jorgensen et al. 1991*).
Überdies zeigten Migrationsstudien ein Fehlen des Typ 1-Diabetes mellitus in West Samoa. Wandern jedoch Teile dieser Bevölkerung nach Neuseeland aus, beträgt die Diabetesinzidenz 10 Fälle pro 100.000 Personen und Jahr (*Elliott 1994*). Interessanterweise gibt es in West Samoa keinerlei Kühe, so daß auch hierdurch wieder die Hypothese der Kuhmilch als möglicher Faktor in der Pathogenese des Diabetes mellitus unterstrichen wird.
Migrationsstudien mit anderen ethnischen Gruppen, z. B. Asiaten, die nach Großbritannien emigrieren, spiegeln analoge Ergebnisse wider (*Elliott et al. 1989, Drash 1990, Bodansky et al. 1992, Lipton et al. 1995*). So untersuchten Bodansky und Mitarbeiter 151 Kinder in Großbritannien, von denen 26 asiatischen Ursprungs waren. Asiatische Familien zeigten eine ansteigende Diabetesinzidenz bei den Kindern, die in Großbritannien geboren waren. Außerdem verdoppelte sich die Inzidenz mit 4,4/100.000 pro Jahr von 1978-84 auf 9,1/100.000 pro Jahr von 1985-90. Diese Inzidenz war nahezu identisch mit der Inzidenz für nicht-

asiatische Kinder in der gleichen Region von Großbritannien. Die asiatischen Kinder scheinen hier einem Umweltfaktor ausgesetzt zu sein, zu dem sie vor der Migration keinen Kontakt hatten.
Eine weitere Studie vom Elliott und Mitarbeitern scheint die in der vorliegenden Arbeit gefundene differierende Wertigkeit von ß-Casein A1- und A2-Antikörpern zu stützen. So basiert die Ernährung des Massai-Volkes in Ostafrika hauptsächlich auf Kuhmilchprodukten (*Elliott et al. 1995*). Jedoch entwickeln überraschenderweise entgegen der Annahme, daß ein Zusammenhang zwischen Kuhmilchkonsum und Diabetes besteht (*Dahl-Jorgensen et al. 1991*), nur wenige Personen einen Diabetes. Als Erklärungsmöglichkeit dient die Tatsache, daß die Milch, die von den Massai konsumiert wird, von der Rinderrasse „Bos indicus", einer Zebu Art, stammt. Die Milch dieser Kuhart enthält kein ß-Casein A1, sondern fast ausschließlich die A2-Variante des ß-Caseins (*Ng-Kwai-Hang et al. 1992*).

In den letzten Jahren werden in der westlichen Welt immer häufiger Milchviehrassen gezüchtet, deren Milch weniger Fett und mehr Protein enthält. Diese Kühe produzieren durchschnittlich aber mehr ß-Casein A1 als die herkömmlichen Herden. Die sog. „A2 Kuh", welche z. B. die vorherrschende Rasse in Afrika ist, ist aufgrund des hohen Fettgehalts nicht mehr erwünscht.
Überdies besteht verstärkt die Tendenz zur Einnutzungsrasse, zu der bei den Milchrassen unter anderem die Holstein-Friesen Kuh, eine Abstammung vom Bos taurus, zählt (*Kielwein 1994*), deren Milch hauptsächlich die A1-Variante des ß-Caseins enthält. Die vermehrte geographische Verbreitung dieses Rindertypes in Europa und parallel dazu der gleichzeitige Anstieg der Diabetesinzidenz (*Sebastiani et al. 1996*) könnte einen Zusammenhang bedeuten.
Dies könnte den Anstieg der Diabetesinzidenz in Ländern erklären, in denen zur selben Zeit das selektive Züchten von diesen modernen Milchkühen begonnen hat.
Im Tierversuch mit NOD-Mäusen konnte gezeigt werden, daß Casein von der indischen Kuh (Bos indicus), welches als 10 % -ger Zusatz einer auf Soja basierenden Kindernahrung (Prosobee) dazugegeben wurde, keinen Diabetes verursacht. Prosobee alleine ist nicht diabetogen. Auf der anderen Seite wirkt

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

4.4 Mögliche pathogenetische Bedeutung von ß-Casein A1 im Zusammenhang mit dem Typ 1-Diabetes mellitus

Für einen Zusammenhang zwischen der Zufuhr von ß-Casein A1 und der Entwicklung eines Typ 1-Diabetes kann folgende Hypothese entwickelt werden:
Bei einem genetisch prädisponierten Menschen kommt es bei vorzeitiger alimentärer Casein A1-Aufnahme im frühen Kindesalter zu einer Sensibilisierung gegen ß-Casein. Dies tritt nur bei A1-Caseinen auf, da sich durch das Histidin in Position 67 eine zusätzliche Cleavage-Stelle ergibt und somit A1-Casein zu Casomorphinen abgebaut werden kann (*Becker 1995, unveröffentlichte Daten, persönliche Mitteilung*). Diese Casomorphine dringen durch die beim Neugeborenen noch nicht suffiziente Darm-Blut-Schranke in die Peyerschen Plaques und führen hier zu einer Sensibilisierung der Lymphozyten.
Nach dieser Sensibilisierung beim genetisch Prädisponierten könnte es nun nach einer langen Latenzphase im Rahmen eines viralen Infekts oder durch andere exogene Noxen zu einer Aktivierung der sensibilisierten Lymphozyten kommen und so zum Anstoßen der für die Beta-Zelle letalen Autoimmunkaskade kommen.
Stillen in den ersten 3 Lebensmonaten vermindert zum einen die Zufuhr von ß-Casein A1 (*Gerstein 1994*), da das immunstimulierende Hexapeptid des humanen Caseins eine völlig andere Aminosäurenzusammensetzung enthält als das bovine Casein (*Elliott 1994*). Zum anderen führen immunsuppressive Faktoren im Colostrum und in der transitorischen Milch zu einer Immuntoleranz im Sinne einer verbesserten Self- / Non-Self-Diskrimination (*Minchewa et al. 1990, Mandalapu et al. 1995*).

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

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

Um jetzt bereits ß-Casein-Antikörper als serologische Marker in der präklinischen Phase des Typ 1-Diabetes mellitus verwenden zu können bzw. um zu klären, inwiefern ß-Casein-Antikörper als prädiktive Marker verwertbar sind, erfordert es weitere Untersuchungen.
Zum einen ist es wichtig, einen Normalwert im Kindesalter bei gesunden Kontrollpersonen zu bestimmen. Zusätzlich müßten mit Hilfe einer prospektiven Familienstudie bei den genetisch prädisponierten Geschwistern von Typ 1-Diabetikern ß-Casein A1- und A2-Antikörper über einen langen Zeitraum bestimmt werden. Dies ist erforderlich um herauszufinden, ob es bei bestimmten Antikörpertitern zur Manifestation des insulinpflichtigen Diabetes mellitus kommt.
Darüber hinaus erscheint es erstrebenswert, Antikörper gegen die häufigsten genetischen Varianten des ß-Caseins in noch größeren Probandengruppen sowie im Tierversuch weiter zu verfolgen. Dies verspricht außerdem, Einblick zu geben in die dem Diabetes mellitus zugrunde liegenden Pathomechanismen.
Auch wenn ß-Casein vielleicht nur eine additive Rolle in der multifaktoriellen Genese der chronisch progredienten Autoimmunerkrankung des Typ 1-Diabetes mellitus spielt, erscheint es doch aufgrund der Beobachtungen der präferentiellen Bindung der Seren von Diabetikern und ihren Geschwistern an die A1-Variante in dieser Studie wichtig zu sehen, ob eine ß-Casein A1-freie Ernährung die Diabetesinzidenz auch beim Menschen reduzieren kann.

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

5. ZUSAMMENFASSUNG

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

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

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

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

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

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

Während keine Korrelation mit der Dauer der Erkrankung demonstriert werden konnte, war aber die Antikörperhäufigkeit streng signifikant korreliert mit dem Manifestationsalter. Es zeigten sich höhere Antikörpertiter bei Diabetikern, deren Erkrankung sich in jüngeren Jahren manifestierte.
Weder Casein A1- noch A2-Antikörper waren mit dem Geschlecht, mit ICA oder IAA korreliert.

Bei Betrachtung der ß-Casein A1- und A2-Antikörper zwischen den verschiedenen Gruppen unterscheiden sich Diabetiker von ihren Eltern und Kontrollpersonen hoch signifikant bzw. signifikant. Ebenso unterscheiden sich die Geschwister verglichen mit ihren Eltern und Kontrollpersonen hoch signifikant bzw. signifikant.
Im Gegensatz dazu war zwischen Diabetikern und ihren Geschwistern sowie zwischen Eltern und Kontrollpersonen statistisch kein Unterschied bezüglich der ß-Casein A1- und A2-Antikörperkonzentrationen nachweisbar.

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

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

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

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

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

6. LITERATUR

1.) Achi-R, Dac-Cam-P, Forsum-U, Karlsson-K, Saenz-P, Mata-L, Lindberg-A
Titres of class-specific antibodies against Shigella and Salmonella lipopolysaccharide antigens in colostrum and breast milk of Costa Rican, Swedish and Vietnamese mothers
J Infect 1992, 25: 89-105

2.) Ahmed-T, Kamota-T, Sumazaki-R, Shibasaki-M, Hirano-T, Takita-H
Circulating antibodies to common food antigens in Japanese children with IDDM
Diabetes Care 1997, 20: 74-76

3.) Atkinson-M, Bowman-M, Kao-K, Campbell-L, Dush-P, Shah-S, Simell-O, Maclaren-N
Lack of immune responsiveness to bovine serum albumin in insulin-dependent diabetes
N Engl J Med 1993, 329: 1853-1858

4.) Atkinson-M, Maclaren-N, Scharp-D, Lacy-P, Riley-W
64.000 M_r autoantibodies as predictors of insulin-dependent diabetes
Lancet 1990, 335: 1357-1360

5.) Awata-T, Kuzuya-T, Matsuda-A, Iwamoto-Y, Kanazawa-Y, Okuyama-M, Juji-T
High frequency of aspartic acid at position 57 of HLA-DQ ß-chain in Japanese IDDM patients and nondiabetic subjects
Diabetes 1990, 39: 266-269

6.) Bach-J, Boitard-C
Experimental models of Type 1 diabetes
Path and Immunopath Res 1986, 5: 384-415

7.) Baekkeskov-S, Aanstoot-H, Christgau-S, Reetz-A, Solimena-M, Cascalho-M, Folli-F, Richter-Olesen-H, de Camilli-P
Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase
Nature 1990, 347: 151-156

8.) Baekkeskov-S, Landin-M, Kristensen-J, Srikanta-S, Bruining-G, Mandrup-Poulsen-T, de Beaufort-C, Soeldner-J, Eisenbarth-G, Lindgren-F, Sundquist- G, Lernmark-A
Antibodies to a 64.000 M_r human islet cell antigen precede the clinical onset of insulin-dependent diabetes
J Clin Invest 1987, 79: 926-934

9.) Baekkeskov-S, Nielsen-J, Marner-B, Bilde-T, Ludvigsson-J, Lernmark-A
Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins
Nature 1982, 298: 167-169

10.) Bärmeier-H, McCulloch-D, Neifing-J, Warnock-G, Rajotte-R, Palmer-J, Lernmark-A
Risk for developing type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus and the presence of islet 64K antibodies
Diabetologia 1991, 34: 727-733

11.) Barnett-A, Eff-C, Leslie-R, Pyke-D
Diabetes in identical twins: a study of 200 pairs
Diabetologia 1981, 20: 87-93

12.) Becker-F, Buschler-H, Bretzel-R, Federlin-K
Thyroid antibodies and thyroid dysfunction in patients with type 1 diabetes and their first degree relatives
In: W. Scherbaum (Ed.): Autoimmunthyreoditis
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1991, 15-19

13.) Becker-F, Buschler-H, Scherer-S, Petzoldt-H, Sauer-H, Bretzel-R, Federlin-K
Identifying the pre-diabetic state in type 1 diabetics: Condition for early intervention
J Autoimmunity 1990, 3: 639-642

14.) Becker-F, Helmke-K, Bretzel-R, Seggewiss-K, Sauer-H, , Federlin-K
Inselzell-(ICA), Insulin-(IAA) und andere Autoantikörper bei Typ 1-Diabetikern und ihren Familien
Gesellschaft für Innere Medizin 1988, 94: 1-6

15.) Becker-F, Helmke-K, Seggewiss-K, Sauer-H, , Federlin-K
Inselzell (ICA)- und Insulin (IAA)- sowie andere Autoantikörper als Marker der Autoimmunität bei Typ 1-Diabetikern und ihren Verwandten 1. Grades
Akt Endokr Stoffw 1989, 10: 37-41

16.) Beppu-H, Winter-W, Atkinson-M, Maclaren-N, Fujita-K, Takahashi-H
Bovine albumin antibodies in NOD mice
Diabetes Research 1987, 6: 67-69

17.) Betterle-C, Zanette-F, Pedini-B, Presotto-F, Rapp-L, Monciotti-C, Rigon-F
Clinical and subclinical autoimmune manifestations in type 1 (insulin dependent) diabetic patients and their first degree relatives
Diabetologia 1984, 26: 431-436

18.) Bodansky-H, Dean-B, Bottazzo-G, Grant-P, McNally-J, Hambling-M, Wales-J

Islet-cell antibodies and insulin autoantibodies in association with common viral infections
Lancet 1986, 2: 1351-1353

19.) Bodansky-H, Staines-A, Stephenson-C, Haigh-D, Cartwright-R
Evidence for an environmental effect in the etiology of insulin dependent diabetes mellitus in a transmigratory population
Br Med J 1992, 304: 1020-1022

20.) Bodington-M, McNally-P, Burden-A
Cow´s milk and type 1 diabetes: no increase in risk
Diabetic Med 1994, 11: 663-665

21.) Boitard-C, Bonifacio-E, Bottazzo-G, Gleichmann-H, Molenaar-J
Immunology and diabetes workshop: Report on the third international (stage 3) workshop on the standardisation of cytoplasmic islet cell antibodies
Diabetologia 1988, 31: 451-452

22.) Bonifacio-E, Dawkins-R, Lernmark-A
Immunology and diabetes workshop: Report on the second international workshop on the standardisation of cytoplasmic islet cell antibodies
Diabetologia 1987, 30: 273

23.) Borch-Johnson-K, Joner-G, Mandrup-Poulsen-T, Christy-M, Zachau-Christiansen-B, Kastrup-K, Nerup-J
Relation between breast-feeding and incidence rates of insulin-dependent diabetes mellitus: a hypothesis
Lancet 1984, 2: 1083-1086

24.) Bottazzo-G, Dean-B, Gorsuch-A, Cudworth-A, Doniach-D
Complement-fixing islet-cell antibodies in type 1 diabetes: possible monitors of active beta-cell damage
Lancet 1980, 1: 668-672

25.) Bottazzo-G, Florin-Christensen-A, Doniach-D
Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies
Lancet 1974, 2: 1279-1283

26.) Bottazzo-G, Gleichmann-H
Immunology and diabetes workshop: Report on the first international workshop on the standardisation of cytoplasmic islet cell antibodies
Diabetologia 1986, 29: 125-126

27.) Bottazzo-G, Mann-J, Thorogood-M, Baum-J, Doniach-D
Autoimmunity in juvenile diabetics and their families
Br Med J 1978, 2: 165-168

28.) Bovenhuis-H, Verstege-A
Improved method for phenotyping milk protein variants by isoelectric focusing using PhastSystem
Neth Milk and Dairy J 1989, 43: 447-451

29.) Burks-A, Casteel-H, Fiedorek-S, Williams-L, Connaughton-C, Brooks-J
Enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting determination of antibody response to major component proteins of soybeans in patients with soy protein intolerance
J Pediatr Gastroenterol Nutr 1989, 8 (2): 195-203

30.) Carter-W, Herrman-J, Stokes-K, Cox-D
Promotion of diabetes onset by stress in the BB rat
Diabetologia 1987, 30: 674-675

31.) Charron-D
HLA Class II Disease Association: Molecular Basis
J Autoimm 1992, 5 (Suppl. A): 45-53

32.) Coleman-D, Kuzava-J, Leiter-E
Effect of diet on incidence of diabetes in nonobese diabetic mice
Diabetes 1990, 39: 432-436

33.) Dahl-Jorgensen-K, Joner-G, Hanssen-K
Relationship between cow's milk consumption of IDDM in childhood
Diabetes Care 1991, 14: 1081-1083

34.) Dahlquist-G, Blom-L, Lönnberg-G
The Swedish Childhood Diabetes Study- a multivariate analysis of risk determinants for diabetes in different age groups
Diabetologia 1991, 34: 757-762

35.) Dahlquist-G, Blom-L, Persson-L, Sandström-A, Wall-S
Dietary factors and the risk of developing insulin dependent diabetes in childhood
Br Med J 1990, 300: 1302-1306

36.) Dahlquist-G, Savilahti-E, Landin-Olsson-M
An increased level of antibodies to ß-lactoglobulin is a risk determinant for early-onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus independent of islet cell antibodies and early introduction of cow`s milk
Diabetologia 1992, 35: 980-984

37.) Dean-B, Becker-F, McNally-J, Tarn-A, Schwartz-G, Gale-E, Bottazzo-G
Insulin autoantibodies in the pre-diabetic period: correlation with islet cell antibodies and development of diabetes
Diabetologia 1986, 29: 339-342

38.) Deschamps-I, Lestradet-H, Busson-M, Hors-J
Evaluation of recurrence risk in siblings of diabetic children: importance of age and birth order in relation to HLA genotypes
Diabetes Research 1984, 1: 125-135

39.) Diabetes Epidemiology Research International Group
Geographic patterns of childhood insulin-dependent diabetes mellitus
Diabetes 1988, 37: 1113-1119

40.) Drash-A
What do epidemiologic observations tell us about the etiology of insulin dependent diabetes mellitus ?
Schweiz Med Wochenschr 1990, 120: 39-45

41.) Eigel-W, Butler-J, Farrell-H, Harwalkar-V, Jennes-R, Whitney-R
Nomenclature of proteins of cow`s milk
J Dairy Science 1984, 67: 1599-1631

42.) Eisenbarth-G
Type 1 diabetes mellitus: a chronic autoimmune disease
N Engl J Med 1986, 314: 1360-1367

43.) Eisenbarth-G, Jackson-R, Pugliese-A
Insulin Autoimmunity: the rate limiting factor in pre-type 1 diabetes
J Autoimmunity 1992, 5 (Suppl A): 241-246

44.) Elliott-R
Cow`s milk casein peptides as dietary triggers of IDDM
Abstract from the International Symposium of Type I (Insulin dependent) Diabetes mellitus. Prediction and prevention of Type I Diabetes.
Nagasaki, Japan, 1994

45.) Elliott-R, Hill-J
Jekyll or Hyde ?
Diabetes Prev and Ther 1995, 9: 1-2

46.) Elliot-R, Martin-J
Dietary protein: a trigger of insulin-dependent diabetes in the BB rat ?
Diabetologia 1984, 26: 297-299

47.) Elliott-R, Pilcher-C, Edgar-B
Geographic IDDM in Polynesia and Macronesia: the epidemiology of insulin-dependent diabetes in Polynesian children born in and reared in Polynesia, compared with children resident in New Zealand
Diabetes in the Young Bulletin (ISGD Proc) 1989, 20:16

48.) Elliot-R, Reddy-S, Bibby-N, Kida-K
Dietary prevention of diabetes in the non-obese diabetic mouse
Diabetologia 1988, 31: 62-64

49.) Ellis-T, Atkinson-M
Early infant diets and insulin-dependent diabetes
Lancet 1996, 347: 1464-1465

50.) Engvall-E, Jonsson-K, Perlmann-P
Enzyme-linked immunosorbent assay II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes.
Biochim Biophys Acta 1971, 251: 427-434

51.) Erlander-M, Tillakaratne-N, Feldblum-S, Tobin-A
Two genes encode distinct glutamate decarboxylase with different responses to pyridoxal phosphate
Neuron 1991, 7: 91-100

52.) Fava-D, Leslie-R, Pozzilli-P
Relationship between dairy product consumption and incidence of IDDM in childhood in Italy
Diabetes Care 1994, 17: 1488-1490

53.) Federlin-K, Helmke-K, Becker-F, Seggewiss-K, Sauer-H
Organspezifische Autoantikörper bei Typ 1 Diabetikern und deren Verwandten 1. Grades
Münch med Wschr 1987, 37: 635-637

54.) Federlin-K, Otten-A, Helmke-K,
Islet cell antibodies and viral infections
Exp Clin Endocrinol 1987, 89: 368-374

55.) Festenstein-H, Award-J, Hitman-G, Cutbush-S, Groves-A, Cassell-P, Ollier-W, Sachs-J
New HLA DNA polymorphisms associated with autoimmune diseases
Nature 1986, 322: 64-67

56.) Foulis-A, McGill-M, Farquharson-M, Hilton-D
A search for evidence of viral infection in pancreases of newly diagnosed patients with IDDM
Diabetologia 1997, 40: 53-61

57.) Freedmann-Z, Feek-C, Irvine-W, Lernmark-A, Rubinstein-A, Steiner-D, Huen-A
Islet cell cytoplasmic and cell surface antibodies in diabetes mellitus
Trans Assoc Am Physicians 1979, 96: 64-76

58.) Gattegno-L, Migliore-Samour-D, Saffar-L, Jolles-P
Enhancement of phagocytic activity of human monocytic-macrophagic cells by immunostimulating peptides from human casein
Immunol Lett 1988, 18: 27-32

59.) Gerstein-H
Cow's milk exposure and type 1 diabetes mellitus
Diabetes Care 1994, 17: 13-19

60.) Glerum-M, Robinson-B, Martin-J
Could bovine serum albumin be the initiating antigen ultimately responsible for the development of insulin dependent diabetes mellitus ?
Diabetes Research 1989, 10: 103-107

61.) Goldman-A, Pong-A, Goldblum-R
Host defenses: development and maternal contributions
Adv Pediatr 1985, 32: 71-100

62.) Goldman-J, Baldwin-D, Pugh-W, Rubenstein-A
Equilibrium binding assay and kinetic characterization of insulin antibodies
Diabetes 1978, 27: 653-660

63.) Green-A, Gale-E, Patterson-C
Incidence of childhood onset insulin-dependent diabetes mellitus: the EURODIAB ACE study
Lancet 1992, 339: 905-909

64.) Greenbaum-C, Palmer-J, Kuglin-B, Kolb-H, Participating Laboratories
Insulin autoantibodies measured by radioimmunoassay are more related to insulin-dependent diabetes mellitus than those measured by enzyme-linked immunosorbent assay: results of the fourth international workshop on the standardization of insulin autoantibody measurement
J Clin Endocrinol Metab 1992, 74: 1040-1044

65.) Hagopian-W, Michelsen-B, Karlsen-A, Larsen-F, Moody-A, Grubin-C, Rowe-R, Petersen-J, McEvoy-R, Lernmark-A
Autoantibodies in IDDM primarily recognize the 65,000-Mr rather than the 67,000-Mr isoform of glutamic acid decarboxylase
Diabetes 1993, 42: 631-636

66.) Hattori-M, Buse-J, Jackson-R, Glimcher-L, Dorf-M, Minami-M, Makino-S, Moriwaki-K, Kuzuya-H, Imura-H, Strauss-W, Seidman-J, Eisenbarth-G
The NOD mouse: Recessive diabetogenic gene in the major histocompatibility complex
Science 1986, 231: 733-735

67.) Hermitte-L, Atlan-Gepner-C, Payan-M, Mehelleb-M, Vialettes-B
Dietary protection against diabetes in NOD mice: lack of major change in the immune system
Diabetes Metab 1995, 21: 261-268

68.) Hoorfar-J, Buschard-K, Brogren-C
Impact of dietary protein and fat source on the development of insulin-dependent diabetes in the BB rat
Diabetes Res 1992, 20: 33-41

69.) Hoorfar-J, Buschard-K, Dagnaes-Hansen-F
Prophylactic nutritional modification of the incidence of diabetes in autoimmune non-obese diabetic (NOD) mice
Br J Nutr 1993, 69: 597-607

70.) Hoorfar-J, Scott-F, Cloutier-H
Dietary plant materials and development of diabetes in the BB rat
J Nutr 1991, 121: 908-916

71.) Irvine-W, McCallum-C, Gray-R, Campbell-C, Duncan-I, Farquar-J, Vaughan-H, Morris-P
Pancreatic islet-cell antibodies in diabetes mellitus correlated with the duration and type of diabetes, coexistent autoimmune disease, and HLA type
Diabetes 1977, 26: 138-147

72.) Issa-Chergui-B, Guttmann-R, Seemayer-T, Kelley-V, Colle-E
The effect of diet on the spontaneous insulin dependent diabetic syndrome in the rat
Diabetes Res 1988, 9: 81-86

73.) Jaziri-M, Migliore-Samour-D, Casabianca-Pignede-M, Keddad-K, Morgat-J, Jolles-P
Specific binding sites on human phagocytic blood cells for Gly-Leu-Phe and Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr, immunostimulating peptides from human milk proteins
Biochim Biophys Acta 1992, 1160: 251-261

74.) Johnston-C, Millward-B, Hoskins-P, Leslie-R, Bottazzo-G, Pyke-D
Islet-cell antibodies as predictors of the later development of Type 1 (insulin-dependent) diabetes
Diabetologia 1989, 32: 382-386

75.) Karjalainen-J
Islet cell antibodies as predictive markers for IDDM in children with high background incidence of disease
Diabetes 1990, 39: 1144-1150

76.) Karjalainen-J, Knip-M, Hyöty-H, Leinikki-P, Ilonen-J, Käär-M, Akerblom-H
Relationship between serum insulin autoantibodies, islet cell antibodies and coxsackie-B4 and mumps virus-specific antibodies at the clinical manifestation of type 1 (insulin-dependent) diabetes
Diabetologia 1988, 31: 146-152

77.) Karjalainen-J, Knip-M, Mustonen-A, Ilonen-J, Akerblom-H
Relation between insulin antibody and complement-fixing islet cell antibody at clinical diagnosis of IDDM
Diabetes 1986, 35: 620-622

78.) Karjalainen-J, Martin-J, Knip-M, Ilonen-J, Robinson-B, Savilahti-E, Akerblom-H, Dosch-H
A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus
N Engl J Med 1992, 327: 302-307

79.) Karjalainen-J, Saukkonen-T, Savilahti-E, Dosch-H
Disease-associated anti-bovine serum albumin antibodies in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus are detected by particle concentration fluoroimmunoassay, and not by enzyme linked immunoassay
Diabetologia 1992, 35: 985-990

80.) Kielwein-G
Leitfaden der Milchkunde und Milchhygiene
Blackwell Wissenschaftsverlag-Berlin, 1994

81.) Kikutani-H, Makino-S
The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains
Advances in Immunol 1992, 51: 285-322

82.) Kolb-D
Diabetes
In: Gemsa-D, Kalden-J, Resch-K (Hrsg.), Immunologie
Thieme Verlag, Stuttgart-New-York, 1991

83.) Kostraba-J, Cruickshanks-K, Lawler-Heavner-J, Jobim-L, Rewers-M, Gay-E, Chase-H, Klingensmith-G, Hamman-R
Early exposure to cow's milk and solid foods in infancy, genetic predisposition, and risk of IDDM
Diabetes 1993, 42: 288-295

84.) Kräuter-K, Becker-F, Buschler-H, Petzold-R, Sauer-H, Helmke-K, Federlin-K
IgG1-IgG4-Subklassen bei Insulinautoantikörpern: Prävalenz und Relevanz bei Typ 1-Diabetikern und ihren Verwandten ersten Grades
Klin Wschr 1989, 67: 240

85.) Kräuter-K, Becker-F, Helmke-K, Schneider-Waterberg-I, Seggewiss-K, Federlin-K

Insulinantikörper (IAK) und Insulinautoantikörper (IAAK) der Klasse IgG bei Typ 1-Diabetikern und ihren Familienangehörigen
Klin Wschr 1988, 66: 130

86.) Krokowski-M, Caillat-Zucman-S, Timsit-J, Larger-E, Pehuet-Figoni-M, Bach-J, Boitard-C
Anti-bovine serum albumin antibodies: genetic heterogeneity and clinical relevance in adult-onset IDDM
Diabetes Care 1995, 18: 170-173

87.) Krolewski-A, Warram-J, Rand-L, Kahn-R
Epidemiologic approach to the etiology of type 1 diabetes mellitus and its complications
N Engl J Med 1987, 317: 1390-1398

88.) Kuglin-B, Bertrams-J, Linke-C, Gries-F, Kolb-H
Prevalence of cytoplasmatic islet cell antibodies and insulin autoantibodies is increased in subjects with genetically defined high risk for insulin-dependent diabetes mellitus
Klin Wochenschr 1989, 67: 66-73

89.) Landin-Olsson-M, Palmer-J, Lernmark-A, Blom-L, Sundkvist-G, Nyström-L, Dahlquist-G
Predictive value of islet cell and insulin autoantibodies for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based study of newly-diagnosed diabetic and matched control children
Diabetologia 1992, 35: 1068-1073

90.) Larsen-B, di Stasio-L, Tucker-E
COGNOSAG Workshop Report
Animal Genet 1992, 23: 188-192

91.) Lendrum-R, Walker-G, Cudworth-A, Theophanides-C, Pyke-D, Bloom-A, Gamble-D
Islet-cell antibodies in diabetes mellitus
Lancet 1976, 2: 1273-1276

92.) Lernmark-A, Freedmann-Z, Hofmann-C, Rubinstein-A, Steiner-D, Jackson-R, Winter-R, Traisman-H
Islet-cell-surface antibodies in juvenile diabetes mellitus
N Engl J Med 1978, 299: 375-380

93.) Leslie-R, Elliott-R
Early environmental events as a cause of IDDM. Evidence and implications
Diabetes 1994, 43: 843-850

94.) Levy-Marchal-C, Bridel-M, Sodoyez-Goffaux-F, Koch-M, Tichet-J, Czernichow-P, Sodoyez-J
Superiority of radiobinding assay over ELISA for detection of IAAs in newly diagnosed type 1 diabetic children
Diabetes Care 1991, 14: 61-63

95.) Levy-Marchal-C, Karges-W, Karjalainen-J, Czernichow-P, Dubois-F, Dosch-H
Antibodies against bovine albumin and other diabetes markers in French children
Diabetes Care 1995, 18: 1089-1094

96.) Li-X, Scott-F, Park-Y, Yoon-J
Low incidence of autoimmune type 1 diabetes in BB rats fed a hydrolysed casein-based diet associated with early inhibition of non-macrophage-dependent hyperexpression of MHC class 1 molecules on beta cells
Diabetologia 1995, 38: 1138-1147

97.) Lien-S, Rogne-S
Bovine casein haplotypes: number, frequencies and applicability as genetic markers
Animal Genet 1993, 24: 373-376

98.) Like-A, Guberski-D, Butler-L
Influence of environmental viral agents on frequency and tempo of diabetes mellitus in BB/Wor Rats
Diabetes 1991, 40: 259-262

99.) Lindersson-M, Lunden-A, Andersson-L
Genotyping bovine milk proteins using allele discrimination by primer length and automated DNA sizing technology
Animal Genet 1995, 26: 67-72

100.) Lipton-R, Fivecoate-J
High risk of IDDM in African-American and Hispanic children in Chicago
Diabetes Care 1995, 18: 476-482

101.) Lipton-R, LaPorte-R
Epidemiology of islet cell antibodies
Epidemiol Rev 1989, 11: 182-203

102.) Maclaren-N
How, when, and why to predict IDDM
Diabetes 1988, 37: 1591-1594

103.) Makino-S, Kunimoto-K, Muraoka-Y, Mizushima-Y, Katagiri-K, Tochino-Y
Breeding of a non-obese diabetic strain of mice
Exp Anim 1980, 29: 1-13

104.) Mandalapu-P, Pabst-H, Peatkau-V
A novel immunosuppressive factor in human colostrum
Cell Immunol 1995, 162: 178-184

105.) Mansfield-K, Beales-P, Williams-A, Lampeter-E, Pozzilli-P
Housing, production and life-maintenance of the Non-Obese Diabetic (NOD) mouse
Animal Technol 1992, 43: 29-37

106.) Mayer-E, Hammam-R, Gay-E, Lezotte-D, Savitz-D, Klingensmith-G
Reduced risk of IDDM among breast-fed children
Diabetes 1988, 37: 1625-1632

107.) McEvoy-R, Witt-M, Ginsberg-Fellner-F, Rubinstein-P
Anti-insulin antibodies in children with type 1 diabetes mellitus
Diabetes 1986, 35: 634-641

108.) Migliore-Samour-D, Jolles-P
Casein, a prohormone with immunomodulating role for the newborn ?
Experientia 1988, 44: 188-193

109.) Migliore-Samour-D, Roch-Arveiller-M, Tissot-M, Jazziri-M, Keddad-K, Giroud-J, Jolles-P
Effects of tripeptides derived from milk proteins on polymorphonuclear oxidative and phosphoinositide metabolisms
Biochem Pharmacol 1992, 44 (4): 673-680

110.) Mills-E, Thompson-T, Björksten-B, Filipovich-D, Quie-P
The chemiluminescence response and bactericidal activity of polymorphonuclear neutrophils from newborns and their mothers
Pediatrics 1979, 63: 429-434

111.) Mincheva-N, Hammarstrom-M, Juto-P, Hammarstrom-S
Human milk cotains proteins that stimulate and suppress T lymphocyte proliferation
Clin Exp Immunol 1990, 79: 463-496

112.) Muntoni-S, Loddo-S, Stabilini-M, Stabilini-L, Muntoni-S
Cow's milk consumption and IDDM incidence in Sardinia
Diabetes Care 1994, 17: 346-347

113.) Nepom-B, Palmer-J, Kim-S, Jansen-J, Holbeck-S, Nepom-G
Specific genomic markers for the HLA-DQ subregion discriminate between $DR4^+$ insulin-dependent diabetes mellitus and $DR4^+$ seropositive juvenile rheumatoid arthritis
J Exp Med 1986, 164: 345-350

114.) Nerup-J, Platz-P, Andersen-O, Christy-M, Lyngsoe-J, Poulson-J, Ryder-L, Thomsen-M, Staub-Nielsen-L, Svejgaard-A
HLA-antigens and diabetes mellitus
Lancet 1974, ii: 864-866

115.) Ng-Kwai-Hang-K, Grosclaude-F
Advanced Dairy Chemistry - Vol 1: Proteins (Ed. Fax P F)
Elsevier Science Publishers Ltd., London 1992, 405-455

116) Nigro-G, Campea-L, de Novellis-A, Orsini-M
Breast-feeding and insulin-dependent diabetes mellitus
Lancet 1985, i: 467

117.) Owerbach-D, Gunn-S, Gabbay-K
Primary association of HLA-DQw8 with type 1 diabetes in DR4 patients
Diabetes 1989, 38: 942-945

118.) Owerbach-D, Hägglöf-B, Lernmark-A, Holmgren-G
Susceptibility to insulin dependent diabetes defined by restriction enzyme polymorphism of HLA-D region genomic DNA
Diabetes 1984, 33: 958-965

119.) Pak-C, Cha-C, Rajotte-R, McArthur-R, Yoon-J
Human pancreatic islet cell specific 38 kilodalton autoantigen identified by cytomegalovirus-induced monoclonal islet cell autoantibody
Diabetologia 1990, 33: 569-572

120.) Palmer-P, Asplin-C, Clemens-P, Lyon-K, Iatpati-O, Raghu-P, Paquette-T
Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment
Science 1983, 222: 1337-1339

121.) Palmer-P, McCulloch-D
Prediction and prevention of IDDM-1991
Diabetes 1991, 40: 943-947

122.) Pardini-V, Vieira-J, Miranda-W, Ferreira-S, Velho-G, Russo-E
Antibodies to bovine serum albumin in Brazilian children and young adults with IDDM
Diabetes Care 1996, 19: 126-129

123.) Parker-F, Migliore-Samour-D, Floc`h-F, Zerial-A, Werner-G, Jolles-J, Casaretto-M, Zahn-H, Jolles-P
Immunostimulating hexapeptide from human casein: amino acid sequence, synthesis and biological properties
Eur J Biochem 1984, 145: 677-682

124.) Pickup-J, Williams-G
Animal models of IDDM
In: Textbook of Diabetes (Vol 1)
Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK. 1991

125.) Platz-P, Jakobsen-B, Morling-N, Ryder-L, Svejgaard-A, Thomsen-M, Christy-M, Kromann-H, Benn-J, Nerup-J, Green-A, Hauge-M
HLA-D and -DR antigens in genetic analysis of insulin dependent diabetes mellitus
Diabetologia 1981, 22: 108-115

126.) Pozzilli-P, Signore-A, Williams-A, Beales-P
NOD mouse colonies around the world - recent facts and figures
Immunol Today 1993, 14: 193-196

127.) Reeves-W
Immunology of diabetes and insulin therapy
In: R.A. Thompson (Ed.): Recent Advances in Clinical Immunology
Churchill Livingstone, London, 1980, 183-220

128.) Ring-J
Angewandte Allergologie
MMV Medizin Verlag München, 2. Auflage 1992

129.) Roep-B, Kallan-A, Hazenbos-L, Bruining-G, Bailyes-E, Arden-S, Hutton-J, De Vries-R
T-cell reactivity to a 38kDa insulin-secretory granule protein in patients with recent-onset type 1 diabetes
Lancet 1991, 337: 1439-1441

130.) Saukkonen-T, Savilahti-E, Vaarala-O, Virtala-E, Toumilehto-J, Akerblom-H, The Childhood Diabetes in Finland Study Group
Children with newly diagnosed IDDM have increased levels of antibodies to bovine serum albumin but not to ovalbumin
Diabetes Care 1994, 17: 970-976

131.) Savilahti-E, Akerblom-H, Taino-V, Koskimies-S
Children with newly diagnosed insulin dependent diabetes mellitus have increased levels of cow´s milk antibodies
Diabetes Res 1988, 7: 137-140

132.) Savilahti-E, Saukkonen-T, Virtala-E, Toumilehto-J, Akerblom-H
The Childhood Diabetes in Finland Study Group
Increased levels of cow´s milk and ß-lactoglobulin antibodies in young children with newly diagnosed IDDM
Diabetes Care 1993, 16: 984-989

133.) Schmelling-M, Becker-F, Buschler-H, Sauer-H, Federlin-K
Typ 1-Diabetes und Insulinautoantikörper der Klasse IgM
Akt Endokrinol u Stoffw 2 1989, 10: 128

134) Schmidt-E
Nahrungsbedarf und Ernährung
In: von Harnack (Hrsg.): Kinderheilkunde
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New-York, 9. Auflage 1994, 93-104

135.) Scott-F
Cow milk and insulin-dependent diabetes mellitus: is there a relationship?
Am J Clin Nutr 1990, 51: 489-491

136.) Scott-F, Cloutier-H, Souligny-J, Riley-W, Hoorfar-J, Brogren-C
Diet and antibody production in the diabetes-prone BB rat
In: Larkins-R, Zimmet-P, Chisholm-D (eds),
Diabetes 1989. Elsevier Science, Amsterdam, 763-767

137.) Scott-F, Kolb-H
Cow´s milk and insulin-dependent diabetes mellitus
Lancet 1996, 348: 613

138.) Scott-F, Norris-J, Kolb-H
Milk and type 1 diabetes
Diabetes Care 1996, 19: 379-383

139.) Sebastiani-L, Visalli-N, Adorisio-E, Suppa-M, Buzzetti-R, Cicco-A, Giovannini-C, Comerci-M, Negri-M, Pozzilli-P
A 5-year (1989-1993) prospective study of the incidence of IDDM in Rome and the Lazio region in the age-group 0-14 years
Diabetes Care 1996, 19: 70-73

140.) Seißler-J, Hering-B, Richter-W, Glück-M, Yassin-N, Bretzel-R, Boehm-B, Federlin-K, Scherbaum-W
Antibodies to the Mr 64,000 (64 K) protein in islet cell antibody positive non-diabetic individuals indicate high risk for impaired beta-cell function
Diabetologia 1992, 35: 550-554

141.) Singal-D, Blajchman-M
Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus
Diabetes 1973, 22: 429-432

142.) Storms-F, Lutterman-J, Ross-A, Hermsen-R, van Lingen-G
Non-specific binding of insulin in an equilibrium binding assay of insulin antibodies
Clin Chim Acta 1986, 161: 147-155

143.) Szopa-T, Ward-T, Dronfield-D, Portwood-N, Taylor-K
Coxsackie B4 viruses with the potential to damage beta cells of the islets are present in clinical isolates
Diabetologia 1990, 33: 325-328

144.) Tainio-V, Savilahti-E, Arjomaa-P, Salmenperä-L, Perheentupa-J, Siimes-M
Plasma antibodies to cow`s milk are increased by early weaning and consumption of unmodified milk, but production of plasma IgA and IgM cow`s milk is stimulated even during exclusive breast-feeding
Acta Paediatr Scand 1988, 77: 807-811

145.) Tarn-A, Thomas-J, Dean-B, Ingram-D, Schwarz-G, Bottazzo-G, Gale-E
Predicting Insulin-Dependent Diabetes
Lancet 1988, i: 845-850

146.) Thomson-G, Robinson-W, Kuhner-M, Joe-S, Klitz-W
HLA and insulin gene associations with IDDM
Genet Epidemiol 1989, 6: 155-160

147.) Thomson-G, Robinson-W, Kuhner-M, Joe-S, MacDonald-M, Gottschalk-J, Barbosa-S, Rich-J, Bertrams-M, Baur-M, Partanen-J, Tait-B, Schober-E, Mayr-W, Ludvigsson-J, Lindblom-B, Farrid-N, Thompson-C, Deschamps-I
Genetic heterogeneity, models of inheritance, and risk estimates for a joint study of Caucasians with insulin-dependent diabetes mellitus
Am J Hum Genet 1988, 43: 799-816

148.) Thorsby-E, Ronningen-K
Particular HLA-DQ molecules play a dominant role in determining susceptibility or resistance to type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus
Diabetologia 1993, 36: 371-377

149.) Tocchino-Y
Discovery and breeding of the NOD mouse
In: Tarui-S, Tocchino-Y, Nonaka-K (Eds.): Insulitis and Type 1 Diabetes. Academic Press, Japan, 1986, 3-10

150.) Todd-J, Bell-J, McDevitt-H
HLA-DQß gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus
Nature 1987, 329: 599-604

151.) Tuomi-T, Groop-L, Zimmet-P, Rowley-M, Knowles-W, Mackay-I
Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulin-dependent onset of disease
Diabetes 1993, 42: 359-362

152.) Van de Winkel-M, Smets-G, Gepts-W, Pipeleers-D
Islet cell surface antibodies from insulin-dependent diabetics bind specifically to pancreatic B cells
J Clin Invest 1982, 70: 41-49

153.) Van Eenennaam-A, Medrano-J
Milk protein polymorphisms in California dairy cattle
J Dairy Science 1991, 74: 1730-1742

154.) Vardi-P, Ziegler-A, Mathews-J, Dib-S, Keller-R, Ricker-A, Wolfsdorf-J, Herskowitz-R, Rabizadeh-A, Eisenbarth-G, Soeldner-J
Concentration of insulin autoantibodies at onset of type 1 diabetes: inverse log-linear correlation with age
Diabetes Care 1988, 11: 736-739

155.) Verge-C, Howard-N, Irwig-L, Simpson-J, Mackerras-D, Silink-M
Environmental factors in childhood IDDM
Diabetes Care 1994, 17: 1381-1388

156.) Virtanen-S, Räsänen-L, Ylönen-K, Aro-A, Clayton-D, Langholz-B, Pitkäniemi-J, Savilahti-E, Lounamaa-R, Tuomilehto-J, Akerblom-H
Early introduction of dairy products associated with increased risk of IDDM in Finnish children
Diabetes 1993, 42: 1786-1790

157.) Virtanen-S, Saukkonen-T, Savilahti-E, Ylonen-K, Rasanen-L, Aro-A, Knip-M, Tuomilehto-J, Akerblom-H
Diet, cow´s milk protein antibodies and the risk of IDDM in Finnish children. Childhood Diabetes in Finnland Study Group.
Diabetologia 1994, 37: 381-387

158.) Visser-S, Slangen-C, Lagerwerf-F, Van-Dongen-W, Haverkamp-J
Identification of a new genetic variant of bovine beta-casein using reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectrometric analysis
J Chromatogr A 1995, 711(1): 141-150

159.) Williams-A, Krug-J, Lampeter-E, Mansfield-K, Beales-P, Signore-A, Gale-E, Pozzilli-P
Raised temperature reduces the incidence of diabetes in the NOD mouse
Diabetologia 1990, 33: 635-637

160.) Wolf-E, Spencer-K, Cudworth-A
The genetic susceptibility to type 1 (insulin-dependent) diabetes: analysis of HLA-DR association
Diabetologia 1983, 24: 224-230

161.) Ziegler-A, Herskowitz-R, Jackson-R, Soeldner-J, Eisenbarth-G
Predicting type 1 diabetes
Diabetes Care 1990, 13: 762-775

162.) Ziegler-A, Ziegler-R, Vardi-P, Jackson-R, Soeldner-J, Eisenbarth-G
Life-table analysis of progression to diabetes of anti-insulin autoantibody-positive relatives of individuals with type 1 diabetes
Diabetes 1989, 38: 1320-1325

163.) Ziegler-R, Alper-C, Awdeh-Z, Castano-L, Brink-S, Soeldner-S, Jackson-R, Eisenbarth-G
Specific association of HLA-DR4 with increased prevalence and level of insulin autoantibodies in first-degree relatives of patients with type 1 diabetes
Diabetes 1991, 40: 709-714

DANKSAGUNG

Hiermit danke ich Herrn Prof. Dr. Drs. med. h. c. K. Federlin für die freundliche Überlassung dieses Themas und die Betreuung der Arbeit.

Herrn Dr. med. Frank Becker für die intensive Unterstützung bei der Planung der Arbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft und das unermüdliche Engagement in stillem Gedenken.

Weiterhin danke ich besonders allen Mitarbeitern des Immunologischen Labors der Medizinischen Klinik III und Poliklinik Gießen, die mich freundlichst unterstützt haben.

Herrn Pabst von dem Institut für Medizinische Informatik Gießen, danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem Frau Ute Nau, Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie Gießen, und Herrn Kattenborn, Abteilung für Klinische und Administrative Datenverarbeitung Gießen, für die Hilfe bei der graphischen Darstellung von Daten.

Zum Schluß möchte ich einen ganz speziellen Dank meinen Eltern für deren ständige Förderung meiner Ausbildung aussprechen. Außerdem danke ich meiner Schwester Sibylle und ihrer Familie für die fortwährende Hilfe und Unterstützung während meines Studiums.

LEBENSLAUF

Daten zur Person	Name	Silvia Seebaum
	Geburtsdatum	25.08.1970
	Geburtsort	Hamburg
	Familienstand	ledig
Schulbildung	07/77 bis 06/81	Grundschule
	07/81 bis 06/87	Gymnasium Quickborn (Schleswig-Holstein)
	07/87 bis 06/88	High School, Michigan, USA High School Abschluß
	07/88 bis 06/91	Gymnasium Quickborn Abitur 1991
Studium	10/91	Studium der Humanmedizin Justus-Liebig-Universität Gießen
	09/93	Physikum
	09/94	1. Staatsexamen
	09/96	2. Staatsexamen
	10/96 bis 10/97	Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Gießen
	10/97	3. Staatsexamen
	01/98	AIP im Zentrum für Innere Medizin Med. Klinik I (Direktor: Prof. Dr. K.H. Usadel) Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt

Gießen im November 1998