

Impedanzmessungen der epithelialen Barrierefunktion

A. H. Gitter

Barrierefunktion und Impedanz von epithelialen Geweben

Das einheitliche Konzept der Epithelgewebe, als Grenze zwischen der funktionellen Außenseite des Körpers und dem Interstitium im Innern, stammt von Friedrich Gustav Jacob Henle (1838). Eine Hauptfunktion der Epithelien ist die Bildung einer Barriere, die unspezifischen, unerwünschten Stoffaustausch zwischen Außen und Innen verhindert. Eine weitere Hauptfunktion ist der organspezifische, geregelte Austausch oder Transport bestimmter Stoffe. Für verschiedene Stoffklassen wirkt die Barriere unterschiedlich, zum Beispiel einerseits für Ionen oder andererseits für ungeladene und unpolare Moleküle. Die Barriere für die Ionen der intra- und extrazellulären Salzlösungen lässt sich durch Messung des elektrischen Gleichstromwiderstands oder der Wechselstromimpedanz bestimmen.

Morphologische Grundlage der Barrierefunktion sind Zellmembranen und extrazelluläre Verbindungen benachbarter Epithelzellen ("Tight junctions"), welche den parazellulären Weg mehr oder weniger gut abdichten. In einer Messung der Wechselstromimpedanz Z_{epi} von Epithelien im erweiterten Audiofrequenzbereich ($f = 1 \text{ Hz bis } 100 \text{ kHz}$) liefern die apikale und basolaterale Zellmembran ohmsche (R_a und R_b) und kapazitive Beiträge (C_a und C_b) und die "Tight junctions" wirken näherungsweise als Widerstand R_p (siehe unten) [1]. "Tight junctions" bilden keine völlig undurchlässige Barriere (darum die Anführungszeichen), sondern können – abhängig vom molekularen Aufbau – insbesondere für kleine Kationen (Na^+) oder auch für größere Anionen (Fluoreszein) durchlässig sein. Zum Beispiel findet sich das Tight junction-Protein Claudin-2 in relativ undichten (lecken) Epithelien wie Dünndarm und proximaler Nierentubulus.

Native Epithelien, wie zum Beispiel das einschichtige der Enterozyten im Darm, liegen einem "subepithelialen" Bindegewebe auf, das experimentell in-vitro nicht vollständig entfernt werden kann, ohne die Integrität der relativ dünnen Epithelschicht zu zerstören. Die Gleichstrommessung des transmuralen elektrischen Widerstands eines Darmepithelgewebepräparats enthält daher neben dem transepithelialen Widerstand R_{epi} einen nicht abtrennbaren "subepithelialen" Beitrag R_{sub} . Kapazitive Beiträge können im "subepithelialen" Bindegewebe, wo wegen der fehlenden "Tight junctions" der Strom im betrachteten Frequenzbereich überwiegend parazellulär verläuft, vernachlässigt werden.

Modell für Epithelien mit "subepitheliale" Bindegewebe

Für natives Epithelgewebe liefert eine Gleichstrommessung die Summe $R_{\text{epi}} + R_{\text{sub}}$. Wenn die Wechselstromimpedanz mit dem in Abb. 1a gezeigten, stark vereinfachenden Modell beschrieben werden kann, erlaubt eine Analyse im erweiterten Audiofrequenzbereich die Bestimmung der Variablen R_{epi} , C_{epi} , R_{sub} , und damit die Separation von R_{epi} und R_{sub} :

$$Z_{\text{einfach}} = R_{\text{sub}} + R_{\text{epi}} / (1 + (s \cdot R_{\text{epi}} \cdot C_{\text{epi}}))$$

mit $s = i \cdot 2 \cdot \pi \cdot f$. Die Beiträge von apikaler und basolateraler Membran und parazellulärem Weg wurden zusammengefasst zu R_{epi} und C_{epi} ; dies setzt voraus, dass ($R_a \gg R_b$ und $C_a \ll C_b$) oder ($R_a \cdot C_a \approx R_b \cdot C_b$ und $R_p \rightarrow \infty$), siehe unten. Die Ortskurve der Impedanz in der komplexen Zahlenebene bildet einen Kreisbogen mit Mittelpunkt auf der reellen Achse.

Die Morphologie nativer Epithelgewebe ist oft komplex. Im Darm beispielsweise ist die Epithelschicht unter anderem durch Einsenkung von Krypten stark gefaltet. Impedanzmessungen zeigten, dass das in Abb. 1a gezeigte Modell dann nicht ohne weiteres anwendbar ist [2]. Man behilft sich mit einer Änderung der Impedanzgleichung nach Cole und Cole [3],

$$Z_{\text{ColeCole}} = R_{\text{sub}} + R_{\text{epi}} / (1 + (s \cdot R_{\text{epi}} \cdot C_{\text{epi}})^{(1-\alpha)}) .$$

Dies beschreibt ebenfalls einen Kreisbogen; der Mittelpunkt liegt aber oberhalb der reellen Achse. Mit der Gleichung können die gemessenen Kurven, mit Hilfe einer phänomenologisch begründeten vierten Variablen α , mitunter gut wiedergegeben werden. Eine biophysikalische Erklärung der Variablen α fehlt aber und damit der Nachweis, anhand der so durchgeführten Analyse von den Werten der Variablen auf die Gewebewiderstände schließen zu dürfen. Dennoch wird die Methode häufig verwendet.

Ein biologisch begründetes Modell mit vier Variablen folgt einer Darstellung des Epithels als Parallelschaltung von sehr vielen Zellen mit unterschiedlichen Zeitkonstanten, wobei die Zeitkonstanten auf einer logarithmischen Achse als normalverteilt angenommen werden:

$$Z_{\tau\text{-Verteilung}} = R_{\text{sub}} + R_{\text{epi}} \int_0^{\infty} \frac{\frac{-(\ln(x/\tau))^2}{2 \cdot \sigma^2}}{\sigma \cdot x \cdot \sqrt{2 \cdot \pi}} \cdot \frac{1}{1 + (s \cdot x)} \cdot dx$$

wobei τ und σ Mittelwert und Standardabweichung der Normalverteilung von $\ln(x/\tau)$ bedeuten. Ein experimenteller Beweis für die biologisch sinnvolle Zuordnung der Variablen fehlt indes noch.

Abb. 2 zeigt einen Modellvergleich für die Impedanz des Mäuse-Kolons.

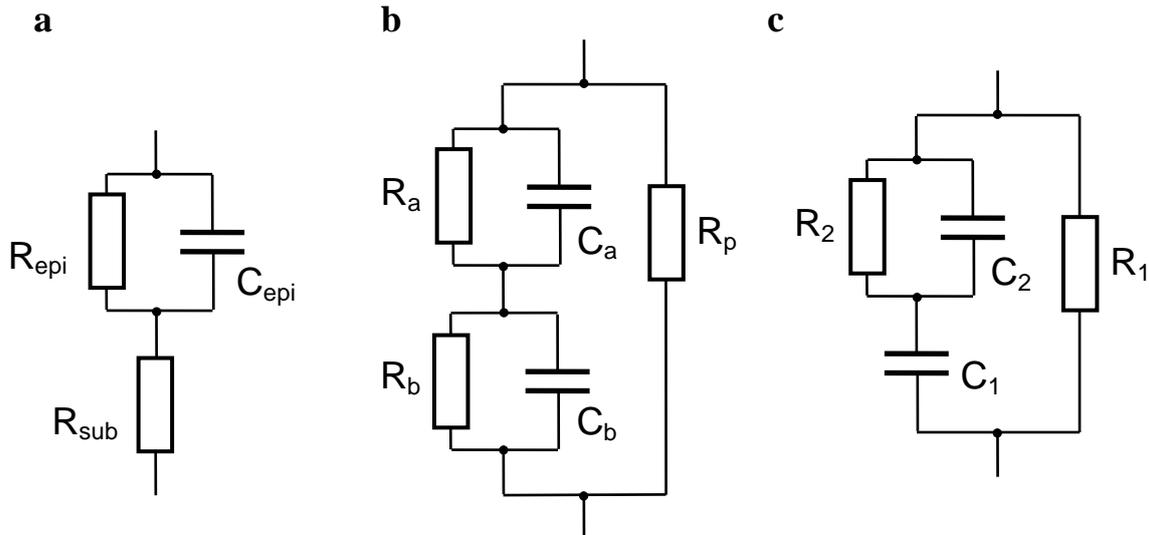


Abb. 1: a) Modell der Impedanz Z_{einfach} eines nativen Epithelgewebes mit "subepitheliale" Bindegewebe. Ohmsche und kapazitive Eigenschaften der Epithelschicht werden, vereinfachend, durch R_{epi} und C_{epi} repräsentiert. Das "subepitheliale" Gewebe wird durch einen ohmschen Widerstand R_{sub} dargestellt; b) Modell der Impedanz Z_{epi} eines einschichtigen Epithels. Der transzelluläre Weg enthält Widerstände R_a und R_b sowie Kapazitäten C_a und C_b der apikalen beziehungsweise basolateralen Membran. Der parazelluläre Weg wird (vereinfachend, siehe genauer in [1]) durch R_p repräsentiert; c) Ersatzschaltbild des biologisch sinnvollen elektrischen Modells eines einschichtigen Epithels. Die Ersatzschaltung hat die gleiche frequenzabhängige Impedanz zwischen den Anschlüssen, enthält aber nur vier (statt fünf) Bauteile (R_1 , R_2 , C_1 und C_2), die mit der Impedanzanalyse bestimmt werden können.

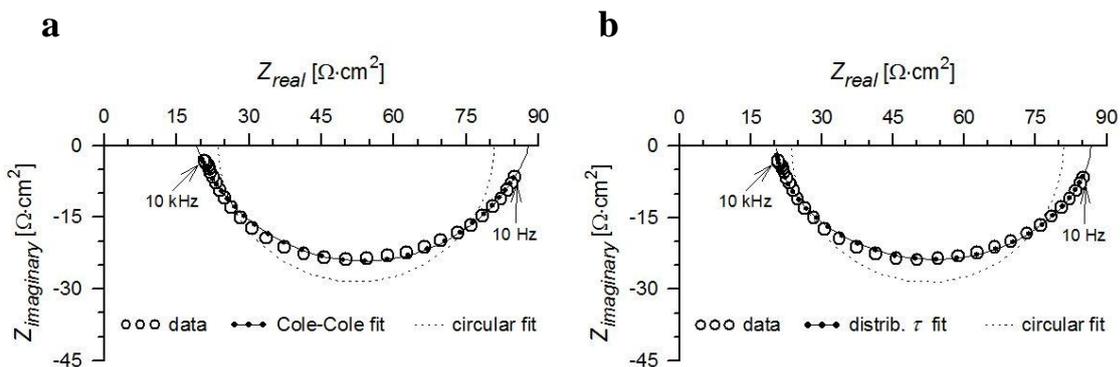


Abb. 2: Transepitheliale Impedanz des Mäuse-Kolons. Gezeigt sind die Daten für 31 Frequenzen von 10 Hz bis 10 kHz (offene Kreise) und Modellanpassungen: einfaches Modell gemäß Abb. 1a (gepunktete Linie), und, dargestellt als schwarze Punkte auf durchgezogener Linie, a) Cole-Cole-Impedanzgleichung bzw. b) Modell verteilter Zeitkonstanten.

Zellkultur-Modell mit trans- und parazellulärem Stromweg

Die Deutung elektrophysiologischer Versuche wird durch Nutzung epithelialer Zellkulturen, ohne die komplexe Morphologie nativer Gewebe, erleichtert, so dass ein elektrisches Modell apikale und basolaterale Zellmembran, sowie den parazellulären Stromweg auflösen kann (Abb. 1b).

Das biologisch sinnvolle Epithelmodell enthält die fünf Variablen R_a , R_b , C_a , C_b und R_p . Die Impedanz des Modells ist

$$Z_{\text{epi}} = \frac{R_p \cdot (R_a + R_b) + s \cdot R_p \cdot (R_a \cdot \tau_b + R_b \cdot \tau_a)}{R_p + R_a + R_b + s \cdot (R_p \cdot (\tau_a + \tau_b) + R_a \cdot \tau_b + R_b \cdot \tau_a) + s^2 \cdot R_p \cdot \tau_a \cdot \tau_b}$$

wobei $s = i \cdot 2 \cdot \pi \cdot f$ ist; $\tau_a = R_a \cdot C_a$ und $\tau_b = R_b \cdot C_b$ sind die Membranzeitkonstanten. Wenn $\tau_a = \tau_b = \tau_{ab}$, reduziert sich die Impedanz zu

$$Z_{a=b} = (R_a + R_b) \cdot R_p / ((R_a + R_b) + R_p \cdot (1 + s \cdot \tau_{ab})) ,$$

was, außer für $R_p \rightarrow \infty$ (dichte Epithelien), trotz *einer* Zeitkonstanten (Ortskurve kreisbogenförmig) *nicht* einer RC-Parallelschaltung entspricht.

Ein Widerstand R_s in Reihe mit Z_{epi} kann nicht-epitheliale Impedanzbeiträge berücksichtigen, zum Beispiel den Widerstand eines porösen Trägermaterials, auf dem die Zellen wachsen, und Widerstände innerhalb der Messkammer. Die im Versuch gemessene transmurale Impedanz ist daher

$$Z_{\text{mur}} = R_s + Z_{\text{epi}}$$

Z_{epi} resultiert jedoch genauso aus einer Ersatzschaltung mit nur vier unabhängigen Variablen [4] (Abb. 1c). Die fünf Variablen R_a , R_b , C_a , C_b und R_p lassen sich daher aus einer Messung der frequenzabhängigen Impedanz mit anschließender Ausgleichsrechnung, bei der die Impedanzfunktion an die Messwerte angepasst wird, nicht ohne weiteres bestimmen.

Die Impedanz der Ersatzschaltung in Reihe mit R_s beträgt

$$Z_{\text{mur}} = R_s + \frac{R_1 + s \cdot R_1 \cdot R_2 \cdot (C_1 + C_2)}{1 + s \cdot (R_1 \cdot C_1 + R_2 \cdot (C_1 + C_2)) + s^2 \cdot R_1 \cdot R_2 \cdot C_1 \cdot C_2}$$

Die Variablen R_1 , R_2 , C_1 , C_2 , R_s ergeben sich eindeutig aus einer Messung der frequenzabhängigen Impedanz mit anschließender Ausgleichsrechnung. R_1 ist der transepitheliale Gleichstromwiderstand R_{epi} ,

$$R_1 = R_{\text{epi}} = 1 / (1 / (R_a + R_b) + 1 / R_p) .$$

Obwohl das Gleichungssystem für R_a , R_b , C_a , C_b und R_p unterbestimmt ist, ergibt sich aus der Analyse der Reihenwiderstand R_s . Diese Separation erlaubt es, im Folgenden das System ohne R_s zu betrachten.

Der Beitrag des parazellulären Stromwegs

Der Kehrwert der bestimmaren Variablen $R_1 = R_{\text{epi}}$ entspricht der Summe der trans- und parazellulären Gleichstrom-Leitwerte des Epithels,

$$1 / R_1 = G_{\text{trans}} + G_{\text{para}}, \text{ wobei}$$

$$G_{\text{trans}} = 1 / (R_a + R_b) \quad \text{und} \quad G_{\text{para}} = 1 / R_p$$

sind.

Es ist jedoch nicht ohne weiteres klar, ob der parazelluläre Stromweg ohne besondere Berücksichtigung des lateralen Stromwegs betrachtet, also durch einen einfachen Widerstand R_p repräsentiert werden darf, wie in obigen elektrischen Modellen vorausgesetzt. Kottra und Frömter [1] haben gezeigt, dass der laterale Spalt zwischen Gallenblasenepithelzellen von *Necturus* viel besser mit einem kabelartigen Modell (aus verteilten Widerständen und Kapazitäten bestehend) beschrieben werden kann. Die Berechtigung des in Abb. 1b dargestellten Modells, und damit der in Abb. 1c gezeigten Ersatzschaltung, kann durch selektive Veränderung von R_p im sogenannten Calcium-Switch-Experiment geprüft werden. Die Durchlässigkeit der "Tight junctions" wird biologisch durch den Einbau verschiedener molekularer Bausteine reguliert; es kann aber auch experimentell die parazelluläre Durchlässigkeit verändert werden: Die Verringerung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration öffnet den parazellulären Weg [5] und verringert damit nur R_p , beziehungsweise R_1 in der Ersatzschaltung.

Die Impedanzmessungen vor und nach Verringerung der Ca^{2+} -Konzentration (Calcium-Switch) liefern R_2 , C_1 , C_2 unter verschiedenen Bedingungen. Wenn beide Messungen gleiche Werte dieser Variablen ergeben, ist das ein Indiz dafür, dass der Widerstand R_p (ohne nachgeschaltetes "Kabel" [1]) ein gutes Maß für die Impedanz des parazellulären Stromwegs in Bezug auf den transepithelialen Ionenfluss darstellt [6]. (Im Fall $R_a \cdot C_a \approx R_b \cdot C_b$ und $R_p \rightarrow \infty$, siehe oben, sollte C_{epi} konstant sein.)

Da die oben dargestellte Impedanzanalyse nicht den parazellulären Widerstand R_p getrennt von $(R_a + R_b)$ bestimmen kann, sind andere Methoden notwendig. Conductance scanning ermöglicht die Bestimmung von G_{trans} und G_{para} , und damit von R_p [2], zum Beispiel in der lecken epithelialen Zelllinie MDCK-C11 [7] und (weniger genau) in den dichten Epithelzelllinien HT-29/B6 und MDCK-C7 [2,6]. Dies vermeidet eine Verrechnung von Messungen, die auf Ionenströmen von Na^+ , K^+ (kleine Kationen) und Cl^- der Salzlösungen beruhen, mit Flussmessungen ungeladener oder anionischer Substanzen (siehe [2]), zum Beispiel mit Fluoreszein [8]; allerdings können Flussmessungen zusätzliche Information ergeben.

Bestimmung des Leitwerts von Tight junction-Kanalproteinen

Durch Messungen des transepithelialen Widerstands R_1 können *selektive Änderungen* des parazellären Leitwerts G_p quantifiziert werden. In einem Epithel vor und nach Transfektion mit einem Protein, welches durch Bildung eines Ionenkanals in den "Tight junctions" die parazelluläre Barrierefunktion beeinflusst, also G_{para} und nicht G_{trans} ändert, ergibt sich

$$1 / R_1^{vor} = G_{trans} + G_{para}^{vor} \quad \text{und} \quad 1 / R_1^{nach} = G_{trans} + G_{para}^{nach} .$$

Damit ist die Leitwert des transfizierten Tight junction-Kanalproteins

$$\Delta G_{para} = G_{para}^{nach} - G_{para}^{vor} = 1 / R_1^{nach} - 1 / R_1^{vor} .$$

R_2 , C_1 und C_2 müssen vor und nach Transfektion gleich sein, wenn das Protein nur parazellulär wirkt! So trugen Impedanzmessungen zur Erkenntnis der funktionellen Bedeutung von Claudin-2 bei [6]:

Western-Blots und Immunfluoreszenzmikroskopie zeigten, dass Claudin-2 von MDCK-C7-Zellen normalerweise nicht exprimiert wird. Nach Transfektion des Proteins mit Hilfe eines Expressionsvektors wurde jedoch Claudin-2 in den Zellen gefunden. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie bewies die Lokalisation des Proteins in den (parazellulären) "Tight junctions" und Abwesenheit in den Zellmembranen. Die Analyse der Variablen R_2 , C_1 und C_2 (oder näherungsweise C_{epi}), siehe oben, mit einem Calcium-Switch-Experiment bestätigte die Anwendbarkeit des oben beschriebenen elektrischen Epithelmodells und lieferte den Wert R_s der nicht-epithelialen Impedanzbeiträge. Die Bestimmung des transepithelialen Widerstands vor und nach Transfektion ergab den Leitwert des transfizierten Claudin-2, ΔG_{para} , und offenbarte, dass es einen Ionenkanal in den "Tight junctions" bildet, der die epitheliale Barriere deutlich herabsetzt.

Während Impedanzmessungen die Änderungen des parazellulären Leitwerts zeigten, ließen weitere elektrophysiologische Versuche (Dilutions- und biionische Potentialmessungen in der Ussing-Kammer, Flussmessungen ungeladener Zucker und Dextrane) die Kationenselektivität des Claudin-2-Kanals erkennen und Conductance-Scanning ermöglichte eine Angabe der parazellulären Leitfähigkeit der untersuchten MDCK-Zellen.

Bei der Untersuchung von ionenselektiven Tight junction-Kanalproteinen ist der transepitheliale Fluoreszein-Fluss J_F kein zuverlässiges Maß für G_{para} . Wenn J_F parazellulär verläuft, sollte zwar im Calcium-Switch-Experiment $\Delta G_{para} / G_{para}$ mit $\Delta J_F / J_F$ einhergehen. Wegen unterschiedlicher Größen und Ladungen der fließenden Ionen lässt sich aber nicht schließen, dass die relativen Änderungen in einem Experiment mit molekular unterschiedlich zusammengesetzten "Tight junctions" gleich sind.

Literatur

[1] Kottra G, Frömter E (1984) Rapid determination of intraepithelial resistance barriers by alternating current spectroscopy. II. Test of model circuits and quantification of results. *Pflügers Arch.* 402: 421-432

[2] Gitter AH (2000) Die Barrierefunktion des Kolonepithels unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen. Habilitationsschrift, Fachbereich Humanmedizin der Freien Universität Berlin

[3] Cole KS, Cole RH (1941) Dispersion and absorption in dielectrics. I. Alternating current characteristics. *J. Chem. Physics* 9: 341-351

[4] Zobel OJ (1923) Theory and Design of Uniform and Composite Electric Wave Filters, *Bell Systems Techn. J.* 2: 1-46

[5] Contreras RG, Miller JH, Zamora M, González-Mariscal L, Cereijido M (1992) Interaction of calcium with plasma membrane of epithelial (MDCK) cells during junction formation. *Am J Physiol.* 263: C313-318

[6] Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schöneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M (2002) Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci.* 115: 4969-4976

[7] Gitter AH, Bertog M, Schulzke JD, Fromm M (1997) Measurement of paracellular epithelial conductivity by conductance scanning. *Pflügers Arch.* 434: 830-840

[8] Krug SM, Fromm M, Günzel D (2009) Two-path impedance spectroscopy for measuring paracellular and transcellular epithelial resistance. *Biophys. J.* 97: 2202-2211

Publiziert:

Gitter, A.H. (2010) "Impedanzmessungen der epithelialen Barrierefunktion". In: "Technische Systeme für die Lebenswissenschaften", Beckmann, D., Meister, M. (eds.), Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V., Heilbad Heiligenstadt, pp. 73-79

(ISBN: 978-3-00-032249-5)

Autor: Prof. Dr. phil. nat. habil. Alfred H. Gitter

Fachhochschule Jena, FB Medizintechnik und Biotechnologie, Carl-Zeiss-Promenade 2, 07745 Jena, Tel.: (03641)205665, e-Mail: alfred.gitter@fh-jena.de