

### 3. Material und Methoden

#### Methodenübersicht

Die Charakterisierung des Na<sup>+</sup>-abhängigen Mg<sup>2+</sup>-Transportes bei Pansenepithelzellen (PEZ) erfolgte im Rahmen von *in vitro*-Versuchen. Hierzu wurden Epithelzellen aus zuvor präpariertem Pansengewebe gewonnen und in Zellkulturen vermehrt.

Mittels immunzytochemischer Methoden (Zytokeratinnachweis) erfolgte der Nachweis des epithelialen Ursprungs der kultivierten Zellen.

Die Abgabe von intrazellulärem Mg<sup>2+</sup> in das Zellsuspensionsmedium bzw. die Mg<sup>2+</sup>-Aufnahme wurden mittels fluoreszenzspektrometrischer Messverfahren quantifiziert.

#### 3.1. Material

Medium 199, Trypsin, Glutamin und Antibiotika (Gentamycin, Kanamycin und Nystatin) wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), die gepufferten Salzlösungen (Dulbecco's PBS, phosphate buffered saline), Kollagen und Fetales Bovines Serum (FBS) von Biochrom (Berlin) bezogen.

Eine detaillierte Zusammenstellung der Versuchsmaterialien und Versuchsmedien findet sich im Anhang (**Kap. 9**).

##### 3.1.1. Versuchsgewebe und Zelllinie

Zur *in vitro*-Kultivierung primärer PEZ wurde Pansengewebe von Schafen verschiedener Schlachthöfe und von institutseigenen Versuchstieren verwendet. Die Schafe waren unterschiedlicher Rasse. Das Alter der Tiere variierte zwischen 6 und 12 Monaten. Auch die zum Zeitpunkt der Schlachtung im Pansen festgestellte Zusammensetzung des Futters (Heu, Gras oder Kraftfutter) war von Tier zu Tier verschieden.

Die Zellen der permanenten Zelllinie (PES, Katalognummer RIE 154; Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin, Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Insel Riems) stammten ursprünglich aus der Pansenschleimhaut eines adulten Schafes.

## 3.2. Methoden

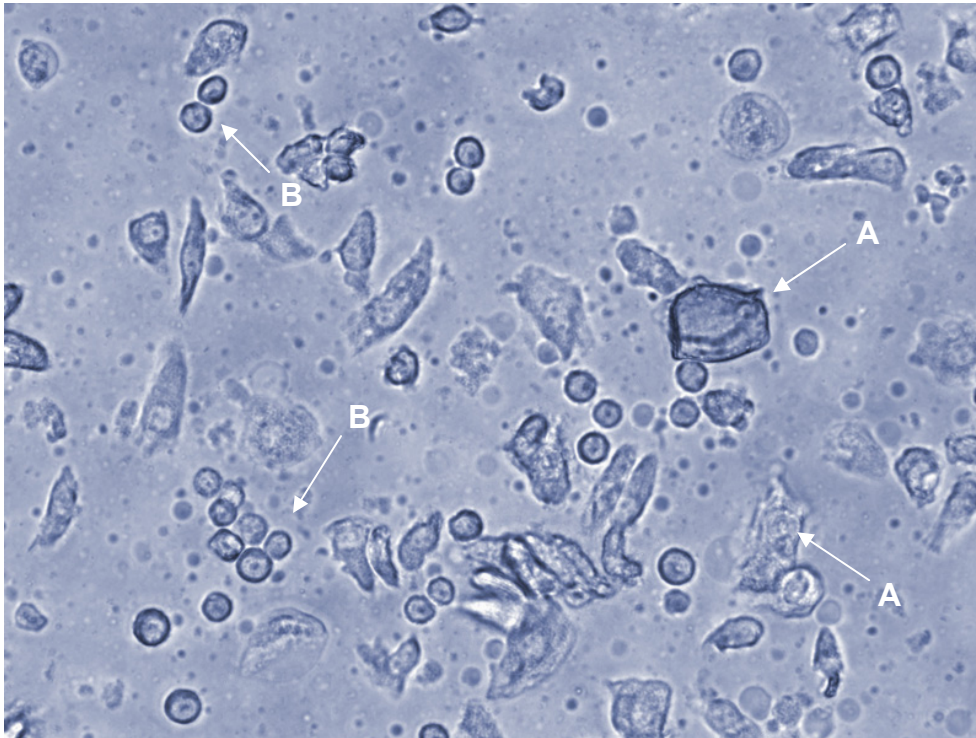
### 3.2.1. *In vitro*-Kultivierung primärer PEZ

Zur Gewinnung primärer PEZ-Kulturen wurde die Methode nach GALFI et al. (1981) in einer modifizierten Form genutzt.

Aus dem cranialen Blindsack des Pansens wurden etwa 5 cm breite Gewebestreifen entnommen, 3 bis 4 mal in  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem Dulbecco's PBS (DPBS) mit 4% Penicillin-Streptomycin gewaschen und bei 4°C in dieser Lösung aufbewahrt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 45 Minuten wurden die Pansenzotten vom restlichen Gewebe abpräpariert, mehrmals gründlich in  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem DPBS mit 1% Penicillin-Streptomycin und abschließend zweimal in antibiotikafreiem DPBS gewaschen.

Die Gewinnung von Primärzellen zur Kultivierung erfolgte mittels der sogenannten warmen, fraktionierten Trypsinierung. Dazu wurden die gründlich mit DPBS gewaschenen Pansenzotten in einer Trypsin-EDTA-Lösung (2.5 g/l Schweinetrypsin, 0.2 g/l EDTA) aufgenommen und unter kontinuierlicher Durchmischung bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Alle 30 Minuten wurde die Trypsinlösung mitsamt der darin enthaltenen Zellen durch frische Trypsin-EDTA-Lösung ersetzt. Mittels Filtration durch Gaze wurden die Zellen von Geweberesten und Pflanzenbestandteilen separiert. Die Neutralisation der Restaktivität des Trypsins erfolgte durch Zugabe serumhaltigen Mediums. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Zellfraktionen bei 4°C aufbewahrt.

20 µl jeder Zellfraktion wurden mit Trypanblau eingefärbt und mikroskopisch untersucht. Besonderes Augenmerk galt dabei der Beurteilung der Vitalität (Anteil nicht durch Trypanblau anfärbbarer Zellen) jeder Zellfraktion sowie der Bestimmung des Verhältnisses von Zellen aus der Keimschicht des Pansenepithels (Stratum basale und Stratum spinosum) zu Zellen aus den oberen Zellschichten (Hornzellen, Zellen des Stratum granulosum; Abb. 3).



**Abb. 3:** Mikroskopisches Bild einer Zellfraktion im Rahmen einer Zellisolierung

Alle Zellfraktionen wurden nach dem Gehalt verhornter Zellen (**A**) und dem Gehalt lebender Zellen aus dem Stratum germinativum (Stratum spinosum und Stratum basale, **B**) beurteilt. (100-fache Vergrößerung)

Da nur Zellen der Keimschicht am Substrat anheften und proliferieren, wurden ausschließlich Zellfraktionen mit einem hohen Anteil von Zellen aus dem Stratum basale und Stratum spinosum zur Weiterverarbeitung ausgewählt. Diese wurden 2 mal in DPBS mit 1% Penicillin-Streptomycin und einmal in antibiotikafreier DPBS gewaschen sowie anschließend im Zellkulturmedium 1 (**Tab. 3**) resuspendiert. Die Aussaat der Zellen ( $5 \times 10^5$  Zellen/ml) erfolgte in nach Herstellerangaben (Biochrom, Berlin) mit Kollagen beschichteten Kulturgefäßen (Zellkulturflaschen,  $25 \text{ cm}^2$ ; Zellkulturschalen,  $\varnothing 6 \text{ cm}$ ). Die Zellen wurden danach im Brutschrank bei 100% Wasserdampfsättigung in einem Luft- $\text{CO}_2$ (5%)-Gemisch bei  $38^\circ\text{C}$  inkubiert und täglich mikroskopisch kontrolliert. 24 Stunden nach dem Aussäen wurde das Zellkulturmedium 1 gegen das Zellkulturmedium 2 getauscht und alle 48 Stunden erneuert (**Tab. 3**). Ab dem 6. Tag wurden die Zellen je nach dem Dichtegrad der Monolayer im Verhältnis 1:2 bzw. 1:3 subkultiviert. Für die Experimente wurden Kulturen ab dem 6. Kulturtag verwendet.

**Tab. 3:** Zusammensetzung der zur Kultivierung der PEZ benötigten Medien

<b>Substanz</b>	<b>Zellkulturmedium 1</b>	<b>Zellkulturmedium 2</b>
Medium 199	Basismedium	Basismedium
Fetales Kälberserum	150 ml/l	100 ml/l
L-Glutamin (200 mM)	6.8 ml/l	6.8 ml/l
HEPES (1M)	20 ml/l	20 ml/l
Nystatin	$2.4 \cdot 10^5$ U/l	-
Gentamycin	50 mg/l	50 mg/l
Kanamycin	100 mg/l	100 mg/l

### **3.2.2. Immunzytochemischer Nachweis von Zellen epithelialen Ursprungs**

PEZ wurden zum Nachweis ihres epithelialen Ursprungs mit Hilfe eines indirekten Immunfluoreszenzverfahrens auf die Existenz von Zytokeratinen untersucht. Im Vorfeld erfolgte dazu eine Aussaat der Zellen auf Kammerdeckgläser. Nach Anheftung der Zellen auf den Deckgläsern wurden die Zellen 10 Minuten lang bei  $-20^{\circ}\text{C}$  Methanol-fixiert. Anschließend wurde das Methanol durch Waschen mit DPBS entfernt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Kammerdeckgläser 15 Minuten lang bei  $37^{\circ}\text{C}$  mit fetalem Kälberserum beschichtet, welches im Anschluss durch Waschen mit DPBS entfernt wurde. Die Inkubation der Deckgläser mit dem primären Antikörper (Maus-anti-Cytokeratin-Pan-Antikörper, Klon Lu5) erfolgte über einen Zeitraum von 60 Minuten bei Zimmertemperatur. Anschließend wurde der primäre Antikörper durch Waschen (dreimal über einen Zeitraum von jeweils 3 Minuten) mit DPBS entfernt. Um die Strukturen, an die der primäre Antikörper gebunden ist, sichtbar zu machen, wurden die Zellen 60 Minuten lang bei Zimmertemperatur mit einem Schaf-Anti-Maus-Ig-Antikörper (konjugiert mit Fluorescein;  $20 \mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Nach dem Entfernen der Kammerstruktur wurden die Kammerdeckgläser mehrmals gründlich in DPBS gewaschen, in phosphatgepuffertem Glycerin eingebettet und fluoreszenzmikroskopisch beurteilt.

### 3.2.3. Bestimmung von Ionenkonzentrationen mittels fluoreszenzspektrometrischer Methoden

#### Grundprinzip

Zur Bestimmung der Ionenkonzentrationen wurden spezifische Fluoreszenzindikatoren (Fluoreszenzfarbstoffe, „fluorescent dyes“) eingesetzt. Diesen Molekülen ist gemeinsam, dass sich deren Exzitations- bzw. Emmisionscharakteristika ändern, wenn sich das Ion, dessen Konzentration bestimmt werden soll, reversibel an das Indikatormolekül bindet.

#### Messgerät und Software

Alle fluoreszenzspektrometrischen Messungen erfolgten computergestützt mit dem Fluoreszenzspektrometer LS 50-B (PerkinElmer Instruments, Shelton, CT, USA). Ein zusätzlich eingebauter Biokinetik-Küvettenhalter ermöglichte Messungen unter kontinuierlicher Durchmischung der Zellsuspension bei einer konstanten Temperatur. Die Steuerung des Fluoreszenzspektrometers und die Ermittlung der Versuchsdaten erfolgte mittels der Software FL-Winlab (PerkinElmer Instruments).

Bei den intrazellulären Messungen kam zusätzlich eine Schnellfiltereinheit zum Einsatz. Diese Einheit besteht aus einem sich in dem Messtrahl drehenden Filterrad, in dem zwei Filterpaare (340/380 nm, 440/480 nm) eingesetzt sind. Dadurch können der intrazelluläre pH-Wert und die freie intrazelluläre  $Mg^{2+}$ -Konzentration ( $[Mg^+]_i$ ) bzw. der intrazelluläre pH-Wert und die intrazelluläre  $Na^+$ -Konzentration ( $[Na^+]_i$ ) simultan gemessen werden. Gleichzeitig verkürzte sich die Zeit zwischen einzelnen Messpunkten von 1.9 s auf 40 ms, wodurch die Erfassung schneller Änderungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen ermöglicht wird.

## **Versuchsablauf**

Die Experimente zur Messung der extra- und intrazellulären Ionenkonzentrationen verliefen im Allgemeinen nach folgendem Schema:

1. Herstellung einer Zellsuspension
2. Beladen der Zellen mit  $Mg^{2+}$  (extrazelluläre Messung) bzw. mit dem Fluoreszenzfarbstoff (intrazelluläre Messung)
3. Waschen der Zellen
4. Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes bei der extrazellulären Messung
5. Messung der Fluoreszenzintensitäten in den verschiedenen Messmedien
6. Ermittlung von Eichdaten
7. Berechnung der Ionenkonzentrationen
8. Bestimmung der Zellzahl

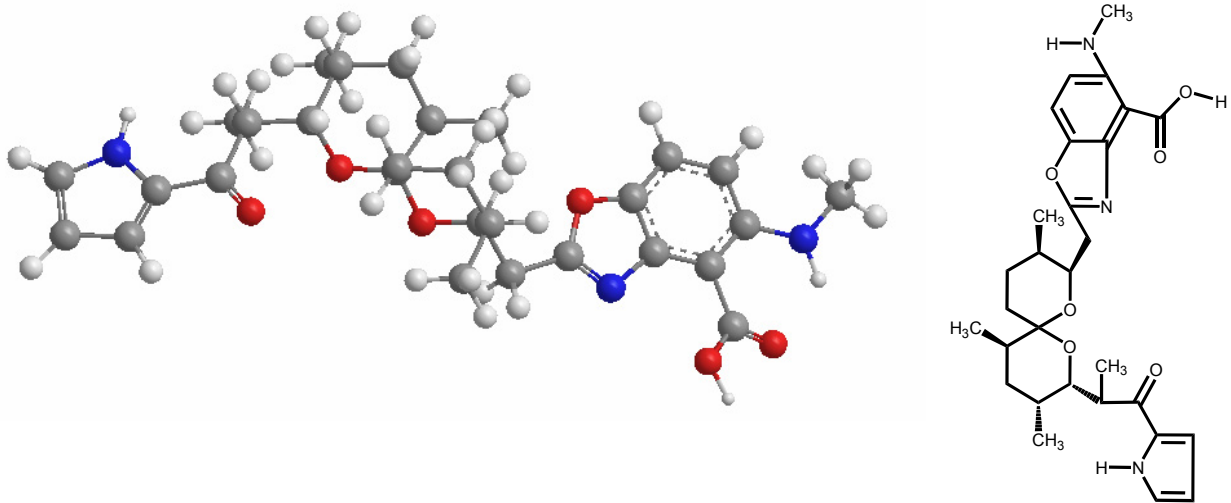
### **3.2.3.1. Suspendieren der Zellen**

Die am Substrat anheftenden Pansenepithelzellen wurden zweimal mit DPBS gespült, um möglichst viel Serum zu entfernen. Durch kaltes Trypsinieren (0.25%ige Trypsinlösung mit 0.2 g/l EDTA) wurden die PEZ vom Substrat gelöst. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe serumhaltigen Mediums inaktiviert. Die isolierten Zellen wurden im Zellkulturmedium 2 gewaschen und je nach Zustand der Zellen zur Regeneration zwischen 30 und 60 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen in Hanks' Salzlösung resuspendiert und zur weiteren Erholung für etwa 30 Minuten im Wasserbad (37°C) belassen. Das Suspendieren und Resuspendieren der Zellen erfolgte jeweils nach Zentrifugation der Zellen in einem Bereich zwischen 70 und 110  $g_z$ .

### 3.2.3.2. Vorbereitung der Zellen zur extrazellulären Messung

#### *Beladen der Zellen mit $Mg^{2+}$*

Das Vorbeladen der Zellen sollte über eine Erhöhung des  $Mg^{2+}$ -Gradienten zu einem konstanten  $Mg^{2+}$ -Flux und einer Maximierung der Transportkapazität führen. Dazu wurden die Zellen in ein Beladungsmedium (**Tab. 4**) überführt, welches neben einer definierten  $[Mg^{2+}]$  von 6 mmol/l ein Ionophor enthielt, und für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Das Ionophor A23187, auch als Calcimycin bezeichnet, besitzt eine hydrophobe Außenseite, welches eine Passage durch die Doppellipidschicht der Zellmembran ermöglicht. A23187 funktioniert als sogenannter ‚shuttle‘. Dabei werden Protonen ( $H^+$ ) in einem Pendelmechanismus gegen Kationen, vorzugsweise gegen divalente Kationen wie  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$ , ausgetauscht (POHL et al., 1990; **Abb. 4**).



**Abb. 4:** Ionophor A23187 (Calcimycin)

Die hydrophobe Außenseite des A23187 ermöglicht dem Molekül die Doppellipidschicht der Zellmembran zu durchdringen. Das Ionophor bildet stabile Komplexe mit divalenten Kationen. Die Ionenspezifität des A23187:  $Mn^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+} \gg Sr^{2+} > Ba^{2+} > Li^+ > Na^+ > K^+$ .

**Entfernen des Ionophors A23187**

Da A23187 die Effluxmessungen negativ beeinflussen würde, musste das Ionophor vollständig aus den Zellen und dem Medium eliminiert werden. Dazu wurde die Eigenschaft genutzt, dass bovines Serumalbumin (BSA) das Ionophor bindet. Der Serumalbumin-Ionophorkomplex wurde durch mehrmaliges Waschen der Zellen (einmal 10 Minuten lang bei 37°C, zweimal bei Zimmertemperatur) in dem Waschmedium (**Tab. 4**), das 6 mmol/l  $Mg^{2+}$  enthielt, um das Auslaufen von  $Mg^{2+}$  aus den Zellen zu verhindern, entfernt.

In einem letzten Schritt wurde restliches  $Mg^{2+}$  durch mehrmalig gründliches Waschen mit NMDG (N-Methyl-D-Glukamin)-modifizierter DPBS (4°C) aus der Suspensionslösung beseitigt. Die Zellen wurden bis zur Messung in NMDG-modifizierter DPBS (4°C) aufbewahrt.

**Tab. 4:** Zusammensetzung der zum Beladen der PEZ mit  $Mg^{2+}$  und zum Waschen benötigten Medien

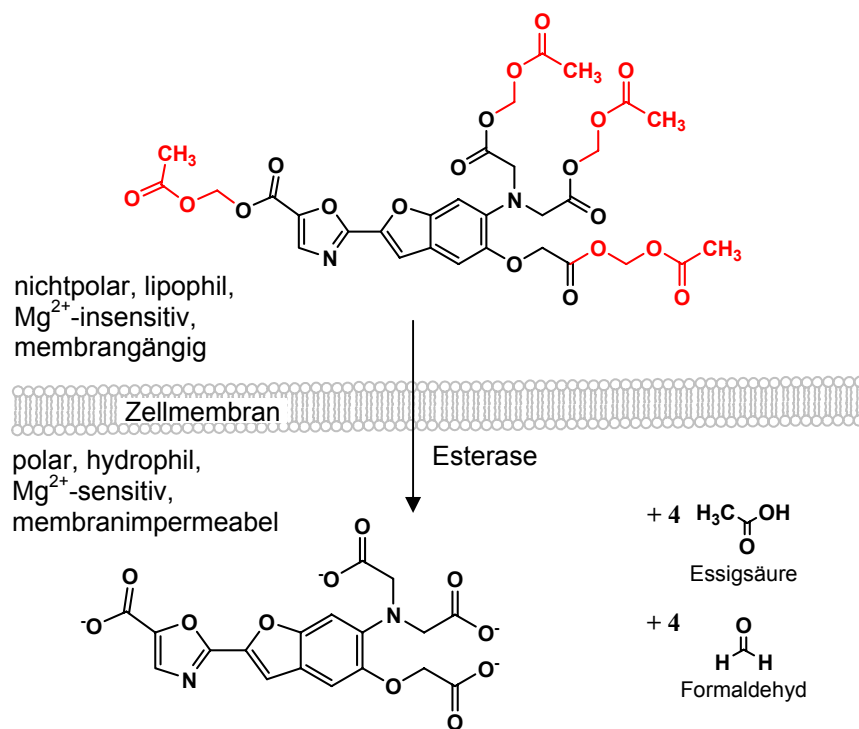
Substanz	Beladungsmedium	Waschmedium zum Entfernen von A23187
Reinstwasser	Basis	Basis
K-Glukonat	130 mmol/l	130 mmol/l
KCL	15 mmol/l	15 mmol/l
NaCl	10 mmol/l	10 mmol/l
HEPES	10 mmol/l	10 mmol/l
MgCl <sub>2</sub>	6 mmol/l	6 mmol/l
A23187	6 µmol/l	-
Bovine Serumalbumin-Lösung (Fraktion V)	-	1%
pH	7.1	7.1



### 3.2.3.3. Vorbereitung der Zellen zur intrazellulären Messung

#### Prinzip

Für die intrazelluläre Messung von Ionenkonzentrationen müssen die Farbstoffe, welche normalerweise nicht membrangängig sind, so modifiziert werden, dass sie in einer nicht polaren, lipidlöslichen und somit membrangängigen Form vorliegen. Dies wird durch eine Veresterung der Farbstoffe erreicht (Acetoxymethylester, AM-Ester). Nach dem Durchdringen der Zellmembran werden die AM-Ester durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert und liegen damit in einer aktiven, polaren Form vor, welche mit spezifischen Ionen interagieren kann (**Abb. 5**).



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Beladung der Zellen mit dem zellpermeablen Azetoxymethylesterderivat von Mag-fura-2

Während des Hydrolysierungsprozesses werden Nebenprodukte wie Formaldehyd und Essigsäure gebildet. Aufgrund geringer Beladungskonzentrationen stellen diese aber keine toxische Belastung für die Zellen dar.

### **Beladen der Zellen mit Fluoreszenzindikatoren**

Zur Messung der intrazellulären  $Mg^{2+}$ - und  $Na^+$ -Konzentrationen sowie zur Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes wurden die Zellen in einem Beladungsmedium aus Hanks' Salzlösung, Pluronic F-127 (20%ige Lösung in DMSO) und einem spezifischen Fluoreszenzindikator für das zu messende Ion aufgenommen. Dabei unterstützt das Pluronic F-127 die Dispersion der unpolaren Farbstoffmoleküle im Beladungsmedium. In Abhängigkeit von dem verwendeten Indikator wurden die Zellen zwischen 25 und 45 Minuten lang bei  $37^{\circ}C$  unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert (**Tab. 5**).

**Tab. 5:** Übersicht über Indikatorkonzentrationen im Beladungsmedium und Beladungszeiten

<b>Indikator</b>	<b>Mag-fura-2 AM</b>	<b>BCECF AM</b>	<b>SBFI AM</b>
Ion	$Mg^{2+}$	$H^+$ (pH)	$Na^+$
Indikatorkonzentration Beladungsmedium ( $\mu\text{mol/l}$ )	5 <sup>1)</sup>	0.5	10
Beladungszeit (min)	30	25	45

<sup>1)</sup> Bei kombinierten Messungen der  $[Mg^{2+}]$  und des pH wurde die Endkonzentration von Mag-fura-2 AM auf  $10 \mu\text{mol/l}$  heraufgesetzt, um optimale Beladungsergebnisse zu erzielen.

### **Waschen**

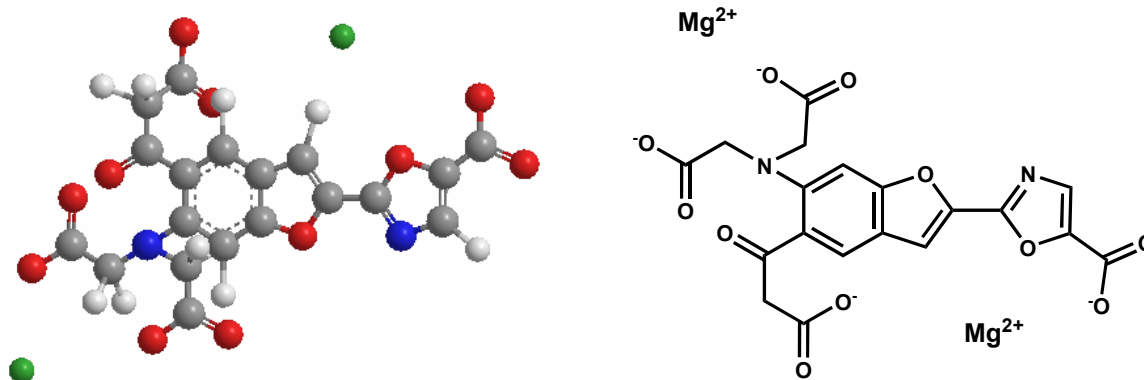
Überschüssiger Indikator bzw. dessen Spaltprodukte wurden anschließend durch Waschen (10 min,  $70 g_z$ ) in Hanks' Salzlösung entfernt.

### 3.2.3.4. Fluoreszenzspektrometrische Bestimmung der extra- bzw. intrazellulären $[Mg^{2+}]$

#### *Mag-fura-2*

Um die  $Mg^{2+}$ -Abgabe aus den PEZ zu untersuchen, wurde ein Farbstoff benötigt, der  $Mg^{2+}$  mit einer höchstmöglichen Spezifität bindet und sensibel auf geringgradige Änderungen der  $[Mg^{2+}]$  im Messmedium reagiert.

Ein Farbstoff mit derartigen Eigenschaften ist Mag-fura-2 (**Abb. 6**).

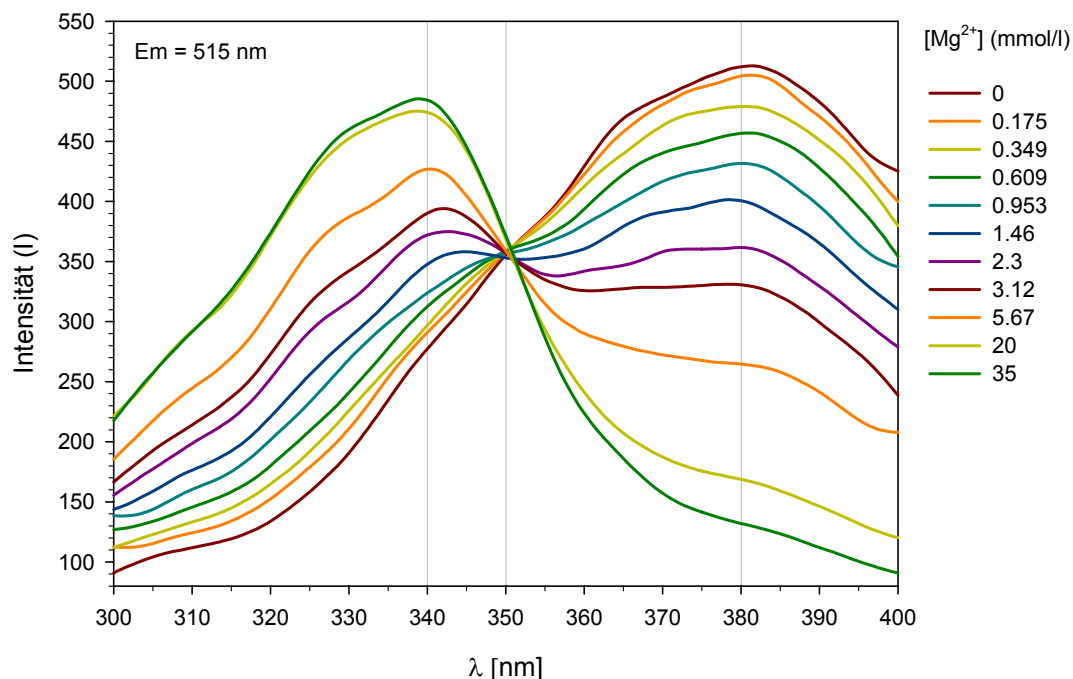


**Abb. 6:** Mag-fura-2 (zellimpermeabel)

Mag-fura-2 besitzt 4 Ionenbindungsstellen für 4 monovalente bzw. 2 divalente Kationen.

Mag-fura-2 gehört zu den sogenannten „excitation shift probes“. Das Exzitationsmaximum für Mag-fura-2 liegt bei einer Wellenlänge von 380 nm. Durch Bindung von  $Mg^{2+}$  (Mag-fura-2- $Mg^{2+}$ -Komplex) verschiebt sich der Wellenlängenbereich der maximalen Exzitation von 380 auf 340 nm (excitation shift). Dieses Verhalten ist beispielhaft in **Abbildung 7** dargestellt. Mit zunehmender  $[Mg^{2+}]_e$  nimmt die Fluoreszenzintensität bei 340 nm zu und bei 380 nm ab.

Daneben weist Mag-fura-2 einen Wellenlängenbereich auf, bei dem Änderungen der  $[Mg^{2+}]$  im Messmedium keine Änderung im Exzitationsverhalten des Farbstoffes erkennen lassen. Dieser auch als „isobestic point“ bezeichnete Wellenlängenbereich um 350 nm dient zur Bestimmung der für die Messung optimalen Emissionswellenlänge.



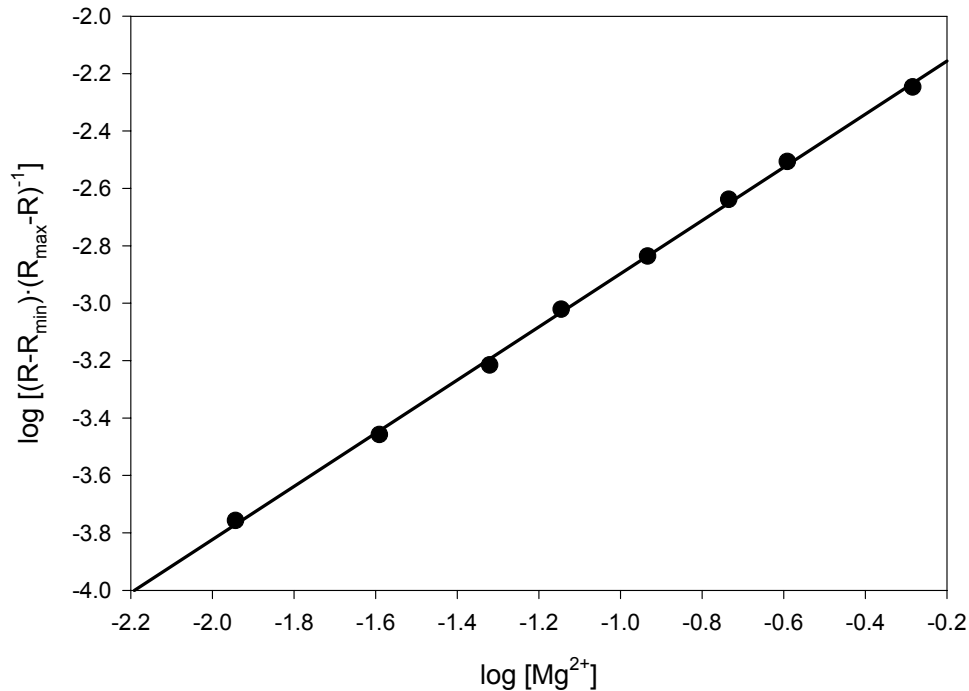
**Abb. 7:** Exzitationsspektren von Mag-fura-2 bei extrazellulären  $[\text{Mg}^{2+}]$  von 0 bis 35 mmol/l ( $E_m = 515 \text{ nm}$ )

Mit zunehmender  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration in der Messlösung verschiebt sich das Exzitationsmaximum von  $\lambda = 380 \text{ nm}$  auf  $\lambda = 340 \text{ nm}$  („excitation shift“). Die Fluoreszenzintensität ändert sich jedoch nicht bei der Wellenlänge ( $\lambda$ ) von  $350 \text{ nm}$  („isobestic point“).

### **Eichprozedur bei Mag-fura-2 (zellimpermeabel)**

Die Berechnung der Ionenkonzentrationen aus den Fluoreszenzdaten wurde im Allgemeinen mit der *ratio*-Methode durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode, bei der das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten (*ratio*) bei zwei verschiedenen Wellenlängen bestimmt wird, liegt darin, dass Veränderungen des Farbstoffes, Änderungen der absoluten Farbstoffkonzentration und bleaching-Effekte keine Auswirkung auf die Berechnung der Ionenkonzentrationen haben.

Zu jeder Mag-fura-2-Messung wurde eine Eichkurve erstellt (**Abb. 7 und 8**). Dazu wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten zwischen den Wellenlängen  $340 \text{ nm}$  und  $380 \text{ nm}$  ( $340/380$ -Ratio) bei Probenmedien mit definierten  $[\text{Mg}^{2+}]$  von 0 bis 35 mmol/l bestimmt und logarithmisch gegen die  $[\text{Mg}^{2+}]$  aufgetragen (**Abb. 8**).



**Abb. 8:** Logarithmierte Eichkurve

Intensitätsverhältnisse von 340 nm gegenüber 380 nm (*340/380-Ratio*) wurden für Messlösungen mit Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen von 0 bis 35 mmol/l bestimmt und logarithmisch gegen die [Mg<sup>2+</sup>] aufgetragen. Die Eichkurve wurde durch lineare Regression dieser Werte erstellt (SigmaPlot, SPSS, Chicago, IL, USA).

### Messung

Für die extrazelluläre Bestimmung der [Mg<sup>2+</sup>] wurden 3 ml-Küvetten mit 1.5 ml des Messmediums mit einer definierten [Na<sup>+</sup>] und mit 0.5 ml der Zellsuspension (~ 40% Zytokrit in Dulbecco's PBS mit NMDG modifiziert) befüllt. Die [Na<sup>+</sup>] im Messmedium wurde durch Mischen von modifiziertem Medium 199 mit Hanks' Salzen ([Na<sup>+</sup>]=145 mmol/l) und modifizierter Na<sup>+</sup>-freier Dulbecco's PBS (Na<sup>+</sup> vollständig durch NMDG ersetzt) eingestellt (**Tab. 6**). Die Zugabe der Zellen erfolgte erst, nachdem der Fluoreszenzindikator (Mag-fura-2 Tetrapotassium-Salz in einer Konzentration von 5 µmol/l) bzw. die Hemmstoffe, second messenger oder Hormone der Messlösung hinzugefügt worden waren. Im Anschluss daran wurde die Messung sofort gestartet. Abweichend von der zuvor beschriebenen Methode

wurden die Zellen bei Messungen mit extrazellulären  $[\text{Na}^+]$  von 145 mmol/l direkt in das modifizierte Medium 199 Hanks gegeben.

**Tab. 6:** Medienvolumina zum Einstellen definierter  $[\text{Na}^+]$  im Messmedium

<b>End-<math>[\text{Na}^+]_e</math> in der Küvette (mmol/l)</b>	0	2.5	5	10	20	50	80
<b>Medium 199 Hanks (modifiziert) in der Küvette (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	0	34.5	69.0	137.8	275.9	689.7	1103.4

Nach dem Einpipettieren von Medium 199 Hanks (modifiziert) wurde durch Zugabe von  $\text{Na}^+$ -freier Dulbecco's PBS (NMDG-modifiziert) ein Endvolumen von 2 ml eingestellt.

### ***Berechnung der extrazellulären $[\text{Mg}^{2+}]$***

Die  $[\text{Mg}^{2+}]$  im Messmedium wurden mittels der Eichkurve bestimmt.

### **3.2.3.5. Fluoreszenzspektrometrische Bestimmung der intrazellulären $[\text{Mg}^{2+}]$**

#### ***Messung***

Die Fluoreszenzintensitäten der mit Mag-fura-2 beladenen Zellen wurden kontinuierlich unter Nutzung der „fast filter“-Einheit über einen Zeitraum von 10 Minuten gemessen. Simultan dazu erfolgte die Messung des intrazellulären pH-Wertes (s.u.).

#### ***Berechnung der Ionenkonzentrationen***

Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden auf der Grundlage der Grynkiewiczformel (**Abb. 9**; GRYNKIEWICZ et al., 1985) in Ionenkonzentrationen umgerechnet. Die bei der *in vitro*-Eichung ermittelten Werte dienten dabei als Referenzdaten.

$$[Ion] = K_d \times \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \times \frac{S_{f2}}{S_{b2}}$$

**Abb. 9:** Grynkiewiczformel

$R$  (*ratio*) Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei den Exzitationsmaxima für den freien Indikator und den Indikator-Ionen-Komplex in der zu untersuchenden Probe

$R_{\max}$  Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten für den vollständig mit Ionen gesättigten Indikator

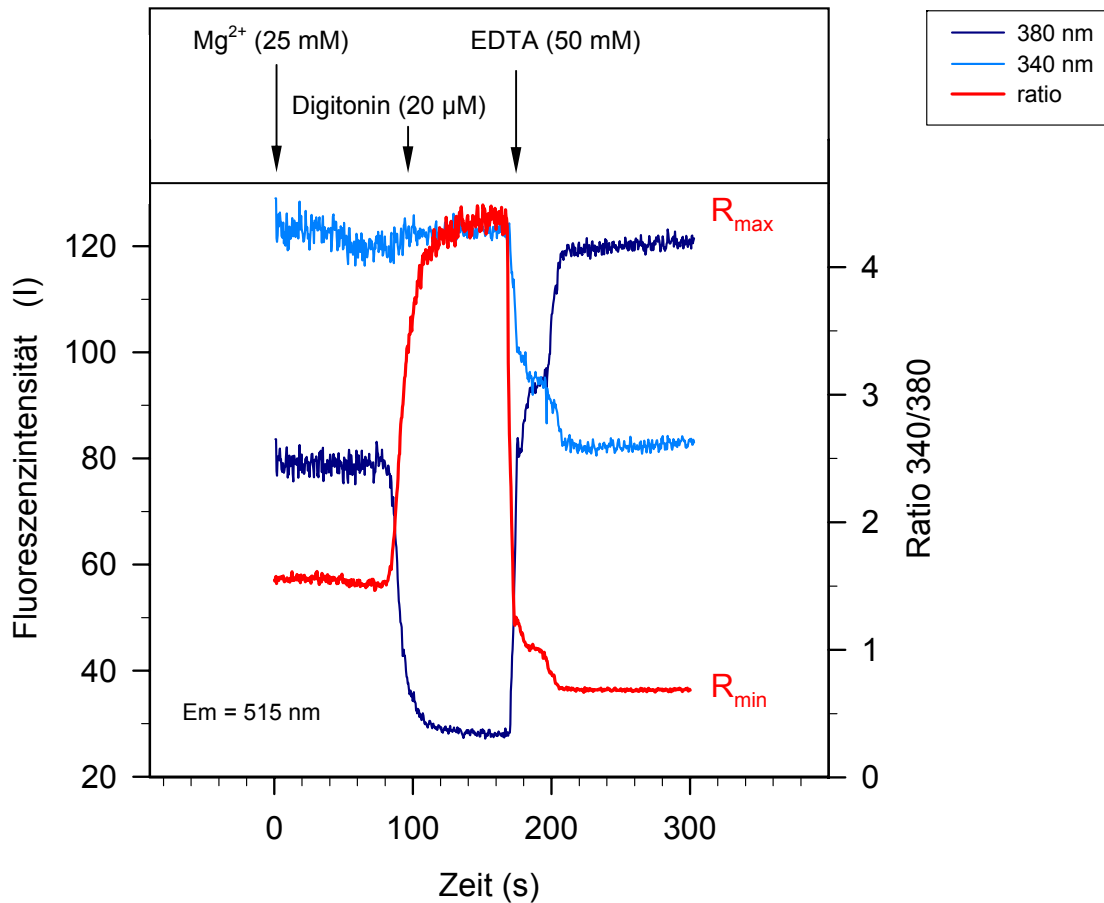
$R_{\min}$  Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten für den freien Indikator

$S_{f2}$  bzw.  $S_{b2}$  Maximale Fluoreszenzintensität des Indikators ohne divalente Ionen bzw., wenn divalente Ionen im Überschuss vorhanden sind

$K_d$  Dissoziationskonstante des Indikator-Ionen-Komplexes. Die  $K_d$  für Mag-fura-2 wurde der Literatur entnommen (1.5 mmol/l). Die Bestimmung der  $K_d$  für den SBFI- $\text{Na}^+$ -Komplex erfolgte mittels einer Eichkurve (**s.u.**).

### ***In vitro*-Eichprozedur bei Mag-fura-2 AM zur Bestimmung der intrazellulären $[\text{Mg}^{2+}]$**

Die zur Berechnung der Ionenkonzentrationen benötigten Parameter ( $R_{\min}$ ,  $R_{\max}$ ,  $S_{f2}$ ,  $S_{b2}$ ,  $K_d$ ; **Abb. 9**) wurden durch eine *in vitro*-Eichung am Ende jeder Messung gewonnen (**Abb. 10**). Dazu wurden die Zellen zunächst mittels Digitonin (20  $\mu\text{mol/l}$ ) lysiert (Austritt des Farbstoffes in das Medium).  $R_{\max}$  wurde nach vollständiger Sättigung des Farbstoffes ( $[\text{Mg}^{2+}]_e = 25 \text{ mmol/l}$ ) ermittelt. Anschließend wurde die Messlösung durch Zugabe von EDTA (50 mmol/l) nominell  $\text{Mg}^{2+}$ -frei gemacht, um die 340/380-*Ratio* des  $\text{Mg}^{2+}$ -freien Farbstoffes ( $R_{\min}$ ) zu bestimmen.



**Abb. 10:** Eichung bei Messungen mit Mag-fura-2 AM

Die [Mg<sup>2+</sup>] in der Zellsuspension wurde auf 25 mmol/l eingestellt. R<sub>max</sub> wurde nach dem Lysieren der Zellen mittels Digitonin (20 µmol/l), R<sub>min</sub> durch anschließende Zugabe von EDTA (50 mmol/l) in das Lysat bestimmt.

### 3.2.3.6. Fluoreszenzspektrometrische Bestimmung der intrazellulären [Na<sup>+</sup>] und des intrazellulären pH-Wertes

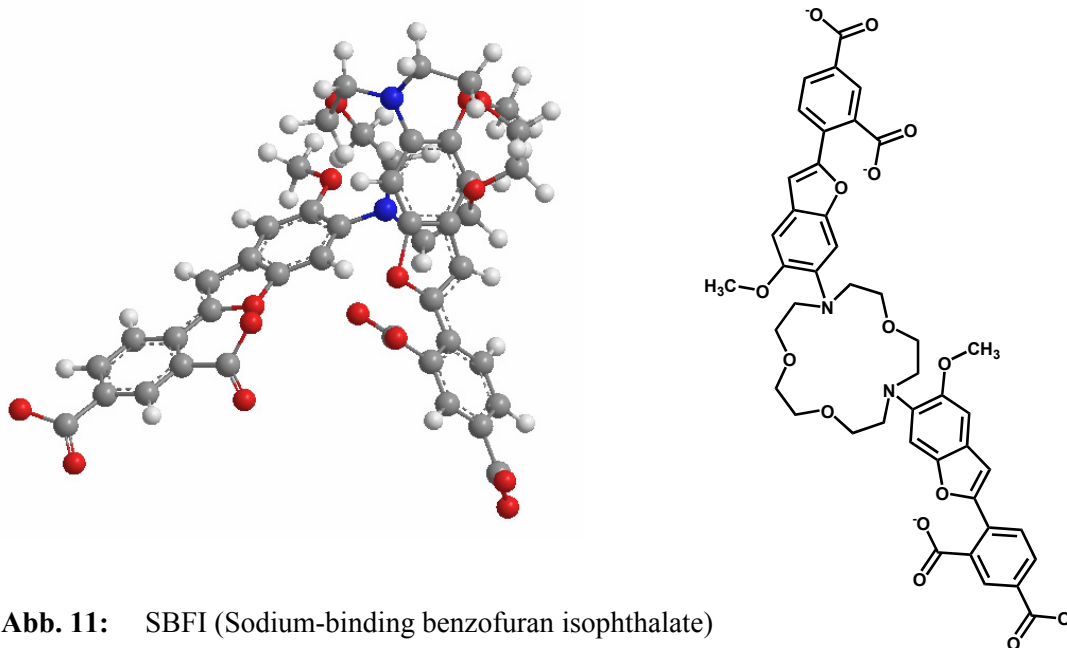
#### *Messung*

Die Fluoreszenzintensitäten der mit SBF1 AM bzw. BCECF AM beladenen Zellen wurden kontinuierlich unter Nutzung der „fast filter“-Einheit über einen Zeitraum von 10 Minuten gemessen.



***In situ Eichprozedur bei SBF1 AM zur Bestimmung der intrazellulären [Na<sup>+</sup>]***

Um Eichdaten für Messungen mit SBF1 (Sodium-binding Benzofuran Isophthalat, **Abb. 11**) zu ermitteln, wurden PEZ in Eichlösungen mit definierten [Na<sup>+</sup>] von 0 bis 160 mmol/l (**Tab. 7**) suspendiert.



**Abb. 11:** SBF1 (Sodium-binding benzofuran isophthalate)  
SBF1 besitzt 4 Ionenbindungsstellen für 4 monovalente Kationen.

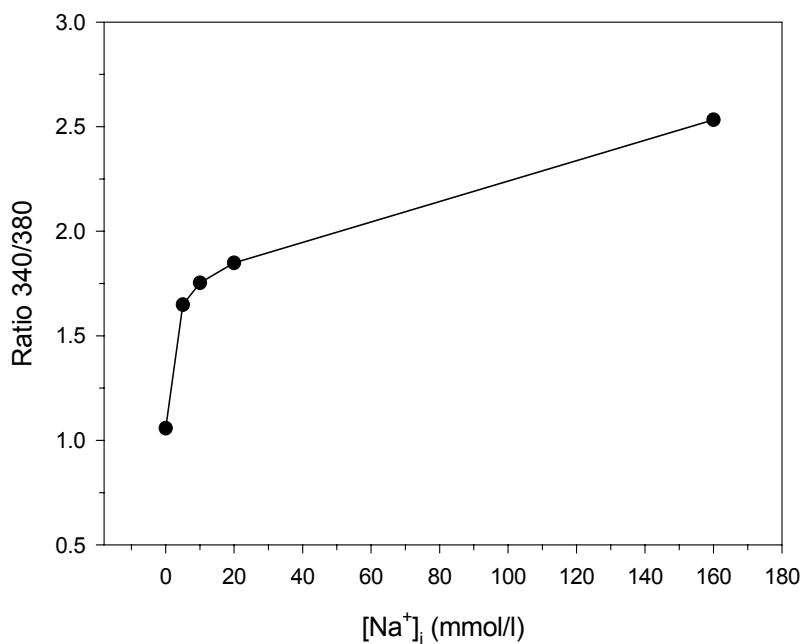
**Tab. 7:** Zusammensetzung der zum Herstellen der Eichlösung mit definierter [Na<sup>+</sup>] verwendeten Na<sup>+</sup>-reichen und Na<sup>+</sup>-freien Medien

Substanz	Na <sup>+</sup> -haltige Lösung	Na <sup>+</sup> -freie Lösung
NaCl	30 mmol/l	-
Na-Glukonat	130 mmol/l	-
KCL	-	30 mmol/l
K-Glukonat	-	130 mmol/l
MgCl	1 mmol/l	1 mmol/l
CaCl	1 mmol/l	1 mmol/l
HEPES	10 mmol/l	10 mmol/l
pH	7.1	7.1

Da sich die  $[\text{Na}^+]$  in der Zelle physiologischerweise von der extrazellulären  $[\text{Na}^+]$  unterscheidet, wurden die Konzentrationen mit Hilfe des Ionophors Gramicidin ( $10\mu\text{mol/l}$ ) äquilibriert (30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$ ).

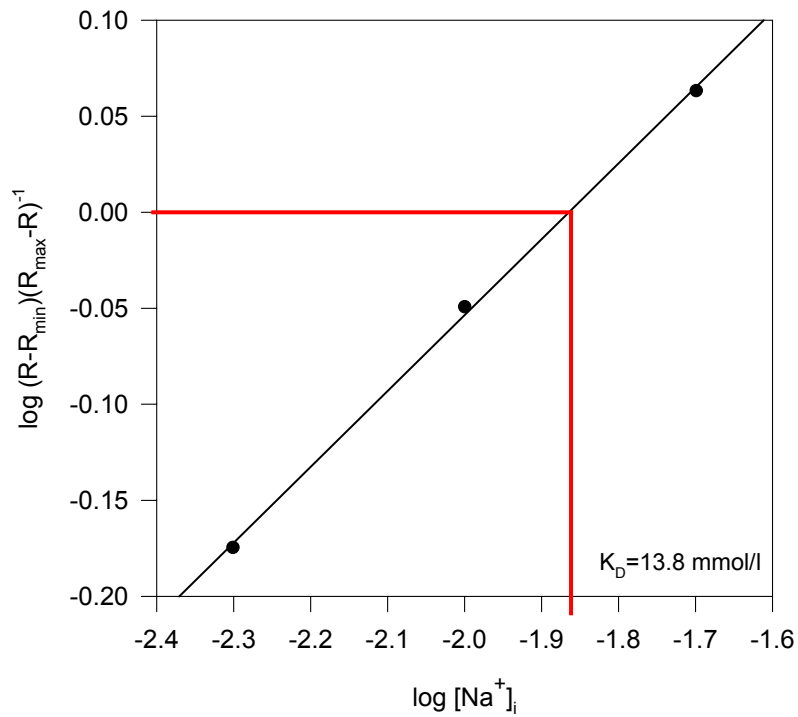
Das Ionophor Gramicidin wurde durch Waschen in BSA-haltiger Lösung entfernt.

Nach Ermittlung der Fluoreszenzintensitäten bei 340 und 380 nm wurde die 340/380-*Ratio* berechnet und gegen die  $[\text{Na}^+]$  aufgetragen (Abb. 12).  $R_{\min}$  und  $R_{\max}$  sowie die  $K_D$  für den verwendeten Farbstoff wurden auf Grundlage der logarithmierten Eichkurve bestimmt (Abb. 13).



**Abb. 12:** Eichkurve für SBF1

Fluoreszenzintensitäten von SBF1 wurden bei PEZ, deren extra- und intrazelluläre  $[\text{Na}^+]$  zuvor mit Hilfe von Gramicidin ( $10\mu\text{mol/l}$ ) auf 0, 5, 10, 20 oder 160 mmol/l äquilibriert wurden, bei 340 und 380 nm bestimmt. Die 340/380-*Ratio* wurde berechnet und gegen die  $[\text{Na}^+]$  aufgetragen. Die Eichkurve dient als Grundlage zur Bestimmung von  $R_{\min}$  und  $R_{\max}$  sowie der  $K_D$  für den verwendeten Farbstoff (Abb. 13).

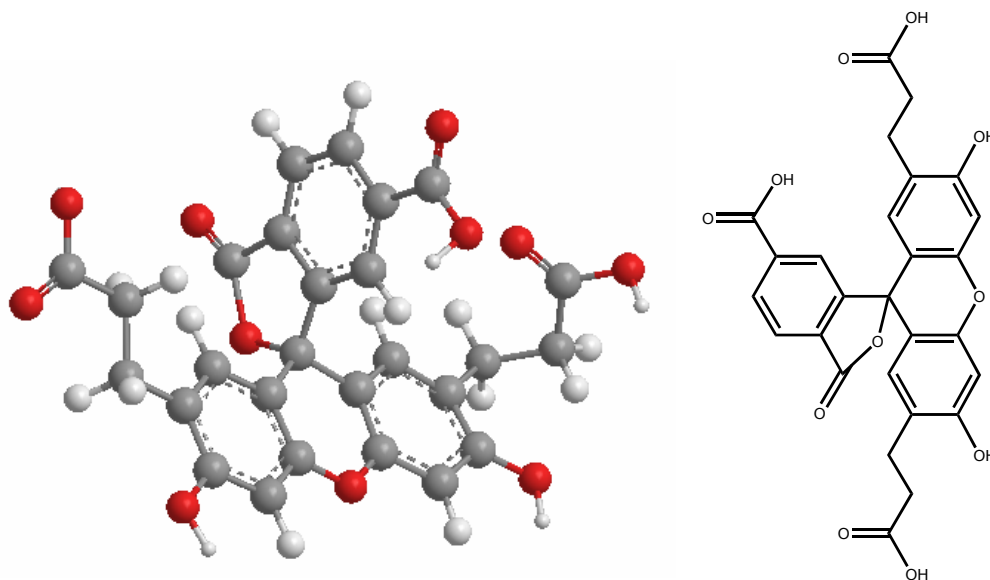


**Abb. 13:** Bestimmung der  $K_D$  für SBFI in situ

Intensitätsverhältnisse von 340 nm gegenüber 380 nm (340/380-*Ratio*) wurden bestimmt und logarithmisch gegen die  $[\text{Na}^+]_i$  aufgetragen. Die Eichkurve wurde durch lineare Regression dieser Werte erstellt (SigmaPlot, SPSS, Chicago, IL, USA). Die  $\log K_D$  betrug -1.86 ( $K_D = 13.8 \text{ mmol/l}$ ).

***In situ* Eichprozedur bei BCECF zur Bestimmung des intrazellulären pH**

Zur Ermittlung von Eichdaten für Messungen mit BCECF (2',7'-Bis(2-Carboxyethyl)-5(6)-Carboxyfluorescein, **Abb. 14**) wurden PEZ in Medien (**Tab. 8**) mit definierten pH-Werten von 6.0 bis 9.0 suspendiert.



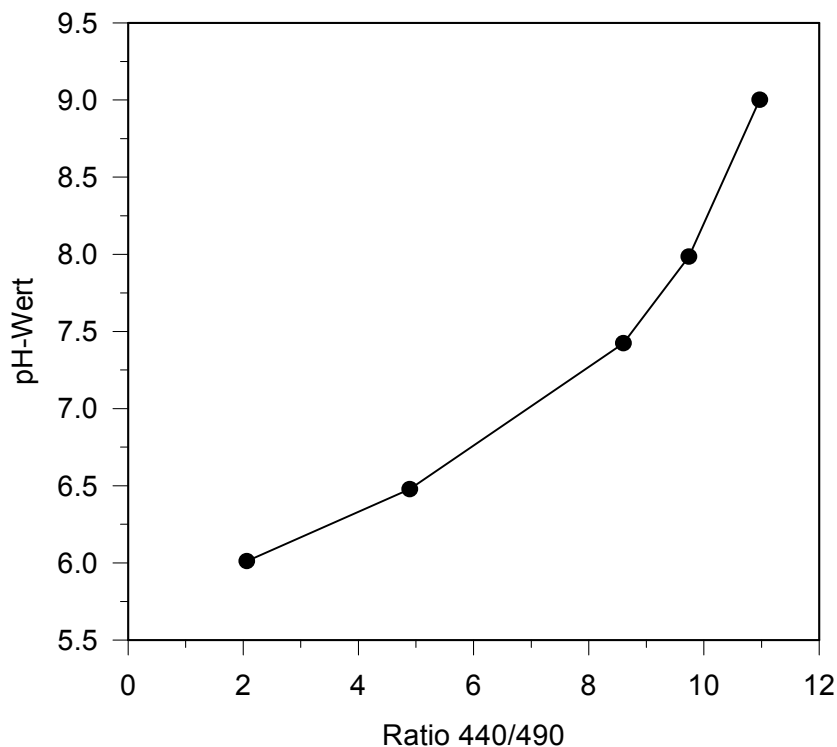
**Abb. 14:** BCECF (2',7'-Bis(2-Carboxyethyl)-5(6)-Carboxyfluorescein)

**Tab. 8:** Zusammensetzung des Eichmediums

Substanz	K <sup>+</sup> -haltige Lösung
KCl	20 mmol/l
K-Glukonat	110 mmol/l
NaCl	10 mmol/l
CaCl <sub>2</sub>	1 mmol/l
MgCl <sub>2</sub>	1 mmol/l
MOPS	10 mmol/l
pH	6.0 bis 9.0

Die extra- und intrazelluläre  $[H^+]$  wurden mittels Nigericin (10  $\mu\text{mol/l}$ ), einem  $K^+/H^+$ -Ionophor, äquilibriert (bei  $37^\circ\text{C}$ ), welches nach 10 Minuten durch Waschen in BSA-haltiger Lösung entfernt wurde.

Nach Ermittlung der Fluoreszenzintensitäten bei 440 und 490 nm wurde die 440/490-*Ratio* berechnet und gegen die entsprechenden pH-Werte aufgetragen. Auf Grundlage dieser Eichpunkte wurde mittels „curve fitting“ eine Eichkurve erstellt (**Abb. 15**). Die biexponentielle Gleichung  $\text{pH}_i = 0.002^{(0.6 \times R_{440/490})} + 5.7^{(0.025 \times R_{440/490})}$  beschreibt den Verlauf dieser Kurve.



**Abb. 15:** Eichkurve für BCECF

Fluoreszenzintensitäten von BCECF wurden bei PEZ, deren extra- und intrazellulärer pH zuvor mit Hilfe von Nigericin zwischen 6.0 und 9.0 äquilibriert wurde, bei 440 und 490 nm bestimmt. Die 440/490-*Ratio* wurde berechnet und gegen den entsprechenden pH-Wert aufgetragen. Die Beziehung zwischen dem  $\text{pH}_i$  und der 440/490-*Ratio* kann durch die biexponentielle Gleichung  $\text{pH}_i = 0.002^{(0.6 \times R_{440/490})} + 5.7^{(0.025 \times R_{440/490})}$  beschrieben werden.

### ***Berechnung der Ionenkonzentrationen bzw. des pH-Wertes***

Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden mittels der erstellten Eichkurven in Ionenkonzentrationen umgerechnet.

#### **3.2.3.7. Bestimmung der Zellzahl**

Da die Anzahl der Zellen in den Messsuspensionen variierte, wurden nach jeder Messung die Zellzahl durch mikroskopische Auszählung der Pansenepithelzellen in einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt.

#### **3.2.4. Graphische Darstellung und Statistik**

Alle Graphen wurden mit dem Programm SigmaPlot (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) erstellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt. Die Einzelwerte der Daten, aus denen die Mittelwerte errechnet wurden, sind im Anhang (**Kap. 9, A3**) aufgeführt. Wenn nicht von einer symmetrischen Verteilung ausgegangen werden konnte, wurden Einzelwerte dargestellt.

Zur statistischen Prüfung der Unterschiede erfolgten Mittelwertvergleiche mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test. Unterschiede wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0.05$  als signifikant angesehen (SigmaStat, SPSS Inc.).