

4 Diskussion

Seit Ende der 70er Jahre ist bekannt, dass die chronische transmurale Entzündung des Darmes bei M. Crohn mit einer Erhöhung der intestinalen Permeabilität einhergeht [36, 37]. Diese Erhöhung der Permeabilität ist pathophysiologisch bedeutsam, da sie eine gesteigerte Translokation von Bakterien und anderen als Antigen wirkenden Substanzen in die Lamina propria ermöglicht und somit zu einer weiteren Verstärkung der Entzündungsreaktion beiträgt [34, 39, 74]. Umgekehrt bedeutet das aber auch, dass ein therapeutischer Ansatz, der zur Normalisierung der epithelialen Barriere führt, die Entzündungsreaktion und damit auch die Krankheitssymptome (Diarrhö, Fieber, Bauchschmerzen) verringern kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Einfluss einer TNF α -Antikörper-Therapie auf die epitheliale Barrierestörung bei M. Crohn analysiert und die Mechanismen der Barriere-Wiederherstellung untersucht. In einem zweiten Teil der Arbeit erfolgte eine weiterführende Analyse von Tight junction-Veränderungen bei M. Crohn. Dabei wurde neben einer Untersuchung der Tight junction-Protein-Expression und der immunhistochemischen Lokalisierung dieser Proteine auch eine elektronenmikroskopische Quantifizierung von Tight junction-Veränderungen durchgeführt.

4.1 Rückgang der Krankheitsaktivität unter TNF α -Antikörper-Therapie

Zur Überprüfung der Wirksamkeit der Therapie wurde der Crohn's Disease Activity Index (CDAI) eines jeden Patienten vor und nach Therapie bestimmt. Da die Bestimmung des CDAI nicht innerhalb einer verblindeten Studie erfolgte, können die Ergebnisse jedoch lediglich als Anhaltspunkt für die klinische Verbesserung der untersuchten Patienten im Rahmen dieser Studie dienen. Die klinische Wirksamkeit einer Infliximab-Therapie bei therapierefraktären M. Crohn-Patienten wurde jedoch in mehreren prospektiven, kontrollierten und randomisierten Studien bewiesen [56, 75].

In der vorliegenden Arbeit zeigten alle 11 Patienten eine klinische Verbesserung unter TNF α -Antikörper-Therapie. Der CDAI sank von 266 ± 30 Punkten vor Therapie entsprechend einer mittelschweren Schubaktivität auf 122 ± 21 Punkte 2 Wochen nach Infliximab-Gabe ($p < 0,01$, siehe Abbildung 5) entsprechend Werten in Remission.

4.2 Wiederherstellung der epithelialen Barrierefunktion unter TNF α -Antikörper-Therapie

Zur Quantifizierung der epithelialen Barriestörung bei M. Crohn sowie zur Untersuchung des Einflusses einer TNF α -Antikörper-Therapie auf diese Barriestörung wurden Impedanzmessungen vor und nach Therapie durchgeführt. Die Impedanzmessung an Biopsien in miniaturisierten Ussing-Kammern stellt ein etabliertes Verfahren zur Beurteilung der epithelialen Barriere dar [76] und bietet eine Vielzahl von Vorteilen gegenüber der herkömmlichen Barriereuntersuchung durch Permeabilitätstests oder Gleichstromuntersuchung in konventionellen Ussing-Kammern. So kann im Gegensatz zu Permeabilitätstests, welche die renale Ausscheidung oral verabreichter Testsubstanzen messen [36], unter Ausschaltung von Störfaktoren wie Peristaltik, intestinaler Durchblutung oder renaler Störungen der Widerstand einer Biopsie unter Bezug auf eine definierte Fläche untersucht werden. Darüber hinaus kann im Gegensatz zu konventionellen Gleichstrommessungen der Anteil des Epithels und des Subepithels (Lamina propria) am Gesamtwiderstand bestimmt werden. Diese Unterscheidung ist von großer Bedeutung, da Präparate mit mukosaler Entzündung aufgrund der Verdichtung subepithelialer Kollagenfasern eine Erhöhung des subepithelialen Widerstandes aufweisen können [43], so dass der Gesamtwiderstand der Darmbiopsie trotz deutlich verringertem Epithelwiderstand unverändert bleibt (siehe Tabelle 9). Die alleinige Untersuchung des transepithelialen Widerstandes würde somit die epitheliale Barriestörung vollkommen maskieren.

Die Impedanzanalyse bei M. Crohn zeigte eine signifikante Störung der epithelialen Barrierefunktion mit einer Reduktion des epithelialen Widerstandes auf nahezu die Hälfte des Kontrollwertes. Diese Werte entsprechen weitestgehend den zuvor bei anderen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa [41] und kollagener Kolitis [43] erhobenen Daten und unterstreichen die Bedeutung der epithelialen Barriestörung in der Pathophysiologie dieser Erkrankungen. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist nicht klar, ob die initiale Aktivierung des mukosalen Immunsystems bei M. Crohn auf einen primären Defekt der Immunzellen zurückgeht [31, 77-80] oder aus einer kontinuierlichen Stimulation der Immunabwehr bei primärem Barrieredefekt resultiert [28, 38, 39, 74]. Es gibt jedoch zahlreiche Hinweise dafür, dass die bei gestörter epithelialer Barriere erhöhte Antigenaufnahme in die Lamina propria den mukosalen Entzündungsprozess kontinuierlich stimuliert [34, 39, 40, 81]. Eine Wiederherstellung der epithelialen Barriere bei M. Crohn könnte somit über Reduktion dieser Antigenaufnahme zum Erlö-

schen der mukosalen Immunantwort und eventuell sogar zur Ausheilung des Krankheitsprozesses führen. Endoskopisch konnte eine Ausheilung nach TNF α -Antikörper-Therapie zumindest bei einem Teil der Patienten gezeigt werden [82].

Zwei Wochen nach TNF α -Antikörper-Therapie zeigte sich im untersuchten Kollektiv von M. Crohn-Patienten ein Anstieg des epithelialen Widerstandes von $24 \pm 3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf $34 \pm 3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($p < 0,01$). Obwohl sich der mittlere epitheliale Widerstand nach Therapie noch immer von dem der Kontrollpatienten unterschied ($p < 0,05$), hatten nach Therapie 6 von 9 behandelten Patienten (67%) einen epithelialen Widerstand innerhalb des Normalbereichs (Mittelwert d. Kontrollen ± 2 Standardabweichungen) erreicht. Dieser Widerstandsanstieg und die damit verbundene Barrierewiederherstellung stellen somit möglicherweise den ersten Schritt auf dem Weg zur „Mukosaheilung“ dieser Patienten dar. Diese Ergebnisse stimmen auch mit zuvor erhobenen Daten von Permeabilitätstests überein, die zeigten, dass eine TNF α -Antikörper-Therapie zur Wiederherstellung der Barrierefunktion bei M. Crohn führt [60].

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen bei anderen chronisch entzündlichen Darmkrankheiten wie der kollagenen Kolitis [43] zeigte sich auch in dieser Arbeit ein im Vergleich zur Kontrolle erhöhter subepithelialer Widerstand. Diese Erhöhung des subepithelialen Widerstandes spiegelt den morphologischen Umbau des Subepithels im Rahmen chronischer Entzündungen wider. So fand sich neben einem entzündlichen Zellinfiltrat eine Verbreiterung der Subepithelschichten mit einer Verdichtung subepithelialer Kollagenfasern (Abbildung 8).

Innerhalb des Untersuchungsintervalls von 2 Wochen zeigte sich trotz deutlicher Reduktion des Zellinfiltrats in der Lamina propria keine Normalisierung der subepithelialen Widerstände. Diese Ergebnisse stimmen mit vorangegangenen histologischen Untersuchungen überein, welche 4 Wochen nach TNF α -Antikörper-Therapie eine weitestgehend unveränderte subepitheliale Architektur bei Reduktion des Zellinfiltrats zeigten [82]. In Hinblick auf die Halbwertszeit von Kollagenfasern, welche mehr als 200 Tage beträgt [83], müssten deutlich längere Intervalle gewählt werden, um solche histologischen Veränderungen untersuchen zu können. Darüber hinaus kommt den Veränderungen der subepithelialen Architektur bei M. Crohn nicht die gleiche Bedeutung zu wie bei anderen chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Während das nicht vaskularisierte subepitheliale Kollagenband bei kollagener Kolitis ein Resorptionshindernis darstellt, findet sich bei M. Crohn eine gute Vaskularisierung der Lamina

propria. Die subepithelialen Veränderungen bei M. Crohn sind daher im Vergleich zur kollagenen Kolitis von geringerer Bedeutung in Hinsicht auf Solutresorption und Induktion einer Diarrhö.

4.3 Verringerung der epithelialen Apoptoserate unter TNF α -Antikörper-Therapie

Für die Untersuchung der Biopsien nach TNF α -Antikörpergabe wurde ein Intervall von 14 Tagen gewählt. Dies sollte ermöglichen, neben Prozessen wie Apoptose, deren Regulation innerhalb weniger Stunden abläuft [57], auch langsamer ablaufende Vorgänge wie eine Änderung im Expressionsmuster der Tight junction-Proteine untersuchen zu können. Da die durch eine TNF α -Antikörper-Therapie erzeugten apoptotischen Veränderungen über mindestens 10 Wochen stabil bleiben [80], konnte eine Reversion dieser Veränderungen innerhalb des gewählten Zeitintervalls von 14 Tagen ausgeschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Erhöhung der epithelialen Apoptoserate in entzündetem Colon sigmoideum bei M. Crohn detektiert werden. Die epitheliale Apoptoserate des Darmepithels bei M. Crohn war mit 5,3% mehr als verdoppelt verglichen mit Kontrollwerten (2,1%).

Die Bedeutung einer erhöhten Apoptoserate für die Integrität der epithelialen Barriere ist erst seit wenigen Jahren bekannt. Noch vor einigen Jahren galt das Dogma, epitheliale Einzelzellapoptosen würden die epitheliale Barrierefunktion nicht stören [3, 4], da apoptotische Zellen während ihrer Extrusion aus dem Epithelverband aufgrund der Plastizität ihrer Tight junction mit ihren Nachbarzellen bis zuletzt in direktem Kontakt blieben, so dass an dieser Stelle keine oder zumindest keine signifikante Störung der epithelialen Kontinuität eintreten würde. Durch Untersuchung von Zellkulturen mittels Conductance-Scanning konnte jedoch gezeigt werden, dass auch Einzelzellapoptosen mit einer lokalen Permeabilitätserhöhung einhergehen, welche unter Stimulation mit TNF α um ein Vielfaches zunimmt [1]. Dies ist bedeutsam, da bei M. Crohn eine erhöhte Produktion von TNF α gezeigt werden konnte [45]. Untersuchungen bei Colitis ulcerosa zeigten, dass auch in frühen Krankheitsstadien bei Fehlen von Erosionen und Ulzerationen Areale mit erhöhter Leitfähigkeit und konsekutivem Zusammenbruch der epithelialen Barriere nachweisbar sind [2]. Diese Areale erhöhter Leitfähigkeit erwiesen sich in der histologischen Untersuchung als Aggregate apoptotischer Epithelzellen. Es muss somit angenommen werden, dass die Verdopplung der Apoptoserate bei M. Crohn verglichen

mit Kontrollwerten zu einer Störung der epithelialen Barrierefunktion führt, welche ihrerseits den mukosalen Entzündungsprozess unterhält.

Als weiteres wesentliches Ergebnis dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die erhöhte epitheliale Apoptoserate bei M. Crohn durch die Einmalgabe eines TNF α -Antikörpers nahezu normalisiert werden kann. Zwei Wochen nach Antikörpergabe hatten 10 von 11 Patienten eine intestinale Apoptoserate innerhalb des Normalbereichs erreicht (siehe Abbildung 10). Diese Normalisierung der epithelialen Apoptose ist wahrscheinlich von erheblicher funktioneller Bedeutung, da sie über eine Wiederherstellung der epithelialen Barriere und konsekutive Hemmung der Antigenaufnahme in die Lamina propria den Entzündungsprozess verringern beziehungsweise bei einer Subgruppe von Patienten sogar zur Ausheilung der mukosalen Entzündung führen kann [82].

Da gezeigt wurde, dass die TNF α -Antikörper-Behandlung zu einer massiven Zunahme der Apoptoserate von Monozyten und mukosalen T-Lymphozyten führt [57, 58], war die hier gezeigte Reduktion der epithelialen Apoptoserate zunächst ein überraschendes Ergebnis. Die Eradikation mukosaler Immunzellen erfolgt über Bindung des TNF α -Antikörpers an den von diesen Zellen exprimierten membranständigen Tumor-Nekrose-Faktor- α und nachfolgende Apoptoseinduktion über verschiedene Signaltransduktionskaskaden [80]. Die sinkende epitheliale Apoptoserate unter TNF α -Antikörper-Therapie lässt somit zwei Schlussfolgerungen zu: Zum einen exprimieren epitheliale Zellen im Gegensatz zu mukosalen T-Lymphozyten und Monozyten mit großer Wahrscheinlichkeit keinen oder nur wenig membranständigen Tumor-Nekrose-Faktor- α und sind somit keine direkten Zielzellen einer TNF α -Antikörperbehandlung. Zum anderen scheint die Wirkung der Antikörperbehandlung auf das intestinale Epithel die indirekte Folge einer Eradikation aktivierter mukosaler Immunzellen mit konsekutiver Verminderung proinflammatorischer und für Epithelzellen wahrscheinlich proapoptotischer Zytokine zu sein.

4.4 Die Erhöhung der Apoptoserate führt zu einer Störung der epithelialen Barrierefunktion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Barriere-Restitution bei M. Crohn unter TNF α -Antikörper-Therapie bei fehlendem Einfluss auf die Expression von Tight junction-Proteinen mit einer Reduktion der erhöhten epithelialen Apoptoserate einhergeht. Da in Biopsien der Beitrag der Apoptosereduktion zur Barriere-

Wiederherstellung nicht quantifizierbar ist, wurden diese Veränderungen an der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29/B6 untersucht. Dazu wurden durch Zugabe des Topoisomerase-Hemmers Camptothecin [67] selektiv Apoptosen induziert. Da gezeigt wurde, dass Camptothecin in Konzentrationen bis 10 µg/ml keinen Einfluss auf die Tight junction ausübt, konnte durch Messung des transepithelialen Widerstandes bei verschiedenen Apoptoseraten der direkte Einfluss der Apoptosezunahme auf die epitheliale Barriere analysiert werden.

Eine Erhöhung der Apoptoserate von 2,6% (ohne Camptothecin) auf 5,4% (Camptothecin 2 µg/ml) führte zur einer Widerstanderniedrigung 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 Daten der Zellkultur lassen natürlich keinen direkten Schluss auf die Veränderungen bei M. Crohn zu und implizieren damit nicht a priori eine Kausalität. Dennoch belegt dieser Vergleich, dass die Verbesserung der Barrierefunktion unter TNF α -Antikörper-Therapie möglicherweise durch eine alleinige Reduktion der epithelialen Apoptoserate ohne Einfluss der Antikörper auf die Tight junction hervorgerufen sein könnte.

4.5 Tight junction-Veränderungen bei M. Crohn und ihre Beeinflussung durch eine TNF α -Antikörper-Therapie.

Tight junctions sind aus einer Vielzahl verschiedener Proteine zusammengesetzte Kontaktpunkte benachbarter Epithelzellen. Sie dienen als Diffusionsbarriere für Solute und grenzen das apikale Membrankompartiment vom basolateralen ab [84]. Sowohl die Anzahl parallel verlaufender Tight junction-Stränge, als auch ihre Verzweigung und Morphologie wirken sich auf die Permeabilität der Tight junction aus [17, 42]. So konnte gezeigt werden, dass in vielen Epithelien die Anzahl von Tight junction-Strängen logarithmisch mit dem transepithelialen Widerstand korreliert [42]. Transfektionen von Tight junction-Proteinen in Fibroblastenkulturen zeigten, dass die Morphologie der Tight junction-Stränge je nach inkorporiertem Tight junction-Protein deutlich variiert [85].

Mehrere integrale Membranproteine sind an der Bildung der Tight junction beteiligt. Zu ihnen gehören Occludin, Junctional Adhesion Molecule (JAM) und eine als Claudine bezeichnete Familie von derzeit 24 bei Warmblütern bekannten Proteinen (Claudin-1, Claudin-2 usw.). Nur von wenigen dieser Proteine kennt man bislang die exakte Funkti-

on innerhalb der Tight junction. Seit wenigen Jahren ist jedoch bekannt, dass neben Proteinen mit abdichtender Funktion (z.B. Claudin-1 [14], Claudin-4 [15], Claudin-5 [16]) auch solche mit porenbildender Funktion (z.B. Claudin-2 [18], Claudin-16 [11]) existieren. Während dem zuerst entdeckten Tight junction-Protein Occludin zunächst eine entscheidende abdichtende Funktion innerhalb der Schlussleiste zugesprochen wurde [6, 7], wird diese Rolle nun eher Proteinen wie Claudin-1 [14, 86] oder Claudin-4 [15] zugeschrieben. Für Claudin-1, -4 und -5 konnte eine permeabilitätserniedrigende und widerstandssteigernde Wirkung gezeigt werden [15, 16, 86]. Claudin-3 ist Angriffspunkt des Diarrhö auslösenden Bakteriums *Clostridium perfringens*. Die Bindung dieses Bakteriums führt zur Desintegration der Tight junction mit konsekutiver Widerstandsabnahme [87, 88], so dass auch für dieses Claudin eine die Permeabilität verringernde Wirkung angenommen werden kann. Die Modulation der Durchlässigkeit von Tight junctions kann jedoch nicht nur über den Einbau abdichtender Proteine reguliert werden. So wurde gezeigt, dass allein die Integration des porenbildenden Proteins Claudin-2 in die Tight junction ausreicht, um ein Epithel vom dichten Typ in ein Epithel vom durchlässigen Typ zu überführen [17].

Aufgrund des zunehmenden Verständnisses der Bedeutung von Tight junction-Veränderungen für die epitheliale Barrierefunktion wurden in den letzten Jahren mehrere Untersuchungen der Tight junctions bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen durchgeführt. Bei Untersuchungen von Colitis ulcerosa-Patienten konnte gezeigt werden, dass nur ein Teil der vorhandenen Barrieredysfunktion auf lokale Lecks (Apoptoseaggregate, Erosionen, Ulzera) zurückzuführen ist. Ein Großteil der Barriestörung hingegen entsteht durch disseminierte Veränderungen wie Tight junction-Alterationen [2]. Zur Untersuchung der Bedeutung morphologischer Tight junction-Veränderungen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurden bereits zu Beginn der 80er Jahre elektronenmikroskopische Studien durchgeführt [89, 90]. Diese zeigten bei M. Crohn Lücken und komplette Abbrüche innerhalb des Tight junction-Netzwerkes sowie streckenweise eine Reduktion der Anzahl parallel verlaufender Tight junction-Stränge. Erste Ende der 90er Jahre durchgeführte quantitative Tight junction-Analysen zeigten bei Colitis ulcerosa eine Reduktion der Tight junction-Stränge mit konsekutiver Verminderung der apiko-basalen Ausdehnung des Tight junction-Netzwerkes.

Nach Entdeckung der Proteinstruktur der Tight junction in den letzten Jahren wurden bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erste Expressionsanalysen von Tight

junction-Proteinen durchgeführt [43, 44]. So zeigte sich bei kollagener Kolitis eine Herabregulation von Occludin und Claudin-1 bei im Vergleich zur Kontrolle unveränderter Expression von Claudin-2, -3 und -5. Erste Untersuchungen bei M. Crohn ergaben eine im Vergleich zur Kontrolle verminderte Expression von Occludin bei vergleichbarer Expression von Claudin-1 [44].

In der hier vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Einfluss einer TNF α -Antikörper-Therapie auf die Expression von Occludin, Claudin-1 und Claudin-4 untersucht. Später wurde an einem unabhängigen Kollektiv von M. Crohn-Patienten die Expression von Occludin und Claudin 1-5 im Vergleich zu Kontrollpatienten analysiert.

Die TNF α -Antikörper-Therapie führte zu einer partiellen Restitution der epithelialen Barriere. Es wurde daher untersucht, ob neben der Normalisierung der epithelialen Apoptoserate auch eine Reversibilität der Tight junction-Veränderungen zu dieser Barriererestitution beigetragen hat. Es zeigte sich jedoch keine Änderung in der Expression von Occludin, Claudin-1 und Claudin-4 unter der TNF α -Antikörper-Therapie. Da Antikörper gegen die Claudine-2, -3 und -5 zum damaligen Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung standen, konnte die Expressionsänderung dieser Proteine leider nicht analysiert werden. Ein möglicher Effekt der TNF α -Antikörper-Therapie auf die Expression von Claudin-2 sowie von Claudin-3 und -5 kann daher nicht ausgeschlossen werden. Dennoch konnte durch die Korrelation von Apoptoseveränderungen und Barrierefunktion in HT-29/B6-Zellen gezeigt werden, dass die Barriere-Wiederherstellung nach TNF α -Antikörper-Therapie allein durch die Reduktion der epithelialen Apoptoserate erklärbar ist.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Vergleich der Expression verschiedener Tight junction-Proteine zwischen M. Crohn und Kontrolle durchgeführt. Dieser zeigte ein komplexes Muster von Expressionsveränderungen. Während Occludin und das vermutlich abdichtende Tight junction-Protein Claudin-3 eine im Vergleich zur Kontrolle verminderte Expression zeigten, war die Expression des porenbildenden Proteins Claudin-2 deutlich erhöht. Claudin-1, Claudin-4 und Claudin-5 unterschieden sich in ihrer Expression nicht von der Kontrolle. Die Hochregulation der Claudin-2-Expression konnte nicht exakt quantifiziert werden, da ein Vergleich zur Kontrolle bei fehlender Expression von Claudin-2 bei allen Kontrollpatienten nicht möglich war. Im Gegensatz zur Kontrolle zeigten jedoch 6 von 10 M. Crohn-Patienten eine deutliche Claudin-2-Expression.

Die immunhistologische Darstellung zeigte darüber hinaus Veränderungen im Verteilungsmuster der Tight junction-Proteine bei M. Crohn. So konnte das porenbildende Tight junction-Protein Claudin-2 bei Kontrollpatienten nicht nachgewiesen werden, während 3 von 4 M. Crohn-Patienten deutliche Claudin-2-Signale in der junktionalen Zellmembran innerhalb der Krypte aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine Umverteilung der vermutlich abdichtenden Tight junction-Proteine Claudin-3 und Claudin-5 bei M. Crohn. Beide Proteine waren bei Kontrollpatienten innerhalb der Tight junction nachweisbar, zeigten jedoch bei allen M. Crohn-Patienten eine ausschließliche Lokalisation in der basolateralen Zellmembran unterhalb der Tight junction. Darüber hinaus zeigte sich bei M. Crohn ein im Vergleich zur Kontrolle deutlich abgeschwächtes Claudin-3-Signal. Es muss davon ausgegangen werden, dass diese Umverteilung in einer Verminderung abdichtender Proteine innerhalb der Tight junction resultiert, welche über die Expressionserhöhung von Claudin-2 hinaus zu einer weiteren Barrierestörung führt.

Claudin-4 zeigte wie vorbeschrieben [10] eine Lokalisation in der basolateralen Zellmembran mit nur schwacher Anfärbung innerhalb der Tight junction, die sich nicht zwischen Kontroll- und M. Crohn-Patienten unterschied. Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Claudinen war daher weder die Expression noch die Lokalisation von Claudin-4 durch die intestinale Entzündung bei M. Crohn beeinträchtigt. Da Claudin-4 im Kolon jedoch nicht - wie beispielsweise in MDCK-Zellen beschrieben [87] - primär in der Tight junction lokalisiert ist, bleibt offen, inwieweit dieses Protein einen integralen Bestandteil der intestinalen Barriere bildet.

Zur elektronenmikroskopischen Analyse der Tight junction-Morphologie bei M. Crohn wurden Gefrierbrüche von Kolonbiopsien hergestellt und transmissionselektronenmikroskopisch analysiert. Diese morphologischen Daten stellen die erste quantitative Tight junction-Analyse bei M. Crohn dar.

Als wesentlicher Befund konnte eine Reduktion der Tight junction-Stränge bei M. Crohn auf etwa $2/3$ der Kontrollwerte gezeigt werden. Da von einer an vielen Epithelien vergleichend erhobenen empirischen Formel bekannt ist, dass die Zahl der Tight junction-Stränge mit dem transepithelialen Widerstand logarithmisch korreliert [42], kann angenommen werden, dass die Reduktion der Zahl der Strands bei M. Crohn zusammen mit der konsekutiven Abnahme der Tiefenausdehnung des Tight junction-Netzwerkes in erheblichem Maße zur epithelialen Barrierestörung beiträgt.

Darüber hinaus ließ sich in allen Gefrierbruchpräparaten von M. Crohn-Patienten eine von der Kontrolle abweichende Morphologie der Tight junction-Stränge demonstrieren. Während Kontrollen die für intestinale Epithelzellen typischen ununterbrochenen, glatten und erhabenen Stränge auf der P-Seite (protoplasmatische Seite) mit komplementären, partikelfreien Rillen auf der E-Seite (extrazelluläre Seite) aufwiesen, zeigten Gefrierbrüche von M. Crohn-Patienten diskontinuierliche, perlenartige Stränge auf der P-Seite. Dieses Ergebnis ist von besonderem Interesse, da bekannt ist, dass die Integration des porenbildenden Proteins Claudin-2 in die Tight junction zu einer analogen Veränderung der Tight junction-Morphologie führt, welche mit einer konsekutiven Erniedrigung des transepithelialen Widerstandes einhergeht [13, 17, 85]. Ein Einbau von vermutlich abdichtenden Tight junction-Proteine wie Claudin-1 und Claudin-3 hingegen führt zu einer den Kontrollen entsprechenden Morphologie [13, 85].

Zusammenfassend zeigte sich bei M. Crohn eine Hochregulation der Expression des porenbildenden Tight junction-Proteins Claudin-2 verbunden mit einer Herabregulation der Expression des vermutlich abdichtenden Tight junction-Proteins Claudin-3 und einer Desintegration abdichtender Proteine aus der Tight junction (Claudin-3, Claudin-5). Diese Expressionsänderung spiegelt sich morphologisch in diskontinuierlichen Tight junction-Strängen mit reduzierter Anzahl von Strängen wider. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass diese Veränderungen zumindest teilweise die bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beschriebenen Erhöhungen der basalen Leitfähigkeit jenseits epithelialer Lecks (Erosionen, Ulzerationen) erklären [2]. Wie bereits erwähnt, tragen diese basalen Leitfähigkeitsveränderungen bei Colitis ulcerosa zu circa 50 Prozent zur erhöhten Gesamtleitfähigkeit bei. Da das Auftreten von Erosionen und Ulzerationen bei M. Crohn deutlich seltener ist als bei Colitis ulcerosa, muss hier sogar von einer eher größeren Bedeutung der Tight junction-Veränderungen ausgegangen werden.