

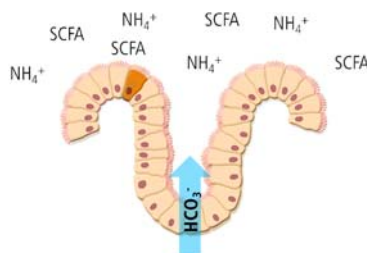
TNF- α Überexpression steigert epitheliale Permeabilität und luminal Alkalisierung im proximalen Kolon der Maus

Marina Juric^{1†}, Fang Xiao^{1†}, Salah Amasheh², Michael P. Manns¹, Ursula Seidler^{1‡}, Oliver Bachmann^{1‡}

¹Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie, Medizinische Hochschule Hannover, und ²Institut für Klinische Physiologie, Charité - Campus Benjamin Franklin, Berlin
[†]gemeinsame Erst-, und [‡]gemeinsame Letztautorschaft

Einleitung

Eine Schädigung der intestinalen Barriere konnte in verschiedenen experimentellen Modellen chronischer Darmentzündung nachgewiesen werden, die pathophysiologischen Folgen für das epitheliale Säure-Basen Gleichgewicht sind jedoch größtenteils unbekannt. Daher führten wir eine Studie im TNF- α -überexprimierenden Mausmodell (TNF^{ΔARE}) durch und wählten das proximale Kolon, das sich aufgrund niedriger HCO₃⁻-Sekretionsraten besonders für die Fragestellung eignet.



Methoden

- Histologie
- Ussing Kammer
HCO₃⁻-Abgabe, I_{sc}, ³H-Mannitol-Flux, Impedanzspektroskopie, Dilutionspotential
- Quantitative realtime-PCR
- Caspase 3/7 Assay
- TUNEL-Färbung
- Western blot

Ergebnisse

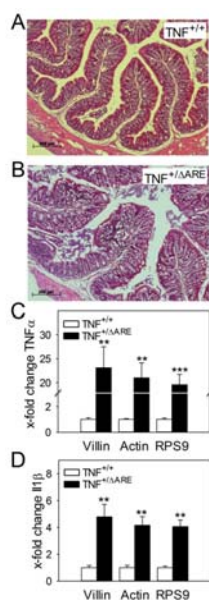


Abb. 1: Histologie und RNA Cytokinexpression im proximalen Kolon von TNF^{ΔARE} Mäusen. TNF^{ΔARE} Mäuse zeigen eine milde bis moderate Entzündung mit intaktem Epithel (A,B). TNF α und Interleukin1 β sind unabhängig vom herangezogenen Referenzgen hoch signifikant erhöht.

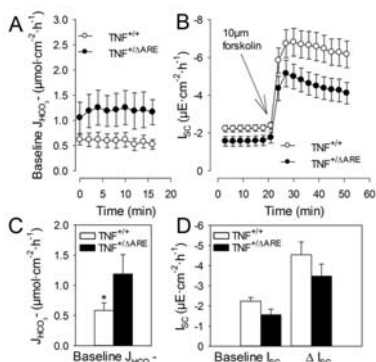


Abb. 2: Basaler HCO₃⁻-Abgabe und Kurzschlussstrom (I_{sc}) im proximalen Kolon von TNF^{ΔARE} Mäusen. Obwohl die Alkalisierungsraten insgesamt niedrig ausfallen, sind sie doch im TNF^{ΔARE} Gewebe signifikant erhöht (A,C). Der I_{sc} als Indikator für aktiven Transport unterscheidet sich unter basalen und stimulierten Bedingungen nach Zugabe von Forskolin nicht signifikant zwischen TNF^{+/+} und TNF^{ΔARE} Mäusen (B,D).

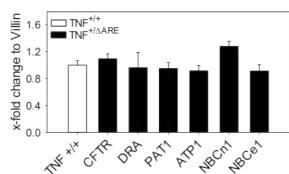


Abb. 3: RNA Expression von an der HCO₃⁻-Sekretion beteiligten Transportern und Kanälen im proximalen Kolon von TNF^{ΔARE} Mäusen. Bezogen auf Villin zeigen sich CFTR, DRA, PAT1, ATP1, NBCn1 und NBCe1 unverändert. TNF^{+/+} Kontrollen (weißer Balken) sind auf 1 aufgerechnet.

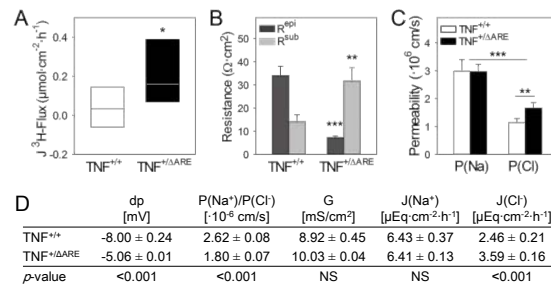


Abb. 4: Permeabilitätsuntersuchungen im proximalen Kolon von TNF^{ΔARE} Mäusen. In TNF^{ΔARE} Mäusen ist ein erhöhter ³H-Mannitolflux (serosal nach mukosal) als Maß für die epitheliale Permeabilität zu beobachten (A). Darüber hinaus zeigen impedanzspektroskopische Messungen einen signifikant verminderten epithelialen und eine signifikant erhöhten subepithelialen Widerstand im entzündeten proximalen Kolon (B). Aus der Leitfähigkeit (G) berechnete Dilutions Potentiale zeigen eine insgesamt höhere, jedoch zwischen gesundem und entzündetem Gewebe unveränderte Permeabilität von Natrium. Die Permeabilität von Chlorid-Ionen war hingegen in TNF^{ΔARE} Mäusen signifikant erhöht (C,D).

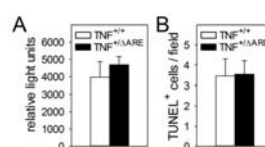


Abb. 5: Apoptose im proximalen Kolon von TNF^{ΔARE} Mäusen. Sowohl im Caspase 3/7 Assay als auch in der TUNEL Färbung war keine Veränderung in der Anzahl apoptotischer Zellen zu verzeichnen.

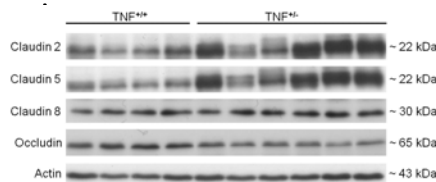
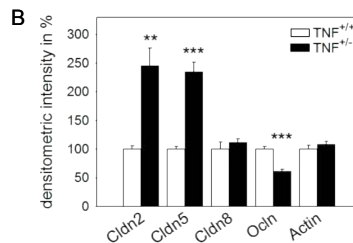


Abb. 6: Expression von Schlussleistenproteinen im proximalen Kolon von TNF^{ΔARE} Mäusen. Die densitometrische Auswertung der originalen Western Blots (A) zeigt im TNF^{ΔARE}-Gewebe eine signifikante Hochregulation von Claudin 2 und 5 während Claudin 8 unverändert bleibt und Occludin vermindert exprimiert wird (B).



Zusammenfassung und Schlussfolgerung

- Im Kolon der TNF- α überexprimierender Mäuse zeigt sich eine gesteigerte luminal Alkalisierung ohne Anhalt für gesteigerten aktiven Transport
- Erhöhte ³H-Mannitolfluxe und eine verringert epitheliale Resistenz weisen auf eine gestörte Barrierefunktion hin
- Die selektive Steigerung der Cl⁻-Permeabilität passt zum veränderten Expressionsmuster der Schlussleistenproteine

Entzündung bei TNF- α Überexpression führt zu gesteigerter epithelialer Permeabilität im proximalen Kolon der Maus, die kausal mit der erhöhten luminalen Alkalisierung zusammenhängen könnte (DFG SFB621 C10).