

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Horst L. Fehm

**ANTIKÖRPER GEGEN YERSINIEN-ANTIGENE
IN DER DARMSCHLEIMHAUT VON PATIENTEN MIT
CHRONISCH ENTZÜNDLICHEN DARMERKRANKUNGEN**

INAUGURALDISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität Lübeck

vorgelegt von

NINA DREXELIUS
aus Hamburg

Lübeck 2006

1. Berichterstatter:
Prof. Dr. med. Diether Ludwig

2. Berichterstatter:
Prof. Dr. med. Pierre Moubayed

Tag der mündlichen Prüfung: 6.3.2009

Zum Druck genehmigt.

Lübeck, den 6.3.2009

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
– Dekan der Medizinischen Fakultät –

INHALT

1.	EINLEITUNG (HINTERGRUND, LITERATURÜBERSICHT)	8
2.	FRAGESTELLUNG	28
3.	PATIENTENKOLLEKTIV UND PROBENGEWINNUNG	29
4.	METHODEN	31
5.	ERGEBNISSE	42
6.	DISKUSSION	61
7.	ZUSAMMENFASSUNG	77
8.	LITERATUR	78
9.	ANHANG I – MATERIALIEN	92
10.	ANHANG II – TABELLE ALLER PATIENTEN	97
11.	ANHANG III – ABKÜRZUNGEN	98
12.	DANKSAGUNG	101
13.	LEBENS LAUF	102

INHALT

1.	EINLEITUNG	8
1.1.	CHRONISCH ENTZÜNDLICHE DARMERKRANKUNGEN	8
1.1.1.	Definition und Diagnose	8
1.1.2.	Theorien zur Etiologie	8
1.1.2.1.	Genetische Faktoren	9
1.1.2.2.	Störungen im Immunsystem	10
1.1.2.3.	Intestinale Permeabilität	11
1.1.2.4.	Umweltfaktoren	12
1.2.	HINWEISE AUF EINE INFEKTIÖSE GENESE VON MORBUS CROHN UND COLITIS ULCEROSA	13
1.2.1.1.	Schwierigkeit der Differenzialdiagnose „infektiöse“ und „idiopathische“ entzündliche Darmerkrankungen	14
1.2.2.	Epidemiologische Daten	14
1.2.3.	Tierversuche („Transmission Experiments“)	15
1.2.4.	Antibakterielle Antikörper	15
1.3.	YERSINIA ENTEROCOLITICA	16
1.3.1.	Klinik und Epidemiologie	16
1.3.2.	Antigenstruktur und Virulenz	18
1.3.2.1.	Plasmidkodierte Virulenzfaktoren	19
1.3.2.2.	Chromosomal kodierte Virulenzfaktoren	20
1.3.3.	Invasion in die Darmschleimhaut und Persistenz im Wirtorganismus	21
1.3.4.	Antikörper gegen Yersinien	22
1.4.	YERSINIA ENTEROCOLITICA UND CHRONISCH ENTZÜNDLICHE DARMERKRANKUNGEN	23
1.4.1.	Induktion von Autoimmunität durch Yersinien	23
1.4.2.	Fallstudien und Langzeitbeobachtungen	26
1.4.3.	Serologie	26
1.4.4.	Mikrobiologische Befunde	27
2.	FRAGESTELLUNG	28
3.	PATIENTENKOLLEKTIV UND PROBENGEWINNUNG	29

4.	METHODEN	31
4.1.	ANTIGENPRÄPARATION	31
4.2.	MARKIERUNG VON ANTIGENPRÄPARATIONEN	31
4.2.1.	Biotinylierung	31
4.2.2.	Fluorescein-Markierung	33
4.3.	AUFBEREITUNG DER GEWEBEPROBEN	33
4.4.	ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG (IEF)	34
4.4.1.	Herstellung des Agarosegels für die IEF	35
4.4.2.	Durchführung der IEF	36
4.5.	TRANSFER AUF NITROZELLULOSE-MEMBRAN	38
4.6.	REVERSES IMMUNBLOTTING	39
4.7.	IMMUNFÄRBUNG	39
4.8.	ERGÄNZENDE VERSUCHE MIT ANTI-IMMUNGLOBULINEN	40
4.8.1.	Bestimmung der Immunglobulinklasse mit markierten Anti-Immunglobulinen	40
4.8.2.	Blockierung von Immunglobulinen mit unmarkierten Anti-Immunglobulinen	40
4.8.2.1.	Blockierung der Yersinia-spezifischen Bindungsstellen mit unmarkierten Yersinien-Antigenen	41
5.	ERGEBNISSE	42
5.1.	VORGEHEN BEI DER AUSWERTUNG	42
5.2.	ERGEBNISSE DER GEWEBEPROBEN	43
5.3.	EINFLUSS ANDERER MERKMALE	47
5.3.1.	Krankheitsaktivität	47
5.3.2.	Entzündungsgrad	49
5.3.3.	Ausdehnung der Entzündung	52
5.3.4.	Entnahmestelle, Alter, Geschlecht	54
5.4.	STATISTISCHE AUSSAGEKRAFT	55
5.5.	VERSUCHE ZUR ÜBERPRÜFUNG DER AUSSAGEKRAFT DER BANDEN	56
5.5.1.	Vergleich der Markierungen mit Biotin und Fluorescein	56
5.5.2.	Blockierung mit Anti-Immunglobulinen und unmarkierten Yersinien-Antigenen	59
5.5.3.	Immunglobulin-Darstellung mit markierten Anti-Immunglobulinen	59

6.	DISKUSSION	61
6.1.	VERGLEICH MIT ANDEREN UNTERSUCHUNGEN	61
6.2.	BEURTEILUNG DER METHODE	62
6.3.	ÜBERLEGUNGEN ZUR AUSSAGEKRAFT	63
6.3.1.	Vergleich der Ergebnisse bei Markierung mit Biotin bzw. Fluorescein	63
6.3.2.	Blockierung mit Anti-Immunglobulinen und unmarkierten Yersinien-Antigenen	64
6.4.	VERGLEICH DER ERGEBNISSE FÜR YERSINIA ENTEROCOLITICA O:9 UND O:3	65
6.5.	VERGLEICH DER ERGEBNISSE FÜR MORBUS CROHN UND COLITIS ULEROSA	66
6.6.	EINFLUSS ANDERER MERKMALE	67
6.6.1.	Krankheitsaktivität und Entzündungsgrad	67
6.6.2.	Ausdehnung und Entnahmestelle	68
6.6.3.	Alter	69
6.7.	IMMUNGLOBULINE	70
6.8.	ASYMPTOMATISCHE INFEKTIONEN	71
6.9.	ALLGEMEINE ÜBERLEGUNGEN ZU DEN ERREGEREIGENSCHAFTEN	71
6.10.	PATHOGENESE CHRONISCH ENTZÜNDLICHER DARMERKRANKUNGEN: EIN MODELL	73
6.11.	ANSÄTZE FÜR WEITERE UNTERSUCHUNGEN	75
7.	ZUSAMMENFASSUNG	77
8.	LITERATUR	78
9.	ANHANG I – MATERIALIEN	92
9.1.	GERÄTE UND ZUBEHÖR FÜR DIE IEF	92
9.2.	VERBRAUCHSMATERIALIEN UND CHEMIKALIEN FÜR IEF UND IMMUNBLOT	93
9.3.	LÖSUNGEN	95

10.	ANHANG II – TABELLE ALLER PATIENTEN	97
11.	ANHANG III – ABKÜRZUNGEN	98
12.	DANKSAGUNG	101
13.	LEBENSLAUF	102

1. EINLEITUNG

1.1. CHRONISCH ENTZÜNDLICHE DARMERKRANKUNGEN

1.1.1. DEFINITION UND DIAGNOSE

Der Begriff der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) umfasst mindestens zwei Formen der intestinalen Entzündung: Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC). Beide Erkrankungen haben einen über Jahrzehnte rezidivierenden Verlauf (Longo et al. 2003, Etienny et al. 2004) und eine gegenüber der Normalbevölkerung erhöhte Mortalität (Jess et al. 2002, Kumar et al. 2004).

Die genauen Ursachen sind bisher weitgehend unbekannt, sodass die Diagnose empirisch hauptsächlich aufgrund klinischer, histologischer (Konuma et al. 1995) und endoskopischer (Fefferman und Farrell 2005) Eigenschaften gestellt wird (Vasiliauskas 2003). Nach elektronenmikroskopischen Befunden ist der Befall der Darmschleimhaut sehr viel ausgedehnter, als dies nach makroskopischer oder lichtmikroskopischer Routineuntersuchung beurteilt werden kann, das heißt auch makroskopisch „gesunde“ Schleimhaut kann entzündet sein (Myllärniemi und Nickels 1980).

1.1.2. THEORIEN ZUR ETIOLOGIE

Die Etiologie der „idiopathischen“ chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist nach wie vor ungeklärt. Zahlreiche Hypothesen sind in den letzten Jahrzehnten diskutiert und viele pathologische Befunde erhoben worden, ohne dass eine eindeutig allein auslösende Ursache nachgewiesen werden konnte. Die meisten Autoren stimmen heute darin überein, dass vermutlich ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren für das Zustandekommen dieser Krankheitsbilder verantwortlich ist, wobei über die Gewichtung der einzelnen Faktoren noch einige Unklarheit herrscht (Jump und Levine 2004, Wen und Fiocchi 2004).

1.1.2.1. GENETISCHE FAKTOREN

Unterschiedliche Inzidenz bei verschiedenen Rassen (Yang 1992), Beobachtungen bei Zwillingen (Tysk et al. 1988, Orholm et al. 2000), das häufige Auftreten dieser Krankheiten in einigen Familien (Rosenberg et al. 1976, Hershfield 1984, Darchis et al. 1989) und ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Verwandte von Patienten (Farmer et al. 1980, Weterman und Peña 1984, Bennett et al. 1991) ließen schon länger einen genetischen Hintergrund für die Disposition vermuten, wobei in etwa 25% der betroffenen Familien ein Vorkommen beider Krankheitsbilder beobachtet wurde (McConnell 1980). Das kanadische Mount Sinai Hospital Inflammatory Bowel Disease Genetics Project kommt nach Auswertung der Daten von über 2500 CED-Patienten zu dem Schluss, 10% der MC-Patienten und 8,8% der CU-Patienten haben erkrankte Familienmitglieder – im Schnitt 2,4 (McLeod et al. 1997).

Die Tatsache, dass das Erkrankungsrisiko für Verwandte ersten Grades mit der Zahl der erkrankten Familienmitglieder steigt, spricht für einen multifaktoriellen Erbgang (Farrall 1993), den die meisten Autoren heute für wahrscheinlich halten (Duerr 2003, Mathews und Lewis 2004).

Tatsächlich konnte 2001 ein Gen auf dem Chromosom 16 identifiziert werden, dessen mutierte Form mit einer erhöhten Prädisposition für MC einhergeht (Ogura et al. 2001): CARD15/NOD2 aktiviert NF-kappaB, so dass dieser auf bakterielle Lipopolysaccharide reagiert. CARD15/NOD2-messenger-RNA wird in Darmepithelzellen exprimiert (Hisamatsu et al. 2003), wo sie unter anderem für die Expression der antibiotisch wirkenden Alpha-Defensine HD-5 und HD-6 zuständig sind (Wehkamp et al. 2004). Defensine haben eine wichtige Funktion in der mukosalen Bakterienschranke. Bei Patienten mit MC ist die Expression der Alpha-Defensine HD-5 und HD-6 sowie des Beta-Defensins HBD-2 in der Darmschleimhaut reduziert (Wehkamp et al. 2002, Wehkamp et al. 2004).

In Tierversuchen wurde außerdem gezeigt, dass das intestinale Immunsystem CARD15/NOD2-defizienter Mäuse bakterielles Muramyl-Dipeptid nicht erkennen kann (Kobayashi et al. 2005), so dass eine wichtige Voraussetzung für die Aktivierung von Makrophagen fehlt. Die CARD15/NOD2-defizienten Tiere waren dann auch besonders empfänglich für eine orale bakterielle Infektion.

Eine weitere Genvariante auf dem Genlocus TLR4-Asp299Gly, die zu einer gestörten Erkennung bakterieller Lipopolysaccharide und einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen mit gramnegativen Bakterien führt, findet sich bei MC und CU häufiger (Franchimont et

al. 2004). Träger des Allels erkranken mehr als doppelt so häufig an MC oder CU. Weisen sie zusätzlich die oben beschriebene NOD2-Variante auf, steigt das Erkrankungsrisiko auf das 4,7-Fache. In den mesenterialen Lymphknoten TLR4-defizienter Mäuse finden sich häufiger gramnegative Bakterien (Fukata 2004). In einer griechischen Erhebung waren 51,7% der untersuchten MC-Patienten Träger eines mutierten TLR4- und/oder CD14-Allels (das eine ähnliche Wirkung hat) und mindestens einer NOD2/CARD15-Variante, 27,0% der CU-Patienten, aber nur 10% der gesunden Kontrollpersonen (Gazouli et al. 2005).

Alle diese Befunde zeigen, dass CARD15/NOD2 und TLR4 wichtige Funktionen in der mukosalen Immunantwort auf luminale Bakterien spielen. Möglicherweise werden in den nächsten Jahren noch weitere Gene identifiziert, die eine Prädisposition für MC oder CU triggern. Wie viele Gene für chronisch entzündliche Darmerkrankungen es gibt, ist derzeit noch unbekannt, man nimmt jedoch an, dass es insgesamt mindestens acht sind (Hugot 2004). Einige davon werden auf den Chromosomen 5q31, 6p21 und 19p vermutet (Mathew und Lewis 2004).

1.1.2.2. STÖRUNGEN IM IMMUNSYSTEM

Praktisch alle Hypothesen zur Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beziehen das intestinale und systemische Immungeschehen ein – gestützt durch zahlreiche pathologische Befunde. So laufen zelluläre Abwehrprozesse, wie Phagozytose, Killing und lymphozyten-assoziierte antibakterielle Aktivität, bei MC und CU deutlich vermindert ab (Caradonna et al. 2000), während die humorale Aktivität massiv gesteigert ist.

Besonders für die CU wird schon seit einigen Jahrzehnten ein Autoimmunmechanismus diskutiert (Raedler und Schreiber 1992), gestützt durch Funde von Autoantikörpern gegen Kolon-Epithel (Hibi et al. 1982, Roche et al. 1985) sowie gegen Lymphozyten (Hibi et al. 1982) und neutrophile Granulozyten (Cambridge et al. 1992, Müller-Ladner et al. 1996, Sugi et al. 1999), die auch bei einem Teil gesunder Verwandten nachgewiesen werden konnten (Shanahan et al. 1992), was eine sekundäre Entstehung unwahrscheinlich macht. Bei MC und CU ist die Zahl der Immunglobulin produzierenden Zellen in der Lamina propria um ein Vielfaches erhöht, wobei alle Immunglobulin-Klassen betroffen sind, allerdings in sehr unterschiedlichem Maße: Immunhistochemische Studien (Rosekrans et al. 1980, van Spreeuwel et al. 1982, Keren et al. 1984) und *In-vitro*-Kulturen isolierter Lym-

phozyten (Danis et al. 1984, MacDermott et al. 1985) zeigen gleichermaßen eine enorme Erhöhung des IgG-Anteils. Dabei konnten Unterschiede zwischen aktiven und inaktiven Krankheitsstadien nachgewiesen werden (Keren et al. 1984). Ganz andere Verteilungsmuster zeigen zum Beispiel akute infektiöse Kolitiden (van Spreeuwel et al. 1985).

Weiterführende Untersuchungen der Immunglobulin-Subklassen fanden Unterschiede zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa: Während IgG1 als am stärksten vertretene Subklasse bei CU sehr viel stärker erhöht ist als bei MC, verhält es sich mit IgG2 (das vorwiegend als Reaktion auf Kohlenhydrate und bakterielle Antigene produziert und sezerniert wird) gerade umgekehrt (Iizuka 1990). Bei beiden Krankheiten besteht eine starke Verminderung dimeren IgAs („Mukosatyp“, vorwiegend IgA2) zugunsten der monomeren Form („systemischer Typ“, vorwiegend IgA1), bei CU ausgeprägter als bei MC (Kett und Brandtzaeg 1987). Für IgG finden sich ähnliche quantitative Veränderungen im Serum (Philipsen et al. 1995, Gouni-Berthold 1999), interessanterweise auch bei gesunden eineiigen Zwillingen von MC- und CU-Patienten (Helgeland et al. 1992).

Über die Spezifität der untersuchten Antikörper ist wenig bekannt. Neben den oben beschriebenen Autoantikörpern, die der IgG- und der IgA-Gruppe zuzuordnen sind, scheint ein großer Teil gegen bakterielle Antigene gerichtet. So fand eine Arbeit von Chao et al. über aktivierte B-Zellen mesenterialer Lymphknoten einen hohen Anteil für verschiedene bakterielle Antigene spezifischer Antikörper (Chao et al. 1988). Auch bei Macpherson et al., die große Mengen IgG vor allem in aktiven Krankheitsstadien von MC und CU fanden, banden diese im Westernblot und enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) an bakterielle Antigene, hauptsächlich an das Zytoplasma der Bakterien (Macpherson et al. 1996). Lokale Immunmechanismen spielen also eine zentrale Rolle bei der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, wobei der Schlüssel in einer gestörten Auseinandersetzung zwischen der intestinalen Immunabwehr und Bakterien zu liegen scheint (Mahida und Rolfe 2004, Yu et al. 2004).

1.1.2.3. INTESTINALE PERMEABILITÄT

Untersuchungen über orale Absorptionstests bei MC stimmen in folgenden Punkten überein: Zuckermoleküle mit einem Molekulargewicht <200 sowie Polyethylenglykol-Moleküle (PEG) verschiedener Größe, die beide vorzugsweise über kleine Poren absorbiert werden, zeigen eine normale oder erniedrigte Absorptionsrate, während Di- und Trisaccharide

sowie ^{51}Cr -EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) und ^{99}Tc -DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure), die über größere Poren aufgenommen werden, gegenüber gesunden Probanden signifikant vermehrt absorbiert werden (Pearson et al. 1982, Bjarnason et al. 1983, Ukabam et al. 1983, Magnusson et al. 1983, Adenis et al. 1992, Oriishi et al. 1995).

Orale Absorptionstests zeichnen sich jedoch durch eine fehlende Differenzierung zwischen den verschiedenen Anteilen des Verdauungstraktes aus, und beispielsweise PEG wird hauptsächlich im proximalen Dünndarm absorbiert, der für chronisch entzündliche Darm-erkrankungen kaum von Bedeutung ist. Regionale Absorptionsstudien sind deshalb von größerem Wert, finden sich in der Literatur aber nur in sehr geringer Anzahl. Sie zeigen eine deutlich erhöhte nicht selektive Absorption von PEG in Ileum (Olaison et al. 1988) und Kolon, unabhängig von der Entzündungsaktivität (Olaison et al. 1989).

Ähnlich pathologische Befunde wurden bei gesunden Verwandten an Morbus Crohn erkrankter Patienten gefunden (Hollander et al. 1986, Katz et al. 1989, Breslin et al. 2001). Die Autoren interpretieren ihre Ergebnisse als Hinweis auf einen spezifischen primären Defekt der Darmschleimhaut, der also nicht erst durch die entzündliche Krankheitsaktivität entstehe.

Untersuchungen der Permeabilität der Darmschleimhaut für Bakterien fanden auch diesbezüglich pathologisch erhöhte Werte (Ambrose et al. 1984, Kreuzpaintner et al. 1989).

Offenbar passieren die Antigene aus dem Darmlumen die Schleimhautbarriere transzellulär: Nach immunelektronischen Befunden an frischen Operationsresektaten werden die Moleküle schon nach wenigen Minuten von der apikalen Zellmembran der Enterozyten aufgenommen und per vesikulärem Transport in das Zellinnere befördert. Bei MC- und CU-Patienten läuft dieser Transportmechanismus in größerem Ausmaß ab, wie sich an den höheren Antigen-Konzentrationen im Zytosol der Enterozyten zeigt (Schurmann et al. 1999). Kürzliche konnten Büning et al. in entzündeter Kolonschleimhaut von MC-Patienten *in vivo* eine gesteigerte Antigen-Expression nachweisen (Büning et al. 2006).

1.1.2.4. UMWELTFAKTOREN

Der Einfluss von Umweltfaktoren auf die Entstehung von Krankheitsbildern wird am besten durch epidemiologische Daten belegt. Trotz Schwierigkeiten bei der Erhebung von Daten über relativ seltene Krankheiten wie MC und CU sind regionale Unterschiede und Trends im Längsschnitt deutlich.

Besonders interessant ist ein international verzeichneter Inzidenz-Anstieg vor allem des MC in Europa und Nordamerika etwa zwischen 1960 und 1980 auf ein Vielfaches der früheren Inzidenz, gefolgt von einem Plateau (Korelitz 1979, Mayberry et al. 1979, Hellers 1979, Kyle und Stark 1980, Dirks 1991). Während die Häufigkeit chronisch entzündlicher Darmerkrankungen in den Industriestaaten nicht wesentlich weiter steigt, hat sie in vielen Regionen, in denen MC und CU vorher seltener waren, in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen, zum Beispiel in Puerto Rico (Appleyard et al. 2004), in Ungarn (Lakatos et al. 2004) und bei der bengalesischen Bevölkerung in London (Tsironi et al. 2004). Die Lebensweise in diesen Poblationen hat sich durch eine zunehmende Industrialisierung und Urbanisierung immer weiter der europäischen und US-amerikanischen angepasst. Dort wo Menschen größtenteils immer noch in Armut leben und weniger Industrialisierung stattgefunden hat, wie in Rumänien, sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen nach wie vor eher seltene Erkrankungen (Gheorghe et al. 2004).

Epidemiologen sind der Auffassung, dass es sich um reale Veränderungen in der Inzidenz handelt, für die vermutlich Umweltfaktoren verantwortlich sind (Loftus und Sandborn 2002, Binder 2004). Unter diesen wurden sozioökonomische Faktoren, infektiöse Ursachen (siehe 1.2), psychologische (Levenstein et al. 1994) und diätetische Einflüsse (Van Kruiningen et al. 2005), der Gebrauch von Kühlschränken (Korzenik 2005), eine durchgemachte Appendizitis (Van Kruiningen et al. 2005), Rauchen (Birrenbach und Bocker 2004, Rugeiro et al. 2005) und orale Kontrazeptiva (Boyko et al. 1994) verantwortlich gemacht. Jahreszeitliche Schwankungen im Krankheitsbeginn (Cave und Freedman 1975) und das überdurchschnittlich häufige Auftreten bei Tropenbesuchern (Harries et al. 1985) deuten auf eine mögliche infektiöse Genese.

1.2. HINWEISE AUF INFEKTÖSE URSACHEN VON COLITIS ULCEROSA UND MORBUS CROHN

Infektiöse Ursachen sind vor allem für den MC immer wieder kontrovers diskutiert worden. Bisher konnte jedoch kein Erreger als eindeutiger Verursacher identifiziert werden. Möglicherweise entgeht ein etwaiger Erreger den bisher üblichen Nachweismethoden, oder er ist nur in der Initialphase der Erkrankung nachweisbar, in der er bei einem genetisch prädisponierten Wirt eine Kaskade verschiedener Entzündungsreaktionen in Gang setzt,

die sich im weiteren Verlauf selbst unterhält (Hit-and-run-Hypothese) (Stallmach und Carstens 2002).

Im Folgenden werden einige Ansätze dargestellt, die zur Vermutung einer infektiösen Genese geführt haben.

1.2.1. SCHWIERIGKEIT DER DIFFERENZIALDIAGNOSE „INFEKTIÖSE“ UND „IDIOPATHISCHE“ ENTZÜNDLICHE DARMERKRANKUNGEN

Üblicherweise wird die Diagnose einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung aufgrund klinischer, endoskopischer und histologischer Eigenschaften gestellt. Keines der Symptome ist jedoch spezifisch für MC oder CU, so dass sich die Frage nach der Differenzialdiagnose zu anderen entzündlichen Darmerkrankungen aufdrängt, insbesondere zu Infektionen durch Viren, Bakterien und Protozoen (Itzkowitz 1986, Heidt et al. 1991). Das endoskopische Bild der infektiösen Enterokolitiden lässt keine definitive differenzialdiagnostische Aussage zu (Tedesco et al. 1983). In den letzten Jahrzehnten hat deshalb der diagnostische Stellenwert der bioptischen Mikrobiologie zugenommen (Heidt et al. 1991, Matsuoto et al. 1994). Sind mikrobiologische Untersuchungen negativ, kann oft erst die klinische Verlaufsbeobachtung zeigen, ob es sich um eine akute Enterokolitis oder eine chronisch entzündliche Darmerkrankung handelt (Ottenjann und Bayerdörffer 1987, Schumacher et al. 1994).

1.2.2. EPIDEMIOLOGISCHE DATEN (siehe auch 1.1.2.4.)

Neben den bei 1.1.2.4. beschriebenen Studien machen Fallberichte über das Auftreten von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bei Lebenspartnern (Batty et al. 1994, Comes et al. 1994, Holmes und Painter 1986, Kirsner 1982, Lobo et al. 1988, Murray und Thomson 1988, Purrmann et al. 1987, Rhodes et al. 1985, Whorwell et al. 1978, Whorwell et al. 1981, Zetzel 1978) und ehemals engen Freunden (Aisenberg und Janowitz 1993) auf die Möglichkeit eines exogenen Faktors (neben zum Beispiel einer genetischen Prädisposition) aufmerksam. Eine größer angelegte Fallkontroll-Studie konnte allerdings keine signifikante Häufung von Krankheitsfällen offen legen (Miller et al. 1976), so dass man im Falle eines infektiösen Agens von einem geringen Manifestationsindex ausgehen muss.

1.2.3. TIERVERSUCHE („TRANSMISSION EXPERIMENTS“)

1970 berichteten Mitchell und Rees von sich langsam entwickelnden Granulomen bei Mäusen, denen Gewebehomogenat von Darm oder Lymphknoten an MC erkrankter Patienten injiziert worden war (Mitchell und Rees 1970). In den folgenden Jahren wurden eine ganze Reihe ähnlicher Studien durchgeführt, die zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. Während einige die Ergebnisse von Mitchell ganz oder teilweise bestätigten (Taub et al. 1976, Simonowith et al. 1977, Das et al. 1983), konnten andere Autoren keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrolltieren feststellen (Heatley et al. 1975, Ahlberg et al. 1978). Als mögliche Erklärung werden Unterschiede in der Durchführung und in der Empfänglichkeit der verschiedenen Versuchstiere angeführt (Cave und Kirsner 1979).

Mitchell und Cave bestätigten später ihre früheren Studien (Cave et al. 1978), und es gelang ihnen sogar die Passage von Gewebe der erkrankten Versuchstiere auf eine weitere Generation vormals gesunder Mäuse mit der nachfolgenden Entwicklung von Granulomen in einigen dieser Tiere (Mitchell und Rees 1976). Donnelly et al. beobachteten Crohn-ähnliche histologische Befunde sowohl nach Injektion von Crohn-Gewebe als auch nach Injektion normalen Darmgewebes, wobei in beiden Gruppen vorherige Inkubation des Homogenats mit Ampicillin das Auftreten dieser Veränderungen verhinderte. Die Autoren schließen auf ein übertragbares, nicht-virales Agens (Donnelly et al. 1977).

Viel weniger zahlreich, aber ähnlich widersprüchlich sind entsprechende Versuche zur Induktion von CU (Cave et al. 1976, Taub et al. 1976).

1.2.4. ANTIBAKTERIELLE ANTIKÖRPER

Mehrere Autoren haben bei Kranken mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Serum Antikörper gegen verschiedene Bakterienspezies gefunden (Blaser et al. 1984, Howells et al. 1984, Ibbotson et al. 1987). Hierbei zeigten sich auch Unterschiede in der Häufigkeit erhöhter Antikörper-Titer von gesunden Verwandten zu denen von Kontrollpersonen (Lagercrantz et al. 1971). Eine höhere Durchlässigkeit der entzündlich geschädigten Darmschleimhaut allein erklärt diesen Befund nicht, da erhöhte Titer bei Durchfallerkrankungen anderer Genese selten sind (Howells et al. 1984).

Nur vereinzelt sind bisher antibakterielle Antikörper in der Darmschleimhaut untersucht worden. In Rektum- und Kolonschleimhaut von CU-Patienten fanden sich Antikörper gegen anaerobe Fäkalflora (Monteiro et al. 1971). Mit stark variierender Häufigkeit (19 bis 83 %) ließen sich in mesenterialen Lymphknoten von MC- und CU-Patienten Antikörper gegen verschiedene Bakterien, u.a. *Escherichia coli* und Mykobakterien, nachweisen (Chao et al. 1988). Macpherson et al. fanden bei Patienten im akuten Krankheitsschub in endoskopisch gewonnener Darmspülflüssigkeit große Mengen IgG gegen eine ganze Reihe von Bakterien der physiologischen intestinalen Flora. Sie postulieren, dass während eines akuten Entzündungsschubs die Immuntoleranz gegen die physiologische Keimbeseidlung zusammenbricht (Macpherson et al. 1996).

1.3. YERSINIA ENTEROCOLITICA

1.3.1. KLINIK UND EPIDEMIOLOGIE

Die Gattung *Yersinia* umfasst über zehn verschiedene Spezies, von denen drei für Menschen pathogen sind. Die gefährlichste ist *Y. pestis*, der Verursacher der Pest. Die beiden anderen Spezies, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*, verursachen ein breites Spektrum intestinaler und extraintestinaler Manifestationen umfassen. Am häufigsten werden Enteritis, terminale Ileitis, mesenteriale Lymphadenitis und Arthritis diagnostiziert (Bockemühl und Roggentin 2004). Radiologische, endoskopische und histopathologische Befunde der *Yersinia*-Enterokolitis entsprechen weitgehend denen der „idiopathischen“ chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. *Y. pseudotuberculosis* wird weniger häufig isoliert als *Y. enterocolitica*. Infektionen mit *Y. enterocolitica* führen in einem hohen Prozentsatz zu chronischen Entzündungsreaktionen. In einer norwegischen prospektiven Langzeiterhebung an 458 Patienten mit serologisch bestätigter *Y.-enterocolitica*-Infektion wurden 160 von ihnen (34,9%) innerhalb von 4 bis 14 Jahren mit entsprechenden Symptomen erneut stationär aufgenommen (Saebo und Lassen 1994). Ein Drittel von ihnen litt unter Gelenkbeschwerden, ein Viertel unter chronischen Bauchschmerzen, fast ein Fünftel hatte chronischen Durchfall.

Der Nachweis einer Infektion mit *Y. enterocolitica* erfolgte bis vor einigen Jahren in der Regel entweder als direkter Erregernachweis mittels Kultur (Coumaros et al. 1989) oder

indirekter Immunfluoreszenz (Hoogkamp-Korstanje et al. 1986) oder serologisch als Agglutinationsreaktion (Hoogkamp-Korstanje et al. 1988). Negative Stuhlkulturen bei positiver Serumagglutination und umgekehrt sind häufig. Neuere Untersuchungen zeigen, dass dies an der niedrigen Sensitivität der Methoden (insbesondere bei Stuhlkultur und Serumagglutination) liegt. Deutlich überlegen ist dagegen der Nachweis spezifischer Antikörper (IgA, IgG und IgM) gegen *Yersinia outer proteins* (Yops; siehe 1.3.2.1.) im Serum (Stolk-Engelaar und Hoogkamp-Korstanje 1995). Seit einigen Jahren steht auch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit sehr hoher Sensitivität zum direkten Erregernachweis zur Verfügung (Fredriksson-Ahomaa und Korkeala 2003). Für die Routinediagnostik kommen aber in der Regel Kultur und indirekte Immunfluoreszenz zur Anwendung.

Im Gegensatz zu *Y. pseudotuberculosis* ist die Inzidenz von Infektionen mit *Y. enterocolitica* bis Ende der 1980er Jahre in Nordeuropa und Nordamerika angestiegen (Ostroff 1995, Verhaegen et al. 1998), gefolgt von einem deutlichen Abfall (Verhaegen et al. 1998, Centers for Disease Control and Prevention 2004). Die Inzidenz ist regional unterschiedlich. In Niedersachsen etwa lag die Häufigkeit durch *Y. enterocolitica* verursachter Gastroenteritiden zwischen 1994 und 2000 bei 12 Fällen pro Jahr auf 100.000 Einwohner (Dreesman et al. 2001), in den USA wurden zwischen 1996 und 1999 durchschnittlich 0,9 Infektionen auf 100.000 Einwohner pro Jahr registriert (Ray et al. 2004).

Der Verzehr von rohem Schweine- und Hühnerfleisch stellt möglicherweise einen eigenen Risikofaktor für eine Infektion mit pathogenen Yersinien dar (Kapperud et al. 1995, Harb et al. 2000). Diese Ergebnisse werden gestützt durch den mikrobiologischen Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* der Serotypen O:3 und O:9 in einem hohen Prozentsatz roher (Schweine-)Fleischproben, vor allem in Skandinavien (Fredriksson-Ahomaa et al. 1999, Nesbakken et al. 2003) und Mitteleuropa (Offermann et al. 1999, Fredriksson-Ahomaa et al. 2001, Gurtler et al. 2005). Die Mikroorganismen finden unter den Bedingungen der modernen Nahrungsmittelindustrie fast optimale Überlebenschancen: Durch die Massentierhaltung in Industrieländern kann Yersinien-kontaminiertes Fleisch rasch große Ausbreitung finden. Da die Mikroorganismen an kühle Temperaturen adaptiert sind, schützt auch eine konsequente Kühlkette nicht vor einer Infektion (Velazquez et al. 2005), wohl aber gründliches Durcherhitzen der Nahrungsmittel vor dem Verzehr (Hillers et al. 2003).

Die Bakterien sind fakultativ anaerobe, gramnegative Stäbchen, die zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören. Es besteht eine enge Beziehung zwischen der O-Serogruppe (Lipopolysaccharid-Antigen) und der Pathogenität von *Y. enterocolitica* (Skurnik und Ben-

goechea 2003). Die am häufigsten isolierten pathogenen Serotypen sind O:3 und O:9 (Shayegani et al. 1995, Verhaegen et al. 1998, Offermann et al. 1999, Bonardi et al. 2003, Gurtler et al. 2005). Interessanterweise gleicht sich das epidemiologische Muster der Yersiniose in Nordamerika zunehmend dem in Europa an, wo – meist durch infizierte Nahrungsmittel verursachte – Epidemien selten sind, während sporadische Infektionen in regional unterschiedlicher Häufigkeit, global jedoch zunehmend verzeichnet werden (Ostroff 1995). Weiterhin werden international Serogruppen-Shifts beobachtet, zum Beispiel eine Zunahme von O:3 bei gleichzeitiger Abnahme von O:8 in den USA seit 1980, während im gleichen Zeitraum Infektionen mit O:9 in Europa zunahm und erstmals O:8 isoliert wurde (Ostroff 1995).

Reihenuntersuchungen gesunder Blutspender zeigen je nach verwendetem Testsystem unterschiedliche Ergebnisse: In einer italienischen Studie hatten nur etwa 10% der getesteten Seren Agglutinationstiter gegen Yersinien $>1/10$ (Hoogkamp-Korstanje und De Koning 1990). In einer Untersuchung von Seren finnischer und deutscher Blutspender mittels Enzym-Immunoassay (EIA) und Immunoblot mit Yersinia outer proteins (Yops; siehe 1.3.2.1.) als Antigen waren in Finnland 19% (EIA) bzw. 31% (Blot) der Seren positiv, in Deutschland 33 bzw. 43% (Maki-Ikola et al. 1997).

1.3.2. ANTIGENSTRUKTUR UND VIRULENZ (siehe auch 1.3.3.)

Nach jahrzehntelanger Unklarheit über die Pathogenität von Yersinien brachte 1980 die Entdeckung eines extrachromosomalen DNA-Elements (Plasmid) bei allen pathogenen Yersinien das Verständnis für die unterschiedliche Virulenz der verschiedenen Yersinienstämme einen großen Schritt weiter (Zink et al. 1980). In gentechnischen Studien konnten gezeigt werden, dass Virulenzfunktionen wie Zelladhärenz, Phagozytoseresistenz, Überlebensfähigkeit im Serum, Zytotoxizität und Kollagenbindung innerhalb der Gattung Yersinia durch Plasmidtransfer übertragbare Eigenschaften sind (Heesemann und Gaede 1989). Alle humanpathogenen *Y.-enterocolitica*-Stämme tragen ein 70 Kilobasen großes Virulenzplasmid, dessen DNA-Sequenz innerhalb der Spezies eine Homologie von 90% aufweist (Heesemann et al. 1983). Da aber nicht alle plasmidtragenden Bakterien über die entsprechenden plasmidkodierten Funktionen verfügen, muss davon ausgegangen werden, dass chromosomale Faktoren für die effektive Expression der Plasmidgene notwendig sind (Heesemann und Gaede 1989). Weiterhin werden einige Virulenzfunktionen, die insbesondere die Gewebsinvasion betreffen, direkt chromosomal kodiert (siehe 1.3.2.2.).

1.3.2.1. PLASMIDKODIERTE VIRULENZFAKTOREN

Unter zellulärem Stress wie zum Beispiel Kalziumentzug, Hitze oder Anwesenheit freier Radikale (Mechanismen, die bei der Infektionsabwehr der Wirtsorganismen in Kraft treten) stellen pathogene Yersinien ihr Wachstum ein und beginnen, große Mengen verschiedener plasmidkodierter Proteine zu produzieren, die an der Pathogenität entscheidend beteiligt sind (Böllin et al. 1985). Sie werden heute *Yersinia outer proteins* (Yops) genannt. YopB, YopD und LcrG sind so genannte translocators, die die so genannten effector yops (YopE, YopH, YopM, YopO, YopP, YopT, YopJ) in die Wirtszelle zu befördern (Sarker et al. 1998, Hartland und Robins-Browne 1998). YopB und YopD formen dabei eine Membranpore (Neyt und Cornelis 1999, Tardy et al. 1999), deren Größe durch LcrG reguliert wird (Holmstrom et al. 2001). Bevorzugtes Ziel der Yops sind offenbar Makrophagen, sie können aber auch praktisch alle anderen eukaryonten Zellen befallen, wozu sie dann allerdings Adhäsionsmoleküle wie das ebenfalls plasmidkodierte (im Gegensatz zu den Yops membrangebundene) *Yersinia adhesin A* (YadA) oder das chromosomal kodierte Invasin benötigen (Boyd et al. 2000).

YopO und YopT wirken zytotoxisch, indem sie die Aktinfilamentstruktur des Zellskeletts in der Wirtszelle zerreißen (Iriarte und Cornelis 1998, Nejedlik et al. 2004). YopT ist eine Zysteinprotease, die die Synthese und Freisetzung von Rho-GTPasen in der Wirtszelle stört und so deren Abwehrfunktion außer Kraft setzt (Aepfelbacher et al. 2003). Die Tyrosinphosphatase YopH inaktiviert die Phosphatidylinositol-3-Kinase, was zur Hemmung der Sekretion von Interleukin 2 und Proliferation von T-Lymphozyten führt. Außerdem wird die Produktion des monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) und damit die Rekrutierung von Makrophagen in Lymphknoten verhindert (Sauvonnet et al. 2002¹).

YopH, YopE, YopT, YopO und YadA agieren synergistisch, um Angriffe von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zu unterdrücken, ihrer Phagozytose zu entgehen und so ein extrazelluläres Überleben der Yersinien zu ermöglichen (Ruckdeschel et al. 1996, Grosdent et al. 2002).

YopM interagiert direkt mit der Proteinkinase C-like 2 (PRK2) und der Ribosomalen S6-Proteinkinase (RSK1) (MacDonald et al. 2003). Außerdem induziert es die Regulation von Genen, die an Zellzyklus und Zellwachstum beteiligt sind (Sauvonnet et al. 2002²).

YopP supprimiert die Freisetzung von Tumornekrosefaktor (TNF) α (Boland und Cornelis 1998), Interleukin 6, 8 10 und 12 (Denecker et al. 2002), unterdrückt die Expression von Oberflächenmolekülen und induziert die Apoptose (Erfurth et al. 2004). Damit zielt YopP

speziell auf Funktionen der Wirtszellen, die für die Aktivierung von T-Zellen notwendig sind, und trägt so zur Umgehung der adaptiven Immunantwort bei. Tatsächlich unterdrückt YopP *in vivo* eine effektive CD8-Zell-Antwort (Trulzsch et al. 2005).

YopJ ist ebenfalls an der Apoptose der befallenen Makrophagen beteiligt: Nachdem die angeborene Immunantwort der Zelle (induziert unter anderem durch die Erkennung des Yersinien-Lipopolysaccharids) die Wahl zwischen einer survival response und einer death response aktiviert hat, verschließt YopJ den Survival-Weg und die Zelle wird apoptotisch (Zhang und Bliska 2005). Außerdem hemmt YopJ die Expression von Entzündungsmolekülen wie Interleukin 8, T-Zell-Regulatoren und Adhäsionsmolekülen (Zhou et al. 2004). Gentechnische Versuche konnten außerdem zeigen, dass Yersinien mit Virulenzplasmid in der Wirtszelle Gene aktivieren, die Abwehrreaktionen drosseln (Hoffmann et al. 2004). Welche plasmidkodierte Proteine für diese Wirkung verantwortlich sind, ist noch nicht klar.

Yersinia adhesin A (YadA) ist ein plasmidkodierte Membranprotein, das für eine effiziente Adhäsion an die Wirtszelle notwendig ist und die Produktion von Interleukin 8 triggert (Schmid et al. 2004), die jedoch von einigen Yops blockiert wird (siehe oben) und deshalb wenig effektiv ist. YadA ist ein wichtiger Faktor für die Resistenz pathogener Yersinien gegen Serumkomplement (Biedzka-Sarek et al. 2005).

1.3.2.2. CHROMOSOMAL KODIERTE VIRULENZFAKTOREN

Das chromosomal kodierte äußere Membranprotein Invasin (Inv) hat eine hohe Affinität zu Beta1-Integrinen und ermöglicht so die Translokation der Bakterien durch M-Zellen im follikelassoziierten Epithel, das die Peyer-Plaques bedeckt (Grassl et al. 2003). Hierdurch wird eine Signalkaskade aktiviert, die in die Produktion von Adhäsionsmolekülen und chemotaktischen Zytokinen mündet (Bohn et al. 2004). Möglicherweise sind die folgende Rekrutierung von Makrophagen und die Gewebeerstörung Teil der Strategie der virulenten Bakterien zur Ausbreitung im Wirtsgewebe.

Die durch Hypokaliämie oder Azidose erhöhte Permeabilität der Bakterienmembran ist vermutlich ebenfalls chromosomal kodiert (Bengoechea et al. 2003).

1.3.3. INVASION IN DIE DARMSCHLEIMHAUT UND PERSISTENZ IM WIRTSORGANISMUS

Nach oraler Aufnahme überwinden Yersinien die Schleimhautbarriere des Ileums und streuen in die Lamina propria, vorwiegend über die Peyer-Plaques; dies konnte durch immunhistochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Darmschleimhaut infizierter Tiere gezeigt werden (Hanski et al. 1989). Für das Eindringen in tiefere Schleimhautschichten scheinen M-Zellen wichtig zu sein, die die Bakterien an ihrer Oberfläche binden und dann phagozytieren (Grützkau et al. 1990, siehe auch 1.3.2.2.). Da die Invasivität hauptsächlich chromosomal kodiert ist (siehe oben), sind sowohl plasmidtragende als auch plasmidlose Stämme pathogener Yersinien fähig, die Darmschleimhaut zu penetrieren (Lian et al. 1987¹).

Das Virulenzplasmid ist jedoch für die eingedrungenen Bakterien erforderlich, um sich im Gewebe des Wirtsorganismus zu vermehren und hier morphologische Veränderungen hervorzurufen (Lian et al. 1987², Grützkau et al. 1993). Nur Yersinien mit Virulenzplasmid streuen über den Blutstrom in Leber, Gallenblase und Milz (Ruiz-Bravo et al. 1999). Versuche mit gendefizienten Yersinien haben gezeigt, dass diese ohne die Aktivität von Yops nicht in der Lage sind, Darm- und Lymphgewebe dauerhaft zu besiedeln (Logsdon und Meccas 2003, Trulzsch et al. 2004). Wie oben ausgeführt, stören Yops die Dynamik des Zellskeletts, hemmen die Phagozytose und drosseln die Produktion inflammatorisch wirksamer Interleukine (siehe 1.3.2.1.). Dies ermöglicht die extrazelluläre Vermehrung im lymphatischen Gewebe des mit Ausbildung von Nekrosen und Abszessen (Pujol und Bliska 2005).

Die Vermehrung findet vor allem extrazellulär statt, pathogene Yersinien können aber auch in Makrophagen überleben und sich vermehren (siehe oben). Auch wenn Yersinien ihre Überlebens- und Vermehrungsmechanismen zu jedem Zeitpunkt der Infektion nutzen können, sind diese wahrscheinlich im frühen Stadium der Besiedlung am wichtigsten. In diesem Stadium hat wohl auch das Abwehrsystem des Wirtsorganismus die größten Chancen, sich gegen bakterielle Angriffe zu Wehr zu setzen: Zytokine, wie Interleukin 1 β , TNF α und Interferon γ , können die Bakterienkonzentration in infizierten Zellen deutlich senken (Huppertz und Heesemann 1999).

1.3.4. ANTIKÖRPER GEGEN YERSINIEN

Patienten mit Yersiniose entwickeln eine ausgeprägte Antikörperantwort gegen verschiedene Bestandteile der Bakterien, die in gleicher Weise von Immunglobulinen der Klassen IgM, IgG und IgA erkannt werden (Ståhlberg et al. 1987¹). Yops weisen eine hohe Antigenität auf (Heesemann et al. 1987), und die spezifischen, hochtitrigen Antikörper eignen sich gut zur serologischen Diagnostik. Es besteht allerdings eine hohe Kreuzreaktivität innerhalb der Gruppe der humanpathogenen Yersinien (Heesemann et al. 1986¹, Heesemann et al. 1986²).

Die Antikörpertiter gegen die verschiedenen Bakterienantigene nehmen mit zunehmendem Zeitabstand zur Infektion gleichmäßig ab (Ståhlberg et al. 1987²). IgA und IgM zeigen eine bestehende oder kürzlich zurückliegende Infektion an, während eine ausschließliche IgG-Reaktivität eine länger zurückliegende Infektion widerspiegelt. Spezifische Antikörper gegen Yops sind hierbei häufiger und länger nachweisbar als Antikörper gegen die serotypspezifischen Lipopolysaccharid-Antigene (siehe oben).

Patienten mit Yersinien-getriggelter Arthritis zeigen noch ein Jahr post infectionem signifikant erhöhte IgA-Serumtiter gegen mehrere plasmidkodierte Antigene (Larsen et al. 1985, Ståhlberg et al. 1987¹, Toivanen et al. 1987, Ståhlberg et al. 1989). Da IgA-Antikörper eine biologische Halbwertszeit von nur wenigen Tagen haben, deutet dies auf ein langes Persistieren der Yersinien im Wirtsorganismus hin. Allerdings können herkömmliche Routinediagnostik-Methoden in der Regel keine Bakterien mehr nachweisen. IgA-Antikörper im Stuhl, die dem darmassoziierten Lymphgewebe (GALT) entstammen, finden sich hingegen nur im akuten Stadium einer Enteritis oder bei aktiver chronisch entzündlicher Darmerkrankung (Fletcher et al. 1988).

Zum Nachweis der Antikörper gegen ganze Bakterien oder Lipopolysaccharid-Antigene haben sich ELISA, crossed electrophoresis und Agglutinationstests (tube agglutination) als gleichwertig erwiesen (Paerregaard et al. 1991). Für die Routinediagnostik wurde bisher in der Regel das vollständige Bakterium als Antigen verwendet, da sich im Vergleich mit Lipopolysaccharid eine gute Korrelation zeigte (Granfors et al. 1981), ebenso bei Verwendung von Bakterien mit und ohne plasmidkodierte(n) Proteine(n) (Granfors et al. 1989). Alle genannten Methoden haben sich jedoch wegen ihrer geringen Sensitivität und Spezifität (Kreuzreaktionen mit apathogenen Yersinien, anderen Enterobacteriaceae und Brucella) als unzureichend erwiesen (siehe oben). Spezifische Immunreaktionen (ELISA, Immunoblot) mit Yops zur Bestimmung der entsprechenden Immunglobuline hingegen

zeichnen sich durch eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität für pathogene Yersinien aus (Cremer et al. 1993, Stolk-Engelaar und Hoogkamp-Korstanje 1995).

1.4. YERSINIEN UND CHRONISCH ENTZÜNDLICHE DARMERKRANKUNGEN

Yersiniosen und chronisch entzündliche Darmerkrankungen haben viele gemeinsame Eigenschaften:

1. Sie entstehen vorzugsweise in kalten Regionen, und ihre zahlenmäßige und geographische Ausbreitung stimmen in etwa überein.
2. Beide Krankheitsbilder treten vorwiegend bei jüngeren Menschen auf.
3. Sie befallen Kolon und terminales Ileum, wo sie eine Entzündungsreaktion hervorrufen, die klinisch, radiologisch, endoskopisch und sogar histologisch schwierig zu differenzieren ist.
4. Extraintestinale Manifestationen, insbesondere arthritische Beschwerden, sind typisch für beide Erkrankungen.

Schon vor Jahrzehnten wurde deshalb eine ursächliche Rolle der Yersinien bei der Entstehung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen diskutiert. Crohn selbst hielt die akute terminale Ileitis (die heute als Yersinien-Infektion bekannt ist), für ein Frühstadium des chronischen Morbus Crohn (Crohn 1965). Diese Auffassung ist heute zumindest umstritten (siehe 1.4.2.). Trotzdem gingen in den vergangenen Jahrzehnten verschiedene Ansätze einem möglichen Zusammenhang zwischen einer Yersinien-Infektion und der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen nach – mit unterschiedlichen Ergebnissen.

1.4.1. INDUKTION VON AUTOIMMUNITÄT DURCH YERSINIEN

Bech fand als Erste bei Patienten mit Morbus Basedow signifikant häufiger als bei Gesunden Agglutinine gegen das O-Antigen von *Y. enterocolitica* O:3 (Bech et al. 1974). Sie stellte fest, dass die Inzidenz am höchsten war bei Patienten, deren Schilddrüsenerkrankung erst kürzlich diagnostiziert worden war, sowie bei akuten Rückfällen, und dann im Verlauf deutlich absank (Bech 1990). Auch Corapcioglu et al. fanden hohe Agglutinations-

titer gegen *Y. enterocolitica* vor allem im Serum von Basedow-Patienten (je nach Serotyp zwischen 29,2 und 53,8%), etwas seltener bei Hashimoto, und sehr viel seltener bei gesunden Kontrollpersonen und solchen mit einer Jodmangel-Struma (Corapcioglu et al. 2002).

Wenzel et al. untersuchten 1988 erstmals Sera von Patienten mit autoimmun bedingten Schilddrüsenerkrankungen auf Antikörper gegen Yops – und beschränkten damit den Nachweis auf pathogene Yersinien, unabhängig vom Serotyp (Wenzel et al. 1988). Der hohe Anteil von Patienten mit (akuten) IgA-Antikörpern und die noch höhere Zahl von Patienten mit (Jahre persistierenden) IgG-Antikörpern gegen Yops (Basedow 72%, Hashimoto 66%, Jodmangel-Struma 40%, gesunde Blutspender 34,5%) stützen ihre Hypothese, dass eine Antigen-Mimikry zwischen Yops und TSH die Krankheitsentstehung triggern könnte. Später fanden auch Chatzipanagiotou et al. bei Patienten mit Hashimoto-Thyroiditis 14-mal häufiger Antikörper gegen Yops als bei Gesunden und Rheuma-Kranken (Chatzipanagiotou et al. 2001).

Rekombinant (gentechnisch) hergestelltes Lipoprotein von *Y. enterocolitica* zeigt *in vitro* deutliche immunmodulatorische Effekte, und gegen das Lipoprotein gerichtete Antikörper von Versuchsmäusen weisen eine starke Kreuzreaktivität mit dem TSH-Rezeptor der Schilddrüse auf (Gangi et al. 2004).

Auch bei chronisch entzündlichen Lebererkrankungen (alkoholinduzierter Zirrhose, primär biliärer Zirrhose (PBC) und chronisch aktiver Autoimmunhepatitis), für die ein Autoimmun-geschehen verantwortlich gemacht wird, konnten häufiger zirkulierende Antikörper gegen Yops nachgewiesen werden als bei Kontrollpersonen oder Patienten mit chronischer Hepatitis B (Stemerowicz et al. 1990). Keiner der untersuchten Patienten wies Yersiniose-typische Symptome auf. Die Autoren vermuten, dass Antikörper gegen bakterielle Zellwandproteine mit menschlichen Zellen kreuzreagieren.

Gestützt werden diese Hypothesen auch durch Versuche einer brasilianischen Arbeitsgruppe mit Mäusen, bei denen experimentelle Infektionen mit *Y. enterocolitica* O:3 oder O:8 jeweils zu einer polyklonalen B-Zell-Aktivierung führten (Machado de Medeiros et al. 1995, Silva et al. 2003, Ramos et al. 2005). Nur ein kleiner Teil der gebildeten Antikörper waren gegen die auslösenden Bakterien gerichtet, den Rest schreiben die Wissenschaftler der polyklonalen B-Zell-Aktivierung zu. Autoantikörper gegen körpereigenes Gewebe waren in der höchsten Konzentration nachweisbar in dem Zeitraum in dem auch die größte Aktivierung unspezifischer B-Lymphozyten beobachtet wurde (Silva et al. 2003). Die Arbeitsgruppe vermutet deshalb, dass einige der so stimulierten Lymphozyten autoreaktive

Klone sind, die einen Autoimmunprozess initiieren und unterstützen können. Wilkin postulierte schon 1990 eine primäre Gewebeläsion durch eine Entzündungsreaktion auf Fremd-Antigen (zum Beispiel Keime) als Auslöser der Fehlerkennung: Lokale Eigen-Antigene würden in die Immunantwort einbezogen und erlangten so immunogenes Potenzial (Wilkin 1990).

An Labormäusen führt die intraperitoneale Injektion eines 60-kDa-Heat-shock-Proteins von *Y. enterocolitica* tatsächlich zu einer Immunreaktion zwischen Dickdarm und Serum (Yagita et al. 1999, Sukegawa et al. 2000). Die licht- und elektronenmikroskopischen Veränderungen an der Darmschleimhaut ähneln dabei denen bei CU.

Die finnische Arbeitsgruppe um Repo hält es für möglich, dass eine erhöhte Mukosa-Permeabilität, wie sie beispielsweise bei Crohn-Patienten und ihren gesunden Verwandten gezeigt wurde (vgl. 1.1.2.3.), zu einer vermehrten Auseinandersetzung des Organismus mit den Bakterienbestandteilen LPS und Peptidoglykan führt. Auch sei ein Antigen-Overload durch eine verminderte Eliminierung von mikrobiellen Komponenten denkbar. Eine persistierende Yersinien-Infektion könnte die Voraussetzung schaffen für eine ausgedehnte Dissemination von Yersinien-Antigenen im Wirtsorganismus, wie sie in histologischen Präparaten von Darmschleimhaut, Lymphknoten und Haut nachgewiesen wurde. Diese Antigene könnten dann extraintestinale Entzündungssymptome hervorrufen, wie sie u.a. für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen typisch sind. Die Gewebeläsion im Organismus zöge wiederum die Freisetzung endogener Entzündungsmediatoren nach sich (Repo et al. 1990).

Noch nicht geklärt ist, warum nach einer Infektion mit Yersinien einige Menschen lediglich eine selbstlimitierende Enterokolitis durchmachen oder gar keine Krankheitssymptome zeigen, während die gleiche Infektion bei anderen den Grundstein für eine lebenslange Autoimmunerkrankung zu legen scheint. Wenzel et al. vermuten, dass genetische Faktoren für die individuell unterschiedliche Empfänglichkeit für Yersinien-Infektionen verantwortlich sind. Bei persistierender Immunantwort gegen Yersinien könnten kreuzreaktive Antikörper entstehen, die dann etwa eine autoimmune Schilddrüsenerkrankung hervorrufen (Wenzel et al. 1990). Gestützt wird diese These durch Untersuchungen, die im Serum gesunder Verwandter von Patienten mit Autoimmun-Thyroepathie überdurchschnittlich häufig Antikörper gegen Yops fanden (Strieder et al. 2003).

1.4.2. FALLSTUDIEN UND LANGZEITBEOBACHTUNGEN

Einzelne Fallstudien berichten über Patienten mit MC, bei denen eine Infektion durch *Y. enterocolitica* (Serotypen 0:3 und 0:9) (Capdevilla Morell et al. 1983, Payne et al. 1987) oder *Y. pseudotuberculosis* (Treacher und Jewell 1985) serologisch nachgewiesen werden konnte.

In einer prospektiven Erhebung mit *Yersinia*-seropositiven Patienten (ohne akute Ileitis) wurde bei diesen im Verlauf von 6 bis 13 Jahren deutlich häufiger MC oder CU diagnostiziert als bei *Yersinia*-negativen Kontrollpersonen (Saebo et al. 2005).

Langzeitbeobachtungen von Patienten mit akuter terminaler Ileitis kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen: Einige Autoren konnten selbst bei nachgewiesener *Yersinia*-Infektion keine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung feststellen (Sjöström 1971, Persson et al. 1976). In einer dänischen Erhebung waren zwar 39% der Patienten *Yersinia*-positiv, jene die innerhalb des Beobachtungszeitraums von 13 Jahren einen MC entwickelten, hatten jedoch zu keinem Zeitpunkt eine *Yersinia*-Infektion (Jess und Jess 2001). In einer US-Nachbeobachtung von Patienten mit granulomatöser Appendizitis erkrankten 2 von 10 Patienten, bei denen zum Zeitpunkt des chirurgischen Eingriffs per PCR *Yersinia* im Operationsresektat nachgewiesen worden waren, später an MC (Lamps et al. 2001).

1.4.3. SEROLOGIE

Auch die Ergebnisse von Studien, die Seropositivität für *Yersinia* bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen untersucht haben, sind widersprüchlich: Während einige Autoren gar keine seropositiven Befunde erheben konnten (Barry und Lobban 1977, Swarbrick et al. 1979, Bories et al. 1983), fanden Casellas et al. signifikante Titer gegen *Y. enterocolitica* bei gut einem Drittel der untersuchten Kranken (Casellas et al. 1984). Allerdings wurde in allen genannten Untersuchungen die Methode der Serumagglutination verwendet (zu deren geringer Empfindlichkeit siehe 1.3.1.).

Ibbotson et al. führten ELISA und Immunfluoreszenz-Tests mit Bakteriensuspension als Antigen durch, mit denen sie bei CED-Patienten erhöhte Antikörper-Titer gegen *Y. enterocolitica* O:3 und O:9 fanden (Ibbotson et al. 1987). Serologische Untersuchungen bei chro-

nisch entzündlichen Darmerkrankungen unter Verwendung des sehr viel sensitiveren Nachweises von spezifischen Antikörpern gegen Yops sind bislang nicht publiziert.

1.4.4. MIKROBIOLOGISCHE BEFUNDE

Heidt et al. wiesen bei 14 von 28 Patienten mit protrahiert verlaufenden und chronischen Enterokolitiden mittels Immunfluoreszenz im Darmschleimhautbiopsat Yersinien nach; bei 8 dieser 14 Patienten waren auch IgA-Antikörper gegen Yops im Serum zu finden. Stuhl- und Biopsiekultur waren bei allen Patienten negativ (Heidt et al. 1991) (vgl. auch 1.3.1.). Kallinowski et al. fanden per PCR in Darmresektaten von MC- und CU-Patienten deutlich häufiger Yersinien als bei Kontrollen (63% bzw. 46% vs. 36%). Auch hier waren Stuhl- und Biopsiekultur negativ (Kallinowski et al. 1998). In einer weiteren Untersuchung enthielten 31% der Darmresektate von MC-Patienten, aber keines der Resektate von Patienten aus der Kontrollgruppe Yersinien-DNA (Lamps et al. 2003). Mononukleäre Zellen aus mesenterialen Lymphknoten von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigen eine gesteigerte T-Zell-vermittelte Reaktivität auf *Yersinia enterocolitica* (Ibbotson et al. 1992).

Offensichtlich sind empfindliche Methoden zum Nachweis einer Yersinien-Infektion notwendig. Die häufige Seronegativität trotz positiven lokalen Bakteriennachweises könnte auf eine Diskrepanz zwischen lokalem und systemischem Immungeschehen zurückzuführen sein, die bei der Wahl der diagnostischen Methoden berücksichtigt werden muss.

2. FRAGESTELLUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Aufschluss über die potenzielle Rolle einer Yersinien-Infektion bei der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu gewinnen.

Dabei ging es insbesondere um die folgenden Fragestellungen:

1. In welcher Häufigkeit sind Antikörper gegen Virulenz-Antigene von *Y. enterocolitica* in der Darmschleimhaut von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachweisbar?
2. Welcher Immunglobulin-Klasse sind diese Antikörper zuzuordnen?
3. Lassen sich Unterschiede hinsichtlich der verschiedenen Serotypen feststellen?
4. Bestehen Unterschiede hinsichtlich aktueller Krankheitsaktivität, Lokalisation, Entzündungsgrad, Entnahmestelle, Alter oder Geschlecht der Patienten?

3. PATIENTENKOLLEKTIV UND PROBENGEWINNUNG

Untersucht wurden Zangenbiopsien, die von insgesamt 83 Patientinnen und Patienten (im Folgenden zusammengefasst als „Patienten“) im Rahmen koloskopischer Untersuchungen zwischen August 1992 und Mai 1993 entnommen wurden.

Alle Patienten, die an dieser Studie teilgenommen haben, wurden vorher über Zielsetzung und Risiken der zusätzlichen Gewebeentnahme informiert und haben ihr Einverständnis schriftlich bestätigt. Es handelte sich hierbei um Patienten der Medizinischen Universität zu Lübeck oder solche, die von anderen Institutionen zur Koloskopie in die endoskopische Abteilung überwiesen wurden. Die Durchführung der Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Universität zu Lübeck genehmigt (3.12.1992, Aktenzeichen 48/92).

Wenn möglich, wurden je zwei Gewebeproben, eine aus makroskopisch entzündeter und eine nicht entzündeter Darmschleimhaut, gewonnen (von manchen Patienten auch nur eine, in manchen Fällen drei Proben). Insgesamt wurden 151 Gewebeproben ausgewertet. Soweit vorhanden, wurden die histologischen Befunde des Pathologischen Instituts der Universität in die Beurteilung mit einbezogen.

Alters- und Geschlechtsverteilung der einzelnen Gruppen sind in Tab. 1 (folgende Seite) dargestellt.

Patienten mit Morbus Crohn

Untersucht wurden 22 Patienten mit anamnestisch bekanntem oder klinisch, endoskopisch bzw. histologisch diagnostiziertem Morbus Crohn (MC). Für die Einschätzung der aktuellen klinische Krankheitsaktivität haben wir den Crohn's Disease Activity Index (CDAI) (Best et al. 1976, Best et al. 1979) und den van Hees Aktivitätsindex (vHAI) (van Hees et al. 1980) verwendet, für die Beurteilung der endoskopisch sichtbaren Aktivität den Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity (CDEIS) (Mary und Modigliani 1989).

Patienten mit Colitis ulcerosa

Untersucht wurden 22 Patienten mit Colitis ulcerosa (CU). Die Zuordnung zu dieser Gruppe erfolgte prinzipiell nach den gleichen Kriterien wie für die MC-Gruppe. Auch hier wurden klinische (Truelove und Witts 1955, Rachmilewitz 1989) und endoskopische (Rachmilewitz 1989) Indizes zur Einschätzung der aktuellen Krankheitsaktivität verwendet.

Patienten mit Intermediate Colitis

Bei 2 Patientinnen mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung konnte das klinische und histologische Bild nicht eindeutig einem der beiden Krankheitsbilder MC oder CU zugeordnet werden. Diese erfüllen damit die Kriterien einer „Intermediate Colitis“ (IC).

Kontrollgruppe

37 Patienten mit unauffälliger Darmschleimhaut (ohne klinisch oder histologisch begründeten Verdacht auf eine der oben genannten Diagnosen zu früheren oder aktuellen Zeitpunkten) sowie Patienten mit anderen Diagnosen (Kolonpolypen, Divertikulose, chronische Niereninsuffizienz u.a.).

Eine Tabelle aller Patienten und Proben findet sich im Anhang II.

Tab. 1 zeigt eine kurze Übersicht über das Patientenkollektiv.

Gruppe	Patientenzahl			Alter	
	weiblich	männlich	total		Durchschnitt
Morbus Crohn	14	8	22	17 - 51 Jahre	32,5 Jahre
Colitis ulcerosa	12	10	22	18 - 78 Jahre	37,9 Jahre
Intermediate Colitis	2	-	2	25 - 56 Jahre	40,5 Jahre
Kontrollgruppe	25	12	37	19 - 82 Jahre	52,1 Jahre

Tab. 1 Patienten; Alters- und Geschlechtsverteilung

4. METHODEN

Die koloskopisch gewonnenen Darmschleimhaut-Biopsien wurden Ultraschall-homogenisiert und durch Isoelektrische Fokussierung aufgetrennt. Nach Transfer auf Nitrozellulosemembran zur Fixierung der Antikörper erfolgte deren Nachweis durch Inkubation mit markierten Antigenen pathogener Stämme von *Y. enterocolitica* der Serotypen 0:9 und 0:3. An diese wurden dann wiederum enzymmarkierte Sekundärantikörper gebunden, die durch eine darauf folgende Immunfärbung sichtbar gemacht wurden. Besondere Eigenschaften der verwendeten Methoden und ihre genaue Durchführung werden im Folgenden beschrieben.

4.1. ANTIGENPRÄPARATION

Die zum Antikörpernachweis verwendete Präparation von *Y.-enterocolitica*-0:9- und -0:3-Antigen wurde nach der von Heesemann et al. beschriebenen Isolierungsmethode für „secreted proteins“ (Yops) durchgeführt (Heesemann et al. 1984). Der durch Zugabe von EDTA herbeigeführte Kalziumentzug führt zur Produktion von Yops durch die Yersinien (siehe 1.3.2.1.).

Die Antigenpräparation enthält neben

- a. (plasmidkodierte) Yops auch
 - b. (chromosomal kodierte) Serotyp-spezifische O-Antigene,
- da eine weitere Aufreinigung der hydrophoben Yop-Fraktion nicht gelang.

4.2. MARKIERUNG VON ANTIGENPRÄPARATIONEN

4.2.1. BIOTINYLIERUNG

Avidin, ein Protein aus Hühnereiweiß, besitzt zu dem Vitamin Biotin eine extrem hohe Affinität. Avidin hat vier Bindungsstellen für Biotin; es ist ein Glykoprotein mit einem Mole-

kulargewicht von 68 kDa und einem isoelektrischen Punkt (pI) um 10. Der Zuckeranteil und der hohe pI bewirken eine relativ starke unspezifische Bindung von Avidin an biologische Strukturen, zum Beispiel an Zellmembranen. Diese Nachteile hat ein zu Avidin analoges Protein aus *Streptomyces avidinii* nicht; sein pI liegt im leicht sauren Bereich, und Zuckergruppen fehlen. Dieses Streptavidin hat ein Molekulargewicht von 60 kDa und bindet wie Avidin vier Moleküle Biotin.

Biotin, ein großes Vitamin, kann dank seiner relativ kleinen Molekülgröße von 244 kDa an die meisten Proteine bzw. Antikörper gekoppelt werden, ohne deren biologische Aktivität zu verändern. Da ein Protein mit einer Vielzahl von Biotinmolekülen konjugiert werden kann, ist durch die anschließende Kopplung mit Avidin bzw. Streptavidin eine erhebliche Steigerung der Sensitivität verschiedener Nachweismethoden zu erreichen.

Die Avidin-Biotin-Interaktion ist die stärkste bekannte nicht kovalente Bindung zwischen einem Protein und einem Liganden. Diese Bindung erfolgt sehr schnell, und ist der Komplex erst einmal gebildet, ist er weitestgehend resistent gegen extreme pH-Werte, organische Lösungsmittel und andere denaturierende Reagenzien.

Da die Biotin-Bindungsstellen ca. 9 Å unter der Oberfläche des Avidin-Moleküls lokalisiert sind, können bestimmte Aminosäuren oder Glykosylgruppen die Biotin-Bindung sterisch behindern. Dieses Problem kann durch Verwendung von Biotin-Derivaten mit einem langen Spacer-Arm (zum Beispiel 6 x CH₂, ε-Kapronsäure) reduziert werden. Dieser aliphatische Rest zwischen Protein und konjugiertem Biotin verbessert außerdem die Komplexbildung von Biotin mit den tief gelegenen Biotin-Bindungsstellen des Avidins, so dass die Einführung dieser Derivate zu einer weiteren Steigerung der Sensitivität führte.

Für die Konjugation an Proteine ist eine reaktive Gruppe notwendig. Heute werden am häufigsten N-Hydroxysuccinimidoester des Biotin mit langem Spacer-Arm (-X-) verwendet, die spontan bei Zugabe zum Protein im Kupplungspuffer hydrolysieren und dabei das Biotin-X- über eine kovalente Peptidbindung an die ε-Aminogruppen der Lysine koppelt. Da ein Protein u.U. bei maximaler Biotinylierung seine biologischen Eigenschaften verlieren kann, muss die Reaktion kontrolliert ablaufen und reproduzierbar sein. Das Reaktionsverhältnis Protein zu Biotin soll zwischen 5 und 20 liegen.

Die Biotinylierung erfolgte nach der Beschreibung der Methode im Handbuch „Biotinylation and analysis of membrane-bound and soluble proteins“ (Coico 2000).

4.2.2. FLUORESCEIN-MARKIERUNG

Die Fluorescein-Markierung des Antigens erfolgte mit dem Fluorescein Labeling Kit der Firma Boehringer Mannheim Biochemica (nach Anleitung des Herstellers). Das Markierungsprinzip besteht in einer Reaktion freier Aminogruppen des zu markierenden Antigens mit 5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxy-succinimidester (FLUOS) unter Bildung einer stabilen Amidbindung. Nicht reagierter FLUOS wird über eine Sephadex^R G-25 Säule abgetrennt.

FLUOS hat gegenüber Fluoresceinisothiocyanat (FITC) den Vorteil, dass es sehr viel reaktiver ist und dass die nach Reaktion gebildete Amidbindung stabiler ist als die Thioharnstoffbindung, die FITC mit freien Aminogruppen bildet.

4.3. AUFBEREITUNG DER GEWEBEPROBEN

1. Je zwei Biopsien aus dem gleichen Schleimhautareal wurden mit 170 ml kaltem PBS (pH 7,4, 0,02 % NaN₃) versetzt und in ein Eisbad gegeben.
2. Ultraschallzertrümmerung: Diese erfolgte mit einer Ultraschallsonde während ca. 20 - 30 Sekunden (bei noch nicht vollständig erfolgter Zertrümmerung evtl. etwas länger).

Einstellungen:

Power Level 200 V (entspricht bei einer geräteseitig
eingestellten Stromstärke von 2,5 A
einer Leistung von 500 W)

Repeating Duty Cycle 0,5 s

3. Zentrifugation: Anschließend wurde das Homogenat 3 x 10 min bei 10.000 x g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils asserviert, um ihn erneut der Zentrifugation zuzuführen.

4.4. ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG

Für die Auftrennung der im Homogenat zu untersuchenden Proteinfractionen haben wir die Isoelektrische Fokussierung (IEF) benutzt. Es handelt sich um eine elektrophoretische Methode, bei der man sich die amphoteren Eigenschaften der Proteine zunutze macht. Diese bewirken eine Änderung der Ladung in Abhängigkeit vom pH-Wert der Umgebung. Der isoelektrische Punkt pI bezeichnet den pH-Wert an dem sich die Ladungen der Seitenketten gegenseitig aufheben; das Protein ist damit elektrisch neutral, so dass keine Wanderung im elektrischen Feld mehr erfolgt. Die Proteine wandern in einem stabilen pH-Gradienten an ihre pIs und werden dort immobilisiert und konzentriert. Am pI liegt ein Löslichkeitsminimum vor, das heißt Proteine fallen am pI als Niederschlag aus.

Voraussetzung für die IEF ist neben der Erzeugung eines elektrischen Feldes über die Wanderungsstrecke die Schaffung eines linearen und stabilen pH-Gradienten. Dieser würde unter normalen Umständen wegen der an den Elektroden stattfindenden chemischen Reaktionen beständig abnehmen. Um ihn aufrechtzuerhalten, werden Trägerampholyte in das Elektrophorese-Gel eingebracht. Dabei handelt es sich um amphotere Substanzen, die an ihrem jeweiligen pI eine gewisse Pufferkapazität besitzen. Da das Ampholyt an dieser Stelle die höchste Konzentration erreicht, wird der entsprechende pH um diesen Punkt herum stabilisiert. Durch eine geeignete Mischung verschiedener Trägerampholyte wird innerhalb des gewünschten pH-Bereichs ein kontinuierlicher pH-Gradient erzeugt.

Die Trennschärfe anderer Separationsmethoden ist durch Diffusion stark limitiert (Bandenverbreiterung). Der pH-Gradient wirkt bei der IEF der Diffusion entgegen: Vom jeweiligen pI weg diffundierende Moleküle erhalten erneut eine elektrische Ladung und werden im elektrischen Feld wieder in Richtung auf ihren pI transportiert. Dieser Konzentrations-effekt (Fokussierung) bedingt ein hohes Auflösungsvermögen und eine hohe Bandenschärfe. Dadurch ist es möglich, Proteine mit gleichen Molekulargewichten und minimalen Ladungsunterschieden bis zu einer pI-Differenz von 0,0005 pH voneinander zu trennen.

Als Trägermedium für die IEF verwendeten wir Agarose-Gel (Gelkonzentration 1,1 %). Dieses hat gegenüber dem sonst üblichen Polyacrylamid-Gel einige Vorteile. Es ist relativ einfach herzustellen und ungiftig. Wegen seines hohen Reinheitsgrades ist es chemisch inert, so dass Interferenzen mit den in den Proben zu untersuchenden Proteinen auszuschließen sind. Seine große Porengröße erlaubt den Durchtritt von Molekülen bis zu einem Molekulargewicht von über 10^6 und schafft ideale Voraussetzungen für einen Transfer der

Proteine zum Beispiel auf Nitrozellulosemembran und eine Kombination mit immunologischen Nachweismethoden.

4.4.1. HERSTELLUNG EINES AGAROSE-GELS FÜR DIE IEF

Zusammenbau der Gelkassette: Ein GelBond-Film wird mit der hydrophoben Seite (Probe mit einem Wassertropfen) und mit etwas Ethanol (70 Vol.%) mittels einer Glaspipette luftblasenfrei auf die Glasplatte aufgerollt, so dass Newton'sche Ringe zu sehen sind. Danach wird die andere Glasplatte mit der Gummidichtung nach unten auf die Folie gelegt und beide an den drei geschlossenen Seiten mit Klammern fixiert. Die fertige Gelkassette sowie eine Injektionsnadel (Nr. 2) und eine 20-ml-Spritze werden 10 bis 15 min vor dem Gießen des Gels in einem auf 70°C temperierten Trockenschrank erwärmt.

0,18 g Agarose IEF,
2,05 g Sorbitol und
16 ml steriles Aqua bidest.

werden in einem sterilen 50 ml Erlenmeyerkolben im Wasserbad erhitzt (Magnetrührer). Nachdem die Agarose vollständig gelöst (wasserklare Lösung) und anschließend auf 75°C abgekühlt ist, wird das Pharmalytgemisch zugegeben:

1,0 ml Pharmalyte pH 3 - 10
0,1 ml Pharmalyte pH 2,5 - 5
0,1 ml Pharmalyte pH 5 - 8
0,1 ml Pharmalyte pH 8 - 10,5.

Die vorgewärmte Injektionsnadel wird auf die vorgewärmte Spritze ohne Spritzkolben gesteckt und die etwa 70°C warme Agarose-Pharmalyt-Lösung wird zügig in die Spritze gegossen, während die Nadel von oben senkrecht in die Gelkassette gehalten wird. Durch geringen Druck des vorsichtig aufgesetzten Spritzkolbens ist ein zügiges und damit luftblasenfreies Spritzen der Lösung in die Gelkassette möglich.

Das Agarose-Gel sollte mindestens 2 Stunden bei 4°C (besser über Nacht im Kühlschrank in einer feuchten Kammer) härten, ehe es gebraucht wird. In einer feuchten Kammer sind vorbereitete Gele bei 4°C gut eine Woche haltbar.

4.4.2. DURCHFÜHRUNG DER ISOELEKTRISCHEN FOKUSSIERUNG

Mindestens 15 min vor dem Start der IEF muss das Kühlsystem eingeschaltet werden, damit bei Auflegung des Gels die Solltemperatur von 10°C erreicht ist.

Vorbereitung des Gels:

Das in einer feuchten Kammer in Kühlschrank aufbewahrte Gel wird aus der Gelkassette gelöst, indem man von der oberen Öffnung her die beiden Glasplatten mittels einer Skalpellklinge vorsichtig auseinander drückt.

Das Gel wird nun auf eine Schablone (Pharmacia) gelegt und die ehemals obere Kante mit einem Lineal abgetrennt, so dass nun vier gerade Gelkanten vorhanden sind. Überschüssige Flüssigkeit auf dem Gel, die den einwandfreien Lauf der IEF stören kann, wird mit einem Blatt Filterpapier vorsichtig aufgenommen.

Die Probenaufgabefolie und die Probenaufgabestücke werden nun in einem Abstand von mindestens 1 cm zum Anodenstreifen aufgelegt. Die Aufgabefolie muss exakt parallel zu den Elektrodenstreifen verlaufen und sollte außerdem mit einer Pinzette an das Gel angedrückt werden, damit die Proben nicht in den Flüssigkeitsfilm zwischen Folie und Gel verlaufen können. Dabei muss besonders darauf geachtet werden, das Gel nicht zu verletzen. Für den Auftrag des Myoglobin-Markers werden kleine Probenaufgabestücke aus Filterpapier auf der Anoden- und Kathodenseite platziert.

Um eine ausreichende Kühlung des Gels sicherzustellen, werden ca. 5 ml Aqua bidest. auf die Kühlplatte der Multiphor-II-Einheit gegeben und das vorbereitete Gel auf die Kühlplatte gelegt, so dass ein luftblasenfreier Kontakt entsteht. Überschüssiges Wasser an den Rändern des GelBond-Films muss penibel entfernt werden, da sonst die Gefahr eines Elektrodenbrandes besteht.

Die beiden Elektrodenstreifen werden nun auf einer Glasplatte mit der Kathoden- bzw. Anodenlösung satt getränkt. Vor dem Auflegen auf das Gel wird die überschüssige Lösung mit einem Papierhandtuch abgenommen. Auch die Elektrodenstreifen müssen unbedingt exakt parallel zu den Gelrändern ausgerichtet werden, damit ein regelmäßiger Lauf garantiert ist.

Nun werden je 2,5 ml der Homogenate mit einer Eppendorf-Pipette vorsichtig in die Löcher der Auftragefolie gegeben, wobei nur jede zweite Position der Folie besetzt wird, damit die Proben nicht ineinander laufen können. Die Probenaufgabe

sollte möglichst schnell erfolgen, weil die Proben sofort in das Gel diffundieren. Eine Verletzung des Gels muss dabei unbedingt vermieden werden. Je 3 ml des Myoglobin-Markers werden auf die entsprechenden Probenaufgabestücke auf der Anoden- und Kathodenseite aufgetragen.

Nach der Probenaufgabe sind evtl. noch vorhandenes Wasser an den Rändern der Gelträgerfolie zu entfernen und das Gel auf der Kühlplatte exakt auszurichten. Nun werden die Glasplatte mit den Platinelektroden und der Deckel aufgesetzt.

Anlegen der Spannung:

Das Netzteil sollte jetzt unmittelbar eingeschaltet werden, um eine Verzögerung des Starts der IEF zu vermeiden. Die entsprechende Abfolge der Phasen kann im Netzteil Multidrive XL abgespeichert werden. Für Gewebehomogenat-Proben ist eine Vorfokussierung zur Ausbildung des pH-Gradienten erforderlich.

Elektrische Parameter:

Phase 1: Spannung (konstant).....500 V

Stromstärke..... 200 mA

Leistung 15 W

Dauer 20 min

Phase 2: Spannung (konstant).....750 V

Dauer 20 min

sonst wie Phase 1

Phase 3: Spannung (konstant).....1500 V

Dauer 90 min

sonst wie Phase 1

Phase 4: Spannung (konstant).....750 V

Dauer 30 min

sonst wie Phase 1

Phase 4 erhält nur noch die Spannung aufrecht; ihr Ende muss nicht abgewartet werden.

Durch die starke Elektroendosmose während der Fokussierung müssen die Elektrodenstreifen nach 15, 30, 45 und 60 Minuten erneut mit Papier getrocknet werden.

Beenden der IEF:

Haben sich die von beiden Seiten wandernden Myoglobin-Banden an ihrem isoelektrischen Punkt vereinigt (eine saure und eine basische Bande), ist die IEF in der Regel abgeschlossen. Nach Beendigung der IEF wird mit einer Flachelektrode der pH-Wert an verschiedenen Stellen des Gels gemessen, so dass ein pH-Gradient erstellt werden kann (dies ermöglicht eine pH-Zuordnung der einzelnen Banden und somit auch eine eindeutige Vergleichbarkeit der Banden verschiedener Läufe). Danach erfolgt sofort der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran.

4.5. TRANSFER AUF NITROZELLULOSE-MEMBRAN

Dank der weiten Vernetzung von Agarose-Gelen lassen sich die zu untersuchenden Proteine durch einfache Diffusion bzw. Kapillarblotting auf Nitrozellulose(NC)-Membran übertragen. Um einen kompletten Transfer, maximale Bindung und einen niedrigen Background zu erreichen, muss die NC-Membran völlig durchfeuchtet sein. Dazu werden sie und das Filterpapier (3 MM) in dem verwendeten Puffersystem (PBS pH 7,4, 0,02 % NaN_3) äquilibriert.

Unmittelbar nach Abschluss der IEF wird das Agarose-Gel auf eine Glasplatte aufgebracht und die vorbereitete NC-Membran luftblasenfrei aufgelegt. Die Position der Membran darf nicht korrigiert werden, da der Proteintransfer sofort beginnt. Danach werden das ebenfalls mit PBS getränkte Filterpapier und 10 doppelte Lagen trockener Papierhandtücher aufgelegt, der Stapel mit einer weiteren Glasplatte abgedeckt und mit etwa 2 kg beschwert. Die Transferzeit beträgt je nach Molekülgröße 1-1½ Stunden (bei Überschreiten dieser Dauer wird die NC-Membran sehr trocken und kann beim Lösen leicht beschädigt werden).

Nach Abschluss des Transfers Papierhandtücher und Filterpapier entfernen, NC-Membran mit Skalpell und Lineal entsprechend der Inkubationsschalen zurechtschneiden (hier hilft der Myoglobin-Marker bei der Orientierung), eine Ecke der Membran zur späteren Zuordnung abschneiden. Hierbei muss rasch gearbeitet werden, da die NC-Membran nicht trocken werden darf. Überschüssige Bindungsstellen der NC-Membran werden blockiert (in Blockierungspuffer, 0,2 ml/cm² Membran, mindestens 3 Stunden bei Zimmertemperatur, besser über Nacht bei 4°C).

4.6. REVERSES IMMUNBLOTTING

Der Nachweis der nunmehr auf der NC-Membran immobilisierten Antikörper erfolgt durch Inkubation der Membran mit markierten definierten Antigenen, hier in der Regel Virulenz-Antigenen von *Y. enterocolitica* O:9 oder O:3. Hierzu wird die NC-Membran zuerst 1x10 min mit Waschpuffer I (0,3 ml/cm² Membran) gewaschen (Zimmertemperatur, Rocker). Dann erfolgt die Inkubation mit dem markierten (biotinylierten bzw. fluoresceinierten) Antigen. Dieses wird in der Regel 1:500 in Blockierungspuffer verdünnt (0,15 ml/cm² Membran). Die Inkubation sollte während mind. 3 Stunden bei Zimmertemperatur, besser über Nacht bei 4°C erfolgen.

4.7. IMMUNFÄRBUNG

Die Detektion des Ergebnisses erfolgt mit Hilfe enzymmarkierter Sekundärantikörper (Extravidin-AP für biotinylierte Antigene bzw. Anti-Fluorescein-AP für fluoresceinmarkierte Antigene), die in der darauf folgenden Färbereaktion sichtbar gemacht werden. Zuerst wird die NC-Membran 4x15 min mit Waschpuffer II (0,3 ml/cm² Membran) gewaschen (Zimmertemperatur, Rocker).

Erst dann erfolgt die eigentliche Konjugation mit dem markierten Sekundärantikörper. Dazu wird die NC-Membran mit Extravidin-AP (1 mg/ml, Verdünnung 1:1000) bzw. Anti-Fluorescein-AP (Verdünnung 1:2000) in Konjugatpuffer (0,15 ml/cm²) für mind. 1 Stunde inkubiert (Zimmertemperatur, Rocker).

Nun wird erneut 4x15 min mit Waschpuffer II gewaschen (wie oben).

Ganz zum Schluss folgt die Entwicklung mit der Färbelösung:

66 ml	NBT-Stammlösung
33 ml	BCIP-Stammlösung
100 ml	1 M MgCl ₂
10 ml	Ethanolaminpuffer pH 9,6

(Diese Lösung ist lichtempfindlich und sollte erst kurz vor der Anwendung hergestellt werden.)

0,15 ml/cm² der Färbelösung werden zu der NC-Membran gegeben. Bei Erreichen der gewünschten Farbintensität (nach circa 20-30 min) wird die Farbreaktion durch Abspülen der

NC-Membran unter fließendem Leitungswasser abgebrochen und die Membran anschließend bei Zimmertemperatur getrocknet.

4.8. ERGÄNZENDE VERSUCHE MIT ANTI-IMMUNGLOBULINEN ZUM NACHWEIS DER ZUGEHÖRIGKEIT DER ANTIKÖRPER ZUR IMMUNGLOBULIN-GRUPPE

Um den Nachweis zu führen, dass die untersuchten Banden tatsächlich Immunglobulinen entsprechen, und gleichzeitig herauszufinden, welcher Immunglobulin-Gruppe diese zuzuordnen sind, haben wir zusätzliche Versuche bzw. Versuchsteile durchgeführt.

4.8.1. IMMUNGLOBULIN-KLASSE-BESTIMMUNG MIT MARKIERTEN ANTI-IMMUNGLOBULINEN

Statt der markierten Yersinien-Antigene wurden hier biotinylierte Anti-Humanimmunglobulin-Antikörper der Firma Dianova zum reversen Immunblotting verwendet. Diese werden in der sich anschließenden Färbereaktion direkt sichtbar gemacht. Neben dem Nachweis der Immunglobuline zeigen sich so auch deren pI-Bereiche, so dass eine Zuordnung der mit Yersinien-Antigenen reagierenden Antikörper (in den anderen Läufen) aus dem Darmgewebe versucht werden kann.

4.8.2. BLOCKIERUNG VON IMMUNGLOBULINEN MIT UNMARKIERTEN ANTI-IMMUNGLOBULINEN

In einem weiteren Schritt ging es darum, direkt bestimmte Banden als zu einer bestimmten Immunglobulin-Klasse zugehörig zu identifizieren. Hierzu wurde in den regulären Versuchsablauf (nach Abschluss der IEF und Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran) ein Blockierungsschritt mit unkonjugierten, d.h. unmarkierten Anti-Immunglobulinen eingefügt. Verwendet wurden diesmal unkonjugierte Antikörper gegen das F(ab')₂-Fragment der Humanimmunglobuline (ebenfalls Dianova). Nach Verdünnung der

fertigen Antikörperlösungen um den Faktor 1:5 wurde die Blockierung vor dem reversen Immunblotting über Nacht durchgeführt.

Bei dieser Blockierung handelt es sich um eine sterische Behinderung der Bindungsstellen am Immunglobulin-Molekül durch das Anti-Immunglobulin.

4.8.3. BLOCKIERUNG DER YERSINIA-SPEZIFISCHEN BINDUNGSSTELLEN MIT UNMARKIERTEN YERSINIEN-ANTIGENEN

Ferner sollte gezeigt werden, dass es sich nicht nur bei den untersuchten Banden um Immunglobuline handelt, sondern dass diese auch als spezifische Antikörper an Yersinien-Antigene binden. Die Blockierung (wie unter 4.9.2. beschrieben) erfolgte hier mit unmarkierten Virulenz-Antigenen, die die spezifischen Bindungsstellen der Immunglobuline besetzen und bei ausreichender Konzentration blockieren, so dass das später zugegebene markierte Antigen hier nicht ansetzen kann.

5. ERGEBNISSE

5.1. VORGEHEN BEI DER AUSWERTUNG

Nach Abschluss der Immunfärbung zeigen sich auf den Laufstrecken der Proben eine ganze Reihe unterschiedlich stark ausgeprägter Banden, die die Vielzahl verschiedener *Y. enterocolitica*-Antigene widerspiegeln. Bei der Auswertung haben wir uns auf zwei Banden beschränkt, die die folgenden Kriterien weitgehend erfüllen:

1. dunkel bzw. kräftig genug gefärbt, um auch bei schwächer konzentrierten Proben erkennbar zu sein und damit eine Auswertung möglichst aller Proben zuzulassen
2. nicht durchgehend bei allen Proben vorhanden, d.h. möglichst aussagekräftig im Sinne der Fragestellung (Banden, die bei allen Proben auftreten, sprechen eher für eine unspezifische Proteinbindung als für eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion; vgl. auch 5.4.).

Da die absolute Höhe der Banden je nach Gesamtlaufstrecke und Elektrodenabstand von Lauf zu Lauf variiert, wurden die Banden zur besseren Vergleichbarkeit den entsprechenden pH-Werten im elektrischen Feld zugeordnet (pH-Messung direkt nach Abschluss der IEF auf dem Gel mit einer Flachelektrode). Exemplarisch zeigt Abbildung 1 eine solche pH-Kurve.

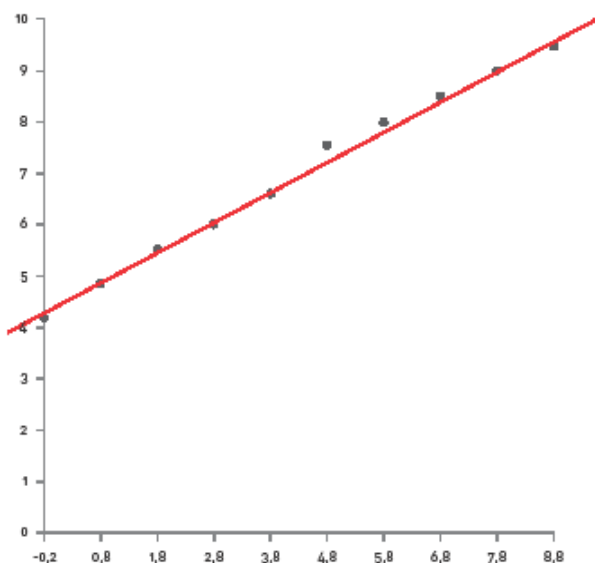


Abb. 1 pH-Gradient (nach Abschluss der IEF auf dem Gel mit einer Flachelektrode auf dem Gel gemessen) und Zuordnung der Werte zu Höhen der Laufstrecke in cm

Die im Weiteren untersuchten und besprochenen Banden entsprechen etwa den pH-Werten 6,5 und 7,7, jeweils nach Inkubation mit *Y. enterocolitica* 0:9- und 0:3-Antigen. Es ergeben sich also für jede Probe insgesamt vier Auswertungen.

Mittels χ^2 -Test (Chi-Quadrat-Test) wurden die Häufigkeiten dieser Banden verglichen und ihre Unterschiede auf Signifikanz hin überprüft.

5.2. ERGEBNISSE DER GEWEBEPROBEN

Die Abbildungen 2 und 3 (auf der folgenden Seite) zeigen exemplarisch das Ergebnis von Läufen unterschiedlicher Gewebeproben. Dargestellt werden spezifische Antikörper gegen *Y.-enterocolitica*-O:9- bzw. -O:3-Antigen.

Nach Inkubation mit *Y.-enterocolitica*-0:9-Antigen fand sich bei 41,3% der MC-Biopsien eine Bande bei pH 6,5, bei 26,8% der CU-Proben und bei 38,3% der Proben in der Kontrollgruppe (absolute Zahlen siehe Tab. 2). Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant ($p = 0,195$).

Gruppe	Yersinia enterocolitica 0:9, Bande pH 6,5				Total
	keine	fraglich	vorhanden	stark	
Morbus Crohn	27	0	16	3	46
Colitis ulcerosa	30	0	11	0	41
Indeterminate Colitis	1	0	2	1	4
Kontrollgruppe	37	0	23	0	60
Total	95	0	52	4	151

Tab. 2 Banden gegen *Y. enterocolitica* O:9 bei pH 6,5

Bei pH 7,7 wiesen sowohl MC- als auch CU-Patienten signifikant häufiger (78,3 bzw. 63,4%) eine Bande auf als Patienten der Kontrollgruppe (45,0%) ($p = 0,006$; signifikant) (Tab. 3).

Gruppe	Yersinia enterocolitica 0:9, Bande pH 7,7				Total
	keine	fraglich	vorhanden	stark	
Morbus Crohn	10	0	13	23	46
Colitis ulcerosa	15	0	9	17	41
Indeterminate Colitis	2	0	0	2	4
Kontrollgruppe	33	0	12	15	60
Total	60	0	34	57	151

Tab. 3 Banden gegen *Y. enterocolitica* O:9 bei pH 7,7

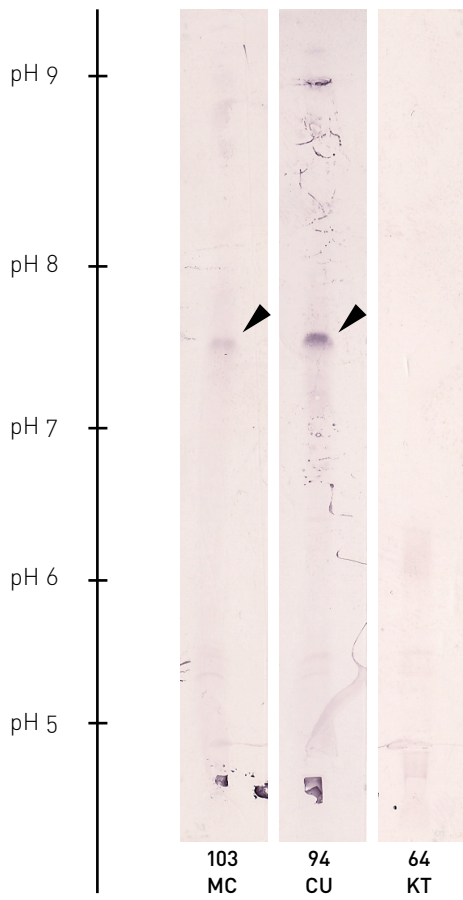


Abb. 2 Darstellung von Banden gegen biotinylierte Virulenz-Antigene von *Y. enterocolitica* O:9 (siehe Pfeile) in Gewebeproben (links Pr. Nr. 103, Pat. 71, MC; Mitte Pr. Nr. 94, Pat. 14, CU; rechts Pr. Nr. 64, Pat. 41, KT)

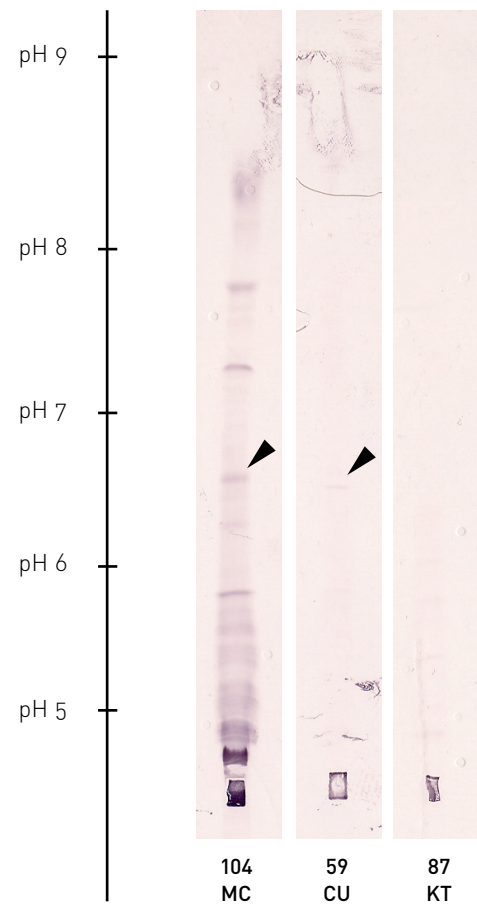


Abb. 3 Darstellung von Banden gegen biotinylierte Virulenz-Antigene von *Y. enterocolitica* O:3 (siehe Pfeile) in Gewebeproben (links Pr. Nr. 104, Pat. 71, MC; Mitte Pr. Nr. 59, Pat. 49, CU; rechts Pr. Nr. 87, Pat. 30, KT)

Angaben zu den Patienten finden sich in der ausklappbaren Tabelle im Anhang II.

Im Folgenden sind die Banden-Häufigkeiten für *Y. enterocolitica* O:9 (Bande „vorhanden“ oder „stark“) bei MC-, CU- und Kontroll-Patienten in einem Diagramm zusammengefasst (die Angaben für IC wurden wegen der geringen Probenzahl in den Diagrammen nicht berücksichtigt):

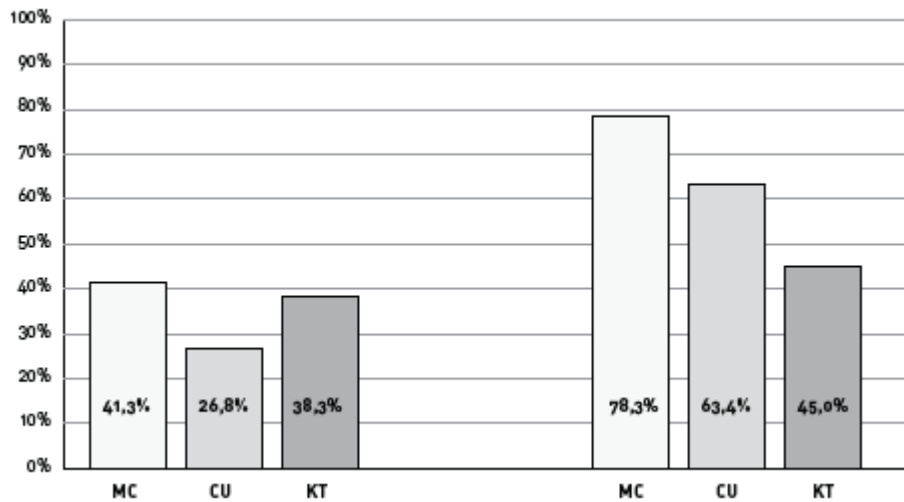


Diagramm 1 Banden bei pH 6,5 (links) und bei pH 7,7 (rechts) nach Inkubation mit *Y. enterocolitica*-O:9-Antigen

30,4% der MC-Proben und 34,1% der CU-Proben zeigten eine Antikörper-Bande gegen *Y. enterocolitica*-O:3-Antigen bei pH 6,5, hingegen nur 18,3% der Biopsien aus der Kontrollgruppe ($p = 0,003$) (Tab. 4).

Gruppe	Yersinia enterocolitica O:3, Bande pH 6,5				Total
	keine	fraglich	vorhanden	stark	
Morbus Crohn	32	0	14	0	46
Colitis ulcerosa	27	0	14	0	41
Indeterminate Colitis	0	0	2	2	4
Kontrollgruppe	49	0	11	0	60
Total	108	0	41	2	151

Tab. 4 Banden gegen *Y. enterocolitica* O:3 bei pH 6,5

Bei pH 7,7 waren Banden in der Kontrollgruppe geringfügig häufiger ($p = 0,303$; statistisch nicht signifikant) als bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (MC 52,2%, CU 53,7%, Kontrollen 58,3%) (Tab. 5).

Gruppe	Yersinia enterocolitica O:3, Bande pH 7,7				Total
	keine	fraglich	vorhanden	stark	
Morbus Crohn	22	0	17	7	46
Colitis ulcerosa	19	0	15	7	41
Intederminate Colitis	0	0	0	4	4
Kontrollgruppe	24	1	25	10	60
Total	65	1	57	28	151

Tab. 5 Banden gegen *Y. enterocolitica* O:3 bei pH 7,7

Im Folgenden sind die Banden-Häufigkeiten für *Y. enterocolitica* O:9 (Bande „vorhanden“ oder „stark“) bei MC-, CU- und Kontroll-Patienten in einem Diagramm zusammengefasst:

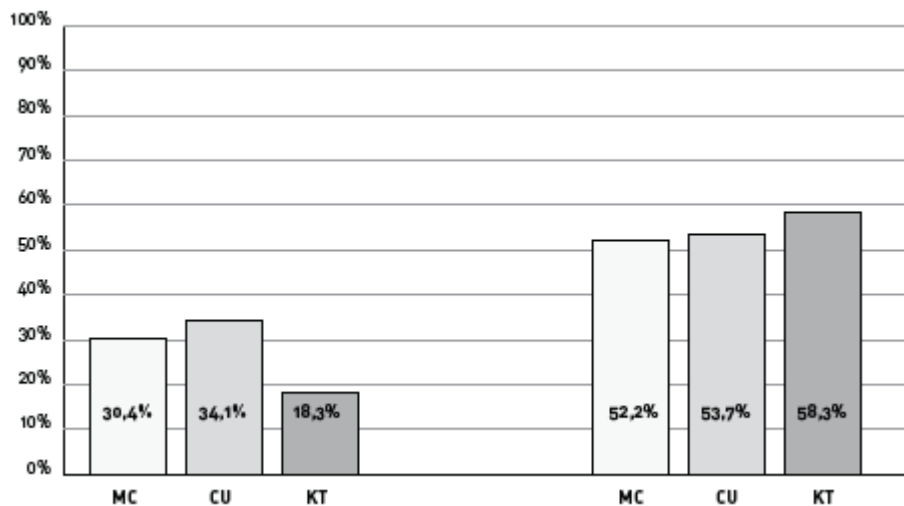


Diagramm 2 Banden bei pH 6,5 (links) und bei pH 7,7 (rechts) nach Inkubation mit *Y.-enterocolitica*-O:3-Antigen

5.3. EINFLUSS ANDERER MERKMALE

5.3.1. KRANKHEITSAKTIVITÄT

Verwendet wurden für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa jeweils ein endoskopischer und zwei klinische Indizes (siehe Kapitel 3). Für einige dieser Indizes (Best, van Hees, Truelove) ist von den Autoren bereits eine Einteilung in drei bzw. vier größere Gruppen unter-

schiedlicher entzündlicher Aktivität vorgesehen, für die anderen wurde hier eine Gruppeneinteilung in jeweils drei Schweregrade festgelegt. Bereits vorgegebene Einteilungen wurden übernommen bzw. in einem Fall leicht modifiziert (Zusammenfassung der im van-Hees-Index angegebenen vier Gruppen zu drei). Die Einteilung sowie die Häufigkeit der verschiedenen Aktivitätsgrade zeigen die Tabellen 6 und 7.

Index	Einteilung im Originaltext		Verwdt. Einteilung			
		Punkte		Punkte	Patienten	
Best	I	< 150	very well / well	I	< 150	9 (40,9%)
klinisch	II	150 - 450	active	II	150 - 450	12 (54,5%)
	III	> 450	very severe	III	> 450	1 (4,5%)
van Hees	I	< 100	no activity	I	< 100	3 (13,6%)
klinisch	II	100 - 150	slight activity	II	100 - 210	16 (72,7%)
	III	150 - 210	moderate activity			
	IV	> 210	severe-to-very-severe	III	> 210	3 (13,6%)
Modigliani				I	< 4	10 (45,5%)
endoskopisch				II	4 - 17	7 (31,8%)
				III	> 17	5 (22,7%)

Tab. 6 Einteilung und Häufigkeit der Entzündungsaktivität bei Morbus Crohn

Index	Einteilung im Originaltext		Verwdt. Einteilung			
		Punkte		Punkte	Patienten	
Truelove	I		mild	I		6 (27,3%)
klinisch	II		moderate	II		3 (13,6%)
	III		severe	III		13 (59,1%)
Rachmilewitz				I	< 4	3 (13,6%)
klinisch				II	4 - 16	17 (77,3%)
				III	> 16	2 (9,1%)
Rachmilewitz				I	< 5	4 (18,2%)
endoskopisch				II	5 - 10	15 (68,2%)
				III	> 10	3 (13,6%)

Tab. 7 Einteilung und Häufigkeit der Entzündungsaktivität bei Colitis ulcerosa

Die folgenden Tabellen zeigen die Häufigkeit von Banden nach Krankheitsaktivität bei Morbus Crohn (Tab. 8) und Colitis ulcerosa (Tab. 9), die Ergebnisse der entsprechenden Signifikanzanalysen finden sich in den Tabellen 8a und 9a.

Bis auf die Verteilung nach dem endoskopischen Rachmilewitz-Index (siehe Tab. 9 und Tab. 9a) ist keines der Ergebnisse statistisch signifikant, und bei diesem Ergebnis finden sich am häufigsten Banden bei mittlerer Krankheitsaktivität (nicht etwa bei den Patienten mit der stärksten Krankheitsaktivität).

	Yersinia enterocolitica 0:9				Yersinia enterocolitica 0:3			
	Bande pH 6,5		Bande pH 7,7		Bande pH 6,5		Bande pH 7,7	
Best	I	6 (19) (31,6%)	I	14 (19) (73,7%)	I	6 (19) (31,6%)	I	10 (19) (52,6%)
	II	12 (25) (48,0%)	II	20 (25) (80,0%)	II	8 (25) (32,0%)	II	13 (25) (52,0%)
	III	1 (2) (50,0%)	III	2 (2) (100%)	III	0 (2) (0,0%)	III	1 (2) (50,0%)
van Hees	I	4 (6) (66,7%)	I	4 (6) (66,7%)	I	1 (6) (16,7%)	I	5 (6) (83,3%)
	II	11 (34) (32,4%)	II	27 (34) (79,4%)	II	11 (34) (32,4%)	II	16 (34) (47,1%)
	III	4 (6) (66,7%)	III	5 (6) (83,3%)	III	2 (6) (33,3%)	III	3 (6) (50,0%)
Modigliani	I	6 (21) (28,6%)	I	15 (21) (71,4%)	I	5 (21) (23,8%)	I	11 (21) (52,4%)
	II	6 (15) (40,0%)	II	13 (15) (86,7%)	II	5 (15) (33,3%)	II	6 (15) (40,0%)
	III	7 (10) (70,0%)	III	8 (10) (80,0%)	III	5 (10) (50,0%)	III	7 (10) (70,0%)

Tab. 8 Banden gegen *Y.-enterocolitica*-Antigene in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad bei Morbus Crohn

Index	Yersinia enterocolitica 0:9		Yersinia enterocolitica 0:3	
	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7
Best	0,531	0,659	0,633	0,997
van Hees	0,116	0,744	0,733	0,259
Modigliani	0,090	0,544	0,346	0,339

Tab. 8a Signifikanzanalyse zu Tab. 8

	Yersinia enterocolitica 0:9				Yersinia enterocolitica 0:3			
	Bande pH 6,5		Bande pH 7,7		Bande pH 6,5		Bande pH 7,7	
Truelove	I	3 (13) (23,1%)	I	8 (13) (61,5%)	I	3 (13) (23,1%)	I	8 (13) (61,5%)
	II	1 (6) (16,7%)	II	4 (6) (66,7%)	II	2 (6) (33,3%)	II	5 (6) (83,3%)
	III	7 (22) (31,8%)	III	14 (22) (63,6%)	III	9 (22) (40,9%)	III	9 (22) (40,9%)
Rachmi- lewitz klinisch	I	0 (6) (0,0%)	I	4 (6) (66,7%)	I	2 (6) (33,3%)	I	3 (6) (50,0%)
	II	11 (32) (34,4%)	II	19 (32) (59,4%)	II	11 (32) (34,4%)	II	18 (32) (56,3%)
	III	0 (3) (0,0%)	III	3 (3) (100%)	III	1 (3) (33,3%)	III	1 (3) (33,3%)
Rachmi- lewitz endoskop.	I	0 (7) (0,0%)	I	4 (7) (57,1%)	I	0 (7) (0,0%)	I	1 (7) (14,3%)
	II	10 (28) (35,7%)	II	19 (28) (67,9%)	II	12 (28) (42,9%)	II	20 (28) (71,4%)
	III	1 (6) (16,7%)	III	3 (6) (50,0%)	III	2 (6) (33,3%)	III	1 (6) (16,7%)

Tab. 9 Banden gegen *Y.-enterocolitica*-Antigene in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad bei Colitis ulcerosa

Index	Yersinia enterocolitica 0:9		Yersinia enterocolitica 0:3	
	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7
Truelove	0,709	0,977	0,561	0,143
Rachmilewitz klin.	0,121	0,371	0,998	0,735
Rachmilewitz endoskop.	0,135	0,663	0,101	0,004

Tab. 9a Signifikanzanalyse zu Tab. 9

5.3.2. ENTZÜNDUNGSGRAD

Untersucht wurden neben den Aktivitätsindices auch der endoskopisch und (soweit Befunde vorlagen) histologisch eingeschätzte Entzündungsgrad („keine Entzündungszeichen“, „leicht“, „mäßig“, „mittelgradig“, „schwer“). Die Ergebnisse in den Tabellen 10 und 11 dargestellt. Ein klarer Trend hin zu häufigerem Nachweis von Antikörpern gegen *Y. enterocolitica*-Antigene bei höherem Entzündungsgrad lässt sich nicht erkennen.

Entzündungsgrad makroskopisch	Y. enterocolitica 0:9		Y. enterocolitica 0:3	
	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7
0 (keine)	33 (103) (32,0%)	52 (103) (50,5%)	27 (103) (26,2%)	55 (103) (53,4%)
1 (leicht)	10 (23) (43,5%)	18 (23) (78,3%)	6 (23) (26,1%)	15 (23) (65,2%)
2 (mittel)	7 (15) (46,7%)	12 (15) (80,0%)	8 (15) (53,3%)	7 (15) (46,7%)
3 (schwer)	6 (10) (60,0%)	9 (10) (90,0%)	2 (10) (20,0%)	8 (10) (80,0%)
Total	56 (151) (37,1%)	91 (151) (60,3%)	43 (151) (28,5%)	85 (151) (56,3%)

Tab. 10 Banden in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad (makroskopisch)

Entzündungsgrad histologisch	Y. enterocolitica 0:9		Y. enterocolitica 0:3	
	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7
0 (keine)	14 (46) (30,4%)	23 (46) (50,0%)	7 (46) (15,2%)	21 (46) (45,7%)
1 (leicht)	11 (39) (28,2%)	22 (39) (56,4%)	12 (39) (30,8%)	23 (39) (59,0%)
2 (mittel)	12 (29) (41,4%)	22 (29) (75,9%)	14 (29) (48,3%)	18 (29) (62,1%)
3 (schwer)	8 (12) (66,7%)	9 (12) (75,0%)	3 (12) (25,0%)	6 (12) (50,0%)
Total*	45 (126) (35,7%)	76 (126) (60,3%)	36 (126) (28,6%)	68 (126) (54,0%)

Tab. 11 Banden in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad (histologisch)

* Für 14 Patienten (25 Proben) lagen keine histologischen Befunde vor.

Die Tabellen 12 und 13 zeigen die Ergebnisse für Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Kontrollgruppe.

Entzündungsgrad makroskopisch	Y. enterocolitica 0:9		Y. enterocolitica 0:3	
	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7
Morbus Crohn				
0 (keine)	9 (27) (33,3%)	19 (27) (70,4%)	9 (27) (33,3%)	12 (27) (44,4%)
1 (leicht)	3 (8) (37,5%)	8 (8) (100%)	2 (8) (25,0%)	5 (8) (62,5%)
2 (mittel)	3 (6) (50,0%)	4 (6) (33,3%)	2 (6) (33,3%)	3 (6) (50,0%)
3 (schwer)	4 (6) (80,0%)	5 (5) (100%)	1 (5) (20,0%)	4 (5) (80,0%)
Colitis ulcerosa				
0 (keine)	2 (17) (11,8%)	7 (17) (41,2%)	5 (17) (29,4%)	7 (17) (41,2%)
1 (leicht)	4 (12) (33,3%)	9 (12) (75,0%)	3 (12) (25,0%)	8 (12) (66,7%)
2 (mittel)	3 (7) (42,9%)	6 (7) (85,7%)	5 (7) (71,4%)	3 (7) (42,9%)
3 (schwer)	2 (5) (40,0%)	4 (5) (80,0%)	1 (5) (20,0%)	4 (5) (80,0%)
Kontrollgruppe				
0 (keine)	21 (57) (36,8%)	25 (57) (43,9%)	11 (57) (19,3%)	34 (57) (59,6%)
1 (leicht)	2 (2) (100%)	1 (2) (50,0%)	0 (2) (0,0%)	1 (2) (50,0%)
2 (mittel)	0 (1) (0,0%)	1 (1) (100%)	0 (1) (0,0%)	0 (1) (0,0%)
3 (schwer)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Tab. 12 Banden in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad (makroskopisch), getrennt aufgeführt für Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Kontrollgruppe

Entzündungsgrad histologisch	Y. enterocolitica 0:9		Y. enterocolitica 0:3	
	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7
Morbus Crohn*				
0 (keine)	3 (11) (27,3%)	7 (11) (63,6%)	3 (11) (27,3%)	7 (11) (63,6%)
1 (leicht)	3 (17) (17,6%)	13 (17) (76,5%)	5 (17) (29,4%)	7 (17) (41,2%)
2 (mittel)	6 (11) (54,5%)	9 (11) (81,8%)	4 (11) (36,4%)	6 (11) (54,5%)
3 (schwer)	5 (5) (100%)	5 (5) (100%)	1 (5) (20,0%)	3 (5) (60,0%)
Colitis ulcerosa				
0 (keine)	1 (8) (12,5%)	5 (8) (62,5%)	0 (8) (0,0%)	3 (8) (37,5%)
1 (leicht)	4 (12) (33,3%)	7 (12) (58,3%)	4 (12) (33,3%)	7 (12) (58,3%)
2 (mittel)	3 (14) (21,4%)	10 (14) (71,4%)	8 (14) (57,1%)	9 (14) (64,3%)
3 (schwer)	3 (7) (42,9%)	4 (7) (57,1%)	2 (7) (28,6%)	3 (7) (42,9%)
Kontrollgruppe**				
0 (keine)	9 (26) (34,6%)	11 (26) (42,3%)	3 (26) (11,5%)	10 (26) (38,5%)
1 (leicht)	4 (9) (44,4%)	2 (9) (22,2%)	2 (9) (22,2%)	8 (9) (88,9%)
2 (mittel)	1 (2) (50,0%)	1 (2) (50,0%)	0 (2) (0,0%)	1 (2) (50,0%)
3 (schwer)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Tab. 13 Banden in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad (histologisch), getrennt aufgeführt für Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Kontrollgruppe

* Für 1 Patienten (2 Proben) lag kein histologischer Befund vor.

** Für 13 Patienten (23 Proben) lagen keine histologischen Befunde vor.

In den Diagrammen 3 bis 6 sind die wichtigsten Ergebnisse grafisch dargestellt.

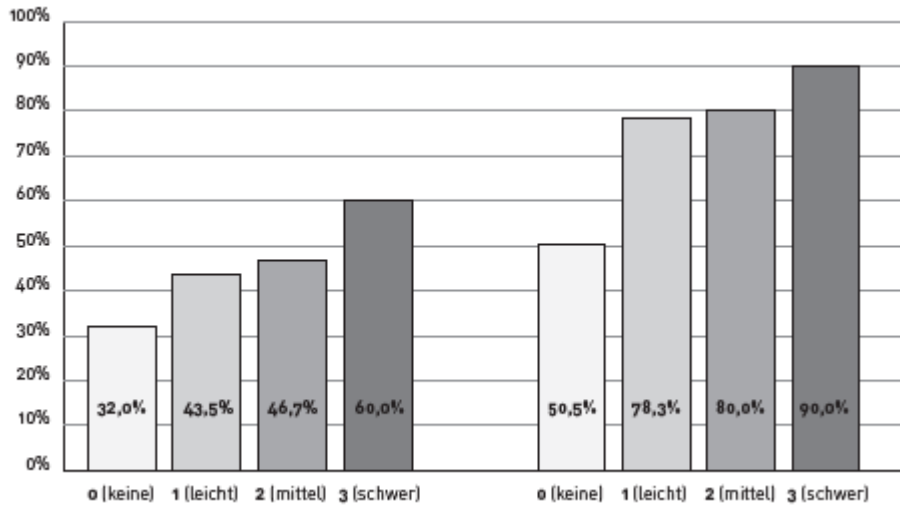


Diagramm 3 Bande bei pH 6,5 (links) und bei pH 7,7 (rechts) gegen *Y.-enterocolitica*-0:9-Antigen in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad (makroskopisch)

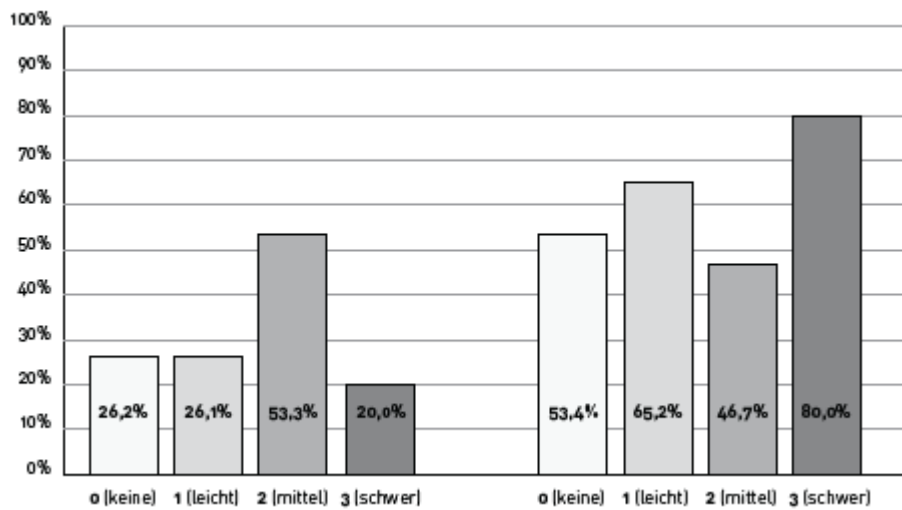


Diagramm 4 Bande bei pH 6,5 (links) und bei pH 7,7 (rechts) gegen *Y.-enterocolitica*-0:3-Antigen in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad (makroskopisch)

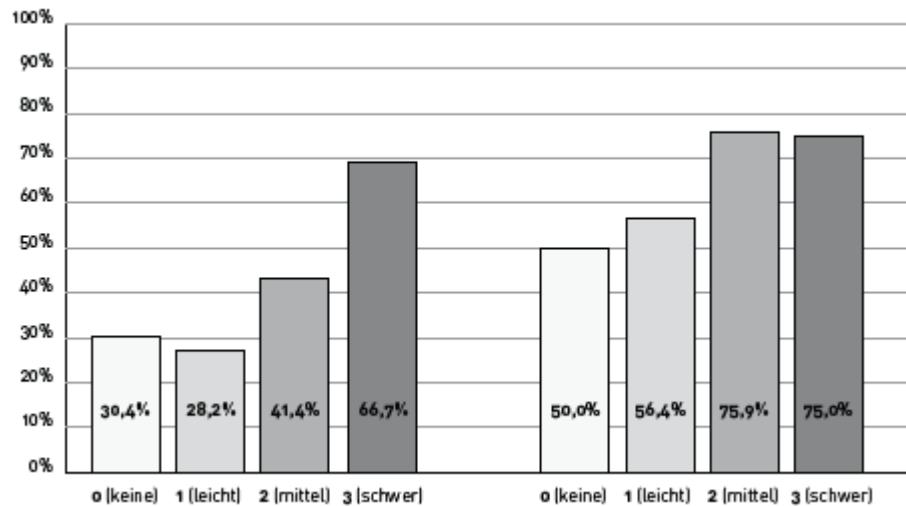


Diagramm 5 Bande bei pH 6,7 (links) und bei pH 7,7 (rechts) gegen *Y.-enterocolitica*-0:9-Antigen in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad (histologisch)

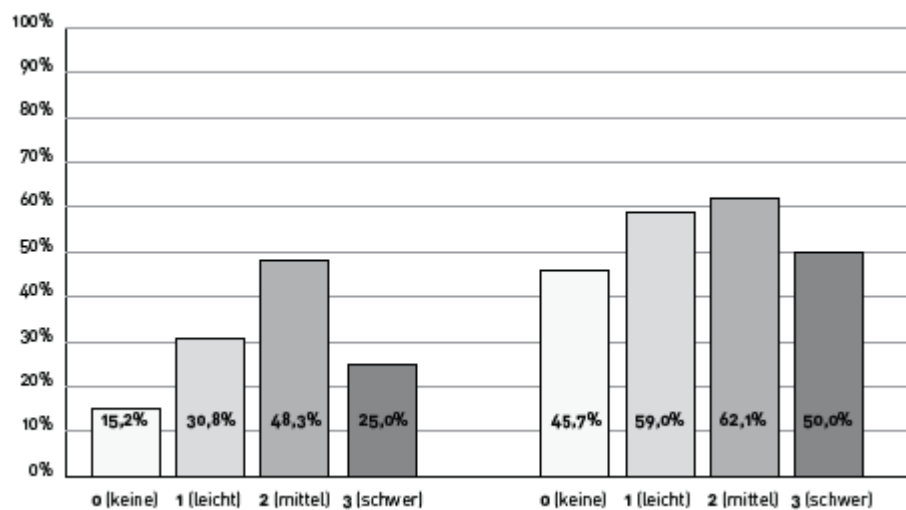


Diagramm 6 Bande bei pH 6,5 (links) und bei pH 7,7 (rechts) gegen *Y.-enterocolitica*-0:3-Antigen in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad (histologisch)

5.3.3. AUSDEHNUNG DER ENTZÜNDUNG

Um den Einfluss der Ausdehnung entzündlicher Veränderungen im Darm auf die Zielvariable „Antikörperbande gegen *Y. enterocolitica*“ zu untersuchen, wurden zunächst die verschiedenen Darmabschnitte gegeneinander abgegrenzt: Ileum, Coecum, Colon ascendens, Colon transversum, Colon descendens, Sigma, Rectum (insgesamt 7 Segmente). Der Befall

der einzelnen Segmente wurde nach den endoskopischen und histologischen Befunden getrennt bewertet. Ausgewertet wurde der Einfluss folgender Parameter auf die Zielvariable:

1. Befall des Ileums (wegen der Bedeutung der akuten Ileitis als Yersinien-Erkrankung) (Tab. 14 und 15) und
2. Gesamtausdehnung (Anzahl der betroffenen Segmente) (Tab. 16 und 17).

Befall des Ileums endoskopisch	Yersinia enterocolitica 0:9		Yersinia enterocolitica 0:3	
	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7
Ileum nicht befallen	24 (62) (38,7%)	42 (62) (67,7%)	23 (62) (37,1%)	34 (62) (54,8%)
Ileum befallen	9 (29) (31,0%)	22 (29) (75,9%)	9 (29) (31,0%)	16 (29) (55,2%)

Tab. 14 Banden in Abhängigkeit vom Befall des Ileum (endoskopisch)

Befall des Ileums histologisch	Yersinia enterocolitica 0:9		Yersinia enterocolitica 0:3	
	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7
Ileum nicht befallen	20 (52) (38,5%)	35 (52) (67,3%)	17 (52) (32,7%)	29 (52) (55,8%)
Ileum befallen	13 (39) (33,3%)	29 (39) (74,4%)	15 (39) (38,5%)	21 (39) (53,8%)

Tab. 15 Banden in Abhängigkeit vom Befall des Ileum (histologisch)

Die Ergebnisse zeigen, dass Antikörper gegen *Y.-enterocolitica*-Antigene nicht signifikant häufiger auftreten, wenn das Ileum befallen ist.

Ausdehnung endoskopisch	Y. enterocolitica 0:9		Y. enterocolitica 0:3	
	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7
0 Segmente	3 (7) (42,9%)	5 (7) (71,4%)	2 (7) (28,6%)	6 (7) (85,7%)
1 Segment	5 (18) (27,8%)	14 (18) (77,8%)	4 (18) (22,2%)	9 (18) (50,0%)
2 Segmente	7 (11) (63,6%)	8 (11) (72,7%)	4 (11) (36,4%)	7 (11) (63,6%)
3 Segmente	3 (10) (30,0%)	8 (10) (80,0%)	3 (10) (30,0%)	2 (10) (20,0%)
4 Segmente	0 (12) (0,0%)	2 (12) (16,7%)	3 (12) (25,0%)	6 (12) (50,0%)
5 Segmente	0 (2) (0,0%)	0 (2) (0,0%)	1 (2) (50,0%)	0 (2) (0,0%)
6 Segmente	12 (21) (57,1%)	18 (21) (85,7%)	11 (21) (52,4%)	15 (21) (71,4%)
7 Segmente	3 (10) (30,0%)	9 (10) (90,0%)	4 (10) (40,0%)	5 (10) (50,0%)

Tab. 16 Banden in Abhängigkeit von der Anzahl der entzündeten Darmsegmente (endoskopisch)

Ausdehnung histologisch	Y. enterocolitica 0:9		Y. enterocolitica 0:3	
	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7
0 Segmente	4 (9) (44,4%)	9 (9) (100%)	2 (9) (22,2%)	6 (9) (66,7%)
1 Segment	2 (7) (28,6%)	7 (7) (100%)	2 (7) (28,6%)	4 (7) (57,1%)
2 Segmente	0 (2) (0,0%)	2 (2) (100%)	1 (2) (50,0%)	0 (2) (0,0%)
3 Segmente	3 (4) (75,0%)	3 (4) (75,0%)	1 (4) (25,0%)	2 (4) (50,0%)
4 Segmente	0 (6) (0,0%)	4 (6) (66,7%)	1 (6) (16,7%)	1 (6) (16,7%)
5 Segmente	1 (8) (12,5%)	2 (8) (25,0%)	4 (8) (50,0%)	5 (8) (62,5%)
6 Segmente	11 (27) (40,7%)	16 (27) (59,3%)	8 (27) (29,6%)	18 (27) (66,7%)
7 Segmente	12 (28) (42,9%)	21 (28) (75,0%)	13 (28) (46,4%)	14 (28) (50,0%)

Tab. 17 Banden in Abhängigkeit von der Anzahl der entzündeten Darmsegmente (histologisch)

Auch die Anzahl der befallenen Darmsegmente hatte keine signifikante Auswirkung auf die Wahrscheinlichkeit, Antikörper gegen *Y. enterocolitica* nachzuweisen. Zwar schwanken die Werte, ein Trend – etwa hin zu häufigerem Auftreten von Banden bei einer größeren Zahl befallener Segmente – ist aber nicht erkennbar. (In dieser Auswertung wurden nur die Proben von Patienten mit MC, CU und IC berücksichtigt.)

5.3.4. ENTNAHMESTELLE UND ALTER

Die Auswertung nach Entnahmestelle der Biopsie (Tab. 18) und dem Alter der Patienten (Tab. 19) war weitgehend unauffällig.

Biopsie- entnahmestelle	Y. enterocolitica 0:9		Y. enterocolitica 0:3	
	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7
Ileum	7 (32) (21,9%)	19 (32) (59,4%)	11 (32) (34,4%)	15 (32) (46,9%)
Coecum	7 (12) (58,3%)	8 (12) (66,7%)	2 (12) (16,7%)	9 (12) (75,0%)
Colon	31 (87) (35,6%)	51 (87) (58,6%)	24 (87) (27,6%)	50 (87) (57,5%)
Sigma	10 (15) (66,7%)	10 (15) (66,7%)	5 (15) (33,3%)	9 (15) (60,0%)
Rectum	1 (5) (20,0%)	3 (5) (60,0%)	1 (5) (20,0%)	2 (5) (40,0%)
Total	56 (151) (37,1%)	91 (151) (60,3%)	43 (151) (28,5%)	85 (151) (56,3%)

Tab. 18 Banden in Abhängigkeit von der Entnahmestelle

	Y. enterocolitica 0:9		Y. enterocolitica 0:3	
	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7	Bande pH 6,5	Bande pH 7,7
Altersgruppe 1	19 (70) (27,1%)	44 (70) (62,9%)	22 (70) (31,4%)	35 (70) (50,0%)
Altersgruppe 2	37 (81) (45,7%)	47 (81) (58,0%)	21 (81) (25,9%)	50 (81) (61,7%)

Tab. 19 Banden in Abhängigkeit vom Alter der Patienten

5.4. STATISTISCHE AUSSAGEKRAFT

Durch die hier vorgenommene statistische Auswertung kann der Einfluss verschiedener Patientenmerkmale auf die Variable „Antikörperbande gegen Yersinien-Antigene“ quantifiziert werden. Es ist jedoch keine Aussage über die Interaktion der einzelnen Merkmale untereinander möglich. Da aber außer der Hauptdiagnose (MC, CU, Kontrolle) keine der untersuchten Eigenschaften einen statistisch signifikanten Einfluss auf die untersuchte Zielvariable aufwies, stellt eine mögliche Interaktion der Merkmale kein wesentliches Problem dar.

Problematischer ist es hingegen, insgesamt auf Basis der relativ geringen Fallzahlen eine gültige Aussage zu treffen. Im Folgenden werden deshalb für die drei Hauptgruppen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Kontrollgruppe) die Vertrauensgrenzen für die entsprechenden Gruppengrößen angegeben (Tab. 20).

	Yersinia enterocolitica 0:9					
	Bande pH 6,5			Bande pH 7,7		
	x (N)	%	Vertr.grenzen	x (N)	%	Vertr.grenzen
MC	19 (46)	41,30	27,00 - 56,77	36 (46)	78,26	63,64 - 89,05
CU	11 (41)	26,83	14,22 - 42,94	26 (41)	63,41	46,94 - 77,88
KT	23 (60)	38,33	26,07 - 51,79	27 (60)	45,00	32,12 - 58,39

	Yersinia enterocolitica 0:3					
	Bande pH 6,5			Bande pH 7,7		
	x (N)	%	Vertr.grenzen	x (N)	%	Vertr.grenzen
MC	14 (46)	30,43	17,74 - 45,75	24 (46)	52,17	36,95 - 67,11
CU	14 (41)	34,15	20,08 - 50,59	22 (41)	53,66	37,42 - 69,34
KT	11 (60)	18,33	9,52 - 30,44	35 (60)	58,33	44,88 - 70,93

Tab. 20 Exakte Vertrauensgrenzen (95%) für die untersuchten Gruppengrößen und Ergebnisse bei Binomialverteilung

Wegen der verhältnismäßig kleinen Gruppengrößen sind die Konfidenzintervalle relativ groß; eine breite Zufallsstreuung der Ergebnisse ist anzunehmen. Die statistische Vorhersagekraft für weitere Versuche unter gleichen Voraussetzungen ist also nicht sehr stark, bewegt sich aber doch innerhalb akzeptabler Grenzen. Zwar überschneiden sich die Konfidenzintervalle einiger Ergebnisse, in einem Fall gibt es jedoch keine Überschneidung (bei YE O:9, Bande pH 7,7 für die Ergebnisse für MC-Patienten und Kontrollen). Bei YE O:3, Bande pH 6,5 überschneiden sich die Konfidenzintervalle für MC und CU nur in einem kleinen Bereich mit dem für die Kontrollgruppe. Es handelt sich hierbei um die beiden Er-

gebnisse, die auch nach der Signifikanzanalyse statistisch aussagekräftig sind ($p = 0,006$ bzw. $p = 0,003$).

Es ist also mit einer hohen Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass diese Unterschiede nicht zufällig zustande gekommen sind.

5.5. VERSUCHE ZUR ÜBERPRÜFUNG DER AUSSAGEKRAFT

5.5.1. VERGLEICH DER MARKIERUNGEN MIT BIOTIN UND FLUORESCEIN

Abbildung 4 (folgende Seite) zeigt die Darstellung von Yersinia-spezifischen Antikörpern unter Verwendung von biotinyliertem bzw. fluoresceiniertem Antigen im Vergleich.

Die Markierung mit Biotin führt zu einer sehr viel stärkeren Anfärbung der Banden. Diese ist Folge der oben genannten Bindung zahlreicher Biotinmoleküle an das nachzuweisende Protein, die die Bindung ebenso vieler Sekundärantikörper (Extravidin-AP) bedingt. Diese führen bei der nachfolgenden Immunfärbung zu einem kräftigen Färbeergebnis. Im direkten Vergleich stellen sich die Banden nach Markierung mit Fluorescein blasser dar. Zartere Banden, die mit Biotin noch eben erkennbar sind, können mit Fluorescein meist nicht mehr nachgewiesen werden.

Die besonders kräftige Doppelbande, etwa auf Höhe von pH 6, die bei Markierung mit dem biotinylierten Antigen sehr deutlich hervorkommt, fehlt bei der Fluorescein-Markierung vollständig. Wir haben diese Bande deshalb als unspezifische Biotin-Bande interpretiert und bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt.

Von diesen beiden Unterschieden abgesehen, zeigen sich für beide Methoden aber praktisch identische Ergebnisse. Im Weiteren wurden, wegen der höheren Empfindlichkeit, die Ergebnisse der Läufe mit biotinyliertem Antigen analysiert, unter Nichtbeachtung der beschriebenen „Biotin-Bande“.

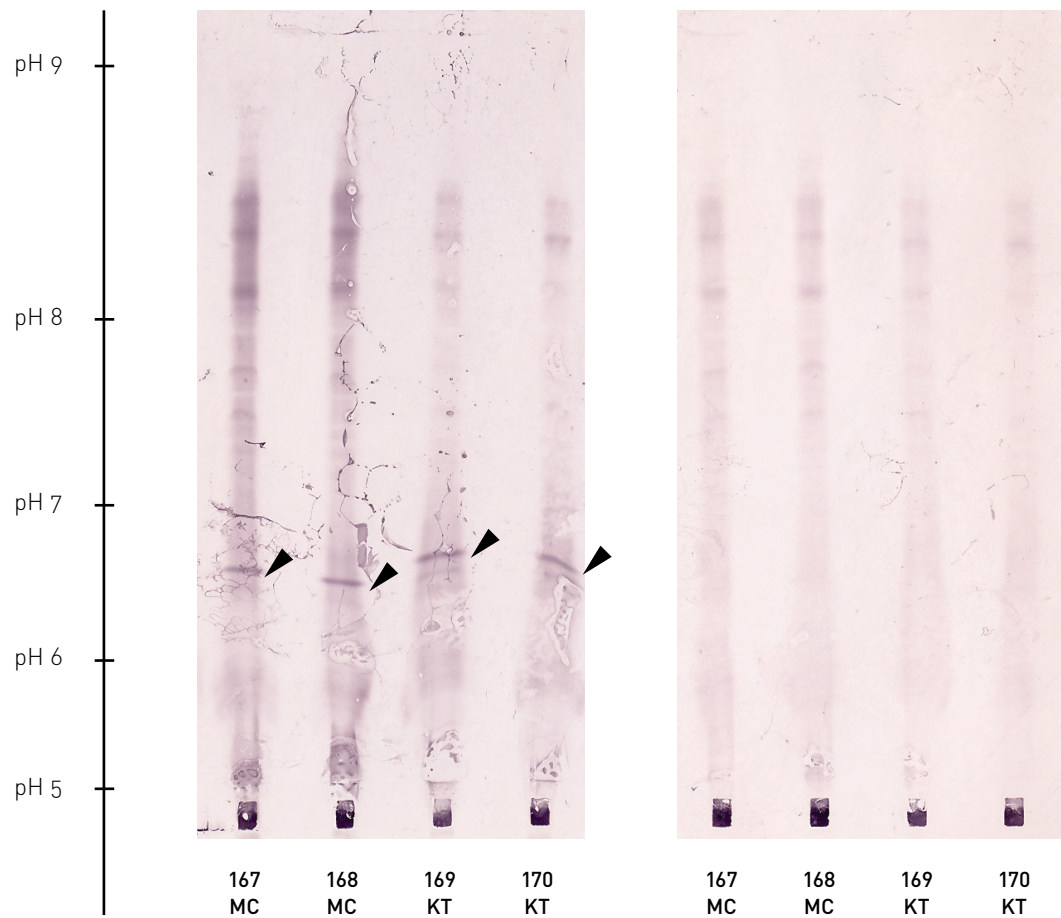


Abb. 4 Vergleich der Verwendung von biotinyliertem (links) bzw. fluoresceiniertem Antigen (rechts) zur Darstellung von Antikörpern gegen *Y. enterocolitica* O:9 in zwei identischen Läufen (jeweils links Pr. Nr. 167 und 168, Pat. 15, MC; rechts Pr. Nr. 169 und 170, Pat. 42, KT; Angaben zu den Patienten siehe Tabelle im Anhang II). Beachte die „Biotin-Bande“ links (Pfeile).

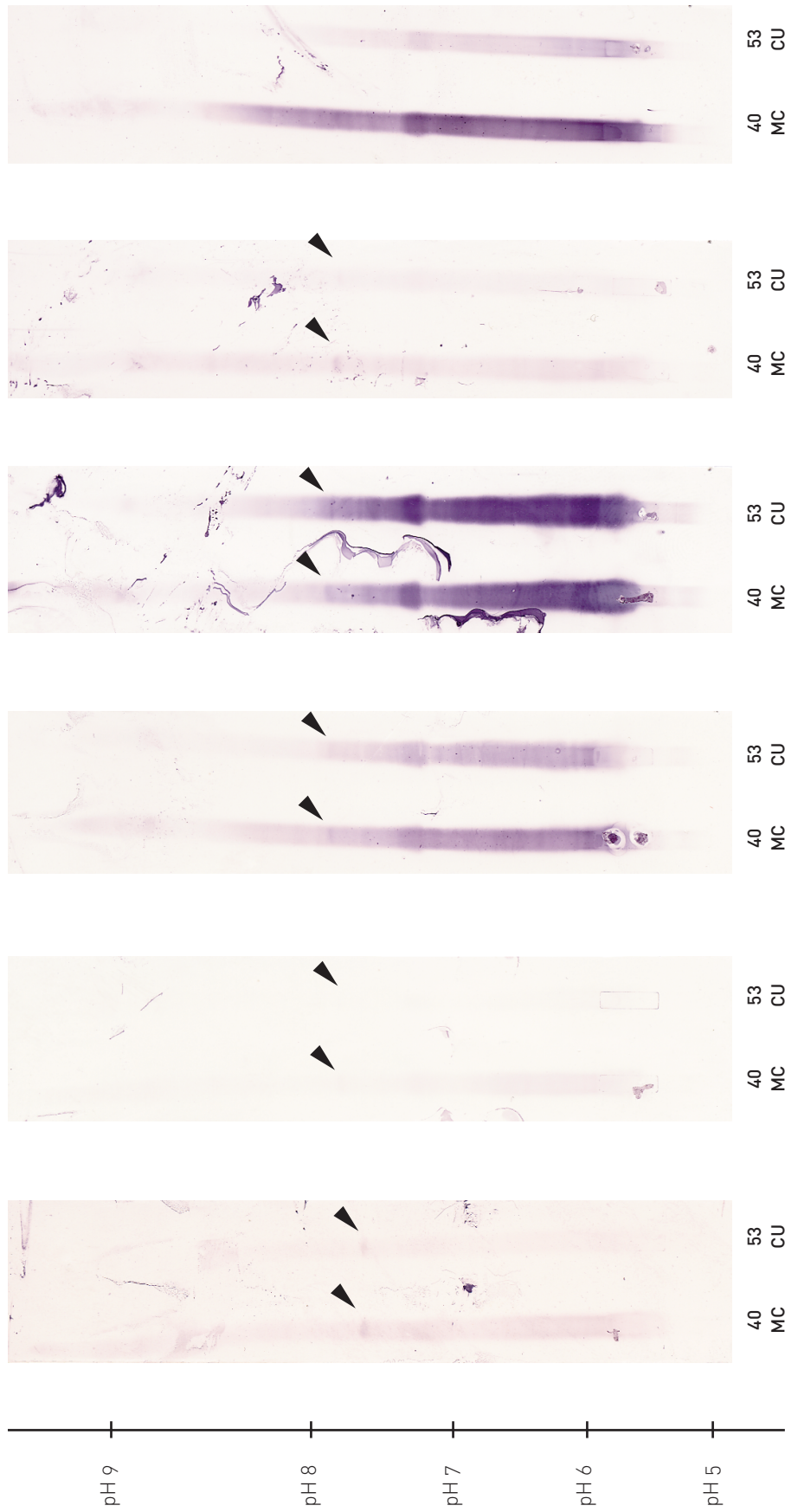


Abb. 5 Darstellung der Banden nach Inkubation mit Antigenen von *Y. enterocolitica* O:9 nach verschiedenen Blockierungen (von links nach rechts): ohne Blockierung, Blockierung mit unmarkierten Virulenz-Antigenen von *Y. enterocolitica* O:9, Blockierung mit Anti-IgA + Anti-IgG + Anti-IgM, Blockierung mit Anti-IgA, Blockierung mit Anti-IgG, Blockierung mit Anti-IgM (jeweils links Pr. Nr. 40, Pat. 26, MC; rechts Pr. Nr. 53, Pat. 66, CU; Angaben zu den Patienten siehe Tabelle im Anhang II). Die Pfeile markieren die Bande bei pH 7,7.

5.5.2. BLOCKIERUNG MIT ANTI-IMMUNGLOBULINEN UND UNMARKIERTEN YERSINIEN-ANTIGENEN

Abbildung 5 (vorhergehende Seite) zeigt das Ergebnis der Blockierungsversuche.

Bei Blockierung mit unmarkierten Yersinien-Antigenen erscheinen praktisch alle Banden sehr viel blasser, verschwinden aber nicht vollständig.

Die Ergebnisse nach Blockierung mit unmarkierten Immunglobulinen sind deutlich schwieriger zu beurteilen, da die Hintergrundfärbung (teilweise stark) zunimmt. Während nach Blockierung mit unmarkiertem IgA und IgG die Bande bei pH 7,7 noch vorhanden scheint, ist diese auf dem Streifen ganz rechts (nach Inkubation mit unmarkiertem IgM) nicht mehr zu identifizieren. Insbesondere bei Probe 40 ist es aber wegen der sehr dunklen Hintergrundfärbung nicht möglich zu entscheiden, ob die Bande verschwunden ist oder von der starken Grundfärbung überdeckt wird. Letztlich ist dieser Versuchsteil nicht sicher auszuwerten.

5.5.3. IMMUNGLOBULIN-DARSTELLUNG MIT MARKIERTEN ANTI-IMMUNGLOBULINEN

Die in den Proben enthaltenen Immunglobuline können (unabhängig von ihrer Spezifität) auch direkt nachgewiesen werden, indem (wie unter 4.9.1. erläutert) als Reaktionspartner biotinylierte Anti-Humanimmunglobuline angeboten werden, getrennt nach den wichtigsten Immunglobulin-Klassen. Nach der Färbung stellen sich dann deren pI-Bereiche dar.

Abbildung 6 (folgende Seite) zeigt das Ergebnis einer solchen Färbung.

Deutlich zeigen sich die sehr breiten pI-Bereiche, in denen sich die jeweiligen Immunglobulin-Klassen bewegen. Große Teile überlappen sich untereinander (so dass nach alleiniger pI-Zuordnung in der Regel kaum eine Bestimmung der Immunglobulinklasse möglich sein wird).

IgA verteilt sich relativ gleichmäßig über etwa die unteren drei Viertel der Strecke (etwa pH 5-8,5); im oberen Viertel ist eigentlich nur noch eine schwache Grundfärbung (ohne Banden) zu erkennen. Die eindeutig stärkste Anfärbung zeigt IgG, das außerdem im gesamten untersuchten pI-Bereich (etwa pH 5-9,5) zu finden ist. Die Farbintensität nimmt zum alkalischen pI-Bereich hin zu, doch auch im sauren (unteren) Teil findet sich eine deutliche Färbung. Am besten abgrenzbar ist IgM, dessen pIs ausschließlich in der unteren Hälfte (saurer Bereich) der Laufstrecke liegen (etwa pH 5-7).

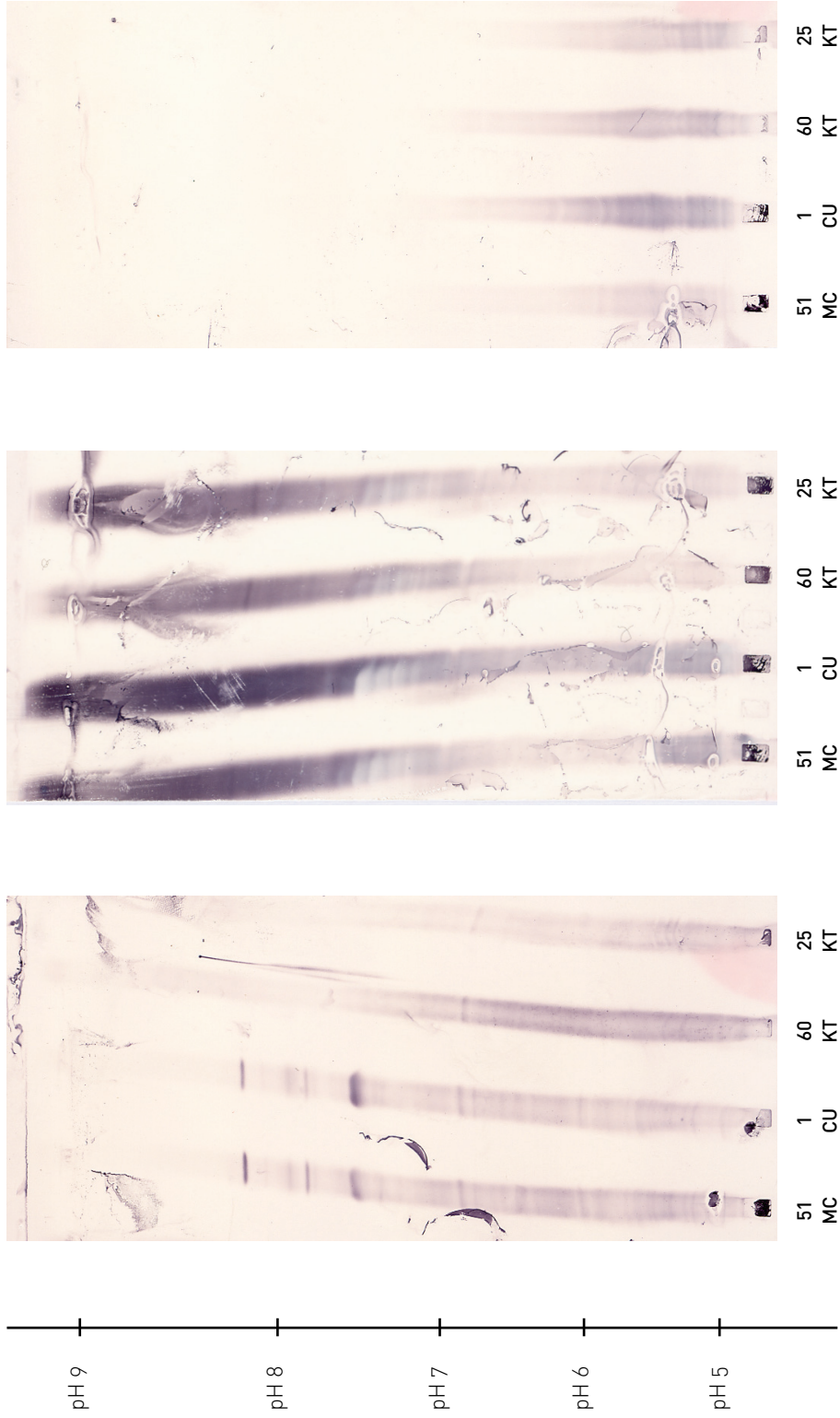


Abb. 6 Darstellung der Immunglobuline in Gewebehomogenat-Proben durch reverses Immunblotting mit biotinylierten Anti-Humanimmunglobulinen; links IgA, Mitte IgG, rechts IgM (jeweils von links nach rechts: Pr. Nr. 51, Pat. 1, MC; Pr. Nr. 60, Pat. 79, KT; Pr. Nr. 25, Pat. 52, KT; Angaben zu den Patienten siehe Tabelle im Anhang II)

6. DISKUSSION

6.1. VERGLEICH MIT ANDEREN UNTERSUCHUNGEN

Nach Isoelektrischer Fokussierung und nachfolgendem Immunblot mit Virulenz-Antigenen von *Y. enterocolitica* O:9 und O:3 zeigte sich in Darmgewebe von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen jeweils eine Bande signifikant häufiger:

- *Y. enterocolitica* O:9, Bande pH 7,7
(MC 78,3%, CU 63,4%, Kontrollen 45,0%; p=0,006)
- *Y. enterocolitica* O:3, Bande pH 6,5
(MC 30,48%, CU 34,1%, Kontrollen 18,3%; p=0,003)

Die Unterschiede zwischen MC und CU waren jeweils nicht signifikant.

Im Sinne der Fragestellung der Arbeit ist es also möglich, dass *Y. enterocolitica* eine Rolle bei der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielt, und zwar bei MC und CU in ähnlichem Ausmaß. Dieses ist die erste Untersuchung, die Antikörper gegen Virulenz-Antigene von *Y. enterocolitica* in Darmgewebe von Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung nachweist.

Unser Ergebnis steht in Widerspruch zu Studien, die mittels Bakterienkultur in Stuhlproben oder Darmbiopsaten keine Yersinien nachweisen konnten (Kallinowski et al. 1998). Der Grund könnte die erwiesenermaßen niedrige Sensitivität der Bakterienkultur für Yersinien sein. Eine hohe Übereinstimmung zeigt sich jedoch mit Ergebnissen der hoch sensitiven PCR (Kallinowski et al. 1998), mit der bei 63 bzw. 46% der untersuchten MC- bzw. CU-Patienten Yersinien-DNA in Darmresektaten nachgewiesen werden konnte (Kontrollen: 36%). Die Häufigkeit positiver Befunde für Yersinia liegt hier in der Größenordnung unserer Ergebnisse. Lamps et al. fanden in 31% der Darmresektate von MC-Patienten Yersinien-DNA, aber bei keinem Patienten der Kontrollgruppe (Lamps et al. 2003).

Auch die gesteigerte Reaktivität mononukleärer Zellen aus mesenterialen Lymphknoten auf *Y. enterocolitica* bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Ibbotson et al. 1992) steht im Einklang mit unserer Hypothese, dass *Y. enterocolitica* bei der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine Rolle spielt, und dass die Auseinan-

dersetzung zwischen Erreger und Wirtsorganismus vorrangig im darmassoziierten Lymphgewebe (GALT) stattfindet.

Serologische Untersuchungen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen, zumindest wenn sie sich der relativ wenig sensitiven Methode der Serumagglutination bedienen (Barry und Lobban 1977, Swarbrick et al. 1979, Bories et al. 1983, Casellas et al. 1984). Mittels ELISA und Immunfluoreszenz konnte bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Seropositivität für *Y. enterocolitica* O:9 und O:3 festgestellt werden (Ibbotson et al. 1987). Die einzige serologische Untersuchung, die einen Immunblot mit Yops verwendete, wurde an gesunden Blutspendern durchgeführt (Maki-Ikola et al. 1997). Hierbei waren 31% (Finnland) bzw. 43% der Probanden (Deutschland) *Yersinia*-positiv. Dieser Durchseuchungsgrad gesunder Personen entspricht der Größenordnung unserer Ergebnisse in der Kontrollgruppe (45,0% für *Y. enterocolitica* O:9, 18,3% für *Y. enterocolitica* O:3).

6.2. BEURTEILUNG DER METHODE

Die Methode der Isoelektrischen Fokussierung mit anschließendem Immunblot gegen Virulenz-Antigene hat sich in mehrfacher Hinsicht bewährt für den Nachweis von Antikörpern gegen *Y. enterocolitica* in Darmgewebe. Die außergewöhnlich hohe Auflösung der IEF (vor allem im Vergleich zu anderen elektrophoretischen Methoden) zeigt sich in feinen, gut differenzierbaren Banden. Schwierigkeiten bei der Beurteilung ergeben sich durch die Vielzahl der Banden, die die Vielfalt der Yersinien-Antigene widerspiegelt. Durch Zuordnung der Banden zu den jeweiligen pIs wird ihre Identifizierung und Vergleichbarkeit aber weitgehend möglich.

Die hohe Spezifität der nachgewiesenen Antikörper gegen Virulenz-Antigene von *Y. enterocolitica* schließt nach heutigem Kenntnisstand Kreuzreaktionen mit anderen Bakterien aus (Heesemann et al. 1987, Stolk-Engelaar und Hoogkamp-Korstanje 1995). Die hohe Sensitivität, durchaus vergleichbar mit dem PCR-Nachweis von Yersinien-DNA (Fredriksson-Ahomaa und Korkeala 2003), lässt realistische Ergebnisse vermuten, die sich aber (im Gegensatz zur PCR) nicht auf den Nachweis der Bakterien selbst beziehen, sondern die immunologische Auseinandersetzung des Wirtsorganismus mit dem Erreger sichtbar ma-

chen – die ja aller Wahrscheinlichkeit nach in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine bedeutende Rolle spielt (Mahida und Rolfe 2004, Yu et al. 2004). Insgesamt sind die Ergebnisse mit einer pathogenetischen Bedeutung von Yersinien für die Entstehung von CED vereinbar, auch wenn mit den verwendeten Methoden keine sicheren Rückschlüsse hierzu gezogen werden können.

6.3. ÜBERLEGUNGEN ZUR AUSSAGEKRAFT

Da von einem sehr unterschiedlichen Proteingehalt der Proben ausgegangen werden muss (der sich in der unterschiedlich starken Anfärbung der Proben zeigt), war lediglich eine qualitative Auswertung der Banden (Bande vorhanden: ja/nein) möglich und sinnvoll. Diese ist im Sinne der Fragestellung („In welcher Häufigkeit sind Antikörper gegen Virulenz-Antigene in der Darmschleimhaut nachweisbar?“; siehe Kap. 2) auch ausreichend.

Die bloße Darstellung von Banden nach Ablauf eines Versuches besagt allerdings noch wenig über deren Spezifität. Zwar ist der Versuchsaufbau angelegt auf den Nachweis spezifischer menschlicher Antikörper gegen Yersinien-Antigene. Der (ungewollte) Nachweis zum Beispiel anderer Proteine durch unspezifische Bindungen (und nachfolgende Anfärbung der gebundenen Marker) ist jedoch ebenfalls möglich. Hier birgt sich die Gefahr falsch positiver Resultate.

Durch den Einsatz zusätzlicher Versuchsteile (Blockierungen) und Ersatz einzelner Versuchsschritte durch alternative Methoden (Markierung) wurde versucht, diese weitestmöglich zu erkennen bzw. auszuschließen. Im Folgenden werden die Ergebnisse diskutiert.

6.3.1. VERGLEICH DER ERGEBNISSE BEI MARKIERUNG MIT BIOTIN BZW. FLUORESCEIN

Die starke Anfärbung der Banden bei Markierung mit Biotin ist (wie unter 4.3.1. ausführlich beschrieben) Folge der Bindung zahlreicher Biotinmoleküle an das nachzuweisende Protein, die die Bindung ebenso vieler Sekundärantikörper (Extravidin-AP) bedingt. Diese führen bei der nachfolgenden Immunfärbung zu einem kräftigen Färbeergebnis.

Nachteil der Methode, insbesondere bei Bearbeitung von Proben aus dem Gastrointestinaltrakt, ist das natürliche Vorkommen von Biotin (Vitamin H) im menschlichen Darm, da es

unter physiologischen Bedingungen von der Darmflora in großen Mengen synthetisiert wird. Dieses freie Biotin kann während der IEF im elektrischen Feld entsprechend seinem pI wandern, eventuell sogar unspezifische Bindungen eingehen, und ebenso wie das zur Markierung verwendete Biotin in der abschließenden Immunfärbung sichtbar gemacht werden.

Um diesen unspezifischen Effekt weitestmöglich auszuschließen, haben wir eine weitere, alternative Markierung (bei ansonsten gleicher Versuchsanordnung) verwendet: Fluorescein (siehe 4.3.2.) kommt unter physiologischen Bedingungen nicht im menschlichen Organismus vor und tritt deshalb nicht als Störfaktor auf. Die Bindung mit dem markierten Protein ist stabil, jedoch reagieren sehr viel weniger Fluorescein-Moleküle mit dem Protein als bei der Biotinylierung, so dass die Methode weniger empfindlich ist.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Markierung mit Fluorescein im Vergleich zur Biotinylierung zwar eine geringere Sensitivität, aber eine höhere Spezifität aufweist.

Um die jeweiligen Vorteile beider Methoden zu nutzen, wurden parallel durchgeführte Läufe (gleiche Proben) der beiden Markierungen verglichen. Unspezifische, also falsch positive Resultate sind dadurch praktisch ausgeschlossen.

Tatsächlich zeigen sich im Vergleich nach Markierung mit Biotin und Fluorescein fast identische Muster (siehe 5.4.1.). Nur ist das Ergebnis nach Fluorescein-Markierung eben insgesamt deutlich blasser, und eine besonders kräftige Doppelbande auf Höhe pH 6, die nach Biotin-Anfärbung besonders kräftig imponiert, fehlt nach Fluorescein-Markierung völlig. Wir gehen davon aus, dass es sich um eine unspezifische Anfärbung physiologisch im Darm vorkommenden Biotins handelt, das sich an seinem natürlichen pI anreichert, und haben sie bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Da alle anderen Banden bei beiden Nachweismethoden sichtbar sind, können diese als das Resultat einer spezifischen Ag-Ak-Reaktion angesehen werden.

6.3.2. BLOCKIERUNG MIT ANTI-IMMUNGLOBULINEN UND UNMARKIERTEN YERSINIEN-ANTIGENEN

Die Methode der Blockierung ist unter 4.9. beschrieben. Es wurden zwei verschiedene Blockierungen durchgeführt:

Bei der Blockierung mit unmarkierten Yersinien-Antigenen binden diese an die spezifischen Bindungsstellen, die bei der dann folgenden Inkubation mit markierten Virulenz-

Antigenen nicht mehr besetzt werden können. Tatsächlich stellen sich nach Blockierung mit unmarkierten Antigenen die Banden sehr viel blasser dar. Um alle Bindungsstellen komplett zu blockieren, also ein vollständiges Verschwinden der Banden zu erreichen, wären vermutlich sehr viel höher konzentrierte Blockierungslösungen notwendig.

Das unmarkierte Yersinien-Antigen blockiert spezifisch die Antigen-Bindungsstelle der Antikörper (Goldstandard der Spezifität). Die Tatsache, dass die Banden nach dieser hoch spezifischen Blockierung sehr viel blasser sichtbar sind als ohne Blockierung, spricht deshalb dafür, dass es sich bei ihnen um Yersinien-spezifische Antikörper handelt.

Die Blockierung mit unmarkierten Anti-Immunglobulinen verfolgte die Intention, die Banden einer Immunglobulin-Klasse zuzuordnen – und so gleichzeitig den Nachweis zu führen, dass es sich tatsächlich um Immunglobuline handelt. Die entsprechenden Banden verschwinden nach Blockierung mit unmarkiertem Anti-IgM praktisch vollständig, nicht jedoch nach Inkubation mit einer der anderen (Anti-)Immunglobulin-Klassen.

Eine Zuordnung der Banden zu einer bestimmten Immunglobulin-Klasse ist aufgrund der Ergebnisse (siehe Abb. 5, Kap. 5.5.2.) nicht ganz eindeutig möglich. Am ehesten handelt es sich aber um Antikörper der Klasse IgM.

Eventuell können trotz vorheriger Blockierung mit Anti-IgM noch zarte Restbanden sichtbar sein, da es sich bei der Blockierung um eine sterische Behinderung handelt, bei der die Bindungsstellen (das große IgM-Molekül hat 5 Bindungsstellen) nicht absolut blockiert werden, sondern die Bindung eben nur „behindert“ wird, sodass das Extravidin-AP noch an einzelne Bindungsstellen andocken kann.

Die Zunahme der Hintergrundfärbung in den Blots mit vorangegangener Blockierung beruht auf der größeren Menge freien *Y. enterocolitica*-Antigens, das sich an die nicht blockierten Bindungsstellen der anderen Antikörper anlagert (und in der nachfolgenden Immunfärbung sichtbar gemacht wird).

6.4. VERGLEICH DER ERGEBNISSE FÜR YERSINIA ENTEROCOLITICA O:9 UND O:3

Die Häufigkeit von Antikörpern gegen *Y. enterocolitica* O:9 und O:3 unterscheidet sich in unserer Studie deutlich voneinander. Da Yops Serotyp-unabhängig sind, kann es sich nicht bei allen Banden um Yop-spezifische Antikörper handeln.

Tatsächlich befinden sich in der verwendeten Antigen-Präparation nicht nur (plasmidkodierte) Yops, sondern auch das für den jeweiligen Serotyp spezifische O-Antigen und andere chromosomal kodierte Antigene. Während die meisten publizierten Untersuchungen mit Laborstämmen von *Yersinia* durchgeführt wurden, die ihre Virulenz-Eigenschaften verloren haben (da das Virulenz-Plasmid bei der Weiterkultivierung rasch verloren geht), wurden hier allerdings ausschließlich virulente (Yops bildende) Stämme von *Y. enterocolitica* O:9 und O:3 verwendet.

Da die Ergebnisse für *Y. enterocolitica* O:9 und O:3 sich deutlich unterscheiden, ist davon auszugehen, dass ein Teil der Antikörper spezifisch für das jeweilige O-Antigen der Yersinien sind. Die immunologische Abwehrreaktion in der Darmschleimhaut richtet sich also offensichtlich nicht nur gegen Yops, sondern auch in hohem Maße gegen das O-Antigen des Zellwand-LPS. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen überein, die dem O-Antigen eine wichtige Rolle in der immunologischen Auseinandersetzung mit dem Wirtsorganismus zuschreiben (Skurnik und Bengoechea 2003).

6.5. VERGLEICH DER ERGEBNISSE FÜR MORBUS CROHN UND COLITIS ULCEROSA

Die Ergebnisse der Untersuchungen für MC und CU (siehe 5.3., Tab. 7) weisen eine erstaunliche Homologie auf. Für die Bande pH 7,7 gegen YE O:9 liegen die Ergebnisse für beide Gruppen knapp außerhalb der Vertrauensgrenzen des Wertes der jeweils anderen Gruppe. Für die Bande pH 6,5 gegen YE O:3 liegen sie gar innerhalb der entsprechenden Vertrauensgrenzen (siehe 5.4., Tab. 2).

Sind MC und CU doch nur entgegengesetzte Pole der gleichen Krankheitsentität? Haben sie gemeinsame Ursachen? Wenn ja: Welche Faktoren entscheiden über die Entwicklung der Symptomatik in Richtung des einen oder des anderen Krankheitsbildes?

Eine letztendlich gültige Antwort auf diese Fragen kann auch diese Untersuchung nicht geben. Unter Berücksichtigung einiger der Aspekte, die im Rahmen der Untersuchung genannt wurden, können aber Modelle entwickelt werden, die vielleicht Ansätze für zukünftige Untersuchungen aufzeigen (siehe 6.10.).

Wahrscheinlich ist, dass eine Infektion mit pathogenen Yersinien bei der Entstehung beider Krankheitsbilder eine Rolle spielt. Die Immunantwort könnte durch genetische und Umge-

bungsfaktoren (mit)beeinflusst werden, wobei feine Unterschiede ausschlaggebend sein könnten für die Ausprägung entweder eines MC oder einer CU.

6.6. EINFLUSS ANDERER MERKMALE

Neben allgemeinen Patientenmerkmalen wie Alter wurden vor allem Faktoren untersucht, für die aufgrund der vorliegenden Literatur (siehe Kap. 1) ein Einfluss auf die untersuchte Zielvariable „Antikörperbande gegen Yersinien-Antigene“ zumindest nicht ausgeschlossen werden kann. Die statistische Auswertung diente dem Zweck (so weit wie möglich) zu differenzieren, ob die immunologische Auseinandersetzung mit *Y. enterocolitica* eine Rolle bei der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielt oder lediglich einen Marker eines sekundären Eindringens der Yersinien durch die entzündlich geschädigte Schleimhaut darstellt.

6.6.1. KRANKHEITSAKTIVITÄT UND ENTZÜNDUNGSGRAD

Unabhängig von einer primär bestehenden erhöhten Permeabilität der Darmmukosa wird deren Durchlässigkeit während eines akuten Entzündungsschubes, der ja mit oft heftigen Gewebeläsionen einhergeht, weiter drastisch gesteigert. Dies kann zu einer massiven Keiminvasion führen. Strittig ist deshalb, ob die immunologische Auseinandersetzung des Organismus mit Yersinien (und anderen Erregern) nicht vielleicht eher als Folge einer unspezifischen sekundären Superinfektion zu sehen ist (Macpherson et al. 1996).

In diesem Fall wäre zu vermuten, dass Biopsien aus stark entzündetem Gewebe oder von Patienten mit einem gegenwärtig hohen Aktivitätsindex mit einer größeren Wahrscheinlichkeit Antikörper gegen Yersinien aufweisen als solche aus gesunder Schleimhaut. Die Ergebnisse aus 5.4.1. und 5.4.2. zeigen, dass dies nicht so ist.

Dies spricht auch gegen eine Rolle der Yersinien bei der Auslösung akuter Krankheitschübe. In diesem Fall müssten bei Krankheitsexazerbationen – zumindest häufiger als im symptomarmen Intervall – Hinweise auf eine Auseinandersetzung mit Yersinien zu finden sein.

Eine sekundäre Auseinandersetzung der Darmschleimhaut mit Yersinien ist also sehr unwahrscheinlich. Möglich wäre aber, dass aufgrund einer primär vorhandenen erhöhten Schleimhautpermeabilität (siehe 1.1.2.3.) oral aufgenommene Yersinien die Schleimhautbarriere leichter überwinden, und dann in der Darmwand und im darmassoziierten Lymphgewebe eine immunologische Reaktion des Wirtsorganismus provozieren – besonders bei Individuen, bei denen eine genetisch determinierte Störung in der bakteriellen Abwehr vorliegt (siehe 1.1.2.1.). Da virulente Yersinien lange im menschlichen Organismus persistieren können (siehe 1.3.3.), ist die Auseinandersetzung des Immunsystems mit den Virulenzantigenen auch Jahre nach der Primärinfektion nachweisbar und nicht an akute Entzündungsschübe gebunden (Larsen et al. 1985, Ståhlberg et al. 1987¹, Toivanen et al. 1987, Ståhlberg et al. 1989).

6.6.2. AUSDEHNUNG UND ENTNAHMESTELLE

Die akute Ileitis ist ein eigenständiges Krankheitsbild, das heute den Yersiniosen zugeordnet wird. Die Ähnlichkeit der Symptome mit einem akuten Krankheitsschub bei Morbus Crohn ist einer der Beweggründe, eine Verbindung zwischen beiden Erkrankungen zu suchen (vgl. 1.4.). Yersinien haben also offensichtlich eine besondere Affinität zum Ileum. Es wäre somit durchaus denkbar, dort häufiger Yersinien bzw. gegen sie gerichtete Antikörper zu finden als in anderen Abschnitten des Darms. In diesem Fall müssten möglicherweise neue Überlegungen zur Verbindung zwischen akuter Ileitis und Morbus Crohn angestellt werden.

Es hat sich allerdings gezeigt, dass die Entnahmestelle unserer Proben keinen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit hatte, in ihnen auf Yersinien zu stoßen. Geht man also von einer etiologischen oder pathogenetischen Bedeutung von Yersinien bei der Entstehung und/oder Unterhaltung von CED aus, handelt es sich vermutlich nicht um eine chronische Form der akuten Ileitis, sondern trotzdem um ein eigenständiges Krankheitsbild. Dies stimmt mit den meisten Verlaufsbeobachtungen nach akuter terminaler Ileitis überein (Sjöström 1971, Persson et al. 1976, Jess und Jess 2001).

Auch die Gesamtzahl der entzündeten Darmsegmente beeinflusst nicht die Wahrscheinlichkeit, Antikörper gegen Yersinien-Antigene in der Darmschleimhaut zu finden. Dieses Ergebnis spricht – ebenso wie die Unabhängigkeit von der aktuellen Krankheitsaktivität; siehe 6.3.1. – gegen eine bloße Superinfektion. Bei einem sekundären Eindringen der Bak-

terien durch die entzündungsbedingt geschädigte Schleimhaut könnte man zumindest vermuten, dass mit der Zahl der betroffenen Darmabschnitte auch die Gesamtoberfläche der zerstörten Schleimhaut steigt. Die natürliche Schleimhautbarriere ist somit in einem größeren Teil lückenhaft oder gar funktionslos geworden und bietet eindringenden Erregern weniger Widerstand. Denkbar wäre in diesem Fall also, dass Yersinien bzw. gegen sie gerichtete Antikörper desto häufiger nachzuweisen sind, je mehr Darmanteile von der Entzündung betroffen sind.

6.6.3. ALTER

Da (nach serologischen Untersuchungen) asymptomatische Infektionen mit Yersinien durchaus vorkommen (Maki-Ikola et al. 1997), wäre ein häufigerer Nachweis von Antikörpern gegen Yersinien mit zunehmendem Lebensalter (im Sinne einer kumulativen Häufigkeit von Personen, die in der Vergangenheit eine Yersinien-Infektion durchgemacht haben) denkbar. Wegen der unterschiedlichen Altersverteilung in den untersuchten Gruppen (vgl. Kap. 3. und 5.7.) könnte sich hier durchaus ein systematischer Fehler einschleichen. Nach den vorliegenden Daten hat jedoch das Alter kaum einen entscheidenden Einfluss auf die Häufigkeit, mit der Antikörper gegen Yersinien nachgewiesen werden können. (Der signifikante Unterschied zwischen „jungen“ und „alten“ in der Gruppe der Colitis-ulcerosa-Patienten, Bande pH 6,5 gegen *Y. enterocolitica* 0:9, ist bei der Menge der anderen Felder mit unauffälliger Verteilung der Ergebnisse auf beide Altersgruppen wohl als statistischer Ausrutscher anzusehen).

Dass das Lebensalter die Ergebnisse nicht beeinflusst, spricht auch dafür, dass subklinische chronische Infektionen mengenmäßig eine eher geringe Rolle spielen.

Einen interessanten Ansatz zu weiteren Überlegungen bietet das Vorkommen symptomloser (oder zumindest symptomarmer, jedenfalls nicht erinnerlicher) Infektionen an sich (siehe hierzu auch 6.8.).

6.7. IMMUNGLOBULINE

Untersucht wurde das Vorkommen von Immunglobulinen der Gruppen A, G und M. Wie in Abb. 6 (Kapitel 5.4.3.) ersichtlich, sind – ohne Berücksichtigung der Spezifität – alle drei Immunglobulin-Klassen in den Proben nachweisbar.

Quantitative Untersuchungen Immunglobulin produzierender Zellen in der Darmschleimhaut von CED-Patienten haben gezeigt, dass alle Immunglobulin-Klassen vermehrt vorhanden sind – am stärksten IgG – (Rosekrans et al. 1980, van Spreeuwel et al. 1982, Keren et al. 1984, Danis et al. 1984, MacDermott et al. 1985). Dies spricht dafür, dass bei der Entstehung von CED lokale Immunmechanismen eine große Rolle spielen.

Die Ergebnisse der Blockierung mit unmarkierten Immunglobulinen (vor Zugabe der markierten Immunglobuline) lassen wegen der starken Hintergrundfärbung nach Blockierung keine eindeutige Zuordnung der Banden zu einer bestimmten Immunglobulin-Klasse zu. Unter pathogenetischen Gesichtspunkten wären sowohl IgG als auch IgA und IgM vorstellbar. IgA wird vor allem im lymphatischen Gewebe des Verdauungstraktes gebildet und spielt als immunologische Schleimhaut-Barriere eine wichtige Rolle beim Erstkontakt mit intestinalen Erregern, u.a. bewirkt es eine Agglutination von Bakterien und Viren. IgM ist vor allem wirksam zur Abwehr größerer partikulärer Antigene wie Bakterien, fixiert Komplement und aktiviert so einen wichtigen Teil der Entzündungsvorgänge. Es wird zu einem hohen Prozentsatz bei der immunologischen Primärantwort gebildet.

Der Nachweis von IgA und/oder IgM würde gegen die Hit-and-run-Hypothese sprechen, die von Stallmach und Carstens vorgeschlagen wurde (Stallmach und Carstens 2002). IgA- oder IgM-Antikörper gegen Yersinien wären Hinweise auf eine persistierende Besiedlung der Darmschleimhaut und/oder des darmassoziierten Lymphgewebes (GALT) mit Yersinien und deren dauerhaftes Eingreifen in das lokale Immungeschehen.

IgG, zu dessen Aufgaben ebenfalls Agglutination und Komplementbindung gehören, ist als Antikörper besonders der sekundären Immunantwort wichtig bei der immunologischen Abwehr bakterieller Infektionen. Als Langzeit-Marker einer immunologischen Auseinandersetzung mit mikrobiellen Erregern würde IgG gut zu einer chronischen Infektion mit Yersinien passen.

Um welche Immunglobulin-Gruppe es sich bei den gefundenen Antikörpern handelt, und ob möglicherweise mehrere Immunglobulin-Klassen vorhanden sind, konnte mit der verwendeten Methode nicht geklärt werden. Ansätze für weitere Untersuchungen in dieser Richtung werden in Kapitel 6.11. vorgeschlagen.

6.8. ASYMPTOMATISCHE INFEKTIONEN

Die Häufigkeit von Antikörpern gegen Antigene virulenter Yersinien in der Kontrollgruppe entspricht in etwa der Häufigkeit asymptomatischer Infektionen in einer finnisch-deutschen Reihenuntersuchung gesunder Blutspender, die als Durchseuchungsgrad der Bevölkerung angenommen werden kann (Maki-Ikola et al. 1997). Warum lösen Yersinien bei einigen Menschen klinische Bilder heftiger akuter oder chronischer Infektionen oder gar ein Autoimmungeschehen aus, während andere eine Infektion offenbar unbemerkt überstehen?

Die Differenzierung in pathogene (plasmidtragende) und apathogene (plasmidlose) Yersinien-Stämme vermag diese Frage nicht zu beantworten, da sowohl in der Erhebung von Maki-Ikola als auch in unserer Studie plasmidkodierte Yersinien-Produkte zum immunologischen Infektionsnachweis verwendet wurden, die einen ungewollten Nachweis apathogener Stämme ausschließt. Vorstellbar ist hingegen, dass individuelle Besonderheiten des Wirtsorganismus den Verlauf der Infektion (mit)bestimmen; etwa eine individuell unterschiedliche Reaktion des Immunsystems, wie Wenzel et al. sie schon für autoimmune Schilddrüsenerkrankungen vermutet haben (Wenzel et al. 1990).

6.9. ALLGEMEINE ÜBERLEGUNGEN ZU DEN ERREGEREIGENSCHAFTEN

Die Forderungen der Henle-Koch-Postulate zur Ermittlung eines Erregers als Krankheitsursache sind auch mit der für die vorliegende Fragestellung neu angewandten Methode der Isoelektrischen Fokussierung nicht erfüllt, da

1. der Erreger (bzw. hier: Antikörper gegen den Erreger) sich nicht bei allen Erkrankten nachweisen lässt,
2. auch ein nicht unerheblicher Teil der Patienten aus der Kontrollgruppe Antikörper gegen den Erreger aufweist,
3. durch Infektion Gesunder mit Yersinien sich ein zwar ähnliches, nicht aber identisches Krankheitsbild erzeugen lässt.

Die Henle-Koch-Postulate beweisen auch heute noch, falls sie erfüllt sind, dass ein Erreger als Verursacher einer Krankheit anzusehen ist. Sind sie nicht erfüllt, so schließt diese Tatsache einen gefundenen Erreger für die Etiologie jedoch nicht aus. Heute sind eine Reihe

von Infektionskrankheiten bekannt, die die Forderungen von Henle und Koch nicht erfüllen (insbesondere praktisch alle Viruserkrankungen, aber auch einige bakterielle Erreger, wie zum Beispiel *Campylobacter pylori* als Verursacher der Gastritis).

Möglicherweise handelt es sich also um einen Erreger mit unterschiedlicher Virulenz. Berücksichtigt werden muss außerdem die Interaktion mit dem potenziellen Wirtsorganismus, insbesondere dessen Immunabwehr: Möglicherweise sind manche Individuen empfänglicher für eine Infektion, oder nicht jede Infektion wird klinisch manifest. Unter Umständen kann eine Infektion auch zu unterschiedliche Krankheitsbildern führen. Verschiedene Einflussfaktoren sind denkbar, etwa eine kongenitale oder erworbene Prädisposition für bestimmte Krankheitsbilder, durchgemachte oder bestehende Infektionen oder der allgemeine Immunstatus.

Dass Yersinien sehr unterschiedlich virulent sind, ist ausreichend belegt. Die Tatsache, dass nicht wenige Studienteilnehmer ohne Symptome einer Yersinien-Infektion Antikörper gegen Virulenz-Antigene von *Y. enterocolitica* aufwiesen, lässt sich aber nicht durch die unterschiedliche Virulenz der Erreger erklären, da gerade die Immunantwort auf die Virulenz-Antigene von der Auseinandersetzung mit einem virulenten Yersinien-Stamm zeugt. Möglich wäre zwar, dass die eingedrungenen Yersinien nur über einen Teil der notwendigen Virulenzfaktoren verfügten (da die Antikörper gegen ein Gemisch verschiedener Yersinien-Antigene getestet wurden, darunter Yops und andere Virulenz-Antigene, wäre der Test auch in diesem Fall positiv). Allerdings persistieren nur virulente Yersinien über einen längeren Zeitraum im Wirtsorganismus, sodass diese Erklärung nicht sehr wahrscheinlich ist.

Dass Antikörper gegen Yersinien sich nicht bei allen CED-Patienten nachweisen lassen, kann bedeuten, dass die Methode nicht empfindlich genug ist, um alle Infektionen zu erfassen. Diese Möglichkeit kann nicht ausgeschlossen werden, ist aber wenig wahrscheinlich; wenngleich keine Vergleichsdaten vorliegen, so ist doch davon auszugehen, dass es sich bei der IEF um ein hoch sensitives Verfahren handelt.

Es kann auch bedeuten, dass eine Infektion mit Yersinien zwar ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der CED sein kann, aber nicht muss. Gut denkbar wäre zum Beispiel, dass andere Erkrankungen nach demselben Schema ablaufen, aber von einem anderen Erreger getriggert werden. Dazu passen würden die erhöhten Antikörpertiter im Serum von CED-Patienten gegen verschiedene bakterielle Erreger (Blaser et al. 1984, Howells et al. 1984, Ibbotson et al. 1987).

Die Möglichkeit einer Beteiligung von *Y. enterocolitica* am Krankheitsgeschehen bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa wird also durch die Ergebnisse dieser Untersuchung untermauert (allerdings nicht bewiesen).

6.10. PATHOGENESE CHRONISCH ENTZÜNDLICHER DARMERKRANKUNGEN: EIN MODELL

Aus dem bisher Dargelegten ergibt sich ein Modell für die Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, das im Folgenden erläutert wird:

Der Einfluss genetischer Faktoren auf die Entstehung der CED ist unumstritten. Bei den heute bekannten Erbfaktoren, die mit einer erhöhten Disposition für MC und CU einhergehen, handelt es sich um Mutationen auf den Genloci CARD15/NOD2 (Ogura et al. 2001) und TLR4-Asp299Gly (Franchimont et al. 2004). Beide Genvarianten führen zu einer gestörten Erkennung der Lipopolysaccharide in der Zellwand gramnegativer Bakterien (Franchimont et al. 2004, Kobayashi et al. 2005). Dadurch fehlt eine wichtige Voraussetzung für die Aktivierung von Makrophagen. Makrophagen sind vor allem in der Anfangsphase der Immunantwort von zentraler Bedeutung für die zellvermittelte Immunität – die bei CED nachhaltig gestört ist.

Diese Störungen führen also zu einer beeinträchtigten Bakterienabwehr auf mukosaler Ebene, einerseits wegen der unterdrückten zellulären Abwehrmechanismen, andererseits durch eine gestörte Expression der Alpha-Defensine HD-5 und HD-6, die wichtig sind für die mukosale Bakterienbarriere (Wehkamp et al. 2004). Für CARD15/NOD2-defiziente Versuchstiere wurde eine erhöhte Anfälligkeit für orale bakterielle Infektionen *in vivo* nachgewiesen (Kobayashi et al. 2005), für TLR4-defiziente sogar eine besondere Disposition für Infektionen mit gramnegativen Bakterien (Franchimont et al. 2004, Fukata 2004). Experten gehen davon aus, dass noch weitere Gene eine Rolle für die Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen spielen (Hugot 2004, Mathew und Lewis 2004). Vielleicht finden sich darunter Gene, die eine erhöhte Schleimhautpermeabilität des Darms für Bakterien bedingen, wie sie bei CED-Patienten gefunden wurde (Ambrose et al. 1984, Kreuzpaintner et al. 1989). Diese erhöhte Durchlässigkeit, die offenbar auf einem gesteigerten transzellulären Transport der Bakterien durch die Schleimhautbarriere beruht

(Schurmann et al. 1999), bedingt ebenfalls eine erhöhte Anfälligkeit für eine orale Infektion mit bakteriellen Erregern.

Die gramnegativen (!) Yersinien finden also bei genetisch vorbelasteten Individuen geradezu ideale Voraussetzungen, um ins Darmgewebe und GALT einzudringen. Die Keime werden vermutlich vor allem durch den Verzehr von (Schweine- und Hühner-)Fleisch oral aufgenommen (Kapperud et al. 1995, Harb et al. 2000). Gerade die Serotypen O:3 und O:9 finden sich in Mitteleuropa in einem hohen Prozentsatz roher Fleischproben (Offermann et al. 1999, Fredriksson-Ahomaa et al. 2001, Gurtler et al. 2005).

Yersinien können sich unter den Bedingungen der modernen Massentierhaltung besonders rasch ausbreiten, an die niedrigen Temperaturen der Kühlkette sind sie adaptiert (Velazquez et al. 2005). Die Durchseuchung hat in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts zugenommen und befindet sich etwa seit den 80er-Jahren auf einem hohen Plateau (Verhaegen et al. 1998) – etwa parallel zur Zunahme und zum Plateau der CED-Inzidenz (Dirks 1991). Treffen virulente Yersinien auf einen (genetisch bedingt) besonders empfänglichen Wirtsorganismus, beginnt eine Auseinandersetzung des Immunsystems mit den Virulenzfaktoren der Yersinien; vor allem Yops und (chromosomal kodiertem) LPS. Bevorzugtes Ziel der Yops sind die Makrophagen des Wirts-Immunsystems (Boyd et al. 2000), die mangels Aktivierung (siehe oben) dem Angriff schutzlos ausgeliefert sind. Die genetisch bedingt bereits eingeschränkte zellvermittelte Immunität wird vor allem durch YopP noch weiter unterdrückt (Erfurth et al. 2004, Trulzsch et al. 2005).

Intrazellulär wirken YopO und YopT zytotoxisch (Iriarte und Cornelis 1998, Nejedlik et al. 2004), YopP und YopJ induzieren die Apoptose (Erfurth et al. 2004, Zhang und Bliska 2005). YopE, YopH, YopO und YopT ermöglichen gleichzeitig ein extrazelluläres Überleben der Yersinien, indem sie gemeinschaftlich Angriffe von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen unterdrücken (Ruckdeschel et al. 1996, Grosdent et al. 2002).

Da die zellvermittelte Immunabwehr weitgehend unterdrückt ist, wird vor allem die humorale Immunantwort aktiviert: Zytokine, wie Interleukin 1 β , TNF α und Interferon γ , können den eingedrungenen Yersinien im Anfangsstadium der Infektion tatsächlich massiv zusetzen (Huppertz und Heesemann 1999). Kommt die Antwort aber aufgrund der gestörten Bakterienerkennung zu spät, und wird sie nicht von der zellvermittelten Abwehr unterstützt, schafft sie es nicht, den Angriff erfolgreich abzuwehren – wohl aber, ein aggressives humorales Entzündungsgeschehen zu unterhalten, das über Jahre andauern kann.

Rein hypothetisch liegt hier der entscheidende Unterschied zwischen asymptomatischen Infektionen und jenen, die den Grundstein für eine lebenslang überschießende humorale

Immunantwort legen: Individuen, deren Bakterienerkennung und zellvermittelte Immunantwort intakt sind, bekommen die Infektion schon im Anfangsstadium in den Griff – bevor die Virulenzproteine der pathogenen Yersinien wirksame Aktivitäten des Abwehrsystems gestört und unterdrückt haben.

Da Patienten mit MC und CU in unserer Studie nahezu gleich häufig Antikörper gegen Yersinien aufwiesen, sind Yersinien möglicherweise an der Pathogenese beider Krankheitsbilder beteiligt. MC und CU könnten demnach unterschiedliche Ausprägungen eines zumindest teilweise gleichen pathogenetischen Prozesses sein. Die verschiedenen klinischen Bilder sind möglicherweise anderen pathogenetischen Faktoren geschuldet, etwa genetisch determinierten Unterschieden in der Immunregulation: Vielleicht sind es feine Unterschiede in dieser (fehlgesteuerten) Immunantwort, die ausschlaggebend sind für die Ausprägung entweder eines MC oder einer CU (oder einer Indeterminate Colitis).

Yersinien erfüllen geradezu ideale Voraussetzungen als (Mit-)Verursacher chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Trotzdem sind nicht bei allen Patienten Antikörper gegen virulente Yersinien nachweisbar. Das mag an der gewählten Methode liegen, oder am Zeitpunkt der Probenentnahme, aber auch daran, dass Yersinien nicht in allen Fällen an der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beteiligt sind. Das beschriebene Modell für die Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen lässt sich möglicherweise auch auf andere bakterielle Erreger übertragen.

6.11. ANSÄTZE FÜR WEITERE UNTERSUCHUNGEN

Letztlich können mit den 1992/1993 zur Verfügung stehenden Methoden keine sicheren Rückschlüsse auf die Bedeutung von Yersinien bei der Genese von CED gezogen werden. Die verwendeten Methoden und ihre Ergebnisse liefern jedoch Ansätze, die oben vorgestellte Hypothese zur Pathogenese von MC und CU weiter zu überprüfen.

Wegen der deutlichen Überlegenheit der Antikörperdiagnostik unter Verwendung von Virulenz-Antigenen von *Yersinia* wären serologische Studien mit Immunblot gegen Yops bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen äußerst aufschlussreich.

Interessant ist ferner die Frage, ob Patienten mit einer CARD15/NOD2- oder einer TLR4-Asp299Gly-Mutation anfälliger für Yersinien-Infektionen sind – oder umgekehrt: wie häufig jene CED-Patienten, bei denen sich Hinweise auf eine Yersinien-Infektion finden, eine

genetische Prädisposition für MC oder CU (und eine gestörte Abwehr bakterieller Infektionen) aufweisen. Entsprechende Erhebungen könnten dazu beitragen, die unter 6.10. entwickelte Hypothese zur Pathogenese der CED zu überprüfen.

Da nicht bei allen CED-Patienten Antikörper gegen Yersinien nachweisbar waren, könnte auch die Suche nach Antikörpern gegen andere bakterielle Erreger in der Darmschleimhaut erhellend sein. In die Suche einbezogen werden sollten auf jeden Fall jene Bakterien, die schon länger im Verdacht stehen, an der Pathogenese von MC und CU beteiligt zu sein, wie Mykobakterien und (gramnegative) Enterobakterien (zum Beispiel *Escherichia coli*). Eine neue Heidelberger Studie fand mittels PCR im Darmgewebe von Crohn-Patienten in etwa der Hälfte der Fälle DNA von *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (Autschbach et al. 2005). Auch hier wäre der Nachweis spezifischer Antikörper (als Indikatoren einer immunologischen Auseinandersetzung mit dem Erreger) interessant.

Zur Frage, welcher Immunglobulin-Klasse die Antikörper gegen Yops zuzuordnen sind, wäre eine gegenüber dem hier verwendeten Untersuchungsgang umgekehrte Versuchsanordnung möglicherweise Erfolg versprechend: Trennt man zuerst die im Schleimhaut-Homogenat vorhandenen Immunglobuline in die verschiedenen Ig-Klassen auf und lässt diese dann mit den Yersinien-Antigenen (Yops) reagieren, wird das Problem der Hintergrundfärbung, das die Interpretation des Blockierungsversuches praktisch unmöglich machte, umgangen. Die Auftrennung der Immunglobuline könnte zum Beispiel mittels Immuno-Beads erfolgen. Bei Immuno-Beads handelt es sich um magnetische Partikel, die mit spezifischen Antikörpern gekoppelt sind; nach Separation des Immunkomplexes ist es möglich diesen zu dissoziieren und die Ak-Spezifität zum Beispiel über Immunpräzipitation zu bestimmen. Hierfür wären allerdings weitaus größere Materialmengen nötig als sie mit den hier verwendeten Biopsien zur Verfügung standen, sodass entsprechende Versuche zum Beispiel mit OP-Resektaten durchgeführt werden müssten.

Die Methode der IEF, in dieser Anwendung für die Yersinien-Diagnostik erfolgreich erprobt, könnte dabei auch in zukünftigen Studien nützlich sein.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Arbeit war es, Aufschluss über die potenzielle Rolle einer Infektion mit *Yersinia enterocolitica* bei der Pathogenese von Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) zu gewinnen. Mittels Isoelektrischer Fokussierung (IEF) und nachfolgendem Immunblot mit Virulenz-Antigenen von *Y. enterocolitica* wurden endoskopisch entnommene Zangenbiopsien von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (n=46) und Kontrollpatienten (n=37) auf Antikörper gegen Virulenzproteine pathogener Yersinien der Stämme O:3 und O:9 untersucht. Blockierungen mit unmarkierten Antikörpern gegen Yersinien-Antigen und mit Anti-Immunglobulinen wurden durchgeführt zum Nachweis der Spezifität der Banden und Zuordnung zu einer Immunglobulin-Klasse.

Nach IEF und Immunblot mit Virulenz-Antigenen von *Y. enterocolitica* O:9 zeigte sich eine Bande bei pH 7,7 signifikant häufiger bei MC (78,3%) und CU (63,4%) als bei Kontrollen (45,0%) ($p=0,006$). Für *Y. enterocolitica* O:3 war das Ergebnis für eine Bande bei pH 6,5 (MC 30,4%, CU 34,1%, Kontrollen 18,3%) ebenfalls signifikant ($p=0,003$). Nach den Ergebnissen von Blockierungsversuchen entsprechen die Banden am ehesten der Immunglobulinklasse M. Krankheitsaktivität, Entzündungsgrad, Entnahmestelle und Alter der Patienten hatten keinen Einfluss auf das Ergebnis.

Die Ergebnisse für MC und CU entsprechen jenen von Untersuchungen, die mittels PCR in vergleichbarer Häufigkeit Yersinien-DNA in Darmresektaten von Patienten nachgewiesen haben. Serologische Reihenuntersuchungen bei Blutspendern fanden ähnlich häufig Antikörper gegen virulente Yersinien wie in unserer Kontrollgruppe.

Auf der Basis der bekannten Tatsachen wird ein Modell zur Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen entwickelt: Genetische Faktoren, wie die bekannten Mutationen auf den Genen CARD15/NOD2 und TLR4, führen zu einer gestörten Erkennung und Abwehr oral aufgenommener Bakterien auf Ebene der Darmschleimhaut und einer gestörten Schleimhautbarriere. Durch Verzehr infizierten Fleisches aufgenommene Yersinien überwinden bei diesen Individuen leicht die Schleimhautbarriere und persistieren über Jahre in der Darmschleimhaut und im darmassoziierten Lymphgewebe (GALT), wo ihre Virulenz-Antigene (vor allem Yops) die zelluläre Immunabwehr weiter stören. Eine überschießende humorale Immunantwort führt zu den für chronisch entzündliche Darmerkrankungen typischen ausgedehnten Schädigungen der Darmschleimhaut.

8. LITERATUR

1. Adenis A, Colombel JF, Lecouffe P, Wallaert B, Hecquet B, Marchandise X, Cortot A: Increased pulmonary and intestinal permeability in Crohn's disease. *Gut* 1992; 33: 678-682
2. Aepfelbacher M, Trasak C, Wilharm G, Wiedemann A, Trulzsch K, Krauss K, Gierschik P, Heesemann J: Characterization of YopT effects on Rho GTPases in *Yersinia enterocolitica*-infected cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 33217-33223
3. Ahlberg J, Bergstrand O, Gillström P, Holmström B, Kronevi T, Reiland S: Negative findings in search for a transmissible agent in Crohn's disease. *Acta Chir Scand* 1978; suppl 482: 45-47
4. Aisenberg J, Janowitz HD: Cluster of inflammatory bowel disease in three close college friends? *J Clin Gastroenterol* 1993; 17: 18-20
5. Ambrose NS, Johnson M, Burdon DW, Keighley MRB: Incidence of pathogenic bacteria from mesenteric lymph nodes and ileal serosa during Crohn's disease surgery. *Br J Surg* 1984; 71: 623-625
6. Appleyard CB, Hernandez G, Rios-Bedoya CF: Basic epidemiology of inflammatory bowel disease in Puerto Rico. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 106-111
7. Autschbach F, Eisold S, Hinz U, Zinser S, Linnebacher M, Giese T, Löffler T, Buchler MW, Schmidt J: High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis IS900 DNA in gut tissue from individuals with Crohn's disease. *Gut* 2005; 54: 944-949
8. Barry RE, Lobban DI: *Yersinia enterocolitica* and Crohn's disease. *Br Med J* 1977; 2: 387
9. Batty GM, Wilkins WE, Morris JS: Ulcerative colitis in a husband and wife. *Gut* 1994; 35: 562-563
10. Bech K, Larsen JH, Hansen JM, Nerup J: *Yersinia enterocolitica* infection and thyroid disorders. *Lancet* 1974 Oct 19; 2(7886): 951-952
11. Bech K: *Yersinia enterocolitica* and thyroid autoimmunity. *Autoimmunity* 1990; 7: 291-294
12. Bengoechea JA, Brandenburg K, Arraiza MD, Seydel U, Skurnik M, Moriyon I: Pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains increase the outer membrane permeability in response to environmental stimuli by modulating lipopolysaccharide fluidity and lipid A structure. *Infect Immun* 2003, 71: 2014-2021
13. Bennett RA et al.: Frequency of inflammatory bowel disease in offspring of couples both presenting with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1991; 100: 1638-1643
14. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F: Development of a Crohn's disease activity index. *Gastroenterol* 1976; 70: 439-444
15. Best WR, Beckett JM, Singleton JW: Rederived values of the eight coefficients of the Crohn's Disease Activity Index (CDAI). *Gastroenterol* 1979; 77: 843-846
16. Biedzka-Sarek M, Venho R, Skurnik M: Role of YadA, Ail, and lipopolysaccharide in serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect Immun* 2005; 73: 2232-2244
17. Binder V: Epidemiology of BD during the twentieth century: an integrated view. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 463-479
18. Birrenbach T, Bocker U: Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 848-859

19. Bjarnason I, O'Morain C, Levi AJ, Peters TJ: Absorption of ⁵¹chromium-labeled ethylenediaminetetraacetate in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1983; 85: 318-322
20. Blaser MJ, Miller RA, Lacher J, Singleton JW: Patients with active Crohn's disease have elevated serum antibodies to antigens of seven enteric bacterial pathogens. *Gastroenterol* 1984; 87: 888-894
21. Bockemühl J, Roggentin P: Enterale Yersiniosen. Klinische Bedeutung, Epidemiologie, Diagnostik und Prävention. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2004; 47: 685-691
22. Bohn E, Muller S, Lauber J, Geffers R, Speer N, Spieth C, Krejci J, Manncke B, Buer J, Zell A, Autenrieth IB: Gene expression patterns of epithelial cells modulated by pathogenicity factors of *Yersinia enterocolitica*. *Cell Microbiol* 2004; 6: 129-141
23. Boland A, Cornelis GR: Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. *Infect Immun* 1998; 66: 1878-1884
24. Böllin I, Portnoy DA, Wolf-Watz H: Expression of the temperature-inducible outer membrane proteins of *Yersinia*. *Infect Immun* 1985; 48: 234-240
25. Bonardi S, Brindani F, Pizzin G, Lucidi L, D'Incau M, Liebana E, Morabito S: Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy. *Int J Food Microbiol* 2003; 85: 11-110
26. Bories P, Veyrac M, Perez C, Michel H: Maladie de Crohn et sérologie yersinienne. *Gastroenterol Clin Biol* 1983; 7: 95-101
27. Boyd AP, Grosdent N, Totemeyer S, Geuijen C, Bleves S, Iriarte M, Lambermont I, Octave JN, Cornelis GR: *Yersinia enterocolitica* can deliver Yop proteins into a wide range of cell types: development of a delivery system for heterologous proteins. *Eur J Cell Biol* 2000; 79: 659-671
28. Boyko EJ, Theis MK, Vaughan TL, Nicol-Blades B: Increased risk of inflammatory bowel disease associated with oral contraceptive use. *Am J Epidemiol* 1994; 140: 268-278
29. Breslin NP, Nash C, Hilsden RJ, Hershfield NB, Price LM, Meddings JB, Sutherland LR: Intestinal permeability is increased in a proportion of spouses of patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2934-2938
30. Cambridge G, Rampton DS, Stevens TRJ, McCarthy DA, Kamm M, Leaker B: Anti-neutrophil antibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* 1992; 33: 668-674
31. Capdevilla Morell JA, Mas Marqués M, Ocana Rivera I, Villagrasa M, Martínez Vázquez JM: Ileitis terminal comounica manifestación de una yersiniosis. *Med Clin* 1983; 80: 758-761
32. Caradonna L, Amati L, Lella P, Jirillo E, Caccavo D: Phagocytosis, killing, lymphocyte-mediated antibacterial activity, serum autoantibodies, and plasma endotoxins in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1495-1502
33. Casellas F, De Buen ML, Accarino A, Vargas V, Guarner L: Maladie inflammatoire intestinale chronique et *Yersinia enterocolitica*. *Gastroenterol Clin Biol* 1984 ; 8: 483-484
34. Cave DR, Freedman LS: Seasonal variations in the clinical presentation of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Int J Epidemiol* 1975; 4: 317-320
35. Cave DR, Kirsner JB: Animal models of inflammatory bowel disease. *Z Gastroenterol* 1979; 17, suppl: 125-135
36. Cave DR, Mitchell DN, Brooke BN: Evidence of an agent transmissible from ulcerative colitis tissue. *Lancet* 1976; 1: 1311-1314
37. Cave DR, Mitchell DN, Brooke BN: Induction of granulomas in mice by Crohn's disease tissues. *Gastroenterology* 1978; 75: 632-637

38. Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – selected sites, United States, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004; 53: 338-343
39. Chao LP, Steele J, Rodrigues C, Lennard-Jones J, Stanford JL, Spiliadis C, Rook GAW: Specificity of antibodies secreted by hybridomas generated from activated B cells in the mesenteric lymph nodes of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1988; 29: 35-40
40. Chatzipanagiotou S, Legakis JN, Boufidou F, Petroyianni V, Nicolaou C: Prevalence of plasmid-encoded outer protein (Yop) class-specific antibodies in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 138-143
41. Coico R (ed.): Biotinylation and analysis of membrane-bound and soluble proteins. *Current Protocols in Immunology*: 8.16.1. City University of New York Medical School, John Wiley & Sons, 2000
42. Comes MC, Gower Rousseau C, Colombel JF, Belaiche J, Van Kruiningen HJ: Inflammatory bowel disease in married couples: 10 cases in Nord Pas de. *Gut* 1994; 35: 1316-1318
43. Corapcioglu D, Tonyukuk V, Kiyan M, Yilmaz AE, Emral R, Kamel N, Erdogan G: Relationship between thyroid autoimmunity and *Yersinia enterocolitica* antibodies. *Thyroid* 2002; 12: 613-617
44. Coumaros D, Zerbe S, Muller D, Brogard JM, Bockel R: Intestinal infections with *Yersinia enterocolitica*. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24, suppl 158: 167
45. Cremer J, Putzker M, Faulde M, Zöller L: Immunoblotting of *Yersinia* plasmid-encoded released proteins: A tool for serodiagnosis. *Electrophoresis* 1993; 14: 952-959
46. Crohn BB: The pathology of acute regional enteritis. *Am J Dig Dis* 1965; 10: 565-572
47. Danis VA, Harries AD, Heatley RV: *In vitro* immunoglobulin secretion by normal human gastrointestinal mucosal tissues, and alterations in patients with inflammatory bowel disease. *Clin exp Immunol* 1984; 56: 159-166
48. Darchis I et al.: Crohn's disease in a married couple and their four children. *Lancet* 1989; 1: 737
49. Das KM, Valenzuela I, Williams SE, Soeiro R, Kadish AS, Baum SG: Studies of the etiology of Crohn's disease using athymic nude mice. *Gastroenterology* 1983; 84: 364-374
50. Denecker G, Totemeyer S, Mota LJ, Troisfontaines P, Lambermont I, Youta C, Stainier I, Ackermann M, Cornelis GR: Effect of low- and high-virulence *Yersinia enterocolitica* strains on the inflammatory response of human umbilical vein endothelial cells. *Infect Immun* 2002; 70: 3510-3520
51. Dirks E: Die Epidemiologie des Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa. *Verdauungskrankheiten* 1991; 9: 162-167
52. Donnelly BJ, Delaney PV, Healy TM: Evidence for a transmissible factor in Crohn's disease. *Gut* 1977; 18: 360-363
53. Dreesman J, Weber KAE, Dallügge-Tamm H, Hölscher J, Pulz M: Gastroenteritis-Surveillance in Niedersachsen: Ergebnisse und Erfahrungen aus einem sechsjährigen ÖGD-Regionalprojekt. *Gesundheitswesen* 2001; 63: 763-768
54. Erfurth SE, Grobner S, Kramer U, Gunst DS, Soldanova I, Schaller M, Autenrieth, Borgmann S: *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. *Infect Immun* 2004; 72: 7045-7054
55. Etienny I, Bouhnik Y, Gendre JP, Lemann M, Cosnes J, Matuchansky C, Beaugerie L, Modigliani R, Rambaud JC: Crohn's disease over 20 years after diagnosis in a referral population. *Gastroenterol Clin Biol* 2004; 28: 1233-1239

56. Farmer RG et al.: Studies of family history among patients with inflammatory bowel disease. *Clinics in Gastroenterology* 1980; 9: 271-278
57. Farrall M: Inheritance of chronic inflammatory bowel disease. *Br Med J* 1993; 306: 651
58. Fefferman DS, Farrell RJ: Endoscopy in inflammatory bowel disease: indications, surveillance, and use in clinical practice. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 11-24
59. Fletcher KM, Morris CM, Noble MA: Human coproantibody secretory immunoglobulin A response to *Yersinia* species. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 287-292
60. Franchimont D et al.: Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 2004; 53: 987-992
61. Fredriksson-Ahomaa M, Bucher M, Hank C, Stolle A, Korkeala H: High prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4:O3 of pig offal in southern Germany: a slaughtering technique problem. *Syst Appl Microbiol* 2001; 24: 457-463
62. Fredriksson-Ahomaa M, Hielm S, Korkeala H: High prevalence of yadA-positive *Yersinia enterocolitica* in pig tongues and minced meat at the retail level in Finland. *J Food Prot* 1999; 62: 123-127
63. Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H: Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 220-229
64. Fukata M, Michelsen KS, Eri R, Thomas LS, Hu B, Lukasek K, Nast CC, Lechago J, Xu R, Naiki Y, Soliman A, Arditi M, Abreu MT: Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G1055-1065
65. Gangi E, Kapatral V, El-Azami El Idrissi M, Martinez O, Prabhakar BS: Characterization of a recombinant *Yersinia enterocolitica* lipoprotein; implications for its role in autoimmune response against thyrotropin receptor. *Autoimmunity* 2004; 37: 515-520
66. Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, Ikonomopoulos J, Gorgoulis VG: Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 681-685
67. Gheorghe C, Pascu O, Gheorghe L, Iacob R, Dumitru E, Tantau M, Vadan R, Goldis A, Balan G, Iacob S, Dobru D, Safoiu A: Epidemiology of inflammatory bowel disease in adults who refer to gastroenterology care in Romania: a multicentre study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 1153-1159
68. Gouni-Berthold I, Baumeister B, Berthold HK, Schmidt C: Immunoglobulins and IgG subclasses in patients with inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 1720-1723
69. Granfors K, Lahesmaa-Rantala R, Ståhlberg TH, Toivanen A: Comparison of bacteria with and without plasmid-encoded proteins as antigens for measurement of immunoglobulin M, G, and A antibodies to *Yersinia enterocolitica* by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 583-585
70. Granfors K, Viljanen MK, Toivanen A: Measurement of immunoglobulin M, immunoglobulin G, and immunoglobulin A antibodies against *Yersinia enterocolitica* by enzyme-linked immunosorbent assay: comparison of lipopolysaccharides and whole bacterium as antigen. *J Clin Microbiol* 1981; 14: 6-14
71. Grassl GA, Bohn E, Muller Y, Buhler OT, Autenrieth IB: Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasin beyond invasion. *Int J Med Microbiol* 2003; 293: 41-54

72. Grosdent N, Maridonneau-Parini I, Sory MP, Cornelis GR: Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun* 2002; 70: 4165-4176
73. Grützkau A, Hanski C, Hahn H, Riecken EO: Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other invasive bacteria. *Gut* 1990; 31: 1011-1015
74. Grützkau A, Hanski C, Naumann M: Comparative study of histological alterations during intestinal infection of mice with pathogenic and non-pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *Virchows Arch A* 1993; 423: 97-103
75. Gurtler M, Alter T, Kasimir S, Linnebur M, Fehlhaber K: Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in fattening pigs. *J Food Prot* 2005; 68: 850-854
76. Hanski C, Kutschka U, Schmoranzler HP, Naumann M, Stallmach A, Hahn H, Menge H: Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *Infect Immun* 1989; 57: 673-678
77. Harb J, Fyfe M, Patrick D, Trinidad A, Hockin J, Masoud N, Louie K, Kurzac C: Case-control study assessing the association between yersiniosis and exposure to salami. *Can Commun Dis Rep* 2000; 26:161-164
78. Harries AD, Myers B, Cooke GC: Inflammatory bowel disease: a common cause of bloody diarrhoea in visitors to the tropics. *Br Med J* 1985; 291: 1686-1687
79. Hartland EL, Robins-Browne RM: In vitro association between the virulence proteins, YopD and YopE, of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 162: 207-213
80. Heatley RV, Bolton PM, Owen E, Jones Williams W, Hughes LE: A search for a transmissible agent in Crohn's disease. *Gut* 1975; 16: 528-532
81. Heesemann J, Algermissen B, Laufs R: Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1984; 46: 105-110
82. Heesemann J, Eggers C, Schröder J: Serological diagnosis of Yersiniosis by immunoblot technique using virulence-associated antigen of enteropathogenic Yersiniae. *Contr Microbiol Immunol* 1987; 9: 285-289
83. Heesemann J, Gaede K: Mechanisms involved in the pathogenesis of Yersinia infections. *Rheumatol Int* 1989; 9: 213-217
84. Heesemann J, Gross U, Schmidt N, Laufs R: Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media. *Infect Immun* 1986¹; 54: 561-567
85. Heesemann J, Kalthoff H, Koch F: Monoclonal antibodies directed against plasmid-encoded released proteins of enteropathogenic Yersinia. *FEMS Microbiol Lett* 1986²; 36: 15-19
86. Heesemann J, Keller C, Morawa R, Schmidt N, Siemens HJ, Laufs R: Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica*: Molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J Infect Dis* 1983; 147: 107-115
87. Heidt H, Karch H, Arndt R, Keeser D, Ottenjann R: Mikrobiologische Befunde bei protrahiert verlaufenden und chronischen Enterokolitiden. *Z Gastroenterol* 1991; 29: 618-620
88. Helgeland L, Tysk C, Järnerot G, Kett K, Lindberg E, Danielsson D, Andersen SN, Brandtzaeg P: IgG subclass distribution in serum and rectal mucosa of monozygotic twins with or without inflammatory bowel disease. *Gut* 1992; 33: 1358-1364
89. Hellers G: Crohn's disease in Stockholm County 1955-1974. A study of epidemiology, results of surgical treatment and long-term prognosis. *Acta Chir Scand* 1979; Suppl. 490: 15-81
90. Hershfield NB: Crohn's disease in a mother, father and son. *Can Med Assoc J* 1984; 131: 1190

91. Hibi T, Aiso S, Yoshida T, Watanabe M, Asakura H, Tsuru S, Tsuchiya M: Anti-colon antibody and lymphocytic antibody in ulcerative colitis. *Clin exp Immunol* 1982; 49: 75-80
92. Hillers VN, Medeiros L, Kendall P, Chen G, DiMascola S: Consumer food-handling behaviors associated with prevention of 13 foodborne illnesses. *J Food Prot* 2003; 66: 1893-1899
93. Hisamatsu T et al.: CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003; 124: 993-1000
94. Hoffmann R, van Erp K, Trulzsch K, Heesemann J: Transcriptional responses of murine macrophages to infection with *Yersinia enterocolitica*. *Cell Microbiol* 2004; 6: 377-390
95. Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty T, Rotter JI: Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. *Ann Int Med* 1986; 105: 883-885
96. Holmes GKT, Painter NS: Crohn's disease in married couples. *Gut* 1986; 27: 350
97. Holmstrom A, Olsson J, Cherepanov P, Maier E, Nordfelth R, Pettersson J, Benz R, Wolf-Watz H, Forsberg A: LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol Microbiol* 2001; 39: 620-632
98. Hoogkamp-Korstanje JAA, De Koning J, Heesemann J: Persistence of *Yersinia enterocolitica* in man. *Infection* 1988; 16: 81-85
99. Hoogkamp-Korstanje JAA, De Koning J, Samson JP: Incidence of human infection with *Yersinia enterocolitica* serotypes O3, O8, und O9 and the use of indirect immunofluorescence in diagnosis. *J Infect Dis* 1986; 15: 138-141
100. Howells B, Matthews N, Mayberry JF, Rhodes J: Agglutinins to anaerobic bacteria in Crohn's disease and in Indian patients with diarrhoea. *J Med Microbiol* 1984; 17: 207-209
101. Hugot JP: Inflammatory bowel disease: a complex group of genetic disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 451-462
102. Huppertz HI, Heesemann J: Effect of cytokines on invasion and survival of *Yersinia* in primary human fibroblasts. *Med Microbiol Immunol* 1999; 187: 157-164
103. Ibbotson JP, Lowes JR, Chahal H, Gaston JS, Life P, Kumararatne DS, Sharif H, Alexander-Williams J, Allan RN: Mucosal cell-mediated immunity to mycobacterial, enterobacterial, and other microbial antigens in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 1992; 87: 224-230
104. Ibbotson JP, Pease PE, Allan RN: Serological studies in Crohn's disease. *Eur J Clin Microbiol* 1987; 6: 286-290
105. Iizuka M: IgG subclass-containing cells in the human large bowel of normal controls, non-IBD colitis, and ulcerative colitis. *Gastroenterol Jpn* 1990; 25: 24-31
106. Iriarte M, Cornelis GR: YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* 1998; 29: 915-929
107. Itzkowitz SH: Conditions that mimic inflammatory bowel disease. Diagnostic clues and potential pitfalls. *Postgrad Med* 1986; 80: 219-231
108. Jess T, Jess P: Acute terminal ileitis, yersiniosis, and Crohn's disease: a long-term follow-up study of the relationships. *Eur J Intern Med* 2001; 12: 98-100
109. Jess T, Winther KV, Munkholm P, Langholz E, Binder V: Mortality and causes of death in Crohn's disease: follow-up of a population-based cohort in Copenhagen County, Denmark. *Gastroenterology* 2002; 1808-1814
110. Jump RL, Levine AD: Mechanisms of natural tolerance in the intestine: implications for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 462-478

111. Kallinowski F, Wassmer A, Hofmann MA, Harmsen D, Heesemann J, Karch H, Herfarth C, Buhr HJ: Prevalence of enteropathogenic bacteria in surgically treated chronic inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 1552-1558
112. Kapperud G, Ostroff SM, Nesbakken T, Hutwagner LC, Bean NH, Lassen J, Tauxe RV: Risk factors for sporadic *Yersinia enterocolitica* infections in Norway; a case-control study. *Contr Microbiol Immunol* 1995; 13: 25-28
113. Katz KD, Hollander D, Vadheim CM, McElree C, Delahunty T, Dadufalza VD, Krugliak P, Rotter JI: Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their healthy relatives. *Gastroenterology* 1989; 97: 927-931
114. Keren DF, Appelman HD, Dobbins WO, Wells JJ, Whisenant B, Foley J, Dieterle R, Geisinger K: Correlation of histopathologic evidence of disease activity with the presence of immunoglobulin-containing cells in the colons of patients with inflammatory bowel disease. *Hum Pathol* 1984; 15: 757-763
115. Kett K, Brandtzaeg P: Local IgA subclass alterations in ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon. *Gut* 1987; 28: 1013-1021
116. Kirsner JB: Later development of inflammatory bowel disease in the healthy spouse of a patient. *N Engl J Med* 1982; 307: 1148
117. Kobayashi KS et al.: Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005; 307: 731-734
118. Konuma Y, Tanaka M, Saito H, Munakata A, Yoshida Y: A study of the histological criteria for ulcerative colitis: Retrospective evaluation of multiple colonic biopsies. *J Gastroenterol* 1995; 30: 189-194
119. Korelitz BI: From Crohn to Crohn's disease: 1979. An epidemiologic study in New York City. *Mount Sinai J Med* 1979; 46: 533-540
120. Korzenik JR: Past and current theories of etiology of IBD: toothpaste, worms, and refrigerators. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: S59-65
121. Kreuzpaintner G, Hesterberg R, Thomas L, Rosin H, Wallner A, Borchard F, Preisendanz H, Kölbl R, Röher HD, Miller B, Strohmeyer G: Increased permeability of affected intestinal mucosa for different bacteria in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1989; 96: A273
122. Kumar S, Ghoshal UC, Aggarwal R, Saraswat VA, Choudhuri G: Severe ulcerative colitis: prospective study of parameters determining outcome. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 1247-1252
123. Kyle J, Stark G: Fall in the incidence of Crohn's disease. *Gut* 1980; 21: 340-343
124. Lagercrantz R, Perlmann P, Hammarström S: Immunological studies in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1971; 60: 381-389
125. Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, Balogh M, Szipocs I, Kamaras G, Lakatos PL: Striking elevation in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary between 1977-2001. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 404-409
126. Lamps LW, Madhusudhan KT, Greenson JK, Pierce RH, Massoll NA, Chiles MC, Dean PJ, Scott MA: The role of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in granulomatous appendicitis: a histologic and molecular study. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 508-515
127. Lamps LW, Madhusudhan KT, Havens JM, Greenson JK, Bronner MP, Chiles MC, Dean PJ, Scott MA: Pathogenic *Yersinia* DNA is detected in bowel and mesenteric lymph nodes from patients with Crohn's disease. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 220-227
128. Larsen JH, Hartzen SH, Parm M: The determination of specific IgA-antibodies to *Yersinia enterocolitica* and their role in enteric infections and their complications. *APMIS* 1985; Sect. B, 93: 331-339

129. Levenstein S, Prantera C, Varvo V, Scribano ML, Berto E, Andreoli A, Luzi C: Psychological stress and disease activity in ulcerative colitis: A multidimensional cross-sectional study. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 1219-1225
130. Lian CJ, Hwang WS, Kelly JK, Pai CH: Invasiveness of *Yersinia enterocolitica* lacking the virulence plasmid: an in-vivo study. *J Med Microbiol* 1987²; 24: 219-226
131. Lian CJ, Hwang WS, Kelly JK, Pai CH: Penetration of the intestinal mucosa by *Yersinia enterocolitica* lacking the virulence plasmid. *Contr Microbiol Immunol* 1987¹; 9: 239-242
132. Lobo AJ, Foster PN, Sobala GM, Axon ATR: Crohn's disease in married couples. *Lancet* 1988; 1: 704-705
133. Loftus EV Jr, Sandborn WJ: Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2002; 31: 1-20
134. Logsdon LK, Meccas J: Requirement of the *Yersinia pseudotuberculosis* effectors YopH and YopE in colonization and persistence in intestinal and lymph tissues. *Infect Immun* 2003; 71: 4595-4607
135. Longo WE, Virgo KS, Bahadursingh AN, Johnson FE: Patterns of disease and surgical treatment among United States veterans more than 50 years of age with ulcerative colitis. *Am J Surg* 2003; 186: 514-518
136. MacDermott RP, Scott MG, Nash GS, Macke K, Bertovich MJ, Nahm MH: Increased spontaneous synthesis and secretion of immunoglobulin G subclass 1 (IgG1) by ulcerative colitis intestinal mononuclear cells. *Gastroenterol* 1985; 88: 1483
137. MacDonald C, Vacratsis PO, Bliska JB, Dixon JE: The yersinia virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J Biol Chem* 2003; 278: 18514-18523
138. Machado de Medeiros BM, de Moraes Costa A, Ferreira de Araújo PM, Pasetto Falcao D: Occurrence of polyclonal B-cell activation after experimental infection with *Yersinia enterocolitica* O:3. *Contr Microbiol Immunol* 1995; 13: 207-210
139. Macpherson A, Khoo UY, Forgacs I, Philpott-Howard J, Bjarnason I: Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut* 1996; 38: 365-375
140. Magnusson KE, Sundqvist T, Sjö Dahl R, Tagesson C: Altered intestinal permeability to low-molecular-weight polyethyleneglycols (PEG 400) in patients with Crohn's disease. *Acta Chir Scand* 1983; 149: 323-327
141. Mahida YR, Rolfe VE: Host-bacterial interactions in inflammatory bowel disease. *Clin Sci (Lond)* 2004; 107: 331-341
142. Maki-Ikola O, Heesemann J, Toivanen A, Granfors K: High frequency of *Yersinia* antibodies in healthy populations in Finland and Germany. *Rheumatol Int* 1997; 16: 227-229
143. Mary JY, Modigliani R: Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospectiva multicentre study. *Gut* 1989; 30: 983-989
144. Mathew CG, Lewis CM: Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects. *Hum Mol Genet* 2004; 13 Spec No 1: R161-168
145. Matsumoto T, Iida M, Kimura Y, Fujishima M: Culture of colonoscopically obtained biopsy specimens in acute infectious colitis. *Gastrointest Endosc* 1994; 40:184-187
146. Mayberry J, Rhodes J, Hughes LE: Incidence of Crohn's disease in Cardiff between 1934 and 1977. *Gut* 1979; 20: 602-608
147. McConnell RB: Inflammatory bowel disease: newer views of genetic influence. In: Berk JE (ed.): *Developments in digestive diseases*. Lea & Febiger, 1980, pp. 129-138
148. McLeod RS et al.: Preliminary report on the Mount Sinai Hospital Inflammatory Bowel Disease Genetics Project. *Dis Colon Rectum* 1997; 40: 553-557

149. Miller DS, Keighley A, Smith PG, Hughes AO, Langman MJS: A case-control method for seeking evidence of contagion in Crohn's disease. *Gastroenterol* 1976; 71: 385-387
150. Mitchell DN, Rees RJW: Agent transmissible from Crohn's disease tissue. *Lancet* 1970; 2: 168-171
151. Mitchell DN, Rees RJW: Further observations on the transmissibility of Crohn's disease. *Ann NY Acad Sci* 1976; 278: 546-559
152. Monteiro E, Fossey J, Shiner M, Drasar BS, Allison AC: Antibacterial antibodies in rectal and colonic mucosa in ulcerative colitis. *Lancet* 1971; 1: 249-251
153. Müller-Ladner U, Gross V, Adnus T, Gschwendtner H, Roth M, Caesar I, Scholmerich J, Lang B: Distinct patterns of immunoglobulin classes and IgG subclasses of autoantibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8: 579-584
154. Murray CJW, Thomson ABR: Marital idiopathic inflammatory bowel disease. Crohn's disease in a husband and a wife. *J Clin Gastroenterol* 1988; 10: 95-97
155. Myllärmiemi H, Nickels J: Scanning electron microscopy of Crohn's disease and ulcerative colitis of the colon. *Virchows Arch A* 1980; 385: 343-350
156. Nejedlik L, Pierfelice T, Geiser JR: Actin distribution is disrupted upon expression of *Yersinia YopO/YpkA* in yeast. *Yeast* 2004; 21: 759-768
157. Nesbakken T, Eckner K, Hoidal HK, Rotterud OJ: Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering, and dressing procedures. *Int J Food Microbiol* 2003; 80: 231-240
158. Neyt C, Cornelis GR: Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol Microbiol* 1999; 33: 971-981
159. Offermann U, Bodmer T, Audigé L, Jemmi T: Verbreitung von Salmonellen, Yersinien und Mykobakterien bei Schlachtschweinen in der Schweiz. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1999; 141: 509-515
160. Ogura Y et al.: A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603-606
161. Olaison G, Leandersson P, Sjö Dahl R, Tagesson C: Increase in permeability and phospholipase A₂ activity of colonic mucosa in Crohn's colitis. *Digestion* 1989; 43: 228-233
162. Olaison G, Leandersson P, Sjö Dahl R, Tagesson C: Intestinal permeability to polyethylenglycol 600 in Crohn's disease. Perioperative determination in a defined segment of the small intestine. *Gut* 1988; 29: 196-199
163. Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO: Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1075-1081
164. Oriishi T, Sata M, Toyonaga A, Sasaki E, Tanikawa K: Evaluation of intestinal permeability in patients with inflammatory bowel disease using lactulose and measuring antibodies to lipid A. *Gut* 1995; 36: 891-896
165. Ostroff S: *Yersinia* as an emerging infection: Epidemiologic aspects of yersiniosis. *Contr Microbiol Immunol* 1995; 13: 5-10
166. Ottenjann R, Bayerdörffer E: Bakterielle Enterokolitiden als Imitatoren von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn. *Med Klin* 1987; 82: 77-79
167. Paerregaard A, Shand GH, Gaarslev K, Espersen F: Comparison of crossed immunoelectrophoresis, enzyme-linked immunosorbent assays, and tube agglutination for serodiagnosis of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:3 infection. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 302-309

168. Payne M, Girdwood AH, Roost RW, Freson MJM, Kottler RE: *Yersinia enterocolitica* and Crohn's disease. S Afr Med J 1987; 72: 53-55
169. Pearson ADJ, Eastham EJ, Laker MF, Craft AW, Nelson R: Intestinal permeability in children with Crohn's disease and coeliac disease. Br Med J 1982; 285: 20-21
170. Persson S, Danielsson D, Kjellander J, Wallensten S: Studies on Crohn's disease. 1. The relationship between *Yersinia enterocolitica* infection and terminal ileitis. Acta Chir Scand 1976; 142: 84-90
171. Philipsen EK, Bondesen S, Andersen J, Larsen S: Serum immunoglobulin G subclasses in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease of different disease activities. Scand J Gastroenterol 1995; 30: 50-53
172. Pujol C, Bliska JB: Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. Clin Immunol 2005; 114: 216-226
173. Purrmann J, Cleveland S, Miller B, Strohmeyer G: Crohn's disease in a married couple. Hepatogastroenterol 1987, 34: 132-133
174. Rachmilewitz D: Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomised trial. Br Med J 1989; 298: 82-86
175. Raedler A, Schreiber S: Ist die Colitis ulcerosa eine Autoimmunerkrankung? Dtsch med Wschr 1992; 117: 1333-1338
176. Ramos OP, Silva EE, Falcao DP, de Medeiros BM: Production of autoantibodies associated with polyclonal activation in *Yersinia enterocolitica* O:8-infected mice. Microbiol Immunol 2005; 49: 129-137
177. Ray SM, Ahuja SD, Blake PA, Farley MM, Samuel M, Fiorentino T, Swanson E, Cassidy M, Lay JC, Van Gilder T; Emerging Infections Program FoodNet Working Group: Population-based surveillance for *Yersinia enterocolitica* infections in FoodNet sites, 1996-1999: higher risk for disease in infants and minority populations. Clin Infect Dis 2004; 38 Suppl 3: S181-189
178. Regueiro M, Kip KE, Cheung O, Hegazi RA, Plevy S: Cigarette smoking and age at diagnosis of inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2005; 11: 42-47
179. Repo H, Ristola M, Leirisalo-Repo M: Enhanced inflammatory reactivity in the pathogenesis of spondyloarthropathies. Autoimmunity 1990; 7: 245-254
180. Rhodes JM, Marschall T, Hamer JD, Allan RN: Crohn's disease in two married couples. Gut 1985; 26: 1086-1087
181. Roche JK, Fiocchi C, Youngman K: Sensitization to epithelial antigens in chronic mucosal inflammatory disease. Characterization of human intestinal mucosa-derived mononuclear cells reactive with purified epithelial cell-associated components in vitro. J Clin Invest 1985; 75: 522-530
182. Rosekrans PCM, Meijer CJLM, van der Wal AM, Cornelisse CJ, Lindeman J: Immunoglobulin containing cells in inflammatory bowel disease of the colon: a morphometric and immunohistochemical study. Gut 1980; 21: 941-947
183. Rosenberg JL et al.: Inflammatory bowel disease in all three members of one family. Gastroenterology 1976; 70: 759-760
184. Ruckdeschel K, Roggenkamp A, Schubert S, Heesemann J: Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. Infect Immun 1996; 64: 724-733
185. Ruiz-Bravo A, Moreno E, Sampedro A, Jimenez-Valera M: Experimental infection of mice with *Yersinia enterocolitica* serotype O9 by oral and parenteral routes: spreading and enterotropism of virulent yersiniae. Curr Microbiol 1999; 38: 257-263

186. Saebo A, Lassen J: *Yersinia enterocolitica*: an inducer of chronic inflammation. *Int J Tissue React* 1994; 16: 51-57
187. Saebo A, Vik E, Lange OJ, Matuszkiewicz L: Inflammatory bowel disease associated with *Yersinia enterocolitica* O:3 infection. *Eur J Intern Med* 2005; 16: 176-182
188. Sarker MR, Sory MP, Boyd AP, Iriarte M, Cornelis GR: LcrG is required for efficient translocation of *Yersinia* Yop effector proteins into eukariotic cells. *Infect Immun* 1998; 66: 2976-2979
189. Sauvonnet N, Lambermont I, van der Bruggen P, Cornelis GR: YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and T-cell proliferation through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol Microbiol* 2002¹; 45: 805-815
190. Sauvonnet N, Pradet-Balade B, Garcia-Sanz JA, Cornelis GR: Regulation of mRNA expression in macrophages after *Yersinia enterocolitica* infection. Role of different Yop effectors. *J Biol Chem* 2002²; 277: 25133-25142
191. Schmid Y, Grassl GA, Buhler OT, Skurnik M, Autenrieth IB, Bohn E: *Yersinia enterocolitica* adhesin A induces production of interleukin-8 in epithelial cells. *Infect Immun* 2004; 72: 6780-6789
192. Schumacher G, Sandstedt B, Kollberg B: A prospective study of first attacks of inflammatory bowel disease and infectious colitis. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 265-274
193. Schurmann G, Bruwer M, Klotz A, Schmid KW, Senninger N, Zimmer KP: Transepithelial transport processes at the intestinal mucosa in inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 1999; 14: 41-46
194. Shanahan F, Duerr RH, Rotter JI, Yang H, Sutherland LR, McElree C, Landers CJ, Targan SR: Neutrophil autoantibodies in ulcerative colitis: familial aggregation and genetic heterogeneity. *Gastroenterology* 1992; 103: 456-461
195. Shayegani M, Maupin PS, Waring A: Prevalence and molecular typing of two pathogenic serogroups of *Yersinia enterocolitica* in New York State. *Contr Microbiol Immunol* 1995; 13: 33-38
196. Silva EE, Ramos OP, Bauab TM, Falcao DP, de Medeiros BM: *Yersinia enterocolitica* O:3 isolated from patients with or without reactive arthritis induces polyclonal activation of B cells and autoantibody production in vivo. *Autoimmunity* 2003; 36: 261-268
197. Simonowitz D, Block GE, Riddell RH, Kraft SC, Kirsner JB: The production of an unusual tissue reaction in rabbit bowel injected with Crohn's disease homogenates. *Surgery* 1977; 82: 211-218
198. Sjöström B : Acute terminal ileitis and its relation to Crohn's disease. In: Engel A, Larsson T (eds.): Skandia International Symposium No. 5 Regional enteritis (Crohn's disease). Nordiska Bokhandels Förlag 1971; 73-76
199. Skurnik M, Bengoechea JA: The biosynthesis and biological role of lipopolysaccharide O-antigens of pathogenic *Yersiniae*. *Carbohydr Res* 2003; 338: 2521-2529
200. Ståhlberg TH, Granfors K, Toivanen A: Human antibody response to individual chromosome- and plasmid-encoded antigens of *Yersinia enterocolitica* O:3. *Contr Microbiol Immunol* 1987¹; 9: 290-291
201. Ståhlberg TH, Granfors K, Toivanen A: Immunoblot analysis of human IgM, IgG and IgA responses to plasmid-encoded antigens of *Yersinia enterocolitica* serovar O3. *J Med Microbiol* 1987²; 24: 157-163
202. Ståhlberg TH, Heesemann J, Granfors K, Toivanen A: Immunoblot analysis of IgM, IgG and IgA responses to plasmid-encoded released proteins of *Yersinia enterocolitica* in patients with or without yersinia triggered reactive arthritis. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 577-581

203. Stallmach A, Carstens O: Role of infections in the manifestation or reactivation of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8: 213-218
204. Stemerowicz R, Möller B, Martin P, Heesemann J, Wenzel BE, Galanos C, Freudenberg M: Antibody activity against lipopolysaccharides, lipid A and proteins from enterobacteriaceae in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Auoimmunity* 1990; 7: 305-315
205. Stork-Engelaar V, Hoogkamp-Korstanje J: Diagnosis in *Yersinia enterocolitica* infection. *Contr Microbiol Immunol* 1995; 13: 137-139
206. Strieder TG, Wenzel BE, Prummel MF, Tijssen JG, Wiersinga WM: Increased prevalence of antibodies to enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* virulence proteins in relatives of patients with autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol* 2003; 132: 278-282
207. Sugi K, Saitoh O, Matsuse R, Tabata K, Uchida K, Kojima K, Nakagawa K, Tanaka S, Teranishi T, Hirata I, Katsu K: Antineutrophil cytoplasmatic antibodies in Japanese patients with inflammatory bowel disease: prevalence and recognition of putative antigens. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1304-1312
208. Sukegawa Y, Kamiya S, Yagita A, Sugamata M, Atomi Y: Induction of autoimmune colitis by *Yersinia enterocolitica* 60-kilodalton heat-shock protein. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1188-1193
209. Swarbrick ET, Kingham JGC, Price HL, Blackshaw AJ, Griffiths PD: Chlamydia, Cytomegalovirus, and *Yersinia* in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1979; 2: 11-12
210. Tardy F, Homble F, Neyt C, Wattiez R, Cornelis GR, Ruyschaert JM, Cabiaux V: *Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted yops. *EMBO J* 1999; 18: 6793-6799
211. Taub RN, Sachar D, Janowitz H, Siltzbach LE: Induction of granulomas in mice by inoculation of tissue homogenates from patients with inflammatory bowel disease and sarcoidosis. *Ann NY Acad Sci* 1976; 278: 560-563
212. Tedesco FJ, Hardin RD, Harper RN, Edwards BH: Infectious colitis endoscopically simulating inflammatory bowel disease: a prospective evaluation. *Gastrintest Endoscop* 1983; 29: 195-197
213. Toivanen A, Lahesmaa-Rantala R, Vuento R, Granfors K: Association of persisting IgA response with yersinia triggered reactive arthritis: a study on 104 patients. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 898-901
214. Treacher DF, Jewell DP: *Yersinia colitis* associated with Crohn's disease. *Postgrad Med J* 1985; 61: 173-174
215. Truelove SC, Witts LJ: Cortisone in ulcerative colitis. *Br Med J* 1955; 2: 1041-1048
216. Trulzsch K, Geginat G, Sporleder T, Ruckdeschel K, Hoffmann R, Heesemann J, Russmann H: *Yersinia* outer protein P inhibits CD8 T cell priming in the mouse infection model. *J Immunol* 2005; 174: 4244-4251
217. Trulzsch K, Sporleder T, Igwe EI, Russmann J, Heesemann J: Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect Immun* 2004; 72: 5227-5234
218. Tsironi E, Feakins RM, Probert CS, Rampton DS, Phil D: Incidence of inflammatory bowel disease is rising and abdominal tuberculosis is falling in Bangladeshis in East London, United Kingdom. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1749-1755
219. Tysk C et al.: Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988; 29: 990-996
220. Ukabam SO, Clamp JR, Cooper BT: Abnormal small intestine permeability to sugars in patients with Crohn's disease of the terminal ileum and colon. *Digestion* 1983; 27: 70-74

221. van Hees PAM, van Elteren P, van Lier HJJ, van Tongeren JHM: An index of inflammatory activity in patients with Crohn's disease. *Gut* 1980; 21: 279-286
222. van Kruiningen HJ, Joossens M, Vermeire S, Joossens S, Debeugny S, Gower-Rousseau C, Cortot A, Colombel JF, Rutgeerts P, Vlietinck R: Environmental factors in familial Crohn's disease in Belgium. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 360-365
223. van Spreeuwel JP, Lindeman J, Meijers CJLM: A quantitative study of immunoglobulin containing cells in the differential diagnosis of acute colitis. *J Clin Pathol* 1985; 38: 774-777
224. van Spreeuwel JP, Lindeman J, van der Wal AM, Weterman I, Kreuning J, Meijers CJLM: Morphological and immunohistochemical findings in upper gastrointestinal biopsies of patients with Crohn's disease of the ileum and colon. *J Clin Pathol* 1982; 35: 934-940
225. Vasilias E: Recent advances in the diagnosis and classification of inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2003; 5: 493-500
226. Velazquez LdelC, Barbini NB, Escudero ME, de Guzman AM: Resistance of *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157:H7 and natural microflora against acidic conditions and freezing-thawing in fresh sausages. *Cent Eur J Public Health* 2005; 13: 89-95
227. Verhaegen J, Charlier J, Lemmens P, Delmee M, Van Noyen R, Verbist L, Wauters G: Surveillance of human *Yersinia enterocolitica* infections in Belgium: 1967-1996. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 59-64
228. Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger KR, Baxmann S, Schmidt K, Schwind B, Duchrow M, Wohlschläger C, Feller AC, Stange EF: Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002 ; 14 : 745-752
229. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schröder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF: NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004; 53: 1658-1664
230. Wen Z, Fiocchi C: Inflammatory bowel disease: autoimmune or immune-mediated pathogenesis? *Clin Dev Immunol* 2004; 11: 195-204
231. Wenzel BE, Franke TF, Heufelder AE: Autoimmune thyroid diseases and enteropathogenic *Yersinia enterocolitica*. *Autoimmunity* 1990; 7: 295-303
232. Wenzel BE, Heesemann J, Wenzel KW, Scriba PC: Antibodies to plasmid-encoded proteins of enteropathogenic *Yersinia* in patients with autoimmune thyroid disease. *Lancet* 1988 Jan 2-9; 1(8575-6): 56
233. Weterman IT, Peña AS: Familial incidence of Crohn's disease in the Netherlands and a review of the literature. *Gastroenterology* 1984; 86: 449-452
234. Whorwell PJ, Eade OE, Hossenbocus A, Bamforth J: Crohn's disease in a husband and wife. *Lancet* 1978; 2: 186-187
235. Whorwell PJ, Hodges JR, Bamforth J, Wright R: Crohn's disease in husband and wife. *Lancet* 1981; 1: 334
236. Wilkin TJ: The primary lesion theory of autoimmunity: A speculative hypothesis. *Autoimmunity* 1995; 7: 225-235
237. Yagita A, Sukegawa Y, Maruyama S, Sato N, Aomi Y, Yamaguchi H, Kamiya S, Ihara T, Sugamata M: Mouse colitis induced by *Escherichia coli* producing *Yersinia enterocolitica* 60-kilodalton heat-shock protein: light and electron microscope study. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 445-451
238. Yang H et al.: The Genetics of Inflammatory Bowel Disease. In: MacDermott RP, Stenson WF (eds.): *Inflammatory Bowel Disease*. Elsevier, New York, 1992

239. Yu Y, Sitaraman S, Gewirtz AT: Intestinal epithelial cell regulation of mucosal inflammation. *Immunol Res* 2004; 29: 55-68
240. Zetzel L: Crohn's disease in a husband and wife. *Lancet* 1978; 2: 583
241. Zhang Y, Bliska JB: Role of macrophage apoptosis in the pathogenesis of *Yersinia*. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 289: 151-173
242. Zhou L, Tan A, Hershenson MB: *Yersinia* YopJ inhibits pro-inflammatory molecule expression in human bronchial epithelial cells. *Respir Physiol Neurobiol* 2004; 140: 89-97
243. Zink DL, Feeley JC, Wells JG, Vanderzant C, Vickery JC, Roof WD, O'Donovan GA: Plasmid-mediated tissue invasiveness in *Yersinia enterocolitica*. *Nature* 1980; 283: 224-226

9. ANHANG I - MATERIALIEN

9.1. GERÄTE UND ZUBEHÖR FÜR DIE IEF

(in alphabetischer Reihenfolge)

Eppendorf-Pipetten 0,5-10,0 ml, 10-100 ml, 100-1000 ml	
Eppendorf-Pipettenspitzen 10 ml, 100 ml, 1000 ml	
Feinwaagen: 1207 MP2, L 610 D	Sartorius
Glasplatten, 125 x 260 x 3 mm, 4 St.	Pharmacia 80-1106-30
Glasplatten mit U-förmiger Dichtung, 125 x 260 x 0,5 mm, 4 St.	Pharmacia 80-1106-89
High Speed Zentrifuge 2 K 15, Rotor Nr. 12141 (G=120 g)	Sigma
Klammern, 12 St.	Pharmacia 80-1106-42
Micro-Röhren mit Schraubverschluss 0,5 ml 2,0 ml	Sarstedt 72.730.006 Sarstedt 72.694.006
MultiDrive XL Stromversorger	Pharmacia 80-1257-93
MultiPhor II Kühlplatte	Pharmacia 80-1106-22
MultiTemp II Kühlsystem	Pharmacia 80-1116-13
Nunc Cryo Tubes	InterMed
Pasteurpipetten 150 mm	Assistent 567/1
pH-Meter TFK 530	WTW
Probenaufgabefolie für Agarose-IEF	Pharmacia 80-1129-49
Röhren mit Schraubverschluß 50 ml	Sarstedt 62.548.004
Schablonen	Pharmacia 80-1129-55
Silent Rocker	cti

Stromversorger Macrodrive XL	Pharmacia 80-1257-93
Trockenschrank	Memmert
Ultraschallgerät Labsonic U	B. Braun
Zentrifugenröhren 5 ml	Sarstedt 55.476

9.2. VERBRAUCHSMATERIALIEN UND CHEMIKALIEN FÜR IEF UND IMMUNBLOT
(in alphabetischer Reihenfolge)

Agarose IEF 10 g	Pharmacia 17-0468-01
Albumin, bovine (BSA)	Sigma
Antihuman-Antikörper aus Ziege, F(ab') ₂ -Fragment (unkonjugiert)	
anti human IgA (Fc)	Dianova 109-006-011
anti human IgG (F(ab') ₂)	Dianova 109-006-006
anti human IgG + IgM (H+L)	Dianova 109-006-044
anti human IgG, IgM, IgA	Dianova 109-006-064
Aqua destillata	
5Bromo-4Chloro-3Indolyl Phosphat, p-toluidin salt 1 g	Pierce 34040
Centricon™ Microconcentrators 3/10/30/100	Amicon
N'N Dimethylformamid 500 ml	Aldrich-Chemie
Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	Merck
Einmalspritzen 20 ml	Becton Dickinson
Elektrodenstreifen 100 St.	Pharmacia 80-1129-51
Ethanol	
Ethanolamine 1000 ml	Aldrich-Chemie
ExtrAvidin 5 mg	Sigma
ExtrAvidin-AP konjugiert 0,5 ml	Sigma

Filterpapier 595, 104 x 253 mm 100 St.	Schleicher & Schuell
Filterpapier 3 MM, 10 x 25 cm 50 St.	Whatman 30306124
Fluorescein Labeling Kit	Boehringer Mannheim Biochemic
Gel-Bond-Film 124 x 258 mm 50 St.	Pharmacia 80-1129-32
Injektionsnadeln Nr. 2	Becton Dickinson
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Markerproteine pI-Bereich 3,0-10,0	Pharmacia 17-0471-01
Methyl Red	Sigma
Myoglobin	Sigma
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Nitrozellulose-Membran, Rolle 300 x 3000 mm - BA 85, 0,45 m Porengröße	Schleicher & Schuell Ref.-Nr. 401196
Pharmalyte pH-Bereich 3,0-10,0 25 ml	Pharmacia 17-0456-01
Pharmalyte pH-Bereich 2,5- 5,0 25 ml	Pharmacia 17-0451-01
Pharmalyte pH-Bereich 5,0- 8,0 25 ml	Pharmacia 17-0453-01
Pharmalyte pH-Bereich 8,0-10,5 25 ml	Pharmacia 17-0455-0
Probenaufgabestücke 200 St.	Pharmacia 80-1129-46
Sorbitol 500 g	Aldrich-Chemie
Sulfo-NHS Biotin 50 mg	Pierce
Tris	Bio-Rad
Tween 20	Merck

9.3. LÖSUNGEN

(in alphabetischer Reihenfolge)

Anodenlösung

0,05 M H₂SO₄

BCIP-Stammlösung

0,5 g 5Bromo-4Chloro-3Indolyl Phosphat disodium salt in 10 ml 100 % Dimethylformamid

Diese Lösung ist bei 4°C über Jahre stabil.

Wasserfreies 100 % DMF kann durch Zugabe von Molecular Sieves, 4-8 mesh beads (Sigma M 1635), hergestellt werden.

Blockierungspuffer

Waschpuffer I, 3 % BSA

0,1 M Ethanolamin-Puffer

für 1 l: 6,1 ml Ethanolamin

pH mit konz. Salzsäure auf 9,6 einstellen

Kathodenlösung

1 M NaOH (ist unsteril nur ca. 1-2 Wochen zu gebrauchen, da durch Pilzbefall Elektrodenbrand auftreten kann)

Konjugatpuffer

Waschpuffer II, 0,3 % BSA

1 M MgCl₂

20,33 g MgCl₂·6H₂O in 100 ml Aqua bidest.

NBT-Stammlösung

0,5 g Nitro Blue Tetrazolium in 10 ml 70 % Dimethylformamid

Diese Lösung ist bei 4°C über Jahre stabil.

PBS pH 7,4, 0,02 % NaN₃

für 5 l: 40,0 g NaCl

2,0 g KH₂PO₄

14,4 g Na₂HPO₄·12H₂O

1,0 g NaN₃

Reaktionspuffer für die Biotinylierung

0,1 M NaHCO₃

0,1 M NaCl

pH 7,4

Waschpuffer I

PBS pH 7,4, 0,2 % Tween-20, 0,02 % NaN₃

für 5 l: 40,0 g NaCl

2,0 g KH₂PO₄

14,4 g Na₂HPO₄·12H₂O

1,0 g NaN₃
10,0 ml Tween-20

Waschpuffer II

TBS pH 7,4, 0,2 % Tween-20, 0,02 % NaN₃

für 10 l: 12,0 g Tris

87,0 g NaCl

2,0 g NaN₃

20,0 ml Tween-20

11. ANHANG III - ABKÜRZUNGEN

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
A	Ampere
Å	Ångström (1 Å = 0,1 nm = 10 ⁻¹⁰ m)
Abb.	Abbildung
BHI	brain heart infusion
bzw.	beziehungsweise
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
CDEIS	Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
cm	Zentimeter
CU	Colitis ulcerosa
dest.	destilliert(es)
et al.	et alii (und andere)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzym-Immunoassay
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLUOS	5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester
g	Erdbeschleunigung (g = 9,81 m/s ²)
g	Gramm
GALT	gut associated lymphoid tissue (darmassoziiertes Lymphgewebe)
h	Stunde(n)
IC	Indeterminate Colitis
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin

Inv	Invasin
kDa	Kilodalton
KT	Kontrollgruppe
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
MC	Morbus Crohn
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
M_r	relative molekulare Masse
NC	Nitrozellulose
NHS	N-Hydroxysuccinimidester
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
Pat.	Patient
PBC	primär biliäre Zirrhose
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
pI	isoelektrischer Punkt
Pr.	Probe
PRK	Proteinkinase C-like 2
rpm	rounds per minute
RSK1	ribosomale S6-Proteinkinase
Tab.	Tabelle
TNF α	Tumornekrosefaktor α
u.a.	und andere(n), unter anderem/n
V	Volt
vgl.	vergleiche
vHAI	van Hees Aktivitätsindex
Vol.	Volumen
vs.	versus

W	Watt
YadA	Yersinia adhesin A
Yop	Yersinia outer protein

12. DANKSAGUNG

Ohne die Unterstützung anderer wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Ich danke

- o Prof. Dr. med. Eduard F. Stange, Leitender Arzt der Klinik für Gastroenterologie der Medizinischen Universität zu Lübeck, sowie seinem Nachfolger, Prof. Dr. med. Diether Ludwig, die mir das Thema überlassen und die Arbeit betreut haben,
- o Dr. rer. nat. Björn E. Wenzel, Leiter des Immunologischen Labors der Medizinischen Klinik I der Universität zu Lübeck, und Sylvia Grammerstorf-Roche, MTA, die mich in die Arbeit eines immunologischen Labors eingewiesen und mich beim experimentellen Teil der Arbeit fachkundig unterstützt und immer wieder versucht haben, alle meine Fragen zufrieden stellend zu beantworten,
- o PD Dr. rer. physiol. Hans-Jürgen Friedrich, bis 2002 stellvertretender Leiter des Instituts für Medizinische Statistik und Dokumentation (heute: Institut für Medizinische Biometrie und Statistik), der mich zur statistischen Auswertung der Daten beraten und mir die technischen Möglichkeiten des Instituts dafür zur Verfügung gestellt hat,
- o Dr. Jürgen Scheibner und César Chávez, die mir bei Problemen mit den Widerspenstigkeiten der PC-Welt geduldig beigestanden haben,
- o Thomas Legband, der die Blots hoch auflösend eingescannt hat, und Gesine Krüger, die Blots und Grafiken zu einer ansehnlichen Form verholfen hat,
- o meiner Familie und meinen Freunden für ihre Geduld und ihr Verständnis.

13. Lebenslauf



ZUR PERSON

Nina Drexelius

geboren am 21. Juni 1966 in Hamburg

verheiratet, ein Sohn (* 1996)

AUSBILDUNG

08/72 bis 07/85	Grundschule und Gymnasium in Hamburg Abitur mit der Note 1,2
10/85 bis 11/92	Studium der Humanmedizin in Lübeck und Córdoba (Argentinien) Ärztliche Prüfung 11/92 in Lübeck mit der Gesamtnote 1,66
06/98 bis 05/99	Journalistische Ausbildung („Fachzeitschriftenredakteurin“) Klett WBS, Hamburg Abschluss „mit sehr gutem Erfolg“
04/99 bis 05/99	Praktikum Hamburger Abendblatt Medizin-Redaktion

TÄTIGKEITEN

11/85 bis 12/93	Arbeit in der Krankenpflege, Lübeck
01/94 bis 07/95	Ärztin im Praktikum, Innere Medizin/Kardiologie Allgemeines Krankenhaus St. Georg, Hamburg

01/96 bis 10/97	Dozentin für Krankheitslehre, Altenpflegeschule des Instituts für berufliche Qualifikation (Lübeck) und Krankenpflegeschule der Medizinischen Universität zu Lübeck
06/99 bis 05/01	Redakteurin bei MJR Hamburg (Medizin Journalistik Rückert)
seit 04/99	freie journalistische Tätigkeit für medizinische Fachzeitschriften, Tageszeitungen u.a.
seit 06/01	ausschließlich als freie Journalistin tätig (für Hebammenforum, Thieme Verlag u.a.)

AUSLANDSAUFENTHALTE

08/79 bis 07/80	Villajoyosa, Spanien Besuch der 8. Klasse einer Grundschule, Schulabschluss
09/88 bis 10/88	Suratthani, Thailand Praktikum in einem Krankenhaus
04/89 bis 03/90	Córdoba, Argentinien Studium an der Universidad Nacional de Córdoba
10/91 bis 09/92	Córdoba, Argentinien Praktisches Jahr in verschiedenen Krankenhäusern

BESONDERE KENNTNISSE

Sprachen	Englisch, Spanisch (beide fließend) Französisch (Grundkenntnisse)
EDV	PC und Mac u.a. Word, QuarkXPress, PageMaker, Photoshop, Excel
Interessen	Fotografie (Spiegelreflex) Sprache (Lesen, Schreiben, Fremdsprachen) Musik (Klavier) Pflanzen

Hamburg, Mai 2006

Nina Jendrus