

# Barrier Function of the Follicle-Associated Epithelium in Stress and Crohn's disease



**Åsa Keita**

**Disputationsdatum:** 8 juni 2007 vid Linköpings Universitet

**Opponent:** Professor Björn Weström, Inst. för Cell- och Organismbiologi, Zoofysiologi, Lund

**Huvudhandledare:** Professor Johan Dabrosin Söderholm

**Biträdande handledare:** Universitetslektor Ann-Charlott Ericson

Crohns sjukdom är en kronisk inflammatorisk tarmsjukdom av okänd orsak där botande behandling saknas. Det är välkänt att Crohns sjukdom är associerad med en förändrad intestinal barriärfunktion och troligtvis är störningen en tidig förändring i inflammationsprocessen. Histologiska studier av tarmslemhinna från Crohnpatienter har visat att den tidigaste synbara förändringen i slemhinnan är små aftösa sår över det så kallade follikelassocierade epitelet (FAE). FAE skiljer sig histologiskt och funktionellt från vanligt villusepitel (VE). FAE är specialiserat för att fanga innehåll från tarmen och transportera det till underliggande immunvävnad, de så kallade Peyerska placken. Denna funktion är viktig för att

inducera skyddande immunsvaret, men den utgör också en ingångsväg för sjukdomsalstrande bakterier.

Studier har visat att Crohns sjukdom är associerad med ett kraftigt ökat immunsvaret mot bakterier, och sjukdomsförloppet kan ändras av stress. Med detta i åtanke, samt vetenskapen om att FAE är en ingångsport för antigen och bakterier, så blev avhandlingens fokus och syfte att studera effekterna av stress på FAE, samt att undersöka rollen av FAE vid utvecklingen av tarminflammation, särskilt vid Crohns sjukdom.

**Flertalet studier har visat** ett ökat upptag genom FAE hos djur. Dessutom har studier påvisat att akut och kronisk stress kan modulera barriärfunktionen i VE. Inled-

ningsvis studerades därför effekterna av psykologisk stress på FAE. Wistar råttor utsattes för kronisk vattenaversionstress (WAS), ileum plockades ut och VE respektive FAE identifierades makroskopiskt och monterades i Ussingkammare för passagestudier. Resultat visade att stressade råttor hade ökad genomsläpplighet av fluorescenskonjugerade *E. coli* K-12 (kemiskt avdödade men med bevarad antigenicitet), (Tabell 1), samt det antigena proteinet HRP. Härmed kunde vi för första gången demonstrera en ökad permeabilitet i FAE efter stress, och även en högre permeabilitetsökning i FAE jämfört med VE.

Vi visste nu att kronisk stress kan modulera barriärfunktionen i FAE och leda till upptag av bakterier som normalt är icke

Grupp, vävnad	120 min passage
Stress, FAE	47.9 (17.6 ± 94.7) <sup>a,b</sup>
Kontroll, FAE	1.4 (0.9 ± 5.1)
Stress, VE	7.8 (6.4 ± 19.3) <sup>c</sup>
Kontroll, VE	5.0 (3.0 ± 5.8)

**Tabell 1.** Wistar råttor utsattes för vattenaversions-stress eller icke-stress (kontroller). Vävnadsbitar av villus epitel (VE) och follikelassocierat epitel (FAE) monterades i Ussingkammare och passage av fluorescens-konjugerade *E. coli* K-12 studerades över tid med fluorimeter. <sup>a</sup>P < 0.005 vs. kontroll FAE, <sup>b</sup>P < 0.05 vs. stress VE, <sup>c</sup>P < 0.05 vs. kontroll VE.

invasiva. För att ta reda på vilka mekanismer som kunde ligga bakom den stress-inducerade ökningen av permeabiliteten i FAE gick vi vidare med att studera betydelsen av neuropeptider och mastceller. De viktigaste resultaten från denna studie visade att stressförändringarna i slemhinnan regleras via kortikotropinfrisättande hormon och mastceller. Vidare visade det sig att vasoaktiv intestinal peptid kunde efterlikna stressens effekter på genomsläppligheten, och att detta kunde förhindras genom att blockera mastcellerna.

**Eftersom FAE i råttor** uppvisade en ökad passage av både HRP och bakterier jämfört med vanligt epitel, så ville vi gå vidare och titta på hur det såg ut i människa. För att kunna studera detta så utarbetade vi en metod för att identifiera FAE och VE i human ileum. Först avlägsnades det yttre muskellagret och vävnaden placerades med mukosan upp i en petriskål. Genom att belysa vävnaden underifrån med en stark ljuskälla kunde respektive vävnad sedan identifieras i ett dissektionsmikroskop (Fig. 1). Det visade

sig att FAE hos friska kontroller hade en signifikant högre passage av HRP jämfört med VE. Dessutom var passagen av både avdödade *E. coli* K-12 och levande *E. coli* HB101 signifikant ökad jämfört med VE (Fig. 2A). Efterföljande *in vitro* experiment visade att upptaget av *E. coli* K-12 var aktinberoende och huvudsakligen transcellulärt, medan den ökade HRP-passagen i FAE inhiberades genom att blockera macropinocytos.

**Med vetskapen om att FAE från human ileum** skiljer sig funktionellt från vanligt epitel så blev det en naturlig fortsättning att karaktärisera barriärfunktionen i FAE hos patienter med Crohns sjukdom. Resultat visade att hos patienter med Crohns sjukdom var passagen av både K-12 och HB101 genom FAE betydligt ökad jämfört med både icke-inflammatoriska och inflammatoriska kontroller (ulcerös kolit) (Fig. 2B). Exponering av bakterier i Ussingkammare gav även förändringar i jontransport (konduktans) genom FAE hos Crohnpatienter. Detta visade på att *E. coli* påverkar barriärfunktionen av slemhinnan vid Crohns.

Vidare visade konfokalmikroskopi att det ökade bakterieupptaget i slemhinna från Crohns ökade andelen av *E. coli* som colokaliserade med dendritiska celler, jämfört med kontroller.

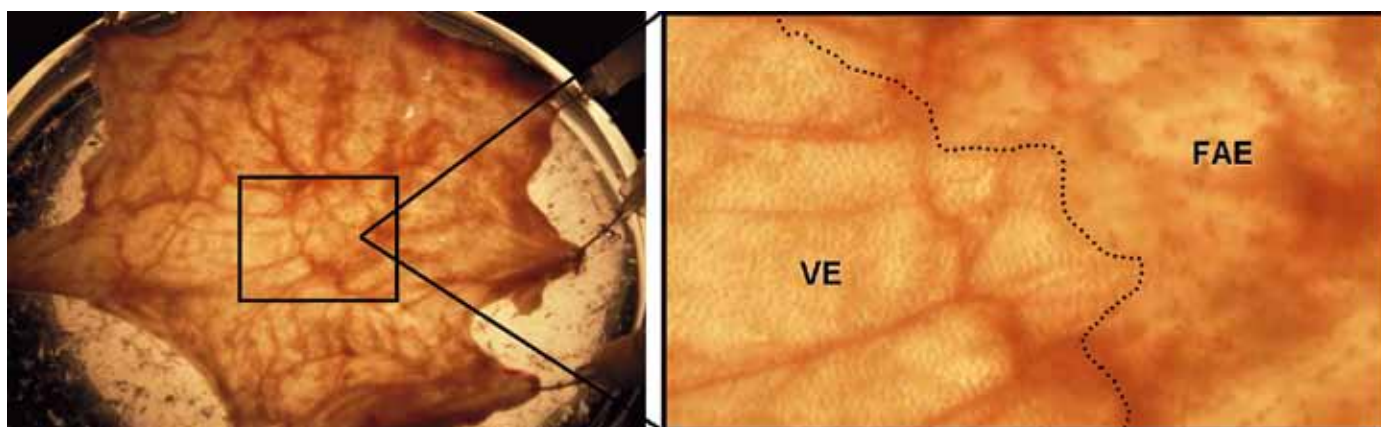
**Sammanfattningsvis** visar avhandlingen att stress kan förändra upptaget av bakterier från tarmen via FAE, med mekanismer som innefattar kortikotropinfrisättande hormon, vasoaktiv intestinal peptid och mastceller. Vidare presenterar avhandlingen att human FAE skiljer sig funktionellt från vanligt epitel, och att patienter med Crohns sjukdom uppvisar en ökad passage genom FAE jämfört med både inflammatoriska och icke-inflammatoriska kontroller. Avhandlingen har gett nya kunskaper kring regleringen av slemhinnebarriären och insikter i sjukdomsuppkomsten vid Crohns sjukdom genom att påvisa en tidigare okänd defekt i barriärfunktionen i FAE.

#### Publicerade arbeten från avhandlingen:

Velin AK, Ericson AC, Braaf Y, Wallon C, Söderholm JD. *Increased antigen and bacterial uptake in follicle associated epithelium induced by chronic psychological stress in rats.* Gut. 2004 Apr;53(4):494-500.

Keita ÅV, Gullberg E, Ericson AC, Salim SY, Wallon C, Kald A, Artursson P, Söderholm JD. *Characterization of antigen and bacterial transport in the follicle-associated epithelium of human ileum.* Lab Invest. 2006 May;86(5):504-16.

Keita AV, Salim SY, Jiang T, Yang PC, Franzén L, Söderkvist P, Magnusson KE, Söderholm JD. *Increased uptake of non-pathogenic E. coli via the follicle-associated epithelium in longstanding ileal Crohn's disease.* J Pathol. 2008 Jun;215(2):135-44.



**Fig. 1.** Identifiering av villus epitel (VE) och follikelassocierat epitel (FAE) i operationsvävnad. Den streckade linjen visar gränsen mellan VE och FAE. Notera det regelbundna mönstret av villi i VE jämfört med det mer oregelbundna mönstret av flertalet folliklar som omger de glesa villi i FAE.