

Aus der Medizinischen Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. K. Wilms

ANTIKÖRPER GEGEN SACCHAROMYCES CEREVISIAE BEI  
MORBUS CROHN - EINE FAMILIENSTUDIE

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Oliver Stich  
aus Würzburg

Würzburg, Dezember 2001

Referent: Prof. Dr. med. M. Scheurlen

Korreferent: Prof. Dr. med. W. Scheppach

Dekan: Prof. Dr. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2002

Der Promovend ist Arzt

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	3
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>4</b>
1.1 Morbus Crohn und Colitis ulcerosa: Krankheitsbild .....	4
1.2 Epidemiologie .....	5
1.3 Ätiologie und Pathogenese des Morbus Crohn.....	6
1.3.1 Genetische Faktoren .....	6
1.3.2 Umweltbedingte und alimentäre Faktoren .....	7
1.3.3 Infektiöse Faktoren .....	8
1.3.4 Immunologische Faktoren .....	9
1.4 Antikörper bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	9
1.4.1 Pankreasantikörper (PAK).....	10
1.4.2 Antikörper gegen neutrophile Granulozyten (pANCA) .....	10
1.4.3 Anti-Saccharomyces cerevisiae-Antikörper (ASCA).....	11
1.5 Problemstellung .....	13
<b>2 Patienten, Material und Methoden.....</b>	<b>14</b>
2.1 Probandenkollektiv .....	14
2.1.1 Patienten mit Morbus Crohn und ihre Angehörigen .....	14
2.1.2 Morbus Crohn-Patienten mit unterschiedlichem Befallsmuster .....	16
2.1.3 Kontrollkollektive .....	17
2.2 Versuchsmaterial .....	18
2.2.1 Chemikalien .....	18
2.2.2 Geräte .....	18
2.2.3 Zellen.....	19
2.2.4 Antiseren.....	19
2.3 Versuchsdurchführung .....	20
2.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz .....	20
2.3.1.1 Herstellung von Hefezellpräparaten zum Nachweis von ASCA .....	20
2.3.1.2 Herstellung von Granulozytenpräparaten zum Nachweis von pANCA .....	21
2.3.1.3 Antikörperdetektion mit der indirekten Immunfluoreszenz (ASCA, pANCA und PAK) .....	22
2.3.2 ELISA-Untersuchung.....	23
2.3.2.1 Kultivierung von Saccharomyces cerevisiae cerevisiae .....	23

2.3.2.2 Mannanextraktion.....	23
2.3.2.3 Antikörperdetektion im ELISA (ASCA).....	24
2.4 Statistische Methoden.....	25
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>26</b>
3.1 Prävalenz und Spezifität von ASCA in der indirekten Immunfluoreszenz und im ELISA bei Patienten mit CED und Kontrollen.....	26
3.2 Prävalenz von ASCA und pANCA in Abhängigkeit vom Befallsmuster bei Patienten mit M.C.....	31
3.3 Prävalenz von ASCA bei Familienmitgliedern von Patienten mit CED .....	33
3.3.1 Abhängigkeit von ASCA vom Geschlecht bei gesunden Angehörigen .....	35
3.3.2 Prävalenz von ASCA innerhalb der Familien .....	35
3.3.3 ASCA bei Angehörigen in Abhängigkeit vom ASCA-Status des Patienten .....	38
3.3.4 ASCA und klinische Symptomatik bei gesunden Angehörigen .....	40
3.4 ASCA und Umweltfaktoren .....	41
3.5 Korrelation von ASCA und Pankreasantikörpern (PAK) bei M.C. -Patienten.....	43
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>44</b>
4.1 Sensitivität und Spezifität von ASCA bei Patienten mit Morbus Crohn und Kontrollen.....	44
4.2 ASCA und klinische Parameter.....	45
4.3 Prävalenz von ASCA bei Familienangehörigen von CED-Patienten und Kontrollen .....	47
4.4 ASCA und mögliche Umweltfaktoren .....	51
4.5 Die Bedeutung von ASCA für die Pathogenese des Morbus Crohn.....	52
4.6 Korrelation von PAK und ASCA bei Patienten mit Morbus Crohn: .....	56
4.7 Schlußfolgerungen .....	56
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>57</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>59</b>
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>68</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AEA-15	Anti-Erythrozyten Antikörper
ASCA	Anti-Saccharomyces cerevisiae Antikörper
BSA	bovine serum albumine
C. albicans	Candida albicans
CDAI	crohn´s disease activity index
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CRP	C-reaktives Protein
C.U.	Colitis ulcerosa
ECAC	epithelial cell associated components
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
HLA	human leucocyte antigen
IEL	intraepithelial lymphocytes
Ig	Immunglobuline
IIF	indirekte Immunfluoreszenz
M.C.	Morbus Crohn
M. paratuberculosis	Mycobacterium paratuberculosis
MPRM	Mono-Poly Resolving Medium
MW	Mittelwert
n.s.	nicht signifikant
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAK	Pankreas-Antikörper
pANCA	perinukleäre anti-neutrophile cytoplasmatische Antikörper
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEG 400	Polyenthylene glycol-400
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PCR	polymerase chain reaction
SD	Standardabweichung
TI	terminales Ileum
TNF?	Tumor-Nekrose-Faktor ?
YEPD	yeast extract peptone dextrose

# 1 Einleitung

## 1.1 Morbus Crohn und Colitis ulcerosa: Krankheitsbild

Bei **Morbus Crohn** (M.C.) und Colitis ulcerosa (C.U.) handelt es sich um chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) mit schubförmigem Verlauf und mit bislang ungeklärter Ätiologie. Der Morbus Crohn wurde erstmals 1932 durch B. Crohn, L. Ginsburg und G.D. Oppenheimer in New York beschrieben. Die Krankheit ist gekennzeichnet durch einen segmentalen, diskontinuierlichen Befall des Gastrointestinaltraktes. Prinzipiell kann jeder Teil des Verdauungstraktes von der Mundhöhle bis zum Analkanal befallen werden. In 40-55% sind Dünn- und Dickdarm befallen. Eine alleinige Beteiligung des Dünndarms liegt in ca. 30-40% der Fälle vor, während ein ausschließlicher Befall des Kolons nur in 15-25% in Erscheinung tritt (Kornbluth 1998). Sehr häufig ist das terminale Ileum beteiligt, weshalb die Erkrankung auch als Ileitis terminalis bezeichnet wird.

Histologisch imponiert der M.C. als eine transmurale chronische Entzündung. Das entzündliche Infiltrat beinhaltet Histiozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen (Kornbluth 1998). Pathognomisch für den M.C. sind die nicht verkäsenden Granulome mit Epitheloid- und Riesenzellen, die allerdings nur bei ca. 60% der Patienten nachweisbar sind (Riede 1995). An der entzündlichen Reaktion sind auch die Serosa, das Peritoneum, regionale Lymphknoten und das Mesenterium, welches sich typischerweise verdickt, ödematös und verfettet präsentiert, beteiligt (Kornbluth 1998). Klinisch äußert sich die Erkrankung vor allem durch häufige Diarrhoen und Schmerzen im unteren rechten Quadranten des Abdomens, Gewichtsabnahme, Fieber und Anämie.

Als Komplikationen treten hauptsächlich Fisteln und fibrostenotische Obstruktionen auf. Die Fisteln bilden sich meist enteroenteral, ileocaecal oder ileosigmoidal, selten zwischen Kolon und oberem Gastrointestinaltrakt. Ebenso können Fisteln zur Blase, Vagina, zum Retroperitonealraum oder enterokutan entstehen (Kornbluth 1998). Weitere Komplikationen sind Obstipation, Abszesse und perianale Fissuren. Gastrointestinale Blutungen treten seltener auf als bei Colitis ulcerosa (Kornbluth 1998).

Die Erstbeschreibung der **Colitis ulcerosa** erfolgte 1859 durch Samuel Wilks in London. Im Gegensatz zu Morbus Crohn ist die Erkrankung auf Kolon, Sigmoid oder Rektum beschränkt, beginnt meist im Rektum und breitet sich kontinuierlich oralwärts aus. Histologisch überschreitet die chronische Entzündung nicht die Mukosa, nur bei einer akuten Dilatation kann sich das entzündliche Infiltrat bis in die Muskularis ausdehnen (Jewell 1998). Im Verlauf der Entzündung entstehen punktförmige Ulzera, die sich vergrößern, die Mukosa wird

hämorrhagisch und später atrophisch, sich überschießend regenerierendes Epithel bildet Pseudopolypen (Jewell 1998).

Typische klinische Symptome sind rektale Blutung, Diarrhoe mit Mukus, Blut und Eiter, Bauchschmerzen, Übelkeit und Gewichtsverlust. Eine Langzeitkomplikation der Colitis ulcerosa ist das ca. 20fach erhöhte Risiko eines Kolon-Karzinoms (Börner 1998).

Extraintestinale Manifestationen sind dem Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa gemeinsam, wobei Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, primär sklerosierende Cholangitis (PSC), entzündliche Gelenkschmerzen, häufig im Ileosakralgelenk, und entzündliche Veränderungen der Augen wie z.B. Iridozyklitis und Konjunktivitis auftreten können (Kornbluth 1998). Diese Begleiterkrankungen weisen auf ein autoimmunologisches Geschehen in der Pathogenese hin (Riede 1995).

Diagnostiziert werden der Morbus Crohn oder die Colitis ulcerosa anhand klinischer Befunde, radiologischer und sonographischer Kriterien, der Endoskopie und der Histologie von Biopsien. In den letzten Jahren wird zunehmend versucht, krankheitsspezifische Antikörper zur Differentialdiagnose zu Rate zu ziehen (Shanahan 1997).

Bei ca. 10-12% der Patienten mit chronischer Kolitis (Quinton 1998) ist eine Zuordnung mittels klinischer, endoskopischer und histologischer Kriterien nicht möglich, was als Colitis indeterminata bezeichnet wird.

## 1.2 Epidemiologie

Weltweit besteht eine geographisch unterschiedliche Prävalenz der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen: Die Inzidenz in den USA, Nordeuropa, Australien und Neuseeland ist gegenüber der übrigen Welt erhöht, vor allem der Morbus Crohn wird eher in urbanen als in ländlichen Regionen angetroffen (Börner 1998). In bestimmten Bevölkerungsgruppen, z.B. bei Juden, ist die Inzidenz ebenfalls erhöht. Über geschlechtsspezifische Unterschiede wird aber nicht berichtet (Kornbluth 1998). Während die Inzidenz der Colitis ulcerosa aktuell ein Plateau erreicht hat, erhöhte sich die des Morbus Crohn im gleichen Zeitraum (Kornbluth 1998). Für Morbus Crohn beträgt die Inzidenz 3-9/100 000, die Prävalenz 30-50/ 100 000 (Börner 1998). Die Colitis ulcerosa weist eine Inzidenz von 5/100 000 und eine Prävalenz von 50/100 000 auf (Börner 1998). CED treten vor allem bei jungen Menschen auf (Gipfel in der 2. und 3. Lebensdekade), ein zweiter Gipfel liegt im 8. Lebensjahrzehnt (Kornbluth 1998).

### 1.3 Ätiologie und Pathogenese des Morbus Crohn

Trotz jahrzehntelanger intensiver Forschung ist die Ätiologie des Morbus Crohn noch immer ungeklärt. Heute geht man davon aus, daß an der Entstehung der Erkrankung mehrere Faktoren beteiligt sind:

Einige epidemiologische und genetische Studien belegen eine genetische Disposition, ebenso scheinen Umwelteinflüsse, Ernährung, Mikroorganismen und eine Dysregulation des Immunsystems eine Rolle in der Pathogenese zu spielen (Börner 1998).

#### 1.3.1 Genetische Faktoren

Die deutlich erhöhte Inzidenz von Morbus Crohn in bestimmten Populationen ist ein wichtiger Hinweis für genetische Einflüsse in der Ätiopathogenese dieser Erkrankung. Ein Beispiel hierfür sind die Ashkenazi-Juden (Kornbluth 1998), die eine zwei- bis achtfach erhöhte Prävalenz von Morbus Crohn im Vergleich zu Kaukasiern zeigen (Brant 1998). Ein weiterer Hinweis für eine genetische Komponente bei der Ätiopathogenese ist die erhöhte Inzidenz dieser Erkrankung in Familien, die bereits Patienten mit CED aufweisen: Ca. 14% aller Patienten mit Morbus Crohn haben eine positive Familienanamnese; umgekehrt beträgt die Prävalenz von Morbus Crohn bei Angehörigen ersten Grades selbst 2,5% im Gegensatz zu 0,2% im normalen Kontrollkollektiv (Peeters 1996).

Die Wahrscheinlichkeit, an Morbus Crohn zu erkranken, ist für Geschwister von M.C.-Patienten etwa um das zehnfache erhöht (Kornbluth 1998). Der Anteil an Familien mit mehr als einem erkrankten Familienmitglied liegt zwischen 8 und 39% (Weterman 1984, Farmer 1989). So gilt es als bedeutendster Risikofaktor für eine Erkrankung an Morbus Crohn, wenn bereits ein Familienmitglied erkrankt ist (Sachar 1996).

Interessant ist, daß Morbus Crohn auch in den Familien mit Colitis ulcerosa-Patienten mit erhöhter Wahrscheinlichkeit im Vergleich zur Normalbevölkerung auftritt (Monsen 1990).

Eine Studie mit monozygoten und dizygoten Zwillingen konnte den Einfluß einer genetischen Disposition unterstreichen, da 50% der monozygoten, aber nur 3% der dizygoten Zwillinge Konkordanz für die Erkrankung aufwiesen (Kornbluth 1998). Die fehlende hundertprozentige Konkordanz bei eineiigen Zwillingen zeigt, daß es sich wahrscheinlich nicht um einen einfachen Mendelschen Erbgang handelt, sondern vielmehr eine oli- oder polygene Vererbung angenommen werden muß (Kornbluth 1998).

Die Suche nach disponierenden Genen oder genetischen Markern wie z.B. TNF $\alpha$ -Mikrosatelliten-Haplotypen (A2B1C2D4E1), die bei ca. 24% der Patienten mit Morbus Crohn

nachgewiesen werden können (Plevy 1997), erbrachte weitere Hinweise auf eine genetische Beteiligung in der Pathogenese der Erkrankung. So konnten auf dem Chromosom 16 für Morbus Crohn und auf den Chromosomen 3, 7 und 12 für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Gene für eine erhöhte Suszeptibilität gefunden werden (Sendid 1998). Geschlechtsbezogen wurden jedoch keine Unterschiede in der Inzidenz festgestellt (Kornbluth 1998).

Weiterhin zeigte sich, daß Patienten bei familiärem Auftreten von Morbus Crohn vermehrt konkordant sind bezüglich Befallsmuster und Entwicklung der Erkrankung (Bayless 1996). Auch die Tatsache, daß die Erkrankung, wenn sie auch in der zweiten Generation auftritt, sich früher manifestiert und diagnostiziert wird, könnte ein Hinweis auf eine genetische Antizipation sein. Als eine mögliche Erklärung wird eine Zunahme von Trinukleotid-Repeats in den verantwortlichen Genen angeführt (Grandbastien 1998).

Eine Verbindung von Genen des HLA-Komplexes mit Morbus Crohn scheint dagegen bei familiär auftretender Erkrankung von untergeordneter Bedeutung zu sein (Naom 1996). Die Assoziation von Morbus Crohn mit anderen Erbkrankheiten wie dem Turner-Syndrom, der ankylosierenden Spondylarthritis und der cystischen Fibrose kann als indirekter Hinweis auf eine genetische Komponente in der Ätiologie gelten (Kornbluth 1998).

### 1.3.2 Umweltbedingte und alimentäre Faktoren

Da sich die Inzidenz von Morbus Crohn in den letzten 50 Jahren stark erhöht hat, scheint dieser Anstieg auch auf andere Ursachen als genetische Faktoren zurückzuführen zu sein, da der Genpool einer Population in dieser relativ kurzen Periode in etwa konstant bleibt (Kornbluth 1998). Mehrere Umweltfaktoren wurden mit Morbus Crohn in Verbindung gebracht:

Sowohl Rauchen als auch orale Kontrazeptiva stellen einen Risikofaktor für Morbus Crohn dar: Rauchen erhöht die Wahrscheinlichkeit, an Morbus Crohn zu erkranken, um einen Faktor von zwei bis fünf, die Einnahme von oralen Kontrazeptiva verfünffacht das Risiko bei Frauen (Kornbluth 1998).

Weiterhin ist es auffällig, daß die Inzidenz von Morbus Crohn in urbanen Gebieten höher als in ländlichen Gebieten ist (Kornbluth 1998). Auch dieser Befund könnte als Hinweis auf Umwelteinflüsse gewertet werden.

Schließlich wird die These einer Beteiligung von Umwelteinflüssen dadurch unterstützt, daß chronisch entzündliche Darmerkrankungen vor allem in den westlichen Industrienationen vorkommen und daß Einwanderer, die selbst aus Populationen mit relativ geringer Prävalenz von Morbus Crohn stammen, innerhalb kurzer Zeit die Prävalenz des Gastlandes annehmen

(Kornbluth 1998). Ein häufig diskutiertes Thema in der Ätiopathogenese der Erkrankung ist die Ernährung. So scheint sie die Krankheitsaktivität zu beeinflussen, da eine Remission auch alleine schon durch Elementardiät oder parenterale Ernährung erreicht werden kann (Riordan 1993). Weiterhin wurde vermutet, daß erhöhter Zuckerkonsum, Margarine und Zahnpasta eine Rolle in der Krankheitsgenese spielen könnten (Kornbluth 1998).

### 1.3.3 Infektiöse Faktoren

Neben genetischen, immunologischen und alimentären Faktoren wurden schon früh Mikroorganismen verdächtigt, an der Ätiopathogenese des Morbus Crohn beteiligt zu sein. In Tierversuchen mit sogenannten knock-out-Mäusen mit genetisch determiniertem Immundefekt kam es erst nach Kontakt mit der Umweltflora und der damit verbundenen Darmbesiedlung zu einer spontanen Entwicklung von CED, während dies in keimfreier Umgebung ausblieb (Conner 1994). Infektiöse Faktoren könnten also eine Trigger-Rolle spielen, die vom genetisch bedingten Immundefekt zur manifesten Erkrankung führt.

Besondere Aufmerksamkeit wurde atypischen Mykobakterien, v.a. *M. paratuberculosis* gewidmet, welche in unterschiedlicher Prävalenz im Darmgewebe von M.C.-Patienten isoliert werden konnten (Kornbluth 1998). Dieses Mykobakterium ist in der Lage, bei Tieren eine granulomatöse Darmerkrankung (Johne'sche Erkrankung) zu verursachen (Kornbluth 1998). Erhöhte IgG-Titer gegen Mykobakterien treten sowohl bei Patienten als auch bei gesunden Angehörigen auf (Wayne 1992). Da aber der Therapieversuch mit Antituberkulotika keine Erfolge zeigte, ist eine Infektion mit *M. paratuberculosis* als direkte Ursache für Morbus Crohn unwahrscheinlich (Kornbluth 1998). Allerdings gibt es zwischen einem Antigen von *M. paratuberculosis* und einem humanen Glykoprotein (HSP 60) in der Darmschleimhaut eine hochgradige Homologie, sodaß es möglicherweise zu Kreuzreaktionen mit humanen Antigenen und damit zu einer Entzündungsreaktion gegen körpereigenes Gewebe kommen kann (Kornbluth 1998).

Ferner wurde das Masernvirus verdächtigt, an der Entstehung von Morbus Crohn beteiligt zu sein (Kornbluth 1998). Die intrauterine oder perinatale Infektion, aber auch die Impfung mit Lebendimpfstoff soll das Risiko, an Morbus Crohn zu erkranken, erhöhen. Allerdings konnten mit der PCR-Technik keine Virus-Transkripte im Darmgewebe von Patienten nachgewiesen werden (Van ter Meulen 1998).

In einer anderen Studie wurden anaerobe Darmbakterien, v.a. *Coprococcus comes*, mit der Ätiologie von Morbus Crohn in Verbindung gebracht (Van de Merve 1988). In der sieben Jahre dauernden Studie entwickelten ausschließlich Kinder von Patienten mit Morbus Crohn und mit

abnormaler Darmflora Symptome eines Morbus Crohn. Möglicherweise sind also anaerobe grampositive Bakterien direkt oder indirekt, indem sie die Darmbesiedelung durch pathologische Bakterien wie z.B. *M. paratuberculosis* begünstigen, an der Ätiologie der Erkrankung beteiligt (Van de Merve 1988).

#### 1.3.4 Immunologische Faktoren

Während der normale Darm in der Lage ist, eine Immunantwort gegen zahlreiche mit der Nahrung zugeführte Antigene und gegen die normale Darmflora zu unterdrücken oder in physiologischen Grenzen zu halten, kommt es bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu einer überschießenden chronischen Immunreaktion (Kornbluth 1998). Die Aufrechterhaltung der Entzündung wird bei Morbus Crohn einer Erhöhung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF zugeschrieben (Kornbluth 1998). Eine Remissionsinduktion der Erkrankung bei über 50% der Patienten unter Gabe von Antikörpern gegen TNF $\alpha$  bestätigt diesen Aspekt (Plevy 1997). Weiterhin zeigt auch das humorale Immunsystem bei Crohn-Patienten eine erhöhte Reaktivität gegen alimentäre und mikrobielle, aber auch gegen körpereigene Antigene. Auf diese Autoantikörper soll im folgenden näher eingegangen werden.

#### 1.4 Antikörper bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Da die klinische Unterscheidung zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa manchmal Schwierigkeiten bereitet, wurde schon früh versucht, serologische Parameter für die Differentialdiagnostik zu finden. So konnte im Laufe der Jahre eine Reihe von Antikörpern bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen entdeckt werden, die sich aber in der Routinediagnostik bisher noch nicht durchgesetzt haben. Diesen Autoantikörpern konnte bisher noch keine Beteiligung an der Pathogenese der CED nachgewiesen werden, aber ihre teilweise hohe Spezifität könnte ein Indikator für einen Defekt in der Immunregulation darstellen. Zu erwähnen sind in diesem Zusammenhang vor allem Antikörper gegen Lymphozyten, Antikörper gegen Becherzellen, die für Colitis ulcerosa spezifisch sind (Seibold 1991), Antikörper gegen Epithelzell-assoziierte Komponenten (ECAC), Anti-Erythrozyten-Antikörper (AEA-15), Antikörper gegen Endothelzellen und Antikörper gegen ein 40 kDa schweres Epithel-Protein (Anti-p40) (Shanahan 1997). Besondere Bedeutung verdienen Pankreasantikörper (PAK), pANCA und Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), auf deren serologischer Bestimmung die vorliegende Arbeit beruht.

#### 1.4.1 Pankreasantikörper (PAK)

Bei PAK handelt es sich um einen für Morbus Crohn hochspezifischen Antikörper, der gegen ein bisher unbekanntes Antigen (1,3 Mio Da) im Pankreassekret gerichtet ist und hauptsächlich der IgG-Klasse angehört (Seibold 1991). Diese Antikörper wurden im Jahr 1987 von Stöcker erstmals beschrieben. PAK wird mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz bestimmt und tritt in zwei verschiedenen Formen auf.

PAK I ist gekennzeichnet durch eine großtropfige Fluoreszenz im Lumen des Pankreasazinus, während PAK II durch eine feingranuläre Fluoreszenz in den Azinuszellen selbst auffällt (Seibold 1997). Die Sensitivität dieses Autoantikörpers ist mit ca. 31% niedrig (Seibold 1991). Wahrscheinlich handelt es sich bei PAK nicht um einen genetischen Marker, da PAK nicht bei gesunden Angehörigen von M.C.-Patienten gefunden wurde (Seibold 1997). Dieser Autoantikörper könnte aber bei der Aufdeckung eines noch nicht diagnostizierten Morbus Crohn hilfreich sein. Eine Korrelation von PAK mit Geschlecht, Krankheitsaktivität, extraintestinalen Manifestationen, Befallsmuster und Behandlung konnte bisher nicht festgestellt werden (Seibold 1991). Aufgrund der niedrigen Sensitivität ist bei der Differentialdiagnose von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn die Bestimmung von PAK alleine nicht sinnvoll.

#### 1.4.2 Antikörper gegen neutrophile Granulozyten (pANCA)

Bei einigen Autoimmunerkrankungen konnte im Serum der Patienten ein Antikörper festgestellt werden, der sich in der indirekten Immunfluoreszenz als perinukleäre Fluoreszenz bei neutrophilen Granulozyten darstellen ließ. pANCA finden sich in unterschiedlicher Häufigkeit bei Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis (PSC), Colitis ulcerosa, aber auch bei Morbus Crohn in geringerer Frequenz (Seibold 1994). Das Antigen, mit dem der Antikörper reagiert, ist noch unbekannt, allerdings wurde über eine Kreuzreaktivität mit bakteriellen Antigenen berichtet (Seibold 1998, J Clin Immunol).

Im Hinblick auf eine serologische Differentialdiagnose der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist es von Relevanz, daß pANCA bei 40-80% der Patienten mit Colitis ulcerosa, aber nur bei ca. 0-40% der Patienten mit Morbus Crohn auftritt und pANCA daher eine gewisse Spezifität für die Colitis ulcerosa besitzt (Seibold 1999). Während in einigen Studien pANCA auch bei ca. 30% der gesunden Angehörigen ersten Grades von Patienten mit Colitis ulcerosa nachgewiesen und aus diesem Grund als genetischer Marker postuliert wurde (Shanahan 1992, Seibold 1994), konnte dies in Studien an anderen Populationen nicht bestätigt

werden (Reumaux 1993, Lee 1995). Eine Korrelation von pANCA mit der Krankheitsaktivität wurde bisher kontrovers diskutiert, allerdings scheint pANCA öfters bei Patienten mit schwerem Verlauf der Colitis ulcerosa aufzutreten. Der pANCA-Titer bleibt auch nach Kolektomie bestehen (Seibold 1998, J Clin Immunol). Nach Vasiliauskas scheint pANCA bei Patienten mit Morbus Crohn, deren Befallsmuster sich ähnlich einer Colitis ulcerosa nur im Colon descendens präsentiert, erhöht zu sein (Vasiliauskas 1996).

#### 1.4.3 Anti-Saccharomyces cerevisiae-Antikörper (ASCA)

ASCA bezeichnet Antikörper, die gegen ein Antigen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gerichtet sind. Main beschrieb 1988 als erster diesen Antikörper als spezifisch für Morbus Crohn (Main 1988). Wie nachfolgende Studien zeigten, fanden sich keine erhöhten ASCA-Titer bei Colitis ulcerosa oder anderen Darmerkrankungen und gesunden Kontrollen (Barnes 1990, Sendid 1996, Quinton 1998, Ruummele 1998, Seibold 1999). Somit konnte ASCA als spezifischer und sensitiver Marker für Morbus Crohn bestätigt werden: In diesen Arbeiten erreichte ASCA eine Sensitivität von 60-70% und eine Spezifität von 77-95% für Morbus Crohn.

Verschiedene Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* weisen insgesamt eine erhöhte, aber jeweils unterschiedliche Reaktivität mit den Seren von M.C.-Patienten auf (McKenzie 1990, Sendid 1996), was jeweils mit einer unterschiedlichen Expression des Antigens, mit dem ASCA reagiert, zu erklären sein dürfte. McKenzie erwähnte die Mannane, essentielle Kohlenhydratketten der Hefezellwand, als wichtigste antigene Determinante der Hefezelle (McKenzie 1990). Mannoproteine bilden zusammen mit Glukanen, mit denen sie kovalent verbunden sind, mit ca. 40% des Trockengewichts den Hauptbestandteil der Hefezellwand (Klis 1994). Sie bestimmen daher die Oberflächeneigenschaften der Zelle und damit ihre dem humoralen Immunsystem zugänglichen immunogenen Determinanten (Schreuder 1996).

Heelan identifizierte 1991 ein hitzestabiles, lösliches, ca. 200 kDa schweres Glykoprotein (gp 200) mit Oligomannose-Ketten und einem Proteinanteil von 10%. Dieses Glykoprotein verlor nach Oxidation der Kohlenhydratanteile mit Periodat, einem sehr starken Oxidationsmittel, seine Immunreaktivität gegenüber Seren von M.C.-Patienten; daraus schloß Heelan, daß nicht der Proteinanteil, sondern die Kohlenhydratkette, also der Mannananteil für die Immunreaktion verantwortlich ist (Heelan 1991, Sendid 1996). In einer neueren Studie wurde beobachtet, daß das Mannan, welches mit dem Serum von M.C.-Patienten reagiert, nicht nur in der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* vorkommt, sondern auch von dieser Hefe aktiv sezerniert wird (Sander 1998). Das Antigen, mit dem Seren von M.C.-Patienten reagieren, wurde 1996 von

Sendid genauer charakterisiert: Es entspricht einem Phosphopeptidomannan, wobei die eigentliche antigene Determinante wahrscheinlich eine Mannotetraose ist und bei verschiedenen Stämmen von *Saccharomyces cerevisiae* vorkommt (Sendid 1996).

Das Auftreten von spezifischen Antikörpern bei einem Großteil der Patienten mit M.C. wirft die Frage auf, ob es sich bei ASCA um einen genetischen Marker handelt, der eine immunologische Dysregulation widerspiegelt oder ob Umweltfaktoren bei der Entstehung von ASCA eine Rolle spielen. Um diese Frage zu beantworten, wurde eine Familienstudie durchgeführt, in der die Seren von Patienten mit CED, ihre gesunden Angehörigen ersten Grades und ihre Ehepartner auf die Prävalenz von ASCA untersucht wurden.

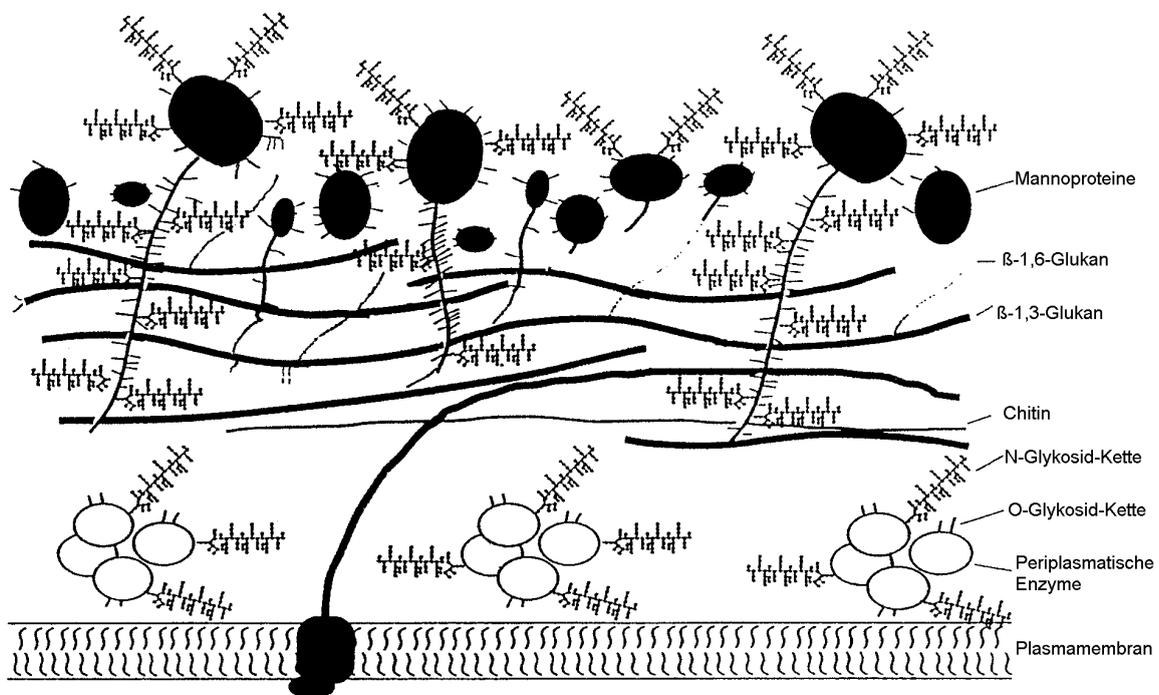


Abbildung 1: Struktur der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae*. Die äußere Schicht besteht aus Mannoproteinen und bestimmt die Oberflächeneigenschaften (nach Schreuder 1996)

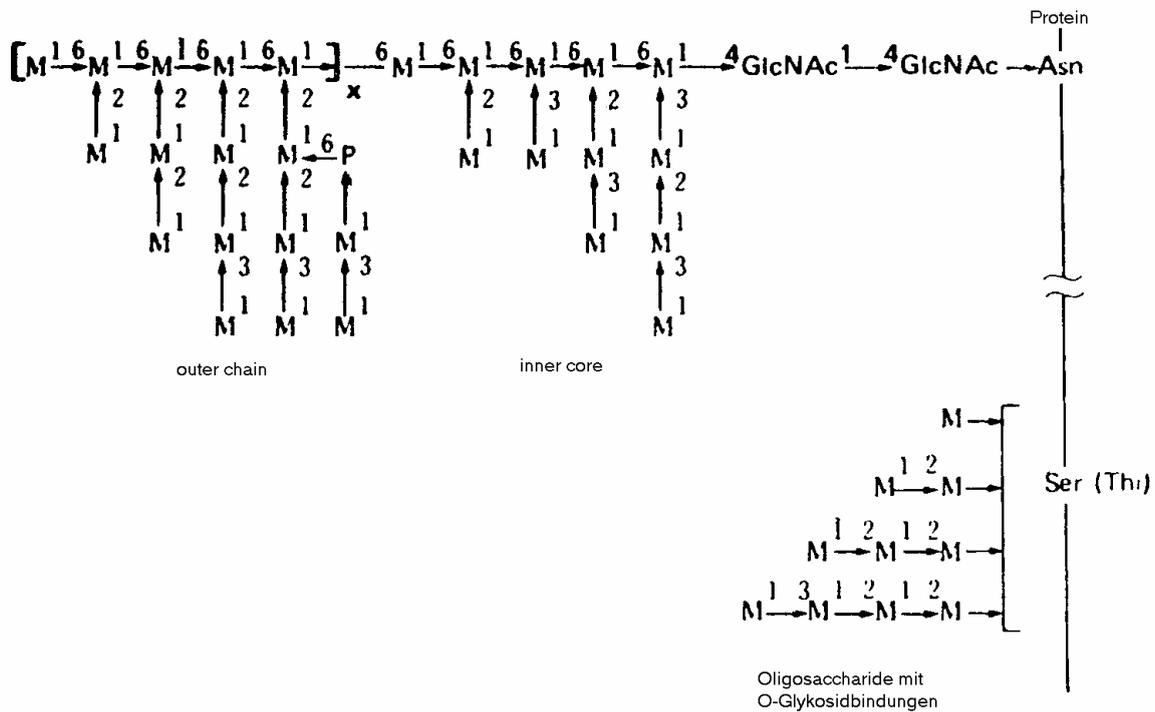


Abbildung 2: Struktur des Phosphopeptidomannans der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae*; M: Mannopyranosyl-Reste (aus Sendid 1996)

### 1.5 Problemstellung

1. Extraktion des Antigens, mit dem ASCA in der indirekten Immunfluoreszenz reagiert und Etablierung eines ELISA-Testsystems zur ASCA-Detektion
2. Prävalenz von ASCA bei Patienten mit Morbus Crohn und in Kontrollgruppen
3. Korrelation des ASCA-Status bei Patienten mit M.C. und klinischer Parameter
4. Prävalenz von ASCA bei gesunden Angehörigen ersten Grades von Patienten

## **2 Patienten, Material und Methoden**

Insgesamt wurden 569 Seren mit der indirekten Immunfluoreszenz und dem ELISA im Rahmen einer retrospektiven Blindstudie untersucht. Die Seren stammten von Patienten der Gastroenterologischen Ambulanz der Universität Tübingen, der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg und von Angehörigen der Patienten. Das Blut wurde nach Abnahme zentrifugiert, das Serum kodiert und bis zur Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Diagnose Morbus Crohn wurde anhand endoskopischer, histologischer und radiologischer Kriterien, die Diagnose Colitis ulcerosa anhand der Kriterien von Truelove und Witts (Truelove 1955) gestellt.

### 2.1 Probandenkollektiv

#### 2.1.1 Patienten mit Morbus Crohn und ihre Angehörigen

##### **M.C.-Patienten:**

Für die Familienstudie wurden die Seren von 69 Familien untersucht. In 64 Familien war jeweils ein Patient von Morbus Crohn (M.C.) betroffen, die übrigen fünf Familien wiesen je zwei Patienten mit M.C. auf. Die Gesamtzahl der M.C.-Patienten betrug demnach 74.

32 Patienten waren weiblichen, 42 männlichen Geschlechts. Acht M.C.-Patienten waren von Zweiterkrankungen betroffen.

Je ein Patient wies ein Blasenkarzinom, Morbus Bechterew, Neurodermitis, Morbus Werlhoff, chronische Hepatitis mit Leberzirrhose oder eine primär sklerosierende Cholangitis mit Leberzirrhose und Milzstauung auf. Zwei Patienten waren zusätzlich an Psoriasis erkrankt.

Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Blutabnahme zwischen 18 und 69 Jahre alt. Als Besonderheit traten in zwei Familien jeweils ein Crohn-Patient und ein Angehöriger mit Colitis ulcerosa (C.U.), in einer Familie zwei Crohn-Patienten und ein Colitis ulcerosa-Patient auf. Insgesamt waren also drei Angehörige an Colitis ulcerosa erkrankt.

##### **Gesunde Angehörige von M.C.-Patienten:**

181 gesunde Angehörige ersten Grades aus 69 Familien wurden in die Studie eingeschlossen. 98 Verwandte waren weiblichen, 83 männlichen Geschlechts. Das Kollektiv bestand aus 42 Müttern, 32 Vätern, 28 Schwestern, 27 Brüder, 28 Töchtern und 24 Söhnen. Zu Beginn der Studie waren die Angehörigen zwischen acht und 76 Jahren alt mit einem Mittelwert von 39 Jahren.

Um zu untersuchen, ob das Auftreten von ASCA von Umweltfaktoren mit beeinflusst wird, wurde bei insgesamt 146 dieser gesunden Angehörigen ermittelt, ob sie mit dem an Morbus Crohn erkrankten Patienten zusammen in einem Haushalt leben:

49 Angehörige ersten Grades wohnten zusammen mit dem Patient in einem Haushalt, 97 dagegen getrennt.

Weiterhin wurden die 181 klinisch gesunden Angehörigen nach für chronisch entzündliche Darmerkrankungen typischen Symptomen und nach extraintestinalen Manifestationen befragt, um eine eventuelle Korrelation von ASCA und subklinischen Symptomen bei Angehörigen zu überprüfen. Dabei wurden Angaben über Diarrhoe, abdominale Schmerzen, Gelenkschmerzen, Aphthen, Hauteffloreszenzen, entzündliche Veränderungen der Augen und Gewichtsverlust erhoben. Diese Daten wurden aus einer vorangegangenen Studie an demselben Kollektiv entnommen (Tanza 1999).

Um zu untersuchen, ob neben einer genetischen Disposition für die Prävalenz von ASCA auch nichtgenetische, z.B. umweltbedingte oder infektiöse Einflüsse verantwortlich sind, wurden die Seren von 32 gesunden Ehegatten (19 weiblich, 13 männlich) von M.C.-Patienten mit bereits bekanntem hohem ASCA-Titer in die Studie mit einbezogen und mittels indirekter Immunfluoreszenz und ELISA auf das Vorkommen von Antikörpern gegen *Saccharomyces cerevisiae* getestet. Ziel dieses Tests war es, zu untersuchen, ob nicht blutsverwandte enge Kontaktpersonen von hochtitrigen M.C.-Patienten eine erhöhte Prävalenz von ASCA aufweisen.

### 2.1.2 Morbus Crohn-Patienten mit unterschiedlichem Befallsmuster

In den meisten bisherigen Studien konnte kein Zusammenhang zwischen dem Befallsmuster des Gastrointestinaltraktes bei M.C. und der Prävalenz von ASCA festgestellt werden. In dieser Arbeit wurden die Seren von 96 M.C. Patienten, deren Befallsmuster endoskopisch gesichert und dokumentiert wurde, mittels indirekter Immunfluoreszenz und ELISA auf das Vorkommen von Antikörpern gegen *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Die Angaben über das Befallsmuster wurden den Krankenakten und Endoskopieberichten entnommen.

Die 96 Patienten wurden nach dem Befallsmuster in sechs Gruppen eingeteilt:

? 18 Patienten mit Befall ausschließlich des oberen Gastrointestinaltraktes bis zur Ileozäkalklappe (Ösophagus, Magen, Duodenum, Ileum, terminales Ileum):

**„Gruppe Dünndarm“**

? 47 Patienten mit allgemeinem Befall des Gastrointestinaltraktes (oberer Gastrointestinaltrakt, terminales Ileum und Kolon): **„Gruppe M.C. gesamter GI-Trakt“**

diese Gruppe wurde unterteilt in:

- 31 Patienten nur mit Befall des terminalen Ileums (TI) und Kolons (ileocaecal, rechtes, linkes oder gesamtes Kolon): **„Gruppe TI und Kolon“**

und in

- 16 Patienten mit Befall von Ösophagus, Magen, Duodenum, Ileum, terminalem Ileum und Kolon: **„Gruppe Ösophagus, Magen, Duodenum, Ileum, terminales Ileum und Kolon“**

? 21 Patienten mit ausschließlichem Befall des Kolons: **„Gruppe Kolon“**

? 10 Patienten mit Fisteln: **„Gruppe Fisteln“**

### 2.1.3 Kontrollkollektive

Als gesundes Kontrollkollektiv dienten die Seren von 9 gesunden Personen mit insgesamt 29 Angehörigen ersten Grades, die weder über eine Vorgeschichte, noch über Symptome von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen berichteten.

Um die Tauglichkeit von ASCA als serologischer Marker zur Differentialdiagnose von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zu überprüfen, wurden die Seren von 25 Patienten mit Colitis ulcerosa (12 Frauen, 13 Männer) getestet. Diese Patienten waren zum Zeitpunkt der Studie zwischen 19 und 65 Jahre alt. Die Seren ihrer 86 gesunden Angehörigen wurden ebenfalls untersucht, um vergleichbare Daten zu den Angehörigen von Patienten mit Morbus Crohn gewinnen zu können. Ebenfalls wurden insgesamt 6 Seren von Ehepartnern von Patienten mit Colitis ulcerosa getestet.

Weiterhin wurden 31 Seren von Patienten mit chronischen Darm- oder Lebererkrankungen serologisch auf die Prävalenz von ASCA getestet. Im einzelnen handelte es sich um folgende Erkrankungen:

Einheimische Sprue (n=8)

Autoimmunhepatitis (n=12),

Primär sklerosierende Cholangitis (PSC) (n=11)

## 2.2 Versuchsmaterial

### 2.2.1 Chemikalien

? Yeast extract peptone dextrose-Agar (YEPD-Agar)

Yeast Extrakt; Firma DIFCO Laboratories, Detroit, USA

Bacto Peptone; Firma DIFCO

Dextrose; Firma Sigma, Deisenhofen

Bacto-Agar; Firma DIFCO

? Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4

(140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

? Immuno-Mount Eindeckmedium; Firma Shandon, Frankfurt am Main

? Carbonat-Bicarbonatpuffer (pH 9,6; 50mM): Na HCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>

? Fehlingsche Lösung: Fehling I (0,28 M Kupfer(II)sulfat-5-hydrat)

Fehling II (1,2 M Kaliumnatriumtartrat-4-hydrat,  
2,5 M Natriumhydroxid)

? Rinderserumalbumin (BSA): Albumin, Bovine, Fraction V, Minimum 98%;

Firma Sigma, Deisenhofen

? Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat); Firma Sigma

? TMB Microwell Peroxidase Substrate System; Firma Kirkegaard and Perry  
Laboratories, Gaithersburg, USA

? Mono-Poly-Resolving Medium (MPRM), Ficoll-Hypaque, steril, Dichte 1,114;

Firma ICN Biomedicals, Eschwege

Bei den übrigen verwendeten Substanzen handelte es sich um allgemein gebräuchliche Laborchemikalien vom höchsten verfügbaren Reinheitsgrad.

### 2.2.2 Geräte

? Brutschrank: UM 500, Firma Memmert, Schwabach

? Zytozentrifuge: Cytospin 2, mit Kammern, Objektträgerhalterungen und  
Zytofilterkarten; Firma Shandon, Frankfurt am Main

? Zentrifuge: Rotanta/RPC; Firma Hettich, Tuttlingen

? Zentrifuge: Avanti J-25; Firma Beckman Instruments, Palo Alto, USA

- ? Fluoreszenzmikroskop: Großes Forschungsmikroskop Universal mit Fluoreszenz-Auflichtkondensator III RS, Filtersatz blau 450-490, Farbteiler FT 510, Sperrfilter LP 515 und Quecksilber-Höchstdrucklampe HBO 50 W/ac, Aufsetzkamera MC 63, Objektiv Plan-Neofluar 16/0,50; Firma Zeiss, Oberkochen
- ? Autoklav: Varioklav Dampfsterilisator; Firma H+P Labortechnik, Oberschleißheim
- ? Platten-Lesegerät: Dynatech MR 5000; Firma Dynatech, Denkendorf mit ELISA-Platten Microlon, 96 Wells, F-Form, hohe Bindungskapazität; Firma Greiner, Frickenhausen

### 2.2.3 Zellen

Zur Detektion von ASCA mittels indirekter Immunfluoreszenz und ELISA-Untersuchung wurden Zellen bzw. Zellwandantigene der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* cerevisiae, einer Subspezies von *Saccharomyces cerevisiae*, verwendet. Die höchste Immunreaktivität mit Seren von Crohn-Patienten zeigten die Backhefe der Marke Vital Gold (Deutsche Hefewerke Hamburg/Nürnberg), die im folgenden zum ASCA-Nachweis diente. Zum Nachweis von pANCA wurden neutrophile Granulozyten der Blutgruppe 0 aus menschlichem Vollblut eingesetzt. Das Blut stammte von gesunden Spendern im Alter von 20 bis 30 Jahren, wurde mit Citrat ungerinnbar gemacht und innerhalb von fünf Stunden verarbeitet.

Der Nachweis von Pankreasantikörpern (PAK) erfolgte ebenfalls durch die indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung von humaner Pankreas der Blutgruppe 0 (Euroimmun, Lübeck).

### 2.2.4 Antiseren

- ? Antihuman IgA, IgG, IgM, Kappa, Lambda, polyvalent, FITC-konjugiert
- ? Antihuman IgA, IgG, IgM, Kappa, Lambda, polyvalent, Peroxidase-konjugiert  
jeweils Firma DAKO Diagnostika, Hamburg

## 2.3 Versuchsdurchführung

### 2.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz

#### 2.3.1.1 Herstellung von Hefezellpräparaten zum Nachweis von ASCA

? Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae*:

Die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* zur Herstellung von Präparaten für die indirekte Immunfluoreszenz erfolgte auf YEPD-Agar. Zur Herstellung der YEPD-Agarplatten wurden 1 l destilliertes Wasser mit 2,2% Bacto Peptone, 1,1% Yeast Extract, 0,0055% Adeninsulfat und 2% Bacto-Agar in einem Erlenmeyerkolben vermischt und zur Sterilisation autoklaviert. 2% Glucose wurde nach separater Autoklavierung zugesetzt und das Kulturmedium in Petri-Schalen gegossen. Zur Anzucht wurde Backhefe der Marke Vital Gold (Deutsche Hefewerke Hamburg/Nürnberg) verwendet. Die Hefen wurden bis zur Anzucht bei 4°C gelagert. Die Hefezellen wurden mehrmals in destilliertem Wasser gewaschen und eine Zellsuspension mit einer Impföse auf die YEPD-Agarplatten aufgetragen. Die Bebrütung erfolgte bei 30°C für mindestens 24 h in einem Brutschrank bei normaler Belüftung und ohne Zusatz von Kohlendioxid. Bis zur weiteren Verwendung wurden die bebrüteten Agarplatten mit Parafilm verschlossen und maximal eine Woche bei 4 °C gelagert.

? Zytozentrifugenpräparate aus Hefezellen

Mit einer Impfschlinge wurden einige Kolonien von *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* von der YEPD-Agarplatte entnommen, mehrmals mit destilliertem Wasser bei 4000 rpm für 5 min (Hettich Zentrifuge Rotanta/RPC) gewaschen und schließlich ca. 125 mg der feuchten Hefezellen in 10 ml Wasser suspensiert.

Um eine bessere Haftung der Zellen auf den Objektträgern zu erreichen, wurden diese zuvor mit einer 10%igen Lösung aus Rinderserumalbumin beschichtet und luftgetrocknet.

Zum Auftragen der Hefezellen auf Objektträger wurde die Zytozentrifuge mit Objektträgern und Filterkarten bestückt und in jede Kammer 150 µl der Hefezellsuspension einpipettiert, die Zentrifugation erfolgte über 5 min bei 500 Umdrehungen/min.

Nach Trocknen bei Raumtemperatur wurden die Präparate für 10 min in reinem Aceton fixiert und in Cellophan-Folie bei – 20 °C für maximal 1 Monat gelagert.

### 2.3.1.2 Herstellung von Granulozytenpräparaten zum Nachweis von pANCA

#### ? Granulozytenisolation

Für die Granulozytenisolation aus menschlichem Vollblut der Gruppe 0 wurde Mono-Poly-Resolving Medium (MPRM) verwendet, eine Lösung aus Ficoll 400 und Hypaque 85, die eine Trennung von mononukleären Leukozyten von polymorphkernigen Leukozyten in einem Zentrifugationsschritt erlaubt. Es wurden 3 ml MPRM in ein dünnes 100 x 11/12 mm Zentrifugationsröhrchen gegeben und vorsichtig mit 3,5 ml Blut überschichtet. Anschließend wurde bei 400g ohne Bremse 30 min zentrifugiert (Hettich Zentrifuge Rotanta/RPC). Dabei bildeten sich drei Fraktionen (von oben):

Mononukleäre Leukozyten, neutrophile Granulozyten und das Erythrozytenpellet. Die Banden bis zu den Granulozyten wurden vorsichtig abpipettiert und verworfen, während die Granulozyten mit einer Pasteurpipette in ein weiteres Zentrifugationsröhrchen überführt wurden.

Zum Waschen der Zellen wurde das Zentrifugationsröhrchen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS pH 7,4) aufgefüllt und 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, die Zellen am Boden des Gefäßes in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, die Zellen danach in PBS einpipettiert.

#### ? Zytozentrifugenpräparate aus neutrophilen Granulozyten

Zur Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten aus neutrophilen Granulozyten wurden Zellsuspensionen aus PBS und Granulozyten in einer Konzentration von ca.  $5 \times 10^3$ /ml hergestellt. Die Zählung der Zellen zur Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Pappenheim-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop. Die Zytozentrifuge wurde mit Objektträgerhalterung, Objektträger (76/26 mm), Zytofilterkarte und Kammer bestückt und jede Kammer mit 100  $\mu$ l der Zellsuspension beladen. Anschließend wurde mit 600 Umdrehungen/min für 10 min zentrifugiert. Die fertigen Granulozytenpräparate wurden luftgetrocknet und anschließend 4 min in 4°C kaltem Ethanol (95%) fixiert. Nach erneutem Lufttrocknen wurden die Objektträger in Frischhaltefolie verpackt und bei -20°C gelagert.

### 2.3.1.3 Antikörperdetektion mit der indirekten Immunfluoreszenz (ASCA, pANCA und PAK)

Zum Nachweis von ASCA wurden Hefezellpräparate, zum Nachweis von pANCA Granulozytenpräparate verwendet. Pankreasantikörper (PAK) wurden mittels Gefrierschnitten aus humaner Pankreas detektiert. Nach vorsichtigem Auftauen der Zellpräparate wurden diese in eine feuchte Kammer gelegt, jeweils 50 µl Serum in einer Verdünnung von 1:100 für ASCA bzw. 1:10 für pANCA in PBS (pH 7,4) auf die Zellen pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Objektträger wurden anschließend dreimal in PBS gewaschen und zum Antikörpernachweis ein zweiter Inkubationsschritt mit jeweils 50 µl polyvalentem (IgA, IgG, IgM, Kappa, Lamda) Fluoreszein-konjugiertem Antihumanserum durchgeführt. Dazu wurde das Antihumanserum 1:100 für ASCA und 1:50 für pANCA in PBS (pH 7,4) verdünnt und die Objektträger für 30 min lichtgeschützt inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Zellpräparate mit Zellstoffpapier vorsichtig abgetrocknet, in Immuno-Mount-Eindeckmedium eingebettet und mit einem Deckglas (24x60 mm) versehen. Die Lagerung bis zur Auswertung erfolgte unter Lichtschutz bei 4°C.

Zum Nachweis von PAK wurde ebenfalls die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt und wie oben beschrieben an Gefrierschnitten von humaner Pankreas durchgeführt.

#### **Auswertung:**

Zwei Untersucher werteten unabhängig voneinander und ohne Kenntnis der Diagnose die Präparate mit einem Fluoreszenz-Mikroskop bei einer 160fachen Vergrößerung unter UV-Licht aus. Die typische Fluoreszenz der Hefezellwand wurde als ASCA-positiv gewertet, wobei nach Intensität der Fluoreszenz zwischen einfach bis dreifach positiv quantifiziert wurde. Seren, die in der indirekten Immunfluoreszenz keine Anfärbung der Zellwand hervorriefen, wurden als ASCA-negativ bezeichnet. Granulozytenpräparate mit einer perinukleären Fluoreszenz wurden auf ähnliche Weise als pANCA-positiv quantifiziert. Beim Nachweis von PAK konnte zwischen zwei Subtypen (PAK I und PAK II) differenziert werden, wie bereits unter 1.4.1 beschrieben wurde.

Zur Kontrolle der Versuchsgüte und als Standard wurde bei jedem Untersuchungsgang jeweils ein stark positives und ein negatives Serum als Positiv- bzw. Negativkontrolle mitgetestet.

## 2.3.2 ELISA-Untersuchung

### 2.3.2.1 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae*

Die Anzüchtung der Hefezellen (Marke Vital Gold, Deutsche Hefewerke Hamburg/Nürnberg) erfolgte im Gegensatz zur Herstellung von Zellpräparaten für die indirekte Immunfluoreszenz in einem YEPD-Flüssigmedium (Herstellung siehe oben, ohne Zusatz von Bacto-Agar) unter kontinuierlichem Schütteln bei 200 Umdrehungen/min bei 30 °C über mindestens 24 h.

### 2.3.2.2 Mannanextraktion

Die Extraktion des Antigens wurde nach der von Kocourek beschriebenen Methode durchgeführt (Kocourek 1969), die in der vorliegenden Arbeit leicht modifiziert und den fortgeschrittenen Labormethoden angepaßt wurde.

Am Ende der logarithmischen Wachstumsphase wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 2500 g für 15 min (Beckmann Zentrifuge Avanti J-25) und zweimaliges Waschen mit destilliertem Wasser vom Kulturmedium getrennt. 100g der feuchten Hefezellen wurden in 50 ml 0,02 M Citratpuffer (pH 7,0) gelöst und bei 125°C 90 min autoklaviert. Nach Abkühlen erfolgte durch Zentrifugieren (2500 g/ 10 min) die Gewinnung der mannanhaltigen Oberphase, während der Bodensatz erneut in 75 ml des gleichen Puffers resuspendiert und oben beschriebenes Vorgehen wiederholt wurde. Die beiden gewonnenen Oberphasen wurden zusammengegeben und unter Rühren das gleiche Volumen an Fehlingscher Lösung zugesetzt. Dabei ist zu beachten, daß Fehling I und Fehling II erst kurz vor Gebrauch zusammengegeben werden, um ein vorzeitige Kristallbildung zu verhindern. Der ausfallende tiefblaue Kupfer-Mannan-Komplex wurde abzentrifugiert (2500 g/ 5 min), das Pellet in 7 ml 3 N Salzsäure unter Rühren aufgelöst. Die entstandene grüne Lösung wurde langsam unter kräftigem Rühren in 100 ml einer Mischung aus Methanol und Essigsäure (8:1) gegeben. Der Mannan-Komplex wurde bei 2500 g/ 5 min abzentrifugiert, die grüne Oberphase entfernt und das Präzipitat wieder mit frischem Methanol-Essigsäuregemisch verrührt. Dieses Vorgehen wurde solange fortgesetzt, bis die Oberphase farblos war. Das Mannan wurde schließlich bei 6250 g 15 min gesammelt, mehrmals mit reinem Methanol gewaschen und bei Raumtemperatur auf Filterpapier getrocknet. Um eine komplette Entfernung von Glukanen zu gewährleisten, wurde das trockene Mannan in Wasser (1 g in 25 ml) gelöst, mit Fehlingscher Lösung präzipitiert und wie oben beschrieben erneut gewonnen. Das Mannan wurde bei 4°C gelagert.

### 2.3.2.3 Antikörperdetektion im ELISA (ASCA)

Die Untersuchung wurde in ELISA-Platten (Microton, 96 Wells, F-Form) in Doppelbestimmung durchgeführt.

Das extrahierte Mannan wurde in Carbonat-Bicarbonat Puffer (pH 9,6; 50mM) in einer Konzentration von 0,5 µg/ml gelöst. Die Antigenbeschichtung der Platte erfolgte mit 100 µl dieser Lösung pro Well über ca. 24 h bei 4°C. Anschließend wurde dreimal mit Waschpuffer I (PBS, pH 7,4 und 0,5% BSA) gewaschen und geblockt, dann die im gleichen Puffer verdünnten Seren (1:2000) einpipettiert (100 µl pro Well) und über 24 h bei 4 ° C inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer II (PBS, pH 7,4; 0,5% BSA; 0,05% Tween) wurden pro Well 100 µl eines polyvalenten (IgA, IgG, IgM, Kappa, Lambda) Peroxidase-konjugierten Antihumanserums in einer Verdünnung von 1:1000 aufgetragen und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer I wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von jeweils 50 µl TMB-Substratlösung gestartet. Die Farbreaktion wurde nach 3 min durch jeweils 50 µl 25%iger Schwefelsäure pro Well gestoppt und die Platte bei 450 nm in einem ELISA-Reader (Dynatech MR 5000) gelesen.

Eine semiquantitative Bestimmung der Proben wurde mittels eines sehr stark reagierenden Patientenserums erreicht, dessen Aktivität als 2000 Einheiten pro ml definiert und als Standard verwendet wurde.

Jedes Experiment enthielt eine serielle Verdünnungsreihe dieses Standardserums von 1:1000 bis 1:64 000, die als Aliquots bei -20°C gelagert wurden. Jeder Verdünnung des Standardserums wurde entsprechend der Vorgabe eine Konzentration (Einheiten pro ml; E/ml) zugeordnet und die gemessene Extinktion gegen die Konzentration in einer semilogarithmischen Eichkurve aufgetragen.

Mittels dieser Standardkurve wurden die Konzentrationen der Proben bestimmt.

## 2.4 Statistische Methoden

Um die Häufigkeit von ASCA in den verschiedenen untersuchten Kollektiven vergleichen zu können und auf signifikante Unterschiede zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Chi-Quadrat-Test verwendet. Bei Stichprobengrößen kleiner als 50 wurde die Yates-Korrektur angewendet. Ein Testergebnis wurde als signifikant bezeichnet, wenn  $p < 0,05$  war. Die Werte für die Signifikanzschranken der Chi-Quadrat-Verteilung bei einem Freiheitsgrad ( $\nu=1$ ) wurden den wissenschaftlichen Tabellen Geigy entnommen (Lenter 1985).

Der Vergleich der Mittelwerte (Mittelwertsdifferenzen in der ELISA-Untersuchung) in den verschiedenen Gruppen wurde mit dem parametrischen Student's t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Die berechneten t-Werte wurden mit den t-Tabellenwerten (Lenter 1985) unter Berücksichtigung des Freiheitsgrades und der Alpha-Fehlervorgabe verglichen. Auch in diesem Testverfahren galt ein Testergebnis als signifikant, wenn  $p < 0,05$  war.

Als weitere statistische Parameter dienten der Mittelwert, der Standardfehler des Mittelwertes und die Standardabweichung.

Um Aussagen über die Empfindlichkeit der beiden Testverfahren treffen zu können, wurde jeweils die Sensitivität berechnet, die als Quotient aus der Zahl der kranken Testpositiven und der Gesamtzahl der Erkrankten definiert ist.

Der Begriff der Spezifität bezeichnet die Eindeutigkeit eines Testes und berechnet sich als Quotient der gesunden Testnegativen und der Gesamtzahl aller Gesunden.

Dividiert man die Zahl der erkrankten Testpositiven durch die Gesamtzahl aller Testpositiven, so erhält man den positiven Vorhersagewert, der über die Wahrscheinlichkeit, beim Vorliegen eines positiven Testergebnisses auch wirklich erkrankt zu sein, Auskunft gibt.

Um zu überprüfen, ob zwischen den beiden verwendeten Testmethoden, indirekte Immunfluoreszenz und ELISA, eine Korrelation besteht, wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Der Korrelationskoeffizient gilt als Abhängigkeitsmaßzahl für den linearen Zusammenhang zweier quantitativer Merkmale und ist definiert als Wurzel aus dem Produkt der Regressionskoeffizienten der beiden Regressionsgeraden (x nach y und y nach x) im Korrelationsdiagramm (Werner 1984).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Prävalenz und Spezifität von ASCA in der indirekten Immunfluoreszenz und im ELISA bei Patienten mit CED und Kontrollen

##### **ELISA und indirekte Immunfluoreszenz**

Alle Seren wurden zunächst mit der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) auf die Prävalenz von ASCA getestet und nach der Intensität der Fluoreszenz der Hefezellwand zwischen negativ und ein- bis dreifach positiv (ASCA + bis +++) grob quantifiziert. Die besten Ergebnisse bezüglich Spezifität und Sensitivität wurden bei einem cut-off Titer von 1:200 erzielt.

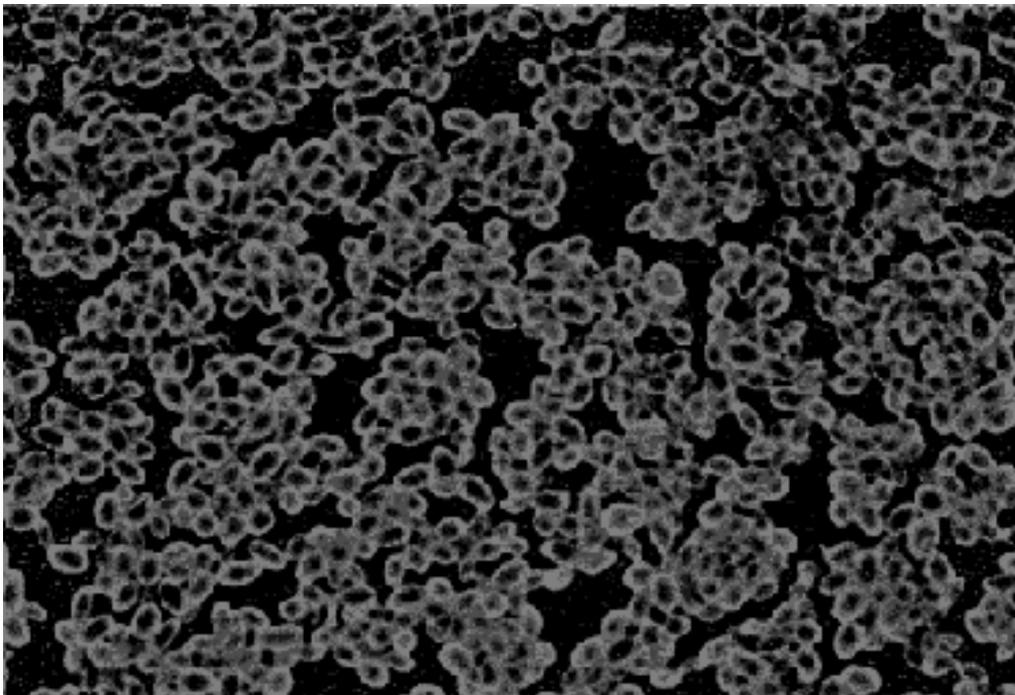


Abbildung 3: Fluoreszenz der Hefezellwand unter UV-Licht (ASCA +++) nach Inkubation mit dem Serum eines M.C.-Patienten und Fluoreszein-konjugiertem Antihumanserum

Um die Methode zu überprüfen und vor allem um eine bessere Quantifizierung zu erreichen, erfolgte eine zweite Untersuchung aller Seren mittels ELISA. Ab einer Konzentration von 114 E/ml (cut off: Mittelwert der insgesamt 38 gesunden Kontrollpersonen zuzüglich der dreifachen Standardabweichung) wurde ein Test als ASCA-positiv gewertet. Diese Methode bestätigte die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz, erlaubte eine semiquantitative Bestimmung des Antikörpertiters und erwies sich etwas sensitiver als die indirekte Immunfluoreszenz (68,8% vs. 67,1%). Zudem kann der standardisierte ELISA in der Routinediagnostik von ASCA bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzt werden und ist weitgehend unabhängig

vom Untersucher. Mit beiden Methoden wurden insgesamt 569 Seren getestet. Dabei ergab sich eine gute Korrelation zwischen der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) und ELISA mit folgenden Entsprechungen:

IIF	ELISA (E/ml ± SD)
ASCA -	46±48
ASCA +	278±178
ASCA ++	662±634
ASCA +++	1739±993

Tabelle 1: Entsprechung von IIF und ELISA

Trägt man die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz (in vier Stufen: negativ, ein- bis dreifach positiv) gegen die Werte des ELISA (E/ml) in einem Korrelationsdiagramm auf, so ergibt sich für alle 569 getesteten Seren eine lineare Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten nach Pearson von 74,2% (siehe Abbildung 4).

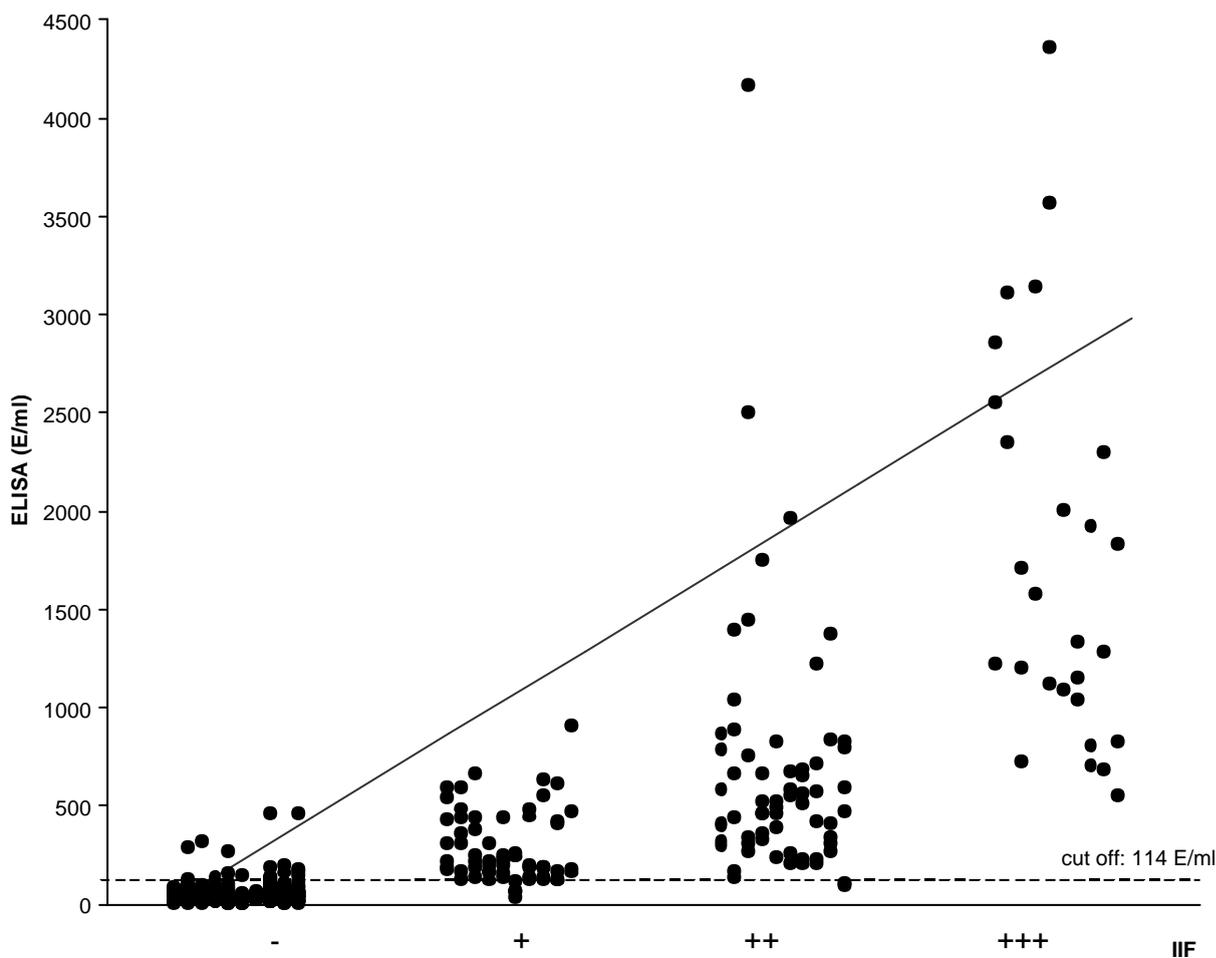


Abbildung 4: Korrelation von indirekter Immunfluoreszenz (IIF) und ELISA, n=569

Unterscheidet man bei der indirekten Immunfluoreszenz und beim ELISA jeweils nur zwischen positiven und negativen Ergebnissen (zweistufig), so beträgt der Korrelationskoeffizient 89,9%.

### ASCA bei Patienten mit Morbus Crohn

51 der 74 Patienten mit M.C. erwiesen sich sowohl in der indirekten Immunfluoreszenz als auch im ELISA als ASCA positiv (68,9%) mit einem Mittelwert von 1068±1105 E/ml. Im Durchschnitt betrug die Konzentration von ASCA im Serum aller 74 Patienten mit M.C. 745±1035 E/ml. Der Unterschied in der Prävalenz von ASCA zum gesunden Kontrollkollektiv und zu Patienten mit Colitis ulcerosa war im  $\chi^2$ -Test statistisch hochsignifikant ( $p < 0,0005$ ,  $p < 0,0005$ ).

	IIF	ELISA		
	n (%)	n (%)	MW±SD (E/ml)	p*
M. Crohn	74	74	745±1035	
+	51 (68,9)	51 (68,9)	1068±1105	< 0,0005
-	23 (31,1)	23 (31,1)	27±16	
Colitis ulcerosa	25	25	43±52	
+	2 (8,0)	2 (8,0)	204±8	n.s.
-	23 (92,0)	23 (92,0)	29±19	
gesunde Kontrollen	38	38	33±27	
+	1 (2,6)	1 (2,6)	148	--
-	37 (97,4)	37 (97,4)	30±20	
Einheimische Sprue	8	8	78±69	n.s.
+	0	2	178±23	
-	8	6	45±36	
Primär sklerosierende Cholangitis	11	11	51±33	
+	0	0	0	n.s.
-	11	11	51±33	
Autoimmunhepatitis	12	12	49±25	
+	0	0	0	n.s.
-	12	12	49±25	

Tabelle 2: ASCA bei Patienten mit M.C. und in den Kontrollkollektiven, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, IIF: indirekte Immunfluoreszenz, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, n.s.: nicht signifikant, \*  $\chi^2$ -Test im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv (nur für ELISA)

Betrachtet man die Prävalenz von ASCA bei den Patienten in Abhängigkeit von der Geschlechtsverteilung, so ergeben sich weder im  $\chi^2$ -Test noch im Student's t-Test signifikante Unterschiede: 30 der 42 männlichen Patienten (71,4%) mit einem Mittelwert von 1205 $\pm$ 1243 E/ml und 21 der 32 weiblichen Patienten (65,6%) mit einem Mittelwert von 872 $\pm$ 862 E/ml wurden als ASCA-positiv befundet.

n <sub>gesamt</sub> : 74	IIF	ELISA	
	n (%)	n (%)	MW $\pm$ SD E/ml
M.C.-Patienten	74	74	745 $\pm$ 1035
+	51 (68,9)	51 (68,9)	1068 $\pm$ 1105
-	23 (31,1)	23 (31,1)	27 $\pm$ 16
Männer	42	42	869 $\pm$ 1176
+	30 (71,4)	30 (71,4)	1205 $\pm$ 1243
-	12 (28,6)	12 (28,6)	28 $\pm$ 20
Frauen	32	32	581 $\pm$ 804
+	21 (65,6)	21 (65,6)	872 $\pm$ 862
-	11 (34,4)	11 (34,4)	27 $\pm$ 11

Tabelle 3: ASCA bei M.C.-Patienten in Abhängigkeit vom Geschlecht

Bei den fünf Familien mit jeweils zwei M.C.-Patienten erwiesen sich in vier Familien (80%) die beiden Patienten als konkordant positiv im Bezug auf ASCA, nur in einer Familie zeigten sich beide Patienten diskordant (siehe Abbildung 7).

#### **ASCA bei Patienten mit Colitis ulcerosa:**

Unter den 25 Patienten mit der Diagnose C.U. fanden sich nur zwei ASCA-positive Seren (8,0%) mit einem Titer von jeweils 198 und 209 E/ml (MW: 204 $\pm$ 8 E/ml). Alle 25 Patienten mit C.U. wiesen im Durchschnitt einen Titer von 43 $\pm$ 52 E/ml auf, während die ASCA-negativen Patienten im Mittel einen Titer von 29 $\pm$ 19 E/ml hatten. Im Vergleich mit der Prävalenz von ASCA im gesunden Kontrollkollektiv zeigte sich keine statistische Signifikanz.

#### **ASCA bei gesunden Kontrollen:**

Bei der Untersuchung von 38 Seren von gesunden Kontrollpersonen aus insgesamt neun Familien wurde nur ein niedrig ASCA-positives Serum (2,6%) mit 148 E/ml gefunden. Der Mittelwert der übrigen 37 negativen Seren betrug 30 $\pm$ 20 E/ml. Der Mittelwert aller 38 Seren ergab 33 $\pm$ 27 E/ml.

### ASCA bei Patienten mit chronischen Leber- und Darmerkrankungen:

In dieser 31 Kontrollseren umfassenden Gruppe erwiesen sich insgesamt zwei Seren als ASCA-positiv. Zwei von 8 untersuchten Seren von Patienten mit einheimischer Sprue waren mit einer Konzentration von 161 und 194 E/ml im ELISA ASCA-positiv (nicht signifikant), in der indirekten Immunfluoreszenz dagegen negativ. Weder in der Gruppe mit Autoimmunhepatitis noch in der Gruppe mit primär sklerosierender Cholangitis konnte ASCA nachgewiesen werden.

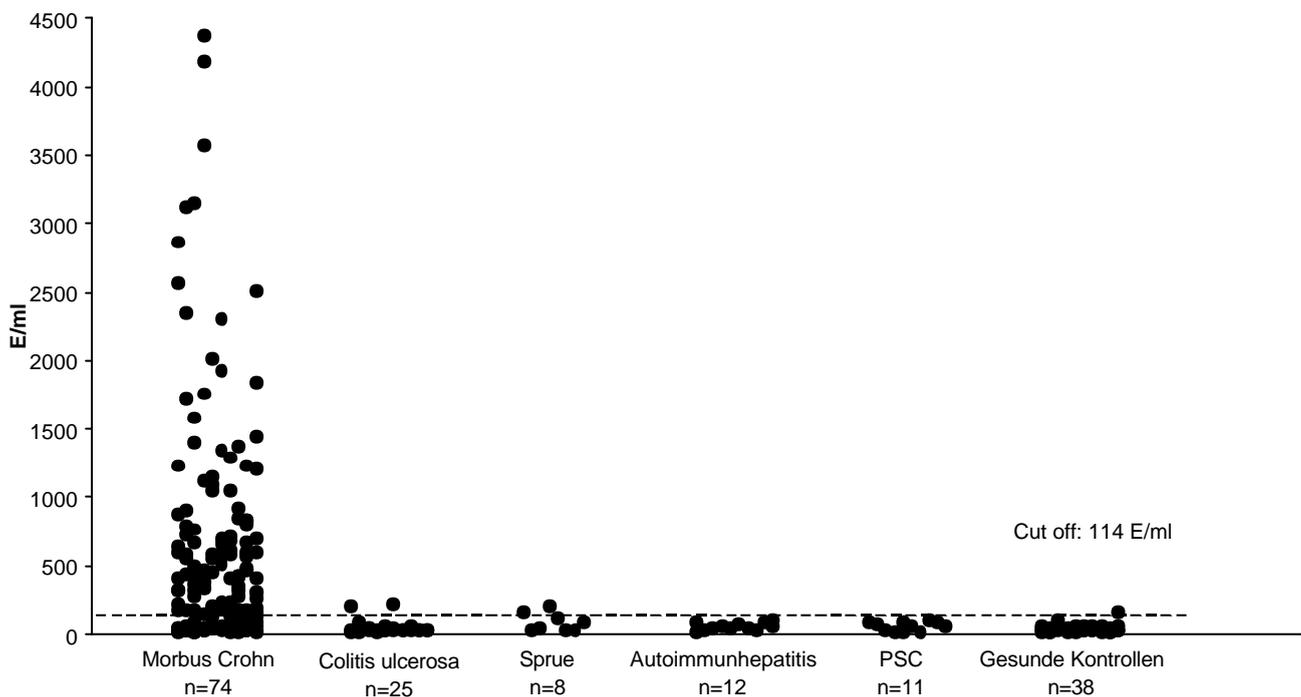


Abbildung 5: Prävalenz von ASCA bei Morbus Crohn im Vergleich zu den Kontrollkollektiven

### 3.2 Prävalenz von ASCA und pANCA in Abhängigkeit vom Befallsmuster bei Patienten mit M.C.

#### **ASCA in Abhängigkeit vom Befallsmuster**

In verschiedenen Studien wurde eine unterschiedliche Prävalenz von ASCA in Abhängigkeit vom Ort der Erkrankung im Intestinaltrakt festgestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde bei insgesamt 96 Patienten mit M.C., bei denen aus den Krankenakten und Endoskopieberichten das Befallsmuster des Gastrointestinaltraktes bekannt war, die Prävalenz von ASCA bestimmt. Insgesamt wiesen 66 der 96 untersuchten M.C.-Patienten (68,8 %) im Serum ASCA auf. Bei Einteilung der Patienten in sechs Gruppen mit unterschiedlichem Befallsmuster ergaben sich deutliche Unterschiede in der Prävalenz von ASCA:

Bei alleinigem **Kolonbefall** war die Prävalenz von ASCA („Gruppe Kolon“) deutlich niedriger als bei den übrigen Gruppen: Nur zehn von 21 Patienten wiesen ASCA im Serum auf (47,6%; MW: 650?388 E/ml).

In der Patientengruppe mit Befall von **Ösophagus, Magen, Duodenum, Ileum, terminalem Ileum und Kolon** konnte bei zehn von 16 Patienten (62,5%; MW: 784?729 E/ml) und in der Gruppe mit Befall nur des oberen Gastrointestinaltraktes („**Gruppe Dünndarm**“) bei elf von 18 Patienten ASCA in etwa gleicher Häufigkeit detektiert werden (61,1%; MW: 543?232 E/ml). Im Vergleich mit der Gruppe mit alleinigem Kolonbefall gab es jeweils keine signifikanten Unterschiede.

Patienten nur mit Befall des terminalen Ileums und zugleich des Kolons (**Gruppe „TI und Kolon“**) zeigten ebenfalls eine erhöhte Prävalenz von ASCA im Vergleich zu alleinigem Kolonbefall: Von 31 untersuchten Seren aus dieser Gruppe waren 26 ASCA-positiv (83,9%; MW: 574?468E/ml; „Kolon“ versus Gruppe „TI und Kolon“:  $p<0,01$ ).

Faßt man die Patientengruppe mit Befall von Magen, Duodenum, Ileum, terminalem Ileum und Kolon (n=16) und die Patientengruppe ausschließlich mit Befall des terminalen Ileums und Kolons („Gruppe TI und Kolon“, n=31) zusammen, läßt sich ASCA in 36 von 47 Seren nachweisen (Gruppe „**M.C. gesamter GI-Trakt**“: 76,6%; MW: 632?550 E/ml; „Kolon“ versus „M.C. gesamter GI-Trakt“:  $p<0,025$ ).

Am häufigsten konnte ASCA in der Gruppe von Patienten mit **Fisteln** nachgewiesen werden, wobei neun von zehn Patienten (90%; MW: 626?610 E/ml; „Kolon“ versus „Fisteln“:  $p<0,025$ ) ASCA-positiv waren. Die ASCA-Titer in den verschiedenen Gruppen erreichten zwar im Gegensatz zur Prävalenz von ASCA kein Signifikanzniveau beim Vergleich im Student's t-Test, aber auch hier tendierte die Patientengruppe mit Kolonbefall zu insgesamt niedrigeren Werten.

### pANCA in Abhängigkeit vom Befallsmuster

Weiterhin wurden 96 Seren von M.C.-Patienten mit unterschiedlichem Befallsmuster auf die Prävalenz von pANCA getestet, da nach Vasiliauskas pANCA vor allem bei Patienten, deren Erkrankung sich ähnlich wie eine Colitis ulcerosa präsentiert, im Serum gefunden wurde (Vasiliauskas 1996). Nur bei sieben von 96 (7,3%) getesteten Seren konnte pANCA nachgewiesen werden. pANCA trat bei vier Patienten (12,9%) in der Gruppe mit Befall des terminalen Ileums und Kolons, bei zwei Patienten (12,5%) in der Gruppe mit Befall von Magen, Duodenum, Ileum und Kolon und nur bei einem Patienten (4,8%) mit ausschließlichem Kolonbefall auf. Damit war die Prävalenz von pANCA in der Gruppe der Patienten mit reinem Kolonbefall (4,8%) nicht erhöht im Vergleich zu anderen Befallsmustern.

n <sub>gesamt</sub> : 96	ASCA			pANCA
	IIF	ELISA		IIF
Befallsmuster	n (%)	n (%)	MW?SD E/ml	n (%)
Dünndarm	18	18	354?303	18
+	11 (61,1)	11 (61,1)	543?232	0 (0)
-	7 (38,9)	7 (38,9)	57?33	18 (100)
Kolon	21	21	325?411	21
+	10 (47,6)	10 (47,6)	650?388	1 (4,8)
-	11 (52,4)	11 (52,4)	29?18	20 (95,2)
M.C. gesamter GI-Trakt	47	47	494?542	47
+	35 (74,5)	36 (76,6) *	632?550	6 (12,8)
-	12 (25,5)	11 (23,4)	42?14	41 (87,2)
nur term. Ileum und Kolon	31	31	488?472	31
+	25 (80,6)	26 (83,9) **	574?468	4 (12,9)
-	6 (19,4)	5 (16,1)	41?17	27 (87,1)
Magen, Duodenum, Ileum, Kolon	16	16	506?676	16
+	10 (62,5)	10 (62,5)	784?729	2 (12,5)
-	6 (37,5)	6 (37,5)	42?12	14 (87,5)
Fisteln	10	10	570?602	10
+	7 (70,0)	9 (90,0) *	626?610	0 (0)
-	3 (30,0)	1 (10,0)	67	10 (100)

Tabelle 4: ASCA und pANCA bei Patienten mit Morbus Crohn und unterschiedlichem Befallsmuster,  $\chi^2$ -Test im Vergleich zu Gruppe mit Kolonbefall: \*  $p < 0,025$ , \*\*  $p < 0,010$

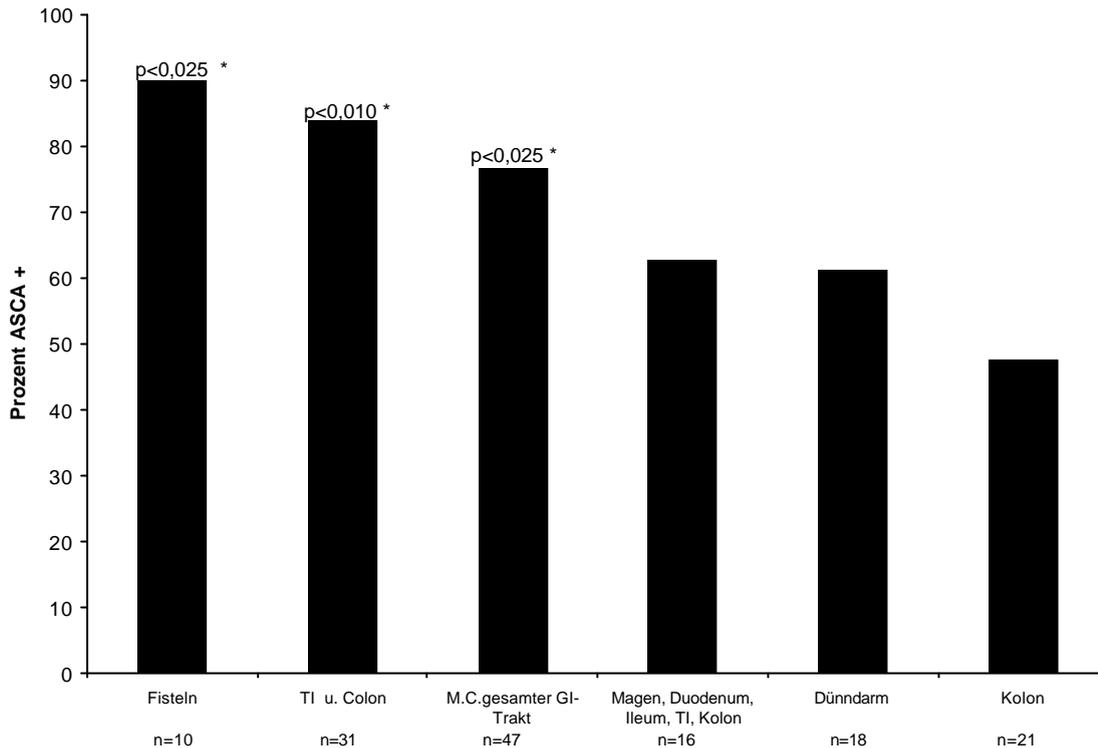


Abbildung 6: Prävalenz von ASCA bei den Gruppen mit verschiedenen Befallsmustern  
 \*  $\chi^2$ -Test im Vergleich zu Kolonbefall

### 3.3 Prävalenz von ASCA bei Familienmitgliedern von Patienten mit CED

#### **Gesunde Angehörige von Patienten mit Morbus Crohn**

In 27 von 69 Familien (39,1%) fand sich mindestens ein ASCA-positiver gesunder Angehöriger ersten Grades (Abbildung 7).

Während in 18 von 47 Familien (38,3%) mit jeweils mindestens einem ASCA-positiven Patienten auch mindestens ein ASCA-positiver gesunder Angehöriger ermittelt wurde, fand sich auch in neun von 22 Familien (40,9%) mit einem negativen Patient mindestens ein ASCA-positives Familienmitglied ersten Grades. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war nicht signifikant. Insgesamt wiesen vier Familien jeweils zwei, drei weitere sogar drei ASCA-positive gesunde Angehörige ersten Grades auf.

Unter den Probanden waren auch zwei zweieiige Zwillingspaare, die beide konkordant ASCA-positiv waren, wobei jeweils nur eines der Geschwister auch an Morbus Crohn erkrankt war. In fünf Familien trat Morbus Crohn bei zwei Personen auf. Dabei waren in 4 von 5 Familien die Patienten jeweils konkordant ASCA-positiv.

Betrachtet man die Prävalenz von ASCA innerhalb der 181 getesteten gesunden Angehörigen ersten Grades, so erwiesen sich in der indirekten Immunfluoreszenz 31 (17,1%) und im ELISA 37 Seren (20,4%) als ASCA-positiv mit einem Mittelwert von 278? 161 E/ml.

Der ASCA-Titer der Testpositiven schwankte zwischen 114 und 826 E/ml, während die Konzentration bei allen 181 gesunden Angehörigen im Mittel 90?122 E/ml betrug. Der Unterschied zur Prävalenz von ASCA im gesunden Kontrollkollektiv ist signifikant ( $p < 0,01$ ).

Der Mittelwert der übrigen 144 ASCA-negativen Angehörigen betrug 42?26 E/ml.

	IIF	ELISA		
	n (%)	n (%)	MW?SD (E/ml)	p*
M. Crohn	74	74	745? 1035	
+	51 (68,9)	51 (68,9)	1068? 1105	< 0,0005
-	23 (31,1)	23 (31,1)	27?16	
Colitis ulcerosa	25	25	43?52	
+	2 (8,0)	2 (8,0)	204? 8	n.s.
-	23 (92,0)	23 (92,0)	29?19	
gesunde Kontrollen	38	38	33?27	
+	1 (2,6)	1 (2,6)	148	--
-	37 (97,4)	37 (97,4)	30?20	
Angehörige von M.C.-Patienten	181	181	90? 122	
+	31 (17,1)	37 (20,4)	278? 161	< 0,01
-	150 (82,9)	144 (79,6)	42?26	
Ehegatten von M.C.-Patienten	32	32	61?98	
+	1 (3,1)	3 (9,4)	314? 188	n.s.
-	31 (96,9)	29 (90,6)	35?23	
Angehörige von C.U.-Patienten	86	86	81?217	
+	7 (8,1)	10 (11,6)	385? 569	n.s.
-	79 (91,9)	76 (88,4)	41?27	

Tabelle 5: ASCA bei CED-Patienten und Familienmitgliedern, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, IIF: indirekte Immunfluoreszenz, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, n.s.: nicht signifikant, \*  $\chi^2$ -Test im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv (nur für ELISA)

### Gesunde Angehörige von Patienten mit Colitis ulcerosa

Die Untersuchung der 86 gesunden Angehörigen von C.U.-Patienten ergab zehn ASCA- positive Seren (11,6%) mit einem Mittelwert von 385?569 E/ml, der Mittelwert der übrigen 76 negativen Seren betrug 41?27 E/ml. Insgesamt lag die Konzentration von ASCA bei allen 86 gesunden Angehörigen bei 81?217 E/ml. Der Unterschied zum gesunden Kontrollkollektiv bezüglich ASCA war nicht signifikant ( $p > 0,1$ ).

### 3.3.1 Abhängigkeit von ASCA vom Geschlecht bei gesunden Angehörigen

Die Gruppe der Angehörigen ersten Grades von Patienten mit Morbus Crohn bestand aus 181 Personen, wobei 83 männlichen und 98 weiblichen Geschlechts waren. In der Untersuchung der Seren waren 18 der 83 getesteten Männer (21,7%; MW: 303?191 E/ml) und 19 der 98 getesteten Frauen (19,4%; MW: 254?126 E/ml) ASCA-positiv. Die Unterschiede erreichten kein Signifikanzniveau.

n <sub>gesamt</sub> : 181	IIF	ELISA	
	n (%)	n(%)	MW?SD (E/ml)
M.C.-Angehörige	181	181	90?122
+	31 (17,1)	37 (20,4)	278?161
-	150 (82,9)	144 (79,6)	42?26
Männer	83	83	97?141
+	15 (18,1)	18 (21,7)	303?191
-	68 (81,9)	65 (78,3)	40?26
Frauen	98	98	84?103
+	16 (16,3)	19 (19,4)	254?126
-	82 (83,7)	79 (80,6)	43?26

Tabelle 6: ASCA und Geschlechtsverteilung bei Angehörigen von M.C.-Patienten

### 3.3.2 Prävalenz von ASCA innerhalb der Familien

Um zu untersuchen, ob die Prävalenz von ASCA innerhalb der Familien unterschiedlich verteilt ist, wurden die 181 gesunden Angehörige ersten Grades von M.C.-Patienten in die jeweiligen Generationen aufgeteilt und auf die Konzentration von ASCA bestimmt.

**Eltern** von M.C.-Patienten: 15 von 74 (20,3%; MW: 300?193 E/ml), dabei zeigten sieben von 32 Vätern (21,9%; MW: 342?239 E/ml) und acht von 42 Müttern (19,0%; MW: 262?148 E/ml) Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae*.

**Geschwister** von M.C.-Patienten: 11 von 55 (20,0%; MW: 299?151 E/ml), dabei waren sieben von 27 Brüdern (25%; MW: 302?179 E/ml) und vier von 28 Schwestern (14,3%; MW: 295?107 E/ml) ASCA-positiv.

**Kinder** von M.C.-Patienten: 11 von 52 (21,2%; MW: 227?119 E/ml), dabei fand sich ASCA bei vier von 24 Söhnen (16,7%; MW: 235?140 E/ml) und bei sieben von 28 Töchtern (25,0 %; MW: 222?118 E/ml).

In keiner der einzelnen Gruppen kam ASCA signifikant häufiger vor. Auch die Mittelwerte der Gruppen unterschieden sich nicht signifikant im Student's t-Test.

n <sub>gesamt</sub> : 181	IIF	ELISA	
	n (%)	n (%)	MW?SD (E/ml)
<b><u>Eltern</u></b>	74	74	95?136
+	14 (18,9)	15 (20,3)	300?93
-	60 (81,1)	59 (79,7)	43?27
Väter	32	32	111?165
+	7 (21,9)	7 (21,9)	342?239
-	25 (78,1)	25 (78,1)	46?28
Mütter	42	42	84?110
+	7 (16,7)	8 (19,0)	262?148
-	35 (83,3)	34 (81,0)	42?27
<b><u>Geschwister</u></b>	55	55	92?125
+	10 (18,2)	11 (20,0)	299?151
-	45 (81,8)	44 (80,0)	40?24
Brüder	27	27	106?148
+	6 (22,2)	7 (25,9)	302?179
-	21 (87,8)	20 (74,1)	37?22
Schwestern	28	28	78?100
+	4 (14,3)	4 (14,3)	295?107
-	24 (85,7)	24 (85,7)	42?25
<b><u>Kinder</u></b>	52	52	81?96
+	7 (13,5)	11 (21,2)	227?119
-	45 (86,5)	41 (78,8)	42?26
Söhne	24	24	70?94
+	2 (8,3)	4 (16,7)	235?140
-	22 (91,7)	20 (83,3)	37?26
Töchter	28	28	91?98
+	5 (17,9)	7 (25,0)	222?118
-	23 (82,1)	21 (75,0)	47?27

Tabelle 7: Verteilung von ASCA innerhalb der Generationen bei Angehörigen

### **ASCA bei Eltern und ihren Kindern:**

Da nicht in allen 69 Familien das Serum beider Eltern zur Untersuchung zur Verfügung stand, wurden nur 55 Paare aus Eltern und ihren Kindern gebildet, um eine eventuelle Übertragung von ASCA von Eltern auf ihre Kinder zu überprüfen.

Bei 16 von 30 Paaren, bei denen mindestens ein Elternteil ASCA-positiv war, zeigte sich auch mindestens ein Kind ASCA-positiv (53,0%).

Unter den 30 genannten Paaren befanden sich auch drei Familien, in denen beide Elternteile ASCA-positiv waren (Nr. 30, 39, 61; siehe Abbildung 7): Während in einer Familie (Nr. 30) die Nachkommenschaft ASCA-negativ war, konnten bei den Kindern der beiden anderen Familien Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden.

Aber auch bei 14 von den verbleibenden 25 Paaren, bei denen beide Eltern ASCA-negativ waren, erwies sich mindestens ein Kind ASCA-positiv (56%). Es besteht kein signifikanter Unterschied.

### **ASCA bei gesunden Eltern und Morbus Crohn bei Kindern**

Um zu untersuchen, ob in M.C.-Familien ein erhöhter ASCA-Titer bei mindestens einem Elternteil zu einem erhöhten Risiko für Morbus Crohn bei den Kindern im Vergleich zu Kindern mit ASCA-negativen Eltern führt, wurden insgesamt 33 Paare aus gesunden Eltern und ihren erkrankten Kindern gebildet.

Während bei 16 von 33 Paaren mindestens ein Elternteil ASCA-positiv war (48,5%), erwiesen sich bei den verbleibenden 17 Paaren beide Eltern ASCA-negativ (51,5%). In der Gruppe der ASCA-positiven Eltern traten jedoch in zwei Familien je zwei Kinder mit Morbus Crohn auf (Nr. 14, 61), in der Gruppe der ASCA-negativen Eltern nur in einer Familie (Nr. 53) zwei Kinder mit Morbus Crohn (siehe Abbildung 7).

### 3.3.3 ASCA bei Angehörigen in Abhängigkeit vom ASCA-Status des Patienten

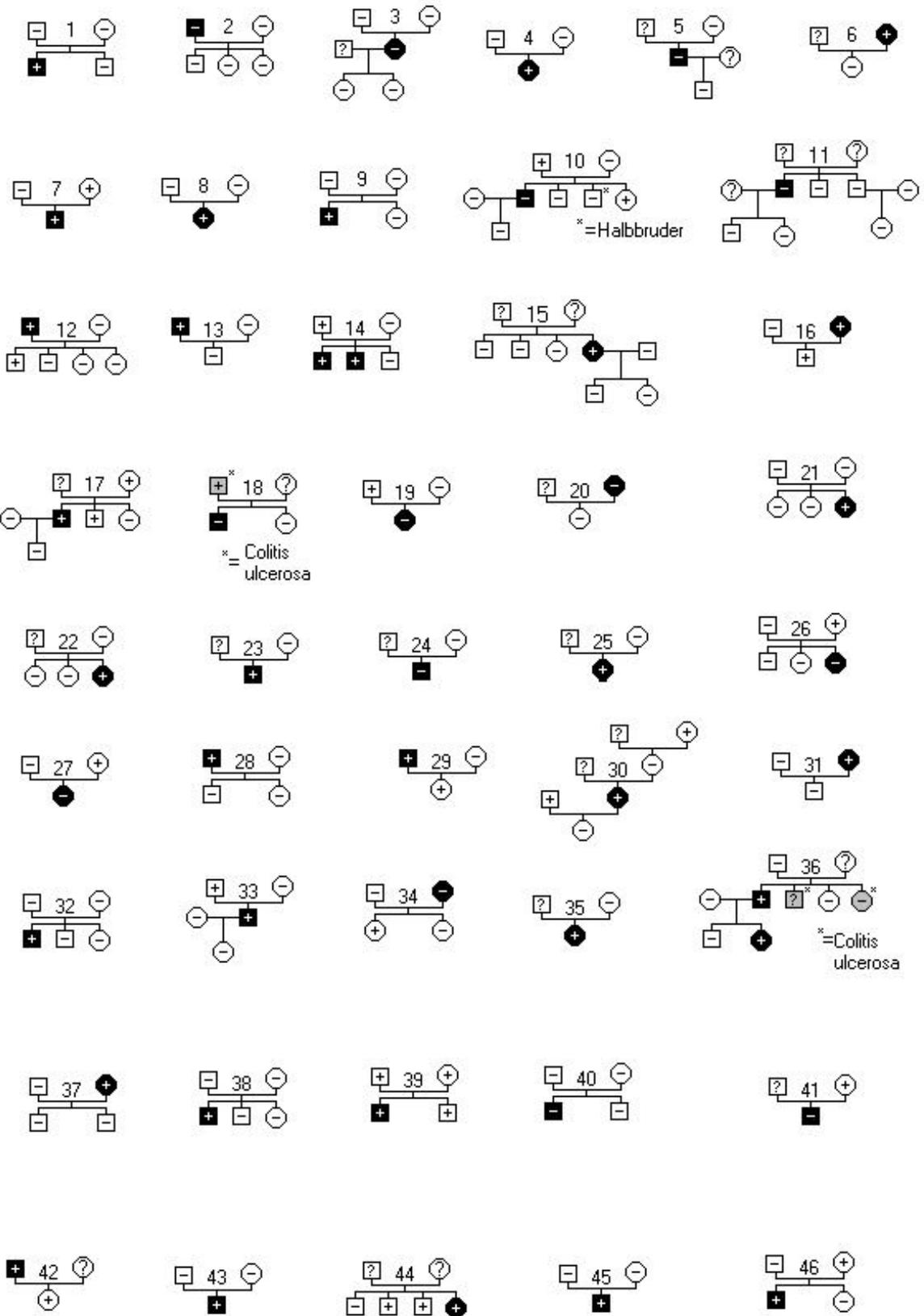
Von den insgesamt 181 untersuchten Seren von gesunden Angehörigen ersten Grades konnten 118 Seren (MW: 90?104 E/ml) einem ASCA-positiven Patienten zugeordnet werden. 26 dieser Angehörigen waren im ELISA selbst ASCA-positiv (22,0%; MW: 255?110 E/ml).

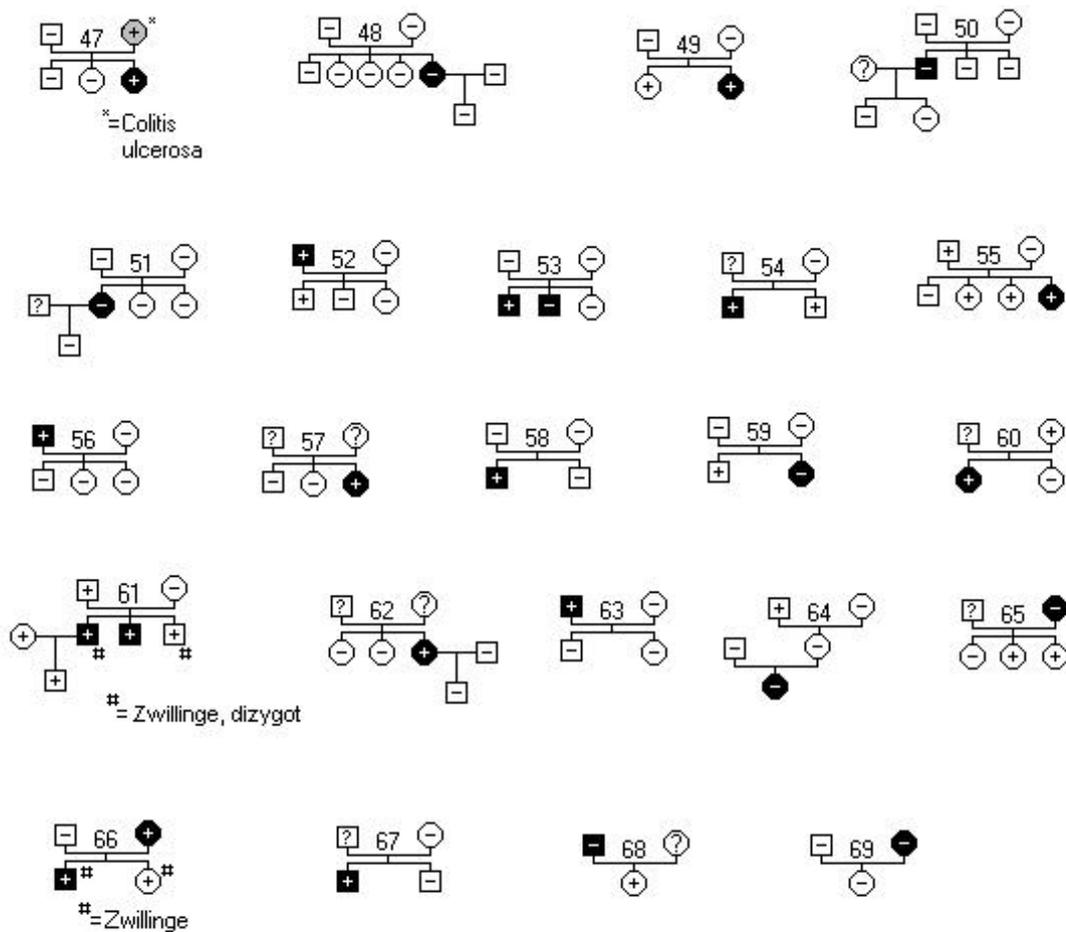
Die übrigen 63 (MW: 91?150 E/ml) der getesteten 181 Seren von Angehörigen stammten aus Familien mit einem ASCA-negativen Patienten. Elf dieser Seren zeigten im ELISA Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* (17,5 %; MW: 333?241 E/ml).

Tendentiell wiesem damit Angehörige von ASCA-positiven Patienten häufiger diesen Antikörper selbst auf als Angehörige von ASCA-negativen Patienten, aber weder der  $\chi^2$ -Test zum Vergleich der ASCA-Prävalenz noch der Student's t-Test zum Vergleich der Mittelwerte erbrachte einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

	IIF	ELISA	
n <sub>gesamt</sub> : 181	n (%)	n (%)	MW?SD E/ml
Angehörige von positiven Patienten	118	118	90?104
+	22 (18,6)	<b>26 (22,0)</b>	255?110
-	96 (81,4)	92 (78,0)	43?26
Angehörige von negativen Patienten	63	63	91?150
+	9 (14,3)	<b>11 (17,5)</b>	333?241
-	54 (85,7)	52 (82,5)	40?25

Tabelle 8: ASCA bei Angehörigen in Abhängigkeit vom ASCA-Status des zugehörigen Patienten, IIF: indirekte Immunfluoreszenz





Zeichenerklärung:

□ = gesunder Mann    ○ = gesunde Frau    - = ASCA negativ    + = ASCA positiv    ■● = Patient mit M. Crohn    ? = keine ASCA-Bestimmung möglich

Abbildung 7 : Stammbäume der 69 getesteten Familien mit Crohn-Patienten

### 3.3.4 ASCA und klinische Symptomatik bei gesunden Angehörigen

Um zu klären, ob die Prävalenz von ASCA bei gesunden Angehörigen auf eine subklinische Manifestation von Morbus Crohn hinweisen könnte, wurden alle 181 gesunden Angehörige von M.C.-Patienten nach Symptomen der CED befragt. Während nur zehn der insgesamt 37 ASCA-positiven gesunden Angehörigen ersten Grades (27,0%; MW: 247?120 E/ml) Symptome aufwiesen, die auf eine subklinische Manifestation einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung hindeuten könnten, zeigten die übrigen 27 ASCA-positiven Angehörige (MW: 289?174 E/ml) keinerlei Symptome. Dagegen gaben 27 der 144 ASCA-negativen Angehörigen (18,8%; MW: 45?26 E/ml) mögliche Symptome einer chronisch

entzündlichen Darmerkrankung an. Der Unterschied in der Symptommhäufigkeit in beiden Gruppen war allerdings statistisch nicht signifikant. Außer dem Fehlen von Hauteffloreszenzen gab es in der Gruppe der ASCA-positiven und zugleich symptomatischen Angehörigen im Vergleich zu den symptomatischen ASCA-negativen Angehörigen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Auftretens von Symptomen. Auch die Häufigkeit von abdominellen Schmerzen in der ASCA-positiven Gruppe (60%) unterschied sich nicht signifikant vom Auftreten dieses Symptoms in der ASCA-negativen Gruppe (40,7%).

Symptome:	ASCA +, symtomatisch			ASCA -, symptomatisch		
	absolut	Prozent	MW?SD(E/ml)	absolut	Prozent	MW?SD(E/ml)
Insgesamt symptomatisch	10/37	27	247?120	27/144	18,8	45?26
Diarrhoe	5/10	50	184?78	12/27	44,4	49?28
Bauchschmerzen	6/10	60	225?94	11/27	40,7	58?33
Gelenkschmerzen	5/10	50	295?143	9/27	33,3	37?16
Aphten	1/10	10	220	5/27	18,5	52?17
Hauteffloreszenzen	0	0	0	6/27	22,2	27?14
Gewichtsverlust	1/10	10	122	2/27	7,4	28?7
Augenentzündungen	1/10	10	122	2/27	7,4	36?13

Tabelle 9: ASCA und Symptome bei Angehörigen (nur ELISA)

### 3.4 ASCA und Umweltfaktoren

#### **ASCA bei gesunden Angehörigen ersten Grades in Abhängigkeit von der Wohnsituation**

Um den Einfluß von Umweltfaktoren auf die Entstehung von ASCA zu überprüfen, wurde bei 146 gesunden Angehörigen ersten Grades von M.C.-Patienten, bei denen die Wohnsituation bekannt war, die Prävalenz von ASCA untersucht.

49 Angehörige (MW: 85?98 E/ml) wohnten mit dem Patienten zusammen in einem Haushalt, 97 Angehörige (MW: 89?99 E/ml) hatten dagegen keinen regelmäßigen Haushaltskontakt mit dem Patienten. Während neun von 49 Angehörigen (18,4%; MW: 245?132 E/ml), die mit einem Patienten in einem Haushalt lebten, auch selbst ASCA-positiv waren, erwiesen sich sogar 23 von 97 Angehörigen (23,7%; MW: 241?97 E/ml), die nicht mit einem Patienten in einem Haushalt wohnten, selbst als ASCA-positiv. Auch hier ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der ASCA-Prävalenz und des ASCA-Titers. Nur eine Familie (Abbildung 7, Nr. 39) war komplett ASCA-positiv, allerdings lebten die Angehörige dieser Familie nicht in einem Haushalt zusammen.

	IIF	ELISA	
	n (%)	n (%)	MW?SD E/ml
n <sub>gesamt</sub> : 146			
Haushaltkontakt	49	49	85?98
+	7 (14,3)	<b>9 (18,4)</b>	245?132
-	42 (85,7)	40 (81,6)	49?31
kein Haushaltkontakt	97	97	89?99
+	20 (20,6)	<b>23 (23,7)</b>	241?97
-	77 (79,4)	74 (76,3)	42?24

Tabelle 10: ASCA in Abhängigkeit von der Wohnsituation der Angehörigen

### ASCA bei gesunden Ehepartnern von hochtitrigen M.C.-Patienten

Um die Rolle von Umweltfaktoren unabhängig vom genetischen Einfluß beurteilen zu können, wurden die Seren von 32 Ehegatten von M.C.-Patienten mit bekanntem hohen ASCA-Titer auf die Prävalenz von ASCA untersucht.

Nur drei der 32 Ehepartner (9,4%) erwiesen sich im ELISA als ASCA-positiv; der Mittelwert der drei positiven Seren betrug 314?118 E/ml, der der negativen Seren 35?23 E/ml. In der indirekten Immunfluoreszenz konnte ASCA nur bei einem Ehegatten nachgewiesen werden (3,1%). Bei allen positiven Seren aus dem Kollektiv der gesunden Ehepartner war auch das Serum des zugehörigen erkrankten Partners ASCA-positiv. Bis auf eine Ehefrau (Titer: 522 E/ml) mit entzündlichen Gelenksbeschwerden und Aphten zeigten sich die beiden weiteren Ehegatten mit positiven Seren asymptomatisch. Die Prävalenz von ASCA im Kollektiv der Ehegatten von M.C.-Patienten war nicht signifikant erhöht im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv (siehe Tabelle 11 und Abbildung 8).

	Patienten (ASCA+)	Angehörige (ASCA+)	Ehegatten (ASCA+)
M.Crohn	51/74 (68,9%)	37/181 (20,4%)	3/32
Colitis ulcerosa	2/25 (8,0%)	10/86 (11,6%)	1/6

Tabelle 11: ASCA bei Angehörigen und Ehegatten von CED -Patienten

### ASCA bei gesunden Ehepartnern von C.U.-Patienten

Es wurden 6 Seren von Ehegatten von Patienten mit Colitis ulcerosa untersucht (MW:85?57 E/ml). Ein Serum erwies sich sowohl in der indirekten Immunfluoreszenz als auch im ELISA als ASCA-positiv (163 E/ml). Diese Testperson wies keinerlei Beschwerden auf, die auf eine CED hindeuten könnten. Der Ehemann, ein Patient mit Colitis ulcerosa, war ASCA-negativ. Dieser positive Befund konnte durch eine zweite Serumprobe zwei Jahre später bestätigt werden. Die ASCA-Konzentration der 5 übrigen Ehegatten betrug 69?46 E/ml (siehe Tabelle 11, Abbildung 8).

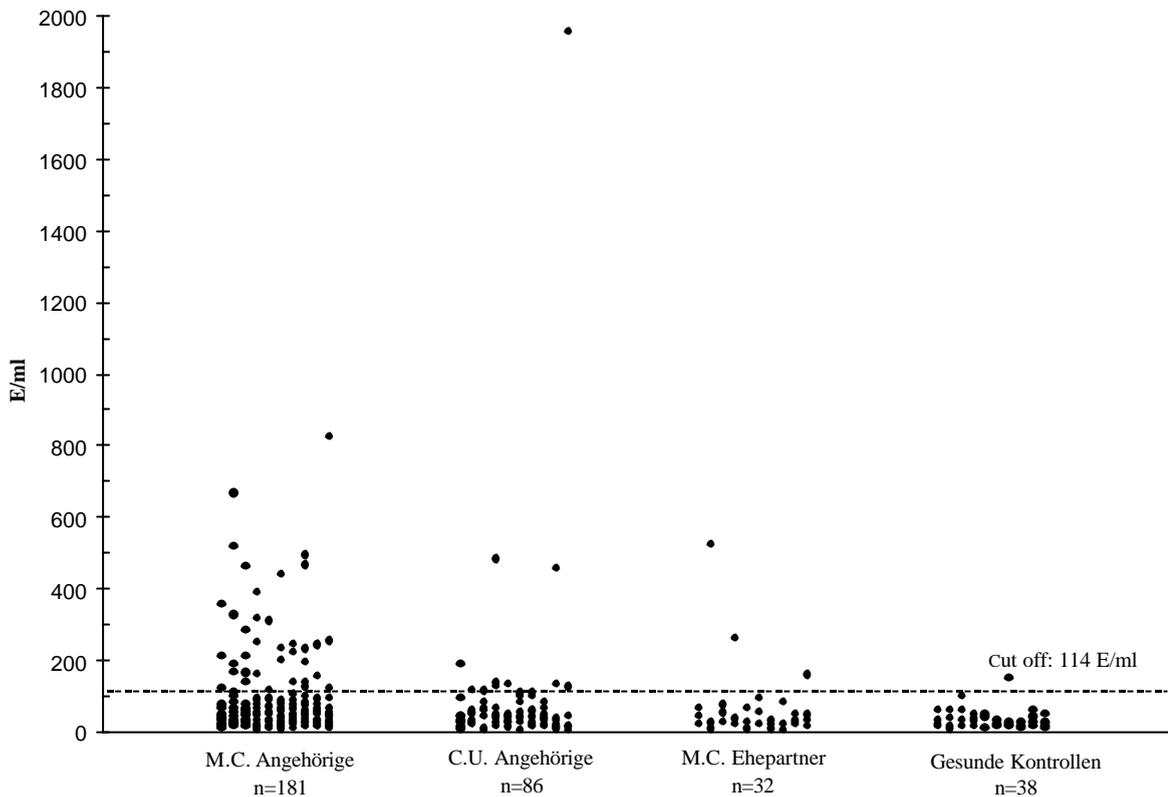


Abbildung 8: ASCA bei Angehörigen von CED-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen

### 3.5 Korrelation von ASCA und Pankreasantikörpern (PAK) bei M.C.-Patienten

Um zu untersuchen, ob es eine Korrelation zwischen der Prävalenz von Pankreasantikörpern und ASCA gibt, wurden die 74 Patienten mit Morbus Crohn aus der vorliegenden Familienstudie auf die Prävalenz von PAK untersucht:

35 der 74 (47,3%) Patienten waren PAK-positiv, die übrigen 39 Patienten PAK-negativ. Die Prävalenz von ASCA war bei den PAK-positiven Patienten mit 27 von 35 (77,1%; MW: 1309?1257 E/ml) im  $\chi^2$ -Test nicht signifikant erhöht im Vergleich zu der PAK-negativen Patientengruppe (61,5%; MW: 797?851 E/ml). PAK und ASCA sind also nicht identisch.

Hinsichtlich der Prävalenz von ASCA bei den verschiedenen Subtypen von PAK ergaben sich keine signifikanten Unterschiede: Die 35 PAK-positiven Patienten gliederten sich in 15 Befunde mit PAK I (MW: 1188?1291 E/ml), 19 mit PAK II (MW: 813?1174 E/ml) und 1 Patient mit PAK I/II (2344 E/ml).

13 der PAK I-positiven Patienten erwiesen sich auch als ASCA-positiv (87,7%; MW: 1363?1303 E/ml), aber auch 13 der PAK II-positiven Patienten (68,4%; MW: 1175?1271 E/ml) zeigten Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae*.

## 4 Diskussion

### 4.1 Sensitivität und Spezifität von ASCA bei Patienten mit Morbus Crohn und Kontrollen

Die Pathogenese des Morbus Crohn ist noch immer unklar. Wahrscheinlich ist aber für die Entstehung der Erkrankung eine Interaktion von genetischen Faktoren, Umweltfaktoren wie etwa der intestinalen Mikroflora und dem Immunsystem der Darmmucosa verantwortlich. Neben epidemiologischen Studien, die eine familiäre Häufung und eine erhöhte Inzidenz des Morbus Crohn bei Zwillingen zeigen und dem Nachweis von prädisponierenden Genloci auf verschiedenen Chromosomen, wird das Auftreten von spezifischen Autoantikörpern bei Patienten mit CED mit einer genetischen Disposition in Zusammenhang gebracht. Ein für Morbus Crohn hochspezifischer Antikörper ist ASCA, der gegen eine Tetramannose der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gerichtet ist. Die vorliegende Arbeit zeigt, daß sich Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* bei 68,8% der untersuchten Patienten mit Morbus Crohn nachweisen lassen, während ASCA in den Kontrollgruppen (Patienten mit Colitis Ulcerosa, Autoimmunhepatitis, einheimischer Sprue, primär sklerosierende Cholangitis, gesunde Personen) nicht signifikant erhöht ist. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bisherigen Studien (Barnes 1990, Sendid 1996, Quinton 1998, Ruemmele 1998, Seibold 1999), in denen die Sensitivität von ASCA zwischen 60% und 70% schwankte.

Weder die Prävalenz noch der Titer von ASCA bei Patienten mit **Morbus Crohn** ist geschlechtsabhängig: In dieser Arbeit unterschied sich diesbezüglich die männliche Patientengruppe nicht signifikant von der weiblichen Gruppe (71,4% bzw. 65,6%). Dies entspricht auch der Tatsache, daß die Erkrankung selbst etwa gleich auf beide Geschlechter verteilt ist (Kornbluth 1998). ASCA ist somit kein geschlechtsspezifischer Marker bei Patienten mit Morbus Crohn. Sowohl die Prävalenz als auch der Titer von ASCA bei **C.U.-Patienten** liegen insgesamt signifikant unter den entsprechenden Werten von M.C.-Patienten (8,0% und 43?52 E/ml versus 68,9% und 745?1035 E/ml) und halten sich damit im Rahmen früherer Studien (ca. 12%) (Quinton 1998). Nach Giaffer lassen sich auch bei **einheimischer Sprue** signifikant erhöhte IgG-Titer gegen *Saccharomyces cerevisiae* nachweisen (Giaffer 1992). Dieses Ergebnis konnte aber in anderen Studien nicht bestätigt werden (Barnes 1990, Ruemmele 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde ein niedrig positiver ASCA-Titer in der ELISA-Untersuchung bei zwei von acht Patienten mit einheimischer Sprue gefunden. Der Mittelwert dieser ASCA-positiven Seren lag bei 178?23 E/ml, also wesentlich niedriger als der von ASCA-positiven M.C.-Patienten (1068?1105E/ml). Zudem erwies sich auch bei beiden Patienten die indirekte Immunfluoreszenz, die zur Kontrolle durchgeführt wurde, als negativ.

Da in der vorliegenden Arbeit nur 8 Seren von Patienten mit Sprue untersucht wurden, sollte eine weitere Studie an einem größeren Kollektiv vorgenommen werden.

Trotz des vereinzelt Auftretens von ASCA in den Kontrollseren beträgt die Spezifität von ASCA für Morbus Crohn in dieser Versuchsreihe 94,7% bei einer Sensitivität von 68,8% und einem positiven Vorhersagewert von 95,9%. In der vorliegenden Arbeit wurde im ELISA ein Cut off von 114 E/ml verwendet, der dem Mittelwert der gesunden Kontrollen zuzüglich der dreifachen Standardabweichung entsprach. Die Spezifität könnte noch weiter erhöht werden, wenn man bei der serologischen Untersuchung im ELISA bzw. in der indirekten Immunfluoreszenz den Cut off heraufsetzt. Diese Maßnahme würde zwar die Spezifität noch mehr verbessern, aber sich zu Lasten einer geringeren Sensitivität niederschlagen.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann gefolgert werden, daß ASCA ein für Morbus Crohn hochspezifischer und sensitiver Marker ist. Die Bestimmung von ASCA kann bei der Differentialdiagnose zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, bei der Einordnung einer Colitis indeterminata und anderen chronischen Darmerkrankungen sinnvoll sein. Selbstverständlich dürfen die bewährten Diagnosekriterien wie klinischer Befund, radiologische und sonographische Verfahren und Endoskopie durch die Bestimmung von ASCA im Serum nicht ersetzt werden, aber dieser neue spezifische und sensitive Parameter stellt dem Arzt ein weiteres Diagnoseinstrument bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zur Verfügung.

#### 4.2 ASCA und klinische Parameter

In den meisten Studien konnte bisher keine signifikante Korrelation zwischen ASCA und dem Befallsmuster des Gastrointestinaltraktes bei Patienten mit Morbus Crohn gefunden werden (Main 1988, Sendid 1996, Sendid 1998, Ruemmele 1998). In der Studie von Ruemmele aus dem Jahr 1998 zeichnete sich eine Tendenz zu niedrigeren ASCA-Titern bei ausschließlichem Befall des Dickdarms im Vergleich zu anderen Befallsmustern ab (Ruemmele 1998). Nur in drei Arbeiten konnte eindeutig gezeigt werden, daß die Prävalenz von ASCA bei reinem Dünndarmbefall und Befall des gesamten Gastrointestinaltraktes signifikant höher ist als bei alleinigem Kolonbefall bzw. bei reinem Dünndarmbefall höher als bei gesamten Befall des Gastrointestinaltraktes (Giaffer 1992 bzw. Lindberg 1992).

Quinton berichtete schließlich 1998 von einer ASCA-Prävalenz bei reinem Dünndarmbefall von 62%, bei gesamten Befall des Gastrointestinaltraktes von 74%, während bei ausschließlichem Befall des Kolons nur 46% der Patienten ASCA-positiv waren (Quinton 1998). Diese letztgenannten Daten stimmen gut mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein. ASCA korreliert sonst mit keinem klinischen Parameter wie mit der Dauer der Erkrankung, der

Aktivität, den Komplikationen, noch der Behandlung mit Immunsuppressiva (Giaffer 1992, Sendid 1996, Quinton 1998, Ruemmele 1998).

Über die Gründe der unterschiedlichen Prävalenz von ASCA bei verschiedenen Befallsmustern kann nur spekuliert werden.

Möglicherweise handelt es sich bei den Patienten mit reinem Kolonbefall, einem negativen ASCA-Test und Nachweis von pANCA um eine Untergruppe, bei der sich der Morbus Crohn klinisch und histologisch ähnlich wie eine Colitis ulcerosa präsentiert. Vasiliauskas beschrieb eine solche Subgruppe, bei der 100% aller Patienten mit negativem ASCA-Test und positivem pANCA-Titer und der Diagnose Morbus Crohn eine linksseitige Colitis ohne Dünndarmbeteiligung, vergleichbar einer Colitis ulcerosa, aufwiesen (Vasiliauskas 1997). Die Präsenz des Autoantikörpers pANCA zugleich mit einem Phänotyp, der klinisch einer Colitis ulcerosa ähnelt, könnte auf eine Überlappung von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn und damit einen gemeinsamen genetischen Hintergrund hinweisen. Diese Ergebnisse konnten von Quinton nicht bestätigt werden (Quinton 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls kein Nachweis einer erhöhten Prävalenz von pANCA bei Patienten mit Kolonbefall und negativem ASCA-Titer erbracht werden.

Weiterhin könnte die divergierende Prävalenz von ASCA in den einzelnen Gruppen auch durch lokale Unterschiede des Mukosa-assoziierten Immunsystems erklärt werden. In der Tat bestehen signifikante Differenzen im Mausmodell zwischen den lokalen Immunsystemen des Dün- und Dickdarms, wobei die kleinen intraepithelialen Lymphozyten (IEL) eine allgemein erhöhte Aktivität im Dünndarm zeigen (Seibold 1998, Gastroenterology).

Am wahrscheinlichsten ist die These, daß durch die Entzündung in Dün- und Dickdarm unterschiedliche Permeabilitätsstörungen vorliegen und dadurch eine unterschiedliche Sensibilisierung der lokalen Immunsysteme durch luminale Antigene stattfinden. Dies würde auch den den ASCA-Nachweis bei einzelnen Patienten mit unbehandelter Sprue erklären. Auffällig ist in der vorliegenden Arbeit eine hohe Prävalenz von ASCA bei Patienten mit Fisteln (90%). Möglicherweise findet in den Fistelgängen ein direkter Kontakt zwischen immunkompetenten Zellen und Antigenen oder Mikroorganismen statt, der durch das fehlende Darmepithel ermöglicht wird. So könnte es zu einer im Vergleich zu anderen Befallsmustern erhöhten Antikörperproduktion kommen. Die schlechte Heilungstendenz der Fisteln könnte damit auf eine stetig stimulierte Entzündungsreaktion zurückzuführen sein.

#### 4.3 Prävalenz von ASCA bei Familienangehörigen von CED-Patienten und Kontrollen

Wie oben beschrieben, handelt es sich bei ASCA um einen für Morbus Crohn spezifischen und sensitiven Marker. Die Prävalenz von ASCA ist jedoch unabhängig von der Aktivität der Erkrankung, der medikamentösen Behandlung und von chirurgischen Resektionen befallener Darmabschnitte. So kommt der Verdacht auf, daß ASCA unabhängig vom Stadium oder Verlauf der Erkrankung eine genetische Disposition für Morbus Crohn anzeigt. Der Nachweis dieses Antikörpers bei gesunden monozygoten Zwillingen von Patienten mit Morbus Crohn gelang Lindberg im Jahr 1992, der diesen Befund als Hinweis für einen genetischen Hintergrund in der Prävalenz von ASCA wertete (Lindberg 1992). Die Prävalenz von ASCA bei gesunden blutsverwandten Personen deutet darauf hin, daß ASCA nicht nur ein sekundäres Epiphänomen der Entzündung ist, sondern einen genetisch oder exogen bedingten Marker für Morbus Crohn darstellt. Um zu untersuchen, ob die Prävalenz von ASCA durch Umweltfaktoren oder genetisch bedingt ist, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Familienstudie unter Einschluß der gesunden Angehörigen ersten Grades und der Ehegatten durchgeführt. Bei 20,4% aller gesunden Angehörigen ersten Grades von MC-Patienten konnte ASCA im Serum nachgewiesen werden ( $p < 0,01$ ). Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit den Befunden von Sendid, der ebenfalls bei 20% der gesunden Angehörigen ASCA nachweisen konnte (Sendid 98).

In 27 von 69 Familien (39,1%) fand sich mindestens ein ASCA-positiver Angehöriger. Dies zeigt, daß die Prävalenz von ASCA nicht auf wenige Familien mit vielen ASCA-positiven Angehörigen beschränkt, sondern relativ gleichmäßig verteilt ist. Geschlechtsspezifische signifikante Unterschiede in der Prävalenz von ASCA konnten ebenso wie bei den Patienten auch bei den gesunden Angehörigen nicht festgestellt werden. Ein x-chromosomaler Erbgang, der zur Generation von ASCA führt, ist damit unwahrscheinlich, da in diesem Fall eine deutliche Häufung der Prävalenz von ASCA bei Männern zu erwarten wäre. Auch eine autosomal-dominante Vererbung ist nicht nachweisbar, da sich im untersuchten Kollektiv die Prävalenz von ASCA bei Kindern von ASCA-positiven Patienten nicht signifikant von der Prävalenz bei Kindern von ASCA-negativen Patienten unterschied. Während bei Sendid ein überwiegender Teil der ASCA-positiven Angehörigen Eltern waren (61,5%) (Sendid 1998), zeigte sich in der vorliegenden Arbeit kein Schwerpunkt in der vertikalen oder horizontalen Verteilung von ASCA in den Generationen.

Auch die Mittelwerte der ASCA-Titer in den einzelnen Generationen unterschieden sich nicht signifikant. Ebenso gab es zwischen Vätern, Müttern, Brüdern, Schwestern, Söhnen und Töchtern keine signifikanten Unterschiede in Prävalenz und Titer von ASCA. Daraus läßt sich

schließen, daß ASCA nicht nach einfachen Mendelschen Regeln vererbt wird, sondern möglicherweise polygen bedingt ist.

Bei 4 von insgesamt 5 Familien mit zwei MC-Patienten ist die Prävalenz von ASCA konkordant. In einer Studie konnte gezeigt werden, daß seropositive oder seronegative Phänotypen der M.C.-Patienten unter allen erkrankten Angehörigen korreliert waren. Weiterhin erwies sich die Rate der Seropositivität für ASCA unter den Angehörigen ersten Grades höher konkordant als gegenüber allen Angehörigen (Sutton 2000). Dies kann als weiterer Hinweis dafür gewertet werden, daß das familiäre Vorkommen von ASCA genetisch bedingt ist.

Wie bereits gezeigt wurde, handelt es sich bei ASCA um einen hochspezifischen Marker für Morbus Crohn. Daher stellt sich die Frage, wie dieser Antikörper bei gesunden Angehörigen auftreten kann.

Möglicherweise verläuft bei gesunden ASCA-positiven Angehörigen die Erkrankung subklinisch. So könnte zum Beispiel eine Ileitis ohne signifikante Stenose vorliegen, die erst nach jahrelangem Verlauf symptomatisch wird. In diesem Fall wäre ASCA ein wichtiger prognostischer Parameter, der Auskunft gibt, ob bei den betroffenen Angehörigen später die Erkrankung auch tatsächlich klinisch manifest wird. Aus ethischen Gründen war es in der vorliegenden Studie nicht möglich, die ASCA-positiven gesunden Angehörigen ersten Grades endoskopisch auf das Vorliegen einer subklinischen Manifestation des Morbus Crohn zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden alle 181 gesunden Angehörigen in einem standardisierten Fragebogen nach typischen Symptomen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Diarrhoe, abdominelle Schmerzen, Gelenkschmerzen, Aphten, Hauteffloreszenzen, Gewichtsverlust und Augenentzündungen, befragt. Ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit und Qualität der Beschwerden ließ sich aber zwischen der ASCA-positiven und der ASCA-negativen Gruppe der gesunden Angehörigen nicht feststellen. Es läßt sich ebenso wie bei Patienten mit Morbus Crohn keine Korrelation von ASCA und eventuell subklinischen Symptomen bei Angehörigen nachweisen. Da es aufgrund der typischen Altersverteilung der Erkrankung relativ unwahrscheinlich ist, daß die ASCA-positiven gesunden Eltern noch einen Morbus Crohn entwickeln, kann wegen der gleichmäßigen Verteilung von ASCA innerhalb der Generationen nicht darauf geschlossen werden, daß das Vorhandensein von ASCA gleichzeitig auf ein erhöhtes Erkrankungsrisiko gegenüber den ASCA-negativen Angehörigen hindeutet. Dafür spricht auch, daß die Prävalenz von Morbus Crohn bei Angehörigen ersten Grades ca. 2,5% beträgt (Peeters 1997), während die Präsenz von ASCA in der vorliegenden Arbeit mit 20,4% wesentlich höher liegt. Aus diesem Grund ist bei Angehörigen von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ein positiver ASCA-Befund vorsichtig zu bewerten und muß nicht gleichbedeutend mit einer Erkrankung an

Morbus Crohn sein. In diesem Fall ist eine Diagnose nur in Verbindung mit eindeutiger klinischer Symptomatik, radiologischen und endoskopischen Befunden zu stellen. Die hohe Frequenz bei Angehörigen ersten Grades, aber zugleich die fehlende Korrelation mit Beschwerden der Angehörigen spricht dafür, daß es sich bei ASCA eher um einen genetischen als einen subklinischen Marker einer latenten Manifestation der Erkrankung handelt. Eine dominierende Rolle von ASCA in der Ätiopathogenese der Erkrankung und als prognostischer Parameter für die spätere Manifestation der Erkrankung ist daher unwahrscheinlich.

Bei Morbus Crohn handelt es sich wahrscheinlich um eine Erkrankung mit multifaktorieller Genese und die Prävalenz von ASCA bei gesunden Angehörigen könnte dabei nur einen prädisponierenden Faktor darstellen. Da ein ASCA-Titer über 826 E/ml ausschließlich bei Patienten mit Morbus Crohn, nicht aber bei gesunden Angehörigen gefunden wurde, könnte allerdings ein hoher ASCA-Titer ein erhöhtes Erkrankungsrisiko darstellen. Eine endgültige Klärung, ob die Prävalenz von ASCA einen Risikofaktor für die Manifestation der Erkrankung darstellt, kann jedoch nur eine Langzeitstudie erreichen, die die Entwicklung des ASCA-Titers und das eventuelle Auftreten der Krankheit bei Angehörigen über mehrere Jahre hinweg verfolgt.

Shanahan konnte 1992 nachweisen, daß pANCA bei 21,4% der Angehörigen von pANCA-positiven Patienten mit Colitis ulcerosa vorkam, aber nur bei 7% der Angehörigen von pANCA-negativen Patienten (Shanahan 1992). Daraus schloß er, daß es sich bei pANCA um einen genetischen Marker für Colitis ulcerosa handelt. In der vorliegenden Arbeit waren Angehörige von ASCA-positiven Patienten statistisch nicht häufiger selbst ASCA-positiv als Angehörige von ASCA-negativen Patienten, wie es zu erwarten gewesen wäre, wenn die Prävalenz von ASCA ausschließlich auf genetische Faktoren zurückzuführen wäre. Dieses Ergebnis läßt daher nicht eindeutig auf einen genetischen oder umweltbedingten Faktor, der zur Prävalenz von ASCA bei Patienten und Angehörigen führt, schließen.

Bildet man Paare aus Eltern und Kindern, um zu testen, ob ASCA von Eltern auf Kinder übertragen wird, so zeigt sich, daß bei 53% der Paare, bei denen mindestens ein Elternteil ASCA-positiv ist, auch mindestens ein Kind Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* aufweist. Gleichzeitig aber erwies sich bei 56% der Paare, bei denen beide Eltern ASCA-negativ sind, auch mindestens ein Kind als ASCA-positiv.

Versucht man, in der vorliegenden Arbeit eine Korrelation vom ASCA-Status der Eltern und der Erkrankung der Kinder an Morbus Crohn zu finden, so unterscheidet sich die Prävalenz von Morbus Crohn bei Kindern weder in der Gruppe mit mindestens einem ASCA-positiven Elternteil (48,8%), noch in der Gruppe mit ASCA-negativen Eltern (51,5%). Dies deutet darauf

hin, daß ASCA-positive Eltern bei familiärem Morbus Crohn im Vergleich zu ASCA-negativen Eltern für Kinder kein erhöhtes Risiko darstellen, später einen Morbus Crohn zu entwickeln. Offensichtlich sind also noch weitere Faktoren genetischer oder umweltbedingter Art notwendig, um zu einer klinisch manifesten Erkrankung zu führen. Dies weist ebenfalls auf eine multifaktorielle Genese des Morbus Crohn hin.

Diese Ergebnisse sprechen weder eindeutig für genetische noch für umweltbedingte Faktoren, die zum Phänomen der Antikörperbildung gegen *Saccharomyces cerevisiae* sowohl bei Patienten mit Morbus Crohn als auch bei ihren gesunden Angehörigen führen. In beiden Fällen würde man eine deutliche Häufung der ASCA-positiven Angehörigen in den Familien mit ASCA-positiven Patienten erwarten. Allerdings ist zu bedenken, daß sich im Laufe der Zeit der ASCA-Titer im Serum ändern könnte.

Überraschenderweise konnte ASCA auch bei gesunden Angehörigen von Patienten mit Colitis ulcerosa (11,6% im ELISA, 8,1% in der indirekten Immunfluoreszenz) nachgewiesen werden. Die Prävalenz von ASCA ist im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv erhöht, allerdings statistisch nicht signifikant ( $p > 0,1$ ). Wenn ASCA tatsächlich einen genetischen Marker bei Morbus Crohn darstellt, so könnte der Nachweis dieses Antikörpers auch bei gesunden Angehörigen von Patienten mit Colitis ulcerosa - wenn auch in weit geringerer Frequenz als bei Angehörigen von M.C.-Patienten - auf einen gemeinsamen genetischen Hintergrund beider chronisch entzündlicher Darmerkrankungen hinweisen. Epidemiologische Studien zeigen, daß die Inzidenz von Morbus Crohn auch bei Familien mit Colitis ulcerosa erhöht ist (Orholm 1991). Bei genetischen Untersuchungen wurden auf den Chromosomen 3, 7 und 12 Gene für eine erhöhte Suszeptibilität für sowohl Morbus Crohn als auch Colitis ulcerosa gefunden (siehe 1.3.1 Genetische Faktoren).

Toyoda stellte drei Thesen für das gemeinsame familiäre Auftreten von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa auf:

1. Es handelt sich genetisch um die gleiche Erkrankung
2. Multiple Gene sind bei beiden Erkrankungen beteiligt, ein oder mehrere sind aber beiden gemeinsam
3. Es gibt mehrere genetisch unterschiedliche Formen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen: Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und eine Überlappung beider Erkrankungen

(Toyoda 1993)

Um die Relevanz von ASCA hinsichtlich dieser Hypothese zu beleuchten, ist es notwendig, eine Korrelation von genetischen Befunden und dem ASCA-Titer zu untersuchen.

#### 4.4 ASCA und mögliche Umweltfaktoren

In der Ätiopathogenese des Morbus Crohn wird neben der genetischen Disposition auch ein Umweltfaktor diskutiert. Ein potentiell krankheitsauslösendes Agens, wie z.B. Mikroorganismen, besondere Nahrungsbestandteile oder Umwelttoxine, könnte somit eine Erklärung für ein familiäres Auftreten von Morbus Crohn und für die Prävalenz der für Morbus Crohn hochspezifischen Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* bei Patienten und Angehörigen bieten, da beide Gruppen ein gemeinsames Umfeld teilen. Um diese These hinsichtlich des Auftretens von ASCA bei Familienmitgliedern zu untersuchen, wurden insgesamt 146 Angehörige ersten Grades, bei denen die Wohnsituation bekannt war, in zwei Gruppen aufgeteilt, je nachdem, ob sie mit einem Morbus Crohn-Patienten in einem Haushalt zusammenleben oder nicht. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied in der ASCA-Prävalenz bei den Angehörigen bezüglich der Wohnsituation festgestellt werden. Dies ist als Hinweis dafür zu werten, daß die Prävalenz von ASCA vom jeweiligen Umfeld und damit von Umweltfaktoren unabhängig ist und wahrscheinlich von genetischen Faktoren bestimmt wird. Allerdings ist auch hier eine kritische Betrachtung der Ergebnisse notwendig, da sicherlich die meisten der ASCA-positiven Angehörigen, die jetzt getrennt vom Patienten leben, früher einmal mit dem Patienten zusammen in einem Haushalt wohnten und damit eventuell ein Kontakt mit möglichen gemeinsamen Umweltfaktoren bestand.

Um daher einen für die Prävalenz von ASCA bei nahen Kontaktpersonen verantwortlichen Umweltfaktor mit weiteren Experimenten auszuschließen, bot sich die Untersuchung der Seren von Ehepartnern von Patienten mit Morbus Crohn an, da hier zwar ein gemeinsames Umfeld, aber keine genetische Verwandtschaft besteht. Einige Studien beschreiben das Auftreten von Autoantikörpern auch bei Ehegatten von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen:

So konnte Korsmeyer nicht nur bei Patienten, sondern auch bei 50% der Ehegatten und bei 40% der im gleichen Haushalt lebenden Angehörigen lymphozytotoxische Autoantikörper nachweisen, während die Prävalenz in Kontrollseren nur 4% betrug. Nur 19% der Angehörigen, die nicht im gleichen Haushalt lebten, wiesen lymphozytotoxische Antikörper auf (Korsmeyer 1975). Auch wurde mehrfach in der Literatur das Auftreten von Morbus Crohn bei beiden Ehepartnern beschrieben (Purmann 1987, Comes 1994). Diese Untersuchungen sprechen für einen nichtgenetischen Faktor in der Pathogenese des Morbus Crohn und lassen an einen Umweltfaktor denken.

In der vorliegenden Studie wurden die Seren von 32 gesunden Ehepartnern von M.C.-Patienten mit bereits bekanntem vorwiegend hohem ASCA-Titer untersucht. Dabei trat kein signifikanter Unterschied in der Prävalenz von ASCA bei Ehegatten im Vergleich zum gesunden

Kontrollkollektiv auf. Die Prävalenz von ASCA bei gesunden Ehegatten (9,4%) von Morbus Crohn-Patienten erscheint auf den ersten Blick recht hoch, zumal alle drei ASCA-positiven Ehepartner auch mit einem hochtitrigen Morbus Crohn-Patienten verheiratet sind und eine Ehefrau (522 E/ml) sogar über Aphten und Gelenkschmerzen klagt. Aus der Familienanamnese dieser Frau ist jedoch zu erfahren, daß ihre Mutter an Colitis ulcerosa erkrankt war und so die Tochter möglicherweise an Morbus Crohn erkrankt sein könnte aufgrund des erhöhten Risikos, bei einem bereits an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung leidenden Angehörigen selbst an einer CED zu erkranken. In diesem Fall ist also der erhöhte ASCA-Titer auch mit einem genetischen Hintergrund erklärbar. Die beiden anderen ASCA-positiven Ehegatten zeigten niedrig-positive ASCA-Titer und beklagten anamnestisch keinerlei Symptome einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung. Der Befund, daß sich der Mittelwert der Ehegatten von ASCA-negativen Patienten mit Morbus Crohn nicht signifikant von dem der Ehegatten von ASCA-positiven Patienten unterscheiden, bestätigt ebenfalls, daß die Prävalenz von ASCA nicht von Umweltfaktoren abhängig ist. Die eigentliche Prävalenz von ASCA bei Ehegatten dürfte wahrscheinlich niedriger liegen, zumal in der indirekten Immunfluoreszenz nur ein Serum aus der Gruppe der Ehepartner ASCA-positiv war (3,1%). Daher nähert sich die Häufigkeit von ASCA bei Ehepartnern eher der Prävalenz im gesunden Kontrollkollektiv (2,6%) an. Somit gilt es als unwahrscheinlich, daß das Auftreten von ASCA bei Angehörigen durch Umweltfaktoren verursacht wird, da weder die Prävalenz von ASCA bei gesunden Angehörigen von der Wohnsituation abhängt, noch sich bei gesunden Ehegatten signifikant häufiger ASCA nachweisen läßt. Interessanterweise konnte ASCA auch bei einer Ehegattin eines ASCA-negativen Patienten mit Colitis ulcerosa sowohl in der indirekten Immunfluoreszenz als auch im ELISA nachgewiesen werden, wobei ihr ASCA-Titer auch bei einer weiteren Serumprobe zwei Jahre später erhöht war. Da in der vorliegenden Arbeit nur wenige Ehegatten von Patienten mit Colitis ulcerosa untersucht wurden, sollte man weitere Studien an einem größeren Kollektiv vornehmen.

#### 4.5 Die Bedeutung von ASCA für die Pathogenese des Morbus Crohn

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist ASCA ein spezifischer Marker für Morbus Crohn, der in signifikanten Titern nur bei Patienten mit Morbus Crohn und bei ihren Angehörigen nachgewiesen werden kann. So stellt sich die Frage, wie es zu dieser spezifischen Prävalenz kommt und ob ASCA eine Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielt.

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist in vielen Nahrungsmitteln der westlichen Industriegesellschaft ein wichtiger Bestandteil. So wird *Saccharomyces cerevisiae* als Wein-

oder Bierhefe, vor allem aber in Getreideprodukten als Backhefe häufig verwendet. Aus der spezifischen Prävalenz von Antikörpern gegen diesen Hefestamm bei Morbus Crohn könnte man folgern, daß die Sensibilisierung des Immunsystems und damit die Produktion von spezifischen Antikörpern durch die Ingestion von Hefezellen oder Antigenen aus der Hefezellwand angeregt wird.

So ist es nicht auszuschließen, daß neben einer genetischen Disposition Hefe oder Hefebestandteile als auslösendes Agens in der Pathogenese eine gewisse Rolle spielen, zumal bekannt ist, daß Mannane (z.B. von *C. albicans*) immunmodulatorische Effekte haben (Barclay 1992). Eine Kreuzreaktion mit Antigenen der Hefe oder aber ein Verlust der Immuntoleranz gegenüber Bestandteilen der Hefezellwand wäre als ein Faktor in der Ätiologie des Morbus Crohn oder zumindest als Ursache für die Bildung von Antikörpern gegen *Saccharomyces cerevisiae* denkbar (Main 1988, McKenzie 1990). Vor allem die hohe Spezifität von ASCA des Typs IgA für Morbus Crohn (Main 1988, Barnes 1990) scheint dafür zu sprechen, daß die immunologische Auseinandersetzung vor allem auf den Schleimhäuten, also im Gastrointestinaltrakt stattfindet. Diese These wird durch eine Studie (Barclay 1992) unterstützt, die über einen signifikanten Rückgang des CDAI (Crohn's Disease Activity Index) bei Patienten mit M.C. unter hefefreier Diät berichtet, dagegen über einen Wiederanstieg bei Einnahme von Kapseln mit Bäckerhefe.

Deutlich gegen die Theorie der direkten Beteiligung von *Saccharomyces cerevisiae* und seiner Zellwandbestandteile an der Ätiopathogenese spricht allerdings, daß die Prävalenz von ASCA in keiner Korrelation mit der Krankheitsaktivität und der medikamentösen Behandlung steht (Giaffer 1992) und daß der ASCA-Titer unabhängig von der Diät konstant blieb (Barclay 1992). Auch besteht kein Zusammenhang zwischen dem entzündungsanzeigenden CRP und der Präsenz von ASCA (Sendid 1998). Diese Befunde sprechen gegen *Saccharomyces cerevisiae* oder Zellwandbestandteile der Hefe als direkte Noxe.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die im Vergleich zum Kontrollkollektiv und zu Colitis ulcerosa-Patienten hohe Prävalenz von Antikörpern gegen *Saccharomyces cerevisiae* könnte eine primäre oder sekundär durch die Entzündung hervorgerufene Permeabilitätsstörung des Darmes bei Morbus Crohn darstellen. Eine erhöhte Permeabilität bei Patienten mit Morbus Crohn für größere Moleküle wie beispielsweise PEG 400 (Hollander 1986) ist in mehreren Studien diskutiert worden, zumal diese Störung auch bei 20% der gesunden Angehörigen ersten Grades (Peeters 1997) festgestellt wurde und demnach nicht durch eine chronische Entzündung der Darmwand hervorgerufen sein kann. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, ist ASCA spezifisch für Morbus Crohn und daher kaum ein Epiphenomen einer allgemein erhöhten Permeabilität. Vor allem die Arbeiten von McKenzie und Lindberg sprechen gegen diese

Hypothese, da ausschließlich erhöhte Antikörpertiter gegen *Saccharomyces cerevisiae*, aber nicht gegen Nahrungsmittelantigene wie Gliadin, Ovalbumin oder die Hefe *Candida albicans*, ein häufiger Kommensale des menschlichen Darms, bei Patienten mit Morbus Crohn gefunden wurden (McKenzie 1990, Lindberg 1992). Eine allgemein erhöhte Permeabilität als Grund für die spezifisch bei Morbus Crohn erhöhte Prävalenz von ASCA ist daher unwahrscheinlich, da man in diesem Falle ebenso einen erhöhten Titer gegen andere Nahrungsmittelantigene und Hefen erwarten dürfte. Endgültige Klarheit über den Zusammenhang von Permeabilitätsstörungen und ASCA kann aber nur eine kombinierte Untersuchung der Darmpermeabilität und zugleich Bestimmung des ASCA-Titers von Morbus Crohn-Patienten und ihren Angehörigen bringen.

Weiterhin könnte eine Kreuzreaktion zwischen dem Antigen von *Saccharomyces cerevisiae*, wahrscheinlich einer Mannotetraose, und anderen Antigenen in Betracht gezogen werden. Kürzlich wurde in einer Studie eine Kreuzreaktion zwischen bakteriellen Antigenen und pANCA postuliert (Seibold 1998). Oligomannoside sind unter Mikroorganismen weit verbreitete Antigene (Sendid 1996). Die Rolle von Mykobakterien, vor allem *M. paratuberculosis*, wurde früher bei der Pathogenese des Morbus Crohn diskutiert. Auch diese Bakterien besitzen Epitope mit Mannan in der Zellwand (Sendid 1996). Bemerkenswert ist, daß die DNA dieses Mykobakteriums in ca. 65% des Darmgewebes von Patienten mit Morbus Crohn nachgewiesen wurde (Sanderson 1992). Interessanterweise tritt ASCA auch bei 60-70% der Patienten im Serum auf. Allerdings konnte die daraus abgeleitete Hypothese, daß das Lipoarabinomannan der Zellwand von *M. paratuberculosis* mit dem Phosphopeptidomannan von *Saccharomyces cerevisiae* kreuzreagiert, nicht bestätigt werden (Sendid 1996).

Eine Kreuzreaktion mit bisher noch nicht identifizierten Mikroorganismen, die zur Bildung von Antikörpern gegen *Saccharomyces cerevisiae* führt, kann aber dennoch in Betracht gezogen werden. Weiterhin könnte aber auch eine Kreuzreaktion mit humanen Glykoproteinen (Sendid 1996) der Darmwand bestehen. Dies trifft zu, falls strukturelle Ähnlichkeiten zwischen dem Phosphopeptidomannan der Hefezelle und Oligomannosiden auf menschlichen Zellen, z.B. Enterozyten existieren. Damit würde ASCA einen Autoantikörper gegen körpereigene Strukturen darstellen, möglicherweise hervorgerufen durch eine Dysregulation des Immunsystems.

Die hohe Spezifität von ASCA für Morbus Crohn und die signifikant erhöhte Prävalenz bei gesunden Angehörigen (20,4%) könnte darauf hinweisen, daß bei Morbus Crohn eine genetisch determinierte Dysregulation des Immunsystems vorliegt und es infolge der abnormen Immunantwort zur Bildung von Antikörpern gegen normalerweise apathogene intestinale Antigene kommt (Barclay 1992). So könnte ASCA einen genetischen Marker darstellen, der

selbst aber nicht unbedingt eine Rolle in der Pathogenese spielt (Shanahan 1997). Nach dieser These stellt ASCA also kein Epiphenomen der Entzündung dar. Aufgrund der Tatsache, daß nicht blutsverwandte enge Kontaktpersonen wie z.B. Ehegatten von Patienten mit Morbus Crohn selbst keine signifikant erhöhte Prävalenz von ASCA aufweisen und auch die ASCA-Prävalenz bei Angehörigen unabhängig von der Wohnsituation ist, gilt es als unwahrscheinlich, daß das Auftreten von ASCA allein durch umweltbedingte Faktoren wie z.B. Nahrungsmittel oder ein von Patienten übertragbares Agens verursacht wird. ASCA kann deshalb als Ausdruck einer wahrscheinlich genetisch bedingten immunologischen Dysregulation des Immunsystems und damit als genetischer Marker gelten. Diese These wird durch die Tatsache unterstützt, daß gesunde Angehörige von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auch sonst ungewöhnliche Immunphänomene zeigen, wie z.B. eine Immunreaktion gegen ECAC (epithelial-cell-associated components) (Fiocchi 1989) und Antikörper gegen Becherzellen (Folwaczny 1997, Gastroenterology). Nach gegenwärtigem Stand der Forschung spielen immunpathologische Mechanismen in der Ätiopathogenese des Morbus Crohn eine entscheidende Rolle. Eine Schlüsselrolle kommt dabei der Interaktion des Immunsystems der Darmmukosa mit der enteralen Mikroflora zu, wobei die individuelle Empfindlichkeit genetisch festgelegt ist. Möglicherweise kommt es zu einem Zusammenbruch der Immuntoleranz gegenüber sonst apathogenen Kommensalen der Darmflora oder anderen luminalen Antigenen und so zu einer chronischen Aktivierung von Immunzellen des Gastrointestinaltraktes und Zytokinen und damit zu einer inadäquaten Immunantwort gegen luminal Antigenen (Shanahan 2001). Die Empfänglichkeit für diese Dysregulation ist wahrscheinlich genetisch bestimmt. Mit diesem Hintergrund könnte die hohe Prävalenz von ASCA sowohl bei Patienten als auch bei ihren Angehörigen erklärbar sein.

ASCA erfüllt zwei der wichtigsten Kriterien eines genetischen Markers (Seibold 1997): Hohe Spezifität und familiäres Auftreten, wie in der vorliegenden Arbeit dargelegt werden konnte. Ob sich ASCA auch über einen längeren Zeitraum konstant im Serum nachweisen läßt und damit die dritte Forderung eines genetischen Markers erfüllt, kann aus der vorhandenen Literatur nicht ausreichend belegt werden. Einzig die Studie von Barclay beschreibt einen konstanten ASCA-Titer bei Patienten über drei Monate (Barclay 1992). Daher sind weitere prospektive Studien erforderlich, um den Verlauf des ASCA-Titers bei Patienten und Angehörigen zu charakterisieren.

Die Immunreaktion gegen Antigene von *Saccharomyces cerevisiae* ist nicht nur auf das humorale Immunsystem beschränkt. Wie eine Untersuchung von Young zeigt, kommt es *in vitro* nach Stimulation durch Bäckerhefe zu einer Proliferation von peripheren Lymphozyten, die von Patienten mit Morbus Crohn isoliert wurden, während bei Lymphozyten von gesunden

Kontrollpersonen keine Reaktion festgestellt wurde (Young 1994). Da im Entzündungsprozess T-Zellen eine maßgebliche Rolle spielen, sollte der Zusammenhang zwischen einzelnen Subpopulationen der T-Zellen und der Reaktion auf Stimulation durch Bäckerhefe oder Zellwandantigene von *Saccharomyces cerevisiae* untersucht werden.

#### 4.6 Korrelation von PAK und ASCA bei Patienten mit Morbus Crohn

In bisherigen Studien konnten Antikörper gegen Pankreasgewebe (PAK) bei ca. 27 % der Patienten mit Morbus Crohn nachgewiesen werden (Seibold 1997). Die hohe Prävalenz von PAK (47,3%) in der vorliegenden Arbeit ist dadurch bedingt, daß die Patientengruppe in einer vorangehenden Studie (Tanza 1999) zusammengestellt wurde und zu ca. 50% aus bereits bekannten PAK-positiven Crohn-Patienten bestand.

Hinsichtlich der Prävalenz von PAK und ASCA gibt es keine signifikante Korrelation zwischen beiden Markern. ASCA und PAK erkennen damit unterschiedliche Antigene, wobei ASCA wesentlich sensitiver ist. PAK ist zwar ein hochspezifischer Marker für Morbus Crohn, sollte aber aufgrund seiner niedrigen Sensitivität nur in Kombination mit ASCA und pANCA, einem für Colitis ulcerosa sensitiven Antikörper, zur serologischen Differentialdiagnose von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzt werden. Die Kombination dieser drei spezifischen Antikörper in der Diagnostik kann die Sensitivität und Spezifität in der serologischen Differentialdiagnose der CED weiter erhöhen.

#### 4.7 Schlußfolgerungen

Folgende Schlußfolgerungen können aus der vorliegenden Arbeit gezogen werden: ASCA ist ein für Morbus Crohn hochspezifischer Marker, der sich auch bei über 20% der gesunden Angehörigen ersten Grades nachweisen läßt. Wahrscheinlich handelt es sich bei ASCA um einen Marker für eine genetisch determinierte Dysregulation des Immunsystems der Darmmucosa, da ASCA bei nicht blutsverwandten engen Kontaktpersonen nicht signifikant erhöht ist und die Prävalenz unabhängig von der Wohnsituation der Angehörigen ist. Zusammen mit weiteren Autoantikörpern (PAK und pANCA) stellt ASCA ein wertvolles Hilfsmittel bei der serologischen Differentialdiagnose der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen dar. Bei ausschließlichem Kolonbefall ist die Prävalenz von ASCA signifikant verringert gegenüber anderen Befallsmustern des Gastrointestinaltraktes.

## 5 Zusammenfassung

Der Morbus Crohn tritt familiär gehäuft auf. Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) gelten als spezifische und sensitive serologische Marker bei Patienten mit Morbus Crohn (M.C.), die mit einer Mannotetraose, einem Antigen der Hefezellwand, reagieren. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß sich ASCA auch bei gesunden Angehörigen ersten Grades von M.C.-Patienten nachweisen läßt. Dazu wurden die Seren von 69 Familien mit 74 Patienten und 181 gesunden Angehörigen ersten Grades mit den Methoden der indirekten Immunfluoreszenz und eines ELISA-Testsystems untersucht. Als Kontrollkollektive dienten gesunde Personen (n=38), 25 Patienten mit Colitis ulcerosa und 86 gesunde Angehörige, 38 Ehegatten von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, 11 Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis, 12 Patienten mit Autoimmunhepatitis und 8 Patienten mit einheimischer Sprue. Der ELISA, der nach Extraktion des Antigens aus der Hefezellwand in der vorliegenden Arbeit etabliert wurde, korreliert sehr gut mit der indirekten Immunfluoreszenz, erreicht eine Spezifität von 94,7% und kann als Testsystem für die Routinediagnostik bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) standardisiert werden.

Während 68,8% der Patienten Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* aufwiesen, zeigten auch 20,4% der Angehörigen diesen Antikörper im Serum. In 39,1% aller Familien fand sich mindestens ein ASCA-positiver Angehöriger. Im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv zeigte sich in der Prävalenz von ASCA sowohl bei Patienten als auch bei ihren Angehörigen eine hohe Signifikanz ( $p < 0,0005$  bzw.  $p < 0,01$ ). Demgegenüber kam es zu keiner signifikanten Erhöhung von ASCA in den Seren der Kontrollgruppen.

Entgegen den geläufigen Angaben aus der Literatur konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikant erhöhte Prävalenz von ASCA bei Befall des gesamten Gastrointestinaltraktes (76,6%), des terminalen Ileums und Kolons (83,9%) oder bei Fisteln (90,0%) im Vergleich zu reinem Kolonbefall (47,6%) gefunden werden.

Sollte es sich bei ASCA um einen genetischen Marker handeln, so kann kein einfacher geschlechtsgebundener oder Mendelscher Erbgang, sondern vielmehr eine polygene Vererbung angenommen werden. Ein Unterschied in der vertikalen oder horizontalen Verteilung von ASCA bei den Angehörigen trat nicht auf.

Um zu untersuchen, ob ASCA von möglichen Umweltfaktoren abhängig ist, wurden die Seren von 32 gesunden Ehepartnern von M.C.-Patienten auf die Prävalenz von ASCA überprüft (nicht signifikant). Weiterhin zeigte sich der ASCA-Status der gesunden Angehörigen ersten Grades statistisch unabhängig davon, ob sie zusammen oder getrennt mit dem Patienten in einem

Haushalt lebten. Somit ist die Induktion von ASCA wahrscheinlich nicht durch Umweltfaktoren beeinflusst.

Auch bei Angehörigen von Patienten mit Colitis ulcerosa (n=86) konnte ASCA in 11,6% nachgewiesen werden. Dies könnte mit der allgemein bekannten erhöhten Inzidenz von Morbus Crohn bei Verwandten von Colitis ulcerosa-Patienten erklärt werden und deutet möglicherweise auf einen gemeinsamen genetischen Hintergrund beider Erkrankungen hin.

ASCA erkennt ein anderes Antigenepitop als PAK (Pankreasantikörper). Somit stellen beide Antikörper voneinander unabhängige sensitive und spezifische Marker für eine serologische Differentialdiagnose der CED dar.

Die gegenüber dem Kontrollkollektiv hochsignifikante Prävalenz von ASCA bei gesunden Angehörigen, die hohe Spezifität bei Patienten mit Morbus Crohn und die Unabhängigkeit von der Krankheitsaktivität bzw. subklinischen Symptomen bei gesunden Angehörigen sprechen gegen einen Sekundäreffekt bei chronischer Entzündung als Ursache für die Prävalenz von ASCA. Es handelt sich bei ASCA wahrscheinlich um einen genetischen Marker, der eine inadäquate, für Morbus Crohn spezifische Immunantwort gegen luminale Antigene, bedingt durch eine genetische Dysregulation des Immunsystems, widerspiegeln könnte. Ob die Prävalenz von ASCA bei gesunden Angehörigen eine Prädisposition zu einer späteren Erkrankung an Morbus Crohn darstellt, ist unsicher, zumal dieser Antikörper bei 20,4% der gesunden Angehörigen auftritt, aber die Prävalenz von Morbus Crohn in der Familie nach Literaturangaben nur ca. 2,5% beträgt. Die vorliegende Arbeit zeigt den Stellenwert von ASCA bei der serologischen Differentialdiagnose der CED und bietet mit dem Nachweis von ASCA bei gesunden Angehörigen ersten Grades einen weiteren Hinweis für die Beteiligung einer genetisch bedingten Dysregulation des Immunsystems an der Pathogenese des Morbus Crohn.

## 6 Literaturverzeichnis

- Barclay GR., McKenzie H., Pennington J., Parratt D., Pennington CR. (1992)  
The Effect of Dietary Yeast on the Activity of Stable Chronic Crohn's Disease  
Scand J Gastroenterol, 27: 196-200
- Barnes RMR., Allan Susan, Taylor-Robinson CH., Finn R., Johnson PM. (1990)  
Serum Antibodies Reactive with *Saccharomyces cerevisiae* in Inflammatory Bowel  
Disease: Is IgA Antibody a Marker for Crohn's Disease?  
Int Arch Allergy Appl Immunol, 92: 9-15
- Bayless TM, Tokayer AZ., Polito JM-2<sup>nd</sup>, et al. (1996)  
Crohn's disease: concordance for site and clinical type in affected family members-  
potential hereditary  
Gastroenterology, 111: 573-9
- Börner N. (1998)  
Chronisch entzündliche Darmerkrankungen  
in: Lehnert H., Schuster H.-P.: Essentials Innere Medizin  
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1998, 301-23
- Brant SR., Fu CT., Fields CT., et al. (1998)  
American families with Crohn's disease have strong evidence to chromosome 16 but  
not chromosome 12  
Gastroenterology, 115: 1056-61
- Comes MC., Gower-Rousseau C., Colombel JF., et al. (1994)  
Inflammatory bowel disease in married couples: 10 cases in Nord Pas de Calais region  
of France and Liege county of Belgium  
Gut, 35: 1316-8
- Conner, E.M., Aiko S., Grisham M. (1994)  
Genetically engineered models of inflammatory bowel disease  
Current Opinion in Gastroenterology, 10: 358-64

Farmer, R G (1989)

Study of family history among patients with inflammatory bowel disease

Scand J Gastroenterol., 24, suppl: 64-8

Fiocchi C., Roche JK., Michener WM. (1989)

High prevalence of antibodies to intestinal epithelial antigens in patients with inflammatory bowel disease and their relatives

Ann Intern Med, 110: 786-94

Folwaczny C., Noehl Nicole, Tschöp Katharina, et al. (1997)

Goblet Cell Autoantibodies in Patients with Inflammatory Bowel Disease and Their First-Degree Relatives

Gastroenterology, 113: 101-6

Giaffer MH., Clark A., Holdsworth CD. (1992)

Antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* in patients with Crohn's disease and their possible pathogenic importance

Gut, 33:1071-5

Grandbastien B., Peeters M., Franchimont D., et al. (1998)

Anticipation in familial Crohn's disease

Gut, 42: 170-4

Heelan BT., Allan Susan, Barnes R.M.R (1991)

Identification of a 200-kDa glycoprotein antigen of *Saccharomyces cerevisiae*

Immunol Lett, 28:181-6

Hollander D., Vadheim CM., Brettholz E., et al. (1986)

Increased Intestinal Permeability in Patients with Crohn's Disease and Their Relatives

Ann Intern Med, 105: 883-5

Jewell DP. (1998)

Ulcerative Colitis

in: Feldman M., Schaschmidt BF., Sleisenger MH.: Sleisenger & Fordtran's  
Gastrointestinal and Liver Disease, 1735-61

6<sup>th</sup> Edition, Vol 2, W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Montreal,  
Sydney, Tokyo 1998

Klis FM. (1994)

Review: Cell Wall Assembly in Yeast

Yeast, 10: 851-869

Kocourek J., Ballou CE., (1969)

Method for Fingerprinting Yeast Cell Wall Mannans

J Bacteriol, 100: 1175-81

Kornbluth A., Sachar DB., Salomon P. (1998)

Crohn's Disease

in: Feldman M., Schaschmidt BF., Sleisenger MH.: Sleisenger & Fordtran's  
Gastrointestinal and Liver Disease, 1708-34

6<sup>th</sup> Edition, Vol 2, W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Montreal,  
Sydney, Tokyo 1998

Korsmeyer SJ., Williams RC. Jr, Wilson ID., et al. (1975)

Lymphocytotoxic antibody in inflammatory bowel disease -a family study

N Engl J Med, 293:1117-20

Lee JCW., Lennard-Jones JE., Cambridge G., et al. (1995)

Antineutrophil antibodies in familial inflammatory bowel disease

Gastroenterology, 108: 428-33

Lenter C. (1985)

Wissenschaftliche Tabellen Geigy, Statistik, 8. Aufl., 30-7

Ciba-Geigy, Basel, 1985

- Lindberg E., Magnusson K-E., Tysk C., Järnerot G. (1992)  
Antibody (IgG, IgA, and IgM) to baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), yeast mannan, gliadin, ovalbumin and betalactoglobulin in monozygotic twins with inflammatory bowel disease  
*Gut*, 33: 909-13
- Main J., McKenzie H., Yeaman GR., Kerr MA., Robson D., Pennington CR (1988)  
Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) in Crohn's disease  
*Br Med J*; 297: 1105-6
- McKenzie H., Main J., Pennington CR., Parratt D. (1990)  
Antibody to selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* (baker's and brewer's yeast) and *Candida albicans* in Crohn's disease  
*Gut*, 31:536-8
- Monsen U., Bernell O, Johansson C., Hellers G. (1990)  
Prevalence of Inflammatory Bowel Disease among Relatives of Patients with Crohn's Disease  
*Scand J Gastroenterol*, 26: 302-6
- Naom I., Lee J., Ford Deborah, et al. (1996)  
Analysis of the Contribution of HLA Genes to Genetic Predisposition in Inflammatory Bowel Disease  
*Am J Hum Genet*, 59: 226-33
- Orholm Marianne, Munkholm Pia, Langholz Ebbe, et al. (1991)  
Familial Occurrence of Inflammatory Bowel Disease  
*N Engl J Med*, 324: 84-8
- Peeters M., Nevens H., Baert F., et al. (1996)  
Familial Aggregation in Crohn's disease: Increased Age-Adjusted Risk and Concordance in Clinical Characteristics  
*Gastroenterology*, 111: 597-603

- Peeters M, Geypens B., Claus D., et al. (1997)  
Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn's disease  
Gastroenterology, 113:802-7
- Plevy SE., Vasiliauskas EA, Taylor K., et al. (1997)  
The Crohn's Disease Associated Tumor Necrosis Factor (TNF) Microsatellite  
A2B1C2D4E1 Haplotype and Anti-Saccharomyces Cerevisiae Antibody (ASCA)  
Define Medically Resistant Forms of Ulcerative Colitis [Abstract]  
Gastroenterology, 112, A 1062
- Purmann J., Cleveland S., Miller B., Stohmeyer G. (1987)  
Crohn's Disease in a Married Couple  
Hepato-gastroenterol, 34: 132-3
- Quinton JF., Sendid B., Reumaux D., et al. (1998)  
Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan combined with antineutrophil antibodies in  
inflammatory bowel disease: Prevalence and diagnostic role  
Gut, 42:788-91
- Reumaux D., Colombel JF., Delecourt L., et al. (1993)  
Antineutrophil cytoplasmic auto-antibodies (ANCA) in patients with ulcerative colitis:  
influence of disease activity and familial study  
Adv Exp Med Biol, 336:515-18
- Riede U.-N., Schaefer H.-E. (1995)  
Dünndarm, Morbus Crohn  
in: Riede U.-N., Schaefer H.-E.: Allgemeine und spezielle Pathologie, 706-13  
4. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York
- Riordan AM., Hunter JO., Cowan RE., et al. (1993)  
Treatment of active Crohn's disease by exclusion diet: East Anglian Multicentre  
Controlled Trial  
Lancet, 342: 1131-4

- Ruemmele FM., Targan SR., Levy G., et al. (1998)  
Diagnostic Accuracy of Serological Assays in Pediatric Inflammatory Bowel Disease  
*Gastroenterology*, 115: 822-9
- Sachar DB. (1996)  
Crohn's disease: A Familial Affair [Editorial]  
*Gastroenterology*, 111: 813-25
- Sander U., Kunze Irene, Bröker M., Kunze G. (1998)  
Humoral immune response to a 200-kDa glycoprotein antigen of *Saccharomyces cerevisiae* is common in man  
*Immunol Lett*, 61: 113-17
- Sanderson JD, Moss MT., Tizard ML., Hermon-Taylor J. (1992)  
Mycobacterium paratuberculosis DNA in Crohn's disease tissue  
*Gut*, 33: 890-6
- Schreuder MP., Mooren ATA., Toschka HY., et al. (1996)  
Immobilizing proteins on the surface of yeast cells  
*Trends-Biotechnol.*, 14: 115-20
- Seibold F., Weber P., Jenss H., Wiedmann KH. (1991)  
Antibodies to a trypsin sensitive pancreatic antigen in chronic inflammatory bowel disease: specific markers for a subgroup of patients with Crohn's disease  
*Gut*, 32: 1192-7
- Seibold F., Slametschka D., Gregor M., Weber P. (1994)  
Neutrophil Autoantibodies: A Genetic Marker in Primary Sclerosing Cholangitis and Ulcerative Colitis  
*Gastroenterology*, 107: 532-6
- Seibold F., Mörk H., Tanza S., et al. (1997)  
Pancreatic autoantibodies in Crohn's disease: a family study  
*Gut*, 40: 481-4

- Seibold F., Seibold-Schmid Beatrice, Cong Y., et al. (1998)  
Regional differences in L-Selectin Expression in Murine Intestinal Lymphocytes  
Gastroenterology, 114: 965-74
- Seibold F., Brandwein S., Simpson S., et al. (1998)  
pANCA Represents a Cross-Reactivity to Enteric Bacterial Antigens  
J Clin Immunol, 18: 153-60
- Seibold F., Hufnagl R., Scheurlen M. (1999)  
Differentialdiagnose zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa  
Sind spezifische Autoantikörper in der Differentialdiagnose hilfreich?  
Fortschritte der Medizin-Originalien, 116: 19-23
- Sendid B., Colombel JF., Jacquinet PM., et al. (1996)  
Specific antibody response to oligomannosidic epitopes in Crohn´s disease  
Clin Diag Lab Immunol, 3: 219-26
- Sendid B., Quinton JF., Charrier G., et al. (1998)  
Anti-Saccharomyces cerevisiae Mannan Antibodies in Familial Crohn´s Disease  
Am J Gastroenterol, 93: 1306-10
- Shanahan F., Duerr RH., Rotter JI., et al. (1992)  
Neutrophil autoantibodies in ulcerative colitis: Familial aggregation and genetic heterogeneity  
Gastroenterology, 103: 456-61
- Shanahan F. (1997)  
Antibody ´markers´ in Crohn´s disease: opportunity or overstatement? [Commentary]  
Gut, 40: 557-8
- Shanahan F. (2001)  
Inflammatory Bowel Disease: Immunodiagnostics, Immunotherapeutics, and Ecotherapeutics  
Gastroenterology, 120: 622-35

Sutton CL., Yang H., Li Z. (2000)

Familial expression of anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies in affected and unaffected relatives of patients with Crohn's disease  
Gut, 46: 58-63

Tanza Stephanie. (1999)

Pankreasantikörper beim Morbus Crohn, eine Familienstudie  
Medizinische Dissertation  
Universität Würzburg, 1999

ter Meulen, V. (1998)

Measles virus and Crohn's disease: view of a medical virologist  
[Leading article]  
Gut, 43: 733-4

Toyoda H., Wang SJ., Yang Hy., et al.(1993)

Distinct associations of HLA class II genes with inflammatory bowel disease  
Gastroenterology, 104: 741-8

Truelove SC., Witts LJ. (1955)

Cortisone in ulcerative colitis. Final report on a therapeutic trial  
Br Med J, 2:1041-8

Van de Merve JP., Schroder AM., Wensinck F., et al. (1988)

The obligate anaerobic faecal flora of patients with Crohn's disease and their first-degree relatives  
Scand J Gastroenterol, 23: 1125-31

Vasiliauskas EA., Plevy SE., Landers CJ., et al. (1996)

Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Crohn's disease define a clinical subgroup  
Gastroenterology, 110: 1810-19

Vasiliauskas EA., Plevy SE., Targan SR. (1997)

Stratification of Crohn's disease by antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and anti-Saccharomyces cerevisiae antibody (ASCA) distinguishes phenotypic subgroups  
[abstract]

Gastroenterology, 112: A1112

Wayne LG., Hollander D., Anderson Beatriz, et al. (1992)

Immunoglobulin (IgA) and IgG Serum Antibodies to Mycobacterial Antigens in  
Crohn's Disease Patients and Their Relatives

J Clin Microbiol, 30: 2013-8

Werner J. (1984)

Medizinische Statistik, 41-54

1. Aufl., Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1984

Weterman IT., Pena AS. (1984)

Familial incidence of crohn's disease in the Netherlands and a review of the literature

Gastroenterology, 86: 449-52

Young C., Sonnenberg A., Burns Edith (1994)

Lymphocyte Proliferation Response to Baker's Yeast in Crohn's Disease

Digestion, 55: 40-3

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Struktur der Zellwand von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (aus Schreuder MP et al., Immobilizing proteins on the surface of yeast cells, Trends-Biotechnol., 14:115-20, 1996) .....	12
Abbildung 2: Struktur des Phosphopeptidomannans (aus Sendid B et al., Specific antibody response to oligomannosidic epitopes in Crohn´s disease, Clin Diag Lab Immunol, 3: 219-26, 1996) .....	13
Abbildung 3: Fluoreszenz der Hefezellwand unter UV-Licht nach Inkubation.....	26
Abbildung 4: Korrelation von indirekter Immunfluoreszenz (IIF) und ELISA .....	27
Abbildung 5: Prävalenz von ASCA bei M. Crohn im Vergleich zu den Kontrollkollektiven.....	30
Abbildung 6: Prävalenz von ASCA bei den Gruppen mit verschiedenen Befallsmustern.....	33
Abbildung 7: Stammbäume der 69 getesteten Familien mit Crohn-Patienten.....	39
Abbildung 8: ASCA bei Angehörigen von CED-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen .....	43
Tabelle 1: Entsprechung von IIF und ELISA .....	27
Tabelle 2: ASCA bei Patienten mit M.C. und in den Kontrollkollektiven .....	28
Tabelle 3: ASCA bei M.C.-Patienten in Abhängigkeit vom Geschlecht.....	29
Tabelle 4: ASCA und pANCA bei Patienten mit Morbus Crohn und unterschiedlichem Befallsmuster .....	32
Tabelle 5: ASCA bei CED-Patienten und Familienmitgliedern.....	34
Tabelle 6: ASCA und Geschlechtsverteilung bei Angehörigen von M.C.-Patienten.....	35
Tabelle 7: Verteilung von ASCA innerhalb der Generationen bei Angehörigen .....	36
Tabelle 8: ASCA bei Angehörigen in Abhängigkeit vom ASCA-Status des zugehörigen Patienten.....	38
Tabelle 9: ASCA und Symptome bei Angehörigen .....	41
Tabelle 10: ASCA in Abhängigkeit von der Wohnsituation der Angehörigen.....	42
Tabelle 11: ASCA bei Angehörigen und Ehegatten von CED-Patienten.....	42

## **Verzeichnis bisher veröffentlichter wissenschaftlicher Arbeiten**

Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* (ASCCA): Ein neuer hochspezifischer Marker für Morbus Crohn (MC)

R.Hufnagl, O.Stich, M. Scheurlen, F. Seibold

26. Kongress der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e.V.

Augsburg, 1998

Anti-*Saccharomyces cerevisiae* Antibodies in Inflammatory Bowel Disease: a Family Study

F. Seibold, O.Stich, R. Hufnagl, S. Kamil, M. Scheurlen

Scand J Gastroenterol 2001; 36:196-201

## **Danksagung**

Für die freundliche Überlassung des Themas bedanke ich mich herzlich bei Prof. Dr. med. M. Scheurlen, Medizinische Poliklinik der Universität Würzburg und bei Priv.-Doz. Dr. med. F. Seibold, Inselspital Bern, Schweiz, für die gute Betreuung und Anregungen während der experimentellen Phase der Arbeit und die Hilfestellungen bei der schriftlichen Arbeit.

Weiterhin schulde ich Herrn PD. Dr. Seibold großen Dank für seine erfolgreichen Bemühungen um eine Veröffentlichung von Teilen der vorliegenden Arbeit auf dem 26. Kongress der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e.V. in Augsburg 1998 und im Scandinavian Journal of Gastroenterology 2001.

Herrn Professor Dr. med. W. Scheppach von der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg danke ich für seine Unterstützung als Korreferent.

## **Oliver Stich**

Birkenstraße 2  
97456 Hambach  
Email: oliverstich@web.de  
Tel. 09725-708799

### **Persönliche Angaben**

geboren am 04. Januar 1974 in Würzburg  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Ausbildung**

1980 – 1984 Kerschensteiner Grundschule in Schweinfurt  
1984 – 1993 humanistisches Celtis-Gymnasium in Schweinfurt  
mit dem Abschluß Abitur (Note: 1,7), Latinum und Graecum  
1993 – 1994 Zivildienst im St. Elisabeth-Krankenhaus in Bad Kissingen  
1995 – 2001 Studium der Humanmedizin an der Julius–Maximilians-  
Universität zu Würzburg (Gesamtnote: 1,49)

### **Famulaturen**

1997 Kardiologie am Martin-Luther-Krankenhaus in Schleswig  
1998 Chirurgie am Klinikum Villingen in Villingen-Schwenningen  
1999 Anästhesie am Klinikum Konstanz  
1999 Innere Medizin in der Praxis Dr. Heise, Würzburg  
2000 Chirurgie am Universitätskrankenhaus von Iraklio/Kreta

### **Praktisches Jahr**

1. Tertial Innere Medizin (Nephrologie und Pulmologie) an der  
Universitätsklinik Würzburg, Prof. Dr. G. Ertl  
2. Tertial Chirurgie am Kantonsspital Winterthur, Prof. Dr. M. Decurtins  
3. Tertial Neurologie an der Universitätsklinik Würzburg, Prof. Dr. K.  
Toyka

### **wissenschaftliche Arbeiten**

1998 Ausarbeitung einer Dissertation über Antikörper gegen  
Saccharomyces cerevisiae (ASCA) bei M. Crohn unter Prof.  
Dr. M. Scheurlen und PD. Dr. F. Seibold  
1998 Vortrag über einen Teil der Ergebnisse auf dem 26. Kongress der  
Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e.V.  
2001 Veröffentlichung eines Teils der Ergebnisse im Scandinavian  
Journal of Gastroenterology 2001; 36:196-201

### **Tätigkeiten neben dem Studium**

1996 Tätigkeit als Pflegehelfer an der Universitätsklinik Würzburg  
Tutor der Erstsemester der Universität Würzburg  
seit 1996 Nachwachtentätigkeit in der Pulmologie und der internistischen  
Privatstation der Universitätsklinik Würzburg  
1997 – 2001 regelmäßige Teilnahme an den Zusatzveranstaltung Klinische  
Röntgendiagnostik unter Prof. Dr. Kulke, Interne Intensiv-  
medizin unter Prof. Dr. Langenfeld und Besuch der  
Ringvorlesung Schmerztherapie unter PD. Dr. Sommer

### **Auslands - aufenthalte**

2000 chirurgische Famulatur an der Uniklinik von Iraklio/Kreta  
2001 Chirurgie am Kantonsspital Winterthur unter Prof. Dr. Decurtins

### **weitere Kenntnisse**

Englisch fließend in Wort und Schrift, sehr guter Umgang mit Microsoft Word,  
Excel, Power Point und Internet

### **persönliche Interessen**

Archäologie, Studienreisen, Lesen, Judo

Würzburg, den 04. Dezember 2001