

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Materialien und Geräte

DAKO ChemMate 100 µm Slides	DAKO BioTek Solutions, USA
Deckgläser	Mariefeld GmbH & Co. KG, Bad Mergentheim
Denton DC 502	Denton Vacuum Inc., Cherry Hill, New Jersey, USA
Elektrophoresekammer-Halter	Biorad, München
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Heizblock	Grant, Berlin
Homogenisator	Wheaton, USA
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX 60, Olympus, Hamburg
Kryostat MTC	SLEE Technik GmbH
Lösungsreservoir	Forschungswerkstatt der Charité, Campus Benjamin Franklin, Berlin
Luminiszenz-Detektor (LAS 1000)	Fuji, Düsseldorf
Magnetrührer	Ika-Combimag, München
Magnetrührstäbchen	Merck, Berlin
Mikroelektrodenhalter	MEH3SF, WP-Instruments, New Haven, CT, USA
Mini-Protean 3 Elektrophoresesystem	Biorad, München
Mini-Trans-Blot Transfer-Zelle	Biorad, München
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pipetten	Eppendorf, Köln

Poly Screen PVDF-Transfer Membran	NEN, Köln
Power pac 200	Biorad, München
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Brand, Wertheim
Schlittenmikrotom	Microm, Heidelberg, Deutschland
Silikonscheibe	Drawin Vertriebs GmbH, Ottobrunn
Skalpell	Feather Safety Razor Co., Japan
Standardtips 10 µl, 100 µl , 1000 µl	Eppendorf, Köln
Tecan Spectra Classic	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Trägerscheibe	Astralon N, Hüls Troisdorf, Troisdorf
Wasserbad	Haake, Berlin
Wippe	Fröbel Labor Technik Lindau
Zeiss EM 902	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Zeiss LSM 510 META	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Zentrifugen	Hermle Z233MK, Wehingen Eppendorf 5414 C, Köln Beckman Avanti J25, Unterschleißheim

2.1.2 Chemikalien

Acrylamid-Bis	Serva, Heidelberg
Alexa Fluor 488 nm Ziege anti-Maus AK	Molecular Probes, Eugene
Alexa Fluor 594 nm	Molecular Probes, Eugene
Ziege anti-Kaninchen AK	
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen
Amylacetat	Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen
Anti-Kaninchen IgG-POD-Antikörper	Roche, Mannheim
BCA Protein Assay Reagenz A+B	Pierce, Rockford, Illinois

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen
BSA (100 ×)	BioLabs, Frankfurt am Main
ChemMate Detection Kit, APAAP, Mouse	DakoCytomation, Hamburg
Collodion Solution	Fluka, Seelze
Complete-Mini	Roche, Mannheim
Corbit-Balsam	I. Hecht, Stadtrade
DAPI	Roche, Mannheim
Dithiothreitol	Roth, Karlsruhe
EDTA 0,5 M	Serva, Heidelberg
EGTA 0,5 M	Serva, Heidelberg
Eosin	Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen
Ethanol	J.T.Backer, Deventer, Niederlande
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Freon 22	Du Pont, Bad Homburg
FKS	Biochrom, Berlin
Fluoromount G	Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama
Formaldehyd	Merck, Berlin
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Glycerol	Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen
Glycin	Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen
Hämatoxylin n. Mayer	Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen
In Situ Cell Death Detection Kit	Roche, Mannheim
Kaleidoscope Prestained Standards	Bio-Rad, München
Kaninchen anti-Occludin polyklon. AK	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
Kaninchen anti-Claudin-1 polyklon. AK	Cytomed, Berlin

Kaninchen anti-Claudin-2 polyklon. AK	Cytomed, Berlin
Kaninchen anti-Claudin-3 polyklon. AK	Cytomed, Berlin
Kaninchen anti-Claudin-5 polyklon. AK	Cytomed, Berlin
Kaninchen anti-ZO-1 polyklon. AK	Cytomed, Berlin
Lumi-Light Western-Blotting Kit	Roche, Mannheim
- Anti-Kaninchen IgG-POD AK	
- Anti-Maus IgG-POD Fab	
- Blockierreagenz	
- 10 × TBS-Tween	
- Lumi-Light POD-Substratlsg.	
Maus anti-CD3 AK	DakoCytomation, Hamburg
Maus anti-Claudin-4 monoklon. AK	Cytomed, Berlin
Maus anti-ZO-1 monoklon. AK	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
Methanol	J.T. Backer, Deventer, Niederlande
Methylbutan	Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen
MountFluor	Biocyc GmbH & Co. KG, Luckenwalde
Natriumhypochlorid	KMF-Laborchemie-Handels-GmbH, Berlin
PBS-Tabletten	Life Technologies, Karlsruhe
PBS-Lösung	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Prestained SDS MW Markers	Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen
Proteinase K	Boehringer Mannheim, Mannheim
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Merck, Berlin
Sucrose	Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen
TEMED	Life Technologies, Karlsruhe

Tissue Embedding Medium	SLEE Technik GmbH, Mainz
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	Biorad, München
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	Biorad, München
Tween 20	Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen
Wasser	Fluka, Seelze
Xylol	J.T.Backer, Deventer, Niederlande
Ziegen-Serum	Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen

2.1.3 Puffer und Lösungen

5% BSA in PBS

5 g BSA
PBS ad 100 ml

BSA-Blockierungslösung

5,0 % BSA
0,02 % Natriumazid
PBS/Tween ad 50 ml

Elektrophoresepuffer

100 ml 10× Puffer West
10 ml 10% SDS
ad 1 l Aqua bidest.

5 x Laemmli-Puffer

2,0 g	SDS
1,54 g	Dithiothreitol 500 mM
3,0 ml	Tris-HCl pH 6,8 300mM
20,0 µl	Bromphenolblau 1%
10,0 ml	Glycerol

Lösung für Proteinquantifizierung

je Probe:

196 µl	Pierce BCA Protein Assay Reagenz A
4 µl	Pierce BCA Protein Assay Reagenz B

Lösung für Ussing-Kammer (intern bezeichnet als #111)

140,0 mmol	Na ⁺
123,8 mmol	Cl ⁻
5,4 mmol	K ⁺
1,2 mmol	Ca ²⁺
1,2 mmol	Mg ²⁺
2,4 mmol	HPO ₄ ²⁻
0,6 mmol	H ₂ PO ₄ ⁻
21,0 mmol	HCO ₃ ⁻
10,0 mmol	D(+)-Glucose
0,5 mmol	β-OH-Butyrat
2,5 mmol	Glutamin
10,0 mmol	D(+)-Mannose
	ad 1 l Aqua bidest.

5% Magermilchpulver in PBS

5 g Magermilchpulver
PBS ad 100 ml

Membranlysepuffer

2 ml Tris HCl, pH 7,4
500 µl 1 M MgCl₂
200 µl 0,5 M EDTA
120 µl 0,5 M EGTA
1 Tbl Complete-Mini
ad 100 ml Aqua bidest

PBST

2 Tbl. PBS
1 ml Tween
ad 1 l Aqua bidest.

PBST/ 5% Magermilchpulver

5 g Magermilchpulver
PBST ad 100 ml

10× Puffer West

144,0 g Glycin
30,4 g Tris Base
ad 1 l Aqua bidest.

Transferpuffer

100 ml	10× Puffer West
100 ml	Methanol
	ad 1 l Aqua bidest.

Trenngel 8,5%

5,6 ml	Bis-Acrylamid
4,7 ml	Tris-HCl 1,5 M pH 8,8
9,2 ml	Aqua bidest
200,0 µl	SDS 10 %
200,0 µl	Ammoniumpersulfat 10 %
10,0 µl	TEMED

Trenngel 12,5%

8,2 ml	Bis-Acrylamid
4,7 ml	Tris-HCl 1,5 M pH 8,8
7,1 ml	Aqua bidest
200,0 µl	SDS 10%
200,0 µl	Ammoniumpersulfat 10%
10,0 µl	TEMED

Sammelgel

1,7 ml	Bis-Acrylamid
625,0 µl	Tris-HCl 2 M pH 6,8
7,4 ml	Aqua bidest
100,0 µl	SDS 10%
100,0 µl	Ammoniumpersulfat 10%
10,0 µl	TEMED

2.1.4 Software

Aida	Raytest Isotopenmessssgeräte GmbH, Straubenhardt
Impedance	Fiebig, Berlin
Microcal Origin	Microcal Software Inc., Northampton, USA
SPSS für Windows	SPSS Software GmbH, München

2.2 Methoden

2.2.1 Patienten und Biopsieentnahme

In der vorliegenden Arbeit wurden 2 unabhängige Kollektive von M. Crohn-Patienten untersucht. Zum einen wurden 11 Patienten mit therapierefraktärem M. Crohn (keine klinische Besserung unter Kortikosteroiden und Azathioprin) und Befall des distalen Kolons vor und 14 Tage nach TNF α -Antikörpergabe (Infliximab 5 mg pro Kilogramm Körpergewicht) koloskopiert und biopsiert. Als Kontrollpatienten dienten 8 Patienten, die aufgrund eines Tumorauschlusses koloskopiert und biopsiert wurden und weder makroskopisch noch mikroskopisch Entzündungszeichen aufwiesen.

Zum anderen erfolgte eine weitergehende Analyse der Tight junction-Veränderungen an 10 M. Crohn-Patienten mit geringer bis mittelgradiger Entzündung sowie 10 Kontrollpatienten. Alle Patienten mit M. Crohn hatten einen Befall des Colon sigmoideum.

In beiden Kollektiven erfolgte ein Ausschluss von Patienten mit einer Prednisolon-Medikation über 10 mg/d innerhalb der letzten 14 Tage vor Biopsieentnahme. Die weitere antientzündliche Medikation (z.B. Mesalazin) wurde während des Untersuchungsintervalls konstant gehalten.

Die Biopsieentnahme erfolgte in beiden Kollektiven 30 cm ab ano mit einer 3,9 mm-Zange. Alle Patienten wurden über die Abnahme von Biopsien für Forschungszwecke informiert und willigten schriftlich in die Untersuchung ein.

2.2.2 Transport und Weiterverarbeitung der Biopsien

Nach koloskopischer Entnahme der Biopsien wurden diese in zuvor mit 95% O₂ und 5% CO₂ begaster Elektrolytlösung in die Laborräume transportiert und dort für die entsprechenden Untersuchungen weiterverarbeitet. Dabei wurde eine Biopsie in die bereits vorbereitete Ussing-Kammer montiert (siehe 2.2.3 Miniaturisierte Ussing-Kammer) und eine weitere Biopsie für nachfolgende Western Blots in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert (siehe 2.2.5

Proteingewinnung aus Biopsien und Western Blot). Für Apoptosefärbungen mit TUNEL und DAPI wurde außerdem eine Biopsie in Formalin fixiert und nach 24 Stunden in Paraffin eingebettet. Die Proben zur elektronenmikroskopischen Tight junction-Analyse wurden in Glutaraldehyd fixiert.

2.2.3 Miniaturisierte Ussing-Kammer

2.2.3.1 Einleitung

Das von dem dänischen Physiologen Hans Ussing 1951 erstmals beschriebene Kurzschlussstromexperiment dient der experimentellen Differenzierung zwischen aktivem und passivem Transport. Alle äußeren Gradienten, die einen passiven Transport fördern würden, werden dabei eliminiert. Durch Zugabe gleicher Volumina einer identischen Badlösung in die durch das eingesetzte Gewebe getrennten Kammern werden sowohl der Druck- als auch der Konzentrationsgradient ausgeglichen. Durch aktiven Transport geladener Moleküle wie Na^+ oder Cl^- entsteht jedoch eine sich permanent ändernde transepitheliale Spannung (U_E), welche den passiven Transport anderer Ionen zur Folge hat. Durch fortlaufende Registrierung dieser transepithelialen Spannung kann ein dem durch aktiven elektrogenen Ionentransport bedingten Strom entgegengesetzter Strom gleicher Höhe – aber mit umgekehrtem Vorzeichen – appliziert werden, der sog. Kurzschlussstrom (I_{SC}), so dass die transepitheliale Spannung 0 mV beträgt. Damit ist zum einen die unerwünschte elektrische Spannung eliminiert, zum anderen spiegelt die Höhe des applizierten Kurzschlussstromes exakt den aktiven Ionentransport des untersuchten Epithels in der Messkammer wider. Da alle äußeren Gradienten ausgeschaltet sind, entspricht der gemessene Transport der Summe aller (primär, sekundär und tertiär) aktiven Transporte.

2.2.3.2 Messanordnung

Der Aufbau der Ussing-Kammer entspricht im Prinzip der 1951 von Ussing und Zerahn [61] beschriebenen 4-Elektroden-Messanordnung (Abbildung 1), ist aber gegenüber dem klassischen Modell miniaturisiert und mit Vorrichtungen zur Minimierung von Randschäden versehen [62, 63]. Zwei Kammerhälften aus gefrästem Acrylglas werden durch ein zentral eingespanntes Epithel vollständig voneinander getrennt, so dass, außer durch das intakte Epithel, kein Stoff- und Flüssigkeitstransport möglich ist und elektrische Ströme sich ebenfalls nur durch das Epithel hindurch ausbreiten können. Jede Kammerhälfte enthält einen Hohlraum von 0,5 ml Volumen, in dem die zirkulieren-

de Badlösung nach medial hin offenen Kontakt zum Epithel hat. Zugeleitet und abgeleitet wird die Badlösung über je 2 Öffnungen, die in Verbindung mit den oberhalb gelegenen Lösungsreservoirs stehen (siehe 2.2.3.4 Wärmeaustauscher). In jeder der beiden Kammern befinden sich zwei Elektroden, wobei ein Paar der Registrierung der transepithelialen Potentialdifferenz dient, während das andere Elektrodenpaar der Applikation des Kurzschlussstromes dient. Die spannungsmessenden Elektroden sind epithelnah lokalisiert (1–2 mm vom Epithel entfernt), um im kurzgeschlossenen Zustand auftretende Spannungsabfälle in der zwischen Epithel und Elektrodenspitze befindlichen Flüssigkeit möglichst gering zu halten. Jede Spannungselektrode besteht aus einer Glas-Kapillare, die mit 3 g/dl Agar-Agar in 0,5 mol/l KCl gefüllt ist. Der elektrische Kontakt dieser Elektroden wird durch die mit 0,5 mol/l KCl gefüllten Mikroelektrodenhalter hergestellt. Über einen axialen Kanal in der lateralen Wand jeder Kammerhälfte sind die in den Hohlraum vorstehende Spannungselektrode und der hinter der lateralen Wand versenkte Mikroelektrodenhalter miteinander verbunden. Zur Abschirmung werden die Spannungselektroden mit einer aus Kupfer bestehenden Schirmung umgeben und über geschirmte Kabel angeschlossen.

Die stromapplizierenden Elektroden, Silberdrahtringe am lateralen Ende des Kammerhohlraumes, befinden sich epithelfern, wodurch eine gleichmäßige Verteilung des elektrischen Feldes über dem Epithel erzielt wird. Die Registrierung der transepithelialen Spannung wird von einem speziell hierfür konstruierten Gerät vorgenommen (Typ CVC6; Fiebig, Berlin), welches ebenfalls die Applikation des Kurzschlussstromes vornimmt. Die Steuerung dieser Funktionen erfolgt über einen PC und spezielle Messprogramme (Impedance; Fiebig, Berlin).

Zum Einspannen der gesamten Konstruktion wird seitlich auf jede Kammer noch ein weiteres Acrylglasteil aufgesteckt, das durch einen eingefrästen Konus eine exakte axiale Positionierung der Konstruktion in einem speziellen Stativ erlaubt. Hierzu werden alle Teile zwischen zwei Gewindestangen festgeschraubt, wodurch eine stabile und dichte Konstruktion entsteht.

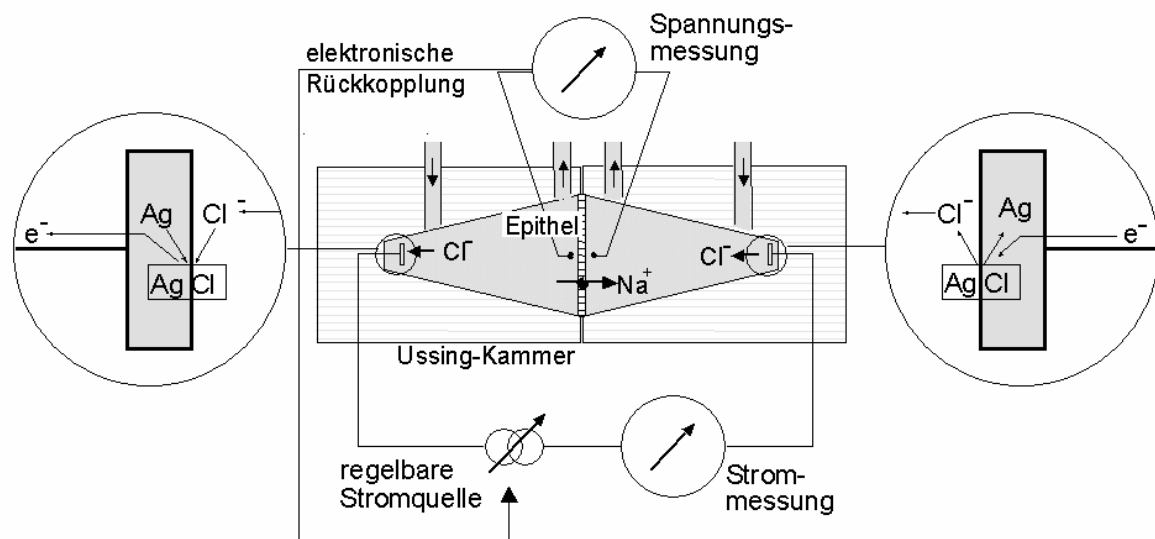


Abbildung 1. Container einer miniaturisierten Ussing-Kammer und Messanordnung [64]. Ausgleich des elektrischen Gradienten am Beispiel des aktiven Na^+ -Transports. Durch elektrogenen Na^+ -Transport entsteht ein elektrischer Gradient, der über Spannungselektroden detektiert wird. Der Ausgleich dieser Spannungsdifferenz erfolgt durch Stromelektroden.

2.2.3.3 Container

Zwischen beiden Kammerhälften befindet sich das Epithel in einem dafür konstruierten Container [63].

Der Container besteht aus zwei Acrylglasshälften, welche die Biopsie aufnehmen. Hierzu ist in der serosalen Hälfte eine 8 mm durchmessende Vertiefung eingefräst, in die eine Trägerscheibe und eine Silikonscheibe passt. Auf die Trägerscheibe, die mittig ein 2,5 mm großes Loch besitzt, ist die Biopsie so aufgeklebt, dass sie rings um das mittige Loch haftet und es voll bedeckt. Die mukosale Containerhälfte besitzt eine zentrale Öffnung von 2,5 mm Durchmesser, was der exponierten Epithelfläche entspricht. Um diese Öffnung herum befindet sich ein 0,2 mm hoher gefräster Wall, der beim Zusammensetzen des Containers auf die mukosale Seite des Epithels drückte. Der zusammengesetzte Container wird zwischen die beiden Hälften der äußeren Kammer eingesetzt.

2.2.3.4 Wärmeaustauscher

Oberhalb dieser beiden kleinen Kammern, befinden sich zwei doppelwandige, zylinderförmige Lösungsreservoirs, die mit den Kammern über je zwei flexible Silikonschläuche verbunden sind (Abbildung 2). In diesen Lösungsreservoirs zirkuliert ein Großteil der Badlösung und wird dort begast und erwärmt. Die Erwärmung der Badlösung erfolgt über ein externes Wasserbad. Mit Hilfe einer Pumpe wird ein Kreislauf von 37°C warmem Wassers aufrecht erhalten, welcher durch Zirkulation innerhalb der beiden Wände des Lösungsreservoirs die Badlösung auf konstante Temperatur erwärmt.

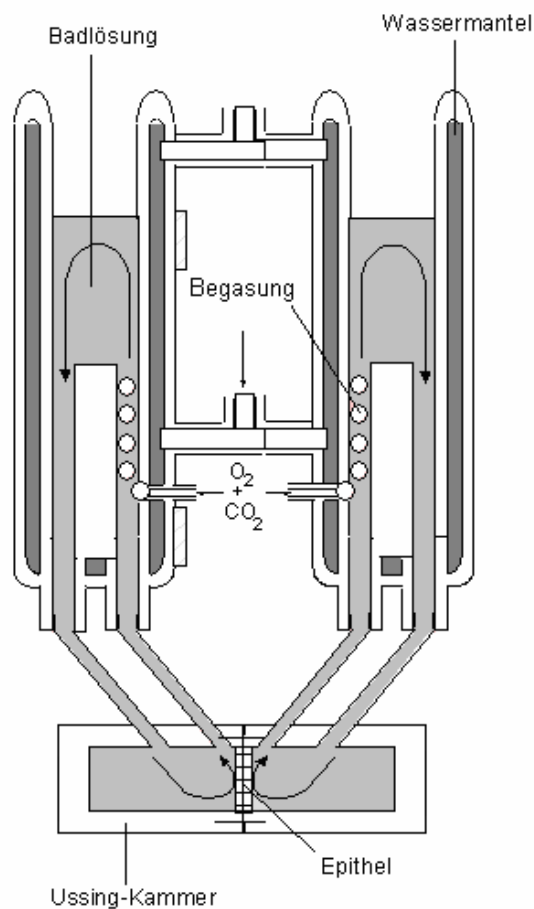


Abbildung 2. Ussing-Kammer mit in Container befindlichem Epithel sowie Wärmeaustauscher und Lösungsbegasung [64].

2.2.3.5 Lösungsbegasung

Die Begasung der Lösung erfolgt mit 8 l/min eines Gemisches aus 95% O_2 und 5% CO_2 . Durch den Auftrieb der Luftbläschen entsteht eine Zirkulation der Badlösung. Die Sauerstoffanreicherung erfolgt durch epithelferne Zuleitung über einen Silikonschlauch.

2.2.4 Wechselstrom-Impedanzanalyse

2.2.4.1 Prinzip der Impedanzmessung

Die Wechselstrom-Impedanzanalyse stellt ein Verfahren zur Unterscheidung von epithelialen und subepithelialen Widerständen dar und bietet somit die Möglichkeit, diese beiden Komponenten des epithelialen Gesamtwiderstandes zu diskriminieren. Während der epitheliale Widerstand die Impedanzeigenschaften des jeweiligen Epithels widerspiegelt, entspricht der subepitheliale Widerstand dem dichten Kollagenfasernetz der Lamina propria. Es gilt also:

$$R^t = R^e + R^{\text{sub}}$$

R^t Gesamtwiderstand des Epithels

R^e Widerstand des Epithels

R^{sub} Widerstand des Subepithels

Der hier beschriebenen Wechselstrom-Impedanzanalyse liegt ein 3-Parameter-Modell eines Ersatzschaltkreises zugrunde [65]. In diesem Modell der Darmwand entspricht in erster Näherung der epitheliale Widerstand einem Ohm'schen Widerstand, welcher parallel zu einem Kondensator (RC-Glied) und in Reihe zu einem dem subepithelialen Widerstand entsprechenden Ohm'schen Widerstand geschaltet ist. Die apparente Kapazität des Kondensator-Glieds repräsentiert dabei die kapazitiven Eigenschaften der apikalen und basolateralen Zellmembranen. Die Möglichkeit eines Mittelpunkthubes des an die Datenpunkte angepassten Kreissegmentes über die Abszisse hinaus ermöglicht es, auch eine Verteilung von Zeitkonstanten, d.h. verschiedene parallele RC-Glieder, in diesem Modell zu berücksichtigen, wie sie sich aus der Zellheterogenität und der komplexen vertikalen Morphologie des Darmepithels in der Realität ergibt. Da die subepithelialen Zellen (Fibroblasten, Lymphozyten, Makrophagen) sowie die extrazelluläre Matrix bei Gesunden keinen geschlossenen Verband darstellen, fließt der Strom weitgehend ungehindert durch den subepithelialen Raum und tritt somit elektrisch kaum als Reaktanz in Erscheinung.

Appliziert man bei eingespanntem Präparat Wechselströme in unterschiedlicher Frequenzen, so ist der kapazitive Blindwiderstand bei einer Frequenz von 0 unendlich groß, während er bei sehr hohen Frequenzen (Extrapolation gegen Frequenz ∞) gegen null tendiert. In ersterem Falle fließt der gesamte Strom über den dem epithelialen Widerstand entsprechenden R-Teil des RC-Gliedes und den in Serie geschalteten

(subepithelialen) Widerstand und bildet somit den Gesamtwiderstand R^t der Darmwand ab. In letzterem Falle fließt der gesamte Strom über den Kondensator kurzgeschlossen am Parallelwiderstand vorbei durch den folgenden (subepithelialen) Serienwiderstand, so dass der dann gemessene Widerstand dem subepithelialen Anteil des Gesamtwiderstandes entspricht.

Die graphische Darstellung der Impedanzanalyse erfolgt in einem Nyquist-Diagramm. Die Ordinate stellt dabei den Imaginärteil der komplexen Impedanz dar, das heißt, die kapazitiven Eigenschaften des Epithels, während der Realteil der komplexen Impedanz, also der Ohm'sche Widerstand, auf der Abszisse aufgetragen wird.

Erfolgt die Messung nicht nur bei Wechselströmen der Frequenzen 0 und ∞ kHz, sondern wie in dieser Arbeit verwendet bei 48 Frequenzen zwischen 0 und 65 kHz, so ergeben sich unterschiedliche Messpunkte, die durch ein Kreissegment verbunden werden können. Der Schnittpunkt dieses Kreissegments mit der x-Achse bei der Frequenz 0 gibt den Gesamtwiderstand R^t an, der Schnittpunkt bei der Frequenz 65 kHz (entsprechend der Extrapolation gegen ∞) den subepithelialen Widerstand R^{sub} . Die Differenz von R^t und R^{sub} entspricht R^e , dem epithelialen Widerstand.

2.2.4.2 Badkorrektur und Elektrodenasymmetrie

Zwischen eingespanntem Epithel und Elektroden befindet sich stets ein dünner Flüssigkeitssaum mit Badlösung, welcher bei Widerstandsmessungen einen ungewünschten Spannungsabfall zwischen den Elektroden hervorruft. Zur Korrektur dieses Widerstandes wurde vor Einspannen des Epithels der Ohm'sche Widerstand der Badlösung in der leeren Kammer bestimmt und von den während des Versuchs erhaltenen Messwerten abgezogen. Weiterhin wurde die durch die Asymmetrie der Elektroden hervorgerufene Potentialdifferenz als Korrekturwert gespeichert und während der Messungen des eingespannten Präparat korrigiert.

2.2.4.3 Messung des Kurzschlussstroms

Im Abstand von 60 Sekunden wurden jeweils die transepitheliale Spannung, der elektrische Widerstand und der Kurzschlussstrom von einer computergesteuerten Spannungsklemmeinrichtung gemessen. Zur Ausschaltung des elektrischen Gradienten wurde nach einem Regelalgorithmus Strom in einer Stromstärke appliziert, welche die Potentialdifferenz über dem Epithel stets auf 0 mV justierte. Der dazu nötige Kurzschlussstrom wurde vom Gerät registriert und entsprach dem durch aktiven

elektrogenen Ionentransport bedingten Stromfluss. Dieser kann entweder als Strom pro Fläche in $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ oder als Teilchenflux pro Fläche in $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ angegeben werden. Zur Errechnung des transepithelialen Widerstandes wurde dem aktuellen Klemmstrom kurzzeitig ein rechteckiger Stromimpuls überlagert, der zu einer entsprechenden Änderung der Spannung führte. Nach dem Ohm'schen Gesetz konnte nun über die Formel $R^t = dV_{\text{ms}} / dI_{\text{sc}}$ der transepitheliale Widerstand berechnet werden.

2.2.4.4 Bestimmung der elektrischen Impedanz des Epithels

Wie bereits im Absatz „Prinzip der Impedanzmessung“ erläutert, wurde über die Applikation von Wechselströmen verschiedener Frequenzen eine getrennte Messung von epithelalem und subepithelalem Widerstand durchgeführt. Dazu wurden sinusförmige Wechselströme in 48 verschiedenen Frequenzen von 1.3 Hz bis 65 kHz nacheinander appliziert und die jeweiligen Spannungsantworten über dem Epithel mit einem Phasenempfindlichen Verstärkersystem gemessen (Electrochemical Interface, Typ 1286, und Frequency Response Analyser, Typ 1250, Fa. Schlumberger, Gräfelfing). Die Gerätesteuerung sowie Datenaufnahme, Datenspeicherung und Berechnung wurde mit einem PC durchgeführt. Die verwendete Software wurde von Ing. grad. Detlef Sorgenfrei, Institut für klinische Physiologie der Charité, Campus Benjamin Franklin, entwickelt.

Aus den erhaltenen 48 Spannungsantworten wurde unter Abzug des Badwiderstandes und Korrektur der Elektrodenasymmetrie sowie unter Berücksichtigung der Phasenverschiebung von Strom und Spannung die komplexe elektrische Impedanz berechnet. Die verschiedenen Impedanzwerte wurde in einem Nyquist-Diagramm dargestellt und einem Kreissegment angepasst. Anschließend wurden transepithelialer und subepithelialer Widerstand aus den Schnittpunkten des Teilkreises mit der Abszisse abgelesen und der epitheliale Widerstand daraus errechnet.

2.2.5 Proteingewinnung aus Biopsien und Western Blot-Verfahren

2.2.5.1 Protein-Extraktion aus Colon sigmoideum-Biopsien

Bei der im folgenden beschriebenen Methode handelt es sich um die Gewinnung der membrangebundenen Proteinfraction aus sigmoidoskopisch gewonnenen Biopsien.

Nach Entnahme der Biopsien werden diese in 1,5 ml Reaktionsgefäßen zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Zur Proteingewinnung werden die Reaktionsgefäße auf Eis gelagert und frischer Membranlysepuffer hergestellt. Die Biopsie wird in ein Homogenisator-Röhrchen überführt, 500 μl des Membranlysepuffers werden hinzupipettiert und das Gewebe wird mit Hilfe eines Homogenisators so lange mechanisch zerkleinert, bis keine Gewebstückchen mehr erkennbar sind. Durch jeweils zehnmaliges Aufziehen durch eine 20 G-Kanüle sowie eine 26 G-Insulinkanüle wird die Zellsuspension weiter homogenisiert und anschließend bei $350 \times g$ und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der nach der Zentrifugation entnommene Überstand wird in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und entspricht dem Gesamtlusat. Dieses wird für 30 Minuten bei $43.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der nun zu entnehmende Überstand entspricht der gelösten zytosolischen Proteinfraction und wird für eventuelle weitere Verarbeitung in einem separaten Eppendorf-Röhrchen bei -80°C gelagert. Das Pellet wird mit 50 μl eiskaltem Lysepuffer vorsichtig gelöst und entspricht der membranständigen Proteinfraction. Nach einer Proteinbestimmung wird auch diese Probe bei -80°C asserviert.

2.2.5.2 Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung wird in Mikrotiterplatten durchgeführt. Dabei werden zu jeweils 10 μl Probe 190 μl Pierce BCA Protein Assay-Lösung pipettiert. Als Kontrolle dienen 10 μl Lysepuffer und eine Standardreihe mit BSA-Lösungen der Konzentrationen 0 mg BSA/ml, 0,2 mg/ml, 0,8 mg/ml und 1,2 mg/ml. Sowohl für die Kontrollen als auch für die Proben werden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt (Tabelle 2). Nach dem Pipettiervorgang wird die Mikrotiterplatte für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend durch Messung der Extinktion bei 562 nm mit dem Tecan Spectra Mikrotiterplatten-Photometer der Proteingehalt der Probe quantifiziert. Vom Mittel der Probenwerte wird der Extinktionswert des Lysepuffers abgezogen. Durch lineare Regression der Standard-BSA-Konzentrationen wird eine Eichgerade ermittelt, mit deren Hilfe die Konzentration der Proteine in den Proben ermittelt wird.

	1	2	3	4
A	0,0 mg/ml BSA	0,0 mg/ml BSA	Probe 1	Probe 1
B	0,2 mg/ml BSA	0,2 mg/ml BSA	Probe 2	Probe 2
C	0,8 mg/ml BSA	0,8 mg/ml BSA	Probe 3	Probe 3
D	1,2 mg/ml BSA	1,2 mg/ml BSA	Probe 4	Probe 4
E	Lysepuffer	Lysepuffer

Tabelle 2. Pipettierschema für die Proteinbestimmung mit dem Tecan Spectra Mikrotiterplatten-Photometer.

2.2.5.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Durch die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese, kurz SDS-PAGE, werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen in einem elektrischen Feld primär in Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Die Proteine wandern dabei umso schneller, je kleiner ihre Molekülgröße, je größer die angelegte Spannung und je niedrigprozentiger das jeweilige Polyacrylamidgel ist. Für die Auftrennung von Occludin wird dabei ein 8,5-prozentiges Trenngel hergestellt, für alle Claudine ein 12,5-prozentiges Gel, da die Molekularmasse von Occludin mit rund 64 kDa einem Mehrfachen der Molekularmasse der Claudine mit rund 22 kDa entspricht. Für das Gießen des Gels werden zwei Glascheiben, durch einen 1,5 mm dicken Abstandhalter voneinander getrennt, in einer Bio-Rad-Apparatur befestigt. Zunächst wird das Trenngel luftblasenfrei in die Gelkammer pipettiert und vorsichtig mit 1 ml absolutem Alkohol überschichtet. Nach Polymerisation des Gels für 30 Minuten wird der Alkohol abgegossen. Reste des Alkohols werden mit einem Filterpapier entfernt. Nun wird das Sammelgel aufgeschichtet und ein Kamm eingesteckt, um später Vertiefungen zur Aufnahme der Proben zu erhalten. Nach erneuter Polymerisationszeit von 30 Minuten wird der Kamm vorsichtig entfernt und die Probentaschen mit Elektrophoresepuffer gespült, um Gelreste zu entfernen. Das Gel wird dann in einer Elektrodenhalterung arretiert, in Elektrophoresekammern eingesetzt und die Kammern mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Für die Mischung der Proben werden für jede Spur 15 µl Proteingemisch hergestellt, bestehend aus 3 µl 5× Laemmli-Puffer, einem Volumenanteil der Biopsie-Probe, welcher 2,5 µg Protein (für den Nachweis von Occludin sowie Claudin-1, -3, -4, und -5) beziehungsweise 5 µg Protein (für

den Nachweis von Claudin-2) entspricht, sowie Membranlysepuffer zum Auffüllen auf 15 µl. Die Proteine im Probengemisch werden durch Inkubation bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Anschließend werden die Proben und ein Marker (Prestained SDS Marker für Occludin-Gele, Kaleidoscope Prestained Standard für Claudine) in die Vertiefungen des Polyacrylamidgels geladen. Die Elektrophorese wird bei konstanter Spannung von 100 Volt durchgeführt, bis die am Bromphenolblau erkennbare Pufferfront am unteren Rand der Gelkammer angelangt ist.

2.2.5.4 Elektrotransfer

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine könnten nun mittels unspezifischer Proteinanfärbung (z.B. mit Comassie-Blau) nachgewiesen werden. Sollen einzelne Proteine nachgewiesen werden, bedient man sich Antikörpern, die spezifisch an diese Proteine binden. Dazu werden die Proteine in einem elektrischen Feld auf eine Nylonmembran übertragen und dort fixiert.

Die Nylonmembran (Poly Screen PVDF) wird zunächst entsprechend der Größe des Polyacrylamidgels zurechtgeschnitten und für 5 Minuten in absolutem Alkohol geschwenkt. Danach werden die Membran, zwei Schwämme sowie zwei Filterpapiere für circa 15 Minuten in Transferpuffer equilibriert. In dieser Zeit wird das Polyacrylamidgel aus der Apparatur herausgelöst, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel mit den aufgetrennten Proteinen 5 Minuten vorsichtig in Transferpuffer geschwenkt. Anschließend wird die Nylonmembran luftblasenfrei auf das Gel aufgebracht und die Gel-Membran-Einheit oben und unten mit je einem Filterpapier und einem Schwamm abgedeckt. Diese „Sandwich“-Konstruktion wird nun zusammen mit einem Kühlakku und einem Rührstäbchen in die Transfer-Apparatur eingebaut. Die Transfer-Apparatur wird auf einen Magnetrührer gestellt und die negativ geladenen Proteine werden bei 100 Volt für 60 Minuten auf die positiv geladene Nylonmembran übertragen.

2.2.5.5 Immundetektion

Als Immundetektion wird die spezifische Detektion bestimmter Proteine mittels monoklonaler (Claudin-4) oder polyklonaler (Occludin, Claudin-1, -2, -3, -5) Antikörper auf der Nylonmembran bezeichnet. Bei dem hier verwendeten Verfahren wird das Protein durch einen Enzym-konjugierten sekundären Antikörper, der gegen den Fc-Teil der in Kaninchen oder Mäusen produzierten primären Occludin- oder Claudin-spezifischen Antikörper gerichtet ist, nachgewiesen. Nach dem Elektrotransfer wird die Membran

kurz in PBS/Tween gespült und anschließend zur Verhinderung unspezifischer Antigen-Antikörperreaktionen in einer Küvette mit 50 ml PBS/Tween/ 5% Magermilchpulver zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Spülvorgang mit PBS/Tween für 5 Minuten wird die Membran in einem zweiten Blockadeschritt bei 4 °C über Nacht in 50 ml PBS/Tween/5% BSA/0,02% NaAzid bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wird die Membran in 50 ml Lösung mit primärem Antikörper (polyklonale Kaninchen-AK gegen humanes Occludin oder Claudin-1, -2, -3, -5 beziehungsweise monoklonale Maus-AK gegen humanes Claudin-4) für 120 Minuten bei RT vorsichtig auf dem Schüttler geschwenkt. Die primären Antikörper sind dabei in PBS/Tween/5% BSA/0,02% NaAzid verdünnt (Occludin 1:10000, Claudin-1, -2, -3, -5 1:2000, Claudin-4 1:5000). Um Antikörper die unspezifisch an der Nylonmembran haften zu entfernen wird die Membran für 2×10 Minuten in PBS/Tween und anschließend für 10 Minuten in TBS/Tween gewaschen. Die Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper werden 1:1000 (anti-Kaninchen Antikörper) beziehungsweise 1:400 (anti-Maus Antikörper) in 10 ml TBST/1% Blockier-Reagenz verdünnt und die Membran für 60 Minuten darin inkubiert. Nach Wiederholung der zwei Waschschriffe mit PBS/Tween und anschließend TBS/Tween wird die Membran für 5 Minuten in einer Küvette mit 10 ml Lumi-Light-Lösung im Dunkeln inkubiert und anschließend zwischen 2 Transparentfolien in den Luminiszenz-Detektor (LAS 1000) gelegt. Die in diesem Gerät installierte CCD-Kamera registriert die Chemoluminiszenz, die durch den enzymatischen Umsatz der in der Lumi-Light-Lösung enthaltenen Substrate entsteht. Die Auswertung der Daten erfolgt mit der Software „AIDA“, welche die emittierten Lichtintensitäten pro Fläche unter Abzug der unspezifischen Hintergrund-Emission berechnet.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte in einem ersten Schritt der Vergleich der Occludin-, Claudin-1- und Claudin-4-Expression von 8 M. Crohn-Patienten vor und 2 Wochen nach TNF α -Antikörper-Therapie. Dazu wurde das Detektionssignal jedes Patienten vor Therapie als 100% angesehen und das auf dem gleichen Blot vorhandene Signal dieses Patienten nach Therapie dazu prozentual ins Verhältnis gesetzt (z.B. Patient A – nach Therapie 125% des vor-Therapie-Wertes).

In einem zweiten Schritt erfolgte an einem unabhängigen Kollektiv von 10 M. Crohn-Patienten eine Analyse der Expression von Occludin und Claudin 1-5 im Vergleich zu Kontrollpatienten. Dazu wurde der Mittelwert der auf einem Blot detektierten Kontrollen als 100% gesetzt und die auf diesem Blot detektierten Signale von M. Crohn-Patienten

prozentual zur Kontrolle angegeben (z.B. Patient A – 67% der Occludin-Expression der Kontrolle).

2.2.5.6 Korrektur der densitometrischen Ergebnisse

Biopsien von M. Crohn-Patienten wiesen im Vergleich zu Kontroll-Patienten eine Zunahme des subepithelialen Gewebes auf, die sich in mehr als verdoppelten subepithelialen Widerständen widerspiegelte. Diese Zunahme von subepitheliale Protein führt zu einer Verdünnung von epithelialen Proteinen (z.B. Tight junction-Proteinen). Auch bei unveränderter Tight junction-Protein-Expression bei M. Crohn würde somit fälschlicherweise eine Herabregulation der Expression angenommen werden. Darüber hinaus führt auch eine Atrophie oder Hyperproliferation des Epithels zu einem veränderten Verhältnis von Epithel zu Subepithel.

Es wurde daher ein Faktor errechnet, mit dem die Tight junction-Protein-Expression bei M. Crohn sowohl für die Zunahme subepithelialen Proteins als auch für Veränderungen der epithelialen Fläche korrigiert werden konnte. Dazu wurden Biopsien von 6 M. Crohn-Patienten und 6 Kontrollpatienten nach Entnahme auf Ussing-Kammer-Ringe fixiert (siehe 2.2.3.3 Container) und eine 0,049 cm² große Fläche ausgestanzt. Nach erfolgter Membranproteinextraktion wurde die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 2.2.5.2 Proteinquantifizierung) und die Proteinmenge pro serosale Fläche errechnet.

Zum Vergleich der epithelialen Fläche wurden Biopsien von 6 M. Crohn-Patienten und 6 Kontrollpatienten nach Entnahme unter einem Mikroskop ausgebreitet und am ungefärbten Gewebe die Anzahl der Krypten pro serosale Fläche bestimmt. Nach Formalin-Fixierung und Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden in Gewebsschnitten mikroskopisch Kryptenlänge und innerer Kryptendurchmesser bestimmt. Die Berechnung der mukosalen Oberfläche erfolgte nach der Formel $A_m = \pi \cdot d_c \cdot l_c \cdot n_c + A_s$, wobei d_c den inneren Kryptendurchmesser, l_c die Kryptenlänge, n_c die Anzahl der Krypten pro mm² serosale Fläche und A_s die mukosale Fläche ohne Krypten angibt.

Die Ergebnisse der Berechnung sind in Tabelle 3 dargestellt. Es zeigte sich, dass bei M. Crohn neben der Zunahme der Gesamt-Proteinmenge (165% der Kontrolle) auch die epitheliale Fläche aufgrund einer Hyperproliferation des Epithels vermehrt war (120% der Kontrolle). Da beide Veränderungen eine entgegengesetzte Korrektur der densitometrischen Tight junction-Signale erfordern, errechnete sich der Gesamt-Korrekturfaktor als 1,23.

Aufgrund des fehlenden Einflusses einer TNF α -Antikörper-Therapie auf die subepithelialen Widerstände und somit auf die Menge subepithelialen Proteins wurde beim Vergleich der Protein-Expression vor und nach TNF α -Antikörper-Therapie auf eine Korrektur der densitometrischen Ergebnisse verzichtet.

	Proteinmenge pro serosale Fläche (in $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	Länge der Krypten (in μm)	innerer Krypten- Durchmesser (in μm)	Kryptenzahl pro mm^2 serosale Fläche	mukosale Fläche pro serosale Fläche	n
Kontrolle	286 \pm 38 (100%)	333 \pm 34	17 \pm 2	79 \pm 19	2,2 \pm 0,1 (100%)	6
M. Crohn	474 \pm 48 (165%)	436 \pm 29	26 \pm 1	50 \pm 7	2,7 \pm 0,2 (122%)	6
p	<0,05	<0,05	<0,01	NS	<0,05	

Tabelle 3. Proteinmenge und epitheliale Fläche bei M. Crohn und Kontrollen.

2.2.6 Färbeverfahren

2.2.6.1 Fixierung, Einbettung und Schnittverfahren

Nach Transport der Biopsien in sauerstoffangereicherter und Bikarbonat-gepufferter Elektrolytlösung wurden diese nach spätestens 20 Minuten in Formalin fixiert. Sauerstoffanreicherung und kurze Transportzeiten waren nötig, um eine Sauerstoffmangel-induzierte Apoptoseinduktion nach Gewebeentnahme zu vermeiden.

Die Einbettung erfolgte nach 24-stündiger Fixierung in laborüblicher Paraffintechnik. Das Gewebe wurde dazu mit Paraffin durchtränkt und im Anschluss plan in einem Paraffinblock eingebettet. Nach Aushärten der Blöcke wurden mit einem Schlittenmikrotom 3-5 μm dünne Serienschnitte angefertigt, die mittels HE-Färbung auf ihre Schnitfführung hin überprüft wurden. Nur Präparate deren Schnitfführung parallel zu den Dickdarmkrypten verlief, wurden für die Apoptosefärbung mit TUNEL und DAPI weiter verwendet. Präparate mit abweichender Schnitfführung wurden umgebettet und die Schnitfführung erneut mittels HE-Färbung überprüft. Diese Arbeitsschritte wurden wiederholt, bis eine Krypten-parallele Schnitfführung gelang.

2.2.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung stellt eine Routinefärbung in der konventionellen Histologie dar. Ziel ist die Darstellung von Gewebsstrukturen im Organschnitt durch den Kernfarbstoff Hämatoxylin und Kontrastierung durch den Plasmafärbstoff Eosin.

Substanz	Wirkdauer
Xylol und absteigende Alkoholreihe	40 min
PBS	5 min
Methanol	10 min
PBS	5 min
Hämalaun	8 s
Leitungswasser 25 °C	30 s
Aqua dest.	30 s
Ethanol 30%,70%, 96%	30 s pro Lösung
Eosin 1%	3 s
Ethanol 96%	10 s
Ethanol 100%	30 s

Tabelle 4. Protokoll zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung an Paraffinschnitten.

2.2.6.3 TUNEL

Apoptose, der programmierte Zelltod, kann durch eine Vielzahl von Noxen sowie über mehrere Rezeptorkaskaden induziert werden. Alle Apoptose-Induktionswege münden jedoch in der gleichen Endstrecke, die sich morphologisch als Kondensation und Fragmentation des Zellkerns darstellt und biochemisch mit der Spaltung von Chromatin durch Ca^{2+} -abhängige Endonukleasen einhergeht. Diese Chromatin-Spaltung führt zunächst zu größeren (50-300 Kilobasen) und schließlich zu kleineren (180-200 Basenpaare) Fragmenten. Es können sowohl doppelsträngige niedermolekulare DNA-Fragmente auftreten als auch Einzelstrangbrüche ("nicks") in hochmolekularer DNA. TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase [TdT]-mediated deoxyuridinetriphosphat [dUTP] nick end-labeling) ist eine Technik zum Nachweis von Apoptosen in Gewebe-

schnitten. Dabei ermöglicht eine terminale Desoxynukleotidyltransferase die Markierung freier DNA-Strangbrüche mittels Fluorescein-markierter dUTP-Moleküle, die in einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können. Obwohl eine unspezifische Mitfärbung von vereinzelt Nekrosen bei massivem DNA-Abbau nicht ausgeschlossen werden kann, stellt die TUNEL-Färbung ein hochspezifisches und –sensitives Verfahren zum Apoptosenachweis dar [66]. Die Analyse apoptotischer Epithelzellen erfolgte in 200-facher Vergrößerung. Als Apoptosen wurden hochkondensierte, stark fluoreszierende und mehrfach segmentierte oder fragmentierte Kerne gezählt. Die Apoptoserate entspricht dem prozentualen Anteil apoptotischer intestinaler Epithelzellen an allen im Gesichtsfeld (~150 Epithelzellen/Gesichtsfeld) erkennbaren Epithelzellen. Die Apoptoserate eines jeden Patienten wurde dabei stets aus mindestens 4 verschiedenen Gesichtsfeldern gemittelt.

Substanz	Dauer	Wirkung
Xylol und absteigende Alkoholreihe	40 min	Entparaffinierung
PBS-Lösung	2 · 5 min	Spülen
20 µg/ml Proteinase K in Tris-HCl	15 min	Permeabilisieren
PBS-Lösung	2 · 5 min	Spülen
5% BSA + 20% FKS in PBS	30 min	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
PBS-Lösung	2 · 5 min	Spülen
Enzym-Label-Mix (1:2)	60 min (37°C)	TUNEL-Reaktion (im Dunkeln)
PBS	3 · 5 min	Spülen
Mountfluor	30 min	Eindecken

Tabelle 5. Protokoll zur TUNEL-Färbung an Paraffinschnitten.

2.2.6.4 DAPI-Kernfärbung

DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) ist ein Fluoreszenzfarbstoff und bindet an zelluläre DNA. DAPI kann bei einem Absorptionsmaximum von $\lambda=340$ nm und

einem Emissionsmaximum von $\lambda=488$ nm in einem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Es entstehen dabei stark fluoreszierende Zellkerne, während eine zytoplasmatische Fluoreszenz allenfalls als schwacher unspezifischer Hintergrund in Erscheinung tritt. Je kondensierter der Zustand des Kernchromatins ist, desto stärker fluoresziert die DNA. Somit treten Kondensationszustände wie Apoptosen, aber auch Mitosen, deutlich in Erscheinung. Mögliche Fehlerquellen, wie die fälschliche Mitzählung von Mitosen in intestinalen Krypten, können unter Zuhilfenahme morphologischer Kriterien minimiert werden. Als Apoptosen wurden hochkondensierte, stark fluoreszierende und mehrfach segmentierte oder fragmentierte Kerne gezählt. Dieses Verfahren erwies sich in mehreren vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe als valides und reproduzierbares Verfahren zur Apoptosezählung [43, 67]. Die Auswertung der Apoptoserate erfolgte wie oben beschrieben (siehe 2.2.6.3 TUNEL).

Substanz	Wirkdauer	Wirkung
Xylol und absteigende Alkoholreihe	40 min	Entparaffinierung
PBS-Lösung	2 · 5 min	Spülen
Methanol	10 min	Fixieren
PBS-Lösung	2 · 5 min	Spülen
DAPI	10 min	Kernfärbung
PBS	3 · 5 min	Spülen
Mountfluor	30 min	Eindecken

Tabelle 6. Protokoll zur DAPI-Färbung an Paraffinschnitten.

2.2.6.5 CD3-Antikörper-Färbung

CD3 (Cluster of differentiation 3) ist ein auf allen reifen T-Lymphozyten vorkommender Oberflächenmarker. In der vorliegenden Arbeit wurde die CD3-Färbung genutzt, um intraepitheliale T-Lymphozyten darzustellen und eine signifikante Beteiligung apoptotischer intraepithelialer T-Lymphozyten an den apoptotischen Zellen des Epithels auszuschließen. Dazu wurden Serienschritte von M. Crohn-Biopsien angefertigt und aufeinanderfolgende Schnitte wechselweise mit TUNEL und CD3-Antikörper gefärbt.

Durch Übereinanderlegen von CD3- und TUNEL-Färbung konnten apoptotische CD3-positive T-Lymphozyten identifiziert werden. Die Färbung wurde durch das Pathologische Institut der Charité, Campus Benjamin Franklin, im Rahmen von maschinellen Routinefärbungen durchgeführt. Als CD3-Antikörper diente ein monoklonaler CD3-Antikörper aus der Maus.

Substanz	Wirkdauer	Wirkung
Xylol und absteigende Alkoholreihe	40 min	Entparaffinierung
Citratpuffer (Kochen)	5 min	Epitop-Demaskierung
1. AK (CD3-monoklonal-Maus)	30 min	Bindung an CD3
Tris-Puffer	1 min	Spülen
2. AK (Kaninchen-anti-Maus)	30 min	Bindung an primären Antikörper
Tris-Puffer	1 min	Spülen
APAAP Immunkomplex	30 min	Bindung d. sekundärer Antikörpers; Signalverstärkung
Tris-Puffer	1 min	Spülen
2. AK (Kaninchen-anti-Maus)	10 min	Wiederholung zur Erhöhung der Sensitivität
Tris-Puffer	1 min	
APAAP Immunkomplex	10 min	
Tris-Puffer	1 min	Spülen
Entwickler	30 min	Markierung der AK-Komplexe
Hämalaun	1 min	Gegenfärben
Glyceringelatine	30 min	Eindecken

Tabelle 7. Protokoll zur CD3-Färbung an Paraffinschnitten.

2.2.7 Immunhistochemie und konfokale Mikroskopie

2.2.7.1 Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen ermöglichen die spezifische Darstellung von Strukturen durch Verwendung von Antikörpern. In der vorliegenden Arbeit erfolgten immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Tight junction-Proteine mit dem Ziel der Lokalisation dieser Proteine im Colon sigmoideum von Kontroll- und M. Crohn-Patienten. Aufgrund seiner Lokalisation innerhalb des Tight junction-Komplexes sowohl bei gesundem [68, 69] als auch bei entzündetem [44] Colon sigmoideum diente ZO-1 in allen Färbungen als Referenz für die Tight junction. Als zweiter primärer Antikörper diente jeweils Occludin oder eines der untersuchten Claudine. Darüber hinaus erfolgte stets eine Kernfärbung mit DAPI.

Je 4 Biopsien von Kontrollpatienten und M. Crohn-Patienten wurden direkt nach Entnahme für 1 Stunde in 4%-igem Paraformaldehyd fixiert. Nach Inkubation in 25 mM Glycin für 5 Minuten erfolgte eine stufenweise Entwässerung des Präparates durch eine ansteigende Sucrose-Reihe (10% Sucrose, 20% Sucrose für je 1 Stunde bei Raumtemperatur, anschließend in 30% Sucrose über Nacht bei 4°C). Danach wurden die Biopsien in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Methylbutan gefroren und in Tissue Embedding Medium eingebettet. Mit Hilfe eines Cryostaten wurden Gewebsschnitte von 4 µm Dicke angefertigt und erneut für 10 Minuten bei -20°C in Methanol fixiert. Nach 30-minütiger Rehydrierung mit PBS folgte eine Blockierung unspezifischer Bindungen mit Blockierungslösung (6% Ziegenserum, 1% BSA in PBS für 60 Minuten bei Raumtemperatur). Für alle folgenden Spülschritte wurde ebenfalls diese Blockierungslösung verwendet. Die primären Antikörper (Kaninchen anti-Occludin, Kaninchen anti-Claudin-1, -2, -3, -5, Kaninchen anti-ZO-1; Maus anti-Claudin-4; Maus anti-ZO-1) wurden 1:50 verdünnt und die Schnitte für je 1 Stunde bei 37°C mit den betreffenden Antikörpern inkubiert. Nach zweimaligem Spülen der Objektträger erfolgte für je 1 Stunde die Inkubation mit den sekundären Antikörpern (Ziege anti-Maus Alexa[®]488, Ziege anti-Kaninchen Alexa[®]594). Es folgten zwei Spülschritte und eine Kernfärbung mit DAPI (10 Minuten bei Raumtemperatur). Danach wurde das Präparat in Mountfluor eingebettet.

2.2.7.2 Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Lasermikroskopie stellt eine Weiterentwicklung der konventionellen Lichtmikroskopie dar. Durch Verwendung von Lochblenden, welche nur das aus der Brennebene emittierte Licht zum Detektor passieren lassen, von außerhalb der Fokal-

ebene stammendes Licht aber im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie ausblenden, können Präparate mit höherer Auflösung abgebildet werden. Darüber hinaus bietet die Verwendung monochromatischen Lichts eines Lasers den Vorteil einer spezifischen Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen. Durch digitale Verarbeitung der Signale mit Vorschaltung verschiedener Filter kann emittiertes Licht verschiedenster Wellenlängen detektiert werden.

Die konfokale Lokalisation der Tight junction-Proteine erfolgte mit einem Zeiss LSM 510 META Mikroskop. Zur Anregung dienten drei Laser der Wellenlängen 405 nm, 488 nm und 543 nm. Die Emission wurde mit einem Bandpassfilter der Wellenlängenbereiche 420-480 nm für DAPI, 505-550 nm für den Ziege anti-Maus-Antikörper sowie mit einem Nebenfartfilter zur Erfassung der Wellenlängen über 545 nm für den Ziege anti-Kaninchen-Antikörper detektiert. Die Aufnahmen erfolgten mit planaren x-y-Scans mit einem 40x-Ölimmersionsobjektiv 1,3 NA.

2.2.8 Elektronenmikroskopische Tight junction-Analyse

2.2.8.1 Allgemeines

Die Untersuchung der Anzahl von Tight junction-Strängen sowie der Tiefe des Tight junction-Netzwerkes erfolgte durch Gefrierbruchelektronenmikroskopie. Grundlage dieser Technik ist die Herstellung von Gewebebrüchen durch Aufbrechen eines gefrorenen Gewebestückes unter Vakuumbedingungen. Da das Präparat vorrangig an hydrophob-hydrophilen Grenzschichten bricht, können mit dieser Technik vor allem Membranen und somit auch Tight junctions dargestellt werden. Zur elektronenoptischen Darstellung erfolgte unter Vakuumbedingungen die Bedampfung des Präparats mit Platin- und Kohlenstoffdampf. Die dabei entstandene Replika, die einen Metallabguss der Oberfläche darstellt, konnte dann in einem Transmissionselektronenmikroskop untersucht werden [70, 71].

2.2.8.2 Gefrierbruchherstellung

Sigmoidoskopisch entnommene Biopsien wurden sofort nach Entnahme in Phosphatgepuffertem 2-prozentigem Glutaraldehyd fixiert. Direkt vor Verwendung der Proben zur Herstellung von Gefrierbrüchen wurde jedes Präparat je 30 Minuten in 10-prozentiger und anschließend in 30-prozentiger Glycerollösung entwässert. Mit Hilfe eines Skalpell wurden unter einer Lupe Gewebestücke zurechtgeschnitten und in einen aufklappbaren

Gewebehälter eingefügt. Der gefüllte und geschlossene Gewebshalter wurde dann in mit flüssigem Stickstoff gekühlten Freon 22 eingefroren und anschließend in flüssigem Freon 22 in einer Halterung befestigt (Abbildung 3A). Ziel war, das gefrorene Epithel im geschlossenen Gewebehalter in ein Vakuum zu überführen und dort durch Öffnung des Gewebehalters bei -100°C das Gewebe zu brechen. Dazu wurden die Gewebehalter in einem auf -180°C vorgekühlten Gefrierbruchgerät (Denton DC 502, Abbildung 4) arretiert und anschließend ein Vakuum von mindestens $2 \cdot 10^{-7}$ Torr erzeugt. Im folgenden Schritt erfolgte bei -100°C die mechanische Öffnung der Gewebehalter und dadurch bedingt der Bruch der Gewebestücke (Abbildung 3B).

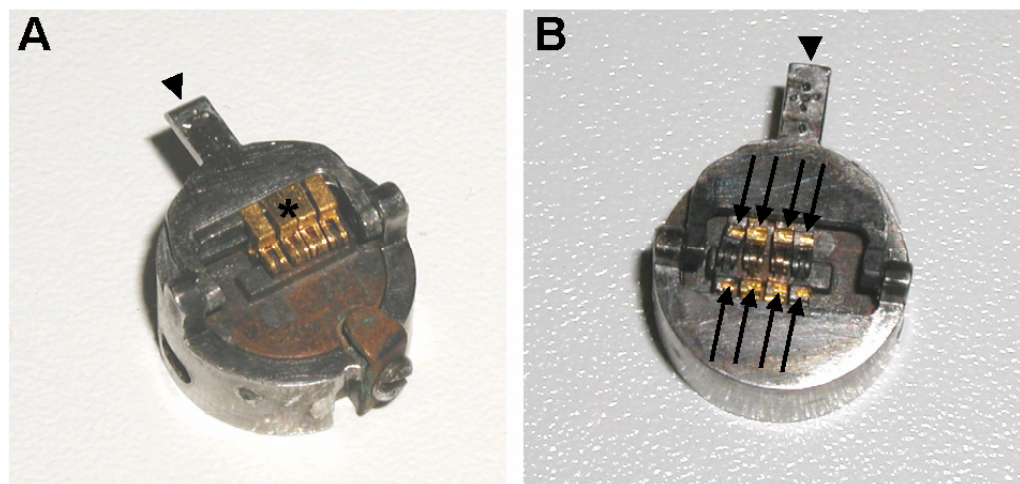


Abbildung 3. Probenhalter für die Gefrierbruchherstellung vor und nach Bruchvorgang. **A:** Vier mit Proben gefüllte geschlossene Gewebehalter (Asteriskus) vor dem Bruchvorgang befestigt auf einer Halterung. Die Pfeilspitze zeigt den Hebel in Ruheposition. **B:** Vier geöffnete Gewebehalter mit bereits entnommenen Proben. Die Pfeile zeigen die Probenöffnungen. Die Pfeilspitze zeigt den umgeklappten Hebel nach dem Bruchvorgang.

Noch unter Vakuumbedingungen wurde das Präparat dann durch eine Platin- und eine Kohlenstoffelektrode mit einem dünnen Film aus Platin und Kohlenstoff bedampft und somit eine Replika, ein aus Metall bestehender Abdruck des darunterliegenden Gewebes, erzeugt. Durch Überführung der Replika in Natriumhypochlorid wurden die organischen Reste entfernt, so dass nach anschließender Reinigung in Amylacetat lediglich der Metall-Abdruck des Gewebetruchs übrig blieb.

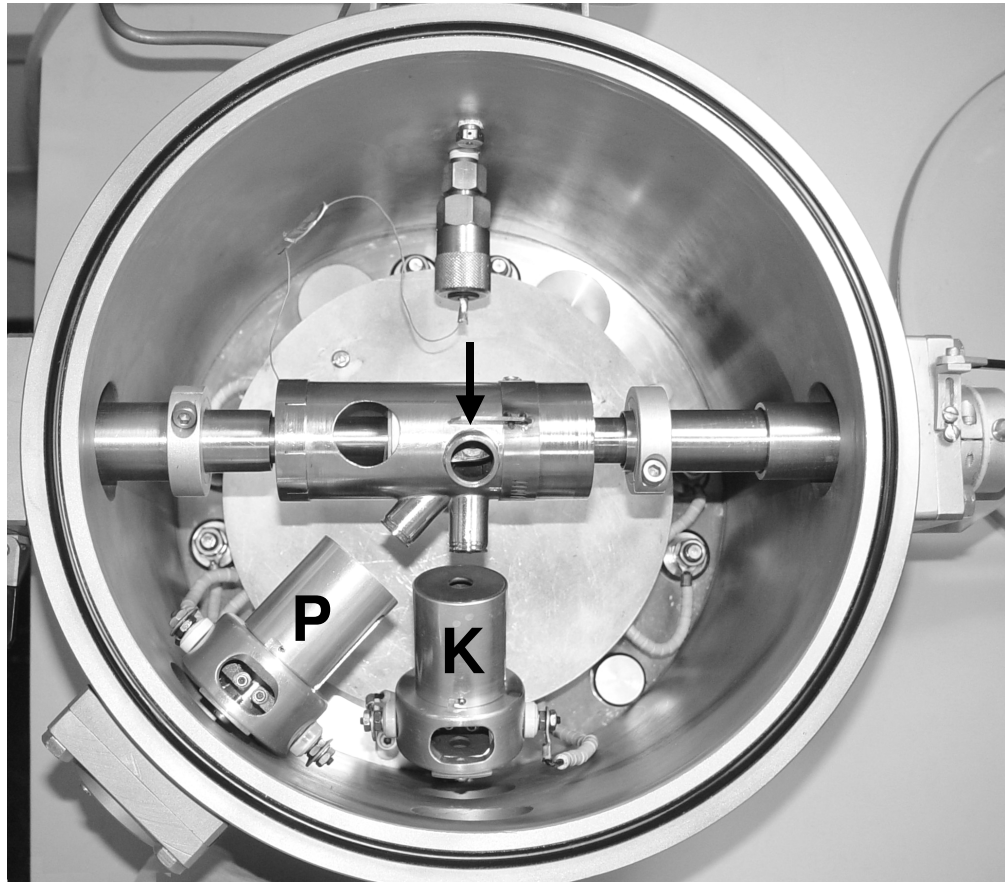


Abbildung 4. Denton DC 502 zur Gefrierbruchherstellung. Der Pfeil zeigt die Öffnung für den Gewebehalter (Gewebehalter siehe Abbildung 3). P und K zeigen die Platin- und Kohlenstoffelektrode zur Probenbedampfung.

2.2.8.3 Elektronenmikroskopie

Die Tight junction-Darstellung erfolgte mit einem Zeiss EM 902 Transmissionselektronenmikroskop. Je 5 Oberflächen- und 5 Kryptenregionen von 6 Kontrollpatienten und 6 M. Crohn-Patienten wurden in 31.000-facher Vergrößerung als Negativ fotografiert. Anschließend wurde mit weiterer 1,55-facher Vergrößerung aus jedem Negativ ein Bild entwickelt. Die morphometrische Analyse erfolgte somit an Bildern mit 48.000-facher Vergrößerung. Dazu wurde auf den Fotos ein Gitterraster senkrecht zum am weitesten luminal gelegenen Tight junction-Strang eingezeichnet, dessen senkrechte Linien einen Abstand von 6 mm auf dem Foto (entsprechend 125 nm) aufwiesen. Entlang jeder senkrechten Gitterlinie wurde innerhalb des Hauptnetzwerkes der Tight junction die Zahl der angeschnittenen Tight junction-Stränge als „Anzahl der Tight junction-Stränge“ bestimmt.

Weiterhin wurde die Ausdehnung der Tight junctions in apiko-basaler Richtung als Distanz zwischen dem am weitesten apikal und dem am weitesten basal liegenden Strang ermittelt und als Tiefe des "gesamten Tight junction-Netzwerkes" angegeben. Neben funktionellen, parallel zur Oberfläche verlaufenden Tight junction-Strängen erfasst die Tiefe des gesamten Tight junction-Netzwerkes auch aberrierende, nicht funktionelle Tight junction-Stränge, die senkrecht zur Oberfläche verlaufen (siehe Abbildung 16). Die Tiefe des "kompakten Tight junction-Netzwerkes" hingegen erfasst nur das dicht gepackte Netz funktionell zusammenhängender Tight junction-Stränge.

2.2.9 CDAI (Crohn's Disease Activity Index)

Zur Klassifizierung des klinischen Schweregrades eines akuten Schubes bei M. Crohn wurde der Crohn's Disease Activity Index (CDAI) nach Best verwendet [72]. Dieser klinische Index erfasst die Anzahl der Durchfälle, den Grad der Bauchschmerzen, das Allgemeinbefinden, extraintestinale Crohn-assoziierte Erkrankungen, Fieber, abdominale Resistenzen, den Hämatokrit sowie das Gewicht des Patienten. Jede Kategorie wird dabei mit einem Faktor gewichtet und aus der Gesamtsumme ein Punktwert gebildet. Liegt der Gesamtpunktwert unterhalb von 150 Punkten, so befindet sich der Patient klinisch in Remission. Bei Punktwerten bis 220 liegt ein milder Schub, bei Werten bis 350 ein mittelschwerer, bei Werten über 350 Punkte ein schwerer Schub vor. Aufgrund des Einflusses subjektiver Parameter (Bauchschmerzen, Allgemeinbefinden) eignet sich der CDAI vor allem für Längsschnittuntersuchungen, jedoch nur bedingt für Querschnittuntersuchungen (Tabelle 8).

Kategorie	Berechnung	Patient	Punktwert
1. Anzahl der Durchfälle / Woche	mal 2	35	70
2. Grad der Bauchschmerzen (0-3) als Summe von 7 Tagen	mal 5	14	70
3. Allgemeinbefinden (0-4) als Summe von 7 Tagen	mal 7	7	49
4. Assoziierte Symptome (Auge, Haut, Mund, Fisteln oder Fieber)	mal 20	1	20
5. Durchfallbehandlung, wenn ja	plus 30	-	0
6. Abdominelle Resistenz (0, 2 oder 3)	mal 10	3	30
7. Hämatokrit (Hkt)	Frauen: (42-Hkt) · 6 Männer: (47-Hkt) · 6	35 (w)	42
8. Gewicht (1 - KG / Standardgewicht)	mal 100	30 kg 160 cm	50
			331

Tabelle 8. CDAI-Berechnung am Beispiel eines M. Crohn-Patienten mit mittelschwerem Schub.

2.2.9 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde SPSS für Windows verwendet. Die im folgenden gezeigten Daten sind Einzelwerte oder Mittelwerte \pm SEM (standard error of the mean). Für Unterschiede zwischen zwei verschiedenen Gruppen (M. Crohn vs. Kontrolle) wurde der ungepaarte zweiseitige Student-T-Test verwendet. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen (Kontrolle, M. Crohn vor Therapie, M. Crohn nach Therapie) wurde eine Varianzanalyse durchgeführt (ONE WAY ANOVA; Least Significant Difference Test). Für gepaarte Daten (Untersuchung M. Crohn vor und nach Therapie) wurde der gepaarte 2-seitige Student-T-Test verwendet. $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen.