

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Tübingen

Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

**Validierung der Bestimmung von HLA DQ2 & DQ8
bei Zöliakie
Diagnostischer Nutzen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der

MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

BERND DREHER

aus

Albstadt

2006

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Professor Dr. M. Stern

2. Berichterstatter:

Professor Dr. C. Müller

Diese Arbeit ist in tiefer Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet.

EUGEN & HERMINE DREHER

— *für Ihre grenzenlose Liebe und Ihr Vertrauen* —

1	Einleitung	1
<hr/>		
1.1	Das HLA-System	1
1.1.1	Die MHC-Struktur	2
1.1.2	Genetik des HLA-Systems	3
1.1.3	HLA-Klasse II Antigene	6
1.1.3.1	HLA-DQ	8
1.1.4	Funktion des HLA-Systems	9
1.1.5	HLA-System und Krankheitsassoziationen	10
1.2	Die Zöliakie	14
1.2.1	Ätiologie und Pathogenese	14
1.2.2	Klassifikation und klinisches Erscheinungsbild	17
1.2.3	Epidemiologie	20
1.3	Zielsetzung	23
2	Patienten, Material und Methoden	24
<hr/>		
2.1	Patienten	24
2.1.1	Allgemeine Charakterisierung der Patienten und Einschlusskriterien	24
2.1.2	Patientenkollektiv	28
2.1.2.1	Gruppe A (TVA/SVA)	30
2.1.2.2	Gruppe B (PVA)	31
2.1.3	Kontrollgruppenkollektiv	33
2.1.3.1	Pädiatrische Kontrollgruppe (PK)	34
2.1.3.2	Adulte Kontrollgruppe (AK)	36
2.2	Material	38
2.2.1	Laborgeräte	38
2.2.2	Gefäße und Zubehör	39
2.2.3	Chemikalien	40
2.2.4	Enzyme, Nukleotide und Bioreagenzien	41
2.2.5	Kommerzielle Reaktionssysteme	41

INHALTSVERZEICHNIS

2.2.6	Lösungen und Puffer	42
2.2.6.1	DNA-Isolierung	42
2.2.6.2	PCR	42
2.2.6.3	Gelelektrophorese	43
2.2.7	Software	43
2.3	Methoden	44
2.3.1	DNA-Extraktion über Salzfällung	44
2.3.2	Prinzip der molekularbiologischen HLA-Typisierung mittels PCR	46
2.3.3	PCR-Amplifikation mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP)	48
2.3.3.1	DQB1 „low resolution“	49
2.3.3.2	DQB1*02	52
2.3.3.3	DQA1	55
2.3.3.4	DQB1*03	59
2.3.4	Auftrennung der PCR-Amplifikate mittels Gelelektrophorese	61
2.4	Statistische Analyse	63
2.4.1	Angewandte statistische Testmethoden	65
2.4.1.1	Der Chi ² - Test	65
2.4.1.2.	Das Relative Risiko (RR)	66
2.4.1.3.	Der T-Test	66
2.4.2	Statistische Auswertung der HLA-DQ Allelfrequenzen	67
2.4.2.1	Statistische Auswertung der HLA-DQB1 Allelfrequenzen	67
2.4.2.2	Statistische Auswertung der HLA-DQA1 Allelfrequenzen	68
2.4.3	Statistische Analyse der HLA DQA1*0501 – DQB1*0201 (DQ2) positiven Patienten hinsichtlich des Relativen Risikos in den einzelnen bioptisch definierten Gruppen TVA & PVA	69

INHALTSVERZEICHNIS

2.4.3.1.	Statistische Auswertung des gesamten HLA DQA*0501-DQB1*0201 (DQ2) Heterodimer positiven Patientenkollektives (TVA & PVA) hinsichtlich des RR	69
2.4.3.2	Statistische Auswertung der HLA DQA1*0501-DQB1*0201 (DQ2) positiven Patienten der Gruppe TVA	70
2.4.3.3	Statistische Auswertung der HLA DQA1*0501-DQB1*0201 (DQ2) positiven Patienten der Gruppe PVA	71
2.4.4.	Vergleichende Statistische Analyse des HLA-DQ Status in den einzelnen bioptisch definierten Subgruppen	72
3	Ergebnisse	75
3.1	Allelfrequenzverteilung DQA1 und DQB1	77
3.2	Gen-Assoziationen von DQA1 und DQB1	80
3.2.1	Patientenkollektiv	80
3.2.2	Kontrollgruppenkollektiv	84
3.3	Phänotypen gegliedert nach EMA, klinischer Präsentationsform, Geschlecht & Zottenatrophie	86
3.4	Retrospektive Betrachtung der Klinik in Relation zu der genetischen Analyse	89
3.4.1	Gesamtes Patientenkollektiv	89
3.4.2	DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) Homozygot	90
3.4.3	DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) Heterozygot	90
3.4.4	DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8) Heterozygot	91
3.4.5	DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) & DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8) Heterozygot	91
3.4.6	Negativ für DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) & DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8)	92
3.4.7	Geschwisteruntersuchung	94

4	Diskussion	96
<hr/>		
4.1	HLA - DQ2 & DQ8 Status	97
4.1.1	HLA - DQ2 & DQ8 als genetische Risikofaktoren für Zöliakie — eine pathogenetische Retrospektive	97
4.1.2	Allelfrequenzverteilung	99
4.1.3	Allelkopplungen von DQA1 und DQB1	102
4.2	Retrospektive Validierung der Klinik in Relation zu der genetischen Analyse	105
4.2.1	Korrelation zwischen HLA-Status und Schweregrad der Klinik	107
4.3	Stellenwert der HLA-DQ Typisierung hinsichtlich der serologischen und bioptischen Diagnostik	111
4.4	HLA-DQ Status bei DQ2 und DQ8 negativen Patienten mit bioptisch gesicherter Zöliakie	114
5.	Zusammenfassung	117
<hr/>		
6.	Literaturverzeichnis	118
7.	Tabellen	X -1
<hr/>		
8.	Anhang	X -18
X-1	HLA-Klasse-I Antigene	X -18
X-2	HLA-DR	X -20
X-3	Funktion des HLA-Systems	X -22
X-3.1	Antigenprozessierung und Präsentation	X -22
X-3.2	MHC Restriktion der Immunantwort	X -27
X-4	Definition der Zöliakie und historischer Rückblick	X -29
X-5	Probanden-Einverständniserklärung	X -30
<hr/>		
9.	Danksagung	X -31
<hr/>		
10.	Lebenslauf	X -33

Abb.1	Klein, J.; Sato, A.; (2000) „The HLA System. “ The New England Journal of Medicine; <u>343</u> ; 702 – 709	3
Abb.2	From, J.H. ; Brown, T.S.; Jardetzky, J.C.; (1993) “Top view of the antigen binding grooves of class II HLA-DR1 and HLA-A68.” Nature; <u>364</u> ; 33	5
Abb.3	Klein, J.; Sato, A.; (2000) „The HLA System. “ The New England Journal of Medicine; <u>343</u> ; 702 – 709	8
Abb.4	Klein, J.; Sato, A.; (2000) „The HLA System. “ The New England Journal of Medicine; <u>343</u> ; 702 – 709	9
Abb.5	Sollid, L. M.; (2002) “Coeliac disease, dissecting a complex inflammatory disorder.” Nature Reviews Immunology; <u>Volume 2</u> ; 647 – 655	16
Abb.6	Sollid, L. M.; (2002) “Coeliac disease, dissecting a complex inflammatory disorder.” Nature Reviews Immunology; <u>Volume 2</u> ; 647 – 655	19
Abb.7	Eisberg-Modell nach Logan www.stauff.de/methoden/dateien/methodenur.htm 18.02.2003 19.20 h MEZ	21
Abb.8	Geschlechtsspezifische Verteilung in den einzelnen Gruppen.	27
Abb.9	Geschlechtsspezifische Altersverteilung der Patienten zum Zeitpunkt der Biopsie.	28
Abb.10	Verteilung der Probanden auf die einzelnen Subgruppen.	29
Abb.11	Geschlechtsspezifische Altersverteilung der Patienten mit TVA / SVA bei Diagnose	30

Abb.12	Geschlechtsspezifische Altersverteilung der Patienten mit PVA bei Diagnose	31
Abb.13	Geschlechtsspezifische Altersverteilung in der pädiatrischen Kontrollgruppe bei Diagnose	35
Abb.14	Geschlechtsspezifische Altersverteilung in der adulten Kontrollgruppe bei Diagnose	36
Abb.15	Bildserie QIAamp® DNA Blood Mini Kit System von QIAGEN® www.qiagen.com/qiaamp-kit.htm 22.05.2003 21.15 h MEZ	44
Abb.16	Gelelektrophorese DQ „low resolution“. Längenstandard www.fermentas.com/catalog/markers/marksm0301.htm 22.04.2004 10.30 h MEZ	51
Abb.17	Gelelektrophorese DQB1*02. Längenstandard www.fermentas.com/catalog/markers/marksm0301.htm 22.04.2004 10.30 h MEZ	54
Abb.18	Gelelektrophorese DQA1. Längenstandard www.fermentas.com/catalog/markers/marksm0301.htm 22.04.2004 10.30 h MEZ	56
Abb.19	Gelelektrophorese DQB1*03 Längenstandard www.fermentas.com/catalog/markers/marksm0301.htm 22.04.2004 10.30 h MEZ	61
Abb. 20	Brown, T. A.; (1993) „Gentechnologie für Einsteiger.“ Spektrum Akademischer Verlag GmbH; Heidelberg-Berlin Trennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese.	62

Abb.21:	Allelfrequenzverteilung DQB1.	78
Abb.22:	Allelfrequenzverteilung DQA1.	79
Abb.23	Vergleich DQ-Heterozygotenfrequenz.	88
Abb.24	Sollid, L. M.; (2002) “Coeliac disease, dissecting a complex inflammatory disorder.” Nature Reviews Immunology; <u>Volume 2</u> ; 647 – 655	98

Tabelle. 1:	Allelfrequenzen des HLA-Komplexes in Unterschiedlichen Populationen nach Baur ⁹ M. B.	X-1
Tabelle.2:	Auflistung der bis 2004 bekannten HLA-Antigene und Spezifitäten nach Bodmer et al. ¹³ .	X-2
Tabelle 3	Assoziationen zwischen DR- und DQ-Antigenen nach Kiefel ⁷⁵ .	X-3
Tabelle 4:	Serologisch definierte supertypische und subtypische Charakteristika von HLA-A, HLA-B und HLA-C Antigenen nach Kiefel ⁷⁵ .	X-4
Tabelle 5:	Wichtige kreuzreagierende Gruppen der HLA-A und HLA-B Antigene nach Kiefel ⁷⁵ .	X-5
Tabelle 6:	Zuordnung der „breit“ reagierenden Determinanten Bw4 und Bw6 zu HLA-A und HLA-B Antigenen nach Kiefel ⁷⁵ .	X-5
Tabelle 7:	Ausgewählte Beispiele von HLA-Assoziationen mit Erkrankungen nach Waßmuth ¹⁶² .	X-6
Tabelle 8:	Historischer Rückblick über die „Meilensteine“ der Zöliakiediagnostik.	X-7
Tabelle 9:	Übersicht der mit Zöliakie assoziierten Erkrankungen, nebst RR und Prävalenz.	X-8
Tabelle 10:	Prävalenz der Zöliakie, basierend auf epidemiologischen Screening-Studien, oder anhand der klinischen Diagnose.	X-9
Tabelle 11:	Mögliche klinische Manifestationsformen der Zöliakie nach Fasano ³⁷ .	X-10
Tabelle 12:	Klassifikation der Dünndarmmukosa nach Marsh ¹⁰⁰ , modifiziert nach Oberhuber ¹¹⁴	X-11
Tabelle 13:	Olerup SSP TM DQ „low resolution“ Typisierungs-Spezifitäten.	50
Tabelle 14:	Olerup SSP TM DQB1*02 Typisierungs-Spezifitäten	53
Tabelle 15:	Olerup SSP TM DQA1 Typisierungs-Spezifitäten.	57
Tabelle 16:	Olerup SSP TM DQB1*03 Typisierungs-Spezifitäten	60

Tabelle 17:	Kombinations-Frequenz von DQA1 und DQB1 Allelen im Patientenkollektiv	81
Tabelle 18:	DQA1/DQB1-Status bei bioptisch gesicherten DQ2 & DQ8 negativen Patienten	83
Tabelle 19:	Kombinations-Frequenz von DQA1 und DQB1 Allelen im Kontrollgruppenkollektiv	84
Tabelle 20:	Phänotypen gegliedert nach klinischer Präsentationsform, Geschlecht, EMA und Typus der Zottenatrophie	X-11
	<u>Tabelle A:</u> Klassische Präsentationsform weiblich.	X-12
	<u>Tabelle B:</u> Klassische Präsentationsform männlich.	X-13
	<u>Tabelle C:</u> Subklinische Präsentationsform weiblich.	X-14
	<u>Tabelle D:</u> Subklinische Präsentationsform männlich	X-15
Tabelle 21:	Retrospektive Klinik in Relation zur genetischen Analyse.	X-16
Tabelle 22:	Frequenz und RR von Zöliakie bei HLA-DQ2 positiven Kaukasiern. Auflistung vorangegangener Studien.	X-17

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
(v/v)	Verhältnis Volumen zu Volumen
(w/v)	Verhältnis Gewicht zu Volumen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
€	Euro
5-AS	5-Aminosalizylsäure
Abb.	Abbildung
AD	Anno Domini
AGA	Anti-Gliadin-Antibodies
AK	Adulte Kontrollgruppe
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	ionisiertes Wasser
ARA	Anti-Retikulin-Antikörper
BF	Komplementfaktor B
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C2	Komplement 2
C21B	Cytochrom P-450
C4A	Komplement 4A
C4B	Komplement 4B
CREG	Crossreacting Groups
CTAB	Chloroform-Triethylammoniumbromid
CTLA4	Negative co-stimulatory molecule cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
d. h.	das heißt
dATP	Desoxy-adenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxy-cytidin-5'-triphosphat
DDB	Dünndarmbiopsie
dGTP	Desoxy-guanosin-5'-triphosphat
dl	Deziliter
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dTTP	Desoxy-thymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendinitrioltetraessigsäure
EMA	Anti-Endomysium-Antikörper
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESPGHAN	European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition
et al.	et alii (und Mitarbeiter)
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	et cetera
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GFD	glutenfreie Diät
HCL	Salzsäure

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HFE	Hämochromatosis
HLA	Human leucocyte antigen
HSP	Hitzeschockprotein
ICP	Invariant chain protein
IDDM	Insulin dependent Diabetes Mellitus
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL-18	Interleukin 18
IL-6	Interleukin 6
INF α	Interferon α
INF γ	Interferon γ
J	Jahre
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilo Dalton
l	Liter
LCD	Latente Zöliakie
LD	Linkage disequilibrium
LMP	Multifunktionale Protease
LS	Längenstandard
LTA	Lymphotoxin A
LTB	Lymphotoxin B
m	Männlich
M	Molar
M.	Monate
mA	Milliampere
max.	maximal
Mbp	Megabasenpaare
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Major histocompatibility complex
min.	Minimal
Min.	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
M-Wert	Mittelwert
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxidlösung
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NPW	negativer prädiktiver Wert
NRW	Nordrhein-Westfalen
OD	Optische Dichte
PCR-SSP	Polymerasekettenreaktion mit sequenzspezifischen Primern
PK	Pädiatrische Kontrollgruppe
PPW	positiver prädiktiver Wert

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PSMB8	Proteasom β 8
PSMB9	Proteasom β 9
PVA	partielle Zottenatrophie
RCLB	Red Cell Lysis Buffer
RR	Relatives Risiko
s	Standardabweichung
Sek.	Sekunden
SSP	Sequenzspezifische Primer
SVA	subtotale Zottenatrophie
Tab.	Tabelle
TAP1	Transporter associated with antigen processing 1
TAP2	Transporter associated with antigen processing 2
TAPBP	TAP-binding protein
Taq-Polymerase	<i>Thermus-aquaticus</i> Polymerase
TBE	Trisborat EDTA
TCR	T-Zellrezeptor
TfR	Transferrinrezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tTG	Tissue Transglutaminase
TVA	totale Zottenatrophie
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
VSD	Ventrikelseptumdefekt
w	weiblich
σ	Standardfehler

1 Einleitung

1.1 Das HLA-System

Der Haupthistokompatibilitätskomplex ist ein Set von Genen mit immunologischen und nicht-immunologischen Funktionen, welches in allen Vertebraten präsent ist⁵². Es wurde während Transplantationsstudien an Mäusen (am H-2 Komplex) von Peter Gorer 1937 am Londoner Lister Institut entdeckt^{48, 49}. Den Grundstein für die systematische Erforschung des humanen HLA - Systems (Humanes Leukozyten Antigen-System) legte Jean Dausset 1954, als er feststellte, dass das Serum polytransfundierter Patienten Antikörper enthielt, die Leukozyten zu agglutinieren vermochten²⁸. Vier Jahre darauf, 1958, beschrieb er mit dem „Mac“, welches heute als HLA-A2 bezeichnet wird, das erste Leukozytenantigen²⁹. Es folgten Studien der Universität Leiden unter der Leitung von Jon van Rood¹⁵⁷, mit der Entdeckung der Antigene 4a und 4b (HLA-Bw4 und Bw6) im Jahre 1962.

Das HLA-System ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 lokalisiert, genauer gesagt auf 6p21.31, und umfasst eine Region von ca. 200 Genen. Von diesen kodieren über 40 (3,6 Mbp) den HLA-Komplex^{80, 69, 2}. Dies entspricht in etwa einem Tausendstel des menschlichen Genoms.

Die Genprodukte des HLA-Komplexes, die so genannten HLA-Antigene, stellen extrem polymorphe Zelloberflächenstrukturen dar. Ihnen kommt innerhalb des Immunsystems eine zentrale Rolle zu. Sie ermöglichen die Unterscheidung zwischen fremd und selbst als Grundlage jeder Immunantwort und bestimmen daher maßgeblich die Akzeptanz oder Abstoßung von Allotransplantaten^{80, 69}. Neben dieser zentralen immunologischen Funktion besitzt der HLA-Komplex noch diverse weitere, nicht immunologische Funktionen bei Interaktionen mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Dazu gehören neben der Signaltransduktion auch der Transferrinrezeptor (TfR), der Wachstumsfaktor und zahlreiche Hormonrezeptoren.

1.1.1 Die MHC-Struktur

MHC steht für „major histocompatibility complex“. Der Haupthistokompatibilitätskomplex, oder MHC-Komplex, entspricht dem HLA-System des Menschen. In der Literatur werden beide Begriffe häufig als Synonym verwendet.

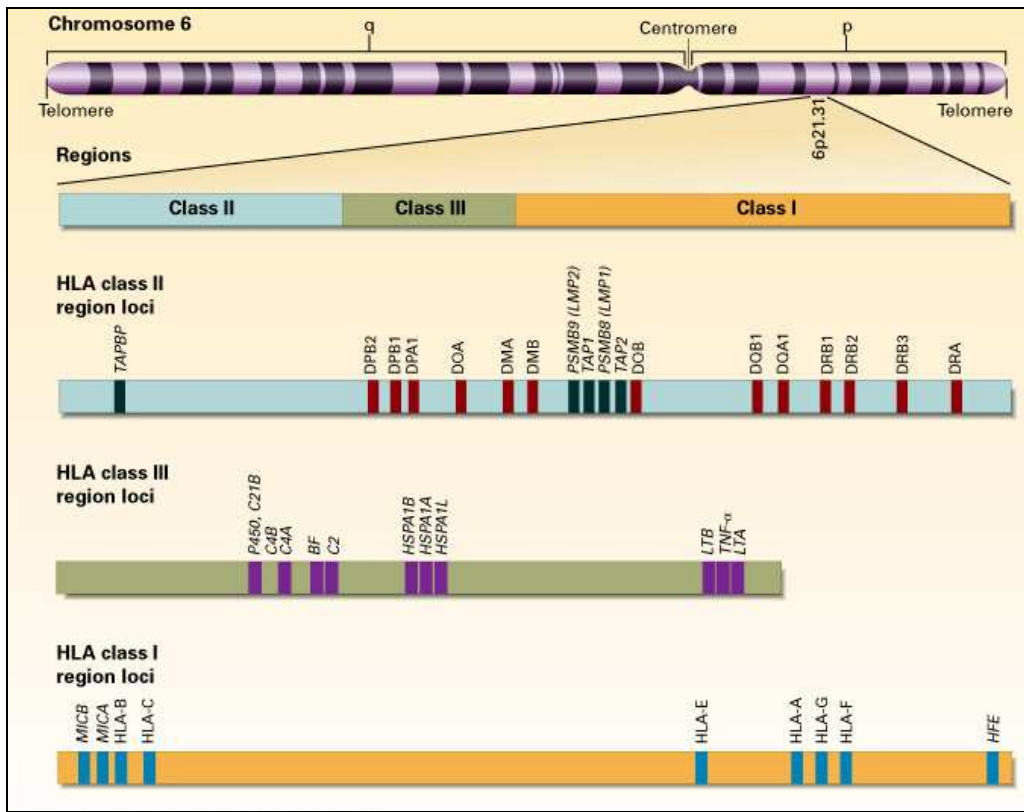
Die Gene und Genprodukte des MHC-Komplexes lassen sich nach ihrer Lage und Funktion in drei Klassen einteilen, und wurden in dieser Form erstmalig von Jan Klein 1977 in Mäusezellen beschrieben^{80, 69, 87, 74}.

Die MHC-Klasse-I Loci liegen in einer Region und kodieren für HLA-A, HLA-B, und HLA-C, die so genannten HLA-Klasse-I Antigene. Die MHC-Klasse-II Loci umfassen eine zweite Region, die HLA-D Region, und kodieren für die HLA-Klasse-II Antigene HLA-DR, HLA-DQ, und HLA-DP^{13, 79}.

Zwischen diesen beiden befindet sich eine weitere Gengruppe, die MHC-Klasse-III Loci. Die Klasse-III Region besitzt die höchste Gendichte und verfügt somit über den größten Informationsgehalt, allerdings sind einige dieser Gene nicht in dem Immunsystem involviert^{79, 1}. Zu diesen von der Klasse-III kodierten Proteinen gehören unter anderem die Komplementfaktoren C2, C4A, C4B und BF, sowie HSP 70, TNF und das Enzym C-21-Hydroxylase. Zwischen den MHC-Klasse-III und MHC-Klasse-I Loci liegen die Gene für die Tumornekrosefaktoren α und β ^{80, 79, 1}.

Aufgrund der Fähigkeit Peptide zu binden und zu präsentieren geht man davon aus, dass HSP70 (Hitzeschockprotein 70) der funktionelle Vorgänger der MHC-Moleküle ist. HSP70 ist des weiteren in der Lage, intrazelluläre Peptide von Tumorzellen zu präsentieren und fungiert somit als „tumor-rejection-antigen“, wie die anderen molekularen Chaperone Calreticulin und grp96⁶⁶. Die Allele von HSP70 zeigen ein starkes Kopplungsungleichgewicht mit HLA-DR Allelen¹¹⁸. Dies ist ein sehr nützlicher Aspekt in Assoziationsstudien HLA kodierter Krankheiten.

Abb. 1: Anordnung und schematischer Aufbau der HLA-Region auf dem kurzen Arm des Chromosom Nr.6



Der HLA-Komplex wird klassischerweise in drei Regionen aufgeteilt, I, II, und III. Jede Region enthält zahlreiche Loci (Gene), wovon allerdings nur einige dargestellt sind. Von den Klasse I und II Genen sind lediglich die exprimierten abgebildet. Die Abkürzungen stehen im Einzelnen für: BF, Komplementfaktor B; C2, Komplement 2; C21B, Cytochrom P-450; C4A und C4B, Komplement 4A und 4B; HFE, Hämochromatosis; HSP, Hitzeschockprotein; LMP, multifunktionale Protease; LTA und LTB, Lymphotoxin A und B; MICA und MICB, „major-histocompatibility-complex“ Klasse I Gene A und B; PSMB8 und 9, Proteasomen β 8 und 9; TAP1 und TAP2, „transporter associated with antigen processing“ 1 und 2; TAPBP, „TAP-binding protein“; TNF- α , Tumornekrosefaktor α ; HSPA1A, HSPA1B, HSPA1L, Hitzeschockprotein 1A A-Typ, Hitzeschockprotein 1A B-Typ und Hitzeschockprotein 1A-like.

1.1.2 Genetik des HLA-Systems

Ein Hauptcharakteristikum des HLA-Systems ist sein extremer Polymorphismus, der mit Abstand umfangreichste im humanen Genom. Für die überwiegende Anzahl von Genorten liegen zahlreiche Genvarianten vor, so genannte Allele^{80, 79, 10}. Für gewöhnlich besitzt ein Locus mit multipler Allelie ein oder zwei Allele mit häufiger Frequenz, sowie eine Anzahl seltenerer Genvarianten. Der MHC-Komplex bildet hier die große Ausnahme. Die Loci des HLA-Systems besitzen zahlreiche, hochfrequente Allele (HLA-A 59, HLA-B 118, HLA-C 36, DRB1 168, DQA1 19, DQB1 30, DPB1 73; *Stand 2003*)^{80, 79}.

Dieser extreme Polymorphismus spiegelt die zentrale Rolle des HLA-Systems im ganzen Immunsystem wieder.

Jedes Individuum besitzt zwei Chromosomen 6, wobei eines vom Vater und eines von der Mutter vererbt wurde. Auf jedem HLA-Lokus liegt nun jeweils ein charakteristisches Allel. Alle HLA-Allele, die serologisch oder molekularbiologisch bei einem Menschen erfassbar sind, kennzeichnen den spezifischen HLA-Phänotyp einer Person. Einzelne Allele eines HLA-Lokus sind in der Population nicht gleich verteilt, so kennt man häufigere und seltenere Allele. Dabei kann die Frequenz der Allele in ethnisch verschiedenen Bevölkerungsgruppen extrem variieren¹⁰⁹ (*siehe Tabelle 1*).

Die Allele verschiedener HLA-Loci werden auf den einzelnen Chromosomen 6 gekoppelt als Haplotypen vererbt. Jeder Mensch ererbt somit von Vater und Mutter zwei Haplotypen, welche somit den individuellen Genotyp bestimmen¹⁰⁹. Der MHC-Komplex wird überwiegend „en bloc“ vererbt, so wird z. B. das große Segment von HLA-B bis HLA-DQ β beinahe immer als Ganzes auf die nächste Generation übertragen. Auch werden die den HLA-Genotyp bestimmenden Gene kodominant korrespondierend exprimiert. Beide Allele tragen daher gleichermaßen zum exprimierten Phänotypen bei^{80, 79, 10}.

Die theoretisch errechnete Zufallsfrequenz von Allelen auf jedem einzelnen Locus (Haplotypen) entspricht nicht den Beobachtungen in der Population. Vielmehr lässt sich feststellen, dass bestimmte verschiedene Allele in Haplotypen häufiger gekoppelt vererbt werden. Dieses Phänomen bezeichnet man als Kopplungsungleichgewicht. Es wird als Δ -Wert angegeben^{80, 79, 10}.

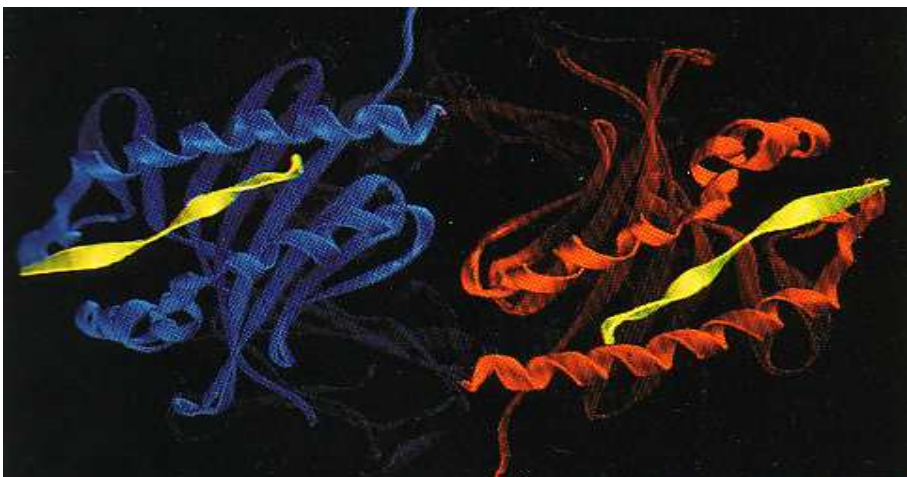
Zur Illustration ein Beispiel:

Die HLA-Klasse I Antigene HLA-A1 und HLA-B8 werden bei Kaukasiern mit einer Häufigkeit von 27,5% und 15,7% festgestellt. Statistisch würde man den Haplotypen A1-B8 mit einer Häufigkeit erwarten, die dem Produkt der Genfrequenz entspräche ($0.275 \times 0.157 = 0.0432$). Die beobachtete Häufigkeit liegt allerdings deutlich darüber, nämlich bei 9.8%. Die Differenz Δ von 5.48% entspricht damit dem zu Grunde liegenden Kopplungsungleichgewicht⁷⁵

HLA-Klasse-I Gene zeigen einen typischen Aufbau aus sieben Exonen (kodierender Anteil), einer 3' nicht translatierten Region, sowie acht Introns (nicht kodierender Anteil). Die polymorphen Anteile der MHC-Klasse-I Gene sind vor allem in Exon 2 und 3 lokalisiert, welche die Peptid-Bindungs-Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ kodieren⁸⁰. Die als $\alpha 3$ bezeichnete Immunglobulinähnliche Domäne wird von Exon 4 kodiert. Diese weist eine charakteristische Struktur auf, welche erstmals bei Immunglobulinen beschrieben wurde⁸⁰. Die α -Kettengene der HLA-Klasse-II Dimere bestehen aus vier Exons und vier Introns, die β -Kettengene hingegen aus fünf Exons und fünf Introns sowie jeweils einer 3' nicht translatierten Region¹⁰⁹.

Die Genprodukte des HLA-Komplexes besitzen Domänenstruktur und zählen somit zu den Molekülen der Immunglobulinsuperfamilie. Exon 2 und 3 der HLA-Klasse-I Gene, sowie Exon 2 und 3 der HLA-Klasse-II Gene, kodieren für jeweils eine extrazelluläre Domäne von 90 Aminosäuren. Wie in den Antikörper-Molekülen werden diese Regionen über konservierte Cysteine in Domänenstruktur gehalten. Obwohl die Sequenzhomologien zwischen HLA-Klasse-I und HLA-Klasse-II Molekülen nur 50 bis 60 Prozent beträgt, zeigen die Röntgenstrukturanalysen beider Dimere grundsätzliche Ähnlichkeiten. Beide Molekülgruppen weisen in ihren äußersten Anteilen Gruben auf, die am Boden von β -Faltblattstrukturen und an den Seiten von α -Helices begrenzt werden¹⁰⁹.

Abb. 2: *Röntgenstrukturanalyse der Antigen-Bindungs-Furchen des HLA-DR1 Moleküls (links) und des HLA-A68 Moleküls (rechts).*



1.1.3 HLA-Klasse II Antigene

Die HLA-Klasse-II Antigene sind die Moleküle der HLA-D Region und sind ebenfalls Heterodimere. Sie bestehen aus je einer α - und einer β -Glykoproteinkette mit jeweils vier Domänen. Einer Peptid-Bindungs-Domäne (α_1 oder β_1), einer Immunglobulinähnlichen Domäne (α_2 oder β_2), einer transmembranösen Region und dem Zytoplasma-Anker (*siehe Abbildung 3*)⁷⁹.⁸⁰. Der die alloenen Determinanten tragende extrazelluläre Bereich beider Ketten wird durch die Domänen α_1/α_2 und β_1/β_2 charakterisiert^{80, 79}. Die beiden Ketten des Heterodimers sind nicht kovalent miteinander assoziiert. Ihr Polypeptid -gerüst hat große Ähnlichkeit mit der Struktur der Klasse-I Moleküle sowie der Immunglobuline^{80, 79}. Die α -Kette besitzt ein Molekulargewicht von 31000-34000 Dalton, bei einer Länge von 229-233 Aminosäuren, die β -Kette mit ihren 225-238 Aminosäuren ein Molekulargewicht von 26000-29000 Dalton^{80, 79}. Klasse-I Antigene werden, bis auf Neuronen, Myokardzellen und Zellen des exokrinen Pankreas, auf allen somatischen Zellen exprimiert. Die Antigene der Klasse-II hingegen nur auf bestimmten immunogenen Zellen^{2, 80, 79}. Zu den Antigen präsentierenden Zellen der Klasse-II gehören B-Lymphozyten, aktivierte T-Lymphozyten, Makrophagen, epidermale Langerhansschezellen, Dendritischezellen und Thymusepithelzellen. In der Gegenwart von Interferon- γ können jedoch auch andere Zellen HLA-Klasse-II Moleküle exprimieren^{79, 78}.

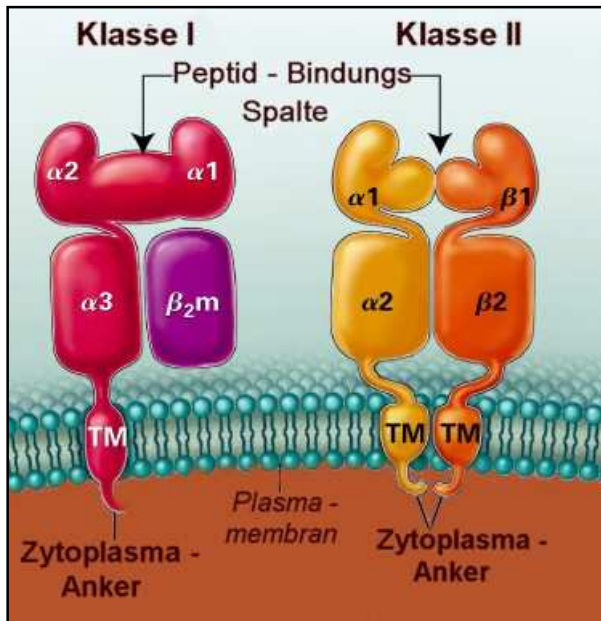
Alle HLA-Klasse-II Antigene werden von verschiedenen Subregionen der HLA-D-Klasse kodiert. Diese Subregionen tragen die Bezeichnung DR, DQ, DO, DM, DN und DP^{80, 87, 13, 79}. Die Subregionen unterscheiden sich sowohl in der Art und Anzahl ihrer jeweiligen Loci, welche die α -und β -Polypeptidketten des Heterodimers kodieren, als auch in der Fähigkeit funktionelle Moleküle zu exprimieren (*siehe Abb. 1*). Nur die Genregionen DR, DQ, DM, und DP sind in der Lage beide Ketten der HLA-Antigene zu kodieren. Die bislang auf Zelloberflächen identifizierten HLA-Antigene stellen ausschließlich Produkte der Subregionen DR, DQ, und DP dar^{74, 13}. Die Bezeichnung ihres Lokus auf Chromosom 6 besteht aus drei Lettern. Der erste Buchstabe (D) steht für die

Klasse, der zweite (M, N, O, P, Q, oder R) für die Familie. Der dritte Buchstabe (A oder B) bezeichnet die α - oder β -Polypeptidkette. Nach diesem System bezeichnet HLA-DRB1 ein Gen der Klasse-II, welches der R-Familie angehört, und für die β -Polypeptidkette kodiert⁷⁹. In der DR-Region können je nach Haplotyp mehrere β -Ketten Gene (z. B. DR β 1-5) vorliegen. In der DQ-Region sind auf allen Haplotypen 2 α und 2 β Segmente bekannt. Allerdings konnte bisher nur die Expression von DQB1 und DQA1 nachgewiesen werden.

Die Nomenklatur der HLA-Antigene erfolgt aufgrund historischen Ursprungs „zweigleisig“. Dem ursprünglichen, serologischen Bezeichnungssystem, welchem die Bindung von Antikörpern zugrunde liegt, reichte die Kapazität für den weitaus größeren Informations -gehalt der heute angewandten Gensequenzierung nicht mehr aus⁷⁵. Die Differenzierung der jeweiligen, individuellen Gene des HLA-Systems erfolgt heute durch die Bezeichnung des Genortes (z.B. DRB1) mittels Arabischer Ziffern. In der HLA-Klasse II spezifiziert die erste Zahl den Locus, gefolgt von einem Stern, die folgenden Nummern stehen für die diversen Allelvarianten des jeweiligen Gens⁷⁹. Das erste Zahlenpaar repräsentiert das Hauptmerkmal, die folgenden beiden Ziffern die auf DNA-Ebene definierten Untermerkmale⁷⁵. Eine fünfte Ziffer wird gelegentlich zur Bezeichnung von Allelen angehängt, wenn eine „stumme“ Mutation vorliegt, die nicht zur Veränderung der Aminosäuresequenz führt (DQB1*030301 und DQB1*030302)⁷⁵. Bereits heute werden häufig mehr als 6 Ziffern verwendet.

Die Bezeichnung HLA-DRB1*0401 bezeichnet demzufolge die Allelvariante 0401 des Gen DRB, mit dem Hauptmerkmal 04 und dem Untermerkmal 01. Dieses ist ein Klasse-II Gen, zur R-Familie gehörend, und kodiert für die β -Kette eines HLA-Klasse-II Moleküls⁷⁹.

Abb. 3: Struktur der HLA-Klasse I und Klasse II Moleküle⁷⁹.



Beta2-Mikroglobulin (β_2m) ist die leichte Kette der Klasse-I Moleküle. Die α -Kette der Klasse-I Moleküle hat zwei Peptid-Bindungs-Domänen (α_1 und α_2), eine immunglobulinähnlichen Domäne (α_3), eine transmembranöse Region (TM) und den Zytosol-Anker. Jede der beiden Klasse-II α und β Ketten hat vier Domänen. Eine Peptid-Bindungs-Domäne (α_1 oder β_1), eine immunglobulinähnlichen Domäne (α_2 oder β_2), eine transmembranöse Region und den Zytosol-Anker.

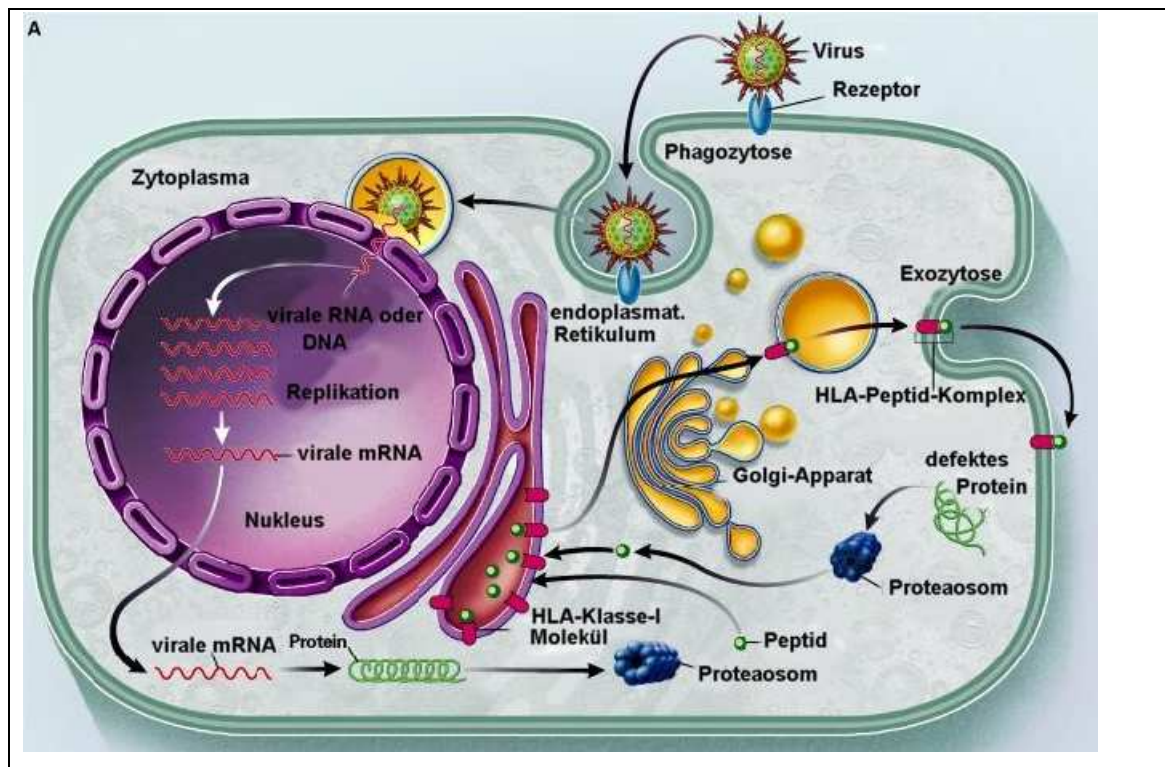
1.1.3.1 HLA-DQ

Die HLA-DQ Subregion besteht aus den beiden Gen-Sets DQA1/DQB1 und DQA2/DQB2. Das Paar DQA2 und DQB2 wird nicht exprimiert. Die DQ α -Kette und die DQ β -Kette, welche jeweils von den Genen DQA1 und DQB1 kodiert werden, bilden zusammen das DQ $\alpha\beta$ -Molekül. Obwohl beide Ketten, sowohl die DQ α -Kette als auch die DQ β -Kette, polymorph sind, ist die DQ β -Kette der determinierende Faktor für das DQ-Antigen²⁵. Eine Auflistung der bis 2004 bekannten HLA-DQ Allele und der dazugehörigen serologischen DQ-Spezifitäten zeigt die *Tabelle 2*. Zwischen der HLA-DQ Region und der HLA-DR Region besteht ein starkes Kopplungsungleichgewicht¹⁰. Dies bedeutet, dass bestimmte DQ Antigene fast ausschließlich in Assoziation mit gewissen DR Antigenen auf der Zelloberfläche exprimiert werden, dies verdeutlicht auch *Tabelle 3*.

1.1.4 Funktion des HLA-Systems

Die HLA-Antigene besitzen durch ihre Präsentation von Peptiden aus antigenen Strukturen eine zentrale Bedeutung bei der Antigenpräsentation, sowie der Ausreifung und Aktivierung von T-Zellen¹⁰⁹. Damit nehmen sie eine Schlüsselposition in der Regulation von Immunreaktionen ein. Die unten aufgeführte Abbildung zeigt die wesentlichen Aspekte des HLA-Systems im Hinblick auf Antigenprozessierung und Präsentation. Der Funktion des HLA-Systems ist im Anhang ein umfangreiches Kapitel gewidmet, worin die einzelnen Komponenten und deren Interaktion explizit erläutert werden.

Abb. 4: Antigenprozessierung und Präsentation⁷⁹.



Die Abbildung zeigt den prinzipiellen Reaktionsweg der Antigenprozessierung autologer und viraler Proteine. Verbrauchte oder defekte Proteine werden im Cytosol durch Proteasomen zu Peptiden fragmentiert. Selektierte Peptide werden dann in das endoplasmatische Retikulum transportiert, wo sie auf neu synthetisierte Klasse-I Moleküle geladen werden. Der so gebildete HLA-Peptid Komplex wird danach über den Golgi-Apparat zu der Zelloberfläche exportiert. In viral infiziertem Gewebe werden die viralen Partikel von der Zelle aufgenommen, „uncoated“, und die virale DNA oder RNA gelangt in den Nucleus, wo sie repliziert wird. Die virale „messenger“ RNA (mRNA) gelangt daraufhin ins Cytoplasma, wo sie in Proteine transkribiert wird. Einige dieser frisch synthetisierten Proteine werden noch im Cytosol von Proteasomen fragmentiert, im endoplasmatischen Retikulum an HLA-Klasse-I Moleküle gekoppelt und auf der Zelloberfläche exprimiert.

1.1.5 HLA-System und Krankheitsassoziationen

Erste Studien über die Assoziation von malignen Krankheiten mit dem HLA-System wurden mit dem Ziel durchgeführt, mögliche genetische Faktoren im Tumorgeschehen zu erfassen. Amiel et al. fanden in diesem Zusammenhang bereits 1967 bei Patienten mit Morbus Hodgkin heraus, dass das Merkmal 4c (den heutigen HLA-Antigenen B5, 35, 18, 15 entsprechend) im Vergleich zur gesunden Bevölkerung in seiner Frequenz erhöht war³⁷. Die Autoren leiteten damit eine Flut von Krankheitsstudien ein, deren Ergebnisse auf dem I. Internationalen Symposium über HLA und Krankheiten 1976 in Paris zusammengefasst und 1977 von Dausset und Svejgaard in der Monographie "HLA and Disease" publiziert und ausgewertet wurden²⁹. Die wichtigsten HLA-Assoziationen sind in *Tabelle 7* zusammengefasst (zitiert nach Waßmuth¹⁶²).

Die Stärke der Assoziation wird als relatives Risiko angegeben, durch welches ausgedrückt wird, um wie viel das Risiko eines Trägers eines bestimmten Antigens erhöht ist, die entsprechende Krankheit im Vergleich zu einer Person zu bekommen, die das Antigen nicht besitzt. Während sich bei verschiedenen Tumorpatienten in der Folgezeit dann keine oder nur sehr schwache Beziehungen zum HLA-System nachweisen ließen, überraschten die starken HLA-Assoziationen bei Erkrankungen des rheumatischen und autoimmunen Formenkreises. Das bekannteste und eindeutigste Beispiel ist der Morbus Bechterew, der eine extrem starke Assoziation zum HLA-B27 Merkmal zeigt. In den Jahren 2000 / 2001 konnte bei allergischer Rhinitis eine Assoziation mit HLA-B40 und bei allergischem Asthma bronchiale mit HLA-B12 gefunden werden³⁷. Die Assoziation mit bestimmten HLA-Merkmalen ist für die verschiedenen Formen der Psoriasis unterschiedlich, was für eine Heterogenität der Psoriasis-Phänotypen spricht. Dabei steht das Merkmal HLA-Cw6 in wesentlich stärkerer Beziehung zur Psoriasis als HLA-B-Merkmale. Die HLA-B Merkmale sind offenbar erhöht, da sie sich in einem starken Kopplungsungleichgewicht mit HLA-Cw6 befinden und deswegen hochfrequent mit HLA-Cw6 in einem Haplotyp (en bloc Vererbung) assoziiert sind¹⁴⁶.

Inzwischen sind bei einer Vielzahl von Krankheiten, meist autoimmuner Natur und unklarer Genese, HLA-Assoziationen bekannt geworden. Diese können für die Diagnostik allerdings nur bei besonders starker Assoziation eingesetzt werden. Für die Ätiopathogenese dieser Erkrankungen können jedoch Kenntnisse über die Struktur und Funktion der HLA-Antigene wichtige Informationen liefern⁷⁹. Für das Zustandekommen der HLA-Assoziation von Krankheiten gibt es verschiedene Hypothesen, die sich gegenseitig nicht ausschließen: direkte Beteiligung der HLA-Antigene (T-Zell-Restriktion, molekulares "Mimicry", Ligand/Rezeptor-Interferenz, Klonale Deletion) und indirekte Beteiligung.

HLA-Antigene als Marker von Suszeptibilitäts (Anfälligkeit) bzw.

Resistenzgenen, T-Zell-Restriktion:

HLA-Moleküle binden Peptide aus Fremdanthigenen (z.B. Viren) und präsentieren sie T-Zellen (biologische Funktion der HLA-Antigene). Dabei binden unterschiedliche HLA-Moleküle ein bestimmtes, umfangreiches, jedoch begrenztes Set an unterschiedlichen Peptiden und bestimmen damit das Repertoire an Erkennungsstrukturen von Mikroorganismen, das den T-Lymphozyten angeboten wird. Die daraufhin ausgelöste Immunantwort induziert eine Erkrankung mit bekannter HLA-Assoziation aus (*immune response*). In Abhängigkeit von der Beziehung Empfänger-Parasit/Virus kann die Krankheit durch Chronizität der Infektion oder durch sekundäre Autoimmunreaktion (Autoantigene durch Modifikation körpereigener Zellen) entstehen. Einige HLA-Moleküle präsentieren dabei bestimmte Peptide den T-Zellen nicht, bzw. derartig, dass eine Immunantwort nicht zustande kommt oder sogar unterdrückt wird (*immune suppression*)¹¹⁴. Damit kann es Mikroorganismen möglich sein, spezielle Zellschäden mit nachfolgenden Entzündungsprozessen hervorzurufen.

Molekulares „Mimicry“

Infolge einer molekularen Ähnlichkeit zwischen Epitopen von Mikroorganismen und körpereigenen Antigenen werden die ersteren nicht als fremd erkannt. Toleranz der Fremdstruktur führt zum Ausbleiben der Immunantwort und nachfolgender Krankheit durch direkten Einfluss der Mikroorganismen. Molekulares „Mimicry“ kann aber auch zur Induktion von Immunreaktionen gegen die Fremdstrukturen führen. Bedingt durch Kreuzreaktionen mit Selbstantigenen führt dies zur Schädigung körpereigener Zellen.

Ligand/Rezeptor-Interferenz

HLA-Antigene wirken als Rezeptoren für Krankheitserreger, die dann auf diese Art leichter in den Organismus gelangen können.

Klonale Deletion

Bei der zentralen Toleranz wird eine klonale Auslöschung bzw. Blockierung der T-Zellen, mit potentieller Reaktion gegen Selbstantigene, vom HLA-System im Thymus kontrolliert. Autoreaktive T-Zellen werden hierbei normalerweise eliminiert. Infolge einer inkompletten klonalen Deletion im Thymus kann es zu Autoimmunerkrankungen kommen.

Indirekte Beteiligung der HLA-Allele

Unbekannte Suszeptibilitätsgene könnten eng mit HLA-Genen gekoppelt sein, welche durch die HLA-Assoziation indirekt als Kopplung angezeigt werden. Zwar sind im HLA-Komplex zahlreiche Gene gefunden worden, die mit bestimmten Abwehrfunktionen verbunden sind (C4, C2, Bf, TNF A und B, Transporter-und Proteasen-Gene, Hsp 70), deren Rolle in der Pathogenese in diesem Zusammenhang jedoch noch nicht eindeutig geklärt ist. Vielfach wurden Erkrankungen beschrieben, die nicht nur mit einzelnen HLA-Antigenen, sondern in Kopplung mit anderen HLA-Molekülen vererbt werden.

Nach dem heutigen Wissen über die Struktur und Funktion der HLA-Allele ist für einen Großteil der HLA-Assoziierten Erkrankungen in der Regel von einem multifaktoriellen Krankheitsgeschehen auszugehen. Weitere Daten über das HLA-System können von Nutzen sein, die Mechanismen der Assoziationen zu Krankheiten zu erfassen, deren Ätiopathogenese zu verstehen und Verbindung für eine erfolgreiche Prophylaxe und Therapie HLA-Assoziierter Krankheiten zu finden. Damit hat sich die Thematik HLA und Krankheiten zu einem für Genetiker, Immunologen und Kliniker gleichermaßen interessanten Forschungsgebiet mit großer Bedeutung für die klinische Praxis entwickelt. In der vorliegenden Arbeit soll insbesondere der Bezug des HLA-Systems zur Ätiopathogenese der Zöliakie näher betrachtet werden.

1.2 Die Zöliakie

1.2.1 Ätiologie und Pathogenese

Die Zöliakie ist eine Autoimmunerkrankung, welche durch das in Nahrungsmitteln enthaltene Protein Gluten ausgelöst wird¹⁵¹.

Autoimmunerkrankungen besitzen typischerweise eine multifaktorielle Ätiologie¹⁶², zu denen sowohl umweltbedingte Komponenten als auch diverse genetische Faktoren gehören — einschließlich der HLA-Gene¹⁴⁶.

Dem historischen Rückblick über die Entwicklungsgeschichte der Zöliakie ist im Anhang, nebst Definition derselben, ein eigenständiges, umfassendes Kapitel gewidmet. Eine Übersicht der historischen „Meilensteine“ der Zöliakiediagnostik illustriert *Tabelle 7*.

Bei der Zöliakie handelt sich um ein Malabsorptionssyndrom, welches auf einer permanenten Unverträglichkeit des Getreideproteins Gluten beruht¹⁴⁶, genetisch determinierte Individuen entwickeln eine Entzündung der Dünndarmmukosa mit Kryptenhyperplasie und villöser Atrophie^{94, 100, 146}.

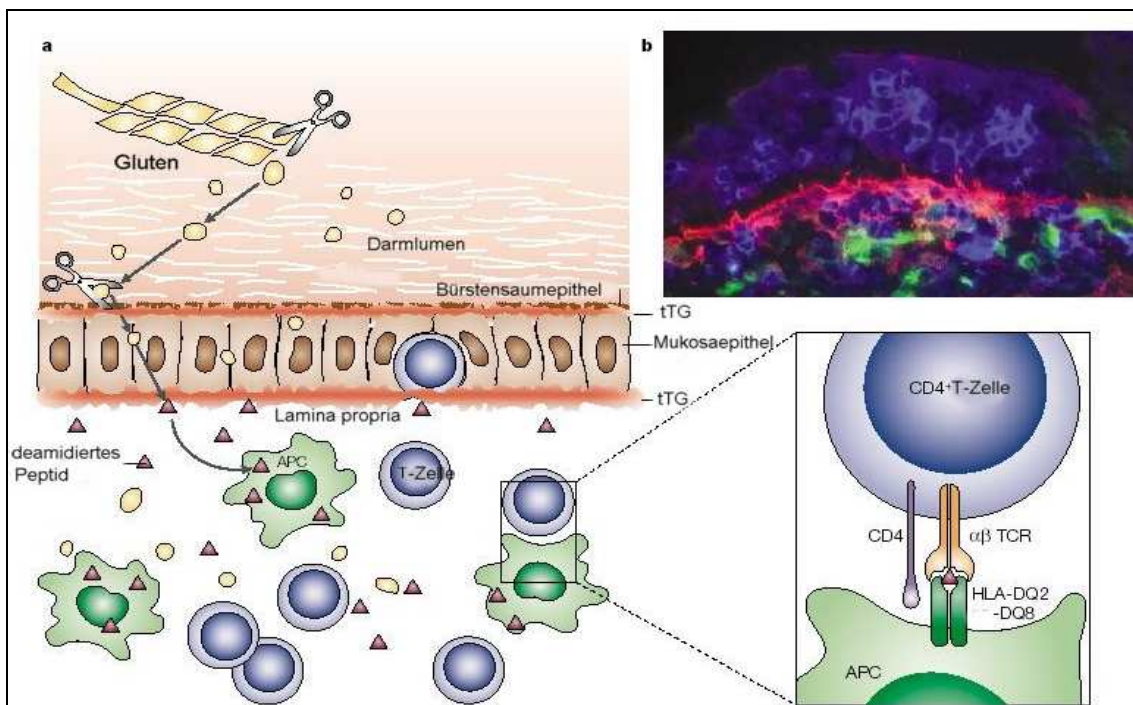
Das Protein Gluten ist ein fester Bestandteil von Weizen, Roggen, Gerste und Hafer. Es ist als „Klebereiweiß“ für die Bindeeigenschaften des Mehls verantwortlich. Gluten kann in die alkohollöslichen, monomeren Prolamine und die unlöslichen, polymeren Glutenine differenziert werden¹⁴¹. Die Prolamine des Weizens werden in α , β , γ , und ω Gliadine fraktioniert, was Molekulargewichten zwischen 20,000 und 75,000 Dalton entspricht, sie enthalten viele repetitive Prolin- und Glutamin Sequenzen¹⁴¹. Die entscheidende glutentoxische Wirkung wird in Bezug auf Zöliakie der Peptidfraktion A des α -Gliadins zugeschrieben^{94, 141}. Peptide, welche diese α -Gliadin Epitope tragen, sind wegen ihres hohen Anteils an Prolin sehr resistent gegenüber intestinalen und pankreatischen Verdauungsenzymen¹⁴⁶. In vitro und in vivo Studien von L. Shan¹⁶² zeigen, dass ein 33-mer Peptidfragment verbleibt¹⁴⁶, wenn Gliadin mit allen physiologisch vorkommenden, digestiven Enzymen behandelt wird. Dieses Peptidfragment stellt die antigene Determinante des α -Gliadins dar.

Unter physiologischen Bedingungen stellt das intestinale Epithel mit seinen „tight junctions“ eine nahezu undurchdringliche Barriere für Makromoleküle wie Gluten dar. Es besteht jedoch für eine quantitativ geringe, aber immunologisch

signifikante Fraktion, der oben genannten Peptidfragmente die Möglichkeit, diese Membran mittels transzellulärem oder parazellulärem Transport zu überwinden³⁷. Nach intrazellulärer Prozessierung werden die α -Gliadin Peptidfragmente dann mittels DQ2/DQ8- Molekülen $CD4^+$ T-Zellen präsentiert. Die „Tissue Transglutaminase“ (tTg) hat in Bezug auf die inflammatorische Pathogenese der Zöliakie direkte und indirekte Effekte. Bei Patienten mit einer aktiven Zöliakie wurden in der Mukosa vermehrt die Cytokine Interleukin 18 (IL-18) und Interferon α (IFN- α) nachgewiesen. Diese Cytokine regulieren unter anderem die T-Zelldifferenzierung und steigern die Freisetzung von Interferon γ (IFN- γ), welches von den Gluten spezifischen T-Zellen in großen Mengen produziert wird¹¹³. Pender¹²¹ et al. zeigten, dass diese Cytokine zu epitheliale Zelltod und zur Freisetzung von Matrix-Metalloproteinasen führen. Das Modell für einen Autoimmunmechanismus wurde von Mäki⁹⁵ et al. 1995 postuliert. Die Gliadinpeptide bilden zusammen mit tTG einen Hapten ähnlichen Komplex. Dieser wird von glutenspezifischen $CD4^+$ T-Lymphozyten an B-Lymphozyten präsentiert, welche dann mittels IgA- und IgG-Antikörpern eine Autoimmunreaktion gegen tTg initiieren¹⁴⁵. Epidemiologische Studien beweisen, dass Infektionen einen Risikofaktor für Zöliakie darstellen¹²², da durch eine oberflächliche Mukosaläsion, wie beispielsweise bei einer Infektion, infolge der beschädigten epithelialen Barriere vermehrt Gluten in tiefere Strukturen gelangen kann. Als Erreger für eine Darminfektion kommt das Adenovirus 12 E1b in Betracht, welches die Immuntoleranz gegen Darmstrukturen und Gliadin aufheben soll. Gestützt wird diese Vermutung durch die Entdeckung einer partiellen Aminosäuresequenzhomologie des viralen Proteins E1b (54 kDA) mit α -Gliadin⁷¹. Es gab viele Genomstudien zu potentiellen Suszeptibilitätsgenen außerhalb des MHC-Systems. Der Konsens zwischen den einzelnen Studien ist allerdings sehr gering und es gibt bis auf den HLA-Komplex keine weitere Genomregion mit einer deutlichen prädisponierenden Signifikanz für die Entwicklung der Zöliakie¹⁴⁶. Es gab zahlreiche Studien bezüglich eines genetischen Einflusses des „negative co-stimulatory molecule cytotoxic T-lymphocyte antigen 4“ (CTLA4)^{130, 76}, aber der Effekt dieses Genes ist sehr gering¹⁴⁶. Momentan gibt es Studien zu einer weiteren Genregion außerhalb

des HLA-Komplexes, die in Zusammenhang mit dem Auftreten der Zöliakie stehen könnte. Es handelt sich um einen Genbereich auf dem langen Arm von Chromosom 5 (5q31-33)^{112, 50}. Laut Sollid könnte diese Region ein „heißer“ Kandidat unter den verdächtigen Genen sein, da sie Gene für die Kodierung verschiedener Cytokine und Interleukine (T_H2; CD-14, IL-12) enthält und auch in weiteren chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie Morbus Crohn, Diabetes Typ-1 oder Asthma, als mögliche prädisponierende Region impliziert ist¹³³.

Abb. 5: Schema der Gluten induzierten Pathogenese der Zöliakie¹⁴⁶.



A. Glutenpeptide werden im Darm sowohl von luminalen Enzymen, als auch von Enzymen des Bürstensaumepithels fermentiert. Einige Peptide überstehen diese Digestion und werden als Polypeptide durch das Mukosaepithel in die Lamina propria transportiert. Diese Peptide werden dort von der „tissue transglutaminase“ deamidiert, welche sowohl extrazellulär, in der subepithelialen Region der intestinalen Mukosa, als auch im Bürstensaumepithel selbst, vorhanden ist. In der Lamina propria vorkommende CD4⁺ T-Lymphozyten erkennen bevorzugt diese deamidierten Glutenpeptide, welche von HLA-DQ2/DQ8 Molekülen auf der Oberfläche Antigenpräsentierender Zellen (APC) präsentiert werden¹⁴⁶. **B.** Immunfluoreszenzbild des Duodenums eines unbehandelten Zöliakiepatienten. HLA-DQ2 (grün), tTG (pink), T-Lymphozyten (lila)¹⁴⁶.

1.2.2 Klassifikation und klinisches Erscheinungsbild

Die Zöliakie manifestiert sich klassischerweise zwischen dem 6. und 18. Lebensmonat, nachdem der Säugling abgestillt ist und glutenhaltige Getreideprodukte der Nahrung hinzugefügt werden. Bei Erwachsenen liegt das Manifestationsalter zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr bei Frauen, und zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr bei Männern⁶³.

Zu ihren klassischen Symptomen gehören chronisch rezidivierende Diarrhoen mit massigen, unangenehm riechenden Fettstühlen, ein geblähtes, stark ausladendes Abdomen, Flatulenz und Meteorismus, Hypovitaminosen und Elektrolytstörungen infolge eines globalen Malabsorptionssyndroms, schwere Anämien, Gewichtsverlust, Wachstums- und Entwicklungsstörungen. Patienten, die unter Zöliakie leiden, sind zusätzlich häufig gereizt und depressiv verstimmt^{37,16, 63}. In den vergangenen Jahren wurde in diversen Studien immer häufiger von atypischen Verläufen mit spät auftretendem Manifestationsalter berichtet. Mäki et al.⁹⁹ berichteten als erste über eine Verschiebung des Manifestationsalters um 5 – 6 Jahre. Weniger als 50% dieser Fälle wiesen dabei die klassischen gastrointestinalen Symptome auf. Studien aus Schottland⁹⁰ und England¹¹⁶ untermauern diese Beobachtung.

Die subklinischen Formen der Zöliakie äußern sich häufig mit folgenden Symptomen: Eisenmangelanämie^{24, 37}, Minderwuchs³⁷, verzögerte Pubertät, Amenorrhoe bis hin zur Infertilität⁵⁹ und verfrühte Menopause, Hypovitaminosen, vor allem Vitamin B₁₂ – Mangel, sekundäre Verkalkungsstörungen der Zähne und des Skeletts und verfrühte Osteoporose^{8, 22,37}, Elektrolytstörungen oder Muskelhypotonie^{24, 58}.

Diese atypischen Symptome werden als epidemiologischer Wandel im Erscheinungsbild der Zöliakie gewertet und sind auf das gewachsene Verständnis hinsichtlich der Pathogenese, sowie der Dank modernster Screeningverfahren verbesserten Diagnostik, zurückzuführen. Serologische Screeningmethoden, wie der anti-tTG Antikörpertest, besitzen eine Sensitivität von 98%, bei einer Spezifität von 95%. Ein selektives serologisches Screening von Risiko-Gruppen im Vorfeld der diagnostischen Dünndarmbiopsie kann dazu

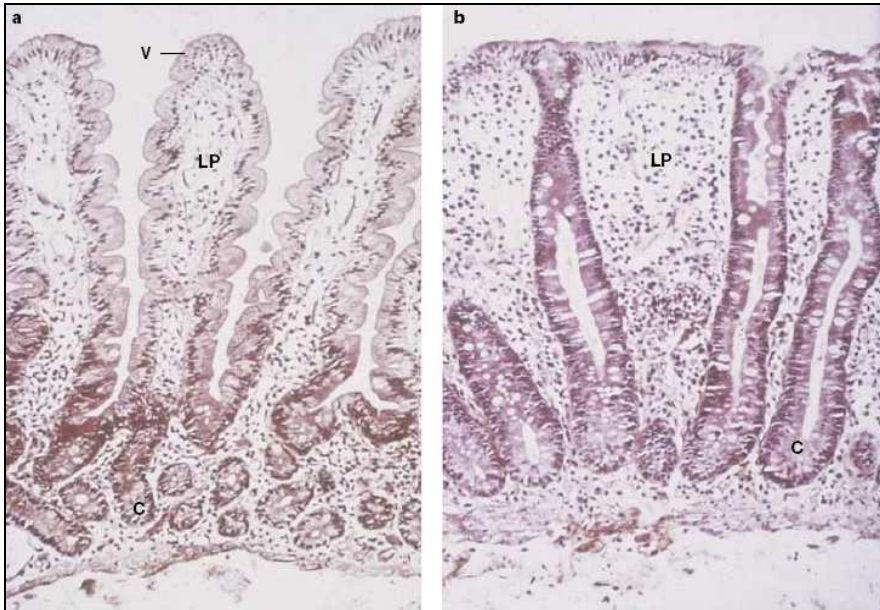
beitragen, Patienten mit silenter und latenter Zöliakie zu erkennen und durch rechtzeitig eingeführte glutenfreie Diät malabsorptionsbedingten Langzeitrissen vorzubeugen³⁷. Der diagnostische Goldstandard ist und bleibt jedoch die Dünndarmbiopsie, welche heute endoskopisch durchgeführt wird. Die gewonnenen Biopsate werden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und unter Lichtmikroskopie nach Marsh¹⁰⁰ histologisch klassifiziert. Die perorale Saugbiopsie wird als ein invasives, zeitaufwendiges und zudem teures Verfahren eingeschätzt, das trotz Sedation für den Patienten einen unangenehmen Eingriff darstellt und zusätzlich mit einer Strahlenbelastung verbunden ist⁹⁷.

Das von der ESPGHAN 1969 erstellte und 1990 modifizierte Diagnoseprotokoll fordert, dass hinsichtlich einer eindeutigen Diagnostik die beiden Kriterien der flachen Dünndarmschleimhaut und der klinischen Remission unter glutenfreier Diät erfüllt sein müssen^{104, 161}. Mittels der von Marsh postulierten histologischen Merkmale (*siehe auch Tabelle 12 im Anhang*) und der von der ESPGHAN geforderten Kriterien, lässt sich die Zöliakie in folgende Gruppen klassifizieren.

Klassische Zöliakie

Das Manifestationsalter liegt bei dieser Form zwischen dem 6. und 18. Lebensmonat. Man beobachtet die oben beschriebenen klassischen Symptome, mit einer damit verbundenen Wachstumsretardierung infolge der Malabsorption. Die pathologischen Veränderungen sind im Duodenum und im oberen Jejunum am ausgeprägtesten. Das Ausmaß der Mukosaläsionen ist dahingehend allerdings sehr variabel und kann den kompletten Dünndarm involvieren³⁷. Die pathohistologischen Läsionen variieren, von stumpfen Zotten, bis hin zur subtotalen oder totalen villösen Atrophie mit Kryptenhyperplasie. Die Mitoserate im betroffenen Gewebe ist signifikant erhöht, auch beobachtet man eine Infiltration der Lamina propria mit Plasmazellen, sowie eine erhöhte Anzahl der intraepithelialen T-Lymphozyten³⁷. Durch GFD klingen die Symptome ab und es kommt zur Remission der Mukosa mit Aufholwachstum³⁷.

Abb. 6: Duodenumbiopsat eines Zöliakiepatienten im Vergleich zu einer normalen Mukosa¹⁴⁶.



a. Histologische Aufnahme eines gesunden Duodenums, mit Villi (V) und Krypten (C). Die Lamina propria (LP) ist stark vaskularisiert und enthält ein ausgeprägtes Lymphsystem.

b. Die Abbildung zeigt eine charakteristisch, pathologisch veränderte Mukosa bei Zöliakie, mit subtotaler Zottenatrophie, vergrößerten, hyperplastischen Krypten und gesteigerter Infiltration von Lymphozyten in die Lamina propria¹⁴⁶.

Subklinische Zöliakie

Bei den subklinischen, atypischen Formen der Zöliakie stehen weniger die gastrointestinalen, als vielmehr die oben beschriebenen atypischen Symptome im Vordergrund.

Bei der Latenten Zöliakie handelt es sich um beschwerdefreie Patienten mit unauffälliger intestinaler Mukosa (trotz glutenhaltiger Ernährung), die sich jedoch zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt, bei positivem Antikörpernachweis, auf charakteristische Weise verändert.^{38, 100}. Diese Patienten haben ein hohes Risiko, an Zöliakie zu erkranken bzw. es besteht die Möglichkeit des Rezidivs.

Bei der Silenten (asymptomatischen) Zöliakie zeigen die Patienten keine gastrointestinalen Beschwerden und werden meist anhand von Screenings diagnostiziert. Unter GFD wurde bei diesen Menschen eine gesteigerte Gewichtszunahme, beschleunigtes Wachstum, gesteigerter Appetit,

verbesserte physische und psychische Leistungen, sowie eine Verbesserung des allgemeinen Wohlbefindens beobachtet³⁶.

Die Zöliakie gilt als potentiell prämaligne Erkrankung. Das relative Risiko (RR), im Vergleich zur allgemeinen Bevölkerung, unter glutenhaltiger Kost ein Malignom zu entwickeln, liegt bei RR=2, für Non-Hodgkin-Lymphome sogar bei RR=42.7⁶⁰. Unter GFD besteht allerdings kein erhöhtes Risiko.

Allein dieses Beispiel zeigt, dass die Erkennung und Behandlung auch der asymptomatischen Zöliakie von entscheidender präventiver Bedeutung ist. Es gibt zahlreiche Erkrankungen, welche eine Assoziation mit der Zöliakie aufweisen. Eine Übersicht der mit Zöliakie assoziierten Erkrankungen, nebst RR und Prävalenz, zeigt *Tabelle 9* im Anhang.

1.2.3 Epidemiologie

In den vergangenen 50 Jahren wurden zahlreiche epidemiologische Studien hinsichtlich der Zöliakie in Europa, mit auf den ersten Blick sehr kontroversen Ergebnissen durchgeführt. Davidson³⁰ führte 1950 die erste epidemiologische Studie in Großbritannien durch und postulierte eine Prävalenz in England und Wales von 1:8000, in Schottland hingegen von „nur“ 1:4000. Zu dieser Zeit steckte die Zöliakieforschung noch in den Kinderschuhen und es wurden nur Fälle dokumentiert, welche die klassischen Symptome der Zöliakie, wie Malabsorption, aufzeigten. Seit 1970 verbesserten sich die diagnostischen Kriterien rapide. Damit wurde man auch auf oligosymptomatische Formen der Zöliakie aufmerksam³⁷. Epidemiologische Studien richteten sich nun nicht mehr nach der reinen Symptomatik, sondern Dank der Dünndarmsaugbiopsie immer mehr auch nach den von Marsh¹⁰⁰ postulierten objektiven pathohistologischen Befunden der Zöliakie. Mit jeder Neuerung hinsichtlich der Diagnostik, wie zum Beispiel den serologischen Antikörpertests gegen Gliadin und Endomysium, stiegen die Zahlen zur Prävalenz der Zöliakie in verschiedenen Bevölkerungsgruppen.^{89, 37, 158} Erstaunlicherweise wurden zum Teil sehr große epidemiologische Differenzen zwischen angrenzenden Populationen wie Schweden und Dänemark oder deutschen und italienischen Kindern¹²⁵ festgestellt. In einer dänischen Studie von 1993 betrug die Prävalenz der

Zöliakie, aufgrund diagnostischer Daten, 1:10000¹⁶³. Im Nachbarstaat Schweden wurden zur gleichen Zeit ebenfalls epidemiologische Daten hinsichtlich der Zöliakie erhoben^{4, 19}. Es zeigte sich eine Prävalenz der Zöliakie von 1:500 in Schweden⁵. Mäki⁹⁷ und Ascher⁴ führten dies darauf zurück, dass Säuglinge immer weniger gestillt wurden und glutenhaltige Babynahrung immer früher zur Ernährung der Säuglinge verwendet wurde. Studien von Lindberg⁸⁸ bestätigen diese Beobachtung, er führte die kontroverse Prävalenz auf unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten wie häufigeres und längeres Stillen, Alter des Säuglings bei Glutenzufütterung, oder Art und unterschiedliche Glutenmengen in der Babynahrung zurück. Neueren Studien zufolge liegt die tatsächliche Prävalenz, welche auch die milderen oder atypischen Formen einschließt, zwischen 1:200 bis 1:300^{18, 17, 19}. Siehe hierzu auch die im Anhang aufgeführte *Tabelle 10*.

Die epidemiologischen Veränderungen in Bezug auf die Zöliakie veranschaulicht das von Logan⁹¹ 1992 erstellte „Eisberg-Modell“ (siehe unten aufgeführte Abb.8). Die Prävalenz der Zöliakie kann der Gesamtgröße des Eisbergs gleichgestellt werden, und wird primär durch die Frequenz der prädisponierenden Genfaktoren in einer Population charakterisiert.



Die Dimension des Eisbergs hängt allerdings auch davon ab, ob Individuen mit latenter oder milder Enteropathie als erkrankt definiert werden müssen⁹¹. Die aus dem Wasser ragende und daher sichtbare Spitze des Eisbergs wird von den beiden Patientengruppen mit klassischer Zöliakie gebildet, die anhand der gegenwärtigen Diagnosekriterien zu erkennen sind. Es handelt sich dabei um die Patienten mit bekannter Zöliakie, bei denen unter GFD eine

klinische und biopsisch Remission festgestellt wurde. Unter der „Wasserlinie“ verbergen sich zum einen eine größere Patientengruppe mit klinisch stummer Zöliakie und flacher Schleimhaut (Silente Zöliakie), zum anderen eine kleinere

Gruppe beschwerdefreier Probanden mit unauffälliger Dünndarmmukosa (trotz glutenhaltiger Ernährung), allerdings positivem Antikörpernachweis (Latente Zöliakie)^{38, 96}.

Die Wasserlinie charakterisiert das Verhältnis von diagnostizierten zu nicht diagnostizierten Fällen und hängt von einer Vielzahl an Faktoren ab, wie unterschiedliche serologische Sensitivität oder Spezifität der verwendeten Antikörper, divergente Nachweisgrenzen, Laborausstattung oder Diagnosekriterien³⁷. Aufgrund dieser Variablen ist die „Wasserlinie“ weit instabiler, als die gesamten Ausmaße des Eisbergs. Dies erklärt möglicherweise die divergente Prävalenz der Zöliakie³⁷.

Ein beeindruckendes Beispiel dafür, dass wir uns nur der Spitze dieses „Eisbergs“ bewusst sind, ist die bisher größte „Screening“ Studie der Zöliakie. Aus allen Regionen Italiens wurden 17 201 Schulkinder im Alter zwischen sechs und 15 Jahren untersucht, dies entspricht 69% der in Frage kommenden Population. Die Prävalenz war 1:184, und die unentdeckten zu diagnostizierten Fälle an Zöliakie standen in einem beeindruckenden Verhältnis von 7:1¹⁶.

1.3 Zielsetzung

Für die vorliegende Arbeit ergaben sich folgende Aufgaben:

1. HLA-DQ Typisierung von definierten Patienten der Tübinger Kinderklinik mit bioptisch gesicherter Zöliakie, sowie einer Kontrollgruppe mit bioptisch ausgeschlossener Zöliakie.
2. Analyse der sich anhand der Marsh-Kriterien¹⁰⁰ ergebenden Gruppen unter Validierung der diagnostischen Wertigkeit der HLA-DQ Typisierung hinsichtlich Manifestationsalter, Geschlecht, EMA-Antikörpern, Pathohistologie und klinischer Symptomatik.
3. Validierung der diagnostischen Wertigkeit und des Stellenwertes der HLA-DQ Typisierung hinsichtlich der serologischen und bioptischen Diagnostik.
4. HLA-DQ Status bei DQ2 und DQ8 negativen Patienten mit bioptisch gesicherter Zöliakie.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

Um die zwischen dem HLA-System und der Zöliakie bestehenden Zusammenhänge besser zu verstehen, wurden in der vorliegenden Arbeit insgesamt 95 Personen untersucht. Es handelte sich hierbei um 69 Patienten des Zöliakiezentrums der Universitätskinderklinik Tübingen und um 26 Probanden eines Kontrollkollektivs.

Zunächst werden allgemeine Merkmale der Proben und die der Studie zugrunde gelegten Einschlusskriterien erläutert. Danach erfolgt die Einteilung der Patienten in die entsprechenden Gruppen.

2.1.1 Allgemeine Charakterisierung der Patienten und Einschlusskriterien

Die Tübinger Universitätskinderklinik ist ein Zentrum für Zöliakie. Im Laufe der letzten Jahre wurde bei einem umfangreichen Patientenkollektiv die Diagnose Zöliakie gestellt. Dies erfolgte anhand der ESPGHAN-Kriterien.

Die häufigsten Indizien für die Verdachtsdiagnose Zöliakie und die daraus resultierende Antikörperbestimmung nebst Dünndarmbiopsie waren folgende klinische Symptome:

- rezidivierende Gastroenteritiden mit massigen, übel riechenden und manchmal fettglänzenden Stühlen (Steatorrhoe).
- großes, vorgewölbttes Abdomen, Flatulenz und Meteorismus
- Malabsorptionssyndrome mit Hypovitaminosen, Kalziummangel, Elektrolytstörungen, Eisen- und Folsäuremangel, und den daraus resultierenden Symptomen wie Anämie, Gewichtsverlust, Wachstums- und Entwicklungsstörungen, Muskelhypotonie, Dystrophie und exsudative Enteropathie.
- verdrießliche Stimmung der Kinder, welche häufig gereizt, depressiv und antriebsarm sind.

Eine detaillierte Auflistung möglicher klinischer Manifestationsformen der Zöliakie zeigt *Tabelle 11* im Anhang.

Neben diesen Patienten mit klassischen Symptomen betreut das Tübinger Zöliakiezentrum auch Patienten mit subklinischer Zöliakie. Diese Patienten wurden überwiegend anhand des Screenings bei an Zöliakie erkrankten Verwandten ersten Grades entdeckt.

Bei entsprechender klinischer Symptomatik wurden die Patientenseren nach dem Protokoll des gastroenterologischen Labors der Universitätskinderklinik Tübingen¹⁵¹ basierend auf der von Wildfang et al. 1992 publizierten Methode¹⁶⁴ auf IgA-Endomysiumantikörpertiter (IgA-EMA) getestet. Bei positiver Klinik oder aufgrund eines verdächtigen Screenings wurde im Anschluss eine Dünndarmsaugbiopsie durchgeführt.

Die Dünndarmsaugbiopsie mittels der pädiatrischen Watsonkapsel¹⁴³ ist und bleibt das wichtigste diagnostische Kriterium der Zöliakie. Hierbei wurde den sedierten Patienten unter Röntgenkontrolle eine Sonde bis zur Flexura duodenojejunalis eingeführt und die Biopsie in der Gegend des Treitz-Ligaments durchgeführt. Das gewonnene Biopsat wurde mit einem Auflichtstereomikroskop lupenmikroskopisch und histologisch untersucht und nach Marsh¹⁰⁰ klassifiziert. Eine Übersicht über die Marsh-Klassifikation zeigt auch *Tabelle 12* im Anhang.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Evaluation von insgesamt 95 Proben basiert also auf der Querschnittsuntersuchung einer Population von Patienten mit gastrointestinaler Symptomatik, wobei eine Zöliakie anhand der Trias Klinik, Serologie und Biopsie entweder ausgeschlossen oder gesichert worden war. Die verwendeten serologischen und biopsischen Daten wurden retrospektiv gewonnen.

Um anhand der vorgegebenen Studienstruktur eindeutig positiv für Zöliakie zu sein, mussten die Patienten in der vorliegenden Arbeit folgendes Kriterium eindeutig erfüllen:

Schwere Läsion der Dünndarmschleimhaut mit einer nach Marsh¹⁰⁰ klassifizierten Totalen Zottenatrophie (TVA/ Marsh 3c), Subtotalen Zottenatrophie (SVA/ Marsh 3b) oder einer Partiellen Zottenatrophie (PVA/ Marsh 3a) unter glutenhaltiger Normalkost.

Siehe hierzu auch Tabelle 12.

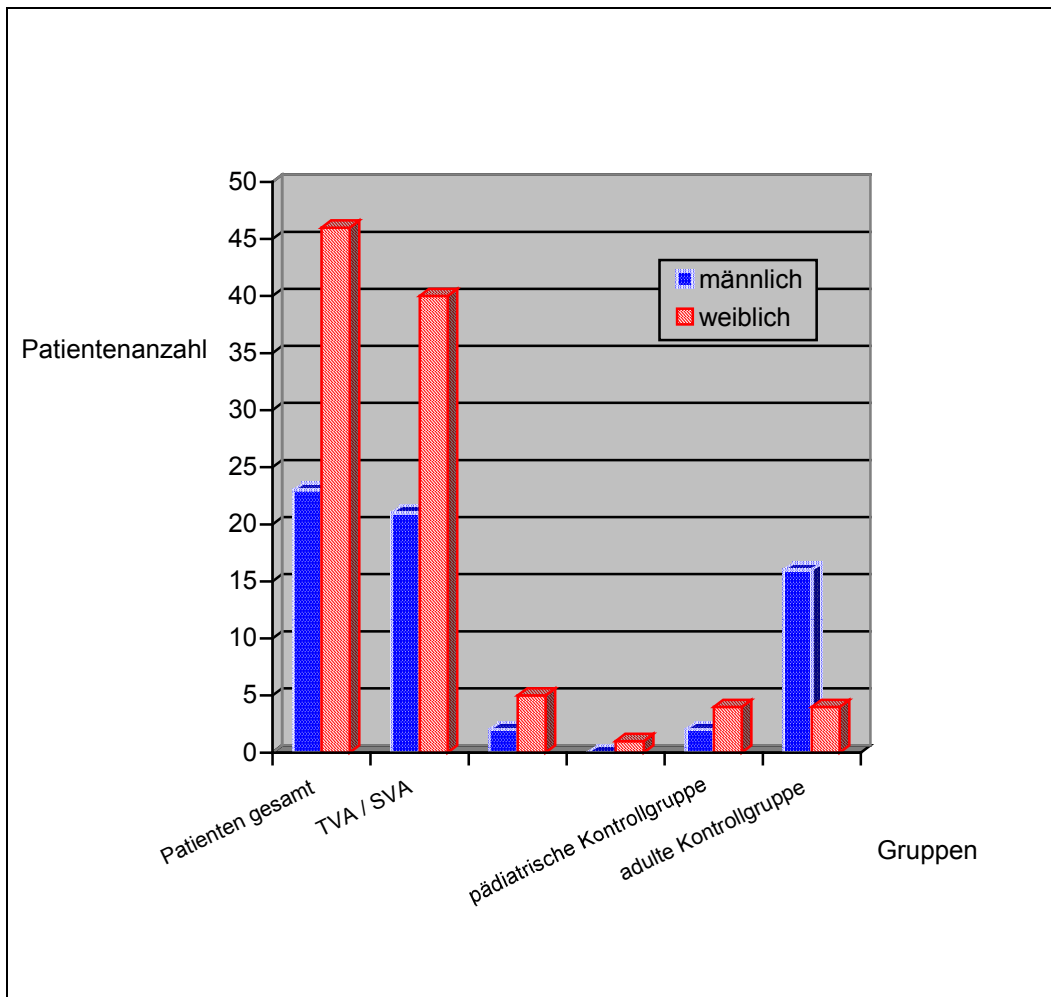
Ein zusätzliches Kriterium, welches in die Studie mit aufgenommen wurde, sind die positiven IgA-Endomysiumantikörper nach Stern¹⁵¹. Da es jedoch Patienten mit eindeutiger Zottenatrophie und negativen IgA-Endomysiumantikörpern, zum Beispiel mit IgA-Mangel gibt, diente die Analyse des IgA-Status mehr zur Validierung desselben im Hinblick auf den HLA-Status.

Für die Typisierung der Patienten wurde den in Frage kommenden Patienten im Zeitraum zwischen Dezember 2000 und März 2002 20 ml Blut abgenommen und bei – 20° C gelagert.

Um ein möglichst unselektiertes Kollektiv zu erhalten, wurden sämtliche Proben typisiert, welche in dem oben genannten Zeitrahmen zur Verfügung standen und die Voraussetzungen erfüllten.

Insgesamt wurden in dieser Studie 95 Proben von verschiedenen Probanden typisiert. Einen Überblick über die Gruppengröße zeigt das unten aufgeführte Diagramm.

Abb.8: Geschlechtsspezifische Verteilung in den einzelnen Gruppen



2.1.2 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv setzte sich insgesamt aus 69 Patienten zusammen, 46 weiblichen und 23 männlichen Probanden, 2 Patienten waren monozygote Zwillinge, 2 Patienten waren Geschwister und 3 Patienten wiesen einen IGA-Mangel vor (siehe auch unter 3. Ergebnisse). Die restlichen Patienten waren nicht miteinander verwandt.

Patientenkollektiv weiblich:

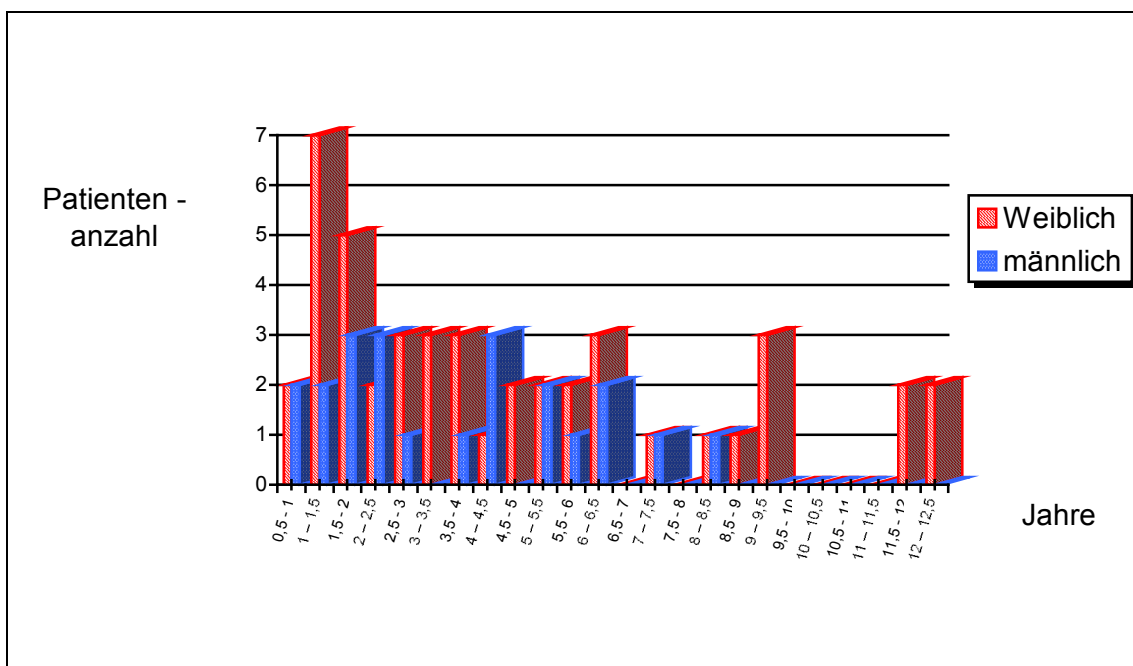
min. Alter	max. Alter	Median	M-Wert	s	σ
11 M	12 ^{1/12} J.	45,5 M.	56,021 M	40,153 M.	5,9206 M.

Patientenkollektiv männlich:

min. Alter	max. Alter	Median	M-Wert	s	σ
6 M	8 ^{3/12} J.	43 M.	45,21 M	28,918 M.	6,029 M.

Eine Übersicht über das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Biopsie zeigt Abb. 10.

Abb. 9: Geschlechtsspezifische Altersverteilung der Patienten zum Zeitpunkt der Biopsie.



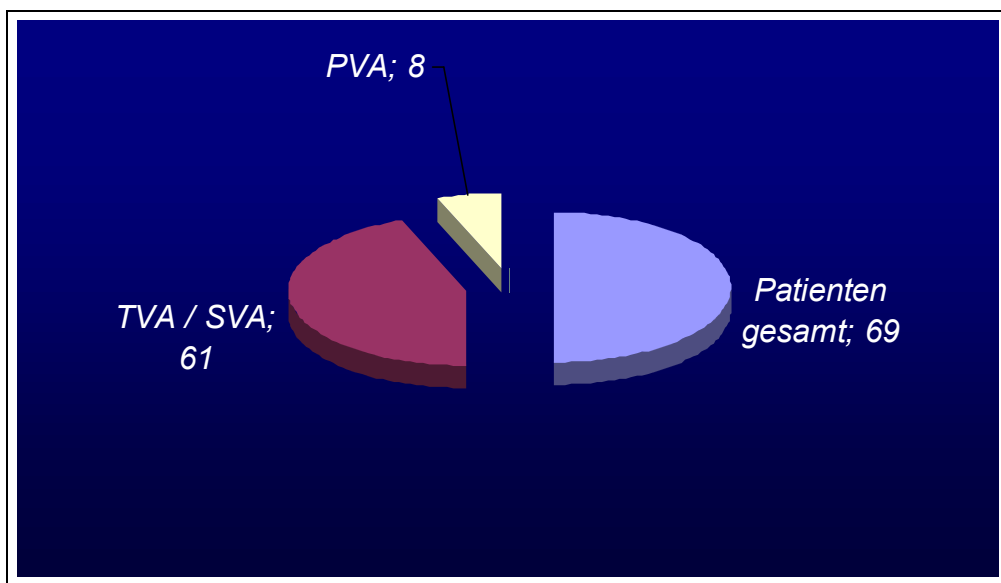
Die Altersverteilung der Patienten bezieht sich auf das Alter zum Zeitpunkt der Biopsie.

Alle 69 Probanden erfüllten die unter 2.1.1 aufgeführten Studienkriterien und wurden anhand der Marsh¹⁰⁰ Klassifikation und der IgA-EMA in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Altersangaben der Patienten bezogen sich auf das Alter zum Zeitpunkt der Biopsie. Bei den pro Gruppe typisierten Proben handelte es sich jeweils um Blutproben verschiedener Patienten. Auf eine weitere Untergliederung der drei Patientengruppen (A, B, C) in altersabhängige Untergruppen wurde verzichtet.

Dies geschah, da sich der „molekularbiologische Fingerabdruck“ eines Individuums, der spezifische HLA-Typ, zeitlebens nicht ändert. Wie sich die einzelnen bioptisch definierten Gruppen hinsichtlich HLA-Verteilung, Klinik, Manifestationsalter, Geschlechtsverteilung und Symptomatik unterschieden war allerdings von großem Interesse und wurde im Diskussionsteil dieser Arbeit analysiert.

Nach Aufteilung der 69 Probanden auf die einzelnen Patientengruppen ergab sich die in *Abb. 10* dargestellte Verteilung.

Abb. 10: Verteilung der Probanden auf die einzelnen Subgruppen.



2.1.2.1 Gruppe A (TVA/SVA)

Zöliakiepatienten mit totaler oder subtotaler Zottenatrophie entsprechend

Marsh¹⁰⁰ 3c bzw. 3b.

Diese Gruppe bestand aus insgesamt **61 Patienten**, wovon 39 weiblich und 21 männlich waren, 2 der Patienten waren Geschwister. Die restlichen Patienten waren nicht miteinander verwandt.

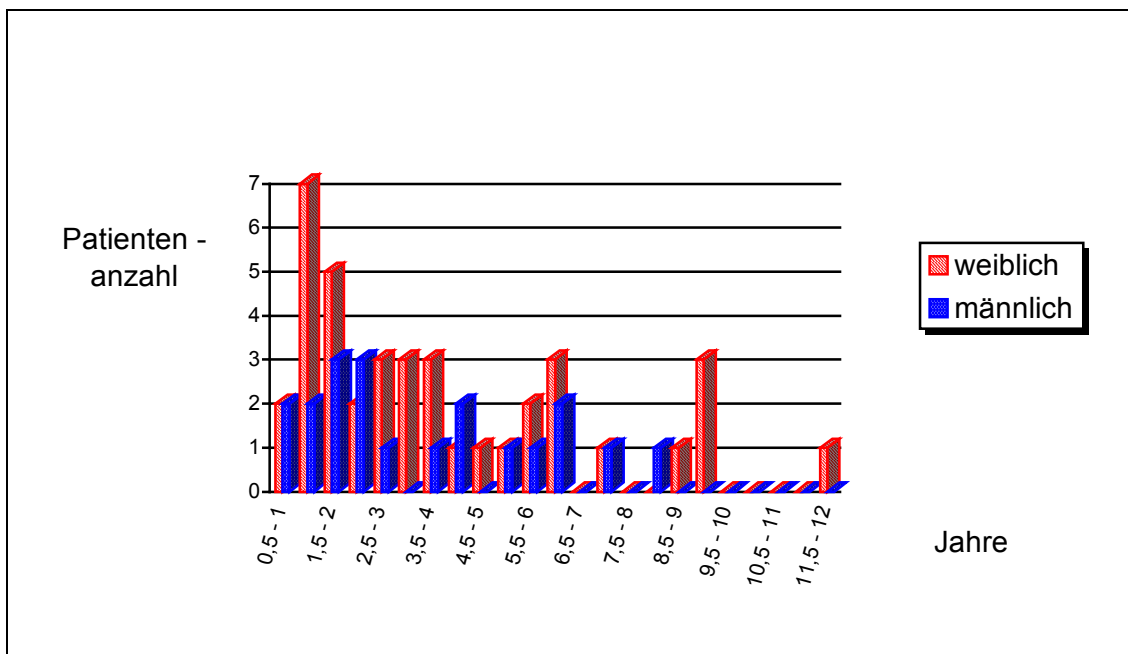
Patientenkollektiv Gruppe A weiblich:

min. Alter	max. Alter	Median	M-Wert	s	σ
11 M	11 ^{6/12} J.	38 M.	47,461 M	34,215 M.	5,478 M.

Patientenkollektiv Gruppe A männlich:

min. Alter	max. Alter	Median	M-Wert	s	σ
6 M	8 ^{3/12} J.	36 M.	44,04 M	30,022 M.	6,551 M.

Abb. 11: *Geschlechtsspezifische Altersverteilung der Patienten mit TVA / SVA bei Diagnose.*



Die Altersverteilung der Patienten bezieht sich auf das Alter zum Zeitpunkt der Biopsie.

2.1.2.2 Gruppe B (PVA)
Zöliakiepatienten mit partieller Zottenatrophie entsprechend Marsh¹⁰⁰ 3a.

Diese Gruppe bestand aus insgesamt **8 Patienten**, wovon 6 weiblich und 2 männlich waren, 2 der Patienten waren monozygote Zwillinge. Die restlichen Patienten waren nicht miteinander verwandt.

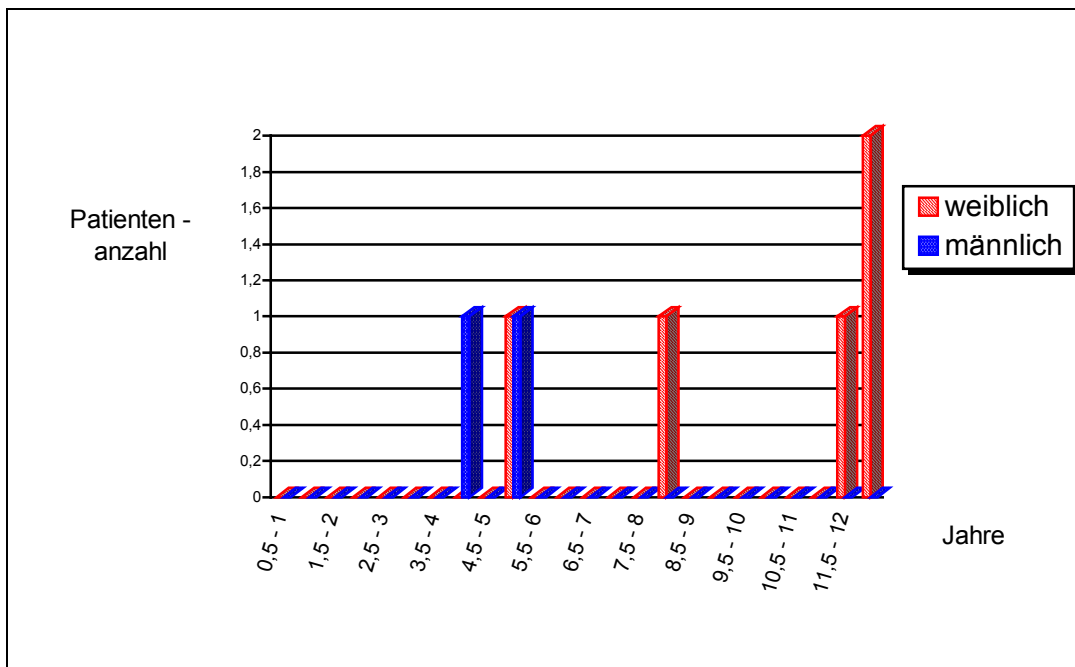
Patientenkollektiv Gruppe B weiblich:

min. Alter	max. Alter	Median	M-Wert	s	σ
5 ^{4/12} J	12 ^{1/12} J.	139 M.	119 M	35,327 M.	15,798 M.

Patientenkollektiv Gruppe B männlich:

min. Alter	max. Alter	Median	M-Wert	s	σ
4 ^{5/12} J	5 ^{2/12} J.	57.5 M.	57,5 M	6,363 M.	4,5M.

Abb.12: *Geschlechtsspezifische Altersverteilung der Patienten mit PVA bei Diagnose.*



Die Altersverteilung der Patienten bezieht sich auf das Alter zum Zeitpunkt der Biopsie.

Neben einer bioptisch gesicherten Zöliakie zeigten die Patienten zum Zeitpunkt der Dünndarmbiopsie folgende, mit Zöliakie assoziierten, Erkrankungen:

Diagnosen	Gruppe A	Gruppe B
IGA-Mangel	2	1
Diabetes Mellitus Typ I	1	0
Autoimmun Hepatitis	1	0
Neurodermitis	4	1
Karies	1	0
Atopie	4	0
Asthma	2	0
VSD	1	0
Morbus Perthes	2	0
Familiärer Kleinwuchs	1	0
Nahrungsmittelallergie	1	0
Legasthenie	1	0

Mehrfach Nennungen möglich.

2.1.3 Kontrollgruppenkollektiv

Das Kontrollgruppenkollektiv setzte sich insgesamt aus 26 Personen zusammen, 8 weiblichen und 18 männlichen Probanden. Alle Personen der Kontrollgruppe waren nicht miteinander verwandt. Keiner der Probanden wies einen IgA-Mangel auf. Die 26 Probanden waren anhand der Marsh¹⁰⁰ Klassifikation (s. *Tabelle 12*) und des IgA-EMA-Tests negativ für Zöliakie, und erfüllten so die unter 2.1.1 aufgeführten Studienkriterien nicht, was sie als Kontrollkollektiv legitimierte.

Jede Dünndarmbiopsie ist für den Patienten, neben der radioaktiven Strahlenbelastung, mit eventuellen Risiken wie Blutungen, Infektionen oder Dünndarmperforationen verbunden.

Bei Patienten mit überwiegend für Zöliakie atypischen klinischen Symptomen und negativem IgA-EMA musste man die Risiken einer solchen diagnostischen Intervention abwägen. Daher wurde nur in klinisch sehr auf Zöliakie verdächtigen Fällen eine Dünndarmbiopsie durchgeführt.

Um den ethischen Richtlinien der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen gerecht zu werden, wurde bereits in der Planungsphase der Studie ein konkretes Studiendesign konzipiert und der hiesigen Ethik-Kommission vorgelegt. Die vorgelegte Studie wurde gemäß PromO § 3 unter dem Vorsitz von Prof. T. Riesler am 15 Mai 2001 geprüft und genehmigt. Alle Probanden wurden in einem Aufklärungsbogen über die Studie informiert und attestierten ihre, jederzeit widerrufliche, freiwillige Teilnahme an derselben mit ihrem schriftlichen Einverständnis. Ein solcher Aufklärungsbogen ist im Anhang unter X-6 ersichtlich.

Die pädiatrische Kontrollgruppe der Universitätskinderklinik Tübingen umfasste aus oben genannten Gründen lediglich **6** Probanden, was uns für eine repräsentative Kontrollgruppe zu wenig erschien.

Nach Absprache mit Prof. Dr. M. Gregor (Leitender Direktor der Abteilung Innere Medizin I der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen) war es uns möglich,

aus der oben genannten Klinik, **20** Probanden zu rekrutieren. Es handelte sich um Patienten mit rezidivierenden Gastroenteritiden bzw. mit gastrointestinalen Symptomen unklarer Genese. Diesen Personen wurde im Rahmen einer diagnostisch indizierten Gastroskopie eine Biopsie des Duodenums entnommen und zur DNA -Typisierung zusätzlich 20 ml EDTA-Blut abgenommen, welches bei – 20°C gelagert wurde. Bei den 20 Probanden aus der Medizinischen Klinik handelte es sich um Erwachsene. Bei der Beurteilung wurde hinsichtlich von Perzentilen Daten nur die pädiatrische Kontrollgruppe (PK) berücksichtigt.

2.1.3.1 Pädiatrische Kontrollgruppe (PK)

Probanden mit nicht nachweisbarer Zottenatrophie und negativen IgA-EMA.

Diese Gruppe bestand aus insgesamt **6 Probanden**, wovon 4 weiblich und 2 männlich waren, alle Patienten waren nicht miteinander verwandt.

Probandenkollektiv pädiatrische Kontrollgruppe weiblich:

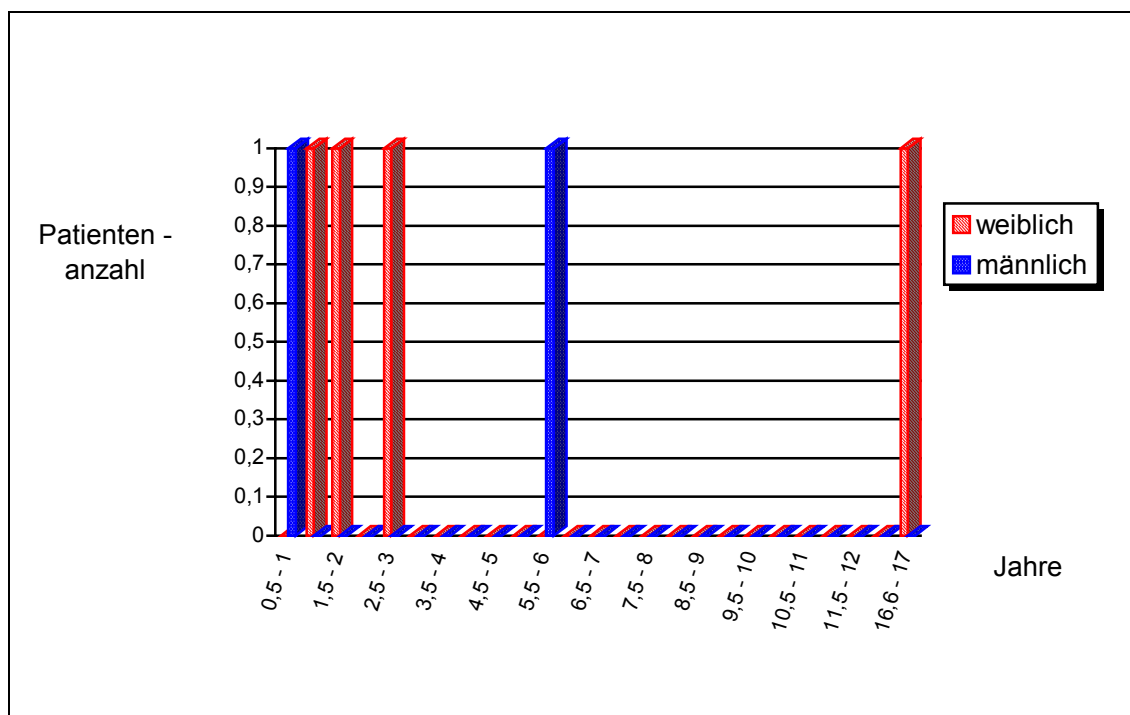
min. Alter	max. Alter	Median	M-Wert	s	σ
1 ^{4/12} J	16 ^{10/12} J.	26,5 M.	67,75 M	89,749 M.	44,874 M.

Probandenkollektiv pädiatrische Kontrollgruppe männlich:

min. Alter	max. Alter	Median	M-Wert	s	σ
12 M.	5 ^{8/12} J.	40 M.	40 M.	30,597 M.	28 M.

Bei 5 Patienten mit ausgeschlossener Zöliakie wurde eine akute, virale Gastroenteritis diagnostiziert. Die rezidivierenden gastrointestinalen Beschwerden eines weiteren Patienten wurden auf eine Schrankenstörung bei Neurodermitis zurückgeführt. Keiner der 6 Probanden der Pädiatrischen Kontrollgruppe wies einen IgA-Mangel vor.

Abb. 13: Geschlechtsspezifische Altersverteilung in der pädiatrischen Kontrollgruppe bei Diagnose.



Altersverteilung der Patienten bezieht sich auf das Alter zum Zeitpunkt der Biopsie.

2.1.3.2 Adulte Kontrollgruppe (AK)
Probanden mit nicht nachweisbarer Zottenatrophie und negativen IgA-EMA.

Diese Gruppe bestand aus insgesamt **20 Probanden**, wovon 4 weiblich und 16 männlich waren, alle Patienten waren nicht miteinander verwandt.

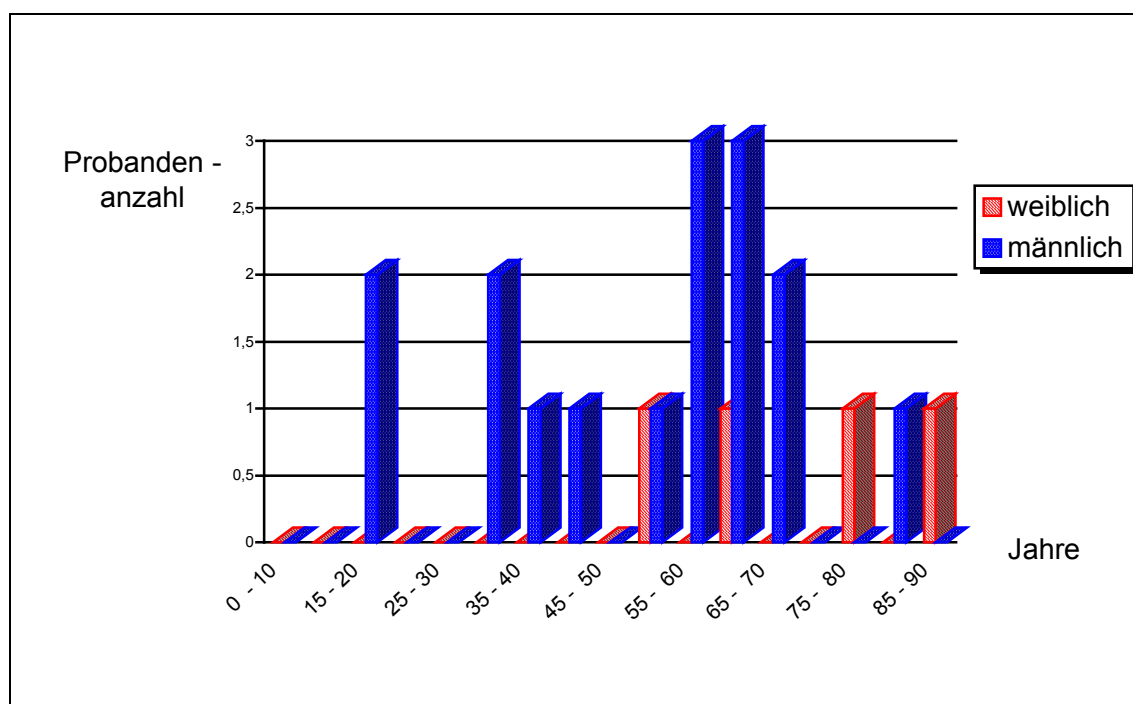
Probandenkollektiv adulte Kontrollgruppe weiblich:

min. Alter	max. Alter	Median	M-Wert	s	σ
54 Jahre	88 Jahre	71 Jahre	71 Jahre	15,011 J	7,5 J

Probandenkollektiv adulte Kontrollgruppe männlich:

min. Alter	max. Alter	Median	M-Wert	s	σ
18 Jahre	81 Jahre	57 Jahre	51 Jahre	18,154 J	4,538 J

Abb.14: *Geschlechtsspezifische Altersverteilung der adulten Kontrollgruppe bei Diagnose.*



Altersverteilung der Patienten bezieht sich auf das Alter zum Zeitpunkt der Biopsie.

Bei den Probanden der adulten Kontrollgruppe wurden folgende, unten aufgeführte Diagnosen gestellt:

Diagnosen	Diagnosen
Chronische Duodenitis	6
Chronische Gastritis	4
Barrett – Syndrom	3
Magenulkus mit H. pylori Infektion	2
Antrumgastritis	2
Schleimhautatrophie des Magens	1
Ösophagusvarizen	1
Gastritis mit Plattenepithelmetaplasie	1

2.2 Material

2.2.1 Laborgeräte

Gelkammer	DNA Pocket Bloc, Biozym Diagnostik (Oldendorf)
Dispenser	Eppendorf (Hamburg)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen)
Elektropipetten	PipetBoy Acu, Integra Biosciences (Fernwald) Impact, Matrix Technologies (Wehrheim)
Gefrierschränke	Liebherr (Ochsenhausen) Bosch (Stuttgart) Kirsch
Magnetrührer	Ikamag RCT, Bachhofer (Reutlingen)
Mikrowellengerät	Bosch (Stuttgart)
PCR-Geräte	PTC-100 Programmable Thermal Controller, MJI(Watertown,USA) GeneAmp PCR-System 9600, Perkin Elmer (Rodgau)
Photometer	Spektralphotometer, Dr. Lange (Düsseldorf)
Pipetten	PreCision P10 0 µl – 10 µl P50 10 µl – 50 µl P100 10 µl – 100 µl P200 10 µl – 200 µl P1000 100 µl – 1000 µl, Biozym (Oldendorf) Reference 10 µl – 100 µl 100 µl – 1000 µl, Eppendorf (Hamb.)
Reinstwasseranlage	Seradest LFM 20, USF Culligan Seral (Ransbach)
Schüttelgerät	Rocky, Fröbel Labortechnik (Lindau)
Sofortbildkamera	Polaroid MP-4 Land Camera, Polaroid (Offenbach)
Spannungsgerät	GIBCO BRL, Life Technologies (Karlsruhe)
Sterilbank	LaminAir HB 2448, Heraeus (Hanau)
Tischschüttler	Vortex Genie 2, Bender und Hobein AG (Zürich)
UV-Illuminator	Bachhofer (Reutlingen)
Waage	Sartorius 600, Sartorius (Göttingen)

PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Zentrifugen	Omifuge 2.0 RS, Heraeus (Hanau) Sigma 2 k 15, Sigma (Taufkirchen) GS-6R Centrifuge (Beckmann) Centrifuge 5402, Eppendorf (Hamburg)

2.2.2 Gefäße und Zubehör

Pipettenspitzen	Nucleic Acid + Nuclease free (filter tips) - 0,5 - 10 µl - 10 – 100 µl - 200 – 1000 µl, ART (San Diego, USA) Combitips plus 0,5 ml, Eppendorf (Hamburg) Matrix Tips 1250 µl, Matrix Technologies (Wehrheim) Safe-Seal Tips, 10 µl, 100 µl, BiozymDiagnostik (Oldendorf) Serologische Pipetten 25 ml, Costar (Corning, USA)
Pinzetten	Aesculap (Tuttlingen)
Filme	Polopan 667, Polaroid (Offenbach)
Glaswaren	Erlenmeyerkolben 500 ml, Hirschmann (Eberstadt) Messzylinder 250ml, 500 ml, 1000ml, Hirschmann (Eberstadt)
Handschuhe	Safeskin sortim plus L, Kimberley-Clark (Roswell, USA) Nitra-Touch powder free L, Ansell Medical (Dothan USA)
Tubes	Safe-Lock-Tubes 1,5 ml, Eppendorf (Hamburg) Falcon Tubes 25 ml, Becton Dickinson (Le Pont Claix, F) Falcon Tubes 50 ml, Becton Dickinson (Le Pont Claix, F) QIAamp Spin Columns, Qiagen (Hilden) Collection tubes 2 ml, Qiagen (Hilden)
EDTARöhrchen	S-Monovette [®] 20 ml, Sarstedt (Nümbrecht)

2.2.3 Chemikalien

Agarose	Seakem LE Agarose, Biozym (Oldendorf)
Tris	Merck (Darmstadt)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
EDTA	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
EtBr	Merck (Darmstadt)
NaCl	Merck (Darmstadt)
AL Buffer	Qiagen GmbH (Hilden)
Saccharose	Merck (Darmstadt)
TritonX-100	Sigma (Taufkirchen)
MgCl ₂	Merck (Darmstadt)
HCL	Merck (Darmstadt)
AW1 Buffer	Qiagen GmbH (Hilden)
Aw2 Buffer	Qiagen GmbH (Hilden)
HCL	Merck (Darmstadt)
PCR Buffer	Geno Vision (Wien)
Glycerol	Geno Vision (Wien)
Kresolrot	Geno Vision (Wien)
Gelatine	Geno Vision (Wien)
KCL	Geno Vision (Wien)
[EDTA] Na ₄	Merck (Darmstadt)

2.2.4 Enzyme, Nukleotide und Bioreagenzien

Längenstandard	puc Mix Marker 8, MBI-Fermentas (St. Leon D)
Taq-Polymerase	Ampli Taq® DNA Polymerase 250 Units (5U/µl) Applied Roche Biosystems, (Mannheim)
Lachssperma	Sigma, (Taufkirchen)
Proteinase K	Roth (Karlsruhe)
dNTP`s 200 µM dATP 200 µM dCTP 200 µM dGTP 200 µM dTTP	Geno Vision (Wien)

2.2.5 Kommerzielle Reaktionssysteme

DNA-Isolierung	DNA Blood Mini Kit, Qiagen GmbH (Hilden)	
SSP PCR	Olerup SSP™ DQ low resolution Lot No.: F 35, GenoVision	
	Olerup SSP™ DQB1*02	Lot No.: F 42, GenoVision
	Olerup SSP™ DQB1*03	Lot No.: H 14, GenoVision
	Olerup SSP™ DQA1	Lot No.: F 89, GenoVision
		GenoVision, (Wien)

2.2.6 Lösungen und Puffer

2.2.6.1 DNA-Isolierung

<u>Red Cell Lysis Buffer (RCLB)</u>	
Stammlösung:	12,1 g TRIS 10,2 g MgCl ₂ 5,8 g NaCl
Gebrauchslösung:	5 ml konzentrierte HCl auf 1 l aqua dest. bei pH = 7,6
AW1 Buffer®	Qiagen GmbH (Hilden)
AW2 Buffer®	Qiagen GmbH (Hilden)
AE Buffer®	Qiagen GmbH (Hilden)
gelagert bei 4°C.	

2.2.6.2 PCR

Für alle PCR's wurde der kommerzielle PCR Master Mix der Firma Olerup SSP verwendet, dessen Zusammensetzung unten aufgeführt ist:

<u>PCR Buffer :</u>	
	50 mM KCL 1,5 mM MgCl ₂ 10 mM Tris-HCl [pH 8,3] 0,001% (w/v) Gelatine
Glycerol:	Glycerol 5%
Kresolrot:	100 µg/ml
steril gelagert bei -20°C.	

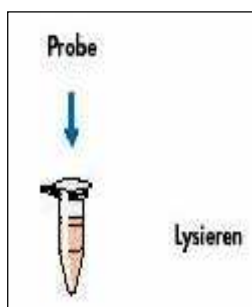
2.3 Methoden

2.3.1 DNA-Extraktion über Salzfällung

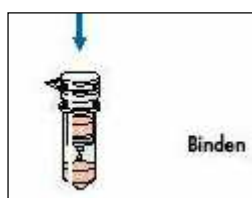
Sowohl EDTA- bzw. Zitratblut, leukozytenhaltige Gradientenflüssigkeit als auch isolierte und resuspendierte Zellen aus Gewebe (Milz, Lymphknoten, Tonsillen) sind zur Gewinnung von DNA geeignet. Es gibt verschiedene Methoden zur DNA-Extraktion, wie z.B. die Chloroform-Triethylammoniumbromid (CTAB)-Methode, oder die Phenol-Chloroformreinigung. In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA aus 10 ml EDTA-Blut gemäß dem QIAamp® Mini Blood Kit Protokoll der Firma Qiagen präpariert.

Die bei -20°C gelagerten Proben wurden zunächst auf dem Schüttler bei Raumtemperatur erwärmt und durchmischt. Zur DNA-Isolierung wurde daraufhin in einem 50 ml Falcon jeweils 10 ml EDTA-Blut mit 40 ml RCLB versetzt und erneut für 10 Minuten auf den Schüttler gelegt. Der Lysierung von roten Blutzellen folgte für 10 Minuten eine Zentrifugation bei 460 g (1500 U/min). Der Überstand wurde mittels einer Wasserstrahlpumpe und einer Pipette abgesaugt und das so gewonnene Zellpellet resuspendiert.

Abb. 15: Bildserie QIAamp® DNA Blood Mini Kit System von QIAGEN®



In einem 1,5 ml Eppendorfcup wurden anschließend 200 μl des sedimentierten kernhaltigen Zellpellet mit 20 μl Protease-Lösung und 200 μl AL-Puffer gut durchmischt und bei 56°C für 30 Min im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Lösung mit 200 μl Ethanol (96%) suspendiert und erneut mit dem Vortexgerät gut durchmischt.



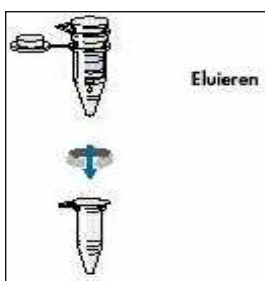
Die gesamte Mixtur wurde daraufhin auf eine steril verpackte QIAamp-Säule® mit Collection Tube pipetiert und bei 15.000 U/min für 2 Minuten zentrifugiert.



Die QIAamp-Säule® wurde in ein neues Collection Tube überführt, mit 500 µl AW1 Puffer aufgefüllt und wiederum bei 12.000 für 2 Minuten zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen.



Dieser Reinigungsschritt wurde mit dem AW2 Puffer wiederholt. Dazu wurde die jeweils verwendete QIAamp-Säule® erneut in ein frisches Collection Tube überführt, mit 500 µl AW2 Puffer aufgefüllt und bei 15.000 U/min für 2 Minuten zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen.



Abschließend wurde die jeweilige QIAamp-Säule® auf ein mit den Patientendaten beschriftetes 1,5 ml Eppendorf Cup gesteckt, die an das Trägermaterial der Säule gebundene DNA mit 200 µl Aqua bidest für 10 Min eluiert und bei 10.000 U/min zentrifugiert.

Im Anschluss an die DNA-Isolierung folgte mittels Spektrometer die Bestimmung des Reinheitsgrades der in 200 µl Aqua bidest gelösten DNA.

Die Ermittlung der DNA-Konzentration erfolgte dabei gleichzeitig durch eine Messung der optischen Dichte (OD) am UV/VIS-Spektrometer. Die Extinktion der DNA-Proben wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, wobei ein Wert von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entsprach. Eventuelle Verunreinigungen durch störende Proteine wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen und mit der optischen Dichte der DNA bei 260 nm ins Verhältnis gesetzt.

Der Reinheitsindex der DNA (OD_{260}/OD_{280}) musste größer als 1,8 sein. Zur DNA-Typisierung wurde die DNA auf eine Konzentration von 80 ng/µl eingestellt. Die vermessene DNA wurde für einen späteren Gebrauch bei einer Temperatur von -20 °C gelagert, wodurch bei Bedarf eine spätere oder wiederholte DNA-Typisierung möglich war.

2.3.2 Prinzip der molekularbiologischen HLA-Typisierung mittels PCR

Durch die molekularbiologischen Methoden wurde eine spezifische und reproduzierbare Typisierung von HLA-Merkmalen auf genetischer Ebene möglich. Auf diese Weise können die Ergebnisse der serologischen Typisierungstechnik abgesichert und aufgrund der höheren Auflösung dieses Verfahrens, insbesondere für die HLA-Cw- und die HLA-DR/DQ-Merkmale, verfeinert werden. Die molekulargenetische Analyse der HLA-Merkmale wurde auf Basis der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt.

Mullis und Faloona¹¹¹ sowie Saiki¹³⁷ et al. führten diesbezüglich erste Experimente mit der PCR durch, um in vitro DNA-Moleküle in einer Kettenreaktion zu amplifizieren. Die PCR-Methodik lehnt sich eng an das natürliche Prinzip der DNA-Replikation an. Durch diese Technik wurde es möglich, die gewünschten DNA-Sequenzen sehr effektiv zu vervielfältigen (Amplifikation). Im wesentlichen sind dabei drei, sich zyklisch wiederholende Prozesse zu nennen, die zur Amplifikation der DNA führten:

1. die Denaturierung der DNA
2. die Primeranlagerung (Annealing)
3. die Polymerisation (Extension)

Die Denaturierung der DNA erfolgte durch Temperaturerhöhung auf 95°C ("schmelzen"), wobei sich der DNA-Doppelstrang in seine zwei Einzelstränge auftrennte. Durch schnelles Abkühlen auf z.B. 55 °C wurde ein Anlagern der spezifischen Primer (synthetisierte einsträngige Oligonukleotide, die als Starternukleotide für die DNA-Polymerasen dienen) an die komplementären Sequenzen der Matrizen-DNA ermöglicht. Diesen Anlagerungsschritt des Primers bezeichnet man als Annealing (Anlagerung). Dazu war je nach Länge und Aufbau der Primer (Art der Nukleotidbasen) eine spezifische Temperatur (z.B. 55 °C) erforderlich. Die DNA-Polymerase synthetisierte dann in Gegenwart von freien Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) einen komplementären DNA-Strang. Für diese Reaktion wurde eine Temperatur von 72 °C benötigt (Extension). Eine n-fache Wiederholung dieses zyklischen Prozesses von Denaturierung, Annealing und Extension entsprach einer 2n fachen Amplifikation

der Matrizen-DNA. Nach mindestens 25 Zyklen wurde im Allgemeinen eine millionenfache Kopie erreicht.

Da Proteine bei hohen Temperaturen denaturiert werden, wurde eine thermostabile DNA-Polymerase eingesetzt, die aus dem in heißen Quellen lebenden Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wurde (Taq-Polymerase). Durch die Thermostabilität dieser Polymerase wurde vermieden, dass nach jedem Zyklus erneut Polymerase zugegeben werden musste. Die PCR war von Vorteil, da durch sie eine Automatisierung der HLA-Typisierung möglich wurde. Zur Untersuchung der HLA-Merkmale wurde für die präsentierte Arbeit das Verfahren der PCR-SSP (SSP: sequenzspezifische Primer) benutzt, d.h. die HLA-Allele bzw. Allelgruppen wurden über die Bildung von sequenz-spezifischen PCR-Produkten differenziert, wobei eine Amplifikationsreaktion nur bei Komplementarität zwischen dem 3'-Ende des Primers und der Zielsequenz ablief¹⁵. Das bedeutete, dass der Differenzierungsschritt bereits auf der Ebene der Amplifikation geschah. Es wurden spezifische HLA-Primer eingesetzt, die entsprechend ihrer Sequenz nur in Anwesenheit eines bestimmten Allels ein PCR-Produkt bilden konnten. Nach Beendigung der PCR wurden die Amplifikate elektrophoretisch im Agarosegel nachgewiesen (*siehe Abb. 20*)

2.3.3 PCR-Amplifikation mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP)

Nach Präparation der DNA des zu untersuchenden Probanden wurde diese der Polymerase-Kettenreaktion zugeführt. Für die Amplifikation mittels PCR-SSP wurden kommerzielle Primerkits der Firma GenoVision (Wien/Österreich) eingesetzt.

Es handelt sich hierbei um folgende Primer-Kits:

Olerup SSP™ DQ low resolution	Lot No.: F 35, GenoVision
Olerup SSP™ DQB1*02	Lot No.: F 42, GenoVision
Olerup SSP™ DQB1*03	Lot No.: H 14, GenoVision
Olerup SSP™ DQA1	Lot No.: F 89, GenoVision

Die für den Reaktionsansatz notwendigen Materialien wurden im so genannten Mastermix zusammengeführt. Dieser hatte für alle vier Primerkits der Firma GenoVision die gleiche Zusammensetzung (s. 2.2.5.2 PCR).

Der Primermix enthielt hingegen jeweils das spezifische Primerpaar, durch das die Amplifikation von DNA-Abschnitten bestimmter HLA-Allele bzw. Allelgruppen induziert wurde, und ein Kontroll-Primerpaar, durch das mittels Bindung an nichtallele Gensequenzen die Wirksamkeit der PCR angezeigt werden sollte. Die Primersets mit der entsprechenden HLA-Spezifität waren, nebst dem positiven Kontroll-Primerpaar, bei den verwendeten Primerkits der Firma GenoVision bereits in die entsprechende Kavität vorpipetiert. In jedes „well“ wurden daraufhin 10 µl der individuellen Probandenlösung pipetiert, welche sich aus Mastermix, DNA und Taq Polymerase zusammensetzte.

Die Menge an Mastermix wurde von der Anzahl der Testansätze bestimmt und divergierte dahingehend in den einzelnen Primerkits. Die genaue Zusammensetzung war bei den jeweiligen Kits angegeben.

2.3.3.1 DQB1 „low resolution“

Zunächst wurden alle Probanden mittels des Olerup SSP™ low resolution Typisierung-Kits analysiert. Für die Primerkits der Firma GenoVision wurde eine optimale DNA-Konzentration von 30 ng/µl vorgegeben. War die Konzentration darüber bestand das Risiko unspezifischer Amplifikationen, welche das Ergebnis verfälschen konnten. Der Typisierungs-Kit setzte sich aus 8 Primermixen zusammen. Diese waren nebst der integrierten Positivkontrolle bereits in die entsprechenden „wells“ vorpipetiert.

Die individuelle Probandenlösung für 10 Testansätze setzte sich bei dem Olerup SSP™ „low resolution-Kit“ wie folgt zusammen:

- 10 x 2 µl = 20 µl DNA (30 ng/µl)
- 10 x 3 µl = 30 µl Master Mix ohne Taq
- 0,8 µl Taq Polymerase (5 Units/µl)
- 10 x 5 µl – 0,8 µl = 49,2 µl Aqua dest.

Diese Lösung wurde auf Eis pipetiert und gevortext. Im Anschluss daran wurden pro „well“ jeweils 10 µl der individuellen Probandenlösung zu den bereits vorpipetierten Primern hinzugegeben. Zu der Sequenz der verwendeten Primer können leider keine Angaben gemacht werden, da diese von der Firma GenoVision urheberrechtlich geschützt und nicht publiziert sind.

Die Amplifikationsreaktion wurde mit dem programmierbaren Thermocycler PTC-100 Programmable Thermal Controller, MJL (Watertown, USA) wie folgt durchgeführt:

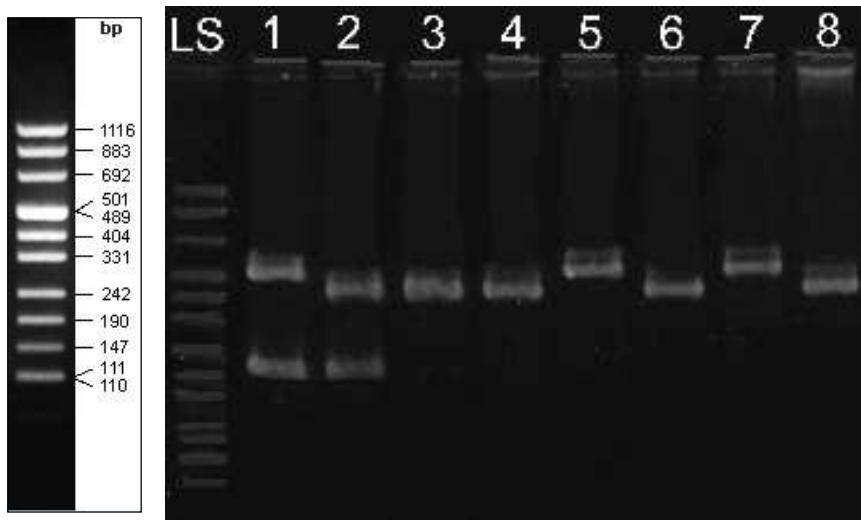
1. zweiminütige Vorinkubation bei 94 °C
2. 10 Zyklen mit jeweils 10 sec bei 94 °C (Denaturierung) und 60 sec bei 65 °C (Annealing und Extension)
3. 20 Zyklen von jeweils 10 sec bei 94 °C (Denaturierung), 50 sec bei 65 °C (Annealing) und 30 sec bei 72 °C (Extension).

Die PCR-Amplifikate wurden mittels der unter 2.3.4 aufgeführten Gelelektrophorese untersucht und anschließend per Transluminationsdokumentation dokumentiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Helmberg SCORE™ – Software, indem die positiven Amplifikate (Banden) in das Datenverarbeitungsprogramm eingegeben wurden und mittels des Programmes der Allel-Typ basierend auf der DQ low resolution-Spezifitäten-Tabelle, bestimmt wurde.

Tabelle: 13 Olerup SSP™ DQ „low resolution“ Typisierungs-Spezifitäten.

Primer Mix	Länge des spezifischen PCR-Produktes	Länge der Kontrollbande	DQ-Serologie	Amplifizierte DQB1 Allele
1	220 bp	515 bp	5	05011-0504
2	220 bp	430 bp	6	06011-0617
3	205 bp	430 bp	2	0201-0203
4	130, 145 bp	430 bp	2, 8, 3	0201, 0202, 0302, 0305, 0307, 0308
5	135 bp	515 bp	3, 7	03011, 03012, 0304, 0309, 0310
6	125, 140 bp	430 bp	8, 9, 3	0302, 03032, 03033, 0305, 0306-0308
7 ¹	125 bp	515 bp	2, 7, 9, 3	0203, 03011, 03012, 03032, 03033, 0306, 0309, 0310
8	195 bp	430 bp	4	0401, 0402

Abb. 16: Gelelektrophorese DQ „low resolution“.



Links: Längenstandard puc Mix Marker 8 von MBI-Fermentas;

Rechts: Nachweis der PCR-Amplifikate mittels Gelelektrophorese:

Spur LS; verwendeter Längenstandard (LS)

Spur 1-8; Probanden DNA, mit interner Positivkontrolle mit 515 bp
bzw. 430 bp.

2.3.3.2 DQB1*02

Nachdem alle Probanden zunächst mittels des Olerup SSP™ „low resolution-Kit“ analysiert worden sind, wurden diejenigen, welche für DQB1*02 positiv waren, mit dem Olerup SSP™ DQB1*02-Kit subtypisiert. Für die Primerkits der Firma GenoVision wurde eine optimale DNA-Konzentration von 30 ng/µl vorgegeben. Lag die DNA-Konzentration darüber bestand das Risiko unspezifischer Amplifikationen, welche das Ergebnis verfälschen konnten. Der Typisierungs-Kit setzte sich aus 4 Primermixen zusammen. Diese waren nebst der integrierten Positivkontrolle bereits in die entsprechenden „wells“ vorpipetiert. Die individuelle Probandenlösung für 6 Testansätze setzte sich bei dem Olerup SSP™ DQB1*02 Kit wie folgt zusammen:

$$\begin{aligned}
 6 \times 2 \mu\text{l} &= 12 \mu\text{l DNA (30 ng/\mu\text{l})} \\
 6 \times 3 \mu\text{l} &= 18 \mu\text{l Master Mix ohne Taq} \\
 &\quad 0,5 \mu\text{l Taq Polymerase (5 Units/\mu\text{l})} \\
 6 \times 5 \mu\text{l} - 0,5 \mu\text{l} &= 29,5 \mu\text{l Aqua dest.}
 \end{aligned}$$

Diese Lösung wurde auf Eis pipetiert und gevortext. Im Anschluss daran wurden pro Testansatz in den Microtubes jeweils 10 µl der individuellen Probandenlösung zu den bereits vorpipetierten Primern hinzu gegeben. Zu der Sequenz der verwendeten Primer können leider keine Angaben gemacht werden, da diese von der Firma GenoVision urheberrechtlich geschützt und nicht publiziert sind.

Die Amplifikationsreaktion wurde mit dem programmierbaren Thermocycler PTC-100 Programmable Thermal Controller, MJL (Watertown, USA) wie folgt durchgeführt:

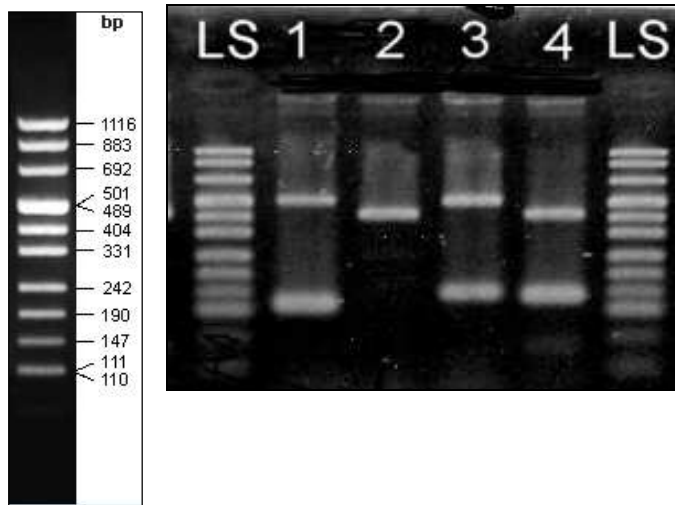
1. zweiminütige Vorinkubation bei 94 °C
2. 10 Zyklen mit jeweils 10 sec bei 94 °C (Denaturierung) und 60 sec bei 65 °C (Annealing und Extension)
3. 20 Zyklen von jeweils 10 sec bei 94 °C (Denaturierung), 50 sec bei 65 °C (Annealing) und 30 sec bei 72 °C (Extension).

Die PCR-Amplifikate wurden mittels der unter 2.3.4 aufgeführten Gelelektrophorese untersucht und anschließend per Transluminationsdokumentation dokumentiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Helmberg SCORE™ – Software, indem die positiven Amplifikate (Banden) in das Datenverarbeitungsprogramm eingegeben wurden, und mittels des Programmes der Allel -Typ, basierend auf der DQB1*02-Spezifitäten-Tabelle, bestimmt wurde.

Tabelle: 14 Olerup SSP™ DQB1*02 Typisierungsspezifitäten

Primer Mix	Länge des spezifischen PCR-Produktes	Länge der Kontrollbande	Amplifizierte DQB1*02 Suballele
1	120 bp	515 bp	0201,0202
2	85 bp	430 bp	0203
3	145 bp	515 bp	0201, 05011-0504, 06011-0617, 03011-0310, 0401-0402
4	140 bp	430 bp	0202, 0203

Abb.17: Gelelektrophorese DQB1*02



Links: Längenstandard puc Mix Marker 8 von MBI-Fermentas.

Rechts: Nachweis der PCR-Amplifikate mittels Gelelektrophorese:

Spur LS; verwendeter Längenstandard (LS)

Spur 1-4; Probanden DNA, mit interner Positivkontrolle mit 515 bp
bzw. 430 bp.

2.3.3.3 DQA1

Nachdem alle Probanden zunächst auf ihren DQB1-Lokus untersucht worden waren, folgte anschließend die Analyse des DQA1-Lokus. Innerhalb der serologischen DQ2 Spezifität waren primär alle Probanden von besonderem Interesse, welche DQA1* 0501 aufwiesen. In der vorliegenden Arbeit wurden aber auch alle Probanden, welche dafür in Frage kamen, auf das Vorliegen der zur serologischen Spezifität DQ8 (DQA1*0301/DQB1*0302) assoziierten DQB1 bzw. DQA1 Allele untersucht.

Für die Primerkits der Firma GenoVision wurde eine optimale DNA-Konzentration von 30 ng/µl vorgegeben. Lag die Konzentration darüber bestand das Risiko unspezifischer Amplifikationen, welche das Ergebnis verfälscht hätten. Der Typisierungs-Kit setzte sich aus 24 Primermixen zusammen. Diese waren nebst der integrierten Positivkontrolle bereits in die entsprechenden „wells“ vorpipetiert.

Die individuelle Probandenlösung für 28 Testansätze setzte sich bei dem Olerup SSP™ DQA1- Kit wie folgt zusammen:

$$\begin{aligned}
 28 \times 2 \mu\text{l} &= 56 \mu\text{l DNA (30 ng}/\mu\text{l)} \\
 28 \times 3 \mu\text{l} &= 84 \mu\text{l Master Mix ohne Taq} \\
 &\quad 2,2 \mu\text{l Taq Polymerase (5 Units}/\mu\text{l)} \\
 28 \times 5 \mu\text{l} - 2,2 \mu\text{l} &= 137,8 \mu\text{l Aqua dest.}
 \end{aligned}$$

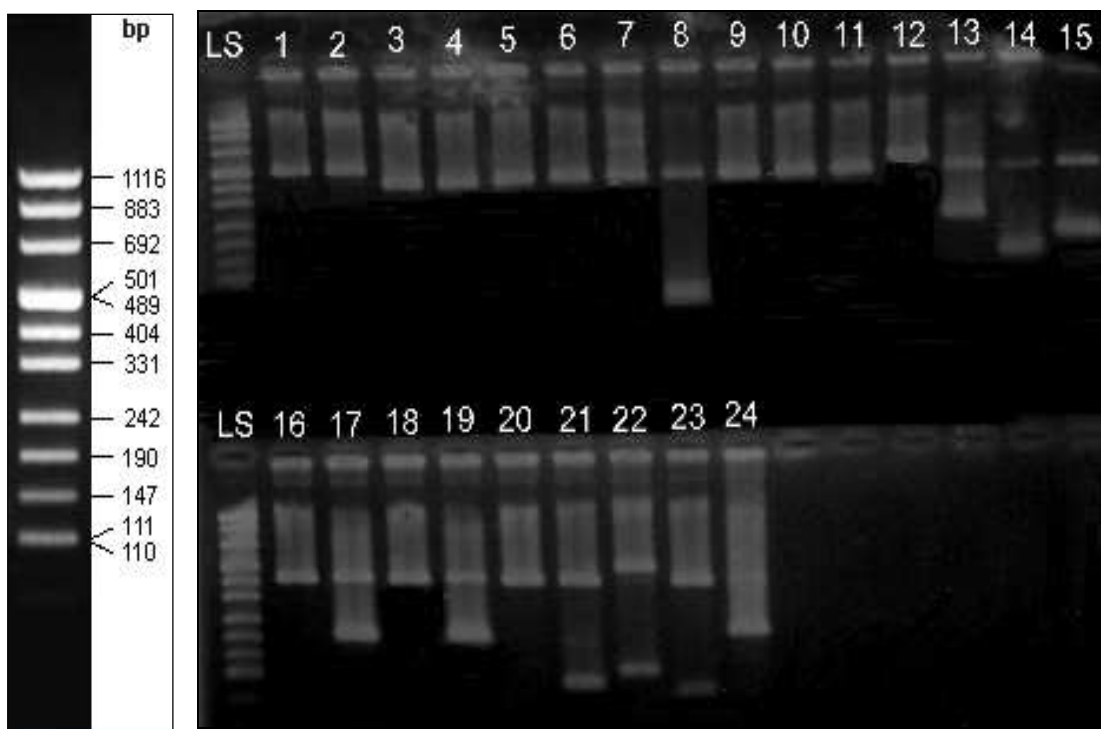
Diese Lösung wurde auf Eis pipetiert und gevortext. Im Anschluss daran wurden pro Testansatz jeweils 10 µl der individuellen Probandenlösung zu den bereits vorpipetierten Primern hinzu gegeben. Zu der Sequenz der verwendeten Primer können leider keine Angaben gemacht werden, da diese von der Firma GenoVision urheberrechtlich geschützt und nicht publiziert sind.

Die Amplifikationsreaktion wurde mit dem programmierbaren Thermocycler PTC-100 Programmable Thermal Controller, MJL (Watertown, USA) wie folgt durchgeführt:

1. zweiminütige Vorinkubation bei 94 °C
2. 10 Zyklen mit jeweils 10 sec bei 94 °C (Denaturierung) und 60 sec bei 65 °C (Annealing und Extension)
3. 20 Zyklen von jeweils 10 sec bei 94 °C (Denaturierung), 50 sec bei 65 °C (Annealing) und 30 sec bei 72 °C (Extension).

Die PCR-Amplifikate wurden mittels der unter 2.3.4 aufgeführten Gelelektrophorese untersucht und anschließend per Translumination dokumentiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Helmberg SCORE™-Software, indem die positiven Amplifikate (Banden) in das Datenverarbeitungsprogramm eingegeben wurden und mittels des Programmes der Allel-Typ, basierend auf der DQA1-Spezifitäten-Tabelle, bestimmt wurde.

Abb. 18: Gelelektrophorese DQA1



Links: Längenstandard puc Mix Marker 8 von MBI-Fermentas.

Rechts: Nachweis der PCR-Amplifikate mittels Gelelektrophorese:

Spur LS; verwendeter Längenstandard (LS)

Spur 1-24; Probanden DNA, mit interner Positivkontrolle mit 515 bp bzw. 430 bp.

Tabelle: 15 Olerup SSP™ DQA1 Typisierungsspezifitäten.

Primer Mix	Länge des spezifischen PCR-Produktes	Länge der Kontrollbande	Amplifizierte DQA1 Allele
1	145 bp	515 bp	01011, 01012, 01041, 01042, 0105
2	170 bp	515 bp	01011, 01012, 01021, 01022, 01041, 01042, 0105, 0106
3	145 bp	430 bp	01021, 01022, 0103, 0106
4	170 bp	430 bp	0103
5	220 bp	430 bp	01041, 01042, 0105
6	100 bp	430 bp	01041, 01042
7 ¹	95 bp	430 bp	0106
8	65 bp	430 bp	01011-0103, 0106, 0201-06012
9	175 bp	430 bp	0201
10	185 bp	430 bp	03011, 0302, 0303
11 ²	215 bp	430 bp	0302
12 ²	225	515 bp	0302, 0303
13	225 bp	430 bp	01011-03011, 0401-06012
14	120 bp	430 bp	0401, 05011, 05012, 0502-0505
15	165 bp	430 bp	05011, 05012, 0502-0505
16 ¹	90 bp	430 bp	0502
17 ²	200 bp	430 bp	05011, 05012, 0502 [?] , 0504 [?] , 0505
18 ²	200 bp	430 bp	0502 [?] , 0503, 0504 [?] ,
19	205 bp	430 bp	05011, 05012, 0502, 0503, 0505
20	130 bp	430 bp	0504
21 ^{1,2,3}	110 bp	430 bp	05012 [?] , 0502 [?] , 0504 [?] , 0505
22 ¹	110 bp	515 bp	06011, 06012
23 ^{1,2}	85 bp	430 bp	0401, 06011, 06012

PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

24	240 bp	430 bp	01011-0106, 0201, 03011,0302-05011, 05012,0502, 0503, 0504, 06011, 06012
----	--------	--------	--

¹Kürzere, spezifische PCR-Fragmente sind weniger scharf und intensiv abgebildet als längere PCR-Fragmente.

²Die Primermischungen 11, 12, 17, 18, 21 und 23 können unspezifische Amplifikationen verursachen.

³Die Primermischung 21 führt zu weniger spezifischen PCR-Produkten als die anderen DQA1-Primermischungen.

Bei der Auswertung der Banden ergab sich das Problem, dass Bande Nummer 21 immer positiv war. Dahingehend war es nicht möglich, die Allele 05011 und 05012 eindeutig zu differenzieren. Nach Rücksprache bestätigte die Firma GenoVision, dass dieses spezifische Problem des Kits bekannt ist und die Bande 21 stark zu unspezifischen Amplifikationen neigt, im Zweifelsfalle sollte die Bande 21 als negativ gewertet werden.

Da die meisten Zöliakiepatienten den DR3-DQ2 Haplotypen (den DRB1*0301 – DQA1*0501 – DQB1*0201 Haplotyp) aufweisen, wurde auf eine Subspezifizierung zwischen 05011/05012 verzichtet und diese Allele als 0501 gewertet, was laut ESPGHAN für die Diagnose der Zöliakie als hinreichend genau erachtet wird^{13,146}.

Es sei noch erwähnt, dass die restlichen Zöliakiepatienten DR5 – DQ7 und DR7 – DQ2 heterozygot sind (das heißt sie haben meistens den DRB1*11/12 – DQA1*0505 – DQB1*0301 und DRB1*07 – DQA1*0201 – DQB1*0202 Haplotypen.)^{103, 154, 153}.

Die DQ α -Kette der DQA1*0501 oder DQA1*0505 Allele unterscheidet sich lediglich im Eton 1, die für das Peptid kodiert.¹⁴⁶. Zum genaueren Verständnis siehe auch Kapitel 1.2.2 „Ätiologie und Pathogenese“, sowie Abbildung Nr. 5.

2.3.3.4 DQB1*03

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Probanden, welche in der DQB1 „low resolution“ Typisierung DQB1*03 positiv waren subtypisiert. Dadurch war es möglich, die serologisch assoziierten spezifischen DQ8 Allele (DQA1*0301/DQB1*0302) weiter zu differenzieren. Alle Probanden mit DQA1*0301 und mit DQB1*03 wurden daher, mittels des Olerup SSP™ DQB1*03-Kit subtypisiert. Für die Primerkits der Firma GenoVision wurde eine optimale DNA-Konzentration von 30 ng/µl vorgegeben. Lag die Konzentration darüber bestand das Risiko unspezifischer Amplifikationen, welche das Ergebnis verfälscht hätten. Der Typisierungs-Kit setzte sich aus 8 Primermixen zusammen. Diese waren nebst der integrierten Positivkontrolle bereits in die entsprechenden „wells“ vorpipetiert. Die individuelle Probandenlösung setzte sich bei dem Olerup SSP™ DQB1*03 Kit wie folgt zusammen:

10 x 2 µl = 20 µl DNA (30 ng/µl)
10 x 3 µl = 30 µl Master Mix ohne Taq
0,8 µl Taq Polymerase (5 Units/µl)
10 x 5 µl – 0,8 µl = 49,2 µl Aqua dest.

Diese Lösung wurde auf Eis pipetiert und gevortext. Im Anschluss daran wurden pro Testansatz jeweils 10 µl der individuellen Probandenlösung zu den bereits vorpipetierten Primern hinzu gegeben. Zu der Sequenz der verwendeten Primer können leider keine Angaben gemacht werden, da diese von der Firma GenoVision urheberrechtlich geschützt und nicht publiziert sind.

Die Amplifikationsreaktion wurde mit dem programmierbaren Thermocycler PTC-100 Programmable Thermal Controller, MJL (Watertown, USA) wie folgt durchgeführt:

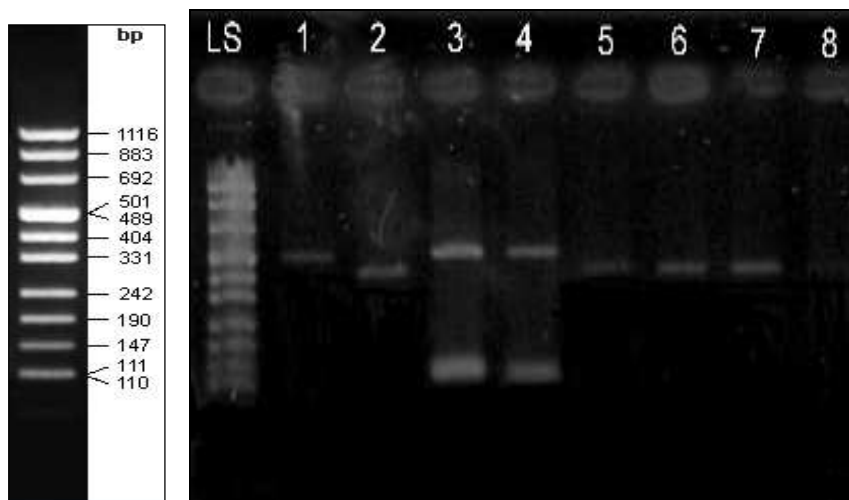
1. zweiminütige Vorinkubation bei 94 °C
2. 10 Zyklen mit jeweils 10 sec bei 94 °C (Denaturierung) und 60 sec bei 65 °C (Annealing und Extension)
3. 20 Zyklen von jeweils 10 sec bei 94 °C (Denaturierung), 50 sec bei 65 °C (Annealing) und 30 sec bei 72 °C (Extension).

Die PCR-Amplifikate wurden mittels der unter 2.3.4. aufgeführten Gelelektrophorese untersucht und anschließend per Transluminationsdokumentation dokumentiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Helmborg SCORE™-Software, indem die positiven Amplifikate (Banden) in das Datenverarbeitungsprogramm eingegeben wurden und mittels des Programmes der Allel-Typ, basierend auf der DQB1*03-Spezifitäten-Tabelle, bestimmt wurde.

Tabelle: 16 Olerup SSP™ DQB1*03 Typisierungsspezifitäten

Primer Mix	Länge des spezifischen PCR-Produktes	Länge der Kontrollbande	Amplifizierte DQB1 Allele
1	100 bp	515 bp	03011-03012, 0304, 0309
2	80 bp	430 bp	03011-03012, 03032-03033, 0309,0310
3	135 bp	515 bp	0302, 0307, 0308
4	130 bp	515 bp	0302, 03032-03033, 0306-0308
5	100,135 bp	430 bp	0304, 0310
6	130	430 bp	03051-03052
7	115, 135	430 bp	0306, 0308, 0309
8	150	430 bp	0307

Abb. 19: Gelelektrophorese DQB1*03



Links: Längenstandard puc Mix Marker 8 von MBI-Fermentas.

Rechts: Nachweis der PCR-Amplifikate mittels Gelelektrophorese:

Spur LS; verwendeter Längenstandard (LS)

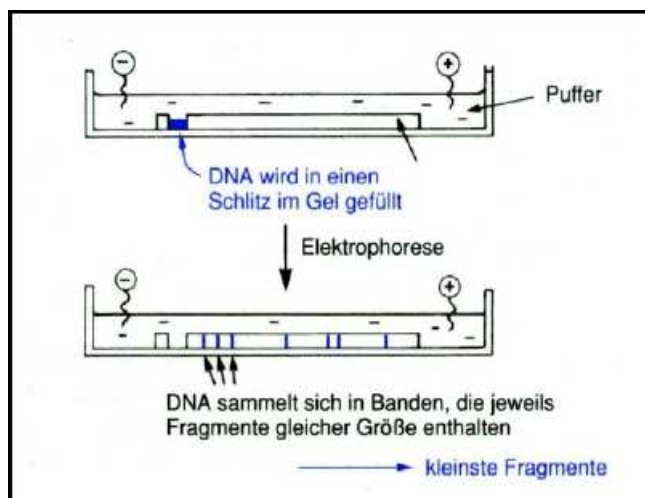
Spur 1-8; Probanden DNA, mit interner Positivkontrolle mit 515 bp bzw. 430 bp

2.3.4 Auftrennung der PCR-Amplifikate mittels Gelelektrophorese

Die PCR-Amplifikate wanderten als negativ geladene Makromoleküle (Anionen) beim Anlegen einer elektrischen Spannung in einem entsprechenden Laufpuffer mit einem pH-Wert von 7,2. Die Wanderungsgeschwindigkeit war dabei von der Größe der DNA-Fragmente abhängig. Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese konnten die PCR-SSP-Produkte daher nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Damit war in kurzer Zeit nachzuweisen, ob eine Amplifikation stattgefunden hatte. Ein PCR-Produkt musste dabei in dem zu erwartenden Größenbereich liegen. Dadurch waren spezifische und unspezifische Ergebnisse (falsch positive) PCR-Produkte unterscheidbar. Durch weiterhin parallel mit den PCR-Produkten aufgetragene Längenstandards aus DNA-Fragmenten bekannter Größe bzw. durch den Vergleich der Laufweite der verschiedenen Amplifikate wurde die Ermittlung der Größe der PCR-Produkte ermöglicht. Zur Herstellung der Agarosegele mussten 3 g Agarose in 100 ml 1 x TBE-Laufpuffer durch

Erhitzen in einem Mikrowellenapparat gelöst werden. Noch vor dem Erstarren wurden Käbme in das Agarosegel getaucht, welche die Vertiefungen (24 „slots“ pro Kamm) für die Aufnahme der Amplifikate nach dem Festwerden der Gele bildeten. In das erstarrte Agarosegel wurden dann in die einzelnen „slots“ die Amplifikate aus den jeweiligen „PCR-Tubes“ der Reihe nach mittels einer Eppendorf-Pipette eingefüllt. Es musste darauf geachtet werden, dass in das erste „slot“ ein Längenstandard bekannter Größe eingefüllt wurde. Nachdem alle „slots“ mit den jeweiligen Amplifikaten gefüllt waren, wurde die gesamte Gelkammer mit 1x TBE-Laufpuffer aufgefüllt. Die anschließende Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 80 V bei 240 mA für ca. 25 Minuten durchgeführt. Das fertige Gel wurde anschließend vorsichtig entnommen und in einer Ethidiumbromidlösung zur Anfärbung der PCR-Produkte für 10 Minuten inkubiert. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht-Bestrahlung auf einem Transilluminator.

Abb. 20: Trennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese¹⁵



2.4 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der vorgelegten Arbeit wurde hinsichtlich der Übersichtlichkeit in die drei unten aufgeführten Statistiken unterteilt.

- A. 2.4.2 Statistische Auswertung der HLA-DQ Allelfrequenzen
- B. 2.4.3 Statistische Analyse der HLA DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) positiven Patienten hinsichtlich des Relativen Risikos in den einzelnen biotisch definierten Gruppen TVA & PVA
- C. 2.4.4 Vergleichende Statistische Analyse des HLA-DQ Status in den einzelnen biotisch definierten Subgruppen TVA & PVA

Das rekrutierte Kontrollgruppenkollektiv umfasste aus den gegebenen ethischen Richtlinien, welche bereits unter 2.1.3 näher erläutert wurden, lediglich 26 Probanden. Dies erschien uns für eine wissenschaftliche Auswertung als statistisch nicht repräsentativ. Daher wurde für die Statistiken A und B eine 2003 publizierte Kontrollgruppe mit 236 kaukasoiden Probanden¹²⁰ verwendet. Es wurden die gleichen Studienkriterien angewendet wie in der vorliegenden Arbeit, das heißt bei allen Individuen wurde nach den Richtlinien der ESPGHAN eine Zöliakie ausgeschlossen und alle Probanden wurden mittels PCR-SSP HLA-typisiert¹²⁰. In der unten aufgeführten statistischen Analyse wurde diese Gruppe mit n = 236 als Spanische Kontrollgruppe bezeichnet. Für die Statistik C wurde die von uns rekrutierte Kontrollgruppe mit n = 26 Probanden verwendet, diese wird als Tübinger Kontrollgruppe bezeichnet.

Für die statistische Auswertung der Statistiken A und B wurde als Testverfahren der unter 2.4.1.1 aufgeführte Chi²-Test sowie das unter 2.4.1.2 gezeigte Relative Risiko (RR) verwendet. Die P-Werte wurden mittels Multiplikation der Anzahl der Allele bzw. der Genfrequenzen korrigiert. Das Relative Risiko (RR) wurde nach der Woolf-Haldane Methode^{165, 53} berechnet.

Für die deskriptive Statistik wurde der Chi²-Wert, das Relative Risiko, der P-Wert, sowie der 95% Konfidenzintervall bestimmt.

Für die statistische Auswertung der Statistik C wurde als Testmethode der unter 2.4.1.3 aufgeführte T-Test nach Student für zwei unabhängige Stichproben verwendet. Für die deskriptive Statistik wurde der Cramers V-Wert bestimmt.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde für alle Testverfahren jeweils mit $p = 0,05$ festgelegt. Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm SPSS 11.0 der Firma Prentice Hall International durchgeführt.

2.4.1 Angewandte statistische Testmethoden

2.4.1.1 Der Chi²-Test

Der Chi² - Test misst die Abweichung der Zellenhäufigkeiten in einer Tabelle von der statistischen Unabhängigkeit. Die Höhe des Chi²-Wertes sagt wenig über die Stärke des Zusammenhanges aus, da die Höhe von der Tabellengröße und der absoluten Fallzahl beeinflusst wird. In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich 4-Felder-Tabellen untersucht. Wichtig für die Interpretation des Chi²-Wertes ist dessen Signifikanz, die durch den Wert P gemessen wird. Ein P-Wert < 0,05 bedeutet, dass der entsprechende Chi²-Wert signifikant ist, d. h., dass die Irrtumswahrscheinlichkeit (wonach der Unterschied zwischen den Gruppen zufällig zustande gekommen sein könnte) < 5% ist. Liegt der P-Wert über 0,05, wurde die Zeile mit „N. S.“ als nicht signifikant gekennzeichnet. Der Chi²-Wert ist nicht aussagekräftig bzw. zu störanfällig, wenn der Erwartungswert in mehr als 25% der Zellen kleiner als 5 ist, was oft bei Allelen der Fall ist, die in einer bzw. beiden Gruppen nicht oder nur selten vorkommen. In diesem Fall wurde die Zeile grau hinterlegt.

2.4.1.2 Das Relative Risiko (RR)

Das Relative Risiko (RR) ist das Quotenverhältnis zwischen Patienten und Kontrollgruppe hinsichtlich des Auftretens des jeweiligen Allels. Es misst den Unterschied der Wahrscheinlichkeit einer falschen Diagnose zwischen den Patienten und der Kontrollgruppe. Gut ist ein Wert von $RR > 1$, schlecht ist ein Wert < 1 . Es kann vorkommen, dass der χ^2 -Wert signifikant ist, RR aber unter 1 liegt. Dann unterscheidet sich die Verteilung des Allels in beiden Gruppen zwar voneinander; die Tendenz der Verteilung ist aber in beiden Gruppen gleich – d. h., in beiden Gruppen besitzt die Mehrheit ein Allel nicht. Die Abweichung besteht im Ausmaß des Überhanges und diskriminiert nicht deutlich genug. Da der Wert von RR ein Quotient ist, kann er nicht berechnet werden, wenn der Wert unter dem Bruchstrich „0“ beträgt. Daher fehlt er bei Allelen, deren Häufigkeit in einer der Gruppen „0“ ist. Das Konfidenzintervall für RR gibt an, in welchem Bereich RR mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% liegt. Problematisch ist, wenn die untere Grenze unter 1, die obere Grenze jedoch über 1 liegt, das Konfidenzintervall also den Wert 1 umschließt (der ja als Grenzwert fungiert). Dann kann man nicht annehmen, dass zwischen Faktor und Ereignis ein Zusammenhang besteht, da der „wahre Wert“ von RR innerhalb des 95%-Konfidenzintervalles auch unter 1 liegen könnte.

2.4.1.3 T-Test

Mit diesem Test kann für einen Mittelwertunterschied zwischen zwei voneinander unabhängigen Gruppen ein Signifikanztest durchgeführt werden. (z.B. TVA versus PVA, Patientenkollektiv versus Kontrollgruppenkollektiv etc.) Voraussetzung für den T-Test ist neben dem metrischen Skalenniveau der Variable die Annahme, dass deren Werte in beiden Gruppen normal verteilt sind. Signifikanz liegt bei dem T-Test ab einem Level $< 0,05$ (= 5%) vor.

2.4.2 Statistische Auswertung der HLA-DQ Allelfrequenzen.

2.4.2.1 Statistische Auswertung der HLA-DQB1 Allelfrequenzen

DQB1 Allele	Patienten Tübingen (n = 138) (freq.)		Kontrollgruppe Sp. (n = 472) (freq.)		Chi ²	P	RR	95% KI
*0201	65	0,471	104	0,22	33,500	0,000	3,151	2,114 – 4,695
*0202	2	0,0144	0	0	6,863	0,009	-	-
*0301	46	0,3333	99	0,21	9,001	0,003	1,884	1,241 – 2,860
*0302	4	0,0289	47	0,1	6,945	0,008	0,270	0,095 – 0,763
*0303	0	0	11	0,023	3,275	N. S.	-	-
*0304	1	0,0072	1	0,002	0,859	N. S.	0,348	0,214 – 55,32
*0305	0	0	1	0,002	0,293	N. S.	-	-
*0309	1	0,0072	0	0	3,426	N. S.	-	-
*04	0	0	6	0,013	1,772	N. S.	-	-
*05	5	0,0362	102	0,22	23,884	0,000	0,136	0,054 – 0,342
*06	14	0,1014	101	0,214	8,839	0,003	0,415	0,229 – 0,752
Sum	138	0,9996	472	1,004				

n: Anzahl P: P-Wert RR: Relatives Risiko NS: Nicht Signifikant KI: Konfidenzintervall
 grau = Chi² nicht anwendbar, da zu geringe Fallzahl in den Zellen

Die Allele mit deutlichen Unterschieden wurden in den Tabellen fett gedruckt. Ein guter Wert für RR geht immer mit einem signifikanten Chi²-Wert einher, aber nicht notwendigerweise umgekehrt. Ein deutlicher Effekt liegt dann vor, wenn die gesamte Zeile fett gedruckt ist.

Wie aus der obigen Tabelle ersichtlich ist waren die Allele DQB1*0201 und DQB1*0301 in unserem Patientenkollektiv mit Zöliakie gegenüber der gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht.

DQB1*0201 RR: 3,151 KI 95%: 2,114 – 4,695.

DQB1*0301 RR: 1,884 KI 95%: 1,241 – 2,860

2.4.2.2 Statistische Auswertung der HLA-DQA1 Allelfrequenzen

DQA1 Allele	Patienten Tübingen (n = 138) (freq.)	Kontrollgruppe Sp. (n = 472) (freq.)	Chi ²	P	RR	95% CI
*0101	2	0,0144	60	0,128	14,834	0,000 0,101 0,024 – 0,419
*0102	13	0,0942	85	0,18	5,841	0,016 0,474 0,255 – 0,878
*0103	5	0,0362	43	0,092	4,434	0,035 0,375 0,146 – 0,966
*0104	4	0,0289	8	0,016	0,802	N. S. 1,731 0,513 – 5,838
*0105	0	0	7	0,014	2,070	N. S. - -
*0201	31	0,224	63	0,134	6,808	0,009 1,881 1,164 – 3,039
*0301	4	0,028	33	0,071	3,140	N. S. 0,397 0,138 – 1,141
*0302	0	0	3	0,006	0,881	N. S. - -
*0303	2	0,0144	27	0,057	4,302	0,038 0,242 0,057 – 1,032
*0401	1	0,0072	7	0,014	0,475	N. S. 0,485 0,059 – 3,975
*0501	68	0,492	134	0,284	21,030	0,000 2,450 1,660 – 3,616
*0503	0	0	2	0,004	0,587	N. S. - -
*0601	8	0,0579	0	0	27,726	0,000 - -
Sum	138	0,9972	472	1		

n: Anzahl P: P-Wert RR: Relatives Risiko NS: Nicht Signifikant KI: Konfidenzintervall
 grau = Chi² nicht anwendbar, da zu geringe Fallzahl in den Zellen

Die Allele mit deutlichen Unterschieden wurden in den Tabellen fett gedruckt. Ein guter Wert für RR geht immer mit einem signifikanten Chi²-Wert einher, aber nicht notwendigerweise umgekehrt. Ein deutlicher Effekt liegt dann vor, wenn die gesamte Zeile fett gedruckt ist.

Wie aus der obigen Tabelle ersichtlich ist waren die Allele DQA1*0201 und DQA1*0501 in unserem Patientenkollektiv mit Zöliakie gegenüber der gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht.

DQA1*0201 RR: 1,881 KI 95%: 1,164 – 3,039.

DQA1*0501 RR: 2,450 KI 95%: 1,660 – 3,616

2.4.3 Statistische Analyse der HLA DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) positiven Patienten hinsichtlich des Relativen Risikos in den einzelnen bioptisch definierten Gruppen TVA & PVA

2.4.3.1 Statistische Auswertung des gesamten HLA DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) Heterodimer positiven Patientenkollektives (TVA & PVA) hinsichtlich des Relativen Risikos

	<i>Heterodimer +</i>		<i>Heterodimer -</i>		<i>Gesamt</i>
	<i>n = (109)</i>	<i>%</i>	<i>n = (196)</i>	<i>%</i>	
<i>Patienten</i>	58	84,1	11	15,9	69
<i>Kontrollen</i>	51	21,6	185	78,4	236
<i>Gesamt</i>	109	35,7	196	64,3	305

Chi² = 90,66

P = 0.0000

RR = 19,127

KI 95% = 9,354 – 39,107

Wie anhand der obigen Tabelle ersichtlich, war das HLA DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) Heterodimer in unserem Patientenkollektiv mit Zöliakie gegenüber der gesunden Kontrollgruppe mit einem RR von 19,127 signifikant erhöht.

2.4.3.2 Statistische Auswertung der HLA DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) positiven Patienten der Gruppe TVA

	DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) +		DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) -		Gesamt
	n = (103)	%	n = (194)	%	
<i>Patienten</i>	52	85,2	9	14,8	61
<i>Kontrollen</i>	51	21,6	185	78,4	236
<i>Gesamt</i>	103	33,7	194	66,3	297

Chi² = 86,648

P = 0.0000

RR = 20,952

KI 95% = 5,621 – 36,92

Wie anhand der obigen Tabelle ersichtlich, war das DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) Heterodimer in der Subgruppe **TVA** gegenüber der gesunden Kontrollgruppe mit einem RR von 20,952 erhöht. P war mit 0,000 kleiner als 5%, somit war das Ergebnis signifikant.

2.4.3.3 Statistische Auswertung der HLA DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) positiven Patienten der Gruppe PVA

	DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) +		DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) -		Gesamt
	n = (57)	%	n = (187)	%	
<i>Patienten</i>	6	75,0	2	25,0	8
<i>Kontrollen</i>	51	21,6	185	78,4	236
<i>Gesamt</i>	57	18,7	187	81,3	244

Chi² = 12,319

P = 0.015

RR = 9,8421

KI 95% = 2,042 – 47,431

Wie aus der obigen Tabelle ersichtlich, war das HLA DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) Heterodimer in der Subgruppe **PVA** gegenüber der gesunden Kontrollgruppe mit einem RR von 9,8421 erhöht. Das Ergebnis war trotz der geringen Fallzahl signifikant, da P mit 0,015 kleiner als 5% war.

Die statistische Analyse des HLA DQA1*0501 - DQB1*0201 (**DQ2**) Heterodimer in den einzelnen biotisch definierten Gruppen zeigte, dass das RR mit 19,127 im Patientenkollektiv gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht war. Betrachtete man die einzelnen pathologisch definierten Gruppen TVA und PVA, so erkannte man, dass die HLA DQA1*0501 - DQB1*0201 (**DQ2**) positiven Patienten mit einer TVA gegenüber einem gesunden Kontrollgruppenkollektiv ein RR von 20,952 aufwiesen. Die HLA DQA1*0501 - DQB1*0201 (**DQ2**) positiven Patienten mit einer PVA hingegen, wiesen gegenüber einem gesunden Kontrollgruppenkollektiv ein wesentlich geringeres RR von 9,8421 auf.

Eine statistische Auswertung der HLA DQA1*0301 - DQB1*0302 (**DQ8**) positiven Patienten hinsichtlich des RR konnte aufgrund der zu geringen Fallzahl von 4 Patienten nicht durchgeführt werden.

2.4.4 Vergleichende Statistische Analyse des HLA-DQ Status in den einzelnen bioptisch definierten Subgruppen TVA & PVA

Für die unten aufgeführte statistische Auswertung der relativen Verteilung von HLA-DQ2 und HLA-DQ8 in den einzelnen Subgruppen sowie der Kontrollgruppe, wurde der T-Test nach Student für zwei unabhängige Stichproben verwendet.

<i>SUBGRUPPE TVA</i>			
<i>DQ - Status</i>	<i>Patientenanzahl</i>		<i>Prozent. Anteil dieses DQ-Typs am gesamten Patientenkollektiv (TVA mit PVA)</i>
	<i>(n = 61)</i>	<i>(%)</i>	
DQ2 (DQA1*0501 - DQB1*0201)	52	85,2	82,5
DQ8 (DQA1*0301 - DQB1*0302)	2	3,3	100,0
DQ2 und DQ8 positiv	2	3,3	100,0
DQ2 und DQ8 negativ	5	8,2	17,9
Gesamt	61	100	64,2

<i>SUBGRUPPE PVA</i>			
<i>DQ - Status</i>	<i>Patientenanzahl</i>		<i>Prozent. Anteil dieses DQ-Typs am gesamten Patientenkollektiv (TVA mit PVA)</i>
	<i>(n = 8)</i>	<i>(%)</i>	
DQ2 (DQA1*0501 - DQB1*0201)	6	75	9,5
DQ8 (DQA1*0301 - DQB1*0302)	0	0	0
DQ2 und DQ8 positiv	0	0	0
DQ2 und DQ8 negativ	2	25	7,1
Gesamt	8	100	8,4

PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

<i>TÜBINGER KONTROLLGRUPPE</i>			
<i>DQ - Status</i>	<i>Patientenanzahl</i>		<i>Prozentualer Anteil des jeweiligen DQ-Typs am gesamten Patientenkollektiv (TVA mit PVA)</i>
	<i>(n = 26)</i>	<i>(%)</i>	
DQ2 (DQA1*0501 - DQB1*0201)	5	19,2	7,9
DQ8 (DQA1*0301 - DQB1*0302)	0	0	0
DQ2 und DQ8 positiv	0	0	0
DQ2 und DQ8 negativ	21	80,8	75
Gesamt	26	100	27,4

<i>GESAMT</i>			
<i>DQ - Status</i>	<i>Patientenanzahl</i>		<i>Prozent. Anteil dieses DQ-Typs am gesamten Patientenkollektiv (TVA mit PVA)</i>
	<i>(n = 95)</i>	<i>(%)</i>	
DQ2 (DQA1*0501 - DQB1*0201)	63	66,3	100
DQ8 (DQA1*0301 - DQB1*0302)	2	2,1	100
DQ2 und DQ8 positiv	2	2,1	100
DQ2 und DQ8 negativ	28	29,5	100
Gesamt	95	100	100

SYMMETRISCHE MAßE			
		Wert	Näherungsweise Signifikanz
Nominal- bzgl. Nominalmaß	Phi	0,703	0,000
	Cramer-V	0,497	0,000
Anzahl der gültigen Fälle		95	

- A Die Null-Hypothese wird nicht angenommen.
- B Unter Annahme der Null-Hypothese wird der asymptotische Standardfehler verwendet.

In der oben gezeigten vergleichenden statistischen Analyse hinsichtlich des jeweiligen HLA-DQ Status in den einzelnen bioptisch definierten Subgruppen wurde die Tübinger Kontrollgruppe verwendet. Diese Statistik zeigt die jeweilige Gruppendynamik aller auf HLA-DQ typisierten Personen.

Zwischen den einzelnen bioptisch definierten Gruppen (TVA, PVA und Kontrollgruppe) bestand bezüglich des HLA-DQ Status eine starke statistische Abweichung. Cramers V zeigte mit 0,497 eine hochsignifikante Divergenz zwischen den einzelnen Gruppen. Signifikanz lag bei vorliegendem Test ab einem Level $< 0,05$ (= 5%) vor. Da unsere Irrtumswahrscheinlichkeit 0,000 (0%) betrug ist diese kleiner 5%, und somit eindeutig signifikant.

3 Ergebnisse

Um die zwischen dem HLA-System und der Zöliakie bestehenden Zusammenhänge besser zu verstehen, wurden in der vorliegenden Arbeit insgesamt 95 Proben untersucht. Es handelte sich hierbei um 69 Proben von Patienten des Zöliakiezentrums der Universitätskinderklinik Tübingen und um 26 Kontrollen.

Zunächst wurde die Allelfrequenzverteilung zwischen Patientenkollektiv und Probandenkollektiv vergleichend betrachtet, danach wurden diese in den einzelnen, klinisch definierten Subgruppen (TVA/PVA) genauer analysiert. Das Patientenkollektiv bestand aus insgesamt 69 Patienten, wovon 67% weiblich und 33% männlich waren. Die Altersverteilung zum Zeitpunkt der Biopsie lag zwischen 6 Monaten und 12^{1/12} Jahren, mit einem Median von 45,5 Monaten (siehe hierzu auch 2.1.2.). Zöliakie im klassischen Sinne wiesen 52 (75%) Patienten auf, eine atypische Zöliakie hingegen 17 Patienten (25%). 15 Patienten mit atypischer Zöliakie wurden durch Screeningmethoden erfasst, da sie für ihr Alter zu klein waren, 1 Patient mit Diabetes Mellitus Typ 1, aufgrund eines Screenings bei Risikogruppen und eine weitere Patientin, da ihre monozygote Zwillingsschwester an einer klassischen Zöliakie litt. Außer dem monozygoten Zwillingspaar wurden in der Studie drei weitere Geschwisterpaare untersucht, wovon alle an Zöliakie erkrankt waren. Neben einer bioptisch gesicherten Zöliakie zeigten 19 Patienten (28%) zum Zeitpunkt der Dünndarmbiopsie folgende mit Zöliakie assoziierten Erkrankungen:

ERGEBNISSE

Diagnosen	Gruppe A	Gruppe B
IgA-Mangel	2	1
Diabetes Mellitus Typ I	1	0
Autoimmun-Hepatitis	1	0
Neurodermitis	4	1
Karies	1	0
Atopie	4	0
Asthma	2	0
VSD	1	0
Morbus Perthes	2	0
familiärer Kleinwuchs	1	0
Nahrungsmittelallergie	1	0
Legasthenie	1	0

Mehrfachnennungen möglich

3.1 Allelfrequenzverteilung DQA1 und DQB1

Basierend auf der unter 2.3.3. beschriebenen PCR-SSP Amplifikation und der anschließenden Gelelektrophorese, wurden die vorliegenden Proben auf ihre HLA-DQA / HLA-DQB Loci analysiert.

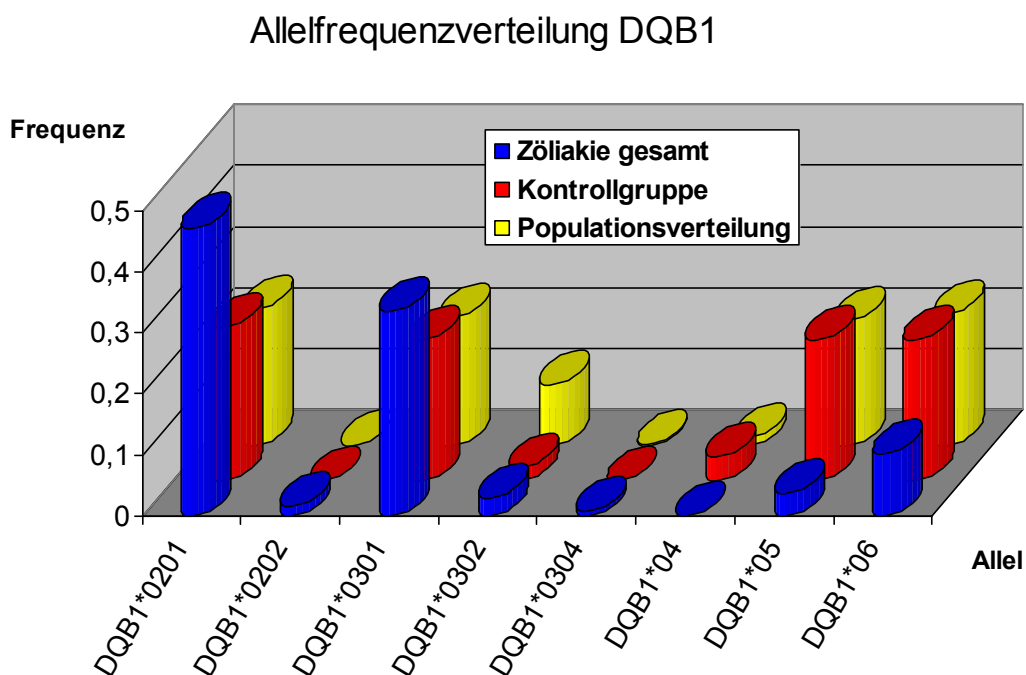
Das von uns rekrutierte Kontrollgruppenkollektiv umfasst aus den gegebenen ethischen Richtlinien, welche bereits unter 2.1.3 näher erläutert wurden, lediglich 25 Probanden. Dies erscheint uns für eine wissenschaftliche Auswertung als statistisch nicht repräsentativ. Daher benutzen wir für die folgende Analyse der Allelverteilung, sowie für die unter 3.3. aufgeführte statistische Analyse, eine 2003 publizierte Kontrollgruppe mit 236 kaukasoiden Probanden¹²⁰. Es wurden die gleichen Studienkriterien angewendet wie in der vorliegenden Arbeit, das heißt bei allen Individuen wurde nach den Richtlinien der ESPGHAN eine Zöliakie ausgeschlossen und alle Probanden wurden mittels PCR-SSP HLA-typisiert¹²⁰.

In der unten aufgeführten Allelfrequenzverteilung wird diese Gruppe mit $n = 236$ als mitteleuropäische, kaukasoider Gesamtpopulation bezeichnet, die von uns rekrutierte Kontrollgruppe mit $n = 25$ wird als Kontrollgruppe bezeichnet.

Die unten aufgeführten Diagramme zeigen die Allelfrequenzverteilung auf dem DQB1,- und dem DQA1 Locus zwischen Patientenkollektiv, Probandenkollektiv und der mitteleuropäischen kaukasoiden Gesamtpopulation¹²⁰.

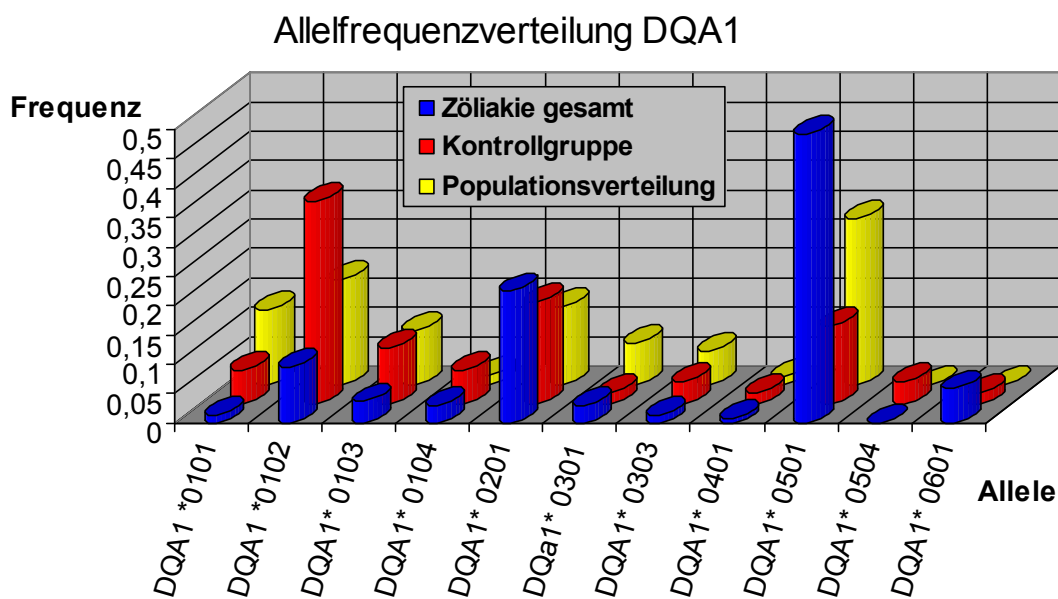
Beim Vergleich der einzelnen Allelfrequenzen erkennt man, dass es trotz der wesentlich geringeren Probandenanzahl zwischen der Kontrollgruppe und der Populationsverteilung¹²⁰ keine wesentlichen Differenzen gibt.

Abb.21: Allelfrequenzverteilung DQB1



DQB1 Allele	Patientenkollektiv n = 138 (%)	Populationsverteilung n = 472 (%)	Kontrollgruppenkollekt. n = 52 (%)
DQB1*0201	65 (0,471)	104 (0,220)	13 (0,25)
DQB1*0202	2 (0,014)	0 (0)	0 (0)
DQB1*0301	46 (0,333)	99 (0,209)	12 (0,23)
DQB1*0302	4 (0,0289)	47 (0,099)	1 (0,019)
DQB1*0304	1 (0,007)	1 (0,002)	0 (0)
DQB1*0309	1 (0,007)	0 (0)	0 (0)
DQB1*04	0 (0)	6 (0,013)	2 (0,038)
DQB1*05	5 (0,036)	102 (0,201)	12 (0,23)
DQB1*06	14 (0,101)	101 (0,213)	12 (0,23)

Abb.22: Allelfrequenzverteilung DQA1



DQA1 Allele	Patientenkollektiv n = 138 (%)	Populationsverteilung n = 472 (%)	Kontrollgruppenkollekt. n = 52 (%)
DQA1*0101	2 (0,014)	60 (0,128)	3 (0,057)
DQA1*0102	13 (0,094)	85 (0,180)	18 (0,346)
DQA1*0103	5 (0,036)	43 (0,092)	5 (0,096)
DQA1*0104	4 (0,028)	8 (0,016)	3 (0,057)
DQA1*0201	31 (0,224)	63 (0,134)	9 (0,173)
DQA1*0301	4 (0,029)	33 (0,071)	1 (0,019)
DQA1*0303	2 (0,014)	27 (0,057)	2 (0,038)
DQA1*0401	1 (0,007)	7 (0,014)	1 (0,019)
DQA1*0501	68 (0,492)	134 (0,284)	7 (0,139)
DQA1*0504	0 (0)	0 (0)	2 (0,038)
DQA1*0601	8 (0,058)	0 (0)	1 (0,019)

3.2 Gen-Assoziationen von DQA1 und DQB1

3.2.1 Patientenkollektiv

Die zuvor in 3.1 betrachteten einzelnen Allelfrequenzen von DQA1 und DQB1 gaben Aufschluss über die Verteilung der jeweiligen Allele. Entscheidend für die molekularbiologische Diagnose der Zöliakie ist jedoch nicht nur deren Frequenz als vielmehr auch deren Kombination. Auf dem DQA und dem DQB Locus befinden sich jeweils 2 Allele. Die unten aufgeführte Tabelle 17 zeigt die Kombinationen und Frequenzen der Allele DQA1*0501, bzw. DQB1*0201 mit deren jeweiligem Partnerallel.

Von besonderem Interesse für die vorliegende Studie war die Verteilung von DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2), bzw. DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8) in unserem Patientenkollektiv. Die Angaben bezüglich der Prävalenz von DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) bzw. DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8) in einer mitteleuropäischen Gesamtpopulation stammen aus der von Dr. Enczmann geleiteten Knochenmarkspenderdatei³⁵ von NRW. Es wurden alle in Deutschland wohnenden Spender ausgewählt, bei denen eine hochauflösende DQA1- und DQB1-Typisierung vorlag (n=4067). Alle diese Spender wurden initial durch das HLA-Labor des Universitätsklinikums Düsseldorf niedrigauflösend für HLA-DQA1 und HLA-DQB1 typisiert. Diese initiale Typisierung wurde mittels PCR-SSOP oder Serologie ggf. ergänzt durch PCR-SSP oder PCR-SSOP durchgeführt. Die darauf folgende hochauflösende HLA-Typisierungen dieser Spender wurden im Rahmen der Suche nach einem unverwandten Spender mittels PCR-SSP und/oder DNA-Sequenzierung durch unterschiedliche, in der Regel EFI- oder ASHI-akkreditierte Labore durchgeführt. Somit wurden die analysierten Spender mindestens zweimal für HLA-DQA1 und HLA-DQB1 durch das HLA-Labor des Universitätsklinikums Düsseldorf sowie durch andere Labore weltweit typisiert.

ERGEBNISSE

Tabelle: 17 Kombinations-Frequenz von DQA1 und DQB1 Allelen im
Patientenkollektiv

Allelkombination DQA1 Locus	Patientenkollektiv n = 69 (%)
DQA1*0501 / *0201	26 (38)
DQA1*0501 / *0102	14 (20,2)
DQA1*0501 / *0601	7 (10,1)
DQA1*0501 / *0501	5 (7,3)
DQA1*0501 / andere ¹	12 (17,4)
DQA1*x / x ²	5 (7,2)

1 DQA1*0501 Kombinationen mit weiteren Allelen die nicht *0201,*0102,*0601,*0501 entsprechen.

2 Allelkombinationen auf dem DQA-Locus wo kein einziges DQA1*0501 Allel vorhanden ist.

Allelkombination DQB1 Locus	Patientenkollektiv n = 69 (%)
DQB1*0201 / *03	45 (65,2)
DQB1*0201 / *06	10 (14,5)
DQB1*0201 / *05	4 (5,8)
DQB1*0201 / *0202	3 (4,3)
DQB1*0201 / *0201	2 (2,9)
DQB1*0201 / andere ¹	1 (1,4)
DQB1*x / x ²	5 (7,2)

1 DQB1*0201 Kombinationen mit weiteren Allelen die nicht *0201,*0202, *03, *05, *06 entsprechen.

2 Allelkombinationen auf dem DQB-Locus wo kein einziges DQB1*0201 Allel vorhanden ist.

DQ2 DQA1*0501 - DQB1*0201

DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2)	Patientenanzahl
Status	n = 69 (%)
<u>Homozygot</u>	<u>2 (2,9)</u>
<u>Heterozygot</u>	<u>58 (84,1)</u>
<u>Gesamt</u>	<u>60 (87)</u>
Prävalenz kaukasoide mittel-europäische <u>Gesamtpopulation</u> ¹⁵⁰	<u>DQ2 = 20,7%</u> ³⁵

Von den 69 analysierten Patienten waren insgesamt **2** für **DQ2 Homozygot (2,9%)** und **58 Heterozygot (84,1%)**. Insgesamt waren somit 60 von 69 Patienten für **DQ2 positiv** was **87 %** entspricht. Die **Prävalenz für DQ2** in einer kaukasoiden mitteleuropäischen Gesamtpopulation beträgt **DQ2 = 20,7%**³⁵.

DQ8 DQA1*0301 - DQB1*0302

DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8)	Patientenanzahl
Status	n = 69 (%)
<u>Homozygot</u>	<u>0 (0)</u>
<u>Heterozygot</u>	<u>4 (5,8)</u>
<u>Gesamt</u>	<u>4 (5,8)</u>
Prävalenz kaukasoide mittel-europäische <u>Gesamtpopulation</u> ¹⁵⁰	<u>DQ8 = 9,1%</u> ³⁵

Von den 69 analysierten Patienten waren insgesamt **4** für **DQ8 Heterozygot**, dies entspricht **5,8%**. Die **Prävalenz für DQ8** in einer kaukasoiden mitteleuropäischen Gesamtpopulation beträgt **DQ8 = 9,1%**³⁵.

DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) und DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8)

DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) & DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8) Status	Patientenanzahl n = 69 (%)
<u>DQ2 & DQ8 Heterozygot</u>	<u>2 (2,9)</u>
<u>Negativ sowohl für DQ2 als auch für DQ8</u>	<u>7 (10)</u>

Sowohl **DQ2** als auch **DQ8** positiv waren 2 Patienten, was **2,9%** entspricht, **DQ2** und **DQ8** negativ waren insgesamt 7 Patienten, was **10%** entspricht.

Bezüglich der Kombination von DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) und DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8) gab es in der Literatur für eine mitteleuropäische Gesamtpopulation, keinen Referenzwert auf den man dahingehend Bezug nehmen konnte.

Insgesamt waren n = 62 (90,2%) der gesamten Patientengruppe für DQ2 bzw. DQ8 positiv, lediglich n = 7 (9,8%) waren DQ2 bzw. DQ8 negativ, wobei alle der negativen Patienten zumindest ein DQA1/DQB1-Allel trugen, jedoch nicht die zwingende Kombination. Die jeweiligen DQA1 bzw. DQB1 Allele der DQ2 und DQ8 negativen Patienten zeigt unten aufgeführte *Tabelle 18*.

Tabelle: 18 DQA1/DQB1-Status bei bioptisch gesicherten DQ2 & DQ8 negativen Patienten.

DQA1	DQB1
*0103/*0201	* 0201 /*06
*0104/*0201	* 0201 /*05
*0201/*0401	* 0201 /*03
0102/ 0501	*03/*06
0103/ 0501	*03/*06
0102/ 0501	*06/*06
0103/ 0501	*03/*05

3.2.2 Kontrollgruppenkollektiv

Tabelle: 19 Kombinations-Frequenz von DQA1 und DQB1 Allelen im Kontrollgruppenkollektiv

Allelkombination DQA1 Locus	Kontrollgruppenkollektiv n = 26 (%)
DQA1*0102 / *0201	5 (20,8)
DQA1*0501 / *0102	4 (16,6)
DQA1*0501 / *0201	2 (8,3)
DQA1*0102 / *0102	2 (8,3)
DQA1*0104 / *03	2(8,3)
DQA1* andere / andere	9 (37,2)

Allelkombination DQB1 Locus	Kontrollgruppenkollektiv n = 26 (%)
DQB1*0201 / *03	8 (33,3)
DQB1*05 / *06	3 (12,5)
DQB1*05 / *05	3 (12,5)
DQB1*0201 / *06	2 (8,3)
DQB1*0201 / *0201	1 (4,1)
DQA1* andere / andere	9 (37,5)

DQ2 DQA1*0501 - DQB1*0201

DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2)	Probandenanzahl
Status	n = 26 (%)
<u>Homozygot</u>	<u>0</u>
<u>Heterozygot</u>	<u>5 (19,2)</u>
<u>Gesamt</u>	<u>5 (19,2)</u>
Prävalenz kaukasoide mittel-europäische <u>Gesamtpopulation</u> ¹⁵⁰	<u>DQ2 = 20,7%</u> ³⁵

Von den insgesamt 26 Probanden des Kontrollkollektives waren insgesamt **5 DQ2 positiv (19,2%)**, was der **Prävalenz** in einer mitteleuropäischen **Gesamtpopulation (20,7%)** recht nahe kam.

DQ8 DQA1*0301 - DQB1*0302

DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8)	Probandenanzahl
Status	n = 26 (%)
<u>Homozygot</u>	<u>0 (0)</u>
<u>Heterozygot</u>	<u>1 (3,8)</u>
<u>Gesamt</u>	<u>1 (3,8)</u>
Prävalenz kaukasoide mittel-europäische <u>Gesamtpopulation</u> ¹⁵⁰	<u>DQ8 = 9,1%</u> ³⁵

DQ8 positiv war lediglich ein Proband, was mit **3,8%**, wie auch schon beim Patientenkollektiv (5,8%), unter der Prävalenz einer mitteleuropäischen Gesamtpopulation (9,1%) lag.

3.3 Phänotypen gegliedert nach EMA, klinischer Präsentationsform, Geschlecht, und Zottenatrophie.

In der vorgelegten Studie wurden insgesamt 69 Patienten mit Zöliakie untersucht. In der im Anhang aufgeführten *Tabelle 20 A – D* wurden diese jetzt mittels retrospektiver Daten bezüglich ihrer Präsentationsform (klassisch, atypisch, latent), ihrer Biopsie (TVA/SVA/PVA), ihres Geschlechts, ihres EMA-Status und ihres neu erhobenen HLA-Status analysiert. Diese Fülle an Daten veranschaulicht am einfachsten die oben erwähnte Tabelle 20 A - D, welche sich am einfachsten von oben nach unten liest, ähnlich einem Stammbaum.

In der ersten Spalte ist die klinische Präsentationsform angegeben. Diese zeigt, dass die klassische Präsentationsform mit 52 Patienten in unserem Patientenkollektiv 2,5 mal häufiger vertreten war, als die insgesamt 17 Patienten mit subklinischer Zöliakie.

Betrachten wir zunächst die klassische Präsentationsform mit 35 (67%) weiblichen und 17 (33%) männlichen Patienten. Bei beiden Geschlechtern fiel auf, dass die Patienten mit einer ausgeprägten Zottenatrophie (TVA/SVA) wesentlich frequenter waren, als diejenigen mit einem geringeren Grad der villösen Vorschädigung (PVA). Bei den weiblichen Patienten mit einem Verhältnis von $32/3 = 10,6$ und bei den männlichen Zöliakieerkrankten mit $16/1 = 16$.

EMA war bei den Patientinnen mit SVA/TVA mit $23/9 = 2,5$ positiv, bei den männlichen Patienten mit TVA/SVA hingegen mit $11/5 = 2,2$. Bei beiden Geschlechtern mit PVA war die EMA indessen zu 100% positiv ($w=3/0$, $m=1/0$).

Von den 32 weiblichen Zöliakiepatienten, mit gesicherter SVA/TVA, waren 2 DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) Homozygot, 25 DQ2 Heterozygot, 2 DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8) positiv, 3 hatten auf dem A-Lokus eine double dose (DQA1*0501/*0501) und 4 auf dem B-Lokus (DQB1*0201/*0201). Die 3 Patientinnen mit einer PVA waren lediglich DQ2 Heterozygot.

Von den 16 männlichen Zöliakiepatienten, mit gesicherter SVA/TVA, waren 15 DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) Heterozygot, einer DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8) positiv, einer DQ2 und DQ8 positiv, zwei hatten auf dem A-Lokus eine double dose (DQA1*0501/*0501) und 2 auf dem B-Lokus (DQB1*0201/*0201). Der Patient mit der PVA war lediglich DQ2 Heterozygot.

Betrachten wir nun die subklinische Präsentationsform mit 11 (65%) weiblichen und 6 (35%) männlichen Patienten. Bei beiden Geschlechtern erkannte man wiederum, dass die Patienten mit einer ausgeprägten Zottenatrophie (TVA/SVA) wesentlich frequenter waren, als diejenigen mit einem geringeren Grad der Schleimhautschädigung (PVA). Bei den weiblichen Patienten mit einem Verhältnis von $8/2 = 4$ und bei den männlichen Zöliakieerkrankten mit $5/1 = 5$. EMA war bei den Patientinnen mit SVA/TVA mit $4/4 = 1$ positiv, bei den männlichen Patienten mit TVA/SVA hingegen mit $4/1 = 4$. Bei der PVA war das Verhältnis ähnlich. Bei den weiblichen Patienten mit $1/1 = 1$ und bei den männlichen Zöliakiepatienten mit $1/0 = 1$.

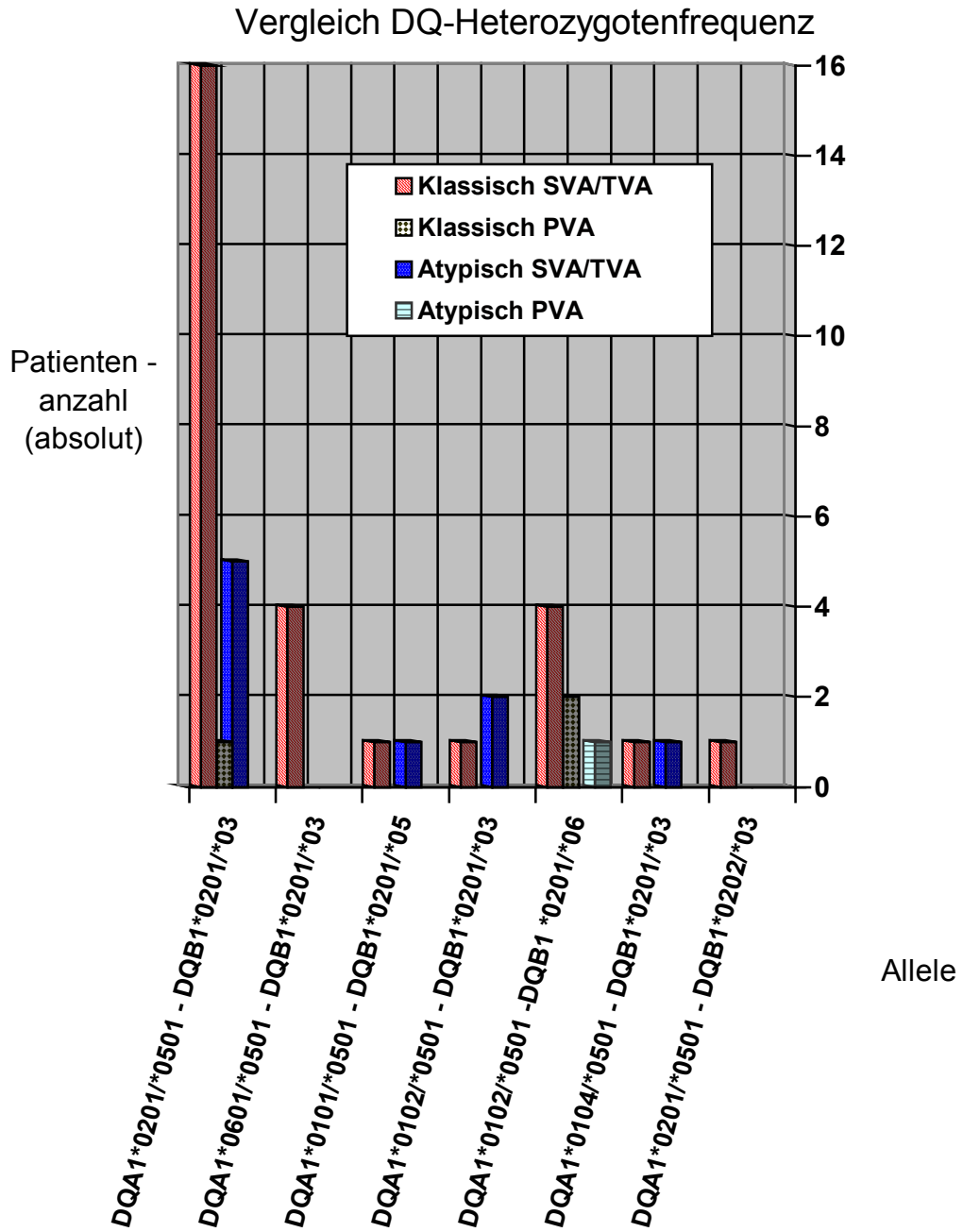
Von den 8 weiblichen Zöliakiepatienten, mit gesicherter SVA/TVA, waren lediglich 7 DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) Heterozygot, keine war DQ2 Homozygot, DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8) positiv oder trug auf dem A-/B-Lokus eine Double Dose. Von den 2 Patientinnen mit einer PVA waren eine DQ2 Heterozygot und die andere DQ2/DQ8 negativ.

Von den 5 männlichen Zöliakiepatienten, mit gesicherter SVA/TVA, waren 5 DQ2 Heterozygot, 1 DQ8 positiv, 1 DQ2 und DQ8 positiv. Der Patient mit der PVA war DQ2 und DQ8 negativ.

Von den 17 Patienten mit subklinischer Zöliakie war lediglich einer DQ2 und DQ8 positiv.

Einen Überblick über die Heterozygotenfrequenz in den einzelnen, nach Klinik und Biopsie definierten Gruppen, zeigt die unten aufgeführte *Abbildung 23*.

Abb.23: Vergleich DQ-Heterozygotenfrequenz



3.4 Retrospektive Betrachtung der Klinik in Relation zu der genetischen Analyse

Ein wesentliches Ziel der vorgelegten Studie, war die Korrelation der retrospektiv gewonnenen, klinischen Parameter, mit dem neu analysierten, spezifischen HLA-DQ2/DQ8-Status und einer dahingehenden Validierung. Die retrospektiv erhobenen klinischen Parameter des Patientenkollektives entstammen allesamt dem Zöliakiezentrum der Universitätskinderklinik Tübingen.

In der im Anhang aufgeführten *Tabelle 21* wurden die einzelnen, mit Zöliakie assoziierten genetischen Präsentationsformen, mittels retrospektiven, klinischen Daten bezüglich ihres Geschlechts, ihres EMA-Status, des Alters beim Auftreten der Erstsymptome, des Alters zum Zeitpunkt der Diagnose, des Intervall zwischen Symptomausbruch und Biopsie, ihrer Präsentationsform (klassisch, atypisch), ihrer Biopsie (TVA/SVA/PVA), ihrer Größenperzentilen und ihrer Gewichtsperzentilen korreliert.

3.4.1 Gesamtes Patientenkollektiv

Ingesamt 69 Patienten, wovon 23 (33%) männlich und 46 (67%) weiblich waren, wurden analysiert. Das Verhältnis EMA positiv zu EMA negativ betrug $49/20 = 71\%$. Eine klassische Präsentationsform wiesen 52 (75%) der Patienten auf, eine atypische hingegen 17 (25%). Bezüglich der Zottenatrophie hatten im Patientenkollektiv 61 (88%) Patienten eine SVA und lediglich 8 (12%) eine PVA. Die Größenperzentile betrug durchschnittlich 23 bei einer Gewichtsperzentilen von 20,3. Das Alter beim Auftreten der Erstsymptomatik lag bei durchschnittlich 1376 Tagen ($3^{10/12}$ J). Das Alter zum Zeitpunkt der intestinalen Biopsie hingegen bei durchschnittlich 1609 Tagen ($4^{6/12}$ J). Der daraus resultierende Intervall zwischen Erstsymptomatik und gesicherter Diagnose mittels Biopsie belief sich somit auf 233 Tage.

3.4.2 DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) Homozygot

Ingesamt 2 Patienten, wovon 1 (50%) männlich und 1 (50%) weiblich waren, wurden analysiert. Das Verhältnis EMA positiv zu EMA negativ betrug 2/0 = 100%. Eine klassische Präsentationsform wiesen 2 (100%) der Patienten auf, eine atypische hingegen niemand. Bezüglich der Zottenatrophie hatten bei den DQ2 Homozygoten 2 (100%) Patienten eine SVA und 0 eine PVA. Die Größenperzentile betrug durchschnittlich 37,2 bei einer Gewichtsperzentilen von 42,5. Das Alter beim Auftreten der Erstsymptomatik lag bei durchschnittlich 891 Tagen ($2^{5/12}$ J). Das Alter zum Zeitpunkt der intestinalen Biopsie hingegen bei durchschnittlich 914 Tagen ($2^{6/12}$ J). Der daraus resultierende Intervall zwischen Erstsymptomatik und gesicherter Diagnose mittels Biopsie lag somit bei 23 Tagen.

3.4.3 DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) Heterozygot

Ingesamt 58 Patienten, wovon 20 (34%) männlich und 38 (66%) weiblich waren, wurden analysiert. Das Verhältnis EMA positiv zu EMA negativ betrug 42/16 = 72%. Eine klassische Präsentationsform wiesen 43 (74%) der Patienten auf, eine atypische hingegen 15 (26%). Bezüglich der Zottenatrophie hatten bei den DQ2 Heterozygoten 52 (90%) Patienten eine SVA und lediglich 6 (10%) eine PVA. Die Größenperzentile betrug durchschnittlich 22 bei einer Gewichtsperzentilen von 19. Das Alter beim Auftreten der Erstsymptomatik lag bei durchschnittlich 1211 Tagen ($3^{4/12}$ J). Das Alter zum Zeitpunkt der intestinalen Biopsie hingegen bei durchschnittlich 1581 Tagen ($4^{4/12}$ J). Der daraus resultierende Intervall zwischen Erstsymptomatik und gesicherter Diagnose mittels Biopsie bei 370 Tagen.

3.4.4 DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8) Heterozygot

Ingesamt 2 Patienten, wovon keiner männlich und 2 (100%) weiblich waren, wurden analysiert. Das Verhältnis EMA positiv zu EMA negativ betrug 2/0 = 100%. Eine klassische Präsentationsform wiesen 2 (100%) der Patienten auf, eine atypische hingegen niemand. Bezüglich der Zottenatrophie hatten bei den DQ8 Heterozygoten 2 (100%) Patienten eine SVA und keiner eine PVA. Die Größenperzentile betrug durchschnittlich 3 bei einer Gewichtsperzentilen von 3. Das Alter beim Auftreten der Erstsymptomatik lag bei durchschnittlich 2796 Tagen ($7^{8/12}$ J). Das Alter zum Zeitpunkt der intestinalen Biopsie hingegen bei durchschnittlich 2847 Tagen ($7^{10/12}$ J). Der daraus resultierende Intervall zwischen Erstsymptomatik und gesicherter Diagnose mittels Biopsie bezifferte sich auf 78 Tage.

3.4.5 DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) & DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8) Heterozygot

Ingesamt 2 Patienten, wovon 2 (100%) männlich und keine weiblich waren, wurden analysiert. Das Verhältnis EMA positiv zu EMA negativ betrug 2/0 = 100%. Eine klassische Präsentationsform wiesen 1 (50%) der Patienten auf, eine atypische ebenfalls 1 (50%). Bezüglich der Zottenatrophie hatten bei den DQ2 + DQ8 Heterozygoten beide (100%) Patienten eine SVA und keiner eine PVA. Die Größenperzentile betrug durchschnittlich 3 bei einer Gewichtsperzentilen von 7. Das Alter beim Auftreten der Erstsymptomatik lag bei durchschnittlich 2518 Tagen ($6^{11/12}$ J). Das Alter zum Zeitpunkt der intestinalen Biopsie hingegen bei durchschnittlich 2542 Tagen (7 J). Der daraus resultierende Intervall zwischen Erstsymptomatik und gesicherter Diagnose mittels Biopsie also auf 24 Tage.

Bei einem Patienten bestand ein bekannter familiärer Kleinwuchs. Er wurde mit einer atypischen Klinik bei besonders starkem Kleinwuchs auf EMA gescreent. Bezüglich des bekannten familiären Kleinwuchses wäre es interessant alle Familienmitglieder auf DQ2/DQ8 zu untersuchen.

3.4.6 Negativ für DQ2 (DQA1*0501 - DQB1*0201) & DQ8 (DQA1*0301 - DQB1*0302)

Ingesamt 7 Patienten, wovon 2 (29%) männlich und 5 (71%) weiblich waren, wurden analysiert. Das Verhältnis EMA positiv zu EMA negativ betrug 3/4 = 36%. Eine klassische Präsentationsform wiesen 4 (57%) der Patienten auf, eine subklinische hingegen 3 (43%). Bezüglich der Zottenatrophie hatten bei den DQ2 und DQ8 negativen 4 (57%) Patienten eine SVA und 3 (43%) eine PVA. Die Größenperzentile betrug durchschnittlich 23 bei einer Gewichtsperzentilen von 23. Das Alter beim Auftreten der Erstsymptomatik lag bei durchschnittlich 1209 Tagen ($3^{4/12}$ J). Das Alter zum Zeitpunkt der Dünndarmbiopsie hingegen durchschnittlich bei 1361 Tagen ($3^{9/12}$ J). Der daraus resultierende Intervall zwischen Erstsymptomatik und gesicherter Diagnose mittels Biopsie also auf 152 Tage.

Bei dieser Gruppe war eine Einzelanalyse von besonderem Interesse

Pat.Nr	Geschlecht	Patho-Status	Klinisches Bild	EMA	Besonderheiten
34	m	PVA	klassische Zöliakie	pos.	
46	w	TVA	klassische Zöliakie	neg.	
72	w	SVA	atypische Zöliakie	neg.	Pat. war zu klein, durch Verdacht erfasst und biopsiert.
74	w	SVA	klassische Zöliakie	pos.	Mutter hat Zöliakie
81	w	PVA	atypische Zöliakie	neg.	Enteropathie mit starker psych. Belastung in Familie
90	w	TVA	klassische Zöliakie	pos.	
91	m	PVA	atypische Zöliakie	pos.	Pat. war zu klein, durch Routine-screening auf EMA erfasst und biopsiert. In der Familie ist congenitaler Kleinwuchs bekannt.

ERGEBNISSE

Pat.Nr.	HLA-DQA1	HLA-DQB1
34	HLA-DQA1*0103/*0201	HLA-DQB1* 0201 /*06
46	HLA-DQA1*0104/*0201	HLA-DQB1* 0201 /*05
72	HLA-DQA1*0201/*0401	HLA-DQB1* 0201 /*03
74	HLA-DQA1*0102/* 0501	HLA-DQB1*03/*06
81	HLA-DQA1*0103/* 0501	HLA-DQB1*0103/* 0501
90	HLA-DQA1*0102/* 0501	HLA-DQB1*06/*06
91	HLA-DQA1*0103/* 0501	HLA-DQB1*03/*05

Um einen eventuellen systemischen Fehler auszuschließen wurden diese DQ2 und DQ8 negativen Patienten noch einmal erneut typisiert. Diese zusätzliche Kontrolle bestätigte allerdings das Ergebnis der ersten Typisierung. Die obige Tabelle zeigt die jeweilige HLA-DQ Typisierung dieser 7 Patienten. Es ist zu erkennen, dass alle 7 Patienten zumindest ein Allel des DQ2-Heterodimers aufwiesen. Diese Beobachtung ist auch in der Studie von Pena¹²⁰ beschrieben. Die oben aufgeführten 7 Patienten wiesen somit klinisch und bioptisch eine Zöliakie auf, waren aber definitiv DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) und DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8) negativ. Drei der DQ2 und DQ8 negativen Patienten waren für EMA negativ, wiesen aber keinen IgA-Mangel auf. Die Daten bezüglich des EMA-Status sind retrospektiv, weswegen ein eventueller falsch negativer Wert nicht ausgeschlossen werden konnte.

Des Weiteren bestand bei den 7 oben genannten Patienten die Möglichkeit, dass ihre Dünndarmbiopsie bei der pathologischen Untersuchung als falsch positiv für Zöliakie diagnostiziert wurde. Heute werden alle Biopsate standardmäßig anhand der Marshkriterien¹⁰⁰ (s. auch Tabelle 12 im Anhang) in spezialisierten Labors untersucht. Da diese Kriterien erst in den letzten Jahren eingeführt wurden bestand die Möglichkeit, dass ältere Biopsien als falsch positiv gewertet wurden.

Der ausführlichen Diskussion eines negativen HLA-DQ2 und DQ8 Status bei Patienten mit bioptisch gesicherter Zöliakie ist unter 4.4 ein eigenes Kapitel gewidmet.

3.4.7 Geschwisteruntersuchung

Bei genetischen Studien ist die Validierung von Geschwistern bezüglich Genetik und Klinik immer von besonderem Interesse. In der Studie wurden insgesamt 8 Geschwisterpaare untersucht, wovon bei 6 Geschwisterpaaren der HLA-Status rein routinemäßig erhoben wurde, da ein Geschwister an Zöliakie erkrankt war. Die 6 kongruenten Geschwister des jeweiligen Paares wiesen allerdings keinerlei Symptome auf, waren EMA negativ und erfüllten dahingehend nicht die Auswahlkriterien der vorgelegten Studie.

Die verbleibenden 2 Geschwisterpaare erfüllten hingegen die definierten Studienkriterien und wurden somit in die Studie aufgenommen.

Paar 1:

Es handelte sich um Patientin Nr.69 und Patientin Nr.70. Beide Geschwister zeigten die typische Klinik einer atypischen Zöliakie in Form eines extremen Minderwuchses (Größenperzentile und Gewichtsperzentile war bei beiden 3 am Tag der Biopsie). Die Mädchen hatten einen Altersunterschied von 5 Jahren, als das jüngere von beiden ebenfalls ein retardiertes Wachstum aufwies, veranlasste der behandelnde Arzt ein Screening auf EMA, welches bei beiden negativ ausfiel. Die Dünndarmbiopsie hingegen zeigte bei beiden Patientinnen, mit atypischer Zöliakie, eine SVA. Die Untersuchung der Seren hinsichtlich DQA und DQB zeigte bei

Nr.69:	DQA1*0201/*0501 – DQB1*0201/*0301
und bei Patientin Nr.70:	DQA1*0104/*0501 – DQB1*0201/*0301

Der Vater der beiden Mädchen war ebenfalls an einer bekannten Sprue erkrankt.

Paar 2:

Es handelte sich um Patientin Nr.83 und Patientin Nr.84, einem monozygoten Zwillingsspaar. Ein Geschwister zeigte die typische Klinik einer klassischen Zöliakie in Verbindung mit einem retardierten Wachstum. Das andere Mädchen die einer atypischen Zöliakie, in Form eines Minderwuchses. (Größenperzentile bei beiden 25, und Gewichtspersentile bei beiden 10 am Tag der Biopsie). Bei beiden Zwillingen war die EMA positiv. Die Dünndarmbiopsie zeigte bei beiden Patientinnen eine PVA. Die Untersuchung der Seren hinsichtlich DQA und DQB

zeigte bei Nr.83: DQA1*0102/*0501 – DQB1*0201/*06
und bei Patientin Nr.84: DQA1*0102/*0501 – DQB1*0201/*06.

4 Diskussion

Im klinischen Erscheinungsbild der Zöliakie hat sich ein epidemiologischer Wandel vollzogen (vgl. 1.2.3). Wurde vormals überwiegend das klassische Erscheinungsbild der Zöliakie beschrieben, so beobachtet man heute immer mehr Patienten mit den silenten Präsentationsformen der Zöliakie.

Dies hat allerdings weniger mit einem Wandel der Krankheit per se zu tun, als viel mehr mit der verbesserten Diagnostik — nicht zuletzt dank der Fortschritte auf dem Gebiet der Screeningmethoden.

Mit jeder Neuerung hinsichtlich der Diagnostik, wie zum Beispiel den serologischen Antikörpertests gegen Gliadin und Endomysium, stieg die Prävalenz der Zöliakie^{89, 37, 158}. Davidson³⁰ führte 1950 die erste epidemiologische Zöliakiestudie in Großbritannien durch und postulierte eine Prävalenz von 1:8000. Zu dieser Zeit steckte die Zöliakieforschung noch in den Kinderschuhen und es wurden nur Fälle dokumentiert, welche die klassischen Symptome der Zöliakie aufzeigten. Catassi¹⁶ führte 1999 mittels neuer serologischer Untersuchungsmethoden die bis dato umfassendste Screening-Studie Europas durch. Aus allen Regionen Italiens wurden 17 201 Schulkinder im Alter zwischen sechs und 15 Jahren untersucht. Dies entsprach 69% der in Frage kommenden Population. Die Prävalenz war 1:184 und das Verhältnis zwischen undiagnostizierter und diagnostizierter Zöliakie betrug beeindruckende 7:1¹⁶. Diese Zahlen sprechen für sich.

Das familiär gehäufte Vorkommen von Zöliakie erhärtete den Verdacht, dass zwischen gewissen genetischen Risikofaktoren und der Klinik der Zöliakie ein nicht von der Hand zu weisender pathogenetischer Einfluss besteht. Mearin¹⁰² zeigte 1984 eine Korrelation zwischen HLA-DR Antigenen und der Serumkonzentration von IgA-AGA. Dies war der initiale Startschuss für eine Anzahl von Genom-Studien mit dem beständigen Ziel, ein für die Pathogenese der Zöliakie spezifisches HLA-Molekül zu analysieren, um so potentiell an

Zöliakie erkrankte Patienten zu identifizieren und noch vor Manifestation derselben zu therapieren.

Die vorgelegte Studie möchte mit HLA- Untersuchungen, einen kleinen Teil zum Verständnis der komplexen Genetik der Zöliakie beitragen.

4.1 HLA - DQ2 & DQ8 Status

4.1.1 HLA - DQ2 & DQ8 als genetische Risikofaktoren für Zöliakie — eine pathogenetische Retrospektive

Die genetischen Risikofaktoren für die Manifestation der Zöliakie sind heute unumstritten. Auf Familienstudien basierend waren McDonald et al.¹⁰¹ die ersten, welche eine autosomale dominante Vererbung der Erkrankung mit inkompletter Penetranz vermuteten. Sie stützten ihre These auf eine gehäufte Inzidenz von Zöliakie in speziellen Familien. Neuere Studien untermauern diese Vermutung und verdeutlichen die starke genetische Komponente in Bezug auf die Pathogenese der Zöliakie. So beträgt das relative Risiko für Geschwister eines an Zöliakie erkrankten Patienten (λ_S) 20%^{123, 12} und die Konkordanz zwischen monozygoten Zwillingen bis zu 75%⁵¹.

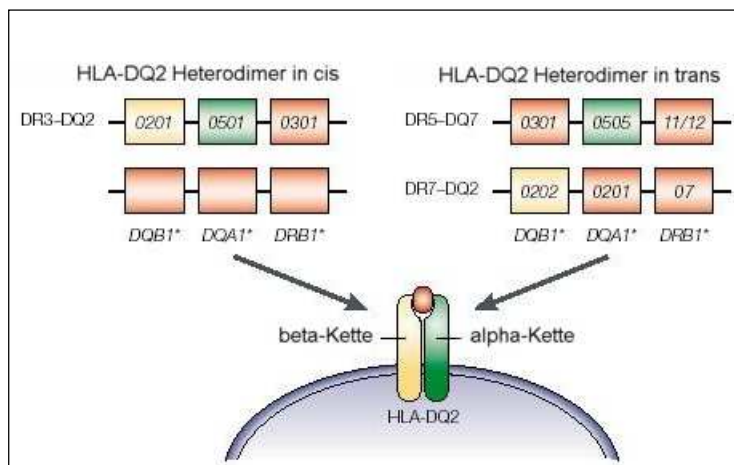
Die primäre genetische Assoziation der Zöliakie besteht mit dem HLA-Antigen DQ2 (DQA1*05/DQB1*02). Dieser Typ wird bei bis zu 95%¹⁴¹ der Patienten nachgewiesen. Die verbleibenden Individuen weisen größtenteils das HLA-Antigen DQ8 auf (DQA1*0301/DQB1*0302)¹⁴⁶. Eine ausführliche Auflistung der vorangegangenen Studien bezüglich der Prävalenz von Zöliakie und HLA-DQ2 zeigt *Tabelle 22*.

Die meisten Zöliakiepatienten tragen entweder einen HLA-DR3-DQ2 Haplotypen (den DRB1*0301 – DQA1*0501 / DQB1*0201 Haplotypen) oder aber sie sind DR5 – DQ7 und DR7 – DQ2 Heterozygot (das heißt sie haben den DRB1*11/12 – DQA1*0505 / DQB1*0301 und DRB1*07 – DQA1*0201 / DQB1*0202 Haplotypen.)^{103, 154, 153}.

Die DQ α -Kette der DQA1*0501 oder DQA1*0505 Allele unterscheidet sich lediglich im Eton 1, die für das Peptid kodiert.¹⁴⁶ Die DQ β -Ketten der Dimere hingegen werden entweder von DQB1*0201 oder DQB1*0202 kodiert, welche

sich ebenfalls nur durch eine Base in der Zellmembran nahe gelegenen Domäne unterscheiden¹⁴⁶. Laut Sollid ist es sehr unwahrscheinlich, dass diese Unterschiede irgendwelche funktionellen Konsequenzen für das Molekül, und somit keine pathogenetische Relevanz für die Entstehung der Zöliakie, haben¹⁴⁶. Zöliakiepatienten, welche diese DR-DQ-Haplotyp Kombinationen besitzen, können dasselbe funktionelle DQ-Molekül auf der Zelloberfläche exprimieren, da dieses entweder von Genen in cis (DQA1*0501 / DQB1*0201 des HLA-DR3 Haplotypen) oder in trans (DQA1*0505 / DQB1*0202 der HLA-DR5, DR7 Haplotypen) exprimierbar ist¹⁴⁷. Dies veranschaulicht auch *Abbildung 24*.

Abb.24: *HLA Assoziation bei der Zöliakie*¹⁴⁶.



Die meisten Zöliakiepatienten exprimieren das HLA-DQ2 Heterodimer (DQA1*05-DQB1*02). Dieses HLA Molekül ist entweder in cis kodiert, bei Menschen, die den DR3-DQ2 Haplotyp aufweisen, oder in trans, bei Individuen, welche DR5-DQ7 und DR7-DQ2 heterozygot sind¹⁴⁶.

Halstensen⁵⁶ et al. zeigten mit in vitro Experimenten eine Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen der Lamina propria durch Gluten in den Dünndarmbiopsien behandelter Zöliakiepatienten, nicht aber in denen gesunder Probanden⁵⁶. Diese $\alpha\beta$ T-Zellrezeptor (TCR) exprimierenden T-Zellen wurden isoliert und kultiviert. Eine Schlüsselbeobachtung war, dass diese T-Zellen spezifisch Glutenpeptide erkannten, die von HLA-DQ2, - bzw. DQ8- Molekülen präsentiert wurden^{93, 94}. Es zeigte sich, dass die beiden HLA-Moleküle DQ2 und DQ8, bevorzugt Peptide mit negativen Ladungen in ihren Bindungstaschen anlagerten¹⁴⁶, wobei für HLA-DQ2 die Positionen P4, P6, P7^{67, 156}, und für HLA-DQ8 die Positionen P1, P4, P9^{46, 85} der Peptide wichtige Ankeraminosäuren darstellen. Allerdings enthielten die untersuchten Glutenpeptide überwiegend positive Ladungen in den genannten Positionen. Sjöström lieferte daraufhin einen weiteren

entscheidenden Baustein für das Verständnis der Bedeutung dieser Peptide in der Pathogenese der Zöliakie. Er bewies, dass T-Zellen von Zöliakiepatienten überwiegend deamidierte Glutenpeptide erkannten¹⁴⁴. Verantwortlich hierfür ist das Enzym tTG. Molberg¹⁰⁷ et al. haben in immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt, dass bei Zöliakie dieses Enzym in großen Mengen sowohl im Bürstensaumepithel des Darms, als auch in der subepithelialen Region vorhanden ist. Bei der durch tTG katalysierten Reaktion wird das Gluten deamidiert und dadurch negativ geladen. Deamidierte Glutenpeptide können somit bevorzugt an HLA DQ2,- bzw. DQ8-Rezeptoren gebunden und T-Zellen präsentiert werden^{107, 144, 146}.

4.1.2 Allelfrequenzverteilung

Bei jeder Genomstudie ist es von essentieller Bedeutung, die Allelverteilung in der jeweiligen untersuchten Gesamtpopulation zu kennen, da zwischen den einzelnen ethnischen Gruppen, und selbst interregionär, starke Differenzen in den jeweiligen Allelfrequenzen vorliegen. Im Rahmen von weltweiten Screeninguntersuchungen wurde in zahlreichen Studien^{9, 50, 126, 61, 16} die Allelfrequenzverteilung untersucht, welche unter www.allelfrequencies.net dargestellt wird. Da DQ2 und DQ8 in den meisten HLA-Datenbanken nicht routinemäßig erfasst wurden, liegen diesbezüglich für die mitteleuropäische, kaukasoide Population nur sehr marginale Daten vor. Um unsere Studie systematisch zu strukturieren war es daher notwendig, die Allelfrequenzen unserer beiden Kollektive mit denen der kaukasoiden Gesamtpopulation zu vergleichen. Daher benutzen wir für die unter 3.1 aufgeführte Analyse der Allelverteilung, sowie für die unter 3.3. aufgeführte statistische Analyse, eine 2003 publizierte Kontrollgruppe mit 236 kaukasoiden Probanden¹²⁰. Es wurden die gleichen Studienkriterien angewendet wie in der vorliegenden Arbeit, das heißt bei allen Individuen wurde nach den Richtlinien der ESPGHAN eine Zöliakie ausgeschlossen und alle Probanden wurden mittels PCR-SSP HLA-typisiert¹⁶⁵.

Anhand der unter 3.1 gezeigten DQA1 / DQB1-Allelfrequenzverteilung war deutlich zu erkennen, dass bezüglich der einzelnen Allele zwischen dem Patientenkollektiv, dem Kontrollgruppenkollektiv und der kaukasoiden Gesamtpopulation, signifikante Differenzen bestanden. Dies ist am eindruckvollsten anhand der Abbildungen 22 und 23. zu erkennen.

Folgende Allele waren bei den untersuchten Zöliakiepatienten deutlich geringer ausgeprägt:

- DQA1*0101 - 11,5 %
- DQA1*0102 - 12,6 %
- DQA1*0103 - 5,2 %
- DQA1*0301 - 4,6 %
- DQB1*03 - 7,1 %

Folgende Allele waren bei den untersuchten Zöliakiepatienten deutlich stärker ausgeprägt:

- DQA1*0201 +13,2 %
- DQA1*0501 + 23,8 %
- DQB1*0201 + 29,8%

Die Allele DQA1*0201, DQA1*0501, DQB1*0201 und DQB1*0301 waren in unserem Patientenkollektiv gegenüber der gesunden Kontrollgruppe statistisch signifikant erhöht.

DQA1*0201	RR: 1,881	KI 95%: 1,164 – 3,039.
DQA1*0501	RR: 2,450	KI 95%: 1,660 – 3,616
DQB1*0201	RR: 3,151	KI 95%: 2,114 – 4,695.
DQB1*0301	RR: 1,884	KI 95%: 1,241 – 2,860

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Pena und Quintana¹²⁰, welche 118 an Zöliakie erkrankte spanische Patienten auf ihren HLA-Typ untersuchten.

DQA1*0201	RR: 1,88	KI 95%: 1,25 – 2,82.
DQA1*0501	RR: 2,00	KI 95%: 2,16 – 4,14
DQB1*0201	RR: 7,60	KI 95%: 5,35 – 10,78
DQB1*0301	RR: 0,66	KI 95%: 0,43 – 1,00

Die meisten Zöliakiepatienten tragen entweder einen HLA-DR3-DQ2 Haplotypen (den DRB1*0301 – DQA1*0501 / DQB1*0201 Haplotypen) oder aber sie sind DR5 – DQ7 und DR7 – DQ2 Heterozygot (das heißt sie haben den DRB1*11/12 – DQA1*0505 / DQB1*0301 und DRB1*07 – DQA1*0201 / DQB1*0202 Haplotypen.)^{103, 154, 153}.

Die Allele DQA1*0501 und DQB1 *0201 sind die beiden Bausteine aus denen das HLA-DQ2 Heterodimer besteht. Dies erklärte, warum diese beiden Allele bei den Probanden vermehrt vertreten waren. Aus vorhergehenden Genomstudien von Catassi^{18, 19} war bekannt, dass zwischen dem DQA1*0501 - DQB1*0201 und dem DQA1*0201 - DQB*0202 Haplotypen ein starkes Kopplungsungleichgewicht bestand. Diese Feststellung war mit unseren Beobachtungen kongruent und erklärte das mit 13,2 % gehäufte Vorkommen von DQA1*0201. Dies bestätigte auch die Feststellung, dass bei dem Patientenkollektiv auf dem α -Lokus die Allelkombinationen von DQA1*0501 mit 94 % eindeutig überwog. (DQA1*0501/DQA1*0201 (38%), DQA1*0501/DQA1*0102 (20,2%)).

Vereinzelte Schwankungen zwischen der kaukasoiden Gesamtpopulation und unserem Kontrollgruppenkollektiv erklärten wir uns mit der diesbezüglichen Gruppengröße von 26 Probanden, da diese somit nur als bedingt repräsentativ betrachtet werden konnte.

Sollid¹⁴⁶ erachtet Zöliakie als eine Erkrankung mit autoimmunogenem Hintergrund. Diese Krankheiten besitzen typischerweise eine multifaktorielle Ätiologie, zu denen sowohl umweltbedingte Komponenten als auch diverse genetische Faktoren gehören — einschließlich der HLA-Gene.

Diese Annahme untermauerten Catassi^{16, 17} und Greco^{50, 51} in vergleichenden, epidemiologischen Studien. Sie zeigten, dass in Populationen mit einer gesteigerten Frequenz von DQA1*0501 und DQB1*0201 auch eine gesteigerte Prävalenz von Zöliakie beobachtet werden konnte.

Dieser Aussage konnten wir uns mit der hier vorgelegten Studie anschließen.

4.1.3 Allelkopplungen von DQA1 und DQB1

Allele können als die einzelnen Bausteine der makromolekulären Proteine erachtet werden. Bei den HLA-DQ Proteinen handelt es sich um Heterodimere, entscheidend für die molekularbiologische Diagnose der Zöliakie sind daher weniger die zuvor betrachteten einzelnen Allelfrequenzen von DQA1 und DQB1, als vielmehr deren Kombination. Die jeweiligen Ergebnisse bezüglich der einzelnen DQA1 / DQB1 Frequenzen, sowie deren Kombination, sind in den *Tabellen 17 und 18* sowie unter 3.2 dargestellt.

Beim Vergleich des Patientenkollektives mit dem des Kontrollgruppenkollektives konnte man im Bereich der einzelnen Allelfrequenzen (*siehe Abb. 22 und 23*) und der Kombination der einzelnen Allele auf dem DQA1-Lokus bzw. DQB1-Lokus, eine signifikante Diskrepanz erkennen.

Bei dem Patientenkollektiv überwog auf dem α -Lokus eindeutig die Assoziation zu DQA1*0501. Insgesamt waren 94 % (65 Patienten) für DQA1*0501 positiv. Die frequentesten Kombinationen waren DQA1*0501/DQA1*0201 mit 38% (26 Patienten) und DQA1*0501/DQA1*0102 mit 20,2% (14 Patienten).

Beim Kontrollgruppenkollektiv hingegen ergab sich ein völlig anderes Bild. Trotz kleinerer Gruppengröße ergab sich ein viel breiteres Spektrum an Allelkombinationen, wobei DQA1*0102/DQA1*0201 mit 20,8% (5 Probanden) und DQA1*0501/DQA1*0102 mit 16% (4 Patienten) die häufigsten waren. DQA1*0501 positiv waren gerade mal 25% (7 Probanden).

Auf dem β -Lokus ergab sich ein ähnliches Bild. Die Allelkombination DQB1*0201/DQB1*03 war mit 65,2% (49 Patienten) im Patientenkollektiv doppelt so häufig vertreten wie in der Kontrollgruppe 33% (9 Probanden). Das Gleiche galt für DQB1*0201 mit 94% positiven (65) Patienten, im Vergleich zu 45% (12) in der Probandengruppe.

Bezüglich der Prävalenz von DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2), in einer mitteleuropäischen kaukasoiden Gesamtpopulation gab es in der Literatur recht genaue Angaben. Für den mitteleuropäischen Raum ergab sich ein Spektrum von 19,4 %⁵⁵ – 21,2 %^{16, 51}, was darauf zurückzuführen war, dass die Studien in unterschiedlichen europäischen Ländern durchgeführt wurden, mit einer gewissen dahingehenden Diskrepanz. Für die Auswertung der Allelverteilung, sowie für die unter 3.3. aufgeführte statistische Analyse, benutzten wir eine 2003 publizierte Kontrollgruppe mit 236 kaukasoiden Probanden¹²⁰. Es wurden die gleichen Studienkriterien angewendet wie in der vorliegenden Arbeit, das heißt bei allen Individuen wurde nach den Richtlinien der ESPGHAN eine Zöliakie ausgeschlossen und alle Probanden wurden mittels PCR-SSP HLA-typisiert¹²⁰.

Für DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8) hingegen lagen keine publizierten Werte vor. Für die Prävalenz von DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8) in einer mitteleuropäischen Gesamtpopulation bezogen wir uns diesbezüglich auf die von Dr. Enczmann geleitete Knochenmarkspenderdatei³⁵ von NRW. Es wurden alle in Deutschland wohnenden Spender ausgewählt, bei denen eine hochauflösende DQA1- und DQB1-Typisierung vorlag (n=4067). Siehe hierzu auch 3.2.1 Demnach liegt die Prävalenz für DQ2 in der Gesamtpopulation in Deutschland bei 20,7 % und für DQ8 bei 9,1%.

Von den insgesamt 69 analysierten Patienten dieser Studie waren 2 für **DQ2 DQA1*0501/DQB1*0201 Homozygot (2,9%)** und 58 **Heterozygot (84,1%)**. Insgesamt waren somit 60 von 69 Patienten für DQ2 positiv, was **DQ2= 87%** entsprach. Von den insgesamt 26 Probanden des Kontrollgruppenkollektives waren insgesamt 5 DQ2 positiv (19,2%), was der Prävalenz in einer kaukasoiden mitteleuropäischen Gesamtpopulation mit 20,7% recht nahe kam.

Vier unserer Patienten waren für **DQA1*0301-DQB1*0302 (DQ8)** Heterozygot, was **DQ8 = 5,8%** entsprach, im Kontrollgruppenkollektiv lediglich einer (3,8%). Von den 4 DQ8 positiven Patienten waren 2 für DQ2 und DQ8 heterozygot, **DQ2 + DQ8 = 2,9%**.

Man hätte nun argumentieren können, dass die Prävalenz für DQ8 im Patientenkollektiv mit 5,8 % deutlich unter dem der Gesamtpopulation mit 9,1% lag. Dies mochte auf den ersten Blick stimmen, jedoch relativierte sich dieses, wenn man es in absoluten Zahlen betrachtete (lediglich 2 Patienten). Wenn 87% der Patienten bereits für DQ2 positiv waren, so war die Wahrscheinlichkeit auf eine hohe Prävalenz von DQ8 verständlicherweise eher gering, was sich auch mit der Argumentation von Ploski¹²⁶ und Houlston⁶¹ deckte. In der Kontrollgruppe waren lediglich 3,8% für DQ8 positiv, was sich mit der diesbezüglichen Gruppengröße von 26 Probanden erklären ließ, die nur als bedingt repräsentativ erachtet werden konnte.

Insgesamt waren 90,2 % der Patientengruppe für DQ2 + DQ8 positiv.

In Studien von Sollid¹⁴⁵, Congia²³, Ploski¹²⁶, Polvi^{129, 128}, Houlston⁶¹ und Michalski¹⁰⁵ wurden in verschiedenen europäischen Ländern bezüglich des DQ2 / DQ8 Status bei Zöliakiepatienten bereits vergleichende Untersuchungen betrieben, jedoch nicht in Deutschland.

Die DQ2 / DQ8 Frequenz bei an Zöliakie erkrankten Patienten lag bei diesen Studien zwischen 84% und 99%. Wir befinden uns mit unseren 90,2% bezüglich DQ2 / DQ8 also im Mittelfeld dieser Studien.

Eine ausführliche Auflistung der Prävalenz von Zöliakie basierend auf epidemiologischen Screening-Studien in unterschiedlichen Ländern zeigt *Tabelle 22* im Anhang.

Lediglich 7 der 69 Patienten waren für **DQ2 / DQ8 negativ = 9,8%**, wobei alle der negativen Patienten zumindest ein mit Zöliakie assoziiertes DQα1/DQβ1 Allel trugen, jedoch nicht die zwingende Kombination, siehe *Tabelle 18*.

4.2 Retrospektive Validierung der Klinik in Relation zu der genetischen Analyse

Ein wesentliches Ziel der vorgelegten Studie war die Korrelation der retrospektiv gewonnenen klinischen Parameter mit den neu analysierten, spezifischen HLA-DQ2/DQ8-Status und einer dahingehenden Validierung.

Grundlage der vorliegenden Diskussion waren die bereits im Ergebnisteil vorgestellten *Tabellen 20 und 21*.

Ausgehend von der klinischen Präsentationsform wurde das Patientenkollektiv hierzu anhand der Marsh-Kriterien¹⁰⁰ in einzelne Subgruppen unterteilt. Die retrospektiv erhobenen klinischen Parameter des Patientenkollektives entstammen dem Zöliakiezentrum der Universitätskinderklinik Tübingen.

Insgesamt 69 Patienten, wovon 23 (33%) männlich und 46 (67%) weiblich waren, wurden analysiert. Diese Art der Geschlechtsverteilung mit 1/3 männlich und 2/3 weiblich korrelierte mit anderen, bereits vorgelegten Studien von Fasano³⁷, Greco⁵¹ oder Catassi¹⁶.

Eine klassische Präsentationsform wiesen 52 (75%) der Patienten auf, eine subklinische hingegen 17 (25%). Bezüglich der Zottenatrophie hatten im Patientenkollektiv 61 (88%) Patienten eine SVA und lediglich 8 (12%) eine PVA.

Betrachten wir zunächst die klassische Präsentationsform mit 35 (67%) weiblichen und 17 (33%) männlichen Patienten. Bei beiden Geschlechtern fiel auf, dass die Patienten mit einer ausgeprägten Zottenatrophie (TVA/SVA) wesentlich frequenter waren, als diejenigen mit einer eher blanden Biopsie (PVA). Bei den weiblichen Patienten mit einem Verhältnis von $32/3 = 10,6$ und bei den männlichen Zöliakieerkrankten mit $16/1 = 16$.

Diese Relationen zeigten, dass bei den männlichen Patienten mit klassischer Zöliakie auch eine mehrheitlich schwerwiegende Atrophie vorzufinden war. Nicht jedoch in diesem Maße bei den Patientinnen, was im Umkehrschluss bedeutete, dass die ausgeprägten klinischen Symptome bei den weiblichen Zöliakiepatienten weniger mit der Zottenatrophie per se korrelieren. Balais⁷ und Greco⁵¹ kamen bei ihren Studien zu ähnlichen Ansichten. Mädchen erkrankten demnach zwar doppelt so häufig an Zöliakie wie Jungen, jedoch wiesen diese zum Zeitpunkt der Biopsie eine verstärkte Zottenatrophie auf (siehe auch *Tabelle 12*, sowie Marsh-Kriterien¹⁰⁰).

EMA war bei den Patientinnen mit SVA/TVA mit 23/9 = 2,5 positiv, bei den männlichen Patienten mit TVA/SVA hingegen mit 11/5 = 2,2. Bei den Patienten mit der klassischen Präsentationsform wiesen also 28% bzw. 31% der Patienten trotz nachgewiesener Biopsie ein negatives EMA auf. Von allen 69 Patienten waren lediglich 71% EMA positiv.

Anhand dieses Resultats muss man die Aussagekraft der EMA bezüglich Zöliakie gründlich abwägen, insbesondere bei der subklinischen Form, wo die Ergebnisse noch gravierender waren, hier herrschte ein nahezu ausgeglichenes Ergebnis zwischen EMA positiven und EMA negativen Patienten.

Dies überraschte, zeichnet sich EMA nach Mäki⁹⁵ doch gerade durch eine Sensitivität von 89% - 100% aus. Doch muss man sich bei dem zu Grunde liegenden Patientenkollektiv vor Augen halten, dass die retrospektiv gewonnenen Daten aus den letzten 12 Jahren stammen. So ergaben sich für einen eventuellen falsch negativen EMA-Status folgende Ansatzpunkte:

- Viele Patienten stammten aus peripheren Häusern mit unterschiedlichen Laboren, Diagnostika und diesbezügliche Kriterien, so waren insbesondere ältere Ergebnisse bezüglich einer Fehldiagnose kritisch zu betrachten und somit eingeschränkt aussagefähig.
- Drei der Patienten hatten einen bekannten IgA-Mangel und zeigten somit einen negativen EMA-Status bei positiver Biopsie.

- Die Daten wurden bei der Erstaufnahme der Patienten ins Tübinger Zöliakiezentrum erhoben und somit nicht unbedingt zum Zeitpunkt der Biopsie. Insbesondere ältere Ergebnisse sind dahingehend kritisch zu betrachten, da zwischen dem initial negativen EMA-Test und der Biopsie oft Jahre liegen konnten. Es ist möglich, dass ein Patient welcher initial EMA negativ war, über Jahre vom Tübinger Zöliakiezentrum betreut wurde. Während dieser Zeit ist die Zöliakie fortgeschritten und zeigt sich in der Biopsie anhand einer TVA / SVA entsprechend Marsh 3b / 3c. Bei diesen Patienten wäre es äußerst aufschlussreich vor der Therapie den EMA-Status zu wiederholen und diesen somit zu validieren.

4.2.1 Korrelation zwischen HLA-Status und Schweregrad der Klinik

Im Laufe der Studie kristallisierte sich mehr und mehr die Frage heraus, ob es Patienten mit einem anhand des HLA-Status verifizierbaren genetisch erhöhten Risikos gab an Zöliakie zu erkranken. Wir stellten uns die Frage, ob eine Korrelation zwischen HLA-Status (Homozygotie / Heterozygotie) und Schweregrad der Klinik existierte. Aus anderen mit dem HLA-Komplex in Verbindung stehenden Erkrankungen waren solche Studien bekannt^{78, 80, 79, 109}. Als Patienten mit einem genetisch erhöhten Risiko betrachteten wir jene, welche DQA1*0501 - DQB1*0201 DQ2-Homozygot, DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8) oder DQ2 & DQ8 positiv waren. All diese Patienten hätten genetisch gesehen eine Prädisposition verstärkt an Zöliakie zu erkranken, wovon auch Sollid¹⁴⁶ und Greco⁵¹ ausgingen.

Von den 48 Zöliakiepatienten mit klassischer Präsentationsform und mit gesicherter SVA/TVA, waren 2 DQ2 Homozygot, 40 DQ2 Heterozygot, 3 DQ8 positiv und einer DQ2 und DQ8 positiv. Die Patienten mit einer PVA waren lediglich DQ2 Heterozygot.

Von den 17 Zöliakiepatienten mit einer subklinischen Präsentationsform und mit gesicherter SVA/TVA, waren 13 DQ2 Heterozygot, 1 war DQ8 positiv und keiner war DQ2 Homozygot. Von den 3 Patienten mit einer PVA war einer DQ2 Heterozygot und die anderen beiden DQ2/DQ8 negativ.

Alle Patienten mit einem erhöhten genetischen Risiko wiesen eine klassische Präsentationsform auf, mit auffallend ausgeprägter Zottenatrophie. Dies bedeutete, dass Patienten welche DQA1*0501 - DQB1*0201 DQ2-Homozygot, DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8) oder DQ2 & DQ8 positiv waren ein ungemein erhöhtes Risiko hatten an einer klassischen Zöliakie mit SVA/TVA zu erkranken, als an einer eher subklinischen Form.

Von besonderem Augenmerk waren auch der Zeitpunkt der Erstsymptomatik und das Intervall zwischen derselben und der intestinalen Biopsie. Die Hypothese hinter dieser Betrachtung war, dass das Alter beim Auftreten der Erstsymptomatik mit dem DQ-Status umgekehrt positiv korreliert. Dies bedeutete konkret, dass ein DQ-Status mit erhöhtem Risiko zu einer früheren Zottenatrophie führt, mit einer damit früher assoziierten Erstsymptomatik. Ein weiterer Aspekt in diesem Zusammenhang war der des Intervalls zwischen Erstsymptomatik und intestinaler Biopsie mittels Watson-Kapsel¹⁴³. Ein erhöhtes genetisches Risiko mit einer dahingehenden früheren Zottenatrophie bedingte eine stärkere Erstsymptomatik⁹⁶ mit daraus resultierender beschleunigter Indikation zur Dünndarmbiopsie^{16, 146, 130}.

Die Ergebnisse unserer Studie bestätigten diese Hypothese. Wie bereits unter 3.4 und in *Tabelle 21* gezeigt, sprechen die Zahlen für sich. Bei den Patienten mit einem erhöhten genetischen Risiko war die Präsentationsform durchweg klassisch. Die Biopsie mittels Watson-Kapsel¹⁴³ und Klassifikation anhand der Marsh-Kriterien¹⁰⁰ (*siehe auch Tabelle 12*) durchweg zumindest Marsh 3b / SVA. Das Intervall zwischen Symptomausbruch und Biopsie war mit 23 Tagen (DQ2/DQ2), 78 Tagen (DQ8), 24 Tagen (DQ2 & DQ8), entschieden geringer als bei den DQ2 Heterozygoten mit 370 Tagen. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Betrachtung der Größenperzentile und der Gewichts-perzentilen, wobei alle Patienten mit risikoreicherem HLA-Status unter den Vergleichsdaten der DQ2 Heterozygoten lagen.

Bei der vergleichenden Betrachtung der Zöliakiepatienten, welche ein genetisch erhöhtes Risiko aufwiesen, mit jenen welche DQ2 Heterozygot waren, gab es interessante Resultate. Sie zeigten das klassische Bild, mit schwerer Zottenatrophie, erkrankten allesamt früher, zeigten ein perzentil retardiertes Wachstum und wurden interessanterweise schneller diagnostiziert.

Die statistische Analyse des HLA DQA1*0501 - DQB1*0201 (**DQ2**) Heterodimer in den einzelnen bioptisch definierten Gruppen untermauerte unsere Hypothese ebenfalls. Diese zeigte, dass das RR bei den HLA DQA1*0501 - DQB1*0201 (**DQ2**) positiven Patienten mit einer TVA gegenüber einem gesunden Kontrollgruppenkollektiv 20,952 betrug. Die HLA DQA1*0501 - DQB1*0201 (**DQ2**) positiven Patienten mit einer PVA hingegen, wiesen gegenüber einem gesunden Kontrollgruppenkollektiv jedoch ein wesentlich geringeres RR von lediglich 9,8421 auf.

Betrachtete man das gesamte Patientenkollektiv, so zeigte sich, dass das Relative Risiko für HLA DQA1*0501 - DQB1*0201 (**DQ2**) Heterodimer positive Individuen an Zöliakie zu erkranken mit RR 19,127 (KI 95% = 9,354 – 39,107) gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht war.

Je nach der zugrundeliegenden Verteilung von HLA-DQ2 in der jeweiligen ethnischen Gesamtpopulation unterliegt das RR an Zöliakie zu erkranken einem gewissen Schwankungsgrad. So kommt Sollid¹⁴⁵ in einer Studie aus Norwegen auf ein RR von 18,749 (KI 95% = 8,763 – 41,381), Congia²³ in einer sardinischen Studie auf ein RR von 21,02 (KI 95% = 6,854 – 37,438) und Houlston⁶¹ in einer britischen Studie auf ein RR von 17,653 (KI 95% = 9,103 – 34,761).

Bei der vorgelegten Studie durfte man jedoch die eingeschränkte Gruppengröße nicht aus den Augen verlieren, die daher nur als bedingt repräsentativ betrachtet werden konnte. Ein genetisch erhöhtes Risiko (DQA1*0501 - DQB1*0201 DQ2-Homozygot, DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8) oder DQ2 & DQ8 positiv) wiesen 24 % unserer Patienten auf, was immerhin ein Viertel aller Patienten war. Eine breit angelegte, internationale Multi-Center-Studie, wäre sicherlich ein sehr interessantes Projekt. Die einzelnen Ergebnisse verschiedener Zöliakiezentren könnten zu einer großen, repräsentativen Studie gebündelt werden. Ein so konzipiertes Studienprojekt mit einem größeren Kontingent an Patienten würde dazu beitragen, unsere Beobachtungen auf dem Gebiet eines mit einem erhöhten Risiko behafteten DQ-Status zu untermauern, um somit die Pathophysiologie der diversen Manifestationen der Zöliakie besser zu verstehen.

4.3 Stellenwert der HLA-DQ Typisierung hinsichtlich der serologischen und bioptischen Diagnostik

Kaum ein Thema hat in der pädiatrischen Gastroenterologie in der letzten Zeit für so viel Verwirrung gesorgt, wie jenes der HLA-Typisierung unter diagnostischen Gesichtspunkten.

Einzelne private labortechnische Institute werben unter dem Mantel der Kosteneffizienz und preisen ihre jeweiligen Dienstleistungen zum Wohle des Patienten an. In medizinischen Artikeln von Zimmer¹⁶⁷, Csizmadia²⁷ oder Kaukinen⁷³ wird das Thema jedoch scharf kontrovers diskutiert.

Die gültigen Empfehlungen der ESPGHAN¹⁶⁷ zur Zöliakiediagnostik bestehen aus 1. Symptomatik, 2. Zöliakie-Serologie, 3. Duodenalbiopsie und 4. Remission unter glutenfreier Ernährung. Die moderne HLA-Diagnostik bezüglich DQ wird in diesem Zusammenhang noch nicht berücksichtigt.

In Studien von Sollid¹⁴⁵, Congia²³, Ploski¹²⁶, Polvi^{129, 128}, Houlston⁶¹, Michalski¹⁰⁵ und Pena¹⁶³ wurden in verschiedenen europäischen Ländern, bezüglich des DQA1*0501 - DQB1*0201 (**DQ2**) / DQA1*0301 - DQB1*0302 (**DQ8**) Status bei Zöliakiepatienten, bereits vergleichende Studien betrieben. Aus diesen Studien ging hervor, dass die DQA1*0501 - DQB1*0201 (**DQ2**) / DQA1*0301 - DQB1*0302 (**DQ8**) Frequenz bei an Zöliakie erkrankten Patienten zwischen 84% und 99% lag. Eine ausführliche Auflistung der vorangegangenen Studien bezüglich der HLA-DQ2 / DQ8 Frequenzen zeigt *Tabelle 22*.

Einzelne private labortechnische Institute machen sich diese Arbeiten zu nutze und bieten Pädiatern und besorgten Patienten bzw. Eltern eine frühzeitige HLA-Diagnostik an, um so die individuelle, genetische Prädisposition zu evaluieren. Sie werben mit den offensichtlichen Vorteilen einer möglichst frühen HLA-Typisierung im Zusammenhang mit Zöliakie, als da wären:

- Analyse der genetischen Prädisposition für Zöliakie bei verdächtiger Symptomatik.
- beschleunigte Diagnostik mit dahingehend effizienterer Therapie.
- Vermeidung von Malabsorption, retardiertem Wachstum und mit Zöliakie assoziierten Sekundärerkrankungen.
- Wissenschaftliche Aspekte der DQ-Typisierung als Familienscreening mit neuen Einblicken bezüglich Genetik und multifaktorieller Ätiologie der Zöliakie.
- Vermeiden von Risiken, wie Sie bei der Dünndarmbiopsie mittels Watson-Kapsel¹⁴³ in Form von Narkoserisiko, Blutungen und Entzündungen bestehen.
- Kosteneinsparung.

Diese Argumente scheinen primär für sich zu sprechen, müssen jedoch kritisch betrachtet werden.

Die heute käuflich zu erwerbenden HLA-DQ Typisierungs-Kits besitzen eine Sensitivität von 98 % bei einer Spezifität von 98%^{73, 112}. Mit den propagierten Typisierungs-Kits reagieren also 2 % der potentiellen Zöliakiepatienten HLA-DQ falsch negativ. Aus den zuvor schon angesprochenen Studien von Sollid¹⁴⁵, Congia²³, Ploski¹²⁶, Polvi^{129, 128}, Houlston⁶¹, Michalski¹⁰⁵ und Pena¹⁶² ging hervor, dass zwischen 84% und 99% der Zöliakiepatienten DQ2 positiv waren und die restlichen DQ8 positiv wären. Kaukinen⁷³, Csizmadia²⁷ und private labortechnische Institute verwendeten dies für ihre Argumentation.

Bezüglich der Prävalenz von DQ2 in einer mitteleuropäischen kaukasoiden Gesamtpopulation gibt es in der Literatur recht genaue Angaben. Für den mitteleuropäischen Raum ergibt sich ein Spektrum von 19,4 %⁵⁵ – 21,2 %^{16, 51}, was darauf zurückzuführen ist, dass die Studien in unterschiedlichen europäischen Ländern durchgeführt wurden, mit einer gewissen Diskrepanz.

Man kann also davon ausgehen, dass ca. 20% der mitteleuropäischen Gesamtpopulation für DQ2 positiv ist, ohne jedoch an Zöliakie zu erkranken^{146, 55, 141, 51, 167}. Die anderen Patienten, welche DQ2 negativ sind, sollen alle DQ8 positiv sein. Dies stimmt so aber nicht. Zöliakie ist eine multifaktorielle Erkrankung¹⁴⁶, von der man weiß, dass die überwiegende genetische

Prädisposition auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 in der HLA-Region liegt^{80, 79, 146, 13}. Es gibt aber Zöliakiepatienten, welche EMA positiv sind, eine bioptisch gesicherte Zottenatrophie aufweisen, jedoch DQA1*0501 - DQB1*0201 (**DQ2**) und DQA1*0301 - DQB1*0302 (**DQ8**) negativ sind^{128, 72}. Dies bedeutet, dass es auch außerhalb der bekannten HLA-Marker Regionen für Zöliakie prädispositionierende Allele gibt, welche jedoch nicht mit den kommerziellen HLA-Kits diagnostiziert werden können. Von Seiten der viel propagierten Kosteneffizienz belaufen sich die Kosten für einen HLA-DQ Kit auf momentan 29 € pro Patienten^{73, 131}, und die einer endoskopischen Untersuchung mittels Watson-Kapsel¹⁴³, nebst histologischer Analyse, auf 224 €⁷³ pro Individuum. Die falsch positiven und falsch negativen Resultate der HLA-Typisierung sind aber zu berücksichtigen.

Subsumiert man die oben dargelegten Argumente, so ist eine alleinige Diagnostik der Zöliakie mittels HLA-DQ Typisierung abzulehnen¹⁶⁷. Eine lebenslange Gliadin freie Diät allein aufgrund eines positiven DQ-Status ist nicht zu vertreten.

Betrachtet man die HLA-DQ Typisierung, neben Klinik und Biopsie, jedoch als einen Baustein in der Zöliakie Diagnostik, so ist sie, insbesondere bei Patienten mit einer subklinischen Präsentationsform und einer partiellen Zottenatrophie, eine weitere Hilfsmethode^{73, 51, 37, 126}. Die HLA-Diagnostik hat heute neben Klinik, Biopsie und Serologie im Verbund ihren festen Platz in der Diagnostik^{146, 96, 55, 16}, liefert sie doch ein weiteres Indiz für oder gegen die Diagnose Zöliakie. Mäki⁹⁶ und Greco⁵⁰ sind sogar der Ansicht, dass die HLA-Diagnostik die Serologie in naher Zukunft als diagnostisches Kriterium ersetzen wird^{128, 125}.

4.4 HLA-DQ Status bei DQ2 und DQ8 negativen Patienten mit bioptisch gesicherter Zöliakie

Die primäre genetische Assoziation der Zöliakie besteht mit dem HLA-Locus DQA1*0501 - DQB1*0201 (**DQ2**). Dieser Typ wird bei 88²³% - 95%⁶¹ der Patienten nachgewiesen. Die verbleibenden Individuen weisen größtenteils den verwandten HLA-Typ DQA1*0301 - DQB1*0302 (**DQ8**)¹⁴⁶ auf. Eine ausführliche Auflistung der vorangegangenen Studien bezüglich der HLA-DQ2 Frequenzen zeigt *Tabelle 22*.

Die meisten Zöliakiepatienten haben demnach entweder den DR3-DQ2 Haplotyp (den DRB1*0301 – DQA1*0501 – DQB1*0201 Haplotyp) oder aber sind DR5 – DQ7 und DR7 – DQ2 Heterozygot (das heißt, sie haben den DRB1*11/12 – DQA1*0505 – DQB1*0301 und DRB1*07 – DQA1*0201 – DQB1*0202 Haplotyp)^{103, 154, 153}. Diese Thematik wurde unter *4.1.1* bereits explizit erläutert und anhand von *Abbildung 24* veranschaulicht.

Seit Lundin⁹³ 1993 HLA-DQ2 als Marker-Gen für Zöliakie publizierte, wurde dies in zahlreichen Studien verifiziert (siehe *Tabelle 9*). DQA1*0501 - DQB1*0201 (**DQ2**) wurde bei bis zu 95% der Zöliakiepatienten nachgewiesen, die restlichen 5 % galten als **DQ8** positiv. Die wenigen verbleibenden Einzelfälle von Patienten welche DQ2 / DQ8 negativ wären, müssten falsch negativ sein oder wären mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit gar nicht an Zöliakie erkrankt.

Mit den wachsenden Erkenntnissen über die multiplen Manifestationsformen der Zöliakie, insbesondere der subklinischen Präsentationsformen, stieg auch die Frequenz an DQ2 / DQ8 negativen, bioptisch verifizierten Zöliakiepatienten. Die wenigen bis dato publizierten diesbezüglichen Arbeiten wurden in die vorliegende Diskussion integriert.

Polvi¹²⁸ wies 1998 in einer vergleichenden Studie zwischen finnischen und spanischen Zöliakiepatienten als erster auf die Diskrepanz zwischen DQ2 / DQ8 negativem HLA-Status und bioptisch gesicherter Zöliakie hin. Von 15 % (13/84) DQ2 negativen Probanden waren 8% (7/84) für DQ8 positiv. Die verbleibenden 7 % (7/84) waren DQ2 und DQ8 negativ. Lediglich 0,7% (2 / 253) der Patienten trugen bei der Studie von Polvi¹²⁸ weder das DQA1*0501 noch das DQB1*0201 Allel. Unter der Federführung von Karell⁷² kam eine diesbezügliche, europäische

Multicenterstudie zu ähnlichen Ergebnissen. Von 1008 Zöliakiepatienten waren in dieser Studie 7 % (71/1008) DQA1*0501 - DQB1*0201 (**DQ2**) und DQA1*0301 - DQB1*0302 (**DQ8**) negativ. Bei dieser Multicenterstudie waren sogar lediglich 0,39% (4/1008) Patienten weder DQA1*0501 noch DQB1*0201 positiv.

Von den insgesamt 69 analysierten Patienten in unserer Studie waren insgesamt 7 Patienten (2 männliche und 5 weibliche) für DQ2 und DQ8 negativ, was 9,8% entspricht. Eine klassische Präsentationsform wiesen 4 (57%) der Patienten auf, eine subklinische hingegen 3 (43%). Bezüglich der Zottenatrophie hatten bei den DQ2 und DQ8 negativen 4 (57%) Patienten eine SVA und 3 (43%) eine PVA. Die Größenperzentile betrug durchschnittlich 23 bei einer Gewichtsperzentilen von 23. Lediglich 3 der DQ2/DQ8 negativen Patienten waren EMA positiv. Unter diesen Gesichtspunkten konnte, wie bereits unter 4.2 diskutiert, EMA bei DQ2 / DQ8 negativen Patienten nicht als diagnostisches Kriterium gelten. Alle DQ2 /DQ8 negativen Patienten wurden nochmals komplett typisiert, um einen eventuellen labortechnischen Fehler auszuschließen. Allerdings bestand bei den 7 DQ2 /DQ8 negativen Patienten die Möglichkeit, dass ihre Dünndarmbiopsie bei der pathologischen Untersuchung als falsch positiv für Zöliakie diagnostiziert wurde. Somit hätten wir den Fall einer falsch positiven Dünndarmbiopsie bei einem richtigermaßen und zweimal kontrollierten negativen DQ2/DQ8 Status. Heute werden alle Biopsate standardmäßig anhand der Marshkriterien¹⁰⁰ (s. auch Tabelle 12 im Anhang) in spezialisierten Labors untersucht. Da diese Kriterien erst in den letzten Jahren eingeführt wurden bestand die Möglichkeit, dass ältere Proben, wie oben erwähnt, als falsch positiv gewertet wurden.

Eine detaillierte Einzelanalyse dieser Patientengruppe findet sich unter 3.4.6. Wie aus dieser Einzelanalyse ersichtlich ist, wiesen alle DQA1*0501 - DQB1*0201 (**DQ2**) und DQA1*0301 - DQB1*0302 (**DQ8**) negativen Patienten, die unterschiedlichsten Kriterien auf; klassische, subklinische Präsentationsform, SVA, PVA, EMA positiv, EMA negativ und doch zeigten alle eine Gemeinsamkeit.

Alle 7 DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) und DQA1*0301 - DQB1*0302 (DQ8) negativen Patienten zeigten zumindest ein Allel des DQ2 Heterodimers. Sie waren somit alle entweder DQA1*0501 oder DQB1*0201 positiv.

Dies veranschaulicht auch *Tabelle 18*.

Wir kamen mit den Ergebnissen der vorgelegten Studie zu der Schlussfolgerung, dass bei den DQ2/ DQ8 negativen Patienten bereits ein Allel des DQ2-Heterodimers ausreichte, um die jeweilige Prädisposition für Zöliakie vorzuweisen, wie zuvor auch von Karell⁷² und Polvi¹²⁸ publiziert.

Auch kam unser Ergebnis mit 9,8 % (7/69) DQ2 / DQ8 negativen Patienten, wenn man unsere eingeschränkte Gruppengröße von 69 Patienten betrachtete, den Resultaten von Polvi¹²⁸ mit 7 % (7/84) und denen von Karell⁷² mit 7 % (71/1008) DQ2 /DQ8 negativen Patienten recht nahe.

Als Fazit der Diskussion des HLA-DQ Status bei DQ2 und DQ8 negativen Patienten mit bioptisch gesicherter Zöliakie galt, dass die vorgelegte Studie die Resultate der von Karell⁷² und Polvi¹²⁸ in ihren, unabhängig voneinander publizierten Studien bestätigte.

Bei dieser speziellen Patientengruppe wäre es allerdings im Interesse der Patienten gewesen ihren positiven Zöliakie-Status erneut zu validieren. Da ihr negativer HLA-DQ2 / DQ8 Status sie nur eingeschränkt für eine Zöliakie prädispositionierte.

Eine erneute Untersuchung dieser 7 Patienten unter Glutenbelastung war daher sehr zu empfehlen.

5 Zusammenfassung

Im klinischen Erscheinungsbild der Zöliakie hat sich ein epidemiologischer Wandel vollzogen (vgl. 1.2.3). Wurde vormals überwiegend das klassische Erscheinungsbild der Zöliakie beschrieben, so beobachtet man heute immer mehr Patienten mit den silenten Präsentationsformen der Zöliakie. Dies hat allerdings weniger mit einem Wandel der Krankheit per se zu tun, als viel mehr mit der verbesserten Diagnostik — nicht zuletzt Dank der Fortschritte auf dem Gebiet der Screeningmethoden.

Aus vorhergehenden Studien ist bekannt, dass die primäre genetische Assoziation der Zöliakie mit dem HLA-Locus DQA1*0501 - DQB1*0201 (**DQ2**) bzw. DQA1*0301 - DQB1*0302 (**DQ8**) besteht. Für Deutschland lagen solche Daten bisher jedoch nicht vor, weswegen wir ein repräsentatives Kollektiv des Tübinger Zöliakiezentrums, nebst Kontrollgruppenkollektiv, auf HLA-DQ2 und HLA-DQ8 hin analysierten.

Von den insgesamt 69 analysierten Patienten dieser Studie waren 2 für **DQ2 DQA1*0501 - DQB1*0201 Homozygot (2,9%)** und 58 **Heterozygot (84,1%)**.

Insgesamt waren somit 60 von 69 Patienten für DQ2 positiv, was **DQ2= 87%** entsprach. Von den insgesamt 26 Probanden des Kontrollgruppenkollektives waren insgesamt 5 DQ2 positiv (19,2%), was der Prävalenz in einer kaukasoiden mitteleuropäischen Gesamtpopulation mit 20,7% recht nahe kam.

Vier unserer Patienten waren für **DQA1*0301-DQB1*0302 (DQ8)** Heterozygot, was **DQ8 = 5,8%** entsprach, im Kontrollgruppenkollektiv lediglich einer (3,8%). Von den 4 DQ8 positiven Patienten waren 2 für DQ2 und DQ8 Heterozygot, somit also **DQ2 und DQ8 positiv 2,9%**.

Insgesamt waren 90,2 % der Patientengruppe für DQ2 und DQ8 positiv.

Das HLA DQA1*0501 - DQB1*0201 (DQ2) Heterodimer war in unserem Patientenkollektiv mit Zöliakie gegenüber der gesunden Kontrollgruppe mit einem RR von 19,127 (KI 95% = 9,354 – 39,107) signifikant erhöht.

Lediglich 7 der 69 Patienten waren für **DQ2 und DQ8 negativ = 9,8%**.

Alle 7 DQ2 und DQ8 negativen Patienten zeigten zumindest ein Allel des DQ2 Heterodimers, sie waren somit alle entweder für DQA1*0501 oder DQB1*0201 positiv. Wir kamen bei den DQ2/DQ8 negativen Patienten zu der Schlussfolgerung, dass bei den DQ2/ DQ8 negativen Patienten bereits ein Allel des DQ2-Heterodimers ausreichte um die Prädisposition für Zöliakie vorzuweisen.

Bei der retrospektiven Validierung der Klinik in Relation zu der genetischen Analyse konnten wir nachweisen, dass Patienten welche DQ2-Homozygot, DQ8 positiv oder DQ2 & DQ8 positiv waren, eine verstärkte genetische Prädisposition hatten an Zöliakie zu erkranken. Bei der vergleichenden Betrachtung zeigten alle Patienten mit einem risikoreicheren DQ-Status die klassische Präsentationsform, mit schwerer Zottenatrophie (TVA / Marsh 3c). Sie erkrankten allesamt früher, zeigten ein retardiertes Wachstum und wurden interessanterweise schneller diagnostiziert.

Unter dem Gesichtspunkt des Stellenwertes der HLA-DQ Typisierung hinsichtlich der serologischen und bioptischen Diagnostik zeigte sich, dass eine alleinige Diagnostik der Zöliakie mittels HLA-DQ Typisierung nicht zu vertreten ist.

Betrachtet man die HLA-DQ Typisierung, neben Klinik, Biopsie und Serologie jedoch als ein weiteres Indiz für die Diagnose Zöliakie, so repräsentiert sie eine nützliche Hilfsmethode in der Diagnostik, insbesondere bei Patienten mit einer subklinischen Präsentationsform oder beim Ausschluss einer Zöliakie.

6 Literaturverzeichnis

1	Aguado, B.; Millner C. M.; Campbell R.D.; (1996) „Genes of the MHC class III region and the functions of the proteins they encode.“ In: “HLA and MHC: genes, molecules and function” Blackwell; Oxford; BIOS Scientific Publ.; 36 - 47
2	Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; (1990) “Molekularbiologie der Zelle” 2. Auflage, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge
3	Allelfrequenzen www.allelefrequencies.net 11.09.2003
4	Ascher, H.; Holm, K.; Kristiansson, B.; Mäki, M.; (1993) „Different features of coeliac disease in two neighbouring countries. “ Arch.Dis.Child.; <u>69</u> ; 375 – 380
5	Ascher, H.; Kristiansson, B.; (1994) „Childhood coeliac disease in Sweden. “ Lancet; <u>44</u> ; 340 - 341
6	Bachelor, J. R.; Fiedler, H. J.; Walport, M. J.; (1989) „HLA class II complement genes and susceptibility to sytemic lupus erythematodes.“ In: Dupont, B.; Immunobiology of HLA; Springer, New York; 447 - 447
7	Balas, A.; Vicario, J. L.; Zambrano, A. et al.; (1997) “Absolute linkage of celiac disease and dermatitis herpetiformis. “ Tissue Antigens; <u>50</u> ; 52 - 56
8	Ballinger, A.; Hughes, C.; Kumar, P.; Hutchinson, I.; Clark, M.; (1994) „Dental enamel hypoplasia in coeliac disease. “ Lancet; <u>343</u> ; 230 - 231
9	Baur, M. B., et. al; (1984) „Frequences of alleles at the HLA-A, -B and –C loci in different populations. “ Histocompatibility Testing, Springer-Verlag, Berlin
10	Begovich, A. B.; McClure, G. R.; Suraj, V. C.; Helmuth, R. C.; (1992) “Polymorphism, recombination, and linkage disequilibrium within the HLA class II region. J.Immunol.; <u>148</u> ; 249 - 258
11	Benecke, R.; (1910) „Über die Spruekrankheit (Aphthae tropicae)“ Deutsche Gesellschaft der Pathologie; <u>14</u> ; 132
12	Bevan, S. et al.; (1999) „Contribution of the MHC region to the familial risk of coeliac disease. “ J.Med.Genet.; <u>36</u> ; 687 – 690
13	Bodmer, J. G.; Marsh, S. G. E.; Albert, E. D.; Bodmer, W.F.; (2003) „Nomenclature for the factors of the HLA-System“ Eur.J.Immunogenet.; <u>26</u> ; 81 - 116

LITERATURVERZEICHNIS

14	Bonamico, M.; Mariani, P.; Mazzilli, M. C.; Triglione, P.; Lionetti, P.; Ferrante, P.; Picarelli, A.; Mesturino, A.; Gemme, G.; (1996) "Frequency and clinical pattern of celiac disease among siblings of celiac children." J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.; <u>23</u> ; 159 - 163
15	Brown, T. A.; (1993) „Gentechnologie für Einsteiger.“ Spektrum Akademischer Verlag GmbH; Heidelberg-Berlin
16	Catassi, C.; Fabiani, E.; Ratsch, I. M.; Coppa, G. V.; Giorgi, P. (1994) „The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects. “ Acta.Paediatr.Suppl.; <u>412</u> ; 29 - 35
17	Catassi, C.; Rättsch, I. M.; Fabiani, E.; Ricci, S.; Bordicchia, F.; Pierdomenico, R.; Giorgi, P. L.; (1995) „High prevalence of undiagnosed coeliac disease in 5280 Italian students screened by antigliadin antibodies. “ Acta.Paediatr.; <u>84</u> ; 672 - 676
18	Catassi, C.; Rättsch, I. M.; Fabiani, E.; Rossini, M.; Giorgi, P. L. (1999) „Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. “ Lancet; <u>343</u> ; 296 – 308
19	Cavell, B.; Stenhammer, L.; Ascher, H.; (1992) „Increasing incidence of childhood coeliac disease in Sweden: Results of a national study. “ Acta.Paediatr.; <u>81</u> ; 589 - 592
20	Collin, P.; Mäki, M.; Keyriläinen, O.; Hällström, O.; Reunala, T.; (1992) "Selective IgA deficiency and coeliac disease." Scand.J.Gastroenterol.; <u>27</u> ; 367 - 371
21	Collin, P.; Reunala, T.; Pukkala, E.; Laippala, P.; Keyriläinen, O;(1994) "Coeliac disease – associated disorders and survival." Gut; <u>35</u> ; 1215 – 1218
22	Combrink, A.; Stevens, T.; Parkman, E.; Sollid, L. M. (1992) „Delayed dental development in coeliac disease." Lancet; <u>340</u> ; 311 – 312
23	Congia, M.; Cucca, F.; Frau, F. et al.; (1994) „A gene dosage effect of the DQA1*0501/DQB1*0201 allelic combination influences the clinical heterogeneity of celiac disease. “ Hum.Immunol.; <u>40</u> ; 138 - 142
24	Corazza, G.; Valentini, R. A.; Andreani, M. L.; D´Anchino M. L.; Leva, M. T.; Ginaldi, L.; De Feudis, L.; Quaglino, D.; Gasbarrini, G.; (1995) „Subclinical coeliac disease is a frequent cause of iron-deficiency anaemia. “ Scand.J.Gastroenterol.; <u>30</u> ; 153 – 156
25	Cruse, J. M.; Lewis, R. E.; (1998) "Atlas of Immunology" CRC Press, Boca Raton, London, New York
26	Csizmadia, C. G.; Mearin, M. L.; von Blomberg, B.; Brand, R. (1999) „An iceberg of childhood coeliac disease in The Netherlands. “ Lancet; <u>353</u> ; 812 – 814

LITERATURVERZEICHNIS

27	Csizmadia, C.; Mearin, L.; Oren, A.; (2000) “Accuracy and cost effectiveness of a new strategy to screen for celiac disease in children with Down syndrome.” J.Pediatr.; <u>137</u> ; 756 - 761
28	Dausset, J.; (1954) „Leuco-agglutinins. IV. Leuco-agglutinins and blood transfusion.” Vox.Sang.; <u>4</u> ; 190-198
29	Dausset, J.; (1959) „Iso-leuco-anticorps. “ Acta.Haematol.; <u>20</u> ; 156 - 166
30	Davidson, L. S. P.; Fountain, J. R.; (1950) „Incidence of sprue syndrome with some observation on the natural history. “ BMJ; <u>1</u> ; 1157 - 1161
31	De Vitis, I.; Ghirlanda, G.; Gasbarrini, G.; (1996) “Prevalence of coeliac disease in type I diabetes: a multicentre study.” Acta.Paediatr.Suppl.; <u>412</u> ; 56 – 57
32	Dicke, W. K. (1950) „Investigation of the harmful effects of certain types of cereal on patients with celiac disease. “ Doctoral Thesis; University of Utrecht, the Netherlands
33	Duquesnoy, R.J.; White, L. J.; First, J. W.; Vanek, M.; (1990) “Multiscreen serum analysis of highly sensitized renal dialysis patients for antibodies toward public and private class I HLA determinants. Implications for computer-predicted acceptable and unacceptable donor mismatches in kidney transplantation.” Transplantation; <u>50</u> ; 427 - 437
34	Ellmeier, W.; Sawada, S.; Littman, D. R.; (1999) „The regulation of CD4 and CD8 co receptor gene expression during T-cell development.” Annu.Rev.Immunol.; <u>17</u> ; 523 – 554
35	Enczmann, E. et. al, ; (2003) „Analyse der Knochenmarkspende-Datei NRW“ Persönliche Auskunft 8.12.2003
36	Fabiani, E.; Catassi, C.; Villari, A.; Gismondi, P.; Pierdomenico, R.; Rättsch, I. M.; Coppa, G. V.; Giorgi, P. L.; (1996) „Dietary compliance in screening-detected coeliac disease adolescents. “ Acta.Paediatr.Suppl.; <u>412</u> ; 65 - 67
37	Fasano, A.; Catassi, C.; (2001) „Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. “ Gastroenterology; <u>120</u> ; 636 – 651
38	Ferguson, A.; MacDonald, T. T.; McClure, J. P.; Holden, R. J.; (1975) „Cell mediated immunity to gliadin within the small intestinal mucosa in celiac disease. “ Lancet; <u>1</u> ; 895 – 897

LITERATURVERZEICHNIS

39	Ferguson, A.; Arranz, E.; O'Mahony, S.; (1993) „Clinical and pathological spectrum of coeliac disease active, silent, latent, potential.“ Gut; <u>34</u> ; 150 - 151
40	Gandolfi, L.; Pratesi, R.; Cordoba, J.; Tavit, P. L.; Gasparin, M.; (2000) „Prevalence of coeliac disease among blood donors in Brazil.“ Am.J.Gastroenterol.; <u>95</u> ; 689 – 692
41	Gee, S.; (1888) “On the coeliac affection” St. Bartholomews Hospital Report; <u>24</u> ; 17 – 20
42	George, E. K.; Mearin M. L.; Bouquet, J.; von Blomberg, B. M. E.; Stapel, S. O.; van Elburg, R. M.; de Graaf, E. A.; Hertbergerten Cate, R.; van Suijlekom, L. W. A.; Reeser, H. M.; Oostdijk, W.; (1996) “Screening for coeliac disease in Dutch children with associated diseases.” Acta.Paediatr.Suppl.; <u>412</u> ; 52 - 53
43	George, E. K.; Mearin, M. L.; Bouquet, J.; von Blomberg, M. E.; Stapel, S. O.; van Elburg, R. M.; de Graaf, E. A. B.; (1997) “High frequency of coeliac disease in Down syndrome.” Eur.J.Pediatr.; <u>128</u> ; 555 - 557
44	Gerarduzzi, T.; Berti, I.; De Gregorio, E.; Horvath, K.; Green, P. H. R.; Sblattero, D.; Not, T.; Pietzak, M.; Hill, I.; Murray, J.; Fine, K.; (2000) „Celiac disease in USA among risk groups and the general population in USA.“ J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.; <u>31</u> ; 29 - 29
45	Gobbi, G.; Bouquet, F.; Greco, L.; Lambertini, A.; Tassinari, C. (1992) „Coeliac disease, epilepsy and cerebral calcifications.“ Lancet; <u>340</u> ; 439 – 443
46	Godkin, A. et al.; (1997) „Use of eluted peptide sequence data to identify the binding characteristics of peptides to the insulin-dependent diabetes susceptibility allele HLA-DQ8.“ Int.Immunol.; <u>9</u> ; 905 – 911
47	Goldrath, A. W.; Bevan, M. J.; (1999) “Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire.” Nature; <u>402</u> ; 255 – 262.
48	Gorer, P.A.; (1937) „The genetic and antigenic basis of tumor transplantation.“ J.Pathol.; <u>44</u> ; 691- 697
49	Gorer, P.A.; Lyman, S.; Snell, G. D.; (1948) “Studies on the genetic and antigenetic basis of tumor transplantation. Linkagebetween a histocompatibility gene and “fused” in mice.” Proceedings of the Royal Society of London – Series B: Biol.Sci.; <u>135</u> ; 499 - 505
50	Greco, L. et al.: (2001) „Existence of a genetic risk factor on chromosome 5q in Italian coeliac disease families.“ Annu.Hum.Genet.; <u>65</u> ; 35 - 41

LITERATURVERZEICHNIS

51	Greco, L. et al.; (2002) „The first large population-based twin study of coeliac disease.“ Gut; <u>50</u> ; 624 – 628
52	Gruen, JR.; Weissmann, SM.; (1997) „Evolving views of the major histocompatibility complex.“ Blood; <u>90</u> ; 4252 – 4265
53	Haaldane, J. B. (1956) “The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies.” Annu.Hum.Genet.; <u>20</u> ; 309 – 311.
54	Haas, C. V.; (1932) „Celiac disease, its specific treatment and cure without nutritional relapse.“ J.Am.Med.Assoc.; <u>99</u> ; 448 - 452
55	Hadziselimovic, F.; Bürgin-Wolff, A.; (2001) „Celiac Disease – a Review“. Elias Journal, <u>2</u> ; 2001; Basel
56	Halstensen, T. S.; Scott, H.; Fausa, O.; Brandtzaeg, P.; (1993) „Gluten stimulation of coeliac mucosa in vitro induces activation (CD25) of lamina propria CD4 ⁺ T-cells and macrophages but no crypt-cell hyperplasia.“ Scand.J.Immunol.; <u>38</u> ; 581 - 590
57	Hay, H. E.; Wiesner, R. H.; Shorter, R. G.; LaRusso, N. F.; (1988) „Primary sclerosing cholangitis and celiac disease. A novel association.“ Ann.Intern.Med.; <u>109</u> ; 713 - 717
58	Heidinger, K.; Kemkes-Matthes, B.; Matthes, K. J.; Franke, F.; (1995) „Einheimische Sprue: Erstdiagnose aufgrund von Blutungskomplikationen.“ Deutsche Medizinische Wochenschrift; <u>124</u> ; 1543 - 1546
59	Holmes, G.; (1989) „Non-malignant complications of coeliac disease.“ Acta.Pediatr.Suppl.; <u>412</u> ; 69 - 75
60	Holmes; G. K.; Prior, P.; Lane, M. R.; Pope, D.; Allan R. N.; (1996) „Malignancy in coeliac disease – effect of a gluten free diet.“ Gut; <u>30</u> ; 333 – 338
61	Houlston, R. S.; Tomlinson, I. P.; Ford, D. et al.; (1997) „Linkage analysis of candidate regions for coeliac disease genes.“ Hum.Mol.Genet.; <u>6</u> ; 1335 - 1339
62	Hovdenak, N.; Hovlid, E.; Aksens, L.; Fluge, G.; Erichsen M.; (1999) „High prevalence of asymptomatic coeliac disease in Norway: A study of blood donors.“ Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.; <u>11</u> : 185 – 187
63	Howdle, P.; Losowsky, M. S.; (1992) „Coeliac disease in adults.“ In: Coeliac disease Blackwell; Oxford; 56 – 63
64	Howell, M. D.; Austin, R. K.; Kelleher, D.; Nepom, G. T.; (1986) „An HLA-D region restriction length polymorphism associated with coeliac disease.“ J.Exp.Med.; <u>164</u> ; 333 – 339

LITERATURVERZEICHNIS

65	Hummel, M.; Bonifacio, E.; Stern, M.; Dittler, J.; Schimmel, A.; (2000) „Development of celiac disease-associated antibodies in offspring of parents with type 1 diabetes.“ Diabetologia; <u>43</u> : 1005 - 1005
66	Ishii, T.; Udono, H.; Yamano, T.; (1999) “Isolation of MHC class I tumor antigen peptide and its precursors associated with heat shock proteins hsp70, hsp90 and gp96.” J.Immunol.; <u>162</u> ; 1303 - 1309
67	Johansen, B. H.; Vartdal, F.; Eriksen, J. A.; Thorsby, E.; (1996) „Identification of a putative motif for binding of peptides to HLA-DQ2. “ Int.Immunol.; <u>8</u> ; 177 - 182
68	Johnston, S. D.; Watson R. G.; McMillan, S. A.; Sloan, J.; (1997) „Prevalence of coeliac disease in Northern Ireland. “ Lancet; <u>350</u> ; 1370 - 1370
69	Jones, J. S.; (1999) „The MHC sequencing consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex.” Nature; <u>401</u> ; 921 – 923
70	Jones, M.; Elkus, B.; Lyles, J.; Lewis, L.; (1996) „Questions and answers on HLA typing and Celiac Disease. “ www.enabling.org/ia/ceciac/cel-hla.html 25.03.2000
71	Kagnoff, M.; Paterson, Y. J.; Kumar, P. J.; Kasadra, D. D.; (1987) „Evidence for the role of a human intestinal adenovirus in the pathogenesis of coeliac disease. “ Gut; <u>28</u> ; 995 - 1001
72	Karell, K.; Louka, A.; Moodie, S.; Ascher, H.; Greco, L.; (2003) “HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2)) heterodimer: results from the European genetic cluster on celiac disease.” Hum.Immunol.; <u>64</u> ; 469 - 477
73	Kaukinen, K.; Partanen, J.; Mäki, M.; (2002) „HLA-DQ Typing in the Diagnosis of Celiac Disease.“ Am.J.Gastroenterol.; <u>97</u> ; 695 - 699
74	Kendall, E.; Todd, J. A.; Campbell, R.D.; (1991) “Molecular analysis of the MHC class II region in DR4, DR7, and DR9 haplotypes.” Immunogenetics; <u>34</u> ; 349 - 357
75	Kiefel, V.; (2002) „ HLA und Transplantation“ www.tmed.uni-rostock.de/hla.pdf 24.04.2003
76	King, A. et al.; (2002) „CTLA4/CD28 gene region is associated with genetic susceptibility to coeliac disease in UK families. “ J.Med.Genet.; <u>39</u> ; 51 - 54
77	Kinney, H. C.; Burger, P. C.; Hurwitz, B. J.; Hijmans; J. C.; (1982) „Degeneration of the central nervous system associated with celiac disease.“ J.Neurol.Sci.; <u>53</u> ; 9 - 22

LITERATURVERZEICHNIS

78	Klein, J.; (1986) "Natural history of the major histocompatibility complex." John Wiley, New York
79	Klein, J.; Sato, A.; (2000) „The HLA System“ N.Eng.J.Med.; <u>343</u> ; 702 – 709
80	Klein, J.; Václav Hořejší (1997) „Immunologie“ 2. Auflage, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge
81	Knudtzon, J.; Fluge, G.; Akses, L.; (1991) "Routine measurements of gluten antibodies in children of short stature." J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.; <u>12</u> ; 190 – 194
82	Kolho, K. L.; Farkkila, M. A.; Savilahti, E.; (1998) „Undiagnosed coeliac disease in common Finnish adults. “ Scand.J.Gastroenterol.; <u>33</u> ; 1280 – 1283
83	Kuncio, G. S. et al.; (1998) „TNF- α modulates expression of the tissue transglutaminase gene in liver cells“ Am.J.Physiol.; <u>274</u> ; G240 – G245
84	Le Bouteiller, P.; (1994) „HLA class I chromosomal region, genes and products: facts and questions. “ Crit.Rev.Immunol.; <u>14</u> ; 89 – 129
85	Lee, K. H.; Wucherpfennig, K. W.; Wiley, D. C.; (2001) „Structure of a human insulin peptide-HLA DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes. “ Nature Immunology; <u>2</u> ; 501 - 507
86	Lepore, L.; Martellosi, S.; Pennesi, M.; Falcini, F.; Ermini, M. (1996) „Prevalence of celiac disease in patients with juvenile chronic arthritis.“ J.Pediatr.; <u>129</u> ; 311 - 313
87	Lewin, B.; (2002) „Gene, Lehrbuch der molekularen Genetik“ 3. Auflage, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge
88	Lindberg, T.; (1981) „Coeliac disease and infant feeding practices. “ Lancet; <u>1</u> ; 449 - 449
89	Logan, R. F. A.; Rifking, E.A.; Busutti, A.; Gilmous, H. M.; (1983) „Prevalence and incidence of celiac disease in Edinburgh and the Lothian region of Scotland. “ Gastroenterology; <u>90</u> ; 334 - 342
90	Logan, R. F.; Tucker, G.; Rifkind, E.; Heading, R. C.; (1986) „Changes in clinical features of coeliac disease in adults in Edinburgh and the Lothians 1960 – 1979. “ BMJ; <u>286</u> ; 95 - 97
91	Logan, R.; (1992) „Problems and pitfalls in epidemiological studies in coeliac disease. “ Common Food Intolerances 1: Epidemiology of coeliac disease; Karger; Basel

LITERATURVERZEICHNIS

92	Lundin, K. E. A.; Scott, H.; Fausa, O.; Thorsby, E.; Sollid, L. (1993) „T-cells from the small intestinal mucosa of a DR4, DQ7/DR4, DQ8 celiac disease patient preferentially recognize gliadin when presented by DQ8“. Hum.Immunol.; <u>41</u> ; 285 - 291
93	Lundin, K. E.; Scott, H.; Hansen, T.; Paulsen, G.; (1994) „Gliadin-specific, HLA-DQ (α^*0501/β^*0201) restricted T-cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. “ J.Exp.Med.; <u>178</u> ; 187 - 196
94	Lundin, K.; Gjertsen, H. A.; Scott, H.; Sollid, L. M.; Thorsby, E.; (1995) „Function of DQ2 and DQ8 as HLA susceptibility molecules in celiac disease. “ Hum.Immunol.; <u>41</u> ; 24 - 27
95	Mäki, M.; (1988) „The humoral immune system in coeliac disease. “ Bailliere’s Clinical Gastroenterology; <u>9</u> ; 231 - 249
96	Mäki, M.; Collin, P.; (1991) „Coeliac disease“ Lancet; <u>349</u> ; 1755 - 1759
97	Mäki, M.; Holm, K.; Ascher, H.; Greco, L.; (1992) „Factors affecting clinical presentation of coeliac disease: role of type and amount of gluten-containing cereals in the diet. “ Dyn.Nutr.Res.; <u>2</u> ; 76 - 82
98	Mäki, M.; Holm, K.; Lipsanen, V.; Hällström, O.; Viander, M.; Collin, P.; Savilati, E.; Koskimies, E.; (1995) “Serological markers and HLA genes among healthy first-degree relatives of patients with coeliac disease.” Lancet; <u>338</u> ; 1350 - 1353
99	Mäki, M.; Kallonen, K.; Lahdeaho, M. L.; Visakorpi, J. K.; (1997) „Changing pattern of childhood coeliac disease in Finland. “ Acta.Paediatr.Scand.; <u>77</u> ; 408 - 408
100	Marsh, M. N.; (1992) “Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine: a molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity. “ Gastroenterology; <u>102</u> ; 330 - 354
101	McDonald, W. C.; Dobbins, W. O. III; Rubin, C. E.; (1965) „Studies of the familial nature of celiac sprue using biopsy of the small intestine. N.Eng.J.Med.; <u>272</u> ; 448 – 456
102	Mearin, H.; Koninkx, C.R.; Biemond, I.; (1983) „Influence of genetic factors on the serum levels of antigliadin antibodies in celiac disease.” J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.; <u>3</u> ; 373 - 377
103	Mearin, M. L. et al.; (1984) „HLA-DR phenotypes in Spanish coeliac children: their contribution to the understanding of the genetics of the disease. “ Gut; <u>24</u> ; 532 – 537

LITERATURVERZEICHNIS

104	Meeuwisse, G. V.; (1970) „Diagnostic criteria in coeliac disease.“ Acta.Paediatr.Scand.; <u>59</u> ; 461 - 463
105	Meini, A.; Pillan, N. M.; Villancci, V.; Monafu, V.; Ugazio, A. G.; (1996) “Prevalence and diagnosis of coeliac disease in IgA-deficient children.” Ann.Allergy.Asthma.Immunol.; <u>77</u> ; 333 - 336
106	Michalski, J. P.; McCombs, C. C.; Arai, T. et al.; (1996) „HLA-DR, DQ genotypes of celiac disease patients and healthy subjects from the West of Ireland.“ Tissue Antigens; <u>47</u> ; 127 - 133
107	Molberg, Ø. et al.; (2001) „T cells from celiac-disease lesions recognize gliadin epitopes deamidated in situ by endogenous tissue transglutaminase.“ Eur.J.Immunol.; <u>31</u> ; 1317 – 1323
108	Moss, P.A.; Rosenberg, W. M.; Bell, J. I.; (1992) “The human T-cell receptor in health and disease.” Ann.Rev.Immunol.; <u>10</u> ; 71 – 96
109	Müller, C.; (2003) “HLA-System: Organisation, Genetik, Struktur, Funktion und klinische Bedeutung” www.medizin.uni-tuebingen.de/~webim2/abtii/hlalabor/hla.htm 24.04.2003
110	Müller, L. P.; (2000) „Typisierung der HLA-DPB1-Allele und HLA-Assoziationen der Chronisch-Lymphatischen-Leukämie.“ Dissertation; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/01B037/prom.pdf 11.09. 2003
111	Mullis, K. B.; Faloona, F. A.; (1997) „Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction.“ Methods.Enzymol.; <u>255</u> ; 335 – 350
112	Naluai, T. et al.; (2001) „Genome-wide linkage analysis of Scandinavian affected sib-pairs supports presence of susceptibility loci for celiac disease on chromosome 5 and 11.“ Eur.J.Hum.Genet.; <u>9</u> ; 938 - 944
113	Nilsen, E. M. et al.; (1998) „Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon- γ in patients with celiac disease.“ Gastroenterology; <u>115</u> ; 551 - 563
114	Oberhuber, G.; Caspary, W.; Kirchner, T.; Borchard, F.; (2001) „Empfehlungen zur Zöliakie-/Spruediagnostik“ Pathologe; <u>22</u> ; 72 – 81
115	Olerup, O.; Zitterquist, H.; (1992) „HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation.“ Tissue Antigens; <u>39</u> ; 225 – 235

LITERATURVERZEICHNIS

116	Pare, P.; Douville, P.; Caron, D.; Lagace, R.; (1988) „Adult coeliac sprue: changes in the pattern of clinical recognition. “ Gastroenterology; <u>10</u> ; 395 - 395
117	Parham, P.; (1999) “Pathways of antigen processing and presentation” Immunol.Rev.; <u>172</u> ; 28 - 32
118	Partanen, J.; Miller, C.; Campbell, R. D.; Maki, M.; (1993) „HLA linked heat shock protein 70 gene polymorphism and celiac disease. Tissue Antigens; <u>41</u> ; 15 – 19
119	Paulley, L. W.; (1954) „Observations of the aetiology of idiopathic steatorrhoea.“ BMJ; <u>2</u> ; 1318 - 1321
120	Pena, L.; Torres, M. J.; Déniz, M. C.; Ortigosa, L.; Ramos, J. C.; (2003) “Assesment of the DQ Heterodimer Test in the Diagnosis of Celiac Disease in the Canary Islands (Spain).” J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.; <u>37</u> ; 604 - 608
121	Pender, S. et al.; (1997) „A major role for matrix metalloproteinase in T-cell injury in the gut. “ J.Immunol.; <u>158</u> ; 1582 - 1590
122	Persson, L. A.; Ivarsson, A.; Hernell, O.; (2002) „Breast-feeding protects against celiac disease in childhood – epidemiological evidence. “ Adv.Exp.Med.Biol.; <u>503</u> ; 115 - 123
123	Petronzelli, F. et al.; (1997) „Genetic contribution of the HLA region to the familial clustering of coeliac disease. “ Ann.Hum.Genet.; <u>61</u> ; 307 - 317
124	Pinals, R. S.; (1986) “Arthritis associated with gluten sensitive enteropathy” J.Rheumatol.; <u>13</u> ; 201 - 201
125	Pittschieler, K.; Ladinser, B.; (1996) „Coeliac disease: screened by a new strategy. “ Acta.Paediatr.Suppl.; <u>412</u> ; 42 - 45
126	Ploski, R.; Ascher, H.; Sollid, L. M.; (1996) „HLA genotypes and the increased incidence of coeliac disease in Sweden. “ Scand.J.Gastroenterol.; <u>31</u> ; 1092 – 1097
127	Pocecco, M.; Ventura, A.; (1995) “Coeliac disease and insulin-dependent diabetes mellitus: a casual association.” Acta.Paediatr.; <u>84</u> ; 1432 – 1433
128	Polvi, A.; Arranz, E.; Fernandez-Arquero, M.; (1996) „HLA-DQ2-negative celiac disease in Finland and Spain. “ Hum.Immunol.; <u>59</u> ; 169 - 175
129	Polvi, A.; Eland, C.; Koskimies, S.; et al.; (1998) HLA-DQ and DP in Finnish families with coeliac disease. “ Eur.J.Immunogenet.; <u>23</u> ; 221 - 234

LITERATURVERZEICHNIS

130	Popat, S. et al.; (2002) „Analysis of the CTLA4 gene in Swedish coeliac disease patients. “ J.Scand.Gastroenterol.; <u>37</u> ; 28 - 31
131	Quiagen-Vertrieb Telefonische Auskunft vom 25 Januar 2005
132	Rammensee, H. G.; Bachmann, J.; Stevanovic, S.; (1997) „MHC ligands and peptide motifs. “ Springer, New York
133	Rioux, J. D. et al.; (2001) „Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohns disease. “ Nature Genetics; <u>29</u> ; 223 - 228
134	Risch, N.; (1987) „Assessing the role of HLA linked and unlinked determinants of disease. “ Am.J.Hum.Genet.; <u>40</u> ; 1 - 14
135	Roche, J.; (1962) „Wissenschaftliche Tabellen“ Geigy AG
136	Rubin, C.; Brandborg, L. L.; Phelps, P. C.; Taylor, H. C.; (1960) „Studies of celiac disease. Part I. The apparent identical and specific nature of the duodenal and proximal jejunal lesion in celiac disease and idiopathic sprue. “ Gastroenterology; <u>38</u> ; 28 - 38
137	Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S. J.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A.; (1988) „Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostabile DNA polymerase.“ Science; <u>239</u> ; 487 – 491
138	Sanchez-Albisa, I.; Storm, W.; Wäscher, I.; Stern, M.; (2002) “How frequent is celiac disease in Down syndrome ?” Eur.J.Pediatr.; <u>12</u> ; 683 - 684
139	Saukkonen, T.; Savilathi, E.; Reijonen, H.; Ilonen, J.; Tuomilehto-Wolf, E.; Åkerblom, H. K.; (1996) “Coeliac disease: frequently provoked after clinical onset of insulin dependent diabetes mellitus.” Diabet.Med.; <u>13</u> ; 464 - 470
140	Savilathi, E.; Reunala, T.; Mäki, M.; (1992) “Increase of lymphocytes bearing the gamma/delta T-cell receptor in the jejunum of patients with dermatitis herpetiformis.” Gut; <u>33</u> ; 206 – 211
141	Schuppan, D.; (2000) „Current concepts of celiac disease pathogenesis. “ Gastroenterology; <u>119</u> ; 234 - 242
142	Shan, L.; Mollberg, Ø.; Parrat, I.; Hausch, F.; Filiz, F.; Gray, M.; (2002) „Structural Basis for Gluten Intolerance in Celiac Sprue.“ Science; <u>297</u> ; 2275 – 2279

LITERATURVERZEICHNIS

143	Shmerling, D. H.; (1970) „Peroral intestinal mucosal biopsies in infants and children.“ Helvetia Acta Paediatrica Supplement; XXII
144	Sjöström, H. et al.; (1998) „Identification of a gliadin T-cell epitope in coeliac disease: general importance of gliadin deamidation for intestinal T-cell recognition. “ Scand.J.Immunol.; <u>48</u> ; 111 - 115
145	Sollid, L. M.; Molberg, Ø.; McAdam, S.; Lundin, K. E. A.; (1997) „Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase – guilt by association? “ Gut; <u>41</u> ; 851 - 852
146	Sollid, L. M.; (2002) “Coeliac disease, dissecting a complex inflammatory disorder.” Nat.Rev.Immunol.; <u>2</u> ; 647 – 655
147	Sollid, L.; Markussen, G.; Ek, J.; Gjerde, H.; Vartdal, F.; (2003) „Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ- α/β heterodimer. “ J.Exp.Med.; <u>169</u> ; 345 - 350
148	Spencer, J.; Issacson, P. J.; Diss, T. C.; MacDonald, T. T.; (1989) Expression of disulfide-linked and non-disulfide-linked forms of the T-cell receptor gamma/delta heterodimer in human intestinal intraepithelial lymphocytes. “ Eur.J.Immunol.; <u>19</u> ; 1335 - 1338
149	Stenhammer, L.; Fällström, S. P.; Jansson, G.; Jansson, U.; (1986) “Coeliac disease in children with short stature without gastrointestinal symptoms.” Eur.J.Pediatr.; <u>145</u> ; 185 - 186
150	Stern, M.; Bender, S. W.; Grüttner, R.; Posselt, H. G.; (1980) “Serum antibodies against gliadin and reticulin in a family study of coeliac disease.” Eur.J.Pediatr.; <u>135</u> ; 31 - 36
151	Stern, M.; Teuscher, M.; Wechmann, T.; (1996) „Serological screening for coeliac disease: methodological standards and quality control.“ Acta.Paediatr.Suppl.; <u>412</u> ; 49 - 51
152	Thomas, C.; (1945) „On the coeliac affection“ Classic descriptions of disease; Major RH, Springfield; 600 - 601
153	Tosi, R. et al.; (1983) „Evidence that celiac disease is primarily associated with a DC locus allelic specificity. “ Clin.Immunol.; <u>28</u> , 395 – 404
154	Trabace, S. et al.; (1984) „HLA-ABC and DR antigens in celiac disease. A study in a paediatric Italian population. “ Vox.Sang.; <u>46</u> ; 102 - 106

LITERATURVERZEICHNIS

155	Van de Kramer, J. H.; Weyers, H. A.; Dicke, W. A.; (1953) „Coeliac disease. An investigation into the injurious constituents of wheat in connection with their action on patients with coeliac disease“. Acta.Paediatr.Scand.; <u>42</u> ; 223 - 231
156	Van de Wal, Y.; Kooy, Y. M. C.; Drijfhout, J. W.; Amons, R.; (1996) „Peptide-binding characteristics of the coeliac disease-associated DQ ($\alpha 1^*0501$, $\beta 1^*0201$) molecule. “ Immunogenet.; <u>44</u> ; 246 - 253
157	van Rood, J. J.; van Leeuwen, A.; (1963) “Leukocyte grouping. A method and its application”. J.Clin.Invest.; <u>42</u> ; 1382 - 1390
158	Van Stirum, J.; Baerlocher, K.; Fanconi, A.; Gugler, E.; (1982) „The incidence of coeliac disease in children in Switzerland. “ Helvetia Acta Paediatrica; <u>37</u> ; 421 - 430
159	Viola, A. ; Lanzavecchia, A.; (1996) “T-cell activation determined by T-cell receptor number and tunable thresholds.” Science; <u>273</u> ; 104 – 106
160	Vogelsang, H.; Wyatt, J.; Penner, E.; Lochs, H.; (1995) “Screening for celiac disease in first degree relatives of patients with celiac disease by lactulose/mannitol test.” Am.J.Gastroenterol.; <u>90</u> ; 1838 - 1842
161	Walker-Smith; J. A.; Guandalini, S.; Schmitz, J.; Shmerling, D. (1990) „Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. “ Arch.Dis.Child.; <u>65</u> ; 909 - 911
162	Waßmuth, R.; (1995) „Einführung in das HLA-Sytem.“ Ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg; pp; 1 - 16
163	Weile, B.; Krasilnifoff, P. A.; (1993) „Extremely low incidence rate of celiac disease in the Danish population of children. “ J.Clin.Epidemiol.; <u>46</u> ; 661 - 664
164	Wildfang, S.; Knauß, M.; Stern, M.; (1992) „IgA-Endomysiumantikörper – Nachweis bei Kindern mit Zöliakie.“ Monatsschrift Kinderheilkunde; <u>140</u> ; 639 - 645
165	Woolf, B. (1955) “On estimating the relation between blood group and disease.” Ann.Hum.Genet.: <u>19</u> ; 251 – 253.
166	Yacha, S. K.; Mohindra, S.; Srivastava, A.; Krishnani, N.; (2000) „Effects of gluten-free diet on growth and small bowel histology in children with celiac disease in India. “ J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.(suppl.); <u>31</u> ; 23 - 23
167	Zimmer, K.P.; Kardorff, R.; Stern, M.; (2003) „Medizinische Befundinterpretation: HLA-Typisierung bei der Zöliakie.“

7 Tabellen

Tabelle 1: Allelfrequenzen des HLA-Komplexes in unterschiedlichen Populationen nach Baur⁹ M. B. et al.

Allel	Kaukas.	Mongoloide	Negroide	Allel	Kaukas.	Mongoloide	Negr.
A1	14.2	1.0	8.1	B55	1.6	2.1	0
A2	28.9	28.1	17.5	B56	1.1	1.5	0.3
A3	13.2	1.5	6.7	B57	2.9	0.7	2.9
A11	6.3	11.7	1.9	B58	1.8	1.9	10.7
A23	1.4	0.1	8.0	B59	0	1.2	0
A24	10.3	31.4	4.8	B60	3.8	6.5	2.3
A25	2.4	0	0	B61	2.1	11.7	1.5
A26	3.2	7.2	4.5	B62	6.1	9.6	2.6
A28	4.7	2.1	9.9	B63	0.7	0	1.9
A29	2.9	0.4	4.9	B64	1.1	0	1.3
A30	3.5	2.3	11.0	B65	2.6	0.2	1.6
A31	2.9	5.2	1.6	B67	0	0.1	0
A32	3.9	0.4	2.3	B71	0.1	0.4	0.8
A33	1.4	6.0	3.9	B72	0.3	0.5	7.1
A34	0.1	0.3	5.1	B73	0.1	0.2	0
A36	0.1	0.1	3.2	BX	4	5.9	1.5
A43	0	0	1.3				
A66	0.2	0.5	0.3	Cw1	3.3	16.3	1.0
AX	0.4	1.7	5.0	Cw2	4.1	1.0	11.9
				Cw3	12.6	27.3	8.3
B7	11.5	4.7	12.1	Cw4	11.6	5.3	14.0
B8	9.6	0.2	5.5	Cw5	6.9	0.6	3.0
B13	2.9	3.8	1.6	Cw6	8.6	3.8	12.9
B18	5.5	0.3	4.2	Cw7	24.3	12.1	24.1
B27	3.4	1.6	1.9	Cw8	3.7	0.3	3.5
B35	10.5	10.2	7.1	CX	24.9	33.3	21.3
B37	1.6	0.6	1.3				
B38	2.5	0.7	1.6	DR1	9.5	5.0	5.1
B39	2.0	0.4	0	DR2	15.8	15.1	15.1
B41	0.9	0.1	2.3	DR3	12.0	1.8	14.9
B42	0.2	0.5	5.8	DR4	12.7	21.8	7.6
B44	12.3	6.0	7.7	DR7	12.0	2.9	13.2
B45	0.4	0.1	2.3	DR8	3.0	7.3	0.8
B46	0.1	3.6	0	DR9	0.8	11.5	1.5
B47	0.2	0.4	0	DR10	0.8	0.5	2.3
B48	0	1.6	0	DR11	12.3	4.0	16.5
B49	1.8	0.3	2.3	DR12	2.0	7.2	3.4
B50	1.1	0.3	0.6	DR13	5.4	2.9	3.8
B51	6.2	7.8	1.9	DR14	5.8	6.8	10.7
B52	2.0	7.3	0.6	DRX	7.9	13.2	5.1

TABELLEN

Tabelle.2: Auflistung der bis 2004 bekannten HLA-Antigene und Spezifitäten nach Bodmer et al.¹³.

HLA-DQ-Antigene

HLA-Allele	ser. HLA Spz	frühere Bezeichnung	HLA-Allele	ser. HLA Spz	frühere Bezeichnung
DQA1*010101	-	DQA 1.1, 1.9	DQB1*0304	DQ7	DQB1*03HP, *03new
DQA1*010102	-	DQA1*0101	DQB1*030501	DQ8	DQB1*03KC
DQA1*010201	-	DQA 1.2, 1.19, 1.AZH	DQB1*030502	-	-
DQA1*010202	-	-	DQB1*0306	DQ3	DQB1*MAT
DQA1*0103	-	DQA 1.3, 1.18, DRw8-DQw1	DQB1*0308	-	-
DQA1*010401	-	-	DQB1*0309	-	DQ3 Var
DQA1*010402	-	DQA1*new	DQB1*0310	DQ8	DQB1*03new
DQA1*0105	-	-	DQB1*0311	-	-
DQA1*0106	-	183DQA1	DQB1*0312	-	-
DQA1*0201	-	DQA 2, 3.7	DQB1*0313	-	-
DQA1*030101	-	DQA 3, 3.1,	DQB1*0401	DQ4	DQB 4.1, Wa
DQA1*0302	-	DQA 3, 3.1, DR9-DQw3	DQB1*0402	DQ4	DQB 4.2, Wa, E1448
DQA1*0303	-	-	DQB1*050101	DQ5	DQB 1.1, DRw10-DQw1.1
DQA1*0401	-	DQA 4.2, 3.8	DQB1*050102	DQ5	DQB1*05COT
DQA1*050101	-	DQA 4.1, 2, dJ93N13	DQB1*050201	DQ5	DQB 1.2, 1.21
DQA1*050102	-	DQA 4.1, 2	DQB1*050202	-	-
DQA1*0502	-	-	DQB1*050301	DQ5	DQB 1.3, 1.9, 1.3.1
DQA1*0503	-	-	DQB1*050302	DQ5	DQB 1.3, 1.9, 1.3.2
DQA1*0504	-	DQA1*05YD, DQA05MC	DQB1*0504	DQ5	DQB 1.9
DQA1*0505	-	DQA 4.1, 2	DQB1*060101	DQ6	DQB 1.4, 1.12
DQA1*06010	-	DQA 4.3	DQB1*060102	DQ6	DQB1*0601v a
DQA1*060102	-	-	DQB1*060103	DQ6	DQ06W649R
DQB1*0201	DQ2	DQB 2	DQB1*0602	DQ6	DQB 1.5, 1.2
DQB1*0202	DQ2	DQB 2	DQB1*0603	DQ6	DQB 1.6, 1.18
DQB1*0203	DQ2	DQB1*02DL, DQB1*GHA30	DQB1*060401	DQ6	DQB 1.7, 1.19
DQB1*030101	DQ7	DQB 3.1, DQ0301W515	DQB1*060402	DQ6	DQB1*0604
DQB1*030102	DQ7	DQB1*03GPT	DQB1*060501	DQ6	DQB 1.8, DQBSLE,

TABELLEN

					1.19b, 2013-24
DQB1*0302	DQ8	DQB 3.2	DQB1*060502	DQ6	DQB1*MDvR-1
DQB1*03032	DQ9	DQB 3.3	DQB1*0606	-	DQB1*WA1
DQB1*03033	DQ9	DQB1*03New			

Tabelle 3: Assoziationen zwischen DR- und DQ-Antigenen nach Kiefel⁷⁵.

DQ	assoziierte DR-Antigene
DQ1	DR1, DR2, DR6, DR10
DQ2	DR7, DR17
DQ3	DR5, DR9, DR4 (meist)
DQ4	DR8, DR4 (selten)

TABELLEN

Tabelle 4: Serologisch definierte supertypische und subtypische Charakteristika von HLA-A, HLA-B und HLA-C Antigenen nach Kiefel⁷⁵.

supertypische Merkmale	subtypische Merkmale		supertypische Merkmale	subtypische Merkmale
A1			A11	
A2			A19	A29, A30, A31, A32, A33, A74
A203			A28	A68, A69
A210			A36	
A3			A43	
A9	A23, A24		A80	
A10	A25, A26, A34, A66			
supertypische Merkmale	subtypische Merkmale		supertypische Merkmale	subtypische Merkmale
B5	B51, B52		B46	
B7			B47	
B703			B48	
B8			B5102	
B12	B44, B45		B5103	
B13			B53	
B14	B64, B65		B59	
B15	B62, B63, B75, B76, B77		B67	
B16	B38, B39		B70	B71, B72
B17	B57, B58		B73	
B18			B78	
B21	B49, B50		B81	
B22	B54, B55, B56		Bw4	
B27			Bw6	
B2708				
B35			Cw1	
B37			Cw2	
B3901			Cw3	Cw9, Cw10
B3902			Cw4	
B40	B60, B61		Cw5	
B4005			Cw6	
B41			Cw7	
B42			Cw8	

TABELLEN

Tabelle 5: Wichtige kreuzreagierende Gruppen der HLA-A und HLA-B Antigene nach Kiefel⁷⁵.

CREG	Assoziierte Genprodukte
1C	A1, 3, 9, 10, 11, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 43
2C	A2, 28, 9, B17
28C	A28, 33, 34, 26
5C	B5, 53, 35, 18, 70, 15, 17, 21
12C	B12, 21, 40, 13, 41
7C	B7, 22, 27, 40, 13, 42, 47, 48
22C	B22, 16, 67, 42
8C	B8, 14, 18, 59, 16, 51

Tabelle 6: Zuordnung der „breit“ reagierenden Determinanten Bw4 und Bw6 zu HLA-A und HLA-B Antigenen nach Kiefel⁷⁵.

HLA-Bw4	HLA-Bw6	HLA-Bw4	HLA-Bw6	HLA-Bw4	HLA-Bw6	HLA-Bw4	HLA-Bw6
B5			B41	B58			B76
	B7		B42	B59		B77	
	B8	B44(12)	B45(12)		B60(40)		B78
B13			B46		B61(40)		B81
	B14	B47			B62(15)		
B17			B48	B63		A9	
	B18	B49(21)	B50(21)		B64(14)	A23(9)	
	B22	B51(5)			B65(14)	A24(9)	
B27		B52(5)			B67	A25(10)	
	B35	B53			B70	A2403	
B37			B54(22)		B71(70)	A32(19)	
B38	B39(16)		B55(22)		B72(70)		
	B40		B56(22)		B73		
		B57(17)			B75(15)		

Tabelle 7: *Ausgewählte Beispiele von HLA-Assoziationen mit Erkrankungen nach Waßmuth¹⁶².*

HLA-assoziierte Krankheiten	HLA-Merkmal	HLA-Antigen-Frequenz (%)		
		bei Erkrankten	bei Gesunden	relatives Risiko
Rheumatologie				
Morbus Bechterew	B27	90%	9%	91
Morbus Reiter	B27	79%	9%	38
Akute vord. Uveitis	B27	52%	9%	11
rheumatoide Arthritis	B27	42%	9%	11
Dermatologie				
Psoriasis vulgaris	Cw6	74%	26%	35
Morbus Behcet	B51	41%	10%	8
Neurologie				
Myasthenia gravis	DR3	50%	28%	4
Endokrinologie				
subaktive Thyreoditis	B35	70%	15%	18
Gastroenterologie				
idiop. Hämochromatose	A3	76%	28%	8

relatives Risiko = Anzahl der Patienten mit dem assoziierten HLA-Merkmal x Anzahl HLA-negativer Kontrollen / Anzahl Patienten ohne x Anzahl Kontrollen mit dem assoziierten HLA-Merkmal.

Tabelle 8: Historischer Rückblick über die „Meilensteine“ der Zöliakiediagnostik.

Erster Bericht einer Malabsorptionsstörung, ähnlich der heutigen Zöliakie.	Aretaeus von Kappadochia 2. Jahrhundert AD ¹⁵² .
Erste detaillierte klinische Beschreibung der Zöliakie.	Gee ⁴¹ 1888
Erste Beschreibung der charakteristischen Mukosaläsion der Zöliakie.	Benecke ¹¹ 1910
Erste erfolgreiche Diät bei Zöliakie, bestehend aus Früchten, Gemüse und Milchpulver.	Haas ⁵⁴ 1924-1932
Weizen und verwandte Cerealien als Trigger der Zöliakie.	Dicke ³² 1950
Identifikation von Gluten als toxisches Agens der Zöliakie.	Van de Kramer ¹⁵⁵ 1953
Villöse Atrophie und Kryptenhyperplasie als pathognomonische Läsion der Zöliakie:	Paulley ¹¹⁹ 1954
Zöliakie und die nicht tropische Sprue haben die gleiche Pathogenese, Einsatz der Watson-Kapsel zur Biopsie.	Rubin ¹³⁶ 1960
Genetische Assoziation der Zöliakie	McDonald ¹⁰¹ 1965
Gliadin triggert die Cytokinfreisetzung bei Zöliakie.	Ferguson ³⁹ 1975
Zöliakie im Zusammenhang mit HLA-D.	Howell ⁶⁴ 1986
HLA-DQ2 ist in Bezug zu Zöliakie in cis oder trans kodiert.	Sollid ¹⁴⁷ 1989
Intraepitheliale γ / δ -T-Zellen sind charakteristisch für Zöliakie .	Spencer ¹⁴⁸ 1989
Postulierung der fünf Phasen der Mukosa-Progression.	Marsh ¹⁰⁰ 1992
Isolation von Gliadin spezifischen HLA-DQ2 T-Zellen aus der intestinalen Mukosa von Patienten mit Zöliakie.	Lundin ⁹³ 1993

Tabelle 9: Übersicht der mit Zöliakie assoziierten Erkrankungen, nebst RR und Prävalenz.

1. Erkrankungen mit gesicherter Assoziation (vielfach belegt).

Erkrankung	Prävalenz (P), bzw. relatives Risiko (RR)	Literaturangaben
Dermatitis herpetiformis		124, 140
Insulinpflichtiger Diabetes mellitus	P: 0,0 – 5,6%	31,43,127,139,65
IgA-Mangel	RR: 10 – 20% P: 7,7%	20, 105,
Verwandte ersten Grades	P: 1,9 – 18,0%	14, 150, 98, 70

2. Erkrankungen mit wahrscheinlicher Assoziation (mehrere Studien, die ein statistisch signifikant erhöhtes Risiko belegen).

Down Syndrom	P: 1,6 – 16,9%	138, 43
Minderwuchs	P: 2,6 – 8,3%	81, 149
Autoimmunthyreoditis	RR: 2	21
Asthma oder atopische Erkrankungen	RR: 1 – 5,8	21
Epilepsie und zerebrale Kalzifikationen		45

3. Erkrankungen mit möglicher Assoziation (Fallberichte).

Morbus Addison		21
Dementia		77
Sarkoidose		77
chronische Lebererkrankungen		57
rheumatische Erkrankungen	P: 0,4 – 2,5 %	21, 86

Tabelle 10: Prävalenz der Zöliakie, basierend auf epidemiologischen Screening-Studien, oder anhand der klinischen Diagnose.

Geographisches Gebiet	Prävalenz anhand der klinischen Diagnose ^a	Prävalenz anhand der Screening-Daten
Brasilien ⁴⁰	?	1:400
Dänemark ¹⁶³	1:10,000	1:500
Finnland ⁸²	1:1000	1:130
Deutschland ¹²⁵	1:2300	1:500
Italien ¹⁶	1:1000	1:184
Niederlande ²⁶	1:4500	1:198
Norwegen ⁶²	1:675	1:250
Slowenien	?	1:550
Schweden ⁴	1:330	1:190
Großbritannien ⁶⁸	1:300	1:112
USA ⁴⁴	1:10,000	1:111
Welt (Durchschnitt) ¹⁶⁶	1:3345	1:266

a: klassische gastroenterologische Symptome.

Tabelle 11: Mögliche klinische Manifestationsformen der Zöliakie nach Fasano³⁷

Typische Symptome	Atypische Symptome	Assoziierte Erkrankungen
Chron. Diarrhoe	A: Malabsorptionsbedingt	IDDM
Meteorismus	Sideropenische Anämie	Autoimmune Thyreoiditis
Flatulenz	Kleinwuchs	Autoimmune Hepatitis
Malabsorptionssyndrome	Osteopenie	Sjögren-Syndrom
Hypovitaminosen	Rekurrente Aborte	Morbus Addison
Gedeihstörungen	Hepatische Steatosis	Down Syndrom
Verdrießlichkeit	Rekkurente abdominelle Beschwerden.	Autoimmune atrophische Gastritis
	Flatulenz	Turner Syndrom
	B: Nicht Malabsorptionsbedingt:	Kongenitale Herzfehler
	Dermatitis herpetiformis	Williams Syndrom
	Zahnschmelz-Hypoplasie	IGA-Mangel
	Ataxie	
	Alopezie	
	Primäre Billiäre Zirrhose	
	Hypertransaminasen	
	Rekkurente aphtöse Stomatitis	
	Myasthenia gravis	
	Recurrente Pericarditis	
	Psoriasis	
	Polyneuropathie	
	Epilepsie	
	Vasculitis	
	Dilatative Kardiomyopathie	

Tabelle 12: Klassifikation der Dünndarmmukosa nach Marsh¹⁰⁰, modifiziert nach Oberhuber¹¹⁴.

	Zotten	Krypten	IEL ¹
Marsh 0	Normal	Normal	< 40
Marsh 1	Normal	Normal	> 40
Marsh 2	Normal	Hyperplasie	> 40
Marsh 3 a	PVA ²	Hyperplasie	> 40
Marsh 3 b	SVA ³	Hyperplasie	>40
Marsh 3 c	TVA ⁴	Hyperplasie	>40

¹IEL – intraepitheliale Lymphozytenzahl/100 Enterozyten

²PVA – partielle Zottenatrophie

³SVA – subtotale Zottenatrophie

⁴TVA – totale Zottenatrophie

Tabelle 20: Phänotypen gegliedert nach klinischer Präsentationsform, Geschlecht, EMA und Typus der Zottenatrophie.

Tabelle A: Klassische Präsentationsform weiblich.

Tabelle B: Klassische Präsentationsform männlich.

Tabelle C: Subklinische Präsentationsform weiblich.

Tabelle D: Subklinische Präsentationsform männlich.

Tabelle: A

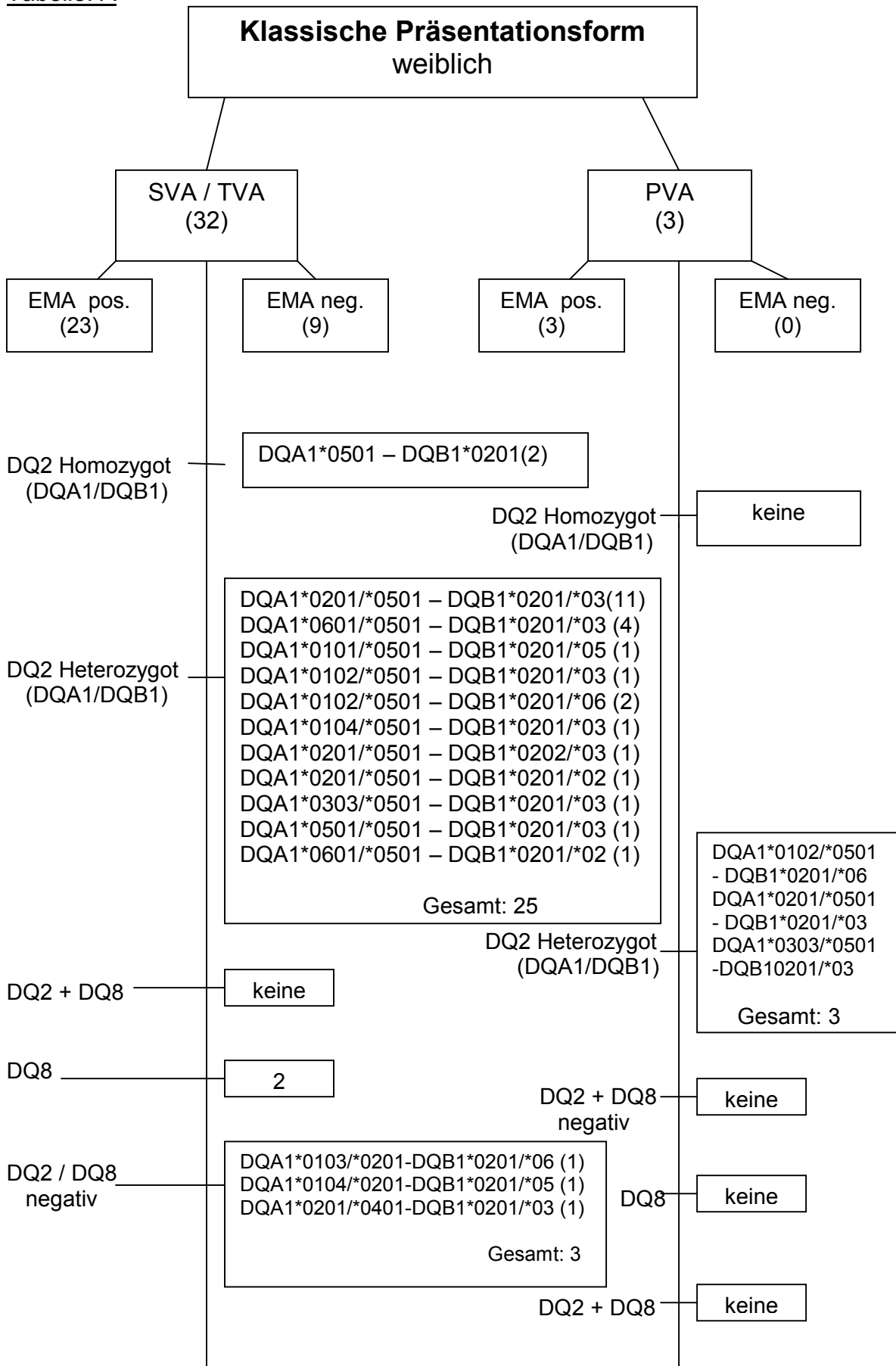


Tabelle: B

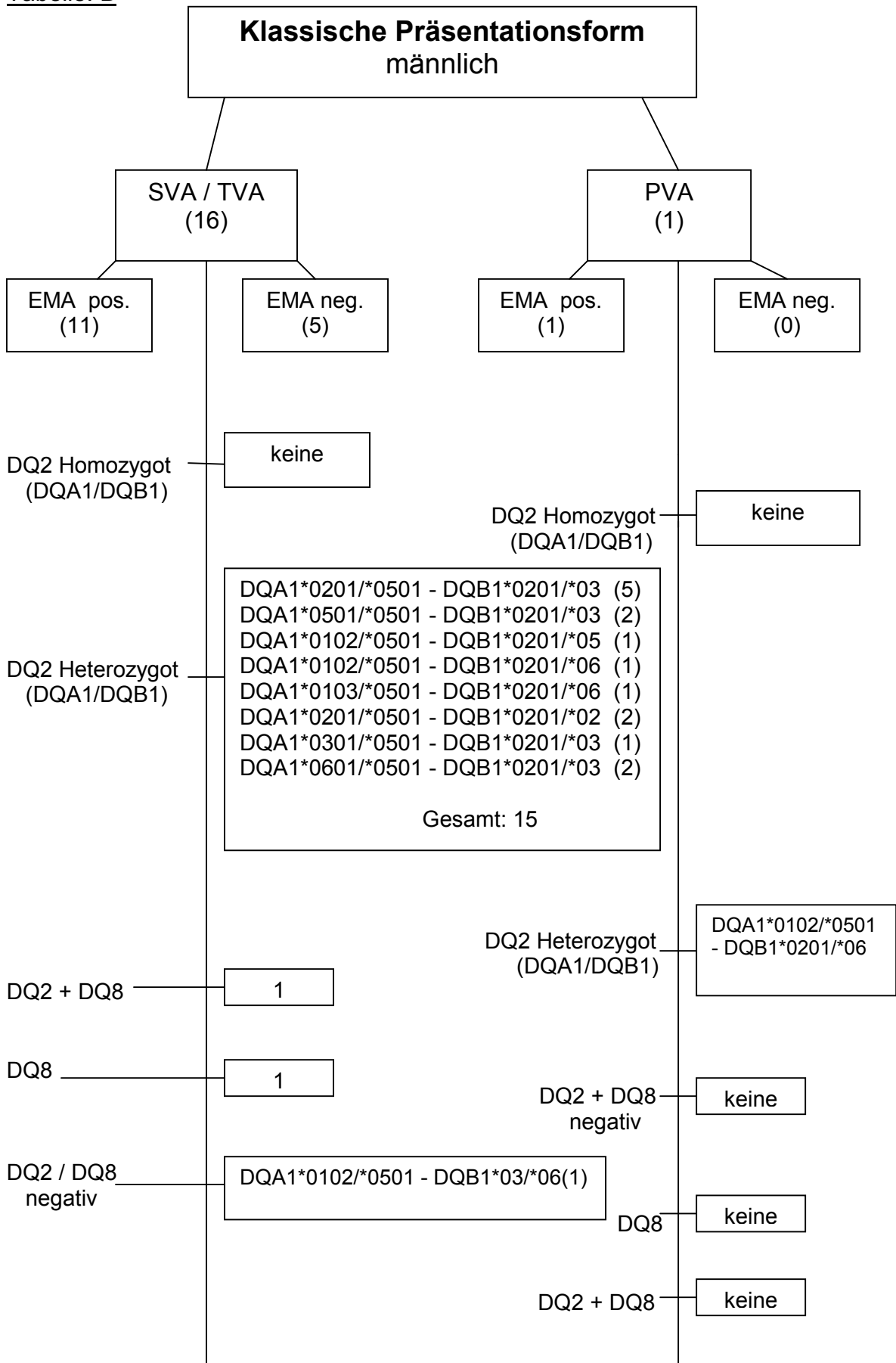


Tabelle: C

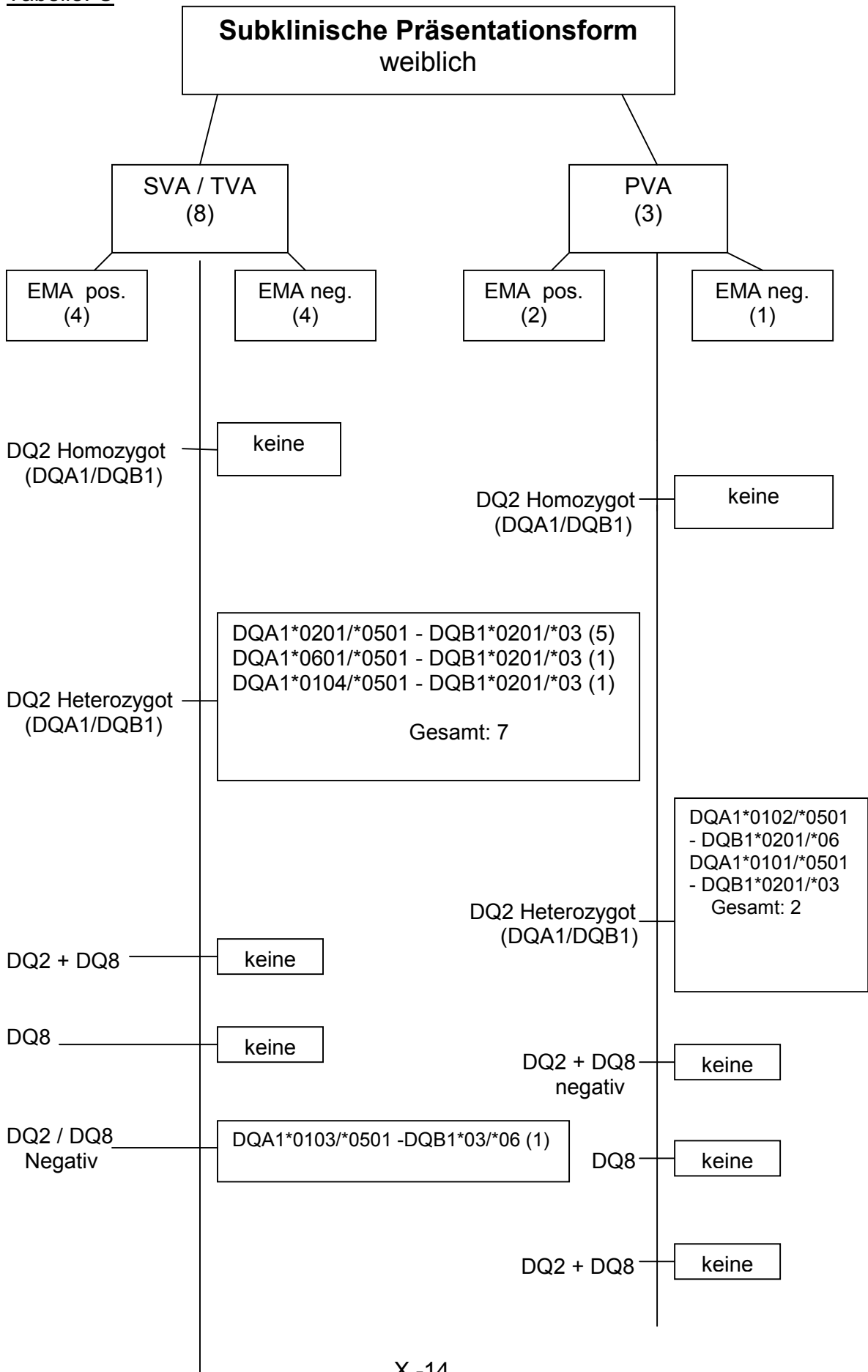
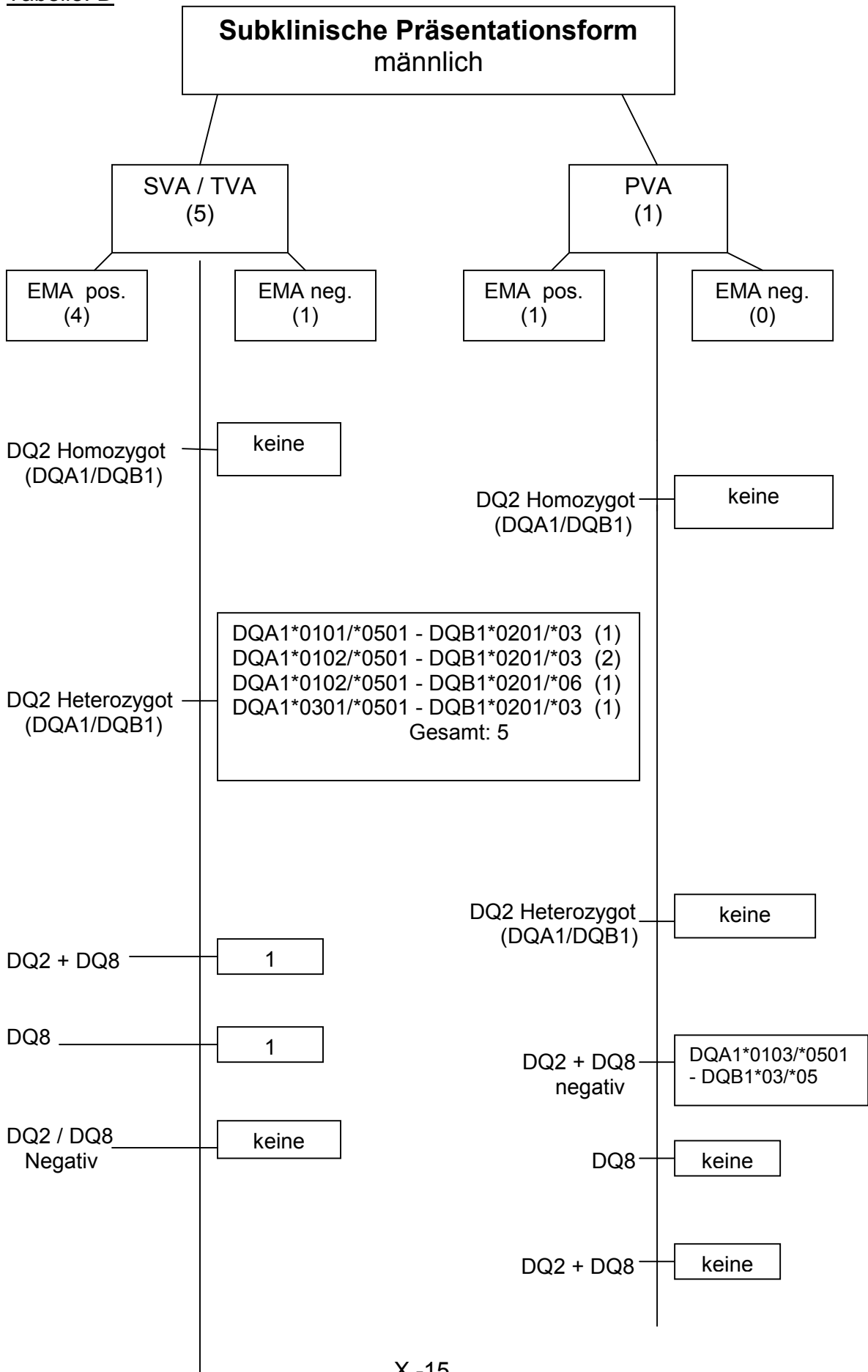


Tabelle: D



TABELLEN

Tabelle: 21 Retrospektive Klinik in Relation zur genetischen Analyse.

	Gesamt	DQ2/DQ2	DQ2 Heterozygot	DQ8
Geschlecht (♂/♀)	23/46	1/1	20/38	0/2
EMA (pos./neg.)	49/20	2/0	42/16	2/0
Alter beim Auftreten der Symptome	1376 T = 3 ^{10/12} J	891 T = 2 ^{5/12} J	1211 T = 3 ^{4/12} J	2796 T = 7 ^{8/12} J
Alter zum Zeitpunkt der Diagnose	1609 T = 4 ^{6/12} J	914 T = 2 ^{6/12} J	1581 T = 4 ^{4/12} J	2847 T = 7 ^{10/12} J
Intervall zwischen Symptomausbruch und Biopsie	233 T	23 T	370 T	78 T
Präsentationsform (klassisch/atypisch)	52/17	2/0	43/15	2/0
Perzentile Größe %	23	37,25	22	3
Perzentile Gewicht %	20,3	42,5	19	3
Biopsie (SVA/PVA)	61/8	2/0	52/6	2/0
Gruppengröße	69	2	58	2
	DQ2 + DQ8	DQ α double dose	DQ β double dose	DQ2 + DQ8 negativ
Geschlecht (♂/♀)	2/0	1/2	2/2	2/5
EMA (pos./neg.)	2/0	1/2	3/1	3/4
Alter beim Auftreten der Symptome	2518 T = 6 ^{11/12} J	2065 T = 5 ^{8/12} J	1237 T = 3 ^{5/12} J	1209 T = 3 ^{4/12} J
Alter zum Zeitpunkt der Diagnose	2542 T = 7 J	2305 T = 6 ^{4/12} J	1706 T = 4 ^{8/12} J	1361 T = 3 ^{9/12} J
Intervall zwischen Symptomausbruch und Biopsie	24 T	240 T	469 T	152 T
Präsentationsform (klassisch/atypisch)	2/0	3/0	2/2	4/3
Perzentile Größe %	3	10	3	23
Perzentile Gewicht %	7	8	3	23
Biopsie (SVA/PVA)	2/0	3/0	4/0	4/3
Gruppengröße	2	3	4	7

TABELLEN

Tabelle 22: Frequenz und RR von Zöliakie bei HLA-DQ2 positiven Kaukasiern. Auflistung vorangegangener Studien.

Autoren	Land	Patientenanzahl mit Zöliakie	HLA-DQ2/DQ8 pos. Patienten mit Zöliakie n (%)	RR
Sollid et al. ¹⁴⁵ 1989	Norwegen	94	93*(99)	18,749
Congia et al. ²³ 1994	Sardinien	66	57*(86)	21,102
Ploski et al. ¹²⁶ 1996	Schweden	135	130(96)	NA
Michalski et al. ¹⁰⁶ , 1996	Irland	90	79(87)	NA
Polvi et al. ¹²⁹ , 1996	Finnland	45	45(100)	24,138
Balais et al. ⁷ , 1997	Spanien	212	210(99)	NA
Houlston et al. ⁶¹ , 1997	UK	78	70*(84)	17,653
Polvi et al. ¹²⁸ , 1998	Finnland	84	82(98)	NA
Polvi et al., ¹²⁸ 1998	Spanien	189	181(96)	NA

NA keine Daten vorhanden

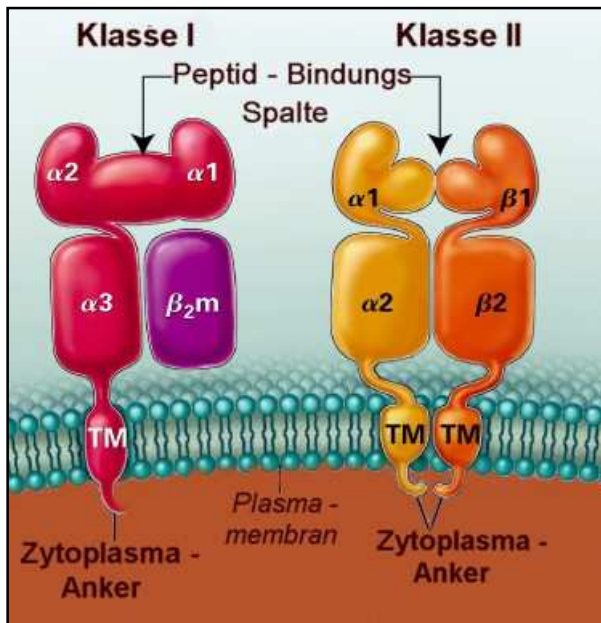
* Nur HLA-DQ2 Frequenz untersucht

8 Anhang

X-1 HLA-Klasse-I Antigene

Die HLA-Antigene der Klasse-I sind Glykoprotein-Dimere, die aus zwei nicht kovalenten Polypeptidketten bestehen. Das gebildete Dimer besteht aus einer schweren α -Kette und einer leichten β -Kette (*siehe Abb.X-1*). Die schwere Kette wird von Klasse-I Genen des HLA-Systems kodiert. Die leichte Kette hingegen, das β_2 -Mikroglobulin, wird als einziges Protein des HLA-Systems von einem Gen außerhalb des MHC-Komplexes kodiert, welches sich auf Chromosom 15 befindet. Das β_2 -Mikroglobulin ist ein monomorphes Protein mit einem Molekulargewicht von 11500 Dalton und einer Länge von 99 Aminosäuren. Die schwere α -Kette hingegen besitzt eine polymorphe Struktur, mit einem Molekulargewicht von 44000 Dalton und einer Länge von ca. 350 Aminosäuren. Die α -Kette besteht aus fünf Domänen und kann bezüglich ihrer Lage zur Zellmembran in drei funktionelle Regionen unterteilt werden. Eine extrazelluläre Region, welche die alloenen Determinanten trägt, eine transmembranöse, die der Verankerung des Moleküls in der Zellmembran dient, und eine zytoplasmatische, welche eine wichtige Rolle bei der transmembranen Signalübertragung spielt. Die extrazelluläre Region der schweren Kette ist in drei Domänen α_1 , α_2 , und α_3 gegliedert. Die α_1 - und α_2 - Domäne bilden gemeinsam eine Furche aus, die als Peptidbindungsstelle dient. An der α_3 - Domäne findet die Interaktion zwischen β_2 -Mikroglobulin und der α -Kette statt^{80, 2,87,79}. Die Klasse-I Antigene HLA-A, -B und -C sind die klassischen Transplantationsantigene und werden auch als Klasse-Ia Antigene bezeichnet, wohingegen HLA-E, -F, und -G der Klasse-Ib angehören. Sie werden mit quantitativen Unterschieden auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert^{80,87,79}. Daneben existiert in der Klasse-I Region noch eine, von dem 1998 Nomenklatur-Komitee anerkannte, Gruppe von Pseudogenen^{13,145}.

Abb. X-1 Struktur der HLA-Klasse I und Klasse II Moleküle⁷⁹.



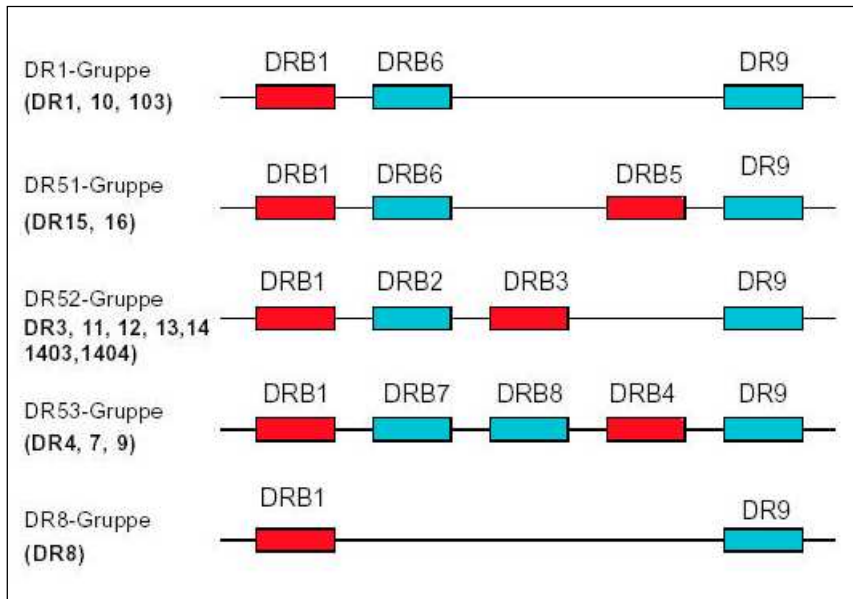
Beta2-Mikroglobulin (β_2m) ist die leichte Kette der Klasse-I Moleküle. Die α -Kette der Klasse-I Moleküle hat zwei Peptid-Bindungs-Domänen ($\alpha 1$ und $\alpha 2$), eine immunglobulinähnliche Domäne ($\alpha 3$), eine transmembranöse Region (TM) und den Zytoplasma-Anker. Jede der beiden Klasse-II α und β Ketten hat vier Domänen. Eine Peptid-Bindungs-Domäne ($\alpha 1$ oder $\beta 1$), eine immunglobulinähnliche Domäne ($\alpha 2$ oder $\beta 2$), eine transmembranöse Region und den Zytoplasma-Anker.

X-2 HLA-DR

Die komplexe chromosomale Organisation der HLA-DR Gene ist durch ein Nebeneinander von exprimierten Genen und so genannten Pseudogenen gekennzeichnet¹⁰⁹. Die HLA-DR Subregion enthält ein monomorphes Gen für die α -Kette (DRA) und neun Gene für die β -Kette (DRB1-DRB9)⁷⁵. Von den neun bekannten DRB-Loci ist HLA-DRB1 definitiv und HLA-DRB5 sehr wahrscheinlich funktionell. Es ist nicht klar ob HLA-DRB3 und HLA-DRB4 exprimiert werden, und wenn, dann nur sehr limitiert. Bei den restlichen Loci, DRB2 und DRB6 bis DRB9 handelt es sich um Pseudogene^{13,80}.

Die DR-Region variiert je nach DR-Haplotyp in Bezug auf die Anzahl der enthaltenen DRB-Gene zwischen zwei und fünf der neun existierenden DRB-Gene. Nach bisherigen Erkenntnissen bestehen fünf prinzipiell verschiedene Möglichkeiten für den Aufbau der DR-Region eines Chromosoms, hervorgerufen durch die strenge Kopplung bestimmter HLA-DR Allele^{80,79} (siehe Abb X-2). Das Gen DRB1 ist Bestandteil aller fünf, theoretisch möglichen DR-Haplotyp Gruppierungen und weist mit mittlerweile 168 identifizierten Allelen, den höchsten Polymorphismus innerhalb der HLA-D-Region auf^{80,79}. Zusammen mit den Genen DRB2-DRB9 ergibt sich ein Kodierungssystem für die diversen serologischen DR-Spezifitäten^{80,79}. DRB1-Allele, welche die Spezifitäten DR1, DR10 oder DR8 kodieren, sind mit den Pseudogenen DRB6 und/oder DRB9 gekoppelt, nicht aber mit weiteren aktiven Genen. DR-Haplotypen dieser Kategorie exprimieren folglich nur eine Art von DR-Antigen. DRB1-Allele, die für die Kodierung der übrigen Spezifitäten verantwortlich sind, liegen in Assoziation mit den Pseudogenen DRB2, DRB6-DRB9 und jeweils einem weiteren aktiven DRB-Gen, (DRB3, DRB4 oder DRB5) vor. Haplotypen dieser Kategorie sind daher in der Lage, zwei Arten von DR-Antigenen zu exprimieren^{80,79}.

Abb: X-2 Organisation der HLA-DR-Region¹³.



Pseudogene sind durch blaue Rechtecke dargestellt, exprimierte Gene durch rote Rechtecke.

DRB51-Gruppe: DRB1-Allele, welche die Spezifitäten DR15 und DR16 kodieren, liegen gekoppelt mit dem Gen DRB5 vor. Dieses Gen ist für die Ausbildung der Spezifität DR51 verantwortlich¹³.

DRB52-Gruppe: DRB1-Allele, welche die Spezifitäten DR3, DR11, DR12, DR13 oder DR14 kodieren, sind mit dem Gen DRB3 assoziiert. Dieses Gen kodiert die Spezifität DR52¹³.

DRB53-Gruppe: DRB1-Allele, welche für die Kodierung der Spezifitäten DR4, DR7 oder DR9 verantwortlich sind, werden mit dem Gen DRB4 gekoppelt, dieses wiederum exprimiert die Spezifität DR53¹³.

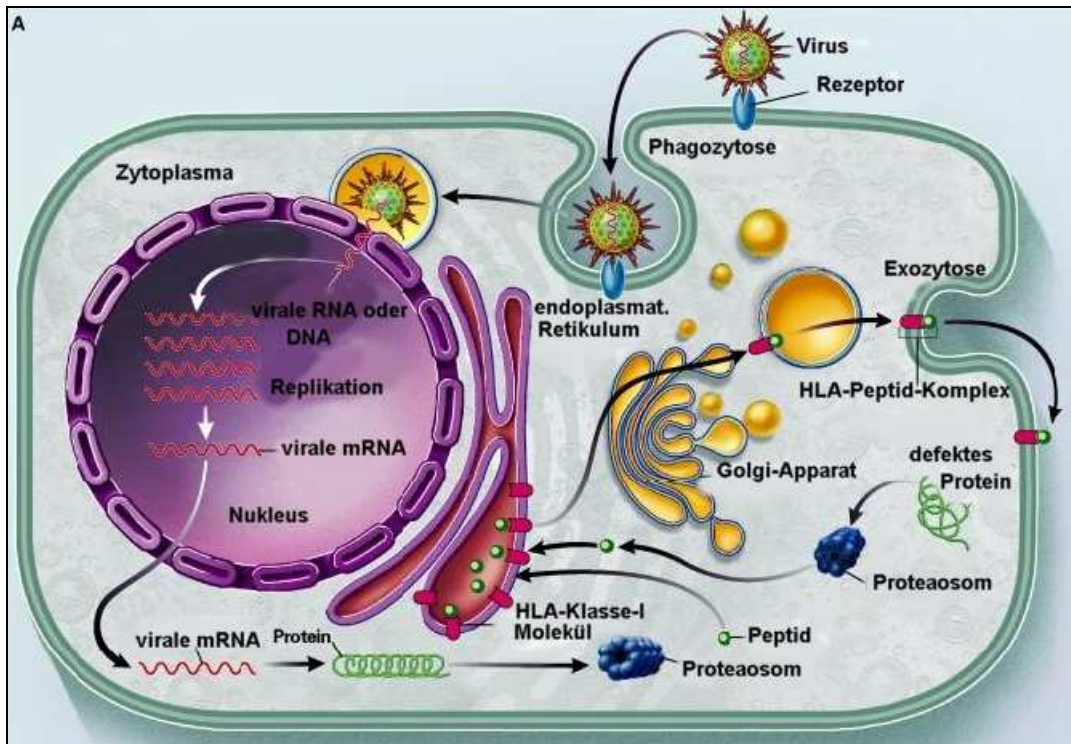
X-3 Funktion des HLA-Systems

X-3.1 Antigenprozessierung und Präsentation

Die menschliche Zelle ist mit einem überaus effizienten Recyclingsystem ausgestattet um den anfallenden Zellabfall abzubauen. Ein spezielles Molekül, Ubiquitin, markiert die nicht mehr benötigten Proteine und startet damit die so genannte Prozessierung. Die Aminosäuresequenz eines Proteins bedingt seine dreidimensionale Struktur. Spezielle Moleküle, Chaperone, sind dafür verantwortlich, dass die Tertiärstruktur der Proteine aufgelöst wird, das Molekül entfaltet sich sozusagen¹¹⁷. Proteasomen, fassförmige molekulare Strukturen, nehmen die verbleibenden Polypeptide in sich auf und verarbeiten sie zu kurzen Fragmenten (*Abb.X-3*). Die so generierten Oligopeptide werden danach entweder im Cytosol weiter zu Aminosäuren degradiert oder direkt in das endoplasmatische Retikulum abgegeben¹¹⁷. Dies trifft für körpereigene Proteine zu, mit extrazellulären Polypeptiden hingegen verfährt der Körper divergent. Diese werden in kleine Vesikel gepackt, von der Plasmamembran invaginiert und gelangen so ins Cytoplasma. Die endozytierten Vesikel fusionieren danach mit primären Lysosomen, welche eine Vielzahl von proteolytischen Enzymen beinhalten, zu Endosomen, wo die extrazellulären Proteine dann zu Peptiden und terminal zu Aminosäuren lysiert werden¹¹⁷. Dieses System der Prozessierung körperfremder Proteine muss zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Evolution etabliert worden sein⁷⁹. Im Laufe der Evolution entwickelten die Vertebraten einen neuen Mechanismus, indem sie die prozessierten, nicht homologen Peptide gezielt zur körpereigenen Abwehr gegen pathogene Organismen nutzen⁷⁹. Die körperfremden Peptide, für gewöhnlich von mikrobiologischen Erregern, werden von Zellen phagozytiert, prozessiert und danach auf der Zelloberfläche exprimiert^{79, 117}. Es ist ein raffiniertes System, um infizierte Zellen zu markieren und anschließend zu zerstören. Außer den Vertebraten gibt es keinen Organismus, der zwischen Peptiden körpereigener Proteine und Peptiden körperfremder Proteine zu unterscheiden vermag⁷⁹. Diese Differenzierung zwischen Fremd und Selbst kommt einem evolutionären Quantensprung gleich. In einer nicht infizierten Zelle fragmentieren die

„Hausmeister“ der Zelle, die Proteasomen, kontinuierlich körpereigene Polypeptide. Einige dieser Bruchstücke werden dann von speziellen Molekülen, so genannten „transporters associated with antigen processing“ oder TAPs, aufgenommen¹¹⁷. TAP1 und TAP2 Proteine bilden zusammen einen Kanal in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) und fungieren so als Transporter für die prozessierten Selbst Peptidfragmente^{79, 117}. Diese gelangen so durch den Transportkanal aus dem Cytosol auf die luminale Seite des ER, dort warten bereits, wie aufgereiht, HLA-Klasse-I Moleküle, um mit den Peptiden beladen zu werden (*Abb. X-3*)⁷⁹. Die beiden Polypeptidketten des HLA-Klasse-I Moleküls werden separat durch Ribosomen auf der cytosolischen Seite des ER produziert. Die α -Kette und das β 2-Mikroglobulin werden getrennt, durch jeweils spezifische Transportmoleküle, auf die luminale Seite des ER geschleust⁷⁹. Dort werden die beiden Prodimere von einem Komitee molekularer Chaperone, - Calnexin, Calreticulin, ERp57, und TAP-binding Protein -, in Empfang genommen^{79, 117}. Diese Moleküle gewährleisten, dass die beiden Polypeptidketten an der richtigen Position zu einem Dimer verschmelzen, und sich nicht schon vorzeitig falten. Das entstandene HLA - Klasse I Molekül wird dann von dem TAP-binding Protein zu einem entsprechenden TAP geleitet. Wenn nun ein passendes Peptid durch den TAP-Kanal geschleust wird, dockt dieses an die Peptid-Bindungs-Spalte (*Abb.X-3*) des wartenden HLA-Klasse I Molekül an⁷⁹. Das so beladene Antigen löst sich von dem TAP-Komplex und wird auf der Zelloberfläche exprimiert. Durch die transmembranöse Region der α -Kette bleibt das HLA-Klasse-I Molekül mit dem Zytoplasma verankert (*Abb.X-3*).

Abb.X-3 Antigenprozessierung und Präsentation



Die Abbildung zeigt den prinzipiellen Reaktionsweg der Antigenprozessierung autologer und viraler Proteine. Verbrauchte oder defekte Proteine werden im Cytosol durch Proteasomen zu Peptiden fragmentiert. Selektierte Peptide werden dann in das endoplasmatische Retikulum transportiert, wo sie auf neu synthetisierte Klasse-I Moleküle geladen werden. Der so gebildete HLA-Peptid-Komplex wird danach über den Golgi-Apparat zu der Zelloberfläche exportiert. In viral infiziertem Gewebe werden die viralen Partikel von der Zelle aufgenommen, „uncoated“, und die virale DNA oder RNA gelangt in den Nucleus, wo sie repliziert wird. Die virale „messenger“ RNA (mRNA) gelangt daraufhin ins Cytosol, wo sie in Proteine transkribiert wird. Einige dieser frisch synthetisierten Proteine werden noch im Cytosol von Proteosomen fragmentiert, im endoplasmatischen Retikulum an HLA-Klasse-I Moleküle gekoppelt und auf der Zelloberfläche exprimiert.

Die Prozessierung körperfremder Virusproteine ist zum oben genannten Mechanismus in einigen Aspekten divergent.

Wie die beiden Ketten der HLA-Klasse-I Moleküle, werden jene der HLA-Klasse-II Moleküle auf der cytosolischen Oberfläche des ER separat produziert, danach durch TAPs auf die luminal Seite des ER geschleust und ebenfalls mit der Hilfe molekularer Chaperone zu einem Dimer verschmolzen⁷⁹. Konträr zu den Klasse-I Dimeren werden die HLA-Klasse-II Antigene nicht im ER mit Peptiden beladen, sondern assoziieren mit einem im ER produzierten Molekül, dem „invariant chain protein“ oder ICP⁷⁹. Dieses Molekül fungiert als Platzhalter, indem es sich an die Peptid-Bindungs-Spalte andockt und somit eine vorzeitige Peptidanlagerung verhindert⁷⁹. Eingeschlossen in membranöse Vesikel

gelangen die Komplexe aus HLA-Klasse-II Proteinen und ICP in das Cytosol, wo sie mit exogenen Endosomen fusionieren⁷⁹. Dadurch werden endosomale Proteasen aktiviert, welche die exogenen Proteine lysieren. Das ICP wird daraufhin von spezialisierten HLA-Klasse-II Molekülen (HLA-DM) aus der Peptid-Bindungs-Spalte gelöst und ein passendes, exogenes Peptid nimmt dessen Position ein⁷⁹. Das somit mit körperfremdem Peptid beladene HLA-Klasse-II Molekül wird daraufhin auf der Zelloberfläche exprimiert.

Die Prozessierung körpereigener Proteine ist ein kontinuierlicher Ablauf, der bis auf Neuronen, Myokardzellen und Zellen des exokrinen Pankreas, in allen somatischen Zellen stattfindet, da zu jedem Zeitpunkt beschädigte oder verbrauchte Selbst Proteine ersetzt werden müssen^{80, 2, 79}. Antigene der Klasse-II hingegen werden nur auf bestimmten immunogenen Zellen exprimiert^{2, 80, 79}. Zu den Antigen präsentierenden Zellen der Klasse-II gehören B-Lymphozyten, aktivierte T-Lymphozyten, Makrophagen, epidermale Langerhansschezellen, Dendritischezellen und Thymusepithelzellen. In der Gegenwart von Interferon- γ können jedoch auch andere Zellen HLA-Klasse-II Moleküle exprimieren^{79, 109}. Die meisten HLA-Moleküle stellen somit Peptidrezeptoren dar, welche nur ein spezifisches Peptid gebunden haben¹⁰⁹. Die Peptide können dabei aus Fremd-, Selbst-, und Alloantigenen stammen und werden durch oben genannte intrazelluläre Prozessierung generiert¹⁰⁹. HLA-Klasse I Moleküle präsentieren überwiegend Peptide, die im Cytoplasma aus in der Zelle synthetisierten Antigenen entstehen, HLA-Klasse-II Antigene hingegen binden vor allem Peptide, die aus Antigenen des extrazellulären Raumes stammen¹⁰⁹. Das Resultat der Proteinprozessierung ist eine mit Antigen gespickte Zellmembran, mit annähernd 100,000 bis 300,000 Klasse-I oder Klasse-II Peptid-Komplexen, der exprimierten HLA-Loci^{79, 132}. Jede nicht infizierte Zelle präsentiert somit hunderttausende von Selbst-Antigenen auf ihrer Oberfläche⁷⁹. Einige dieser Peptide sind zu Tausenden vertreten, andere hingegen werden nur durch wenige Kopien repräsentiert. Jede einzelne Zelle präsentiert so ein heterogenes Sortiment von Peptiden auf ihrer Zelloberfläche⁷⁹. Es gibt supertypische Merkmale, die von Antikörpern mit einem breiten Bindungsspektrum, einer so genannten allgemeinen Spezifität, erkannt werden

und subtypische Charakteristika, welche durch Seren mit individueller Spezifität erkannt werden⁷⁵, siehe auch *Tabelle 4*.

Dies ist dadurch zu erklären, dass HLA-A, HLA-B und HLA-C Antigene mehrere Determinanten aufweisen. So kann ein HLA-A9 tragendes HLA-Klasse-I Molekül entweder für das Antigen HLA-A23 oder für HLA-A24 charakteristische Determinanten tragen⁷⁵. Vor allem zwischen Alloantigenen innerhalb einzelner Loci kommen zahlreiche Kreuzreaktionen vor. Solche Antigengruppen, gegen die besonders häufig kreuzreagierende Antikörper gebildet werden, fasst man auch in kreuzreagierende Gruppen zusammen³³, dies zeigt auch *Tabelle 5*.

Die Merkmale Bw4 und Bw6 sind Determinanten, welche auf allen HLA-B Antigenen und einigen HLA-A Antigenen nachweisbar sind⁷⁵. Dabei ist entweder Bw4 oder Bw6 auf allen HLA-B kodierten schweren Ketten der HLA-Klasse-I Antigene nachweisbar. Außerdem ist Bw4 auf allen Molekülen von HLA-A9, HLA-A25 und HLA-A32 nachweisbar⁷⁵. Die wichtigsten HLA-B Assoziationen mit Bw4 und Bw6 sind in der *Tabelle 6* aufgeführt.

X-3.2 MHC Restriktion der Immunantwort

Jede humane Zellmembran hat eine charakteristische Struktur, gespickt mit hunderttausenden von Peptid präsentierenden HLA-Antigenen. Die Zellen, welche mit diesen Peptidrezeptoren direkt interagieren, sind die T-Lymphozyten^{80, 79}. Für die Differenzierung von Vorläuferzellen zu T-Lymphozyten sind neben epithelialen Thymuszellen vor allem der T-Zell Rezeptor¹⁰⁸ und die CD4-CD8 Co-Rezeptoren³⁴ verantwortlich. Der Ligand für beide Rezeptoren ist der HLA-Peptid Komplex^{80, 79}. Der T-Zell Rezeptor interagiert direkt mit der Peptidbindungsfurche, wohingegen der CD4-CD8 Co-Rezeptor außerhalb derselben andockt^{80, 79}. Die heranreifenden T-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche sowohl CD4, als auch CD8 Rezeptoren, sie sind daher CD4+CD8+⁷⁹. Treten die T-Lymphozyten mit den HLA-Molekülen in Kontakt, so bedeutet dies die Down- beziehungsweise Up-Regulation des diametralen Co-Rezeptors. Die adulten T-Zellen sind daher entweder CD4+CD8- oder CD4-CD8+⁴⁷. Welches der beiden CD-Moleküle die jeweilige Zelle letztendlich exprimiert, wird vom T-Zell Rezeptor determiniert⁷⁹. Einige T-Zell Rezeptoren interagieren bevorzugt mit HLA-Klasse-I, andere hingegen mit HLA-Klasse-II Molekülen, abhängig von der Spezifität ihrer variablen (V) Domäne⁷⁹. Der T-Zell Rezeptor hat eine dimere Struktur, ähnlich den HLA-Antigenen, bestehend aus jeweils einer α - und einer β -Kette^{80, 79}. Jede dieser beiden Polypeptidketten besitzt eine variable und eine konstante Domäne. In der V-Domäne weisen die Segmente CDR1, CDR2 und CDR3 die höchste Variabilität an Aminosäuren auf⁷⁹. Die Nomenklatur dieser Regionen bezieht sich auf die dreidimensionale Struktur ihrer Moleküle. Diese bilden Schleifen aus, welche nach dem Prinzip der räumlichen Komplementarität, sich wie die Finger einer greifenden Hand auf den HLA-Peptid-Komplex projizieren⁷⁹. Die Variabilität von CDR3 wird größtenteils während der Maturation jeder einzelnen T-Zelle generiert, wohingegen jene von CDR1 und CDR2 vererbt werden. Die Diskriminanz des T-Zell Rezeptors ist sehr fein justiert, so kann der Austausch einer einzigen Aminosäure in der V α -Region seine Spezifität bezüglich der beiden HLA-Klassen ändern. Die α 3 Domäne der HLA-Klasse-I Peptidkomplexe interagiert mit dem T-Zellrezeptor der CD8+ Lymphozyten und definiert diese

somit als cytotoxische T-Zelle. HLA-Klasse-II Peptidkomplexe hingegen, assoziieren mit ihrer $\alpha 2$ Domäne an dem T-Zellrezeptor der CD4+ Lymphozyten und charakterisieren diese somit als T-Helferzellen¹⁰⁹.

Die progenitorialen T-Zellen differenzieren sich auf ihrem Weg durch den Thymus dahingehend, dass jeder individuelle T-Zellklon seinen spezifischen T-Zellrezeptor exprimiert⁴⁷. Im thymalen Kortex interagieren die juvenilen T-Zellrezeptoren mit den zahlreichen HLA-Peptid-Komplexen der Thymusepithelzellen. Die meisten Lymphozyten finden allerdings keinen zu ihrem T-Zellrezeptor passenden Liganden und Apoptose tritt ein. Nur jene Lymphozyten, deren T-Zellrezeptoren eine geringe Affinität zu ihrem spezifischen HLA-Peptid-Komplex aufweisen, erhalten das für ihr weiteres Fortbestehen essentielle Signal und werden somit positiv selektiert⁴⁷. Am kortikomedullären Übergang, und in der Medulla des Thymus selbst, treffen die Lymphozyten auf zahlreiche HLA-Klasse-II präsentierende Dendritische-Zellen und Makrophagen. Diese medullären, Antigen präsentierenden Zellen sind jedoch nicht nur passive HLA-Peptid-Komplexe. Sie exprimieren zusätzlich auch Moleküle mit einem kostimulatorischen Effekt auf die reifenden T-Zellen⁴⁷. Als Konsequenz entwickelt sich eine stärkere Interaktion zwischen T-Zellrezeptor und Ligand. Diese höhere Affinität zwischen HLA-Peptid-Komplex und Lymphozyt generiert ein spezifisches Signal, welches ebenfalls die Apoptose einleitet, die Zellen werden negativ selektiert. Mit diesem Prinzip entledigt sich der Körper der meisten autoreaktiven Zellen, die ansonsten eine autoimmune Reaktion initiieren könnten⁴⁷. Nur 1 % der primären Vorläuferzellen bestehen die positive und negative Selektion und verlassen den Thymus als naive T-Lymphozyten. Im Falle einer Infektion binden die T-Lymphozyten mit hoher Affinität an einen Komplex aus HLA-Molekül und fremdem Peptid und initiieren so eine Immunantwort⁷⁹. Ein einziger T-Lymphozyt besitzt über 10 000 Rezeptoren, wenn nun einige 100 dieser Rezeptoren per Ligand interagieren, so wird die T-Zelle aktiviert. Der aktivierte T-Lymphozyt differenziert sich daraufhin entweder in eine CD8+ zytotoxische T-Zelle (HLA-Komplex der Klasse-I) oder in eine CD4+ T-Helferzelle (HLA-Komplex der Klasse-II)¹⁵⁹.

X-5 Definition der Zöliakie und historischer Rückblick

Zöliakie; eine Krankheit mit vielen Namen, in der Literatur sind verschiedene Termini gebräuchlich, intestinaler Infantilismus, nicht tropische Sprue, gluteninduzierte Enteropathie, idiopathische Steatorrhoe, Herter-Heubnersche-Krankheit, um nur einige zu nennen. Dem Londoner Arzt Samuel Gee verdanken wir die an den Symptomen orientierte deskriptive Erstbeschreibung der Zöliakie in seiner Publikation „On the coeliac affection“ aus dem Jahre 1888. Er vermutete bereits damals einen „Diätfehler“ als Krankheitsursache mit einer Affektion des Dickdarms (Coelia), woraus vermutlich die Bezeichnung Zöliakie entstand⁴¹. Medizingeschichtlich lässt sich das Vorkommen der Zöliakie bis in die Zeiten Roms zurückverfolgen, wo bereits Aretaeus von Kappadochia, im zweiten Jahrhundert AD, das klinische Bild einer chronischen juvenilen Malabsorptionsstörung beschrieb¹⁵². Der deutsche Mediziner Haas führte 1921 die Pathogenese der Zöliakie auf ernährungsbedingte Faktoren zurück und kurierte die Krankheit 1924 mit einer strikten Bananendiät. Während des Zweiten Weltkrieges entdeckte der niederländische Pädiater Dicke eine Beziehung zwischen Brotkonsum und Zöliakie. Die Hungersnot führte bei vielen Patienten zu einer Remission der Zöliakie und zu einem Rezidiv der Symptome bei wiedererstärktem Brotkonsum nach Ende des Krieges³². In Zusammenarbeit mit Van der Kramer demonstrierte Dicke 1950 eine Assoziation zwischen Weizenproteiningestion und Fettmalabsorption¹⁵⁵. Auf Dicke geht auch die bis heute noch therapeutisch gültige glutenfreie Diät zurück. Mit der beginnenden per oralen, intestinalen Mukosabiopsie, durch Royer, Mitte der fünfziger Jahre des 20. Jahrhunderts, wurde man auf die intestinalen Mukosaläsionen aufmerksam.

Dies führte zu der Erkenntnis, dass die bis dahin als „Kinderkrankheit“ deklarierte Zöliakie, das gleiche pathohistologische Charakteristikum aufwies, wie die nicht tropische Sprue des Erwachsenen⁵⁵. Die pathognomonischen Mukosaläsionen gelten heute immer noch als Goldstandard dienende Methode der Zöliakiediagnostik. Einen historischen Rückblick über die „Meilensteine“ der Zöliakiediagnostik zeigt Tabelle 8.

X-6 Probanden-Einverständniserklärung

Universitätsklinikum Tübingen

Universitäts-Kinderpoliklinik

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. D. Niethammer

Abteilung Kinderheilkunde I

Prof. Dr. M. Stern

Hoppe-Seyler-Str. 1
72076 Tübingen

Telefon(++49)(07071) 298 37 81

Email: martin.stern@med.uni-tuebingen.de

Doktorand: Bernd Dreher

Telefon: 0172 7389491

Email: Bernd.Dreher@student.uni-tuebingen.de

(Raum für Patientendaten)

Aufklärungsbogen

Datum: Juni 2001

Studientitel: *Untersuchung von HLA DQ2 bei Zöliakie: Diagnostischer Nutzen*

Blutentnahme zu wissenschaftlichen Zwecken

Sehr geehrte Damen und Herren

Die Universitäts-Kinderpoliklinik führt in Zusammenarbeit mit der Medizinischen Klinik eine Untersuchung mit dem oben genannten Titel durch.

Für diese wissenschaftliche Untersuchung bitten wir Sie um eine Blutspende von insgesamt 10 ml Venenblut.

Da bei Ihnen diese Krankheit **eindeutig nicht vorliegt** dient Ihre Blutprobe als Kontrolle für eine gesunde Bevölkerungsgruppe!!!

Diese Blutmenge wird im Rahmen einer medizinisch notwendigen Routine-Blutentnahme einfach zusätzlich entnommen, das heißt **Sie werden nicht zusätzlich gestochen**, es wird nur 1 Röhrchen zusätzlich abgenommen.

Daher ist die Blutspende für Sie **mit keinem zusätzlichen Risiko oder Nebenwirkungen** verbunden. Die Daten werden nur in anonymisierter Form ausgewertet, **der Datenschutz ist gewährleistet.**

Ich habe den Aufklärungsbogen gelesen und bestätige meine freiwillige Teilnahme an der Studie. Mit der Blutspende von 10ml für die „Untersuchung von HLA DQ2 bei Zöliakie: Diagnostischer Nutzen“ bin ich einverstanden.

Datum: _____

Unterschrift: _____

9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, in der Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik (Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger) unter Betreuung von Prof. Dr. M. Stern angefertigt.

Bei Herrn Prof. Dr. R. Handgretinger und Herrn Prof. Dr. M. Stern möchte ich mich für die Überlassung des Themas sowie für die Bereitstellung der Materialien bedanken. Ganz besonders möchte ich mich bei Herr Prof. M. Stern für seine intensive Betreuung bedanken. Er stand mir mit seinen Ratschlägen, seinem Engagement und seiner fachlichen Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit jederzeit zur Seite. Vielen Dank.

Danken möchte ich auch ganz herzlich Frau Prof. Dr. C. Müller (Medizinische Klinik, Innere Medizin II, Leiterin der Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie an der Universität Tübingen) für die Bereitstellung des Labors, und ihrer überaus kompetenten fachliche Betreuung. Hierbei möchte ich mich auch ganz ausdrücklich bei Inge Steiert und Antje Petz für die Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeitsmethoden und die diversen Tipps für die Arbeit im Labor bedanken. Beide hatten für ihren „Studi“ immer ein offenes Ohr, was nicht selbstverständlich ist. Danke

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei zwei Menschen bedanken welche für mein Studium prägend waren. Meinem Onkel Peter, Dr. med. Otto Roth

— welchen ich immer bewundern und nie vergessen werde —

und Dr. med. Peter Apfelbacher, welcher als Arzt und Humanist diesen Beruf wie kein zweiter verkörpert und ein wahrer Freund unserer Familie ist.

DANKSAGUNG

Für die viele Unterstützung, die ich außerhalb des Labors erfahren habe, danke ich allen voran Christian Jung meinem Freund und Mitbewohner, der mir über all die Jahre sehr ans Herz gewachsen ist, genauso wie Christoph Hössle und Martin Gutknecht, meinem treuen Freund.

Danken möchte ich auch meinen Studienkollegen und Freunden für die wundervollen Jahre in Tübingen; Udo Decker, Björn Krämer, Tino Rieger, Jan Fritz, Fabian Maier, Stefan Reichert, Judith Junginger, Roman Alderweiereldt, Gordon Bowler, Prav Kashinathan, Timo Gentner, Ursula Kiderlen, Kathrin Fuchs, Andrea Galli, Catherine Gebhardt, Alex Klein, Kathrin Schmidt, Axel Kimmich, Martin Lämmle, Kerstin Kunz, Anette Zeiselmeier, Daniel Krause, Stefanie Joachim, Monique Ventura, Lukas Wildy, Jan Sönnichsen, Enikö, Marija, Constance, Marcel, Egges, Lobster, Nici, Annika, Jörg, Steffi, Anita, Queni, Lena, Natalie, Joe, Julia, Martina, Chrissi, — alleine hätte ich es nie geschafft !

Mein DANK gilt aber vor allem den Menschen die immer zu mir gestanden haben und denen ich diese Arbeit widme; meinen Eltern, meinen Schwestern Lucia und Barbara,..... und Dir Miriam.

Vieles war schwierig, aber ohne Euch wäre es unmöglich gewesen.

Auslandsstudien & Famulaturen

- 07 – 10 / 2001 Famulatur in Pädiatrie am Mount Sinai Hospital Medical School. New York / USA

- 12 / 2001 – 02 / 2002 Tropenmedizinisches Malaria-Forschungs-Projekt mit der DFG am Hôpital-Albert-Schweitzer. Lambarene / Gabun

- 03 – 09 / 2002 EU – Auslandsstudium „ERASMUS“ an der Universität Padua. Padua / Italien

- 09 – 10 / 2002 Famulatur in Anästhesie / HNO am General Hospital St. Helier. Jersey / Channel Islands

- 12 / 2002 – 09 / 2003 Stipendium & Studium an der Brown University Medical School.
Providence, Rhode Island / USA

Belegte Electives:

- Medicine RI General Hospital
- Accident & Emergency RI General Hospital
- Plastical Surgery RI General Hospital

- 09 – 10 / 2003 Famulatur in Plastischer Chirurgie
Bodenseeklinik Lindau Prof. Dr. W. Mang

Praktisches Jahr

- 04/2004 – 08/2004 HNO-Universitätsklinik Tübingen
HNO (Wahlfach) bei Herr Prof. Dr. Zrenner
- 08/2004 – 12/2004 Alpines Notfallzentrum & Regionalspital
Interlaken. Schweiz
Innere Medizin bei Dr. med. H. Schaad
- 12/2004 – 03/2005 BG-Unfallklinik Tübingen
Chirurgie bei Prof. Dr. K. Weise

Ärztliche Tätigkeit

- 07/2005 – 07/2006 Assistenzarzt als Senior House Officer in
Orthopedics and Trauma sowie Cardiology im
Jersey General Hospital
Jersey Chanel Islands
- 07/2006 - Assistenzarzt in der Herzchirurgie
SANA Herzchirurgische Klinik Stuttgart