

Medizinische Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

aus der Medizinischen Klinik I,

Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie

Direktor: Prof. Dr. med. M. Zeitz

**Morbus Crohn:
Mechanismen der epithelialen Barrierestörung
und der therapeutische Effekt von TNF α -Antikörpern**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung
der medizinischen Doktorwürde

an der Charité - Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Sebastian Zeißig
aus Zittau

Referent: Prof. Dr. med. J.-D. Schulzke

Koreferent: Prof. Dr. med. J. Schölmerich

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 27.5.2005

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	9
1.1	Die epitheliale Barriere	9
1.1.1	Bestandteile der epithelialen Barriere	9
1.1.2	Zelluläre Integrität, Apoptose und epitheliale Barrierefunktion	9
1.1.3	Tight junctions	10
1.2	Morbus Crohn	11
1.2.1	Historie, Epidemiologie, Klinik, Diagnostik	11
1.2.2	Ätiologie und Pathophysiologie des M. Crohn	13
1.2.3	Therapie des M. Crohn	15
1.3	Zielstellung der Arbeit	17
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Material	18
2.1.1	Materialien und Geräte	18
2.1.2	Chemikalien	19
2.1.3	Puffer und Lösungen	22
2.1.4	Software	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Patienten und Biopsieentnahme	27
2.2.2	Transport und Weiterverarbeitung der Biopsien	27
2.2.3	Miniaturisierte Ussing-Kammer	28
2.2.4	Wechselstrom-Impedanzanalyse	32
2.2.5	Proteingewinnung aus Biopsien und Western Blot-Verfahren	35
2.2.6	Färbeverfahren	40
2.2.7	Immunhistochemie und konfokale Mikroskopie	45
2.2.8	Elektronenmikroskopische Tight junction-Analyse	46
2.2.9	Statistik	50
3	ERGEBNISSE	51
3.1	Einleitung	51
3.2	Krankheitsaktivität	52
3.3	Wechselstrom-Impedanz-Analyse der Barrierefunktion	53
3.4	Veränderung der epithelialen Apoptoserate	56
3.5	Expressionsveränderungen von Tight junction-Proteinen unter TNF α -Antikörper-Therapie	59

3.6	Bedeutung der epithelialen Apoptoserate für die Barriere-Restitution unter TNF α -Antikörper-Therapie	60
3.7	Veränderte Expression von Tight junction-Proteinen bei M. Crohn.....	62
3.8	Immunhistochemische Lokalisation der untersuchten Tight junction-Proteine.....	64
3.9	Elektronenmikroskopische Analyse morphologischer Tight junction-Veränderungen bei M. Crohn	68
4	DISKUSSION	71
4.1	Rückgang der Krankheitsaktivität unter TNF α -Antikörper-Therapie	71
4.2	Wiederherstellung der epithelialen Barrierefunktion unter TNF α -Antikörper-Therapie	72
4.3	Verringerung der epithelialen Apoptoserate unter TNF α -Antikörper-Therapie.....	74
4.4	Die Erhöhung der Apoptoserate führt zu einer Störung der epithelialen Barrierefunktion.....	75
4.5	Tight junction-Veränderungen bei M. Crohn und ihre Beeinflussung durch eine TNF α -Antikörper-Therapie.....	76
5	ZUSAMMENFASSUNG	81
6	LITERATURVERZEICHNIS	84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Container einer miniaturisierten Ussing-Kammer und Messanordnung..	30
Abbildung 2. Ussing-Kammer mit in Container befindlichem Epithel sowie Wärmeaustauscher und Lösungsbegasung.....	31
Abbildung 3. Probenhalter für die Gefrierbruchherstellung vor und nach Bruchvorgang.	47
Abbildung 4. Denton DC 502 zur Gefrierbruchherstellung.....	48
Abbildung 5. Krankheitsaktivität der Patienten mit M. Crohn vor und 2 Wochen nach TNF α -Antikörpertherapie.....	52
Abbildung 6. Darstellung der Wechselstrom-Impedanz-Analyse in Nyquist-Diagrammen.	54
Abbildung 7. R ^e der Kontrollen und M. Crohn-Patienten vor und 2 Wochen nach TNF α -Antikörpertherapie.	55
Abbildung 8. HE-Färbung der Colon-sigmoideum-Biopsien eines Patienten vor und 2 Wochen nach TNF α -Antikörpertherapie.....	56
Abbildung 9. TUNEL- und DAPI-Färbung von Colon sigmoideum-Biopsien eines M. Crohn-Patienten.....	57
Abbildung 10. Apoptoserate im Colon sigmoideum von Kontrollen und Crohn-Patienten vor und 2 Wochen nach TNF α -Antikörpertherapie.	58
Abbildung 11. Darstellung der Expression der Tight junction-Proteine Occludin, Claudin-1 und Claudin-4 auf einem Immunoblot.....	60
Abbildung 12. Korrelation der Apoptoserate mit dem transepithelialen Widerstand nach Camptothecin-Stimulation in HT-29/B6.....	62
Abbildung 13. Expression von Tight junction-Proteinen bei Kontrollen und M. Crohn...	63
Abbildung 14. Immunfluoreszenz-Analyse von Tight junction-Proteinen bei Kontrollpatienten.....	66
Abbildung 15. Immunfluoreszenz-Analyse von Tight junction-Proteinen bei M. Crohn.....	67
Abbildung 16. Elektronenoptische Darstellung der Tight junction bei Kontrollen und M. Crohn	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Häufigkeit unterschiedlicher Lokalisationen bei M. Crohn.	12
Tabelle 2.	Pipettierschema für die Proteinbestimmung mit dem Tecan Spectra Mikrotiterplatten-Photometer.....	36
Tabelle 3.	Proteinmenge und epitheliale Fläche bei M. Crohn und Kontrollen.	40
Tabelle 4.	Protokoll zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung an Paraffinschnitten.....	41
Tabelle 5.	Protokoll zur TUNEL-Färbung an Paraffinschnitten.....	42
Tabelle 6.	Protokoll zur DAPI-Färbung an Paraffinschnitten.	43
Tabelle 7.	Protokoll zur CD3-Färbung an Paraffinschnitten.....	44
Tabelle 8.	CDAI-Berechnung am Beispiel eines M. Crohn-Patienten mit mittelschwerem Schub.....	50
Tabelle 9.	Epithelialer Widerstand (R^e), subepithelialer Widerstand (R^{sub}) und Gesamtwiderstand (R^t) bei Kontrollen und M. Crohn.....	53
Tabelle 10.	Statistische Auswertung elektronenmikroskopischer Daten.....	68

Verzeichnis der Abkürzungen

A.	Aqua
AK	Antikörper
BSA	Bovines Serum-Albumin
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CLDN	Claudin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylen-Glycol-Bis(β -Aminoethyl-Ether)-N, N, N', N'-Tetraacetylsäure
FKS	Fötales Kälberserum
KTR	Kontrolle
M. Crohn	Morbus Crohn
OCLN	Occludin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline/Tween
R^t	Gesamtwiderstand des Epithels
R^e	Widerstand des Epithels
R^{sub}	Widerstand des Subepithels
SDS	sodium dodecyl sulfate
TJ	Tight junction
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase [TdT]-mediated deoxyuridinetriphosphat [dUTP] nick end-labeling