

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Charakterisierung von Mg^{2+} -Effluxmechanismen bei kultivierten ruminalen Epithelzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hi-Sung Park
Tierarzt aus Freising

Berlin 2003

Journal-Nr. 2793

Gefördert durch die H. WILHELM SCHAUMANN STIFTUNG

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunberg
Erster Gutachter: PD Dr. Monika Schweigel
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Angelika Richter
Dritter Prüfer: Prof. Dr. Klaus Männer

Deskriptoren:
Mg²⁺-Efflux, Na⁺/Mg²⁺-Austauscher, Schaf, Pansenepithelzelle, Mag-fura-2

Tag der Promotion: 6.2.2004

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
2. Literatur	7
2.1. Die Anfänge der Mg²⁺-Forschung	7
2.2. Die Bedeutung von Mg²⁺ im Organismus	7
2.3. Die zelluläre Mg²⁺-Verteilung	8
2.3.1. Mg ²⁺ in den Zellorganellen	8
2.3.2. Mg ²⁺ im Zytosol	9
2.4. Die Mg²⁺-Homöodynamik	10
2.5. Der Mg²⁺-Transport über biologische Membranen	11
2.5.1. Mg ²⁺ -Influxmechanismen	11
2.5.2. Mg ²⁺ -Effluxmechanismen	13
2.5.3. Die Rolle der Zellpolarität beim Mg ²⁺ -Transport	16
2.5.4. Der Mg ²⁺ -Transport bei gereinigten Plasmamembranen	17
2.6. Die Beeinflussung der Mg²⁺-Homöodynamik durch Hormone und Mediatoren ..	18
2.6.1. Die Modulation des Mg ²⁺ -Transportes	18
2.6.2. Die hormonelle Stimulation des Mg ²⁺ -Effluxes	19
2.6.3. Die hormonelle Stimulation des Na ⁺ /Mg ²⁺ -Austauschers	21
2.6.4. Die hormonelle Stimulation der Mg ²⁺ -Akkumulation bzw. des Mg ²⁺ -Influxes ...	21
2.7. Die physiologische Bedeutung der Mg²⁺-Regulation	22
2.8. Spezielles zum Mg²⁺-Transport beim Schaf	22
2.8.1. Die Lokalisation der Mg ²⁺ -Resorption beim Schaf	23
2.8.2. Der Mg ²⁺ -Transport über das Pansenepithel	23
2.8.3. Die Mechanismen der Mg ²⁺ -Aufnahme in die PEZ	25
2.8.4. Die Mechanismen der Mg ²⁺ -Abgabe	26
2.8.5. Hemmung des Mg ²⁺ -Transportes bei PEZ	27
2.8.6. Regulation des Mg ²⁺ -Transportes bei PEZ	28
2.9. Literaturzusammenfassung und Ziel eigener Untersuchungen	29
2.9.1. Literaturzusammenfassung	29
2.9.2. Schwerpunkt eigener Untersuchungen	30

3. Material und Methoden	31
3.1. Material	31
3.1.1. Versuchsgewebe und Zelllinie	31
3.2. Methoden	32
3.2.1. <i>In vitro</i> -Kultivierung primärer PEZ	32
3.2.2. Immunzytochemischer Nachweis von Zellen epithelialen Ursprungs	34
3.2.3. Bestimmung von Ionenkonzentrationen mittels fluoreszenzspektrometrischer Methoden	35
3.2.3.1. Suspendieren der Zellen	36
3.2.3.2. Vorbereitung der Zellen zur extrazellulären Messung	37
3.2.3.3. Vorbereitung der Zellen zur intrazellulären Messung	39
3.2.3.4. Fluoreszenzspektrometrische Bestimmung der extra- bzw. intrazellulären [Mg ²⁺]	41
3.2.3.5. Fluoreszenzspektrometrische Bestimmung der intrazellulären [Mg ²⁺]	44
3.2.3.6. Fluoreszenzspektrometrische Bestimmung der intrazellulären [Na ⁺] und des intrazellulären pH-Wertes	46
3.2.3.7. Bestimmung der Zellzahl	52
3.2.4. Graphische Darstellung und Statistik	52
4. Ergebnisse	53
4.1. Immunzytochemische Charakterisierung der aus dem Pansenepithel isolierten Zellen	53
4.2. Funktionelle Untersuchungen zur Na⁺-abhängigen Komponente der Mg²⁺-Abgabe aus PEZ	54
4.2.1. Nachweis des Na ⁺ -abhängigen Mg ²⁺ -Effluxes	55
4.2.2. Einfluss der extrazellulären [Na ⁺] auf die Mg ²⁺ -Abgabe	58
4.3. Einfluss unspezifischer Blocker auf den Mg²⁺-Efflux	69
4.3.1. Unspezifische Hemmung des Na ⁺ /Mg ²⁺ -Austauschers durch Imipramin	69
4.3.2. Hemmung von Cobalt(III)hexamin-abhängigen Mg ²⁺ -Transportprozessen	71
4.3.3. Auswirkung einer kombinierten Gabe von Imipramin und Cobalt(III)hexamin auf den Na ⁺ /Mg ²⁺ -Austauscher	73
4.3.4. Zusammenfassung der Blockerversuche	74
4.4. Regulation der Mg²⁺-Abgabe	75
4.4.1. Effekt von db-cAMP auf die Mg ²⁺ -Abgabe	75
4.4.2. Stimulation mittels PGE ₂	77
4.4.3. Zusammenfassung der Ergebnisse zur hormonellen Stimulation	78

4.5. Vergleichende Untersuchung an PEZ aus einer Zelllinie und aus der Primärkultur	79
4.5.1. Die intrazelluläre Mg^{2+} - und Na^+ -Konzentration sowie der pH_i bei Primärzellen und PEZ aus einer Zelllinie	79
5. Diskussion	83
5.1. Methodenkritik	83
5.2. Funktionelle Untersuchung des Na^+/Mg^{2+}-Austauschers	84
5.2.1. Abhängigkeit des Mg^{2+} -Effluxes von der $[Na^+]_e$	85
5.2.2. Hemmung der durch Na^+ bestimmten Komponente des Austauschers.....	87
5.2.3. Besonderheiten bei weit differenzierten Zellen	89
5.2.4. Beteiligung von Mg^{2+} -Kanälen am Mg^{2+} -Efflux	89
5.2.5. Modell zum Mg^{2+} -Transport über das Epithel	91
5.2.6. Regulation des Na^+/Mg^{2+} -Austauschers.....	93
5.3. Primärkultivierung versus Zelllinie	96
5.4. Schlussfolgerung	97
6. Zusammenfassung	99
6. Summary	101
7. Literaturverzeichnis	103
8. Abkürzungsverzeichnis	118
9. Anhang	119
A1. Tabellarische Zusammenfassung der verwendeten Materialien	119
A1.1 Zellkultivierung	119
A1.2. Versuchsdurchführung	120
A2. Verwendete Medien	121
A3. Gemessene Einzelwerte	122



Danksagung

An dieser exponierten Stelle möchte ich mich herzlichst bei all denen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. M. Schweigel für die Bereitstellung des Themas. Vielen Dank für die mit Engagement geführte Betreuung und für ein stets offenes Ohr.

Ich danke Herrn Prof. H. Martens für sein Interesse an der Magnesiumforschung.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau G. Kiselowsky bedanken für die Einführung in die labortechnischen Arbeiten und einen nie endenden Teestrom. Vielen Dank auch für die vielen aufmunternden Worte.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. R. J. Schweyen und Herrn Dr. M. Kolisek für die Überlassung des Cobalt(III)hexamins.

Ein großes Dankeschön geht an Frau D. Plaumann und Frau J. Wagner für die stilistische Beratung und Durchsicht der Arbeit.

Allen Mitgliedern des Instituts gebührt ein herzlicher Dank für das ausgesprochen tolle Arbeitsklima und die unvergesslichen Betriebsausflüge, Weihnachtsfeiern, das jährliche Angrillen, die morgendlichen Sektempfänge, Es war eine schöne Zeit.

Ich danke der H. Wilhelm Schaumann Stiftung, insbesondere Herrn Prof. H. O. Gravert für die Bereitstellung eines Stipendiums und für alle Reisekostenzuschüsse.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, ohne deren Liebe und rückhaltlose Unterstützung diese Arbeit nicht entstanden wäre. Ich liebe euch sehr.

LEBENS LAUF

NAME: Park

VORNAME: Hi-Sung

GEBURTSDATUM: 26.03.1973

GEBURTSORT: Freising

FAMILIENSTAND: ledig

STAATSAN-
GEHÖRIGKEIT: Deutsch

WEHRDIENST: 1992-1993 Bundeswehr in Eschweiler/Basepohl
Grundwehrdienst

AUSBILDUNG:

PROMOTIONS-
BEGINN: 01.04.2000 Doktorand am Institut für in Berlin
Veterinärphysiologie der
Freien Universität Berlin

APPROBATION: April 1999 Approbation als Tierarzt in Berlin

HOCHSCHUL-
AUSBILDUNG: Oktober 1993 Studiums der in Berlin
bis
März 1999 Veterinärmedizin an der
Freien Universität Berlin
Staatsexamen Veterinärmedizin

SCHUL-
AUSBILDUNG: 1983-1992 Gymnasium Steglitz in Berlin
allgemeine Hochschulreife
1979-1983 Grundschule am Insulaner in Berlin

STIPENDIUM: 2001-2003 Stipendiat der H. Wilhelm Schaumann Stiftung

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 20.11.2003

Hi-Sung Park