

Skripte

(15. 11. 2001)

**Elektrodynamische Modellierung
epithelialer Gewebe**

Alfred H. Gitter

Bioelektrische Gewebeanalyse

Theorie

Biologisches System
(Epithelgewebe)

–

Physikalisches Modell
(elektrischer Schaltkreis)

–

Mathematische Beschreibung
(Gleichungssystem)

Experiment

Biologische Funktion
(trans- und parazelluläre Barriere)

–

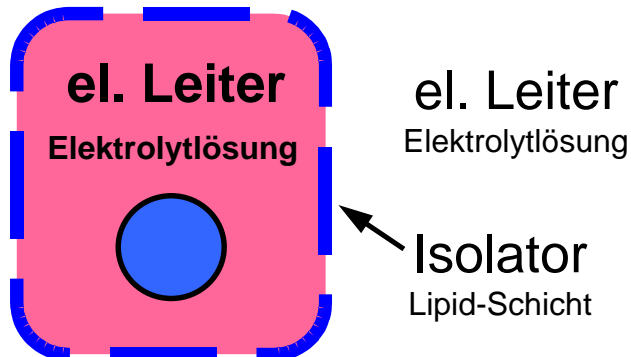
Modellparameter
(Werte der Schaltelemente)

–

Meßdaten
(frequenzabhängige Impedanz)

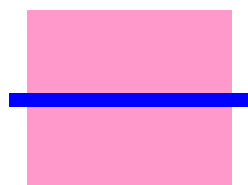
– – **Bioinformatik**

Elektrische Eigenschaften der Zellmembranen



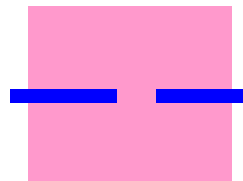
Intra- und Extrazellularraum enthalten elektrisch leitende Elektrolytlösungen, die von der relativ schlecht leitenden Zellmembran getrennt werden.

Die Zellmembran besteht aus der für Ionen undurchlässigen Lipidschicht (mit der Dielektrizitätskonstanten ≈ 7 , zum Vergleich: Luft = 1), in die Ionenkanalproteine eingebaut sind.



Kondensator

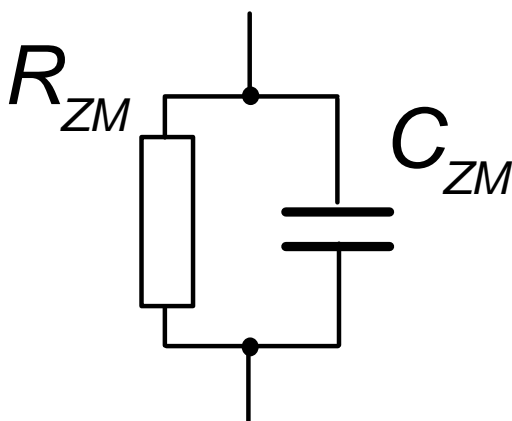
konstante Kapazität pro Membranfläche
etwa $1 \mu\text{F} / \text{cm}^2$



Widerstand

Membranproteine bilden leitfähige Poren (sog. Ionenkanäle)

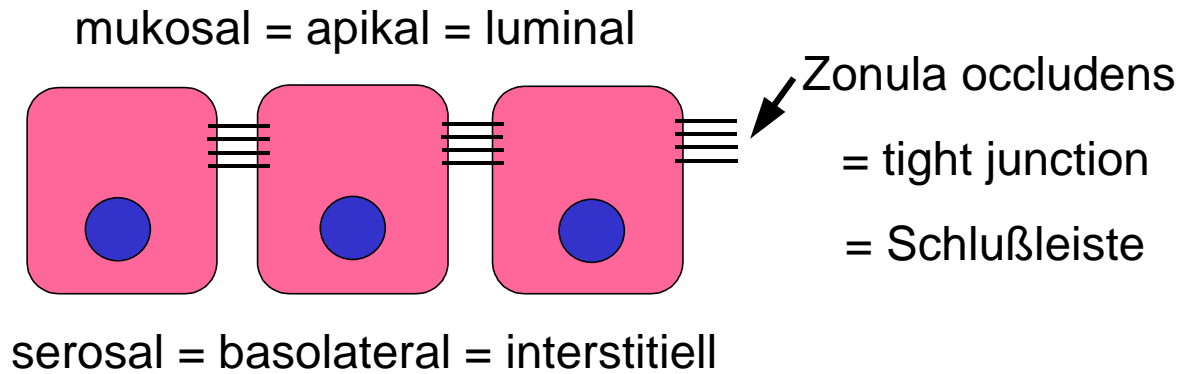
Physikalisches Modell: RC-Schaltkreis



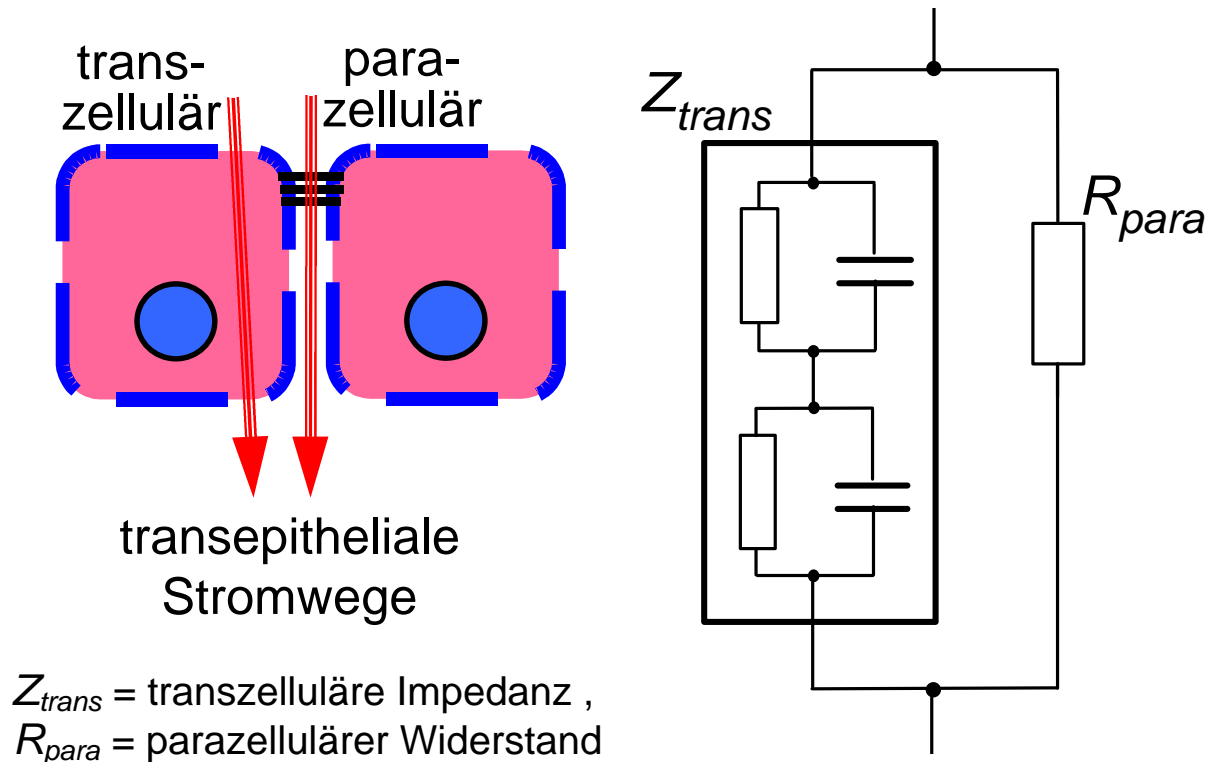
Ohmsche und kapazitive Komponenten der Zellmembran liegen nebeneinander und können durch ein einfaches physikalisches Modell, einem Widerstand R_{ZM} parallel zu einer Kapazität C_{ZM} , repräsentiert werden.

Das elektrische Modell berücksichtigt nicht Abweichungen vom idealen Verhalten der Bauteile. Außerdem werden die spezifischen Eigenschaften der Ladungsträger im biologischen System (verschiedene Ionen statt Elektronen) nicht berücksichtigt.

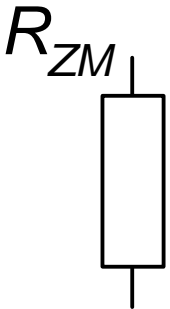
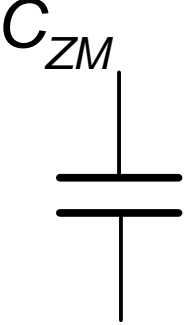
Biologisches System: Epithelgewebe



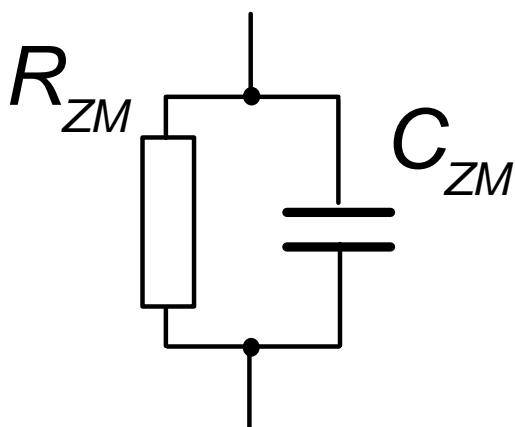
Schaltkreismodell von Epithelgewebe



Mathematische Beschreibung der physikalischen Größen

 <p>Die Impedanz Z_R eines Widerstands R_{ZM}, $Z_R = R_{ZM}$, hängt nicht von der Frequenz des durchfließenden (geklemmten) Stromes ab. Der Kehrwert von R_{ZM} heißt Leitwert (G_{ZM}).</p>	 <p>Die Impedanz Z_C einer Kapazität C_{ZM} ist $Z_C = \frac{1}{s \cdot C_{ZM}}$, wobei $s = j \cdot 2 \cdot \pi \cdot f$ die imaginäre Einheit ($\sqrt{-1}$) mal der Winkelfrequenz des Klemmstroms ist.</p>
--	---

Mathematische Beschreibung des Zellmembranmodells



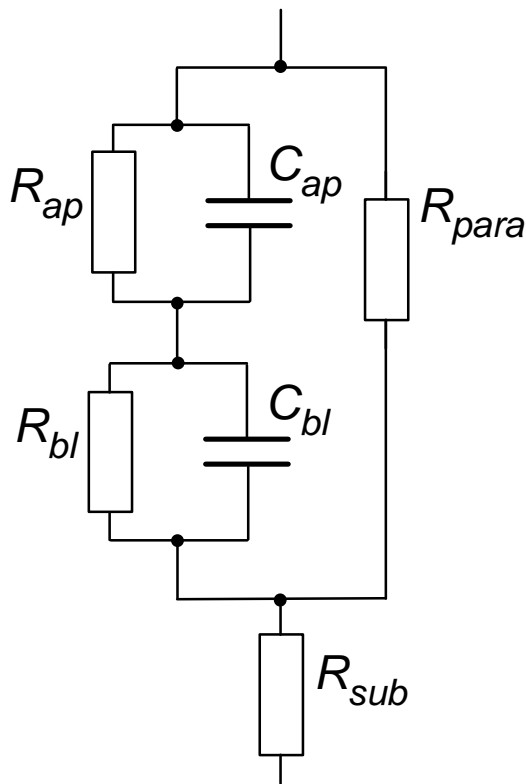
$$\frac{1}{Z_{ZM}} = \frac{1}{Z_R} + \frac{1}{Z_C}$$

Die Impedanz Z_{ZM} des einfachen RC-Schaltkreises als Funktion der Frequenz (f) ist

$$Z_{ZM} = \frac{R_{ZM}}{1 + (s \cdot R_{ZM} \cdot C_{ZM})} ,$$

$\tau_{ZM} = R_{ZM} \cdot C_{ZM}$ heißt Membranzeitkonstante.

Parameter des elektrischen Epithel-Modells



Elektrischer Äquivalentschaltkreis eines Epithels

Die transzelluläre Impedanz (Z_{trans}) ist die Summe der Impedanzen von apikaler und basolateraler Membran.

Die beiden Membranen werden jeweils durch einen Widerstand und einen parallelgeschalteten Kondensator repräsentiert (R_{ap} und C_{ap} , bzw. R_{bl} und C_{bl}).

Der parazelluläre Weg wird durch den Widerstand R_{para} repräsentiert.

Der Serienwiderstand des Zellkulturträgers (bei Zellkulturen) bzw. des subepithelialen Gewebes (bei nativem Gewebe) wird durch R_{sub} repräsentiert.

Mathematische Beschreibung des Epithelmodells

Damit ergibt sich die Impedanz des Epithels (ohne R_{sub}) als

$$Z_{epi} = \frac{R_{para} \cdot (R_{ap} + R_{bl}) + s \cdot R_{para} \cdot (R_{ap} \cdot \tau_{bl} + R_{bl} \cdot \tau_{ap})}{R_{para} + R_{ap} + R_{bl} + s \cdot (R_{para} \cdot (\tau_{ap} + \tau_{bl}) + R_{ap} \cdot \tau_{bl} + R_{bl} \cdot \tau_{ap}) + s^2 \cdot R_{para} \cdot \tau_{ap} \cdot \tau_{bl}}$$

wobei $s = j \cdot 2 \cdot \pi \cdot f$ die imaginäre Einheit mal der Winkelfrequenz des Klemmstroms ist; τ^{ap} und τ^{bl} sind die Zeitkonstanten der apikalen und basolateralen Membran (s.o.).

Theoretische Analyse

Die Impedanz des Epithels, Z_{epi} , ist eine Funktion von 5 Parametern,

$Z_{epi} = Z_{epi}(R_{ap}, R_{bl}, R_{para}, t_{ap}, t_{bl})$, von denen 2 (t_{ap}, t_{bl}) frequenzabhängig sind.

Durch Umformung der Gleichung (jeder Term wird durch $(R_{para} + R_{ap} + R_{bl})$ geteilt) läßt sich die Zahl der Parameter minimieren und es ergibt sich

$$Z_{epi} = \frac{k_1 + s \cdot k_2}{1 + s \cdot k_3 + s^2 \cdot k_4},$$

wobei $k_1 \dots k_4$ Funktionen von $R_{ap}, R_{bl}, R_{para}, t_{ap}$ und t_{bl} sind.

Problem:

Durch Messung von Z_{epi} als Funktion der Frequenz, lassen sich eindeutig $k_1 \dots k_4$ bestimmen. Die haben jedoch keine physiologische Bedeutung. Für die sinnvollen Parameter des Epithelmodells ($R_{ap}, R_{bl}, R_{para}, t_{ap}$ und t_{bl}) ist das System dagegen unterbestimmt: Aus den 4 gegebenen Parametern $k_1 \dots k_4$ kann man nicht eindeutig auf die 5 Parameter des Epithelmodells schließen.

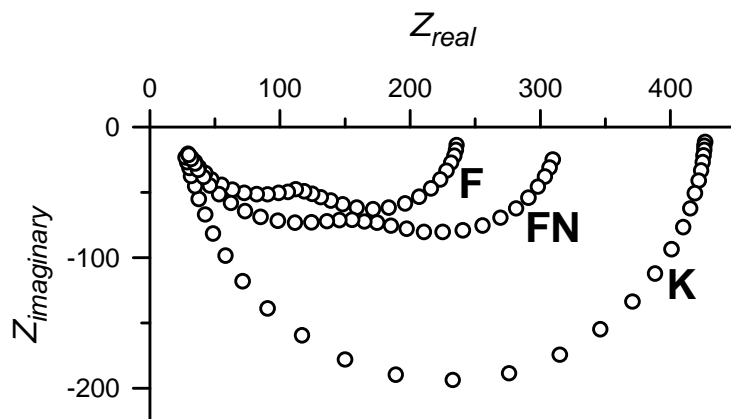
Lösungswege:

- a) Vorgabe einzelner Modellparameter durch alternative Bestimmung einzelner Größen mit anderen Methoden
- b) Kopplung von Gleichungssystemen durch selektive Perturbation einzelner Modellparameter im Experiment

Meßdaten ® Modellparameter

Beispiel: Modulation des transzellulären Widerstands

Eingabe: Meßdaten (frequenzabhängige Impedanz)



Impedanzanalyse, HT-29/B6-Zellkultur (Nyquist-Diagramm)

Impedanzdaten (31 Frequenzen zwischen 2 Hz und 2 kHz) unter Kontrollbedingungen (K), nach Forskolin-Zugabe (F) und nach anschließender Zugabe von NPPB (FN).

Fit-Algorithmus

(1)	Einlesen der Meßdaten:	$\Re(z_i), \Im(z_i), f_i (i = 1 \dots 31) [K, F, FN]$
(2)	Graphische Darstellung:	Nyquist-Diagramm ($\Re(z_i), \Im(z_i), f_i$)
(3)	Funktionsgleichungen:	$Z_{epi} := Z_{epi}(R_{ap}, R_{bl}, R_{para}, C_{ap}, C_{bl}, f)$ $s := \sum (z_i - Z_{epi}(R_{ap}, R_{bl}, R_{para}, C_{ap}, C_{bl}, f_i))^2$
(4)	Randbedingungen:	$R_{para}[C] = 3,9 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2; C_{bl}[K] = C_{bl}[F] \dots$
(5)	Startbedingungen:	$R_{ap} = 1 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2; C_{ap} = 3 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2};$ usw.
(6)	Minimierung von s:	FindMinimum(s, $\{R_{ap}, R_{bl}, R_{para}, C_{ap}, C_{bl}\}, [K, F, FN]$) / $5 \times 3 = 15$ Parameter
(7)	Ausgabe der Parameter:	$R_{ap}, R_{bl}, R_{para}, C_{ap}, C_{bl} [K, F, FN]$
(8)	Graphische Darstellung:	Nyquist-Diagramm ($\Re(Z_{epi}), \Im(Z_{epi}), f_i$)

Programmierung

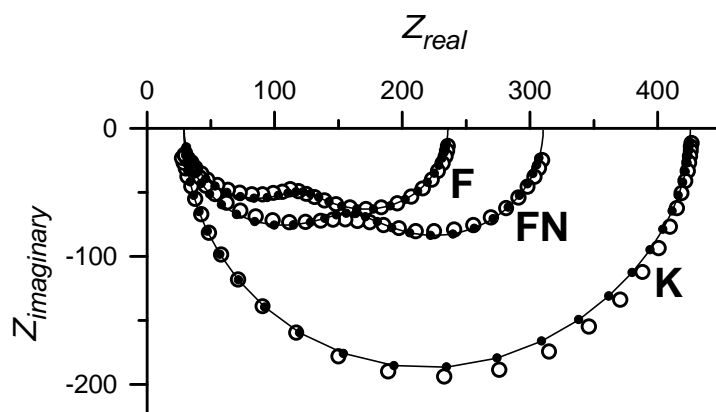
- Übersichtliches, kurzes Programm durch Objektorientierung (kein Struktogramm)
- starke Befehle in *Mathematica*, z.B. *FindMinimum* zur numerischen Minimierung

Ausgabe: Modellparameter (Werte der Schaltkreiselemente)

	R_{epi} [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	R_{ap} [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	C_{ap} [$\mu\text{F} / \text{cm}^2$]	R_{bl} [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	R_{para} [$\text{k}\Omega \cdot \text{cm}^2$]	I_{sc} [$\mu\text{A} / \text{cm}^2$]
Kontrolle	375 ± 12	354 ± 12	$5,00 \pm 0,04$	61 ± 3	$3,9 \pm 1,3$	$3,4 \pm 0,4$
Forskolin	226 ± 10 ***	100 ± 5 ***	$5,75 \pm 0,06$ ***	140 ± 6 ***	$1,8 \pm 0,6$ (***)	$84,1 \pm 1,4$ ***
F + NPPB	265 ± 10 ***	123 ± 6 ***	$5,72 \pm 0,05$ n.s.	161 ± 6 ***	$3,9 \pm 1,3$ (***)	$24,5 \pm 0,5$ ***

C_{bl} [$\mu\text{F} / \text{cm}^2$]	R_{sub} [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	χ^2 [$\Omega^2 \cdot \text{cm}^4$]	R-Faktor [$\cdot 10^6$]	Zell- kulturen
$70,2 \pm 1,3$	$28,4 \pm 0,8$	1185 ± 147	$0,26 \pm 0,03$	6

Anpassung des Modells an die Meßdaten



Impedanzanalyse, HT-29/B6-Zellkultur (Nyquist-Diagramm)

Die mit dem Fit-Algorithmus berechnete Impedanz des Modells (schwarze Punkte auf durchgezogener Linie) paßt gut auf die gemessenen Impedanzdaten (offene Kreise).

Bioelektrische Gewebeanalyse

Beispiel: Modulation des parazellulären Widerstands

Biologische Frage

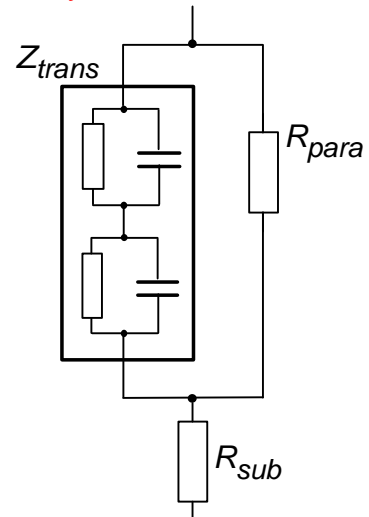
Welche Funktion hat das Protein Claudin-2 in den *tight junctions* von Epithelien ?

Biologisches System (MDCK Epithelgewebe)



- (1) MDCK Klon C7, natürlich ohne Claudin-2
- (2) MDCK Klon C7, mit Claudin-2 Expression
- (3) MDCK Klon C11, natürlich mit Claudin-2

Physikalisches Modell



R_{para} als Maß für die Barrierefunktion des parazellulären transepithelialen Weges

selektive Perturbation

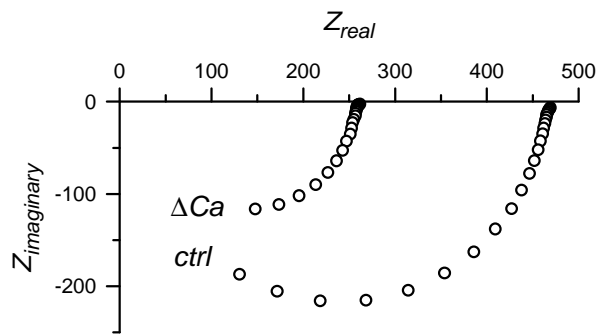
Am selben Epithel wird die Impedanz Z_{epi} unter zwei Bedingungen (*ctrl* und ΔCa) gemessen, wobei sich nur R_{para} ändert.

Mathematische Beschreibung

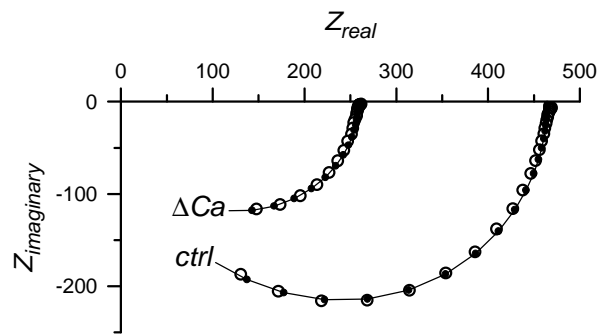
$$Z_{epi}[ctrl] = \frac{1}{(1/Z_{trans}) + (1/R_{para}[ctrl])} + R_{sub}$$

$$Z_{epi}[\Delta Ca] = \frac{1}{(1/Z_{trans}) + (1/R_{para}[\Delta Ca])} + R_{sub}$$

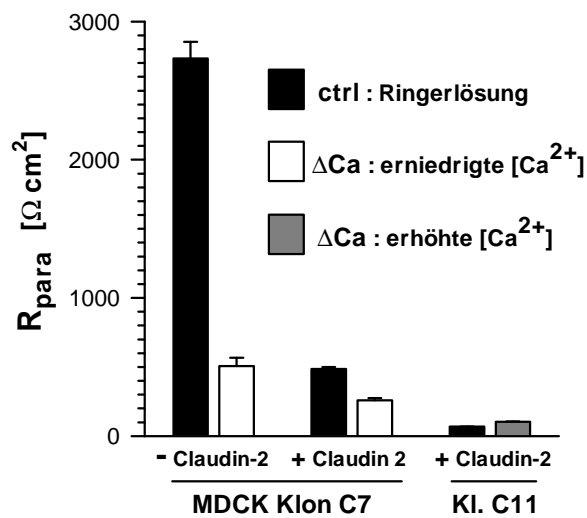
Meßdaten (Klon C7, mit Claudin-2)



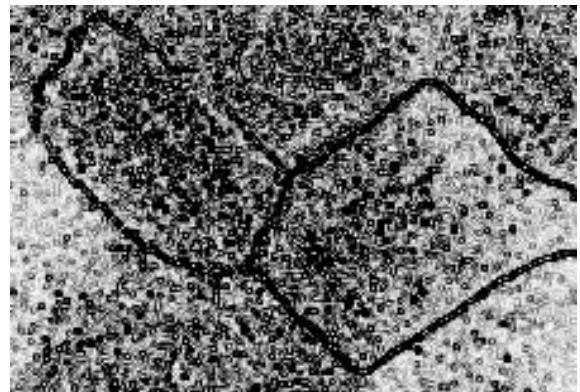
Anpassung des Modells



Modellparameter



Claudin-2 im MDCK Klon C7

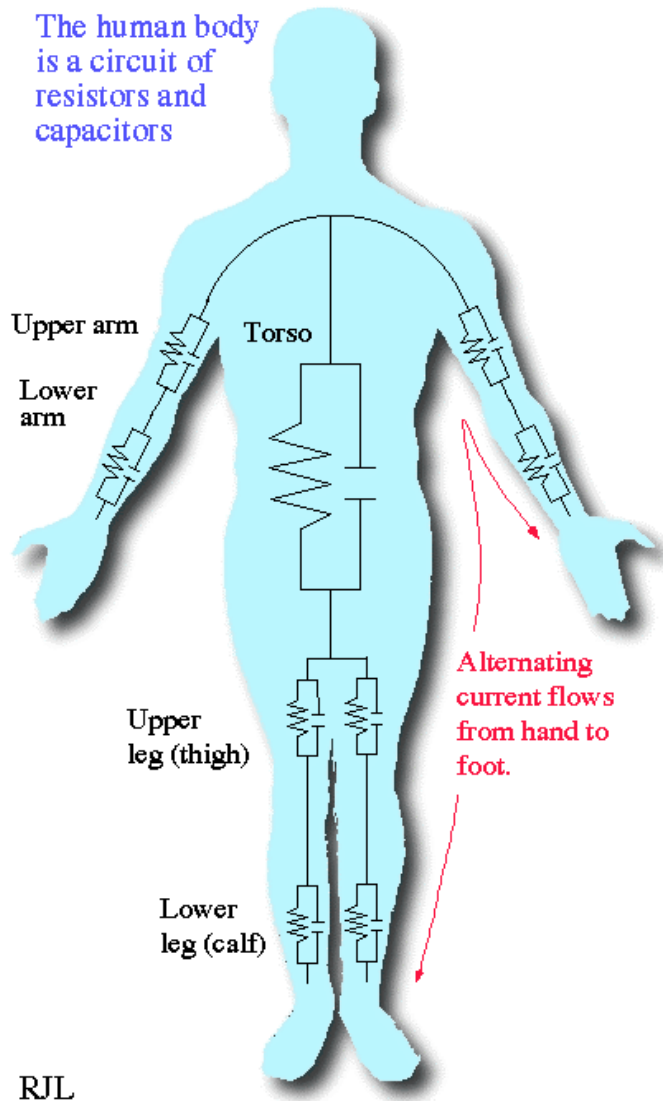


Nachweis von Claudin-2 in den *tight junctions* von MDCK Klon 7 nach gentechnischer Expression des Proteins.

Biologische Funktion

Claudin-2 bildet ionenpermeable Kanäle in den *tight junctions* von Epithelien.

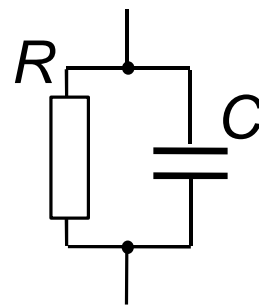
"Bioimpedanzanalyse" bzw. "Bioimpedanzspektroskopie"



Biologisches System

Intra- und extrazellulären Flüssigkeitsvolumina und Fettgehalt des gesamten menschlichen Körpers

Physikalisches Modell



phänomenologische Korrektur: α

Mathematische Beschreibung

$$Z = \frac{R}{1 + (j \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \cdot R \cdot C)^{(1-\alpha)}}$$

Cole und Cole (1941)

Vorteil: beurteilt wichtige Körperdaten durch einfache und schnelle Messung

Nachteil: liefert nur ungenaue Aussagen mit schlechter Reproduzierbarkeit

Problem: die Theorie ("Dielektrizität von Biomasse") ist unzulänglich und falsch

Lösung: Algorithmus zur Anpassung eines physiologisch sinnvollen Modells