

3 Ergebnisse

3.1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Biopsien aus dem Colon sigmoideum von 11 Patienten mit therapierefraktärem M. Crohn vor und dann 2 Wochen nach Einmalgabe eines TNF α -Antikörpers untersucht. Als Kontrollkollektiv dienten 8 Patienten, die zum Ausschluss eines Tumors oder einer intestinalen Blutung kolonoskopiert und biopsiert wurden. Ziel dieses ersten Teils der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses einer TNF α -Antikörper-Therapie auf die epitheliale Barriere. Dabei wurden neben der Untersuchung der Barrierefunktion durch Wechselstrom-Impedanzanalyse auch die maßgeblichen Komponenten dieser Barriere, epitheliale Apoptoserate und Tight junction-Proteine analysiert. Zur Untersuchung der Bedeutung der epithelialen Apoptose für die Barriererestitution unter TNF α -Antikörper-Therapie erfolgte darüber hinaus eine selektive Induktion von Apoptosen im intestinalen Zellmodell HT-29/B6. Die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit sind in Kapitel 3.2 bis 3.6 dargestellt.

Die TNF α -Antikörper-Therapie führte zu einer Verminderung der epithelialen Apoptoserate mit konsekutiver Barriere-Wiederherstellung. Da die Antikörper-Behandlung jedoch keine Auswirkungen auf die drei untersuchten Tight junction-Proteine hatte, stellte sich die Frage, ob die Barrierestörung bei M. Crohn allein auf einer erhöhten Apoptoserate bei ungestörter Tight junction-Funktion basiert. Zur Untersuchung dieser Fragestellung erfolgte in einer zweiten Serie von Experimenten eine weitergehende Analyse von Tight junction-Veränderungen bei M. Crohn. Dazu wurde die Expression verschiedener Tight junction-Proteine an einem Kollektiv von 10 Patienten mit geringem bis mittelschwerem M. Crohn im Vergleich zu 10 Kontrollpatienten untersucht. Die Expressionsanalyse umfasste dabei nicht nur die drei unter TNF α -Antikörper-Therapie untersuchten Tight junction-Proteine Occludin, Claudin-1 und Claudin-4, sondern auch die neu beschriebenen Proteine Claudin-2, -3 und -5. Darüber hinaus erfolgte eine Lokalisation der Tight junction-Proteine durch immunhistochemische Färbung und konfokale Lasermikroskopie sowie eine quantitative Gefrierbruch-elektronenmikroskopische Analyse der Tight junction. Die Darstellung dieser Ergebnisse erfolgt in Kapitel 3.7 bis 3.9.

3.2 Krankheitsaktivität

Zur initialen Einstufung der Krankheitsaktivität des untersuchten Patientenkollektivs sowie zur Verlaufsbeurteilung wurde der Crohn's disease activity index (CDAI) verwendet. Dieser von Best und Mitarbeitern erarbeitete Index [72] errechnet sich aus subjektiven (Allgemeinbefinden, Bauchschmerzen) und objektiven (Hämatokrit, Gewicht) Parametern, deren Punktschwere die individuelle Krankheitsaktivität widerspiegelt. Ein Patient konnte nach Abschluss der Therapie nicht mehr erreicht werden, so dass die Daten auf einer n-Zahl von 10 basieren. Der mittlere Punktwert der behandelten Patienten lag vor Therapie bei 266 ± 30 entsprechend einer mittelschweren Schubaktivität und verringerte sich auf 122 ± 21 Punkte entsprechend Werten in Remission ($p < 0,01$) 2 Wochen nach Antikörpergabe (Abbildung 5).

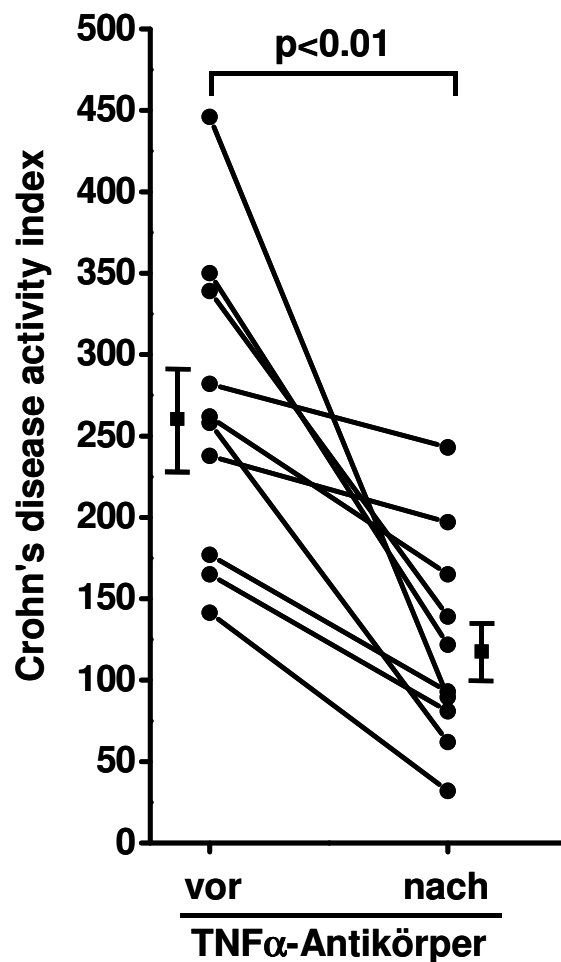


Abbildung 5. Krankheitsaktivität der Patienten mit M. Crohn ($n = 10$) vor und 2 Wochen nach TNF α -Antikörper-Therapie. Die Bestimmung erfolgte mittels Crohn's Disease Activity Index nach Best. Dargestellt sind Einzelwerte und Mittelwerte \pm SEM.

3.3 Wechselstrom-Impedanz-Analyse der Barrierefunktion

Zur Quantifizierung der epithelialen Barriestörung bei M. Crohn wurde in miniaturisierten Ussing-Kammern eine Impedanz-Analyse durchgeführt. Abbildung 6 zeigt drei originale Nyquist-Diagramme. Die statistische Auswertung ist in Tabelle 9 und Abbildung 7 dargestellt.

	R^e in $\Omega \cdot \text{cm}^2$	R^{sub} in $\Omega \cdot \text{cm}^2$	R^t in $\Omega \cdot \text{cm}^2$	n
Kontrolle	42 ± 3	9 ± 1	50 ± 2	8
M. Crohn vor Therapie	24 ± 3^a	22 ± 3^a	47 ± 3	9
M. Crohn nach Therapie	34 ± 3^b	20 ± 4	53 ± 5	9

Tabelle 9. Epithelialer Widerstand (R^e), subepithelialer Widerstand (R^{sub}) und Gesamtwiderstand (R^t) bei Kontrollen und M. Crohn.

Bezüglich der Errechnung von R^e , R^{sub} und R^t siehe Methoden. ^a $p < 0,01$ bei Vergleich M. Crohn vs. Kontrolle. ^b $p < 0,01$ bei Vergleich M. Crohn nach Therapie vs. M. Crohn vor Therapie. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM.

Aufgrund der unzureichenden Größe zweier Biopsien konnte nur bei 9 Patienten eine gepaarte Datenauswertung erfolgen.

Der epitheliale Widerstand (R^e) des Kontrollkollektivs war mit $42 \pm 3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n = 8$) höher als der der untherapierten M. Crohn-Patienten ($24 \pm 3 \Omega \cdot \text{cm}^2$; $n = 9$; $p < 0,001$), die nahezu eine Halbierung des epithelialen Widerstandes verglichen mit Kontrollpatienten zeigten. Unter TNF α -Antikörper-Therapie zeigte sich ein Anstieg des epithelialen Widerstandes auf $34 \pm 3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($p < 0,01$ für R^e vor Therapie versus R^e nach Therapie). Während vor Therapie nur 2 von 9 M. Crohn-Patienten (22%) einen epithelialen Widerstand innerhalb des Normalbereichs (definiert als Mittelwert des Kontrollkollektivs ± 2 Standardabweichungen [$29\text{--}56 \Omega \cdot \text{cm}^2$; $n = 8$]) aufwiesen, waren es 2 Wochen nach TNF α -Antikörper-Therapie 6 von 9 Patienten (67%).

Trotz dieser signifikanten Verbesserung der epithelialen Barrierefunktion (8 von 9 untersuchten Patienten zeigten einen Anstieg des epithelialen Widerstandes) waren die epithelialen Widerstände der untersuchten M. Crohn-Patienten auch nach Therapie niedriger als die des Kontrollkollektivs ($p < 0,05$).

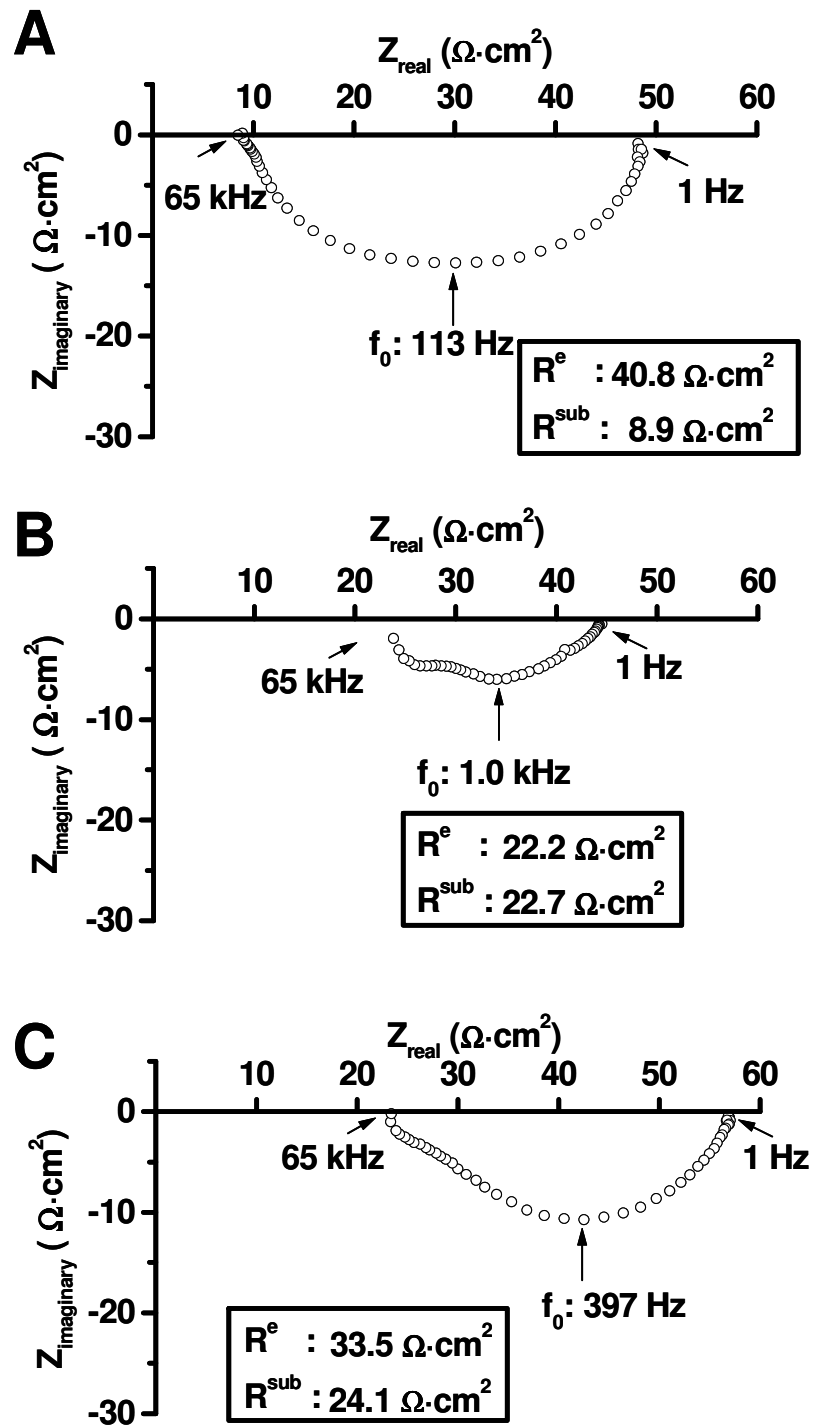


Abbildung 6. Darstellung der Wechselstrom-Impedanz-Analyse in Nyquist-Diagrammen. **A:** Kontrolle. **B:** Patient mit M. Crohn vor TNF α -Antikörper-Therapie. **C:** Patient mit M. Crohn 2 Wochen nach TNF α -Antikörper-Therapie. Z_{real} stellt die Ohm'sche Komponente, $Z_{\text{imaginary}}$ die reaktive Komponente der elektrischen Impedanz dar. Die Schnittpunkte des Halbkreises mit der x-Achse bei niedrigen und hohen Frequenzen ergeben R^t und R^{sub} . R^t minus R^{sub} ergibt R^e .

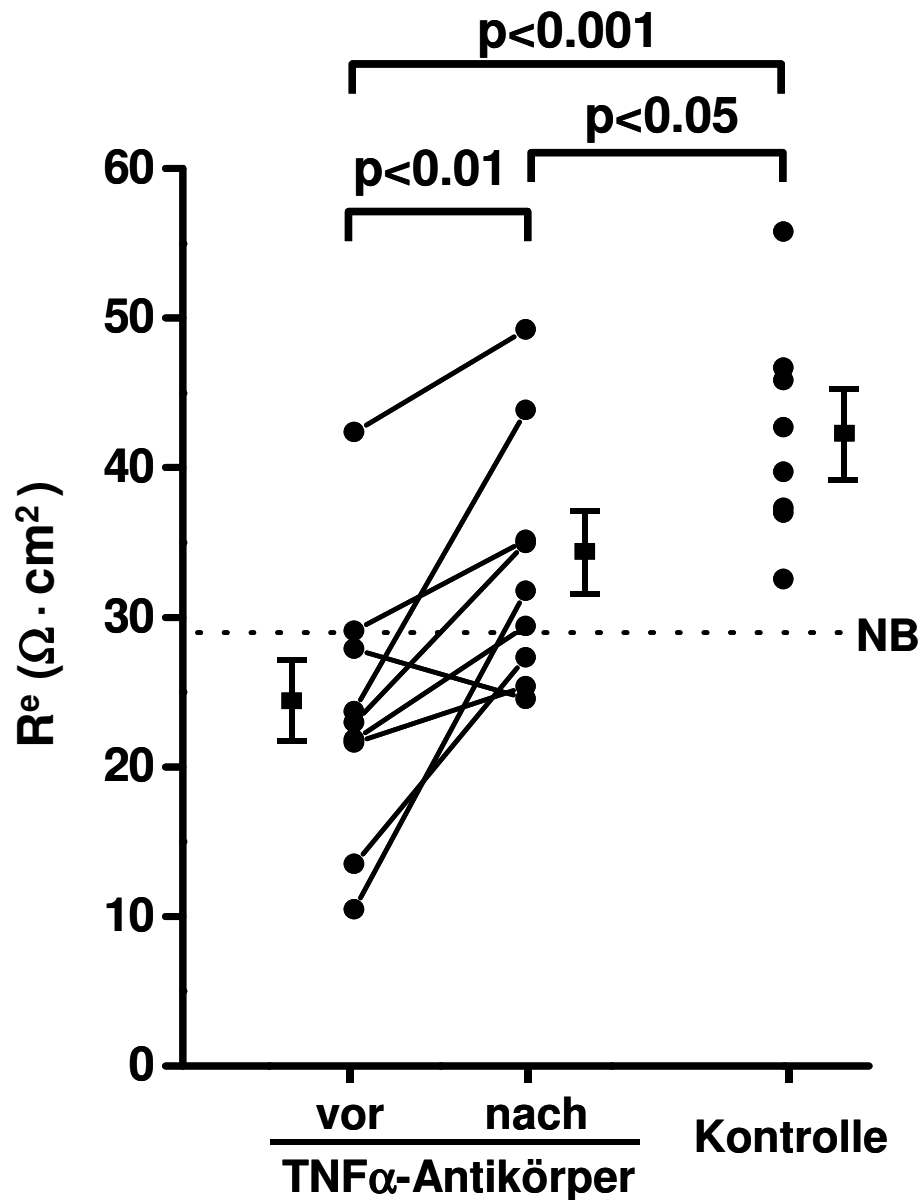


Abbildung 7. R^e der Kontrollen ($n = 8$) und M. Crohn-Patienten ($n = 9$) vor und 2 Wochen nach $\text{TNF}\alpha$ -Antikörper-Therapie. Dargestellt sind Einzelwerte und Mittelwerte \pm SEM. Die untere Grenze des Normalbereichs (Mittelwert des Kontrollkollektivs minus 2 Standardabweichungen) ist als gepunktete Linie dargestellt.

Im Gegensatz zur Erniedrigung des epithelialen Widerstand war der subepitheliale Widerstand der 9 untersuchten M. Crohn-Patienten vor Therapie deutlich höher als im Kontrollkollektiv ($22 \pm 3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ [$n = 9$] vs. $9 \pm 1 \Omega \cdot \text{cm}^2$ [$n = 8$]; $p < 0,01$). Diese Erhöhung des subepithelialen Widerstandes stellt das elektrophysiologische Korrelat der entzündlichen Veränderungen innerhalb der Lamina propria dar (Abbildung 8A). Innerhalb des 14-tägigen Untersuchungsintervalls zeigte sich trotz deutlichem Rückgang des entzünd-

lichen Zellinfiltrats in der Lamina propria (Abbildung 8B) allerdings keine signifikante Veränderung des subepithelialen Widerstandes ($20 \pm 4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ nach Therapie vs. $22 \pm 3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ vor Therapie).

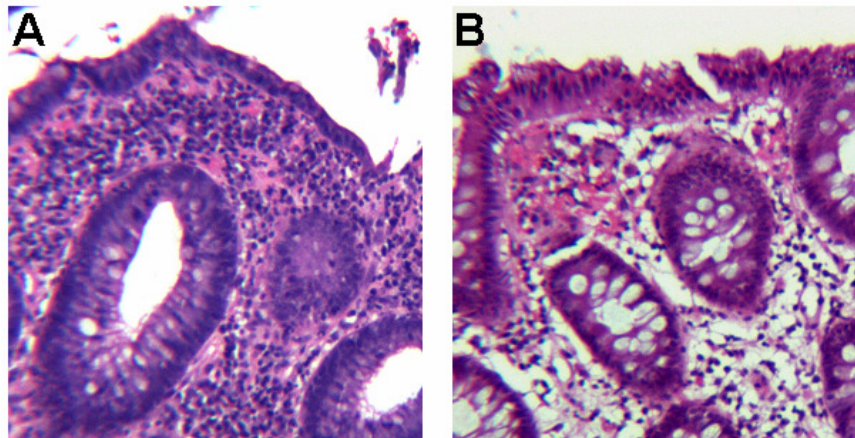


Abbildung 8. HE-Färbung der Colon-sigmoideum-Biopsien eines Patienten vor (A) und 2 Wochen nach (B) TNF α -Antikörper-Therapie.

Nach Therapie ist neben einer Normalisierung der Epithel- und Zellarchitektur vor allem ein deutlicher Rückgang des entzündlichen Infiltrats in der Lamina propria zu beobachten. Vergrößerung 200-fach.

3.4 Veränderung der epithelialen Apoptoserate

Epitheliale Barrierestörungen mit einer konsekutiven Erniedrigung des epithelialen Widerstandes können die Folge einer Vielzahl verschiedener Ursachen sein. So können neben Erosionen und Ulzerationen auch eine Erhöhung der epithelialen Apoptoserate [1] sowie eine verminderte Expression abdichtender Tight junction-Proteine [43] beziehungsweise eine erhöhte Expression porenbildender Tight junction-Proteine [18] eine Barrierestörung verursachen. Um den Einfluss von Veränderungen der epithelialen Apoptoserate und der Expression von Tight junction-Proteinen auf die epitheliale Barriere untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit auf die Biopsieentnahme aus Darm-Arealen mit erosiven oder ulzerösen Läsionen verzichtet, da dort die epitheliale Barriere in der Regel komplett zerstört ist.

Es wurden zunächst histologische Schnitte von Biopsien aus dem Colon sigmoideum der 11 M. Crohn-Patienten sowie von 8 Kontrollpatienten hergestellt. Diese Schnitte wurden jeweils durch TUNEL oder mit DAPI gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Entsprechend den im Methodenteil beschriebenen Kriterien erfolgte eine

Quantifizierung apoptotischer intestinaler Epithelzellen mit prozentualer Angabe des Anteils apoptotischer Epithelzellen an allen im jeweiligen Schnitt sichtbaren Epithelzellen. Um auszuschließen, dass es sich bei den apoptotischen Zellen um intraepitheliale T-Lymphozyten handelt, wurden aufeinander folgende Serienschritte wechselseitig durch TUNEL beziehungsweise mit einem CD3-Antikörper angefärbt. CD3-positive Zellen waren dabei stets TUNEL-negativ, so dass eine signifikante Beteiligung apoptotischer T-Lymphozyten an den innerhalb des Epithels liegenden apoptotischen Zellen ausgeschlossen werden konnte.

Abbildung 9 zeigt 2 typische TUNEL- und DAPI-Färbungen. In Abbildung 10 sind die Ergebnisse der Apoptoseauswertung aller TUNEL- und DAPI-Schnitte wiedergegeben. Da sich die Resultate beider Färbungen kaum voneinander unterscheiden, werden im folgenden Text nur die Ergebnisse der TUNEL-Färbung diskutiert.

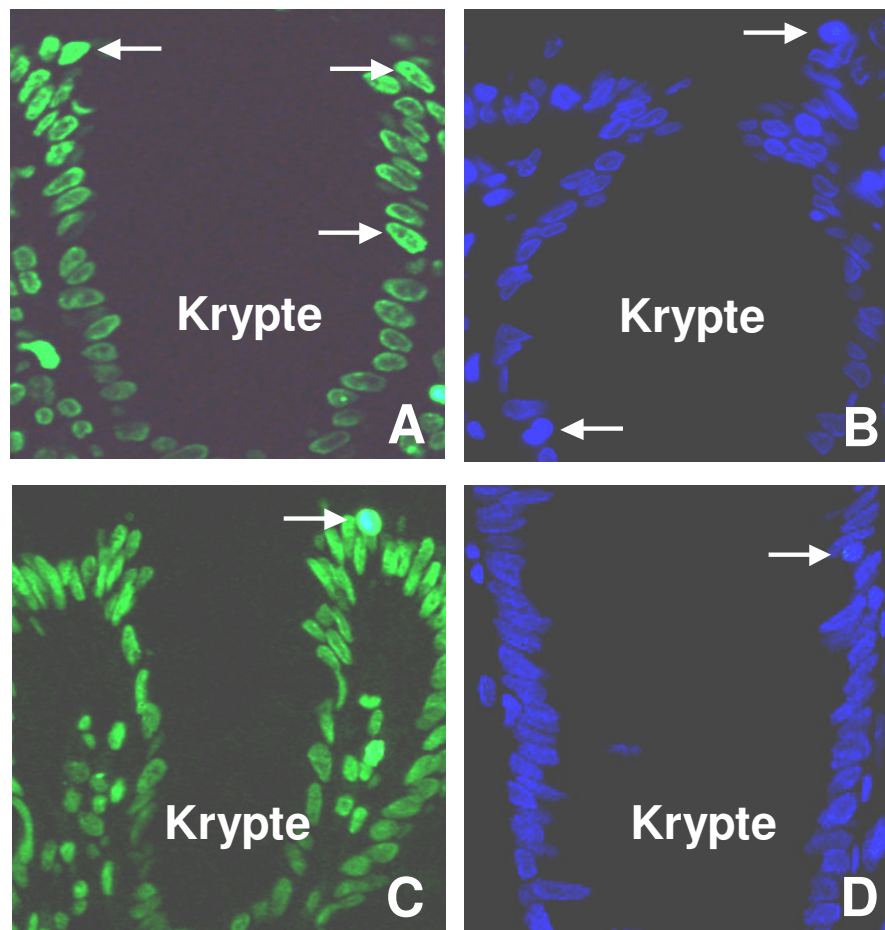


Abbildung 9. TUNEL- (A, C) und DAPI-Färbung (B, D) von Colon sigmoideum-Biopsien eines M. Crohn-Patienten. Biopsien vor (A, B) und 2 Wochen nach TNF α -Antikörper-Therapie (C, D). Epitheliale Apoptosen sind durch Pfeile dargestellt. Vergrößerung 400-fach.

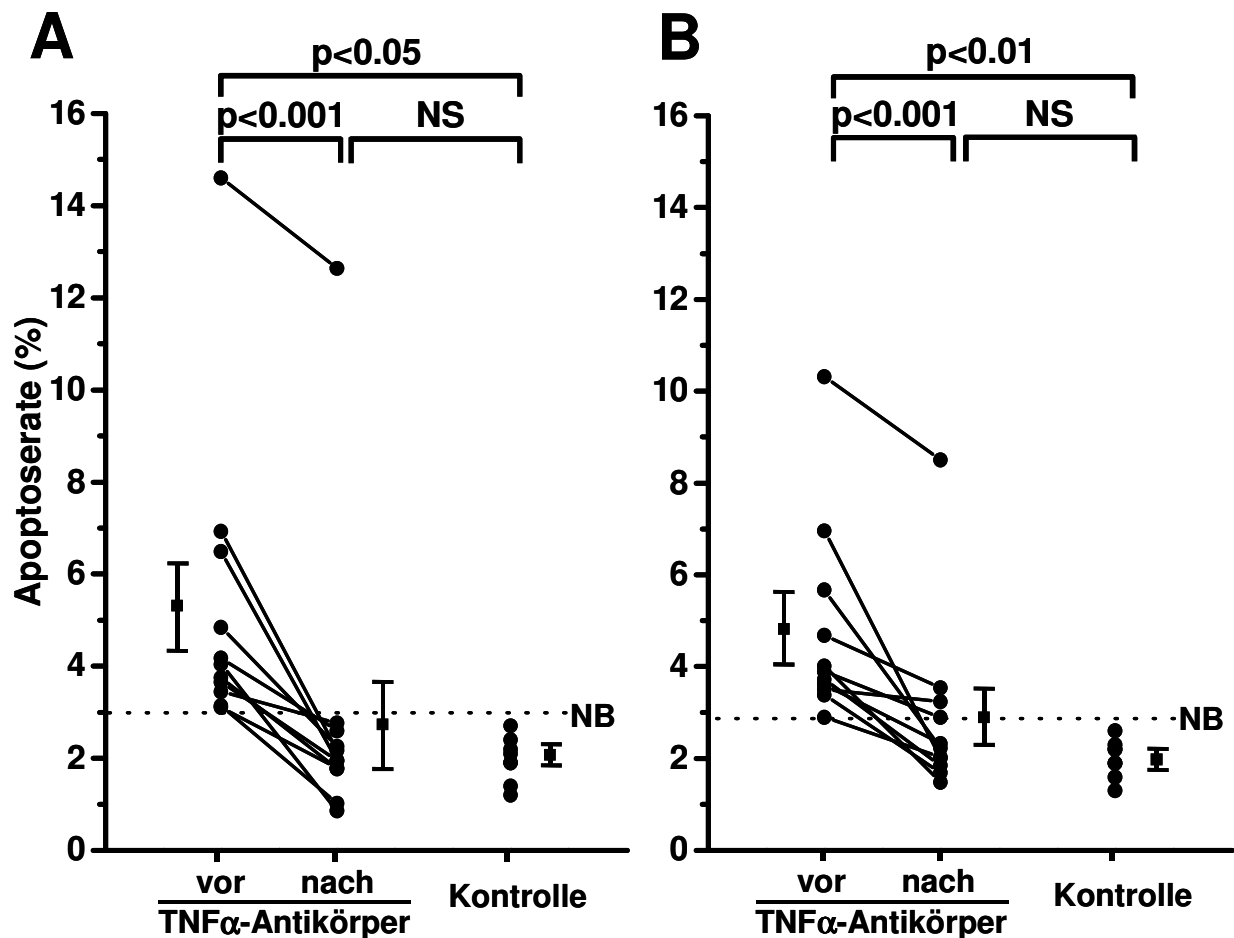


Abbildung 10. Apoptoserate im Colon sigmoideum von Kontrollen ($n = 8$) und M. Crohn-Patienten ($n = 11$) vor und 2 Wochen nach TNF α -Antikörper-Therapie. Die Färbung erfolgte durch TUNEL (**A**) beziehungsweise mit DAPI (**B**). Dargestellt sind Einzelwerte und Mittelwerte \pm SEM. Die obere Grenze des Normalbereichs (Mittelwert der Kontrolle + 2 Standardabweichungen) ist durch eine gepunktete Linie dargestellt. NS = nicht signifikant.

Die mittlere epitheliale Apoptoserate der M. Crohn-Patienten lag vor Therapie bei $5,3 \pm 1,0\%$ ($n = 11$). Dies entsprach mehr als einer Verdopplung der Apoptoserate verglichen mit den Werten des Kontrollkollektivs ($2,1 \pm 0,2\%$; $n = 8$; $p < 0,05$). Zwei Wochen nach TNF α -Antikörper-Gabe hatte sich die epitheliale Apoptoserate der untersuchten M. Crohn-Patienten auf $2,9 \pm 1,0\%$ ($n = 11$; $p < 0,001$) verringert. Während die epitheliale Apoptoserate aller untersuchten Crohn-Patienten vor Therapie außerhalb des Normalbereichs (definiert als Mittelwert des Kontrollkollektivs \pm 2 Standardabweichungen [1,2 bis 3,0; $n = 8$]) lag, wiesen zwei Wochen nach Antikörper-Gabe 10 von 11 Patienten (91%) eine Apoptoserate innerhalb des Normalbereichs auf. Bereits durch

eine Einmalgabe eines TNF α -Antikörpers war es somit möglich, die bei M. Crohn erhöhte intestinale Apoptoserate in den Bereich gesunder Kontrollpatienten zurückzuführen.

3.5 Expressionsveränderungen von Tight junction-Proteinen unter TNF α -Antikörper-Therapie

Zur Untersuchung des Einflusses einer TNF α -Antikörper-Therapie auf die Expression von Tight junction-Proteinen wurde die Expression dreier funktionell wesentlicher, abdichtender Tight junction-Proteine (Occludin, Claudin-1, Claudin-4) in Western Blots analysiert. Dazu wurde die für die einzelnen Tight junction-Proteine spezifische Signalstärke aus der Biopsie vor Therapie für jeden Patienten individuell als 100% definiert und zu dem auf dem selben Blot vorhandenen Signal aus der Biopsie nach Therapie ins Verhältnis gesetzt (in Prozent des vor-Therapie-Wertes). Bei 3 von 11 Patienten reichte das Material einer von beiden Biopsien allerdings nicht aus, um eine komplette Analyse durchzuführen. Ein Vergleich mit Kontrollen wurde nicht vorgenommen. Dieser erfolgte erst in einer weiterführenden Untersuchung an einem unabhängigen Kollektiv von M. Crohn-Patienten (siehe Kapitel 3.7)

Die Expression 14 Tage nach Einmalgabe von Infliximab zeigte praktisch unveränderte Werte sowohl für Occludin ($109 \pm 18\%$; $n = 8$) als auch für Claudin-1 ($114 \pm 25\%$; $n = 8$) und Claudin-4 ($108 \pm 6\%$; $n = 8$). Die TNF α -Antikörper-Therapie hatte somit keinen Einfluss auf die Expression dieser Tight junction-Proteine (Abbildung 11).

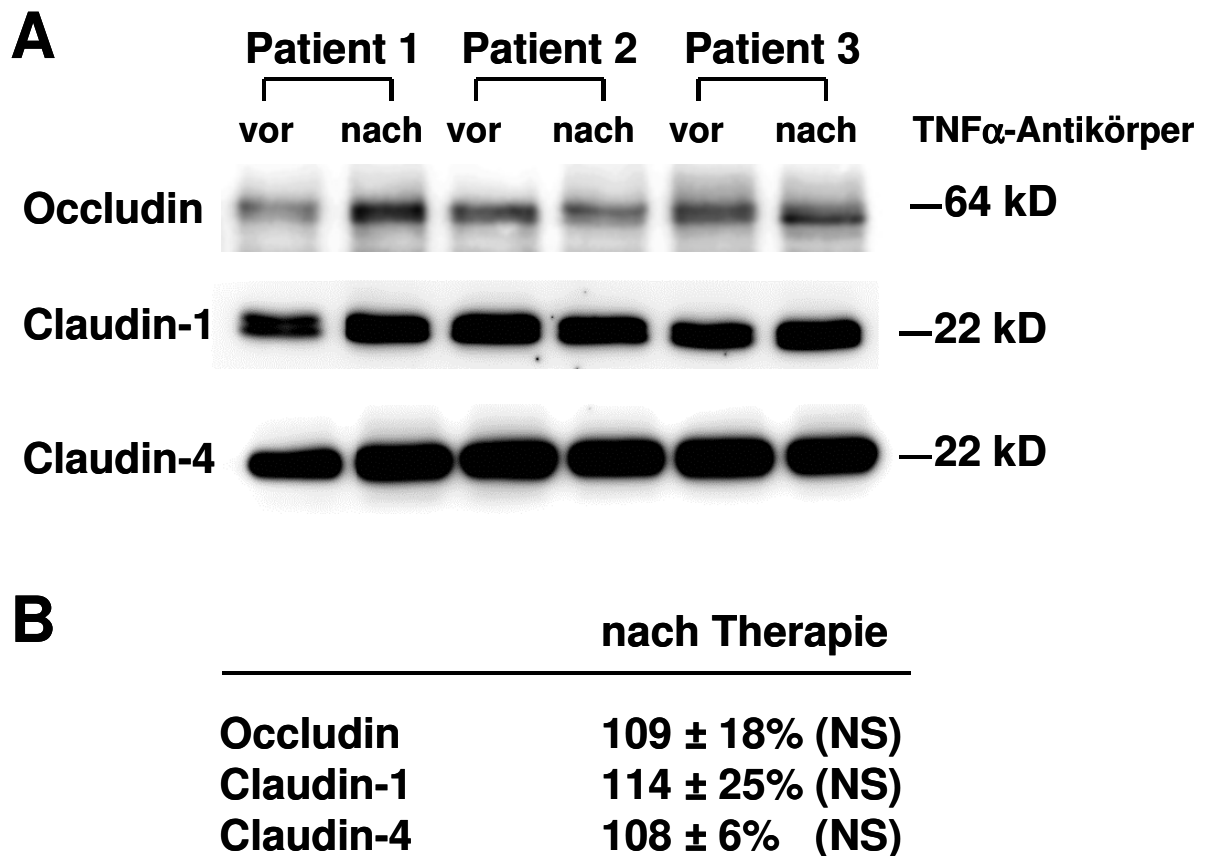


Abbildung 11. Darstellung der Expression der Tight junction-Proteine Occludin, Claudin-1 und Claudin-4 auf einem Immunoblot.

A: Ausschnitte aus 3 Western Blots für Occludin, Claudin-1 und Claudin-4 von je 3 M. Crohn-Patienten vor und 2 Wochen nach TNF α -Antikörper-Therapie.

B: Statistische Auswertung nach Densitometrie der Western Blot-Signale. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der Proteinexpression nach TNF α -Antikörper-Therapie in Prozent der Werte vor Therapie, welche als 100% gesetzt wurden. NS = nicht signifikant im Vergleich zur Proteinexpression vor Therapie.

3.6 Bedeutung der epithelialen Apoptoserate für die Barriere-Restitution unter TNF α -Antikörper-Therapie

Die Untersuchung des Einflusses einer TNF α -Antikörper-Therapie auf die intestinale Barriere bei M. Crohn zeigte eine Verbesserung der epithelialen Barrierestörung unter TNF α -Antikörper-Therapie, welche bei unveränderter Expression der untersuchten Tight junction-Proteine mit einer Reduktion der bei M. Crohn erhöhten epithelialen Apoptoserate einherging.

Da in humanen Biopsiepräparaten der direkte Einfluss einer erhöhten Apoptoserate auf epitheliale Widerstände und somit auf die Barrierefunktion des Epithels nicht quantifizierbar ist, wurde dieser Einflussfaktor in der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29/B6 untersucht.

Durch die Inkubation mit dem Topoisomerase-Hemmer Camptothecin wird in Konzentrationen bis 10 µg/ml selektiv Apoptose induziert, während epitheliale Tight junction-Proteine unbeeinflusst bleiben [67]. In der vorliegenden Arbeit wurden HT-29/B6 Zellen mit Medium ohne Camptothecin beziehungsweise mit einer Camptothecin-Konzentration von 0,2 µg/ml und 2 µg/ml inkubiert. Während die Apoptoserate der unbehandelten HT-29/B6-Zellen mit 2,6% den Werten des humanen Kontrollkollektivs (2,1% Apoptoserate) glich, führte die Zugabe von Camptothecin zu einer Erhöhung der Apoptoserate auf 3,3% (0,2 µg/ml Camptothecin) beziehungsweise 5,4% (2 µg/ml Camptothecin), entsprechend der Apoptoserate der unbehandelten M. Crohn-Patienten (5,3% Apoptoserate). Da die Tight junction-Proteine durch Camptothecin-Behandlung nachweislich nicht beeinflusst werden, war es möglich, durch parallele Widerstandsmessung den Effekt einer Erhöhung der epithelialen Apoptoserate auf die Barrierefunktion des Epithels zu quantifizieren (Abbildung 12). Der transepitheliale Widerstand der unbehandelten HT-29/B6-Monolayer lag im Mittel bei $452 \pm 20 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (2,6% Apoptoserate). Der Zusatz von Camptothecin führte bei einer Erhöhung der Apoptoserate auf 3,3% (0,2 µg/ml Camptothecin) zu einer konsekutiven Widerstandserniedrigung auf $404 \pm 37 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (nicht signifikant verglichen mit den Werten der unbehandelten Kontrolle) und bei Anstieg der Apoptoserate auf 5,4% (2 µg/ml Camptothecin) zu einer weiteren Verringerung des Widerstandes auf $269 \pm 37 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($p < 0,05$ verglichen mit den Werten der unbehandelten Kontrolle).

Eine Erhöhung der Apoptoserate von 2,6% auf 5,4% führte somit zur einer Widerstandserniedrigung um 40%. Der Vergleich zur Untersuchung der Biopsien von M. Crohn-Patienten zeigte unter Therapie eine Verringerung der Apoptoserate von 5,3% auf 2,9%, welche mit einer Widerstandserhöhung von 42% einherging. Die Zunahme des epithelialen Widerstandes unter TNF α -Antikörper-Therapie könnte somit gut durch die alleinige Herabregulation der epithelialen Apoptose erklärbar sein.

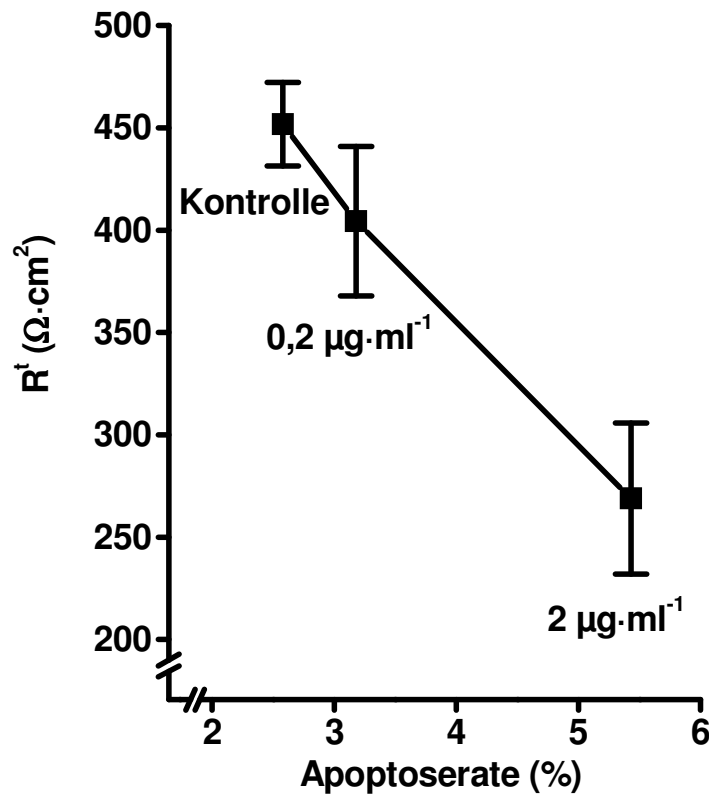


Abbildung 12. Korrelation der Apoptoserate mit dem transepithelialen Widerstand nach Camptothecin-Stimulation in HT-29/B6. HT-29/B6 vor (Kontrolle) und nach 48-stündiger Apoptoseinduktion mit $0,2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ und $2,0 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Camptothecin. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 6 unabhängigen Experimenten.

3.7 Veränderte Expression von Tight junction-Proteinen bei M. Crohn

Die Untersuchung des Einflusses einer TNF α -Antikörper-Therapie auf die epitheliale Barriestörung bei M. Crohn zeigte eine Barriere-Wiederherstellung aufgrund der Verringerung der epithelialen Apoptoserate. Die Antikörper-Therapie hatte dabei keinen Einfluss auf die Expression der drei untersuchten Tight junction-Proteine. Es stellte sich daher die Frage, ob die gestörte Barrierefunktion bei M. Crohn allein auf Apoptoseveränderungen zurückzuführen ist oder zusätzlich Tight junction-Veränderungen vorliegen. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde zunächst an einem von der TNF α -Antikörper-Studie unabhängigen Kollektiv von M. Crohn-Patienten ein Vergleich der Tight junction-Protein-Expression zu Kontroll-Patienten vorgenommen. Neben der Analyse von Occludin, Claudin-1 und Claudin-4 war nun auch eine Untersuchung von Claudin-2, -3 und -5 möglich, da Antikörper gegen diese Proteine inzwischen kommerziell erhältlich waren.

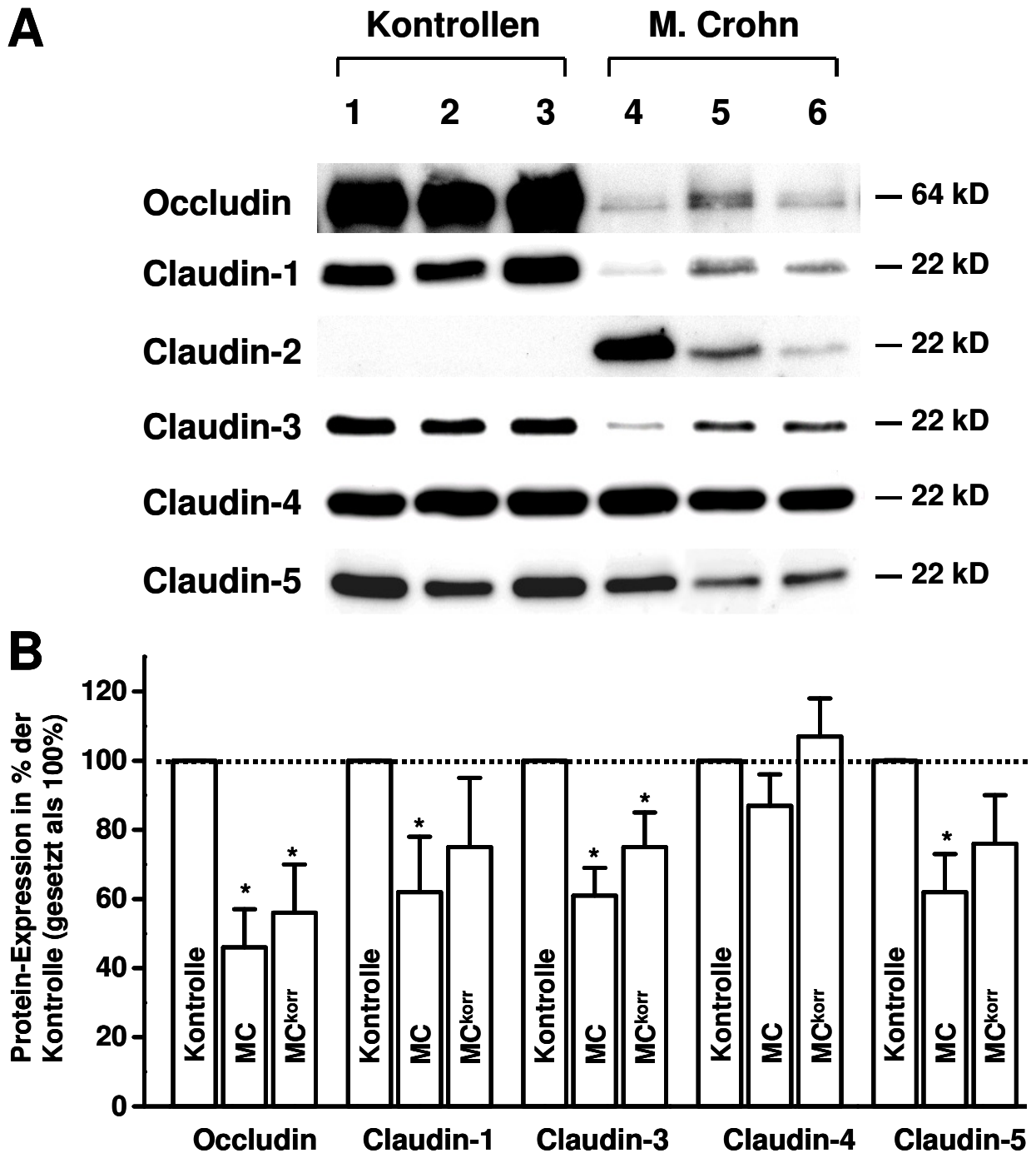


Abbildung 13. Expression von Tight junction-Proteinen bei Kontrollen und M. Crohn.
A: Western Blot von 3 Kontrollen und 3 M. Crohn-Patienten. **B:** Statistische Auswertung mittels Densitometrie. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der Proteinexpression von Kontrollpatienten und M. Crohn. Die Protein-Expression der Kontrollpatienten wurde jeweils als 100% gesetzt. Die Ergebnisse der M. Crohn-Patienten sind unkorrigiert (MC) und korrigiert für epitheliale Fläche und subepitheliales Protein (MC^{korr}) wiedergegeben. Die gepunktete Linie zeigt eine Protein-Expression von 100% an. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Abbildung 13A zeigt beispielhaft für drei Kontrollen und drei M. Crohn-Patienten den Nachweis Tight junction-spezifischer Signale aus den Biopsien. Zur Auswertung der densitometrischen Daten wurden die Detektionssignale der auf einem Blot aufgetragenen Kontrollen gemittelt und als 100% gesetzt. Die Expressionssignale der auf dem gleichen Blot vorhandenen M. Crohn-Proben wurden in Prozent der als 100% gesetzten Kontrolle angegeben.

Die unkorrigierten densitometrischen Ergebnisse zeigten eine verringerte Expression von Occludin, Claudin-1, -3 und -5 bei M. Crohn ($n = 10$). Da sich bei M. Crohn jedoch eine deutliche Vermehrung subepithelialen Gewebes nachweisen ließ, die zur Dilution der Tight junction-Proteine führte, wurden die densitometrischen Werte wie unter 2.2.5.6 beschrieben korrigiert. Nach der Korrektur zeigte sich eine im Vergleich zur Kontrolle verringerte Expression der Tight junction-Proteine Occludin ($56 \pm 14\%$ der Kontrolle; $p < 0,05$ vs. Kontrolle) und Claudin-3 ($75 \pm 10\%$ der Kontrolle; $p < 0,05$), während sich die Expression von Claudin-1 ($75 \pm 20\%$ der Kontrolle), Claudin-4 ($107 \pm 11\%$ der Kontrolle) und Claudin-5 ($76 \pm 14\%$ der Kontrolle) nun nicht mehr signifikant von der Kontrolle unterschied (Abbildung 13B). Die veränderte Signifikanz nach Korrektur unterstreicht die Bedeutung eines Korrekturfaktors bei der Untersuchung der Expression epithelialer Proteine bei chronisch entzündlichen Darmkrankheiten, die stets mit einer Verdickung subepithelialer Gewebsschichten einhergehen.

Während keine Biopsie eines Kontrollpatienten eine messbare Expression des porenbildenden Tight junction-Proteins Claudin-2 aufwies, konnte bei 6 von 10 M. Crohn-Patienten eine Expression detektiert werden (Abbildung 13A). Eine Quantifizierung mit Bezug auf die Kontrolle war jedoch bei fehlendem Kontrollsignal nicht möglich.

3.8 Immunhistochemische Lokalisation der untersuchten Tight junction-Proteine

Die Analyse der Tight junction-Protein-Expression in Western Blots ermöglicht die Quantifizierung der in Zellmembranen oder zytosolischen Vesikelmembranen gebundenen Proteinmenge. Es muss jedoch angenommen werden, dass nur die in der Tight junction verankerten Proteine den parazellulären Soluttransport regulieren, während beispielsweise in zytosolischen Vesikeln befindliche Proteine vermutlich nur einen Reservepool darstellen. Neben der Quantifizierung der Membranproteinmenge ist daher

eine Lokalisierung der Tight junction-Proteine auf zellulärer Ebene notwendig, um Expression und Lokalisationsveränderungen korrelieren zu können.

Zur Lokalisation der Tight junction-Proteine wurden Cryostatschnitte von Biopsien von 4 Kontroll- und 4 M. Crohn-Patienten angefertigt und die Lokalisation von Occludin und Claudin-1 bis -5 untersucht. Repräsentative Gewebefärbungen sind in Abbildung 14 und Abbildung 15 dargestellt.

Das Verteilungsmuster von Occludin zeigte sowohl bei Kontrollen als auch bei M. Crohn-Patienten neben der Lokalisation in der Tight junction eine zusätzliche Anfärbung der lateralen Zellmembran. Diese Verteilung war im Oberflächen- und Kryptenepithel gleichermaßen nachweisbar.

Claudin-1 konnte mit einem spezifischen, jedoch nicht für Immunfluoreszenz-Nachweise getesteten Antikörper weder bei Kontrollen noch bei M. Crohn-Patienten nachgewiesen werden. Da im Western Blot ein deutliches Claudin-1-Signal zu detektieren war und Claudin-1 im Subepithel nicht vorkommt, ist es wahrscheinlich, dass im Gewebe konformationsbedingt keine Antikörperbindung stattfindet, während diese am denaturierten Protein im Western Blot möglich ist. Immunfärbungen mit einem weiteren für Immunfluoreszenz-Nachweise getesteten Claudin-1-Antikörper zeigten Signale, die in ihrer Verteilung Claudin-3 entsprachen. Da jedoch gezeigt worden ist, dass dieser Antikörper mit Claudin-3 kreuzreagieren kann [10], kann nicht von einer Spezifität der Signale ausgegangen werden (Daten nicht dargestellt).

Claudin-2 war im Colon sigmoideum aller 4 Kontrollpatienten nicht nachweisbar. Bei 3 von 4 M. Crohn-Patienten zeigte sich jedoch eine deutliche Anfärbung im unteren Teil der Krypten. Claudin-2 war dabei streng apikal innerhalb der Tight junction lokalisiert.

Das Verteilungsmuster von Claudin-3 zeigte bei Kontrollpatienten neben einer Anfärbung innerhalb der Tight junction auch eine deutliche Anfärbung der lateralen Zellmembran, welche vor allem im Oberflächenepithel nachweisbar war. Bei allen untersuchten M. Crohn-Patienten zeigte sich entsprechend den Western Blot-Ergebnissen ein kaum nachweisbares Claudin-3-Signal, welches sich ausschließlich in der lateralen Zellmembran darstellte.

Claudin-4 wies sowohl bei Kontrollpatienten als auch bei M. Crohn-Patienten eine Lokalisation innerhalb der lateralen Zellmembran auf, welche vom Krypten- zum Oberflächenepithel hin zunahm. Es zeigte sich eine nur schwache Anfärbung innerhalb der Tight junction.

Claudin-5 war bei Kontrollpatienten im Krypten- und Oberflächenepithel streng apikal innerhalb der Tight junction lokalisiert, während alle 4 untersuchten M. Crohn-Patienten eine Umverteilung von Claudin-5 in die laterale Zellmembran aufwiesen, ohne dass eine Anfärbung innerhalb der Tight junction nachweisbar war.

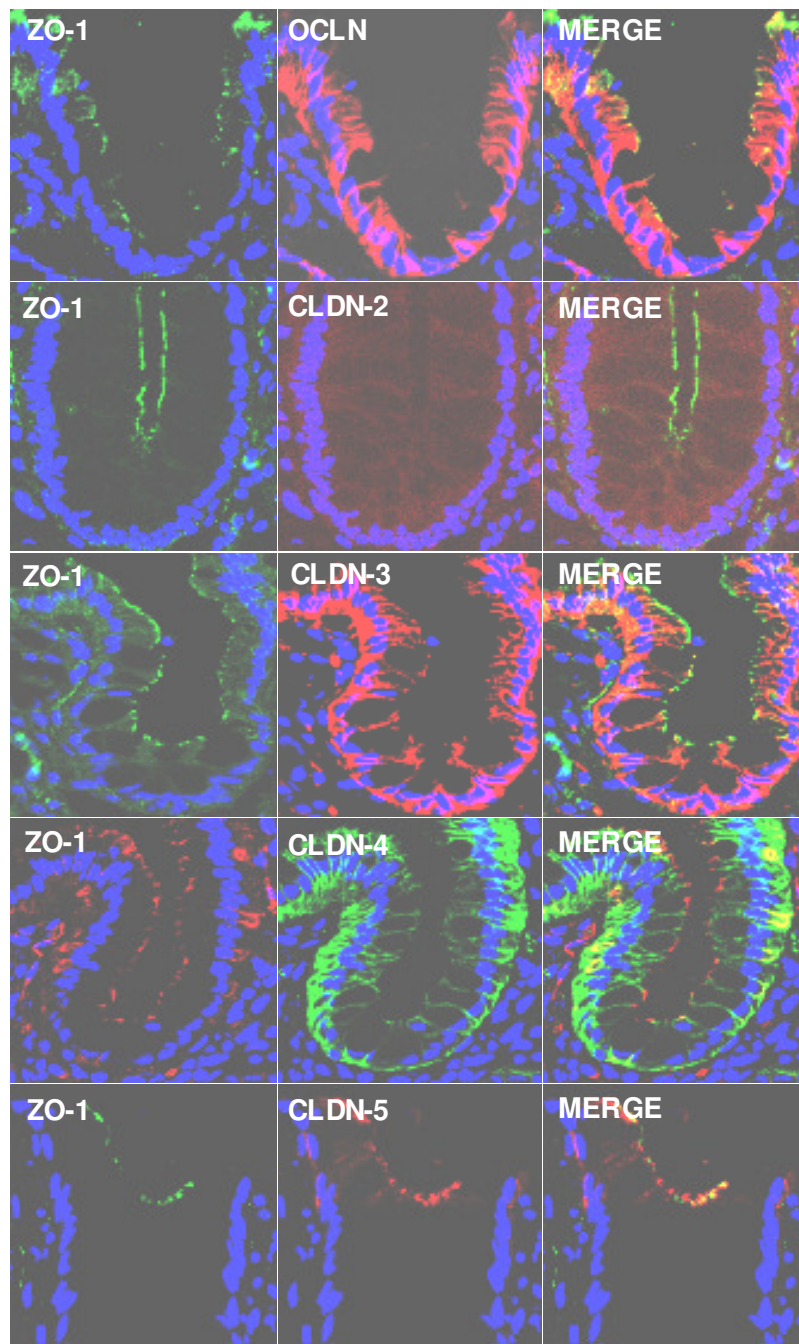


Abbildung 14. Immunfluoreszenz-Analyse von Tight junction-Proteinen bei Kontrollpatienten. ZO-1 (links), Occludin (OCLN) und Claudin (CLDN)-2-5 (Mitte) im Colon sigmoideum. Die Kolokalisation von ZO-1 und Occludin bzw. Claudin stellt sich gelb dar (rechts). Die Abbildungen zeigen den Übergangsbereich vom Oberflächen- ins Kryptenepithel. Claudin-2 ist am Kryptenboden dargestellt. Abbildungen 400-fach.

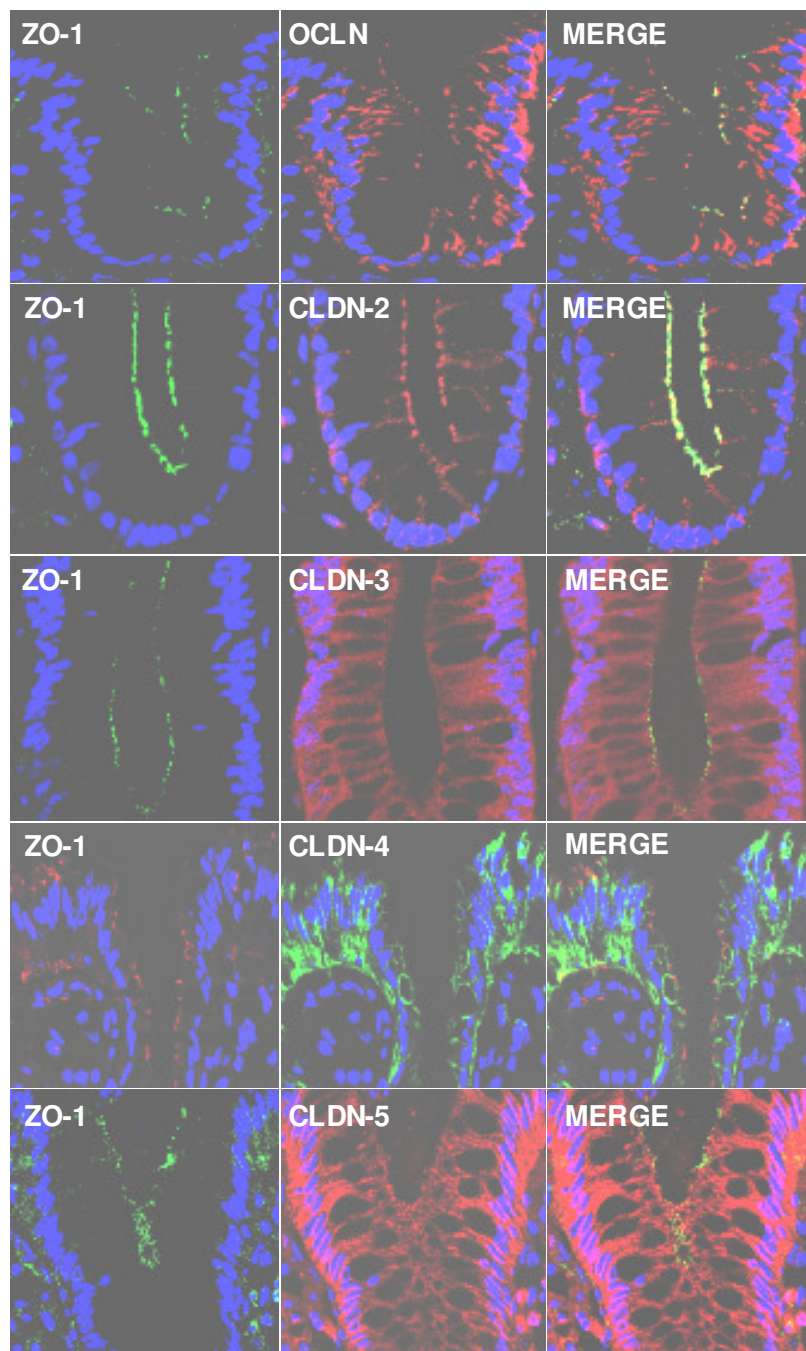


Abbildung 15. Immunfluoreszenz-Analyse von Tight junction-Proteinen bei M. Crohn. ZO-1 (links), Occludin (OCLN) und Claudin (CLDN)-2-5 (Mitte) im Colon sigmoideum. Die Kolokalisation von ZO-1 und Occludin bzw. Claudinen stellt sich gelb dar (rechts). Die Abbildungen zeigen den Übergangsbereich vom Oberflächen- ins Kryptenepithel. Claudin-2 ist am Kryptenboden dargestellt. Abbildungen 400-fach.

3.9 Elektronenmikroskopische Analyse morphologischer Tight junction-Veränderungen bei M. Crohn

Elektronenoptisch stellen sich Tight junctions als ein Netzwerk verschmelzende Stränge dar, welche die lateralen Zellmembranen zweier benachbarter Epithelzellen verbinden und den Interzellularrspalt abdichten. In einer Vielzahl von Arbeiten konnte ein Zusammenhang morphologischer Tight junction-Veränderungen mit funktionellen Veränderungen der epithelialen Barriere gezeigt werden [17, 42, 73]. So haben neben der Anzahl der verschmelzenden Tight junction-Stränge auch die Tiefe des Tight junction-Netzwerkes und die Morphologie der Stränge einen Einfluss auf die Barrierefunktion des Epithels.

Diese verschiedenen Einflussfaktoren wurden mittels Freeze-fracture-Elektronenmikroskopie bei Kontrollpatienten und M. Crohn-Patienten analysiert und quantifiziert. Die ausführliche Erklärung der Messparameter erfolgte im Kapitel 2.2.8, eine graphische Darstellung der Messparameter ist Abbildung 16 zu entnehmen, die statistische Auswertung ist in Tabelle 10 dargestellt.

	TJ-Stränge		Kompaktes TJ-Netzwerk (in nm)		Gesamtes TJ-Netzwerk (in nm)		n
	Oberfläche	Krypte	Oberfläche	Krypte	Oberfläche	Krypte	
Kontrolle	7,2 ± 0,2	7.0 ± 0,4	438 ± 18	395 ± 24	521 ± 54	510 ± 11	6
M. Crohn	4,7 ± 0,2*	4,4 ± 0,2*	363 ± 24*	348 ± 27	459 ± 58	412 ± 43	6

Tabelle 10. Statistische Auswertung elektronenmikroskopischer Daten.

TJ-Stränge = Anzahl parallel verlaufender funktioneller Tight junction-Stränge. Kompaktes TJ-Netzwerk = apiko-basale Tiefe des kompakten Anteils des Tight junction-Netzwerkes (ohne aberrante Stränge). Gesamtes TJ-Netzwerk = apiko-basale Ausdehnung des Tight junction-Netzwerkes vom apikalsten bis zum basalen strand (mit aberranten Tight junction-Strängen). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM; * p<0,05 vs. Kontrolle.

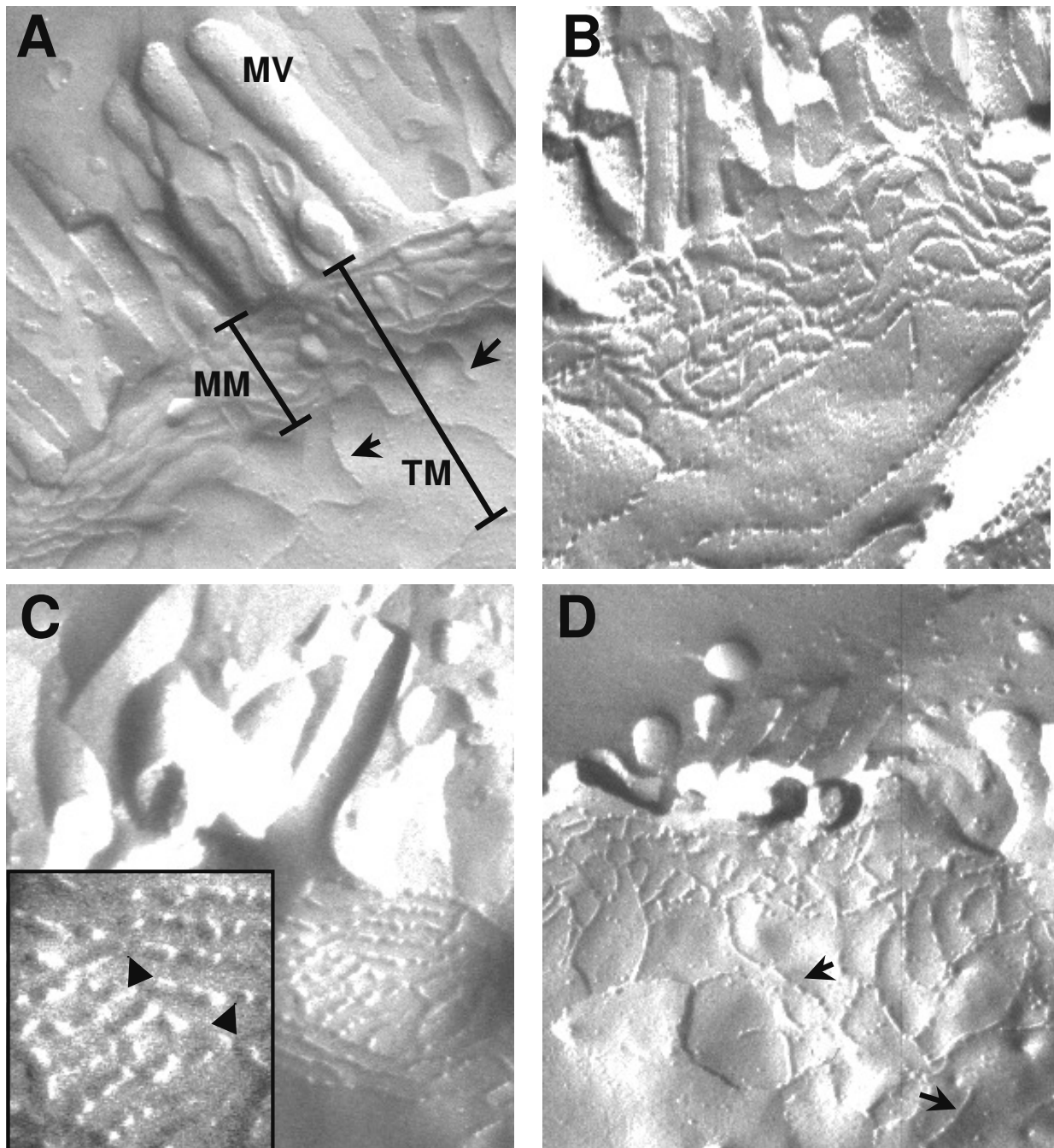


Abbildung 16. Elektronenoptische Darstellung der Tight junction bei Kontrollen (**A,B**) und M. Crohn (**C,D**).

A, C: Protoplasmatische Ansicht. **B, D:** Extrazelluläre Ansicht.

Darstellung der Messparameter in Abbildung A: MM = main meshwork = kompakter Anteil des Tight junction-Netzwerkes ohne aberrierende Stränge. TM = Total meshwork = Tight junction-Netzwerk vom apikalsten bis zum basalsten Strang inklusive aberrierender Stränge. Pfeile zeigen aberrierende, nicht funktionelle Tight junction-Stränge. Inset mit Pfeilköpfen in Abbildung C zeigt unterbrochene Tight junction-Stränge – sog. Stranddiskontinuitäten – bei M. Crohn. Vergrößerung 30.000-fach, Inset 60.000-fach.

Kontrollpatienten ($n = 6$) zeigten eine mittlere Anzahl von circa 7 parallel verlaufenden Tight junction-Strängen (Tabelle 10). Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen Oberflächen- und Kryptenregionen. Die mittlere Anzahl der Tight junction-Stränge war im Kollektiv der 6 M. Crohn-Patienten mit $4,7 \pm 0,2$ Tight junction-Strängen in Oberflächenregionen und $4,4 \pm 0,2$ Tight junction-Strängen in Kryptenregionen auf circa 2/3 der Kontrollwerte reduziert ($p < 0,05$ vs. Kontrolle). Mit dieser Reduktion der Anzahl von Tight junction-Strängen ging eine Verringerung der Tiefe des Tight junction-Netzwerkes einher. Während die Tiefe des kompakten Netzwerkanteils (funktionell wirksame Tight junction-Stränge) in Oberflächenregionen bei Kontrollpatienten im Mittel 438 ± 18 nm betrug, zeigte sich bei M. Crohn eine Reduktion auf 363 ± 24 nm ($p < 0,05$ vs. Kontrolle). In Kryptenregionen zeigte sich tendenziell ein ähnliches Verhältnis (395 ± 24 nm vs. 348 ± 27 nm), die Veränderungen erreichten hier jedoch keine Signifikanz. Die Gesamttiefe des Tight junction-Netzwerkes inklusive aberrierender, funktionell nicht relevanter Tight junction-Stränge zeigte sowohl in Oberflächen- als auch in Kryptenregionen keine signifikanten Unterschiede zwischen M. Crohn- und Kontrollpatienten. Ebenso unterschied sich die Anzahl aberrierender Tight junction-Stränge nicht zwischen Kontrollen und M. Crohn-Patienten ($0,4 \pm 0,1$ aberrierender Tight junction-Stränge pro funktionellem Strang bei Kontrollen vs. $0,3 \pm 0,1$ bei M. Crohn).

Auffallend war die durchweg unterschiedliche Morphologie der Tight junction-Stränge bei M. Crohn im Vergleich zur Kontrolle. Kontrollreplikas zeigten die für intestinale Epithelzellen typischen ununterbrochenen, erhabenen Stränge auf der P-Seite (protoplasmatische, intrazelluläre Ansicht, Abbildung 16A) und weitestgehend glatte, partikelfreie Rillen als Komplement auf der E-Seite (extrazelluläre Ansicht, Abbildung 16B). Tight junction-Stränge bei M. Crohn hingegen zeigten die für Claudin-2-haltige Tight junctions typischen diskontinuierlichen, gepunkteten Stränge auf der P-Seite (Abbildung 16C) [17].