

Pathophysiologie: Untersuchung und **Erkenntnisse A SoSe09**

Praktikumsprotokoll

Ussingkammer

Jevgeni Erehman

Epitheliale Barriere

Epithelien sind ein dichtes Maschenwerk eng verbundener Zellen und bilden Grenzflächen des Körpers zwischen der funktionellen Außenseite und dem Interstitium. Beispielsweise kleidet das Darmepithel die innere Wand des Darms aus und sorgt für eine regulierte Aufnahme bzw. Resorption von Stoffen aus dem Darmtrakt. Von entscheidender Bedeutung hierbei ist die parazelluläre Barriere des Epithels an deren Aufrechterhaltung maßgeblich Tight – Junction – Proteine beteiligt sind. Die Tight – Junction ist apikal lokalisiert und „schnürt“ benachbarte Zellen eng aneinander, so dass durch den Parazellulärraum keine Stoffe hindurchtreten können und die laterale Diffusion von Proteinen verhindert wird. An der Bildung der Tight – Junction sind die Proteine Occludin, Claudin, Tricellulin und Junction Adhesion Molecule (JAM) beteiligt (Abb. 2). Über den Proteinkomplex ZO1 ist die Tight – Junction mit einem Aktinnetzwerk im Zytosol verbunden, welches die Epithelzelle umgürtet (Abb. 1). Der transzelluläre Transport von Stoffen durch die Zelle hindurch ist durch aktive und passive Proteincarrier/Kanäle hochgradig reguliert. Parazelluläre und transzelluläre Barriere bilden gemeinsam einen Widerstand, der als transepithelialer Widerstand bezeichnet wird. Im Laborpraktikum sollte ermittelt werden, inwiefern sich durch bestimmte Stoffe, sog. Absorptionenhancer, der transepitheliale Widerstand herabsenken lässt, um eine bessere Resorption von Stoffen zu gewährleisten (z.B. bei oral verabreichten Medikamenten). Ein interessanter Kandidat für einen Absorptionenhancer ist Chitosan, welches durch Deacetylierung aus Chitin gewonnen wird. Bei vorangegangenen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass Chitosan einen starken Abfall des transepithelialen Widerstandes induziert. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch bislang unklar.

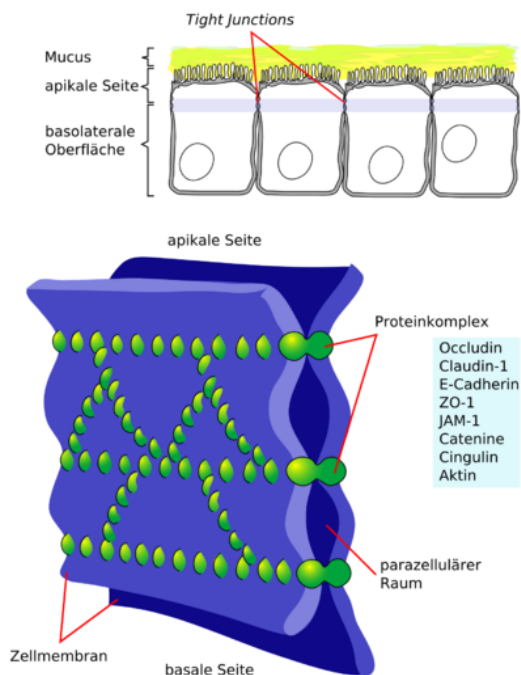


Abbildung 1 Tight – Junction, Aktin - Gurt

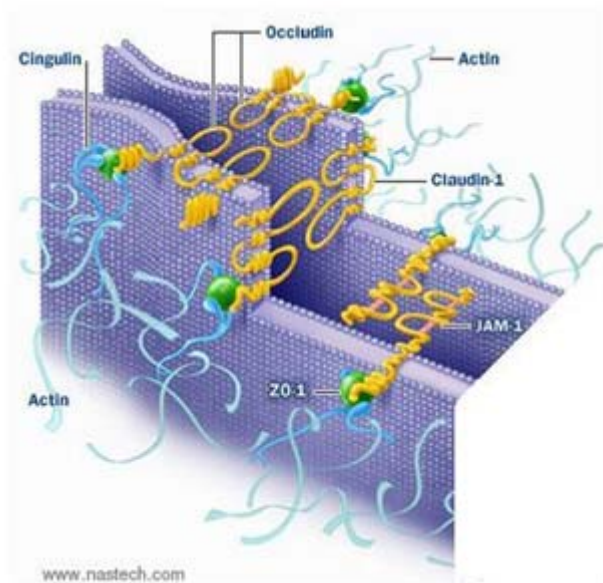


Abbildung 2 Tight – Junction - Komponenten

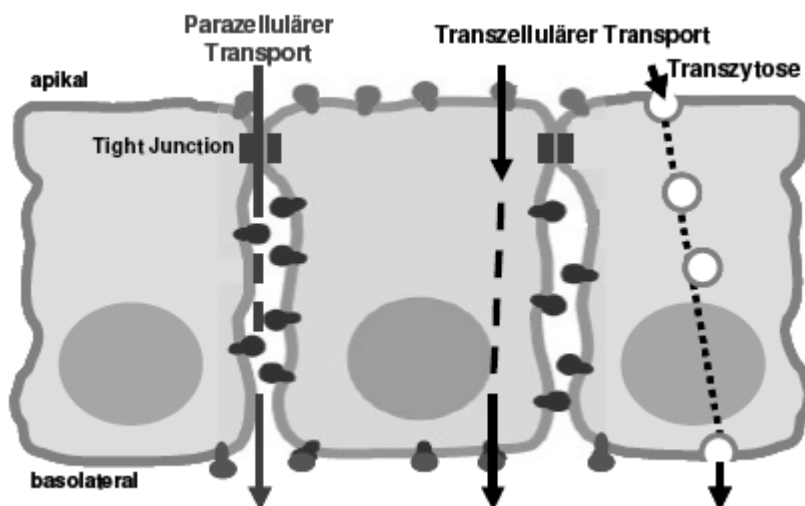


Abbildung 3 Parazelluläre und transzelluläre Barriere

Ussing – Kammer

Bei der Ussing – Kammer handelt es sich um eine Vorrichtung mit der die Barrierefunktion des Epithels näher untersucht werden kann. Dabei werden elektrophysiologische Messungen an der Epithelmembran durchgeführt anhand derer Rückschlüsse auf den Widerstand und damit die Leitfähigkeit der Membran möglich sind.

Die Ussingkammer besteht aus 2 Glasaufsätzen, die durch eine Kammer miteinander verbunden sind. In diese ist ein Filter eingelegt, auf dem das zu untersuchende Epithel wächst. In die Kammer sind jeweils 2 Elektroden eingespannt durch die Strom appliziert werden kann und 2 weitere durch die Strom gemessen werden kann.

Um Spannungsmessungen an der Epithelmembran durchführen zu können, müssen zunächst alle äußeren Gradienten eliminiert werden. Hierzu gehören zum Einen der hydrostatische Gradient und diverse Konzentrationsgradienten der Stoffe, die sich im Extrazellulärmedium befinden. Die Eliminierung wird dadurch bewerkstelligt, dass der Filter auf beiden Seiten mit gleichartiger Elektrolytlösung umspült wird, die beidseitig gleich hoch eingefüllt wird. Darüber hinaus müssen noch die unter normalen Bedingungen vorliegenden elektrischen Gradienten beseitigt werden, die u.a. durch aktive Cl^- - Sekretion und Na^+ - Resorption zustande kommen, aber auch durch passive Ionenströme bedingt sind. Hierfür wird durch die beiden Elektroden genauso viel Strom appliziert, wie durch die Ionenströme entsteht. Die transepitheliale Spannung ist dann null, so dass sich Stromänderungen ermitteln lassen, die nicht durch Normalbedingungen hervorgerufen sind.

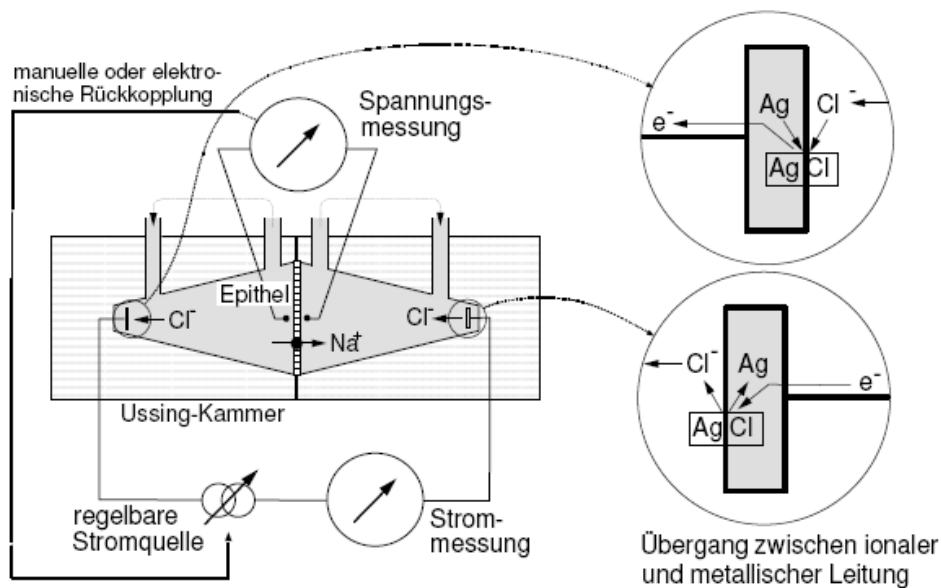


Abbildung 4 Schematische Darstellung einer Ussing - Kammer

Absorptionsenhancer

Ein Absorptionsenhancer ist ein Molekül, das die parazelluläre Barriere eines Epithels schwächt, indem es die Auflösung bestimmter Tight – Junction – Proteinkomplexe induziert. Das hat zur Folge, dass Stoffe leichter durch das Epithel resorbiert werden können.

Ein Ziel des Einsatzes von Absorptionsenhancern besteht darin die Aufnahme oral verabreichter Medikamente durch den Darm zu erleichtern.

Material und Methoden

Es sollte mit Hilfe der Ussing – Kammer die Wirkung von drei Stoffen auf die Integrität der Tight Junction und damit deren Nutzen als Absorptionenhancer ermittelt werden. Zu diesen Stoffen gehören Natriumcaprat, EGTA und Protamin.

EGTA ist ein Ca^{2+} - Chelator. In der Nähe der Tight Junction führt eine gewisse EGTA – Konzentration zu einer Ca^{2+} - Defizienz. In den Adherens – Junctions, die sich unterhalb der Tight – Junctions befinden, sind Ca^{2+} - abhängige eCadherin – Proteine enthalten. Bei Ca^{2+} - Mangel werden diese internalisiert, was zur Folge hat, dass sich die Adherens – Junction auflöst. Dies wiederum führt zur Auflösung der Tight Junction, so dass die parazelluläre Barriere einbricht.

Protamin induziert die Auflösung der porenbildenden Claudin - 2 – Proteine, welche die parazelluläre Barriere aufgrund der Porenbildung schwächen. Somit steigt bei Einsatz von Protamin der parazelluläre Widerstand.

Natriumcaprat ist eine Fettsäure für die gezeigt werden konnte, dass sie den transepithelialen Widerstand herabsenkt.

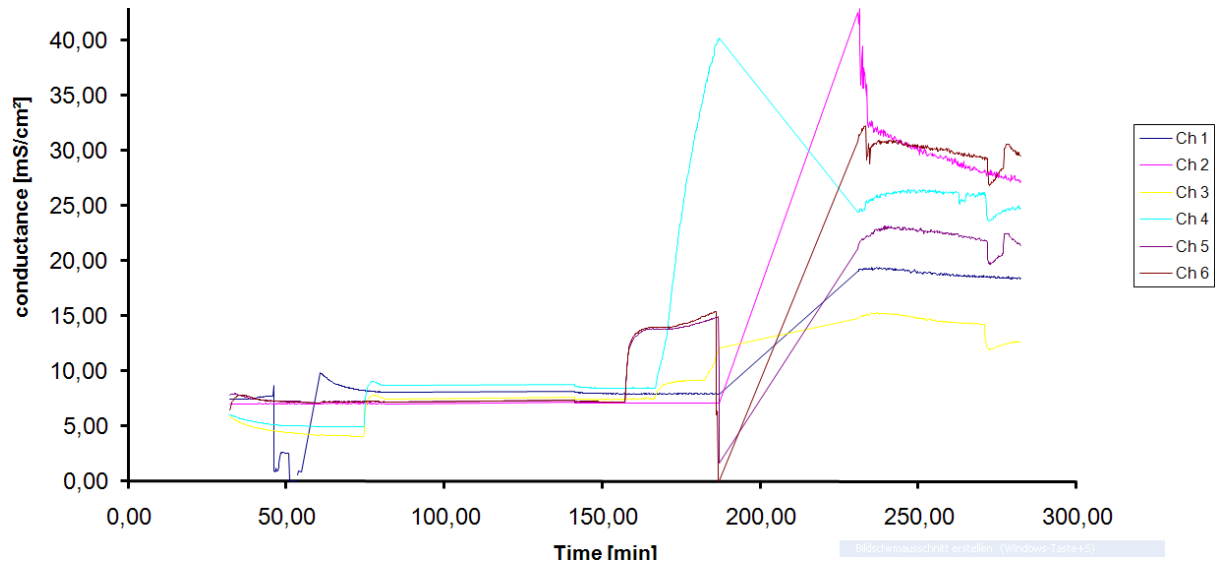
Es wurde eine Colon – Carcinom – Zellkultur (CaCo 2) und eine MDCK – Zellkultur verwendet. Diese wurden in eine Ussingkammer eingespannt und es wurde der Widerstand nach Hinzugabe des potenziellen Absorptionenhancers gemessen.

Beide Glasaufsätze der Ussingkammer wurden mit 5ml 111+ - Lösung gefüllt, um die Konzentrationsgradienten auszugleichen. Vorher wurden Sie mit destiliertem Wasser gewaschen. Durchgeführt wurden jeweils 2 Versuche, mit jeweils 3 Durchläufen. Bei beiden Versuchen wurde ein Kontrolldurchlauf durchgeführt, um Vergleichswerte zu erhalten.

1. Versuch
 - a. Kontrolle
 - b. Natriumcaprat
 - c. EGTA
2. Versuch
 - a. Kontrolle
 - b. Protamin
 - c. Protamin + Heparin

Resultat

Im folgenden Diagramm ist für den jeweiligen Versuchsdurchlauf die Änderung der Leitfähigkeit der Membran gezeigt. Die Leitfähigkeit ist der Kehrwert des Widerstandes und ein Maß für die Durchlässigkeit der Membran und somit für die Wirksamkeit der Barrierefunktion. Die Nummerierung der Channels korrespondiert mit der oben angegebenen Reihenfolge der Versuchsdurchläufe (Ch 1 = 1a bis Ch 6 = 2c).



Bei Channel 1 und 4 handelt es sich um die Kontrollgruppe für die jeweilige Zellart. Bei diesen Gruppen wurden keine Absorptionenhancer hinzugegeben. Somit stellt die Änderung der Leitfähigkeit bei Channel 1 und 4 die Änderung unter Normalbedingungen dar. Es ist ein deutlicher Unterschied bezüglich der epithelialen Barriere zwischen den beiden Zellarten zu erkennen. Bei den MDCK – Zellen ist ein drastischer Anstieg der Leitfähigkeit im Vergleich zu den CaCo – Zellen zu erkennen. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass MDCK – Zellen in den Nierentubuli vorkommen, in denen eine höhere Resorption von Stoffen erforderlich ist. Bei Channel 5 (Protamin) sinkt die Leitfähigkeit erwartungsgemäß, da Protamin die Auflösung der porenbildenden Claudin – 2 – Proteine induziert. Demgemäß steigt die Leitfähigkeit wiederum in Channel 6 (Protamin + Heparin) etwas an, da Heparin ein Antagonist von Protamin ist. Bei Channel 2 (Natriumcaprat) ist ein starker Anstieg der Leitfähigkeit im Vergleich zum Normalzustand zu erkennen, da Natriumcaprat den Widerstand enorm absinken lässt. Derselbe Effekt wäre bei Channel 3 (EGTA) zu erwarten, jedoch bleibt die Leitfähigkeit bei Channel 3 nahezu unverändert und sinkt sogar etwas. Dies könnte auf Pipettierfehler zurückzuführen sein bzw. auf eine geringe [EGTA] oder die Auflösung der Adherens – Junctions hat in diesem Fall nicht zu einer Auflösung der Tight – Junctions geführt.