

4. Ergebnisse

4.1. Immunzytochemische Charakterisierung der aus dem Pansenepithel isolierten Zellen

Voraussetzung für die Durchführung der eigenen Versuche war die Überprüfung des epithelialen Ursprungs der verwendeten Primärkulturzellen. Dies erfolgte mittels des immunzytochemischen Nachweises von Zytokeratinen. Diese Intermediärfilamente sind ausschließlich bei epithelialen Zellen zu finden und werden daher für die Zelltypisierung als spezifische Markerproteine verwendet.

Unter dem Mikroskop zeigten sich ausnahmslos alle Zellen deutlich Pan-Zytokeratin-positiv gefärbt (**Abb. 17AB**), d.h. die epitheliale Charakteristik und die Uniformität des Zelltyps wurde bei den aus Primärkulturen stammenden Zellen nachgewiesen. Das Vorhandensein von Zellen anderen Ursprungs wie Bindegewebszellen wurde ausgeschlossen.

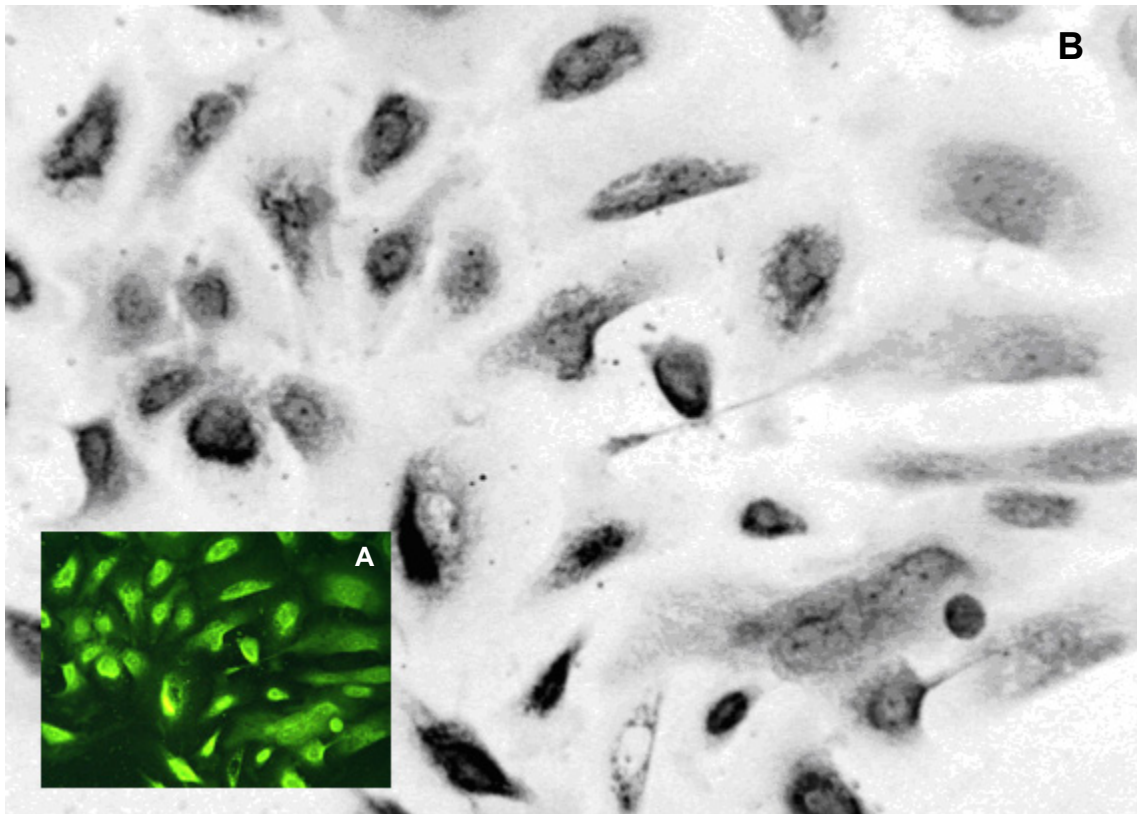


Abb. 17AB: Nachweis des epithelialen Ursprungs der kultivierten Zellen mittels Zytokeratinbestimmung

Die Zellen wurden mit dem Maus-anti-Zytokeratin-Pan-Antikörpers (Klon Lu5) gegen die Zytokeratine 1-19 behandelt, anschließend mit einem fluoreszierenden Anti-Maus-Ig-Antikörper inkubiert und mikroskopisch beurteilt. Die Zytoskelettstrukturen der Zellen zeigen sich deutlich gefärbt.

(A Originalbild, B Greyscale invertiert; beide in 400-facher Vergrößerung)

4.2. Funktionelle Untersuchungen zur Na^+ -abhängigen Komponente der Mg^{2+} -Abgabe aus PEZ

Erste Hinweise auf die Existenz eines Na^+ -abhängigen Mg^{2+} -Transportes bei PEZ gaben parallele Messungen von intrazellulärer Mg^{2+} - ($[\text{Mg}^{2+}]_i$) und Na^+ -Konzentration ($[\text{Na}^+]_i$). Nach Umkehr des transmembranösen Na^+ -Gradienten ($[\text{Na}^+]_i > [\text{Na}^+]_e$) wurde eine Erhöhung der $[\text{Mg}^{2+}]_i$ gemessen. Die $[\text{Na}^+]_i$ nahm dagegen ab.

Es stellte sich die Frage, ob bei PEZ auch unter physiologischen Bedingungen ($[\text{Na}^+]_e > [\text{Na}^+]_i$) ein wesentlicher Teil des Mg^{2+} -Transportes über den $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher vermittelt wird. Zur Klärung dieser Problematik, wurden Versuche durchgeführt, bei denen

Änderungen der $[Mg^{2+}]$ im extrazellulären Medium als Maß für die Mg^{2+} -Abgabe aus PEZ bestimmt wurden. Dabei wurde geprüft, inwieweit die $[Na^+]_e$, Inhibitoren (Imipramin, Cobalt(III)hexamin) und Stimulantien (PGE_2 , db-cAMP) Einfluss auf den Mg^{2+} -Efflux nehmen.

4.2.1. Nachweis des Na^+ -abhängigen Mg^{2+} -Effluxes

Mit Mg^{2+} -beladene Pansenepithelzellen wurden in einem nominal Mg^{2+} -freien Medium mit einer definierten $[Na^+]$ suspendiert. Die Messungen wurden über einen Zeitraum von mindestens 15 Minuten durchgeführt. Die Maximaldauer betrug 60 Minuten. Die **Abbildungen 18AB** und **19AB** zeigen zwei charakteristische Messverläufe. Die Effluxrate nahm bis etwa zur 15. Minute exponential zu.

Bei einem Großteil der Messungen trat nach 15 Minuten eine Sättigung des Transportes ein, d.h. von diesem Zeitpunkt an wurden keine Änderungen der $[Mg^{2+}]_e$ mehr beobachtet (**Abb. 18B**).

Bei einige Messungen kam es jedoch nach etwa 15 bis 25 Minuten zu einen starken linearen Anstieg der $[Mg^{2+}]_e$ (**Abb. 19B**). Die Ursache für diesen Anstieg konnte zunächst nicht mit Sicherheit geklärt werden. Es wurden aber zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen. Zum einen wäre ein Mg^{2+} -Efflux über zusätzliche Transportsysteme möglich (**Kap. 4.3.2.**). Zum anderen konnte trotz sorgfältiger Behandlung der Zellen während der Messprozedur nicht ausgeschlossen werden, dass Mg^{2+} durch mechanische Defekte in der Zellmembran in das extrazelluläre Medium gelangte.

Da dieses Phänomen nur bei einigen Messungen auftrat, wurde für die Bestimmung der Kinetik des Na^+/Mg^{2+} -Austauschers der Transport nach 15 Minuten als gesättigt angenommen.

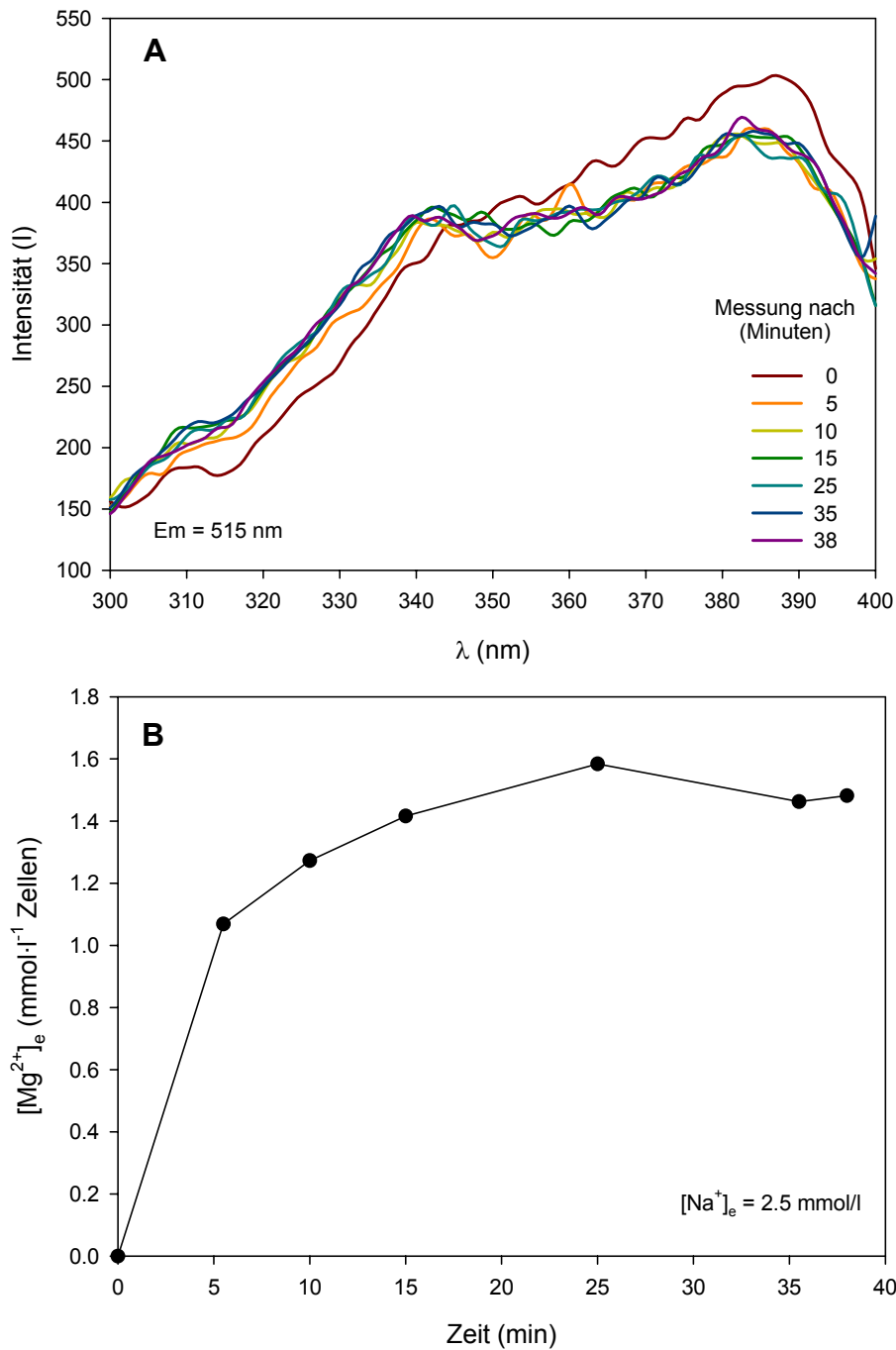


Abb. 18 AB: Beispiel einer Messung zum Na^+ -abhängigen Mg^{2+} -Transport bei PEZ ($[Na^+]_e = 2.5$ mmol/l)

Pansenepithelzellen wurden mit 6 mmol/l Mg^{2+} beladen und in ein Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freies Medium mit einer $[Na^+]$ von 2.5 mmol/l verbracht. Die $[Mg^{2+}]$ wurde mittels Mag-fura-2 (5 μ mol/l) über einen Zeitraum von 38 Minuten bestimmt. **Abbildung A** zeigt die Originalfluoreszenzdaten. In den ersten 15 Minuten stieg die $[Mg^{2+}]_e$ exponential auf einen Wert von 1.42 mmol/l an. Ab der 15. Minute verlangsamte sich der Anstieg der $[Mg^{2+}]_e$ und stellte sich bei etwa 1.45 mmol/l ein (**Abb. B**). In den meisten Versuchen konnte diese typische Sättigungskinetik beobachtet werden.

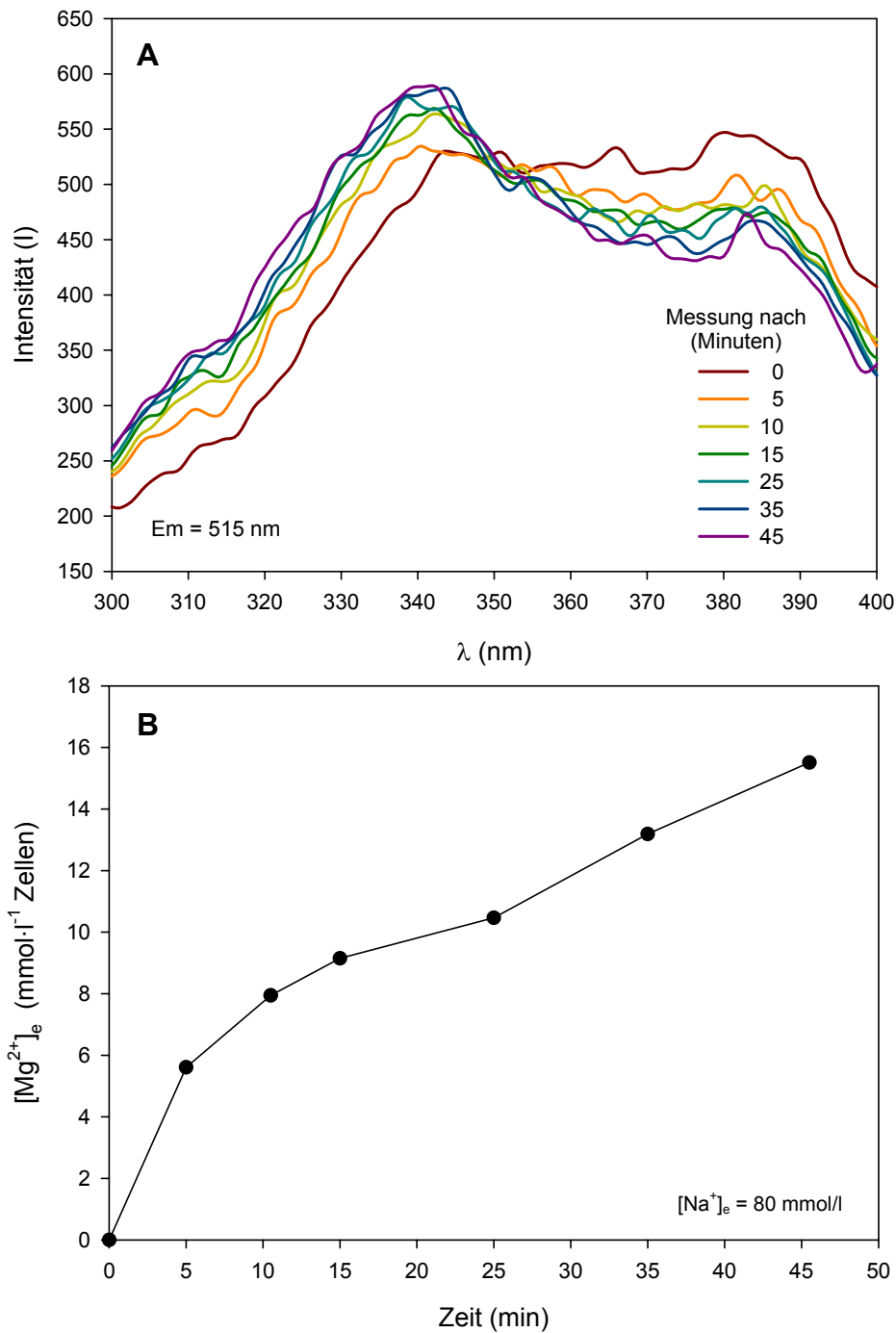


Abb. 19AB: Beispiel einer Messung zum Na^+ -abhängiger Mg^{2+} -Efflux bei PEZ ($[\text{Na}^+]_e = 80 \text{ mmol/l}$)

Pansene epithelzellen wurden mit 6 mmol/l Mg^{2+} beladen und in ein Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freies Medium mit einer $[\text{Na}^+]$ von 80 mmol/l verbracht. Die $[\text{Mg}^{2+}]$ wurde mittels Mag-fura-2 ($5 \mu\text{mol/l}$) über einen Zeitraum von 45 Minuten bestimmt. **Abbildung A** zeigt die Originalfluoreszenzdaten. Die $[\text{Mg}^{2+}]_e$ stieg bis zur 25. Minute exponential auf einen Wert von 10.47 mmol/l an. Danach war ein linearer Anstieg der $[\text{Mg}^{2+}]_e$ mit einer Effluxrate von $0.50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ zu beobachten (**Abb. B**).

4.2.2. Einfluss der extrazellulären $[\text{Na}^+]$ auf die Mg^{2+} -Abgabe

Um die kinetischen Parameter des Na^+ -abhängigen Mg^{2+} -Effluxes, speziell die Maximalgeschwindigkeit (V_{\max}) und den K_M -Wert, nach Michaelis-Menten zu ermitteln, wurden Mg^{2+} -Effluxraten bei verschiedenen $[\text{Na}^+]_e$ über einen Zeitraum von 15 Minuten bestimmt. Dazu wurde Na^+ im Messmedium komplett oder zu einem definierten Teil durch N-Methyl-D-Glukamin (NMDG) ersetzt, um $[\text{Na}^+]_e$ von 0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 50, 80 und 145 mmol/l zu erhalten. Die **Abbildungen 20AB** bis **27AB** zeigen beispielhaft Originaleinzelmessungen bei verschiedenen $[\text{Na}^+]_e$.

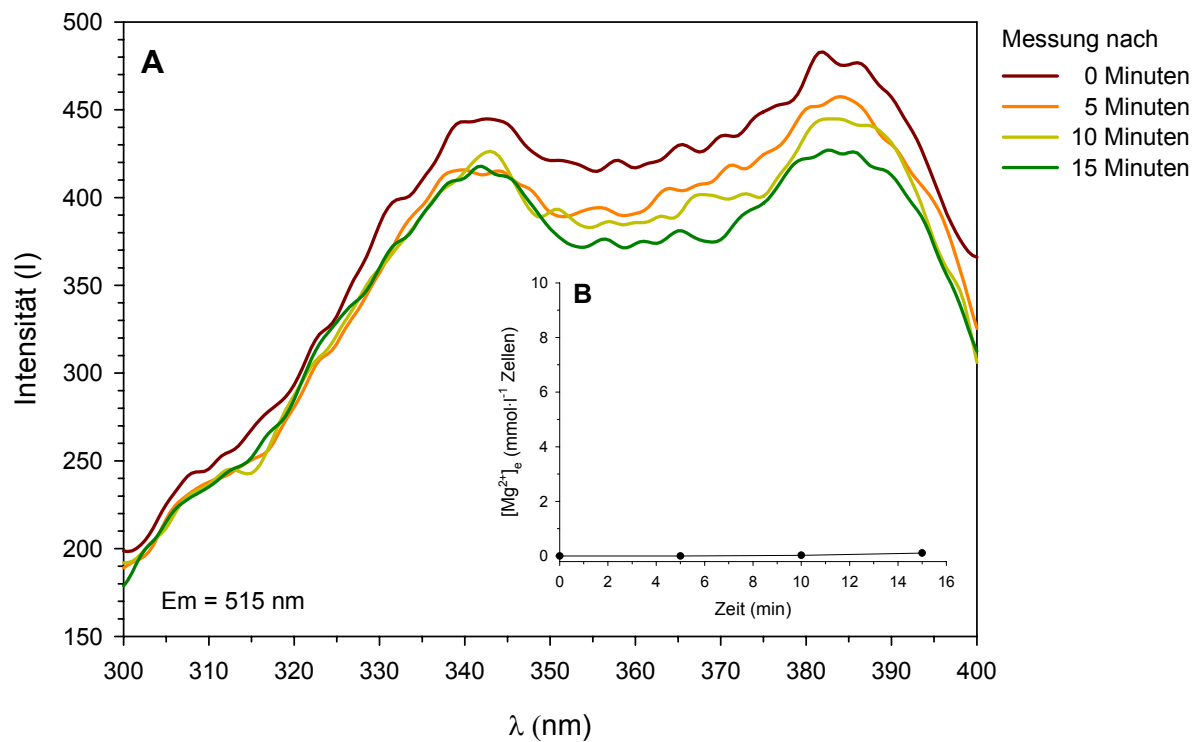


Abb. 20AB: Mg^{2+} -Abgabe aus PEZ in ein Na^+ -freies Messmedium

Pansenepithelzellen wurden suspendiert und mit 6 mmol/l Mg^{2+} beladen. Die beladenen Zellen wurden in ein Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freies Medium mit einer $[\text{Na}^+]$ von 0 mmol/l verbracht und die $[\text{Mg}^{2+}]$ mittels Mag-fura-2 (5 $\mu\text{mol/l}$) über einen Zeitraum von 15 Minuten bestimmt. **Abbildung A** zeigt Originalfluoreszenzdaten, **Abbildung B** die Mg^{2+} -Abgabe aus den PEZ.

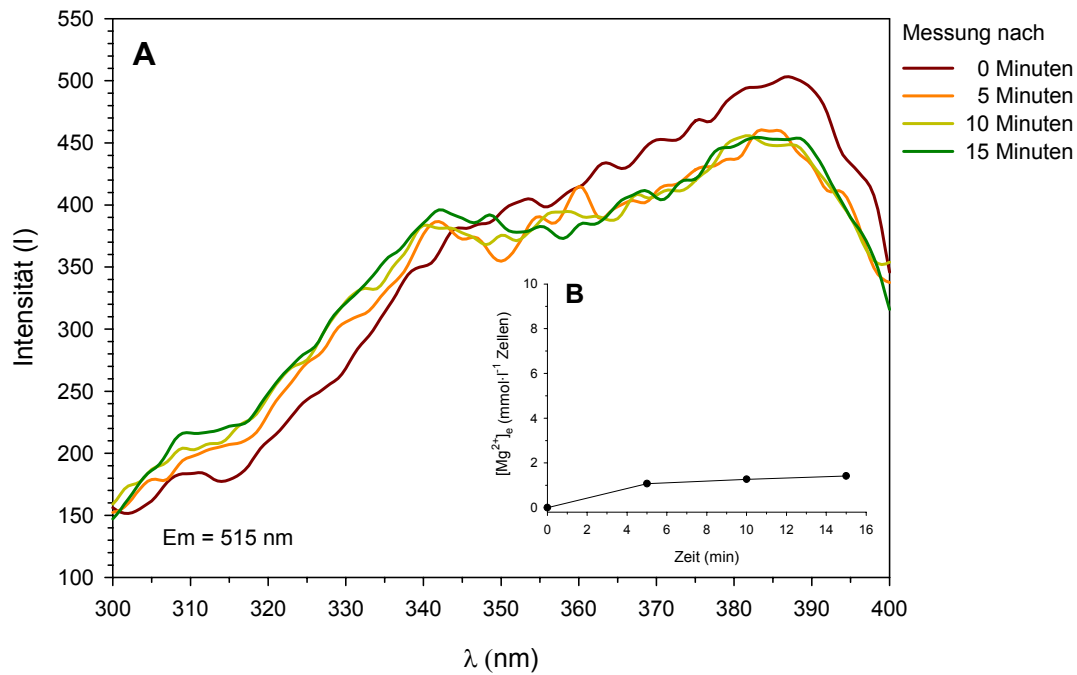


Abb. 21AB: Messung zum $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher bei PEZ ($[\text{Na}^+]_e = 2.5 \text{ mmol/l}$) Mg^{2+} -beladene PEZ (6 mmol/l) wurden in ein Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freies Medium mit einer $[\text{Na}^+]$ von 2.5 mmol/l verbracht und die $[\text{Mg}^{2+}]$ mittels Mag-fura-2 (5 $\mu\text{mol/l}$) über einen Zeitraum von 15 Minuten bestimmt (A Originalfluoreszenzdaten, B Mg^{2+} -Abgabe aus den PEZ).

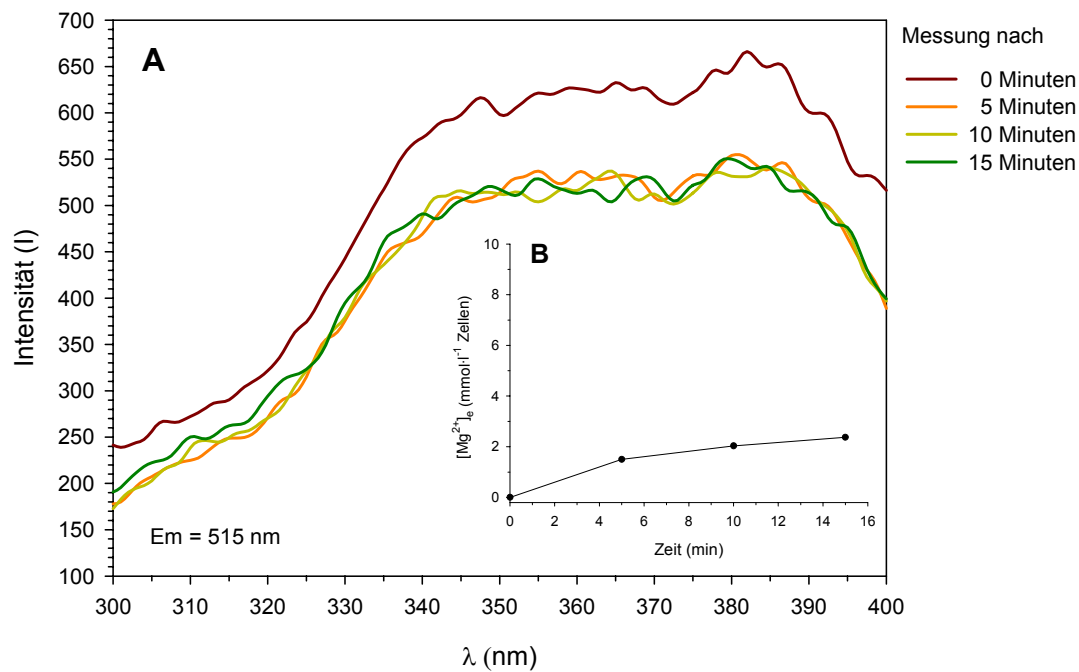


Abb. 22AB: Messung zum $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher bei PEZ ($[\text{Na}^+]_e = 5 \text{ mmol/l}$) Mg^{2+} -beladene PEZ (6 mmol/l) wurden in ein Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freies Medium mit einer $[\text{Na}^+]$ von 5 mmol/l verbracht und die $[\text{Mg}^{2+}]$ mittels Mag-fura-2 (5 $\mu\text{mol/l}$) über einen Zeitraum von 15 Minuten bestimmt (A Originalfluoreszenzdaten, B Mg^{2+} -Abgabe aus den PEZ).

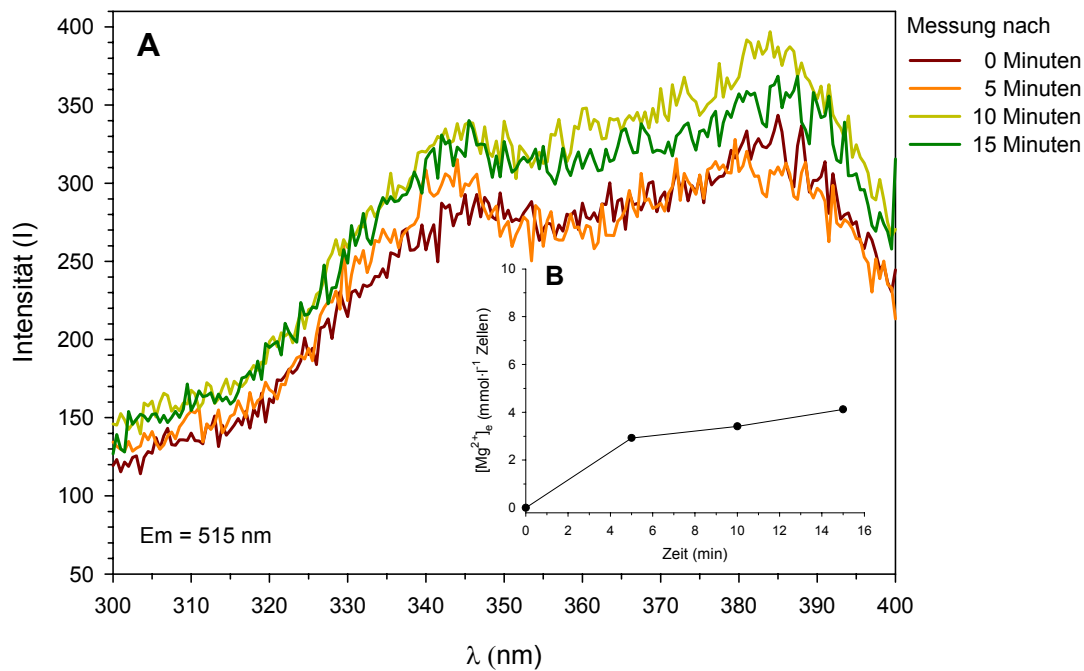


Abb. 23AB: Messung zum Na⁺/Mg²⁺-Austauscher bei PEZ ($[Na^+]_e = 10 \text{ mmol/l}$) Mg²⁺-beladene PEZ (6 mmol/l) wurden in ein Ca²⁺- und Mg²⁺-freies Medium mit einer $[Na^+]$ von 10 mmol/l verbracht und die $[Mg^{2+}]$ mittels Mag-fura-2 (5 μmol/l) über einen Zeitraum von 15 Minuten bestimmt (**A** Originalfluoreszenzdaten, **B** Mg²⁺-Abgabe aus den PEZ).

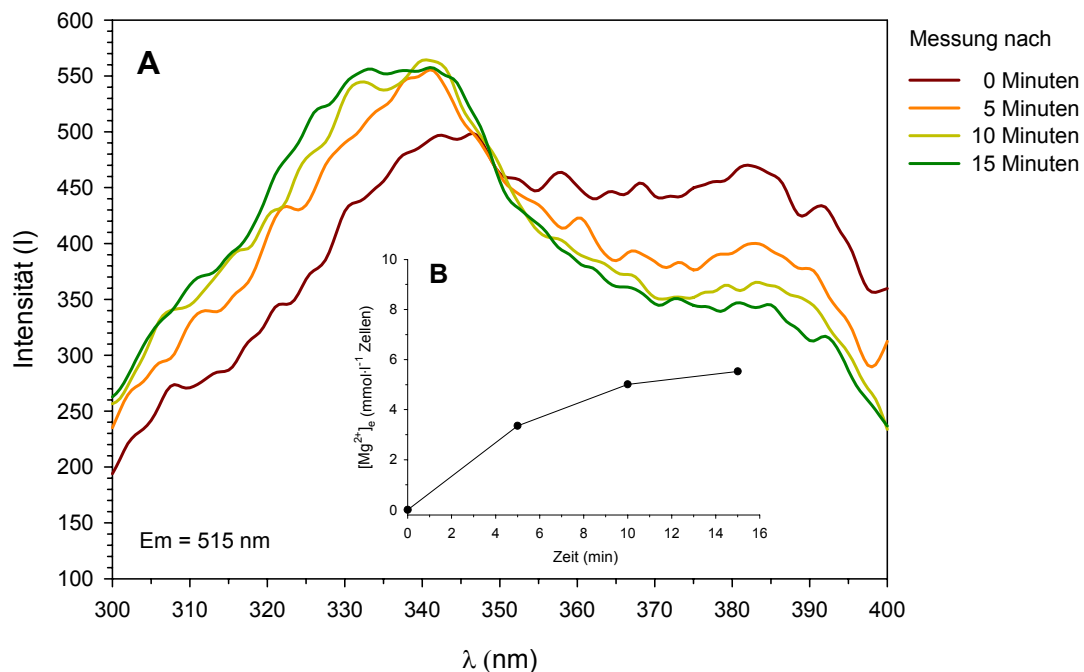


Abb. 24AB: Messung zum Na⁺/Mg²⁺-Austauscher bei PEZ ($[Na^+]_e = 20 \text{ mmol/l}$) Mg²⁺-beladene PEZ (6 mmol/l) wurden in ein Ca²⁺- und Mg²⁺-freies Medium mit einer $[Na^+]$ von 20 mmol/l verbracht und die $[Mg^{2+}]$ mittels Mag-fura-2 (5 μmol/l) über einen Zeitraum von 15 Minuten bestimmt (**A** Originalfluoreszenzdaten, **B** Mg²⁺-Abgabe aus den PEZ).

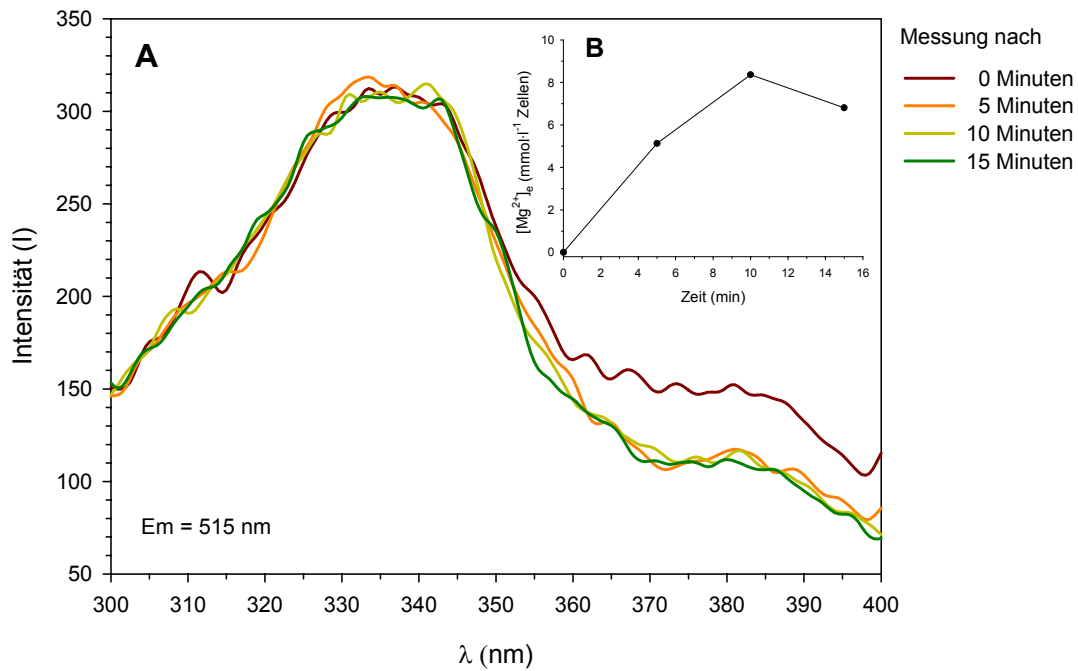


Abb. 25AB: Messung zum $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher bei PEZ ($[\text{Na}^+]_e = 50 \text{ mmol/l}$) Mg^{2+} -beladene PEZ (6 mmol/l) wurden in ein Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freies Medium mit einer $[\text{Na}^+]$ von 50 mmol/l verbracht und die $[\text{Mg}^{2+}]$ mittels Mag-fura-2 (5 $\mu\text{mol/l}$) über einen Zeitraum von 15 Minuten bestimmt (A Originalfluoreszenzdaten, B Mg^{2+} -Abgabe aus den PEZ).

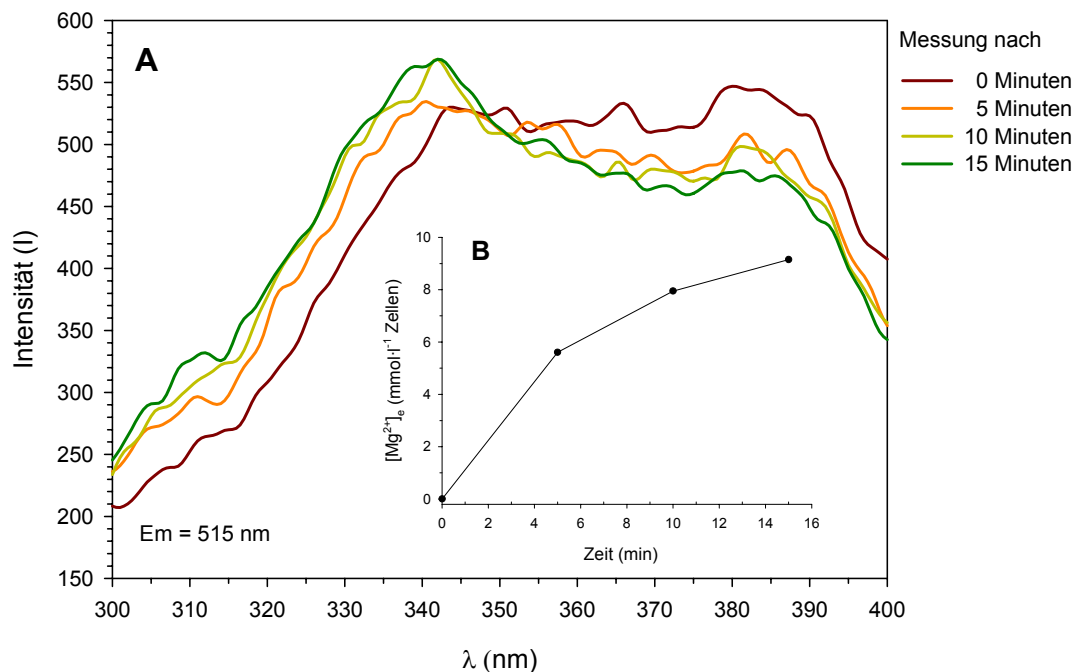


Abb. 26AB: Messung zum $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher bei PEZ ($[\text{Na}^+]_e = 80 \text{ mmol/l}$) Mg^{2+} -beladene PEZ (6 mmol/l) wurden in ein Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freies Medium mit einer $[\text{Na}^+]$ von 80 mmol/l verbracht und die $[\text{Mg}^{2+}]$ mittels Mag-fura-2 (5 $\mu\text{mol/l}$) über einen Zeitraum von 15 Minuten bestimmt (A Originalfluoreszenzdaten, B Mg^{2+} -Abgabe aus den PEZ).

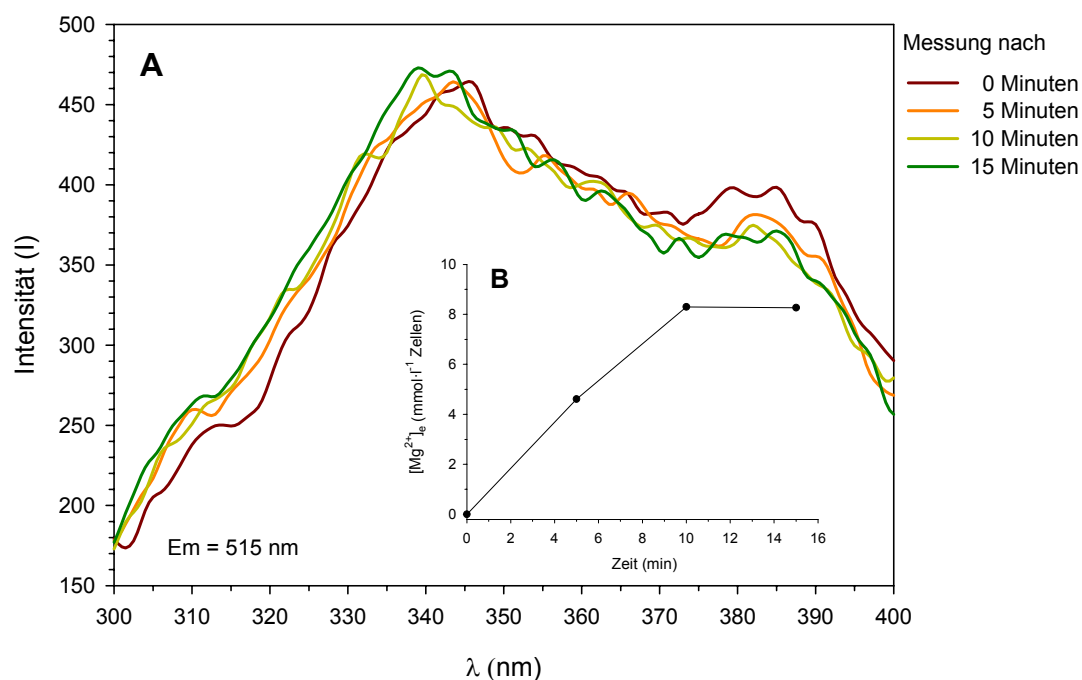


Abb. 27AB: Messung zum Na^+ -abhängigen Mg^{2+} -Transport bei PEZ ($[Na^+]_e = 145$ mmol/l)

Mg^{2+} -beladene PEZ (6 mmol/l) wurden in ein Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freies Medium mit einer $[Na^+]_e$ von 145 mmol/l verbracht und die $[Mg^{2+}]_e$ mittels Mag-fura-2 (5 μ mol/l) über einen Zeitraum von 15 Minuten bestimmt (**A** Originalfluoreszenzdaten, **B** Mg^{2+} -Abgabe aus den PEZ).

Die zu verschiedenen Zeitpunkten (5, 10 und 15 Minuten) bei den unterschiedlichen $[Na^+]_e$ ermittelten Messdaten sind in den Abbildungen 28 bis 30 zusammenfassend dargestellt. Die **Tabelle 9** zeigt die Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

Wurden Messmedien verwendet, in denen Na^+ komplett durch NMDG ersetzt worden war (0- Na^+ -Medien), kam es zu keinem Zeitpunkt zu einem wesentlichen Anstieg der $[Mg^{2+}]_e$. Im Unterschied dazu stieg die $[Mg^{2+}]_e$ in den Messmedien mit $[Na^+]_e$ von 2.5 bis 145 mmol/l innerhalb der ersten 5 Minuten auf bis zu 6.86 ± 1.79 mmol \cdot l⁻¹ Zellen an (**Abb. 28, Tab. 9**).

10 Minuten nach dem Beginn der Messung betrug die maximal ermittelte $[Mg^{2+}]_e$ bereits $8.35 \pm 0.13 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Zellen bei einer $[Na^+]_e$ von 145 mmol/l, wobei im 0- Na^+ -Medium ein Anstieg der $[Mg^{2+}]_e$ nicht festgestellt werden konnte (**Abb. 29, Tab. 9**).

15 Minuten nach Messbeginn war der Mg^{2+} -Efflux bei einem Großteil der Messungen gesättigt. Nur bei den niedrigen $[Na^+]_e$ (2.5, 5 und 10 mmol/l) waren auch nach 15 Minuten vereinzelt nichtlineare Anstiege der $[Mg^{2+}]_e$ im Messmedium zu beobachten. Die maximal gemessene $[Mg^{2+}]_e$ lag zu diesem Zeitpunkt bei $9.37 \pm 4.67 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Zellen (**Abb. 30, Tab. 9**).

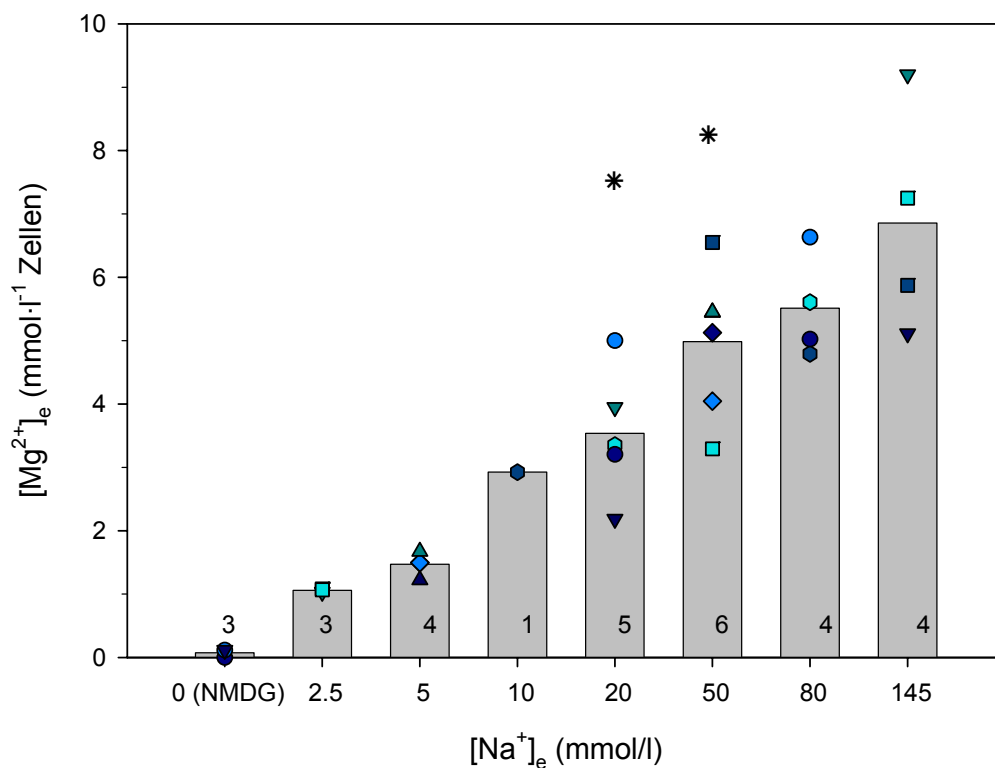


Abb. 28: Mg^{2+} -Abgabe bei PEZ nach 5 Minuten ($[Na^+]_e = 0$ bis 145 mmol/l)
Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl (n) der Messungen
(* $p < 0.05$ vs NMDG).

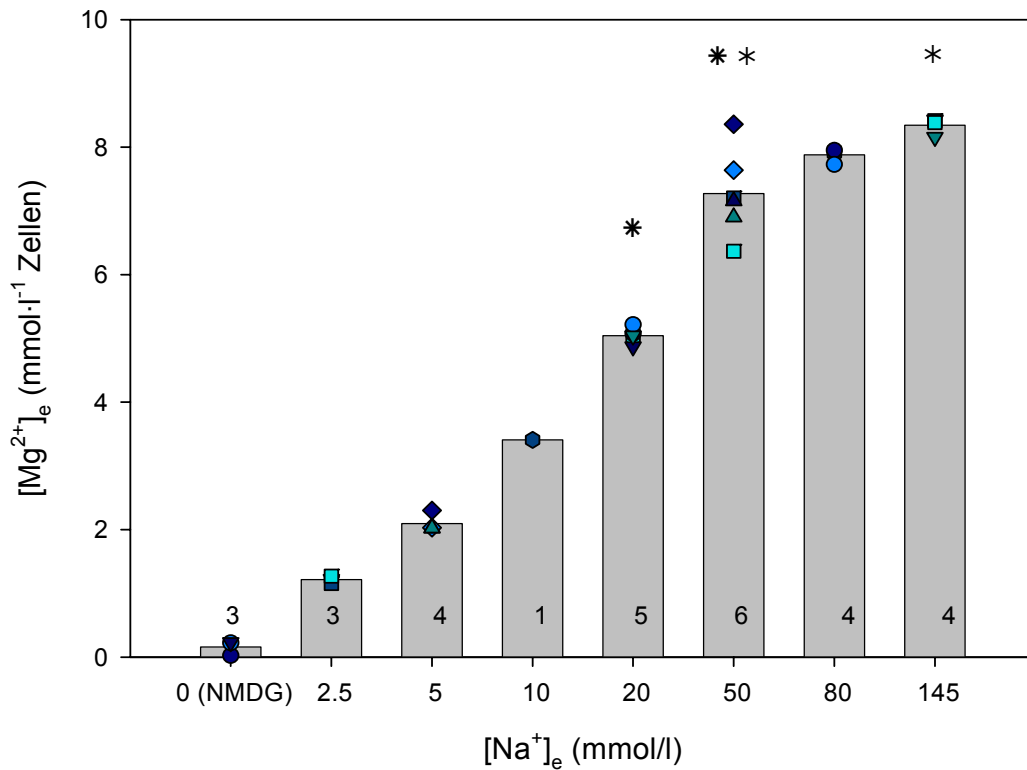


Abb. 29: Mg²⁺-Abgabe bei PEZ nach 10 Minuten ([Na⁺]_e = 0 bis 145 mmol/l)
Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl (n) der Messungen (*p<0.05 vs NMDG, * p<0.05 vs nächstniedrige [Na⁺]_e).

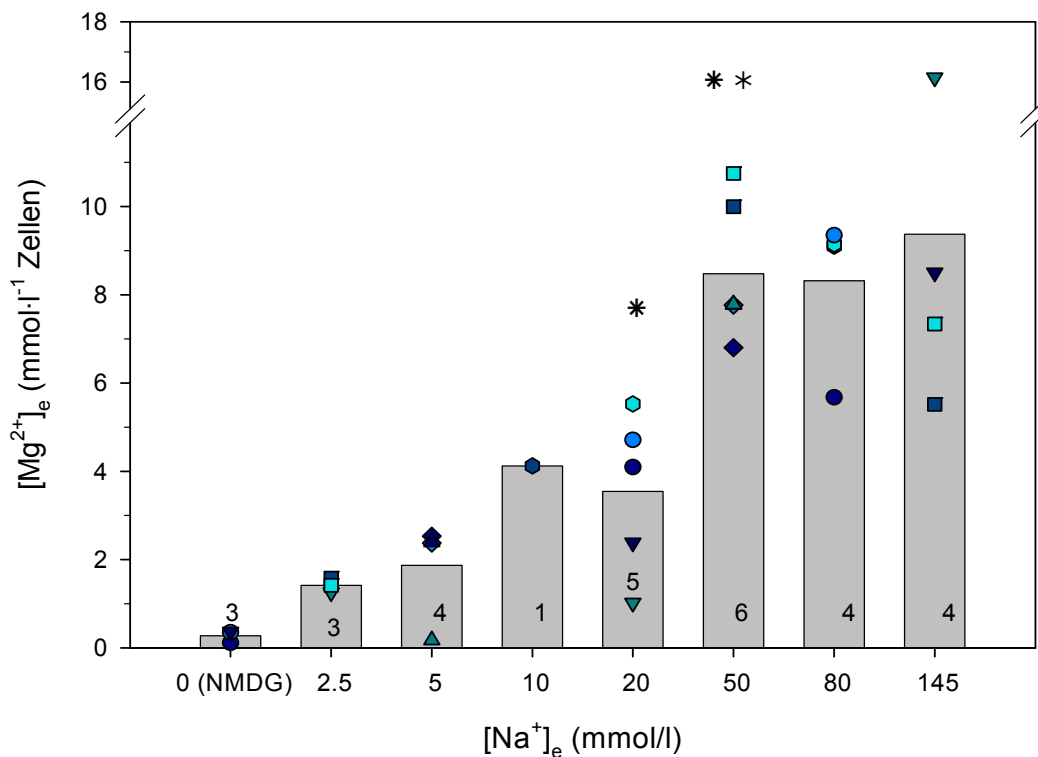


Abb. 30: Mg²⁺-Abgabe bei PEZ nach 15 Minuten ([Na⁺]_e = 0 bis 145 mmol/l)
Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl (n) der Messungen (*p<0.05 vs NMDG, * p<0.05 vs nächstniedrige [Na⁺]_e).

Tab. 9: Mg²⁺-Efflux nach 5, 10 und 15 Minuten ([Na⁺]_e = 0 bis 145 mmol/l)

[Na ⁺] _e (mmol/l)	0 (NMDG)	2.5	5	10	20	50	80	145
[Mg ²⁺] _e nach 5 Minuten (mmol·l ⁻¹ Zellen)	0.076 ± 0.066	1.061 ± 0.026	1.473 ± 0.186	2.925	3.537 † ± 1.036	4.985 † ± 1.153	5.512 ± 0.821	6.857 ± 1.794
[Mg ²⁺] _e nach 10 Minuten (mmol·l ⁻¹ Zellen)	0.159 ± 0.117	1.216 ± 0.058	2.095 ± 0.138	3.409	5.042 † ± 0.123	7.271 †‡ ± 0.678	7.88 ± 0.105	8.345 ‡ ± 0.127
[Mg ²⁺] _e nach 15 Minuten (mmol·l ⁻¹ Zellen)	0.275 ± 0.143	1.417 ± 0.163	1.869 ± 1.132	4.123	3.546 † ± 1.826	8.479 †‡ ± 1.532	8.317 ± 1.766	9.373 ± 4.673

Die Effluxwerte sind als Mittelwerte ± SD dargestellt.
(† p<0.05 vs NMDG, ‡ p<0.05 vs nächstniedrige [Na⁺]_e)

Zusammenfassung

Die **Abbildung 31** zeigt eine zusammenfassende Darstellung der ermittelten Daten. In den Messmedien, in denen Na⁺ komplett durch NMDG ersetzt wurde (0-Na⁺-Medien), war die Mg²⁺-Abgabe nahezu zu vernachlässigen, während sie bei einer physiologischen [Na⁺]_e von 145 mmol/l ein Maximum erreichte. Die dabei berechneten Messkurven zeigten in Verlauf und Form die Eigenschaften einer Sättigungskinetik (Einzeldaten **Abb. 20AB** bis **27AB**; **Abb. 31**).

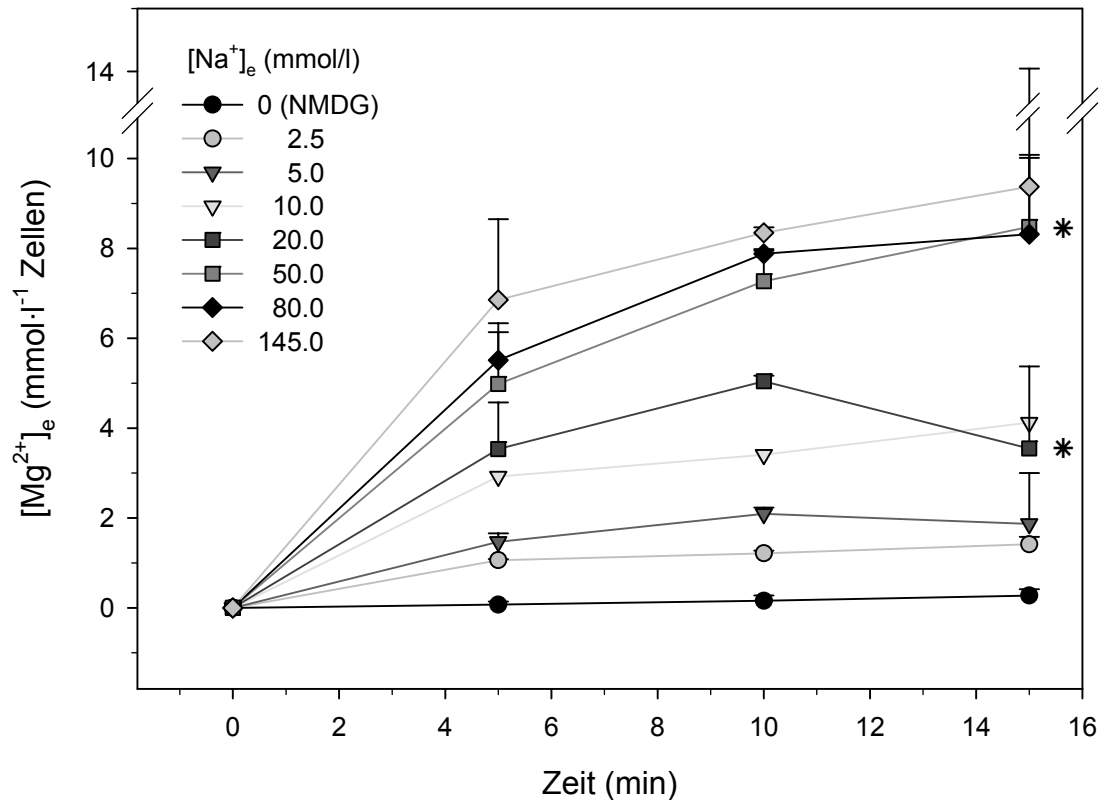


Abb. 31: Abhängigkeit der Mg^{2+} -Abgabe aus PEZ von der $[\text{Na}^+]_e$

Der Mg^{2+} -Abgabe wurde bei ansteigenden $[\text{Na}^+]_e$ (0, 2.5, 5, 10, 20, 50, 80 und 145 mmol/l) gemessen. Dazu wurde jeweils nach 0, 5, 10 und 15 Minuten die $[\text{Mg}^{2+}]_e$ in der Messsuspension bestimmt. Es wurden nur solche Messungen berücksichtigt, bei denen nach 15 Minuten eine Sättigung der Mg^{2+} -Abgabe eintrat. Die Erhöhung der $[\text{Na}^+]_e$ war mit einem Anstieg der $[\text{Mg}^{2+}]_e$ verbunden. So stieg die $[\text{Mg}^{2+}]_e$ bei einer $[\text{Na}^+]_e$ von 145 mmol/l nach 15 Minuten auf 9.37 ± 4.67 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Zellen im Vergleich zu 0.28 ± 0.14 ($[\text{Na}^+]_e = 0$ mmol/l), 1.42 ± 0.16 ($[\text{Na}^+]_e = 2.5$ mmol/l), 1.87 ± 1.13 ($[\text{Na}^+]_e = 5$ mmol/l), 4.12 ($[\text{Na}^+]_e = 10$ mmol/l), 3.55 ± 1.83 ($[\text{Na}^+]_e = 20$ mmol/l), 8.47 ± 1.53 ($[\text{Na}^+]_e = 50$ mmol/l) und 8.31 ± 1.77 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Zellen ($[\text{Na}^+]_e = 80$ mmol/l) an (* $p < 0.05$ vs NMDG).

Ermittlung der kinetischen Daten

Grundlage für die weiteren Berechnungen bildeten die nach 15 Minuten bestimmten Effluxdaten. Die Daten wurden auf Basis der Michaelis-Menten- bzw. Lineweaver-Burk-Gleichung (**Abb. 32**) einem kinetischen Modell angepasst („curve fitting“ mittels des Enzyme Kinetics Module, SPSS Inc., Chicago, IL, USA; **Abb. 33A**). Aus der auf der Grundlage des kinetischen Modells berechneten, spezifischen Kurve konnten die kinetischen Kenngrößen V_{\max} (maximale Transportgeschwindigkeit) und K_M (die $[Na^+]_e$, bei der die Transportgeschwindigkeit bei der Hälfte ihres Maximalwertes liegt) bestimmt werden (**Abb. 33AB**). Für den Na^+/Mg^{2+} -Austauscher bei PEZ ergab sich eine V_{\max} von $11.1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Zellen} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$ und eine K_M von 24 mmol/l .

$v_0 = \frac{V_{\max} [Na^+]_e}{K_M + [Na^+]_e}$	$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{K_M}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[Na^+]_e} + \frac{1}{V_{\max}}$
Michaelis-Menten	Lineweaver-Burk

Abb. 32: Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burk-Gleichung

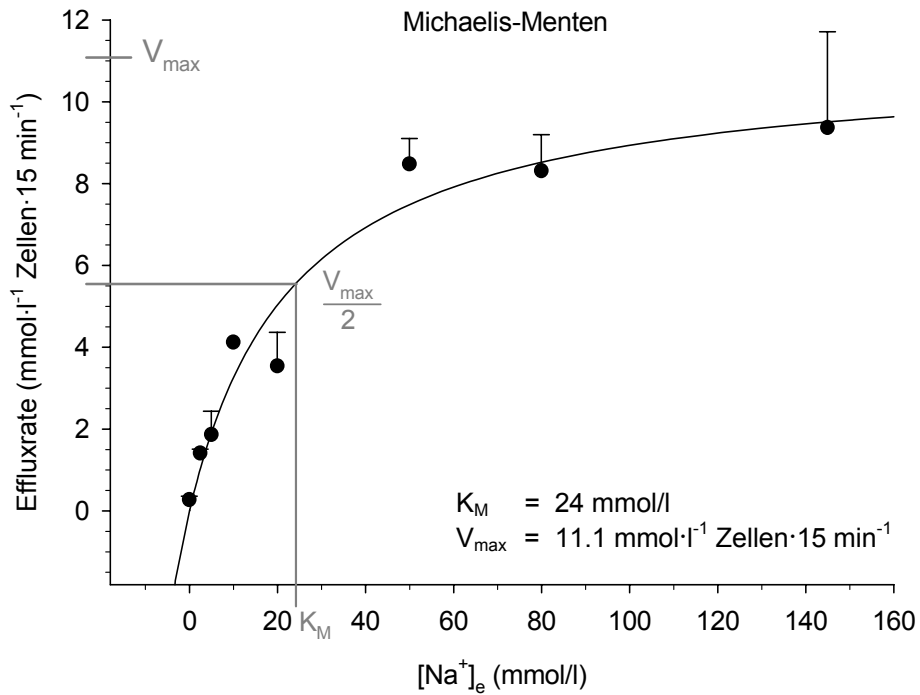
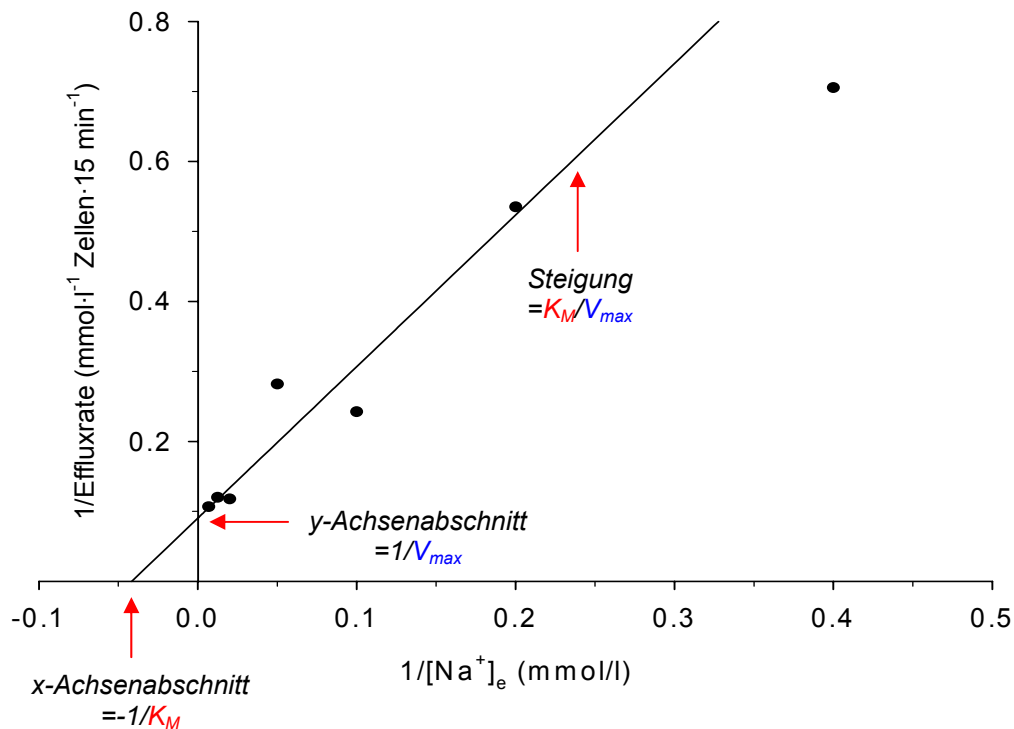
A**B**

Abb. 33AB: Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik des Na^+ -abhängigen Mg^{2+} -Effluxes nach 15 Minuten

Die Effluxrate wurde gegen die $[\text{Na}^+]_e$ im Messmedium aufgetragen. Diesen Daten wurde eine Kurve angepasst („curve fitting“, Enzyme Kinetics Module). Die K_M des Na^+ -abhängigen Mg^{2+} -Effluxes bei PEZ für Na^+ betrug 24 mmol/l. Die V_{\max} dieses Transportmechanismus wurde mit $11.1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Zellen}\cdot 15 \text{ min}^{-1}$ errechnet.

(A Michaelis-Menten-Diagramm, B Lineweaver-Burk-Diagramm)

4.3. Einfluss unspezifischer Blocker auf den Mg^{2+} -Efflux

Als Hemmstoffe des $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers bei PEZ wurden Imipramin, Amilorid und Quinidin in Betracht gezogen, da diese in verschiedenen Untersuchungen eingesetzt wurden, um den Transportmechanismus zu hemmen (**Kap. 2.5.1**).

Amilorid hemmt aber auch verschiedene Na^+ -abhängige Transportsysteme und weist zusätzlich hemmende Effekte auf die Na^+/K^+ -ATPase auf. Quinidin blockiert unter anderem auch K^+ -Kanäle und löst somit Veränderungen des Membranpotentials aus. Aufgrund dieser Nebenwirkungen wurden die eigenen Versuche nur mit Imipramin durchgeführt.

4.3.1. Unspezifische Hemmung des $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers durch Imipramin

In allen Versuchen wurde eine Imipraminkonzentration von 0.25 mmol/l verwendet. Diese Konzentration wurde in Vorversuchen ermittelt und entsprach der niedrigsten Imipraminkonzentration, bei der signifikante Hemmeffekte zu beobachten waren. Alle Messungen wurden mit einer $[\text{Na}^+]_e$ von 20 mmol/l durchgeführt. Damit lag die gewählte Konzentration im Bereich des für den $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher bei PEZ ermittelten K_M -Wertes von 24 mmol/l.

Die **Abbildung 34** zeigt, dass sich die Mg^{2+} -Effluxrate nach der Applikation von Imipramin signifikant verringerte. 10 Minuten nach Messbeginn betrug die $[\text{Mg}^{2+}]_e$ im Imipramin-haltigen Medium $2.58 \pm 1.04 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Zellen gegenüber einer $[\text{Mg}^{2+}]_e$ von $4.95 \pm 0.26 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Zellen im Kontrollmedium.

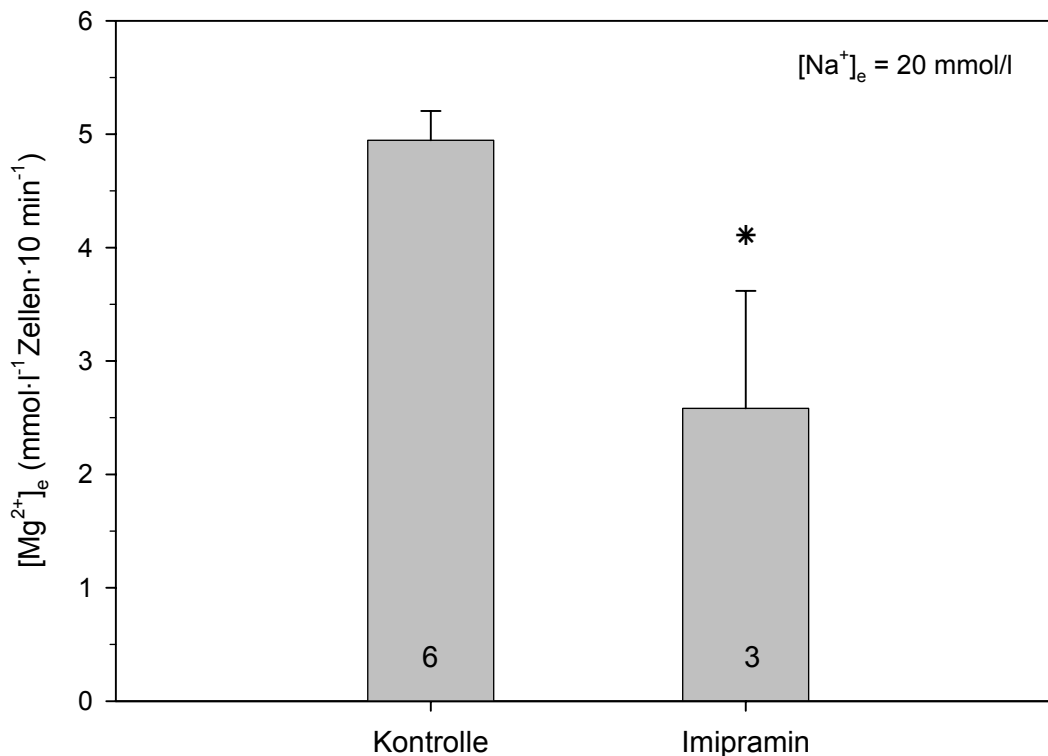


Abb. 34: Einfluss von Imipramin auf den Mg²⁺-Efflux

Nach der Gabe von Imipramin (0.25 mmol/l) in das Messmedium ([Na⁺]_e = 20 mmol/l) wurde 10 Minuten nach Messbeginn eine [Mg²⁺]_e von 2.58±1.04 mmol·l⁻¹ Zellen festgestellt. Die [Mg²⁺]_e war damit deutlich niedriger als in den Kontrollmessungen (4.95±0.26 mmol·l⁻¹ Zellen). Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl (n) der Messungen (* p<0.05 vs Kontrolle).

Bei einigen Zellen wurde trotz Imipramingabe keine oder nur eine geringe Erniedrigung der [Mg²⁺]_e beobachtet. Dies betraf vorwiegend Messungen mit Zellen, die in ihrem Differenzierungsgrad weit fortgeschritten waren. Diese Beobachtung und die Tatsache, dass bei einigen Messungen ein zweiter linearer Anstieg der Mg²⁺-Abgabe aus den PEZ beobachtet wurde (**Kap. 4.2.2; Abb. 19AB**), führten zu der Vermutung, dass die Mg²⁺-Abgabe bei diesen Zellen auch bzw. überwiegend durch einen Mg²⁺-Kanal erfolgt. Die Daten aus Messungen mit derart differenzierten Zellen wurden nicht berücksichtigt. Dennoch war zu klären, ob Kanäle auch an der Mg²⁺-Abgabe bei weniger differenzierten Zellen beteiligt sind. Um dies zu untersuchen, wurde der Mg²⁺-Kanalblocker Cobalt(III)hexamin (**Kap. 2.8.3.**) eingesetzt.

Die Untersuchung der Wirkung von Cobalt(III)hexamin auf PEZ sollte zur Klärung der bei den Imipraminmessungen festgestellten Unregelmäßigkeiten beitragen. Zusätzlich sollte

überprüft werden, ob der bei einigen Messungen als Normabweichung beurteilte Wiederanstieg der $[Mg^{2+}]_e$ nach der scheinbaren Sättigung der Mg^{2+} -Abgabe (**Abb. 19AB**) durch eine Zelllysis oder durch einen geregelten Transport (beispielsweise über Kanäle) verursacht wurde.

4.3.2. Hemmung von Cobalt(III)hexamin-abhängigen Mg^{2+} -Transportprozessen

In einzelnen Messungen konnte festgestellt werden, dass nach der Applikation von Cobalt(III)hexamin der bei Kontrollmessungen zu beobachtende Wiederanstieg der $[Mg^{2+}]_e$ ausblieb (**Abb. 35**).

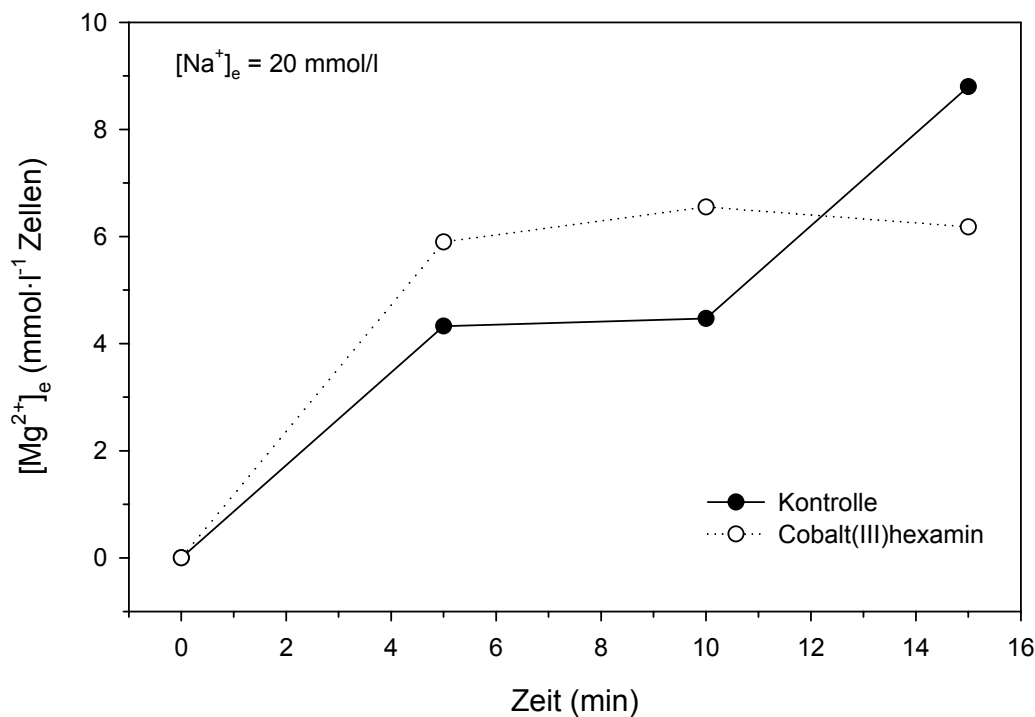


Abb. 35: Mg^{2+} -Abgabe nach Applikation von Cobalt(III)hexamin

Nach der Gabe von Cobalt(III)hexamin (0.5 mmol/l) in das Messmedium ($[Na^+]_e = 20$ mmol/l) wurde die $[Mg^{2+}]_e$ zum Messbeginn sowie nach 5, 10 und 15 Minuten bestimmt. Im Medium mit Cobalt(III)hexamin stieg die $[Mg^{2+}]_e$ in den ersten 5 Minuten auf einen Wert von 5.90 mmol·l⁻¹ Zellen an und blieb dann bei einem Wert von ~ 6.2 mmol·l⁻¹ Zellen stehen. Die Kontrolle hatte in den ersten 10 Minuten einen vergleichbaren Verlauf. Danach kam es zu einer weiteren Erhöhung der $[Mg^{2+}]_e$ von 4.47 mmol·l⁻¹ Zellen auf 8.80 mmol·l⁻¹ Zellen.

Bei der Mehrzahl der Versuche konnte dagegen nach der Cobalt(III)hexamingabe (0.5 mmol/l) keine Änderung der $[Mg^{2+}]_e$ gegenüber der Kontrolle ($4.95 \pm 0.26 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Zellen}$) festgestellt werden. 10 Minuten nach dem Messbeginn betrug die $[Mg^{2+}]_e$ $4.91 \pm 1.45 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Zellen}$ (**Abb. 36**).

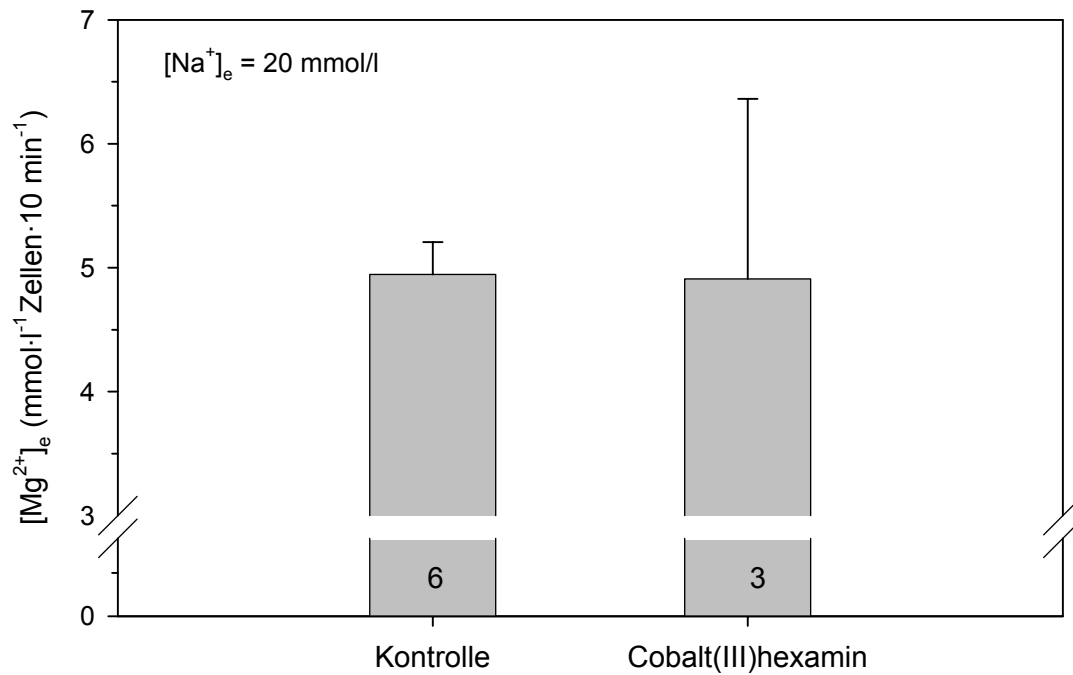


Abb. 36: Einfluss von Cobalt(III)hexamin auf den Mg^{2+} -Efflux

Nach der Gabe von Cobalt(III)hexamin (0.5 mmol/l) in das Messmedium ($[Na^+]_e = 20 \text{ mmol/l}$) wurde 10 Minuten nach Messbeginn eine $[Mg^{2+}]_e$ von $4.91 \pm 1.45 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Zellen}$ festgestellt. Die $[Mg^{2+}]_e$ im Messmedium war damit im Vergleich zur Kontrolle ($4.95 \pm 0.26 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Zellen}$) unverändert. Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl (n) der Messungen.

4.3.3. Auswirkung einer kombinierten Gabe von Imipramin und Cobalt(III)hexamin auf den $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher

Ein signifikanter, hemmender Einfluss von Cobalt(III)hexamin auf die Mg^{2+} -Abgabe konnte nur in Einzelmessungen nachgewiesen werden.

Daraus entwickelte sich jedoch die Frage nach der Wirkung einer kombinierten Gabe von Imipramin und Cobalt(III)hexamin. Ein additiver Effekt würde bedeuten, dass die Mg^{2+} -Abgabe unter den gewählten experimentellen Bedingungen ($[\text{Mg}^{2+}]_i \gg [\text{Mg}^{2+}]_e$) über den $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher und einen Mg^{2+} -Kanal erfolgt.

Die Ergebnisse dieser Versuchsserie sind in **Abbildung 37** zusammenfassend dargestellt. Bei kombinierter Gabe von Imipramin und Cobalt(III)hexamin verringerte sich der Mg^{2+} -Efflux von $4.95 \pm 0.26 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{Zellen} \cdot 10 \text{ min}^{-1}$ (Kontrolle) auf $2.35 \pm 0.24 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{Zellen} \cdot 10 \text{ min}^{-1}$. In der Tendenz war damit der Mg^{2+} -Efflux geringer als nach der alleinigen Gabe von Imipramin ($2.58 \pm 1.04 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{Zellen} \cdot 10 \text{ min}^{-1}$). Demzufolge erscheint eine additive Wirkung von Imipramin und Cobalt(III)hexamin möglich.

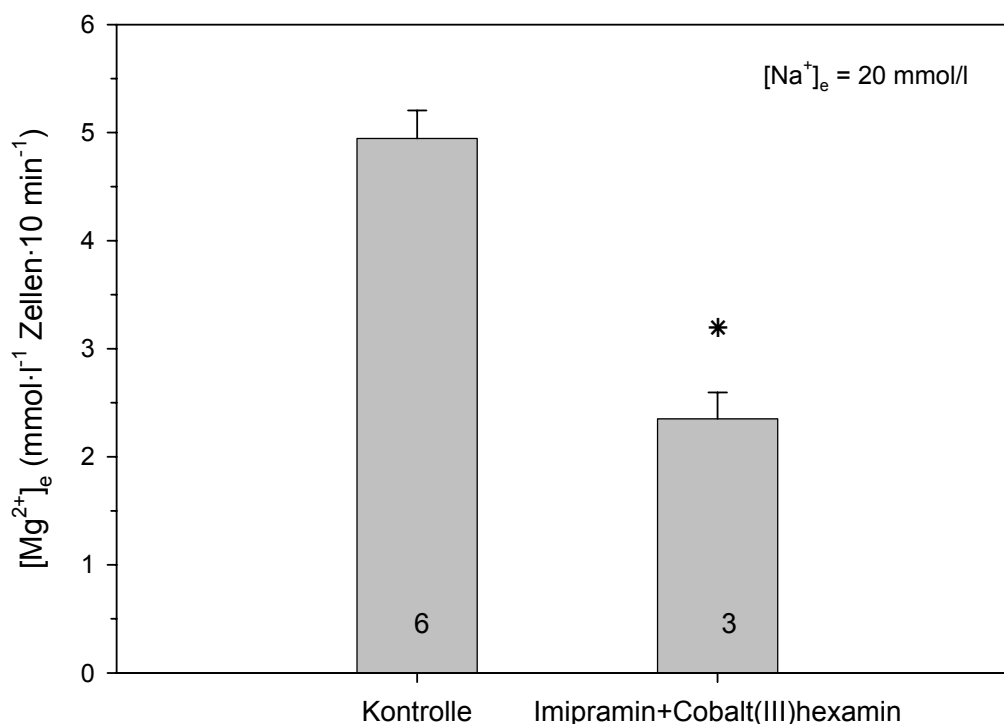


Abb. 37: Effekt der kombinierten Gabe von Imipramin und Cobalt(III)hexamin auf die Mg^{2+} -Abgabe

Nach der Applikation von Imipramin (0.25 mmol/l) und Cobalt(III)hexamin (0.5 mmol/l) wurde nach 10 Minuten im Messmedium ($[\text{Na}^+]_e = 20 \text{ mmol/l}$) eine $[\text{Mg}^{2+}]_e$ von $2.35 \pm 0.24 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{Zellen}$ gemessen. Die $[\text{Mg}^{2+}]_e$ war im Vergleich zur Kontrolle ($4.95 \pm 0.26 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{Zellen}$) um $52.46 \pm 4.91\%$ erniedrigt. Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl (n) der Messungen (* $p < 0.05$ vs Kontrolle).

4.3.4. Zusammenfassung der Blockerversuche

Die **Abbildung 38** zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse. Im Vergleich zur Kontrolle war der Mg^{2+} -Efflux nach Imipramingabe um $47.82 \pm 20.97\%$ und nach der kombinierten Gabe von Imipramin und Cobalt(III)hexamin um $52.46 \pm 4.91\%$ erniedrigt (**Abb. 73**).

Bei der Einzelapplikation von Cobalt(III)hexamin konnte ein hemmender Effekt lediglich in Einzelmessungen nachgewiesen werden. Dabei war die Mg^{2+} -Abgabe um 29.88% gemindert.

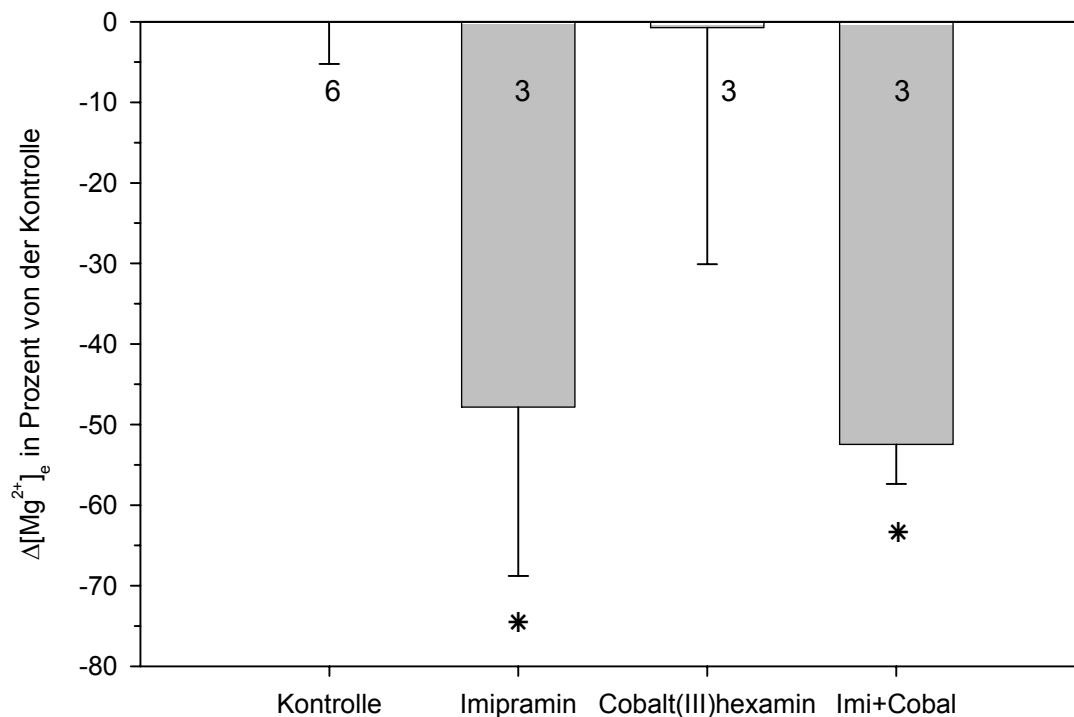


Abb. 38: Hemmung des Na^+ -abhängigen Mg^{2+} -Effluxes

Die Mg^{2+} -Abgabe wurde bei einer $[Na^+]_e$ von 20 mmol/l bestimmt. Die $[Mg^{2+}]_e$ wurde nach 10 Minuten gemessen. Die $[Mg^{2+}]_e$ in der Kontroll suspension betrug 4.95 ± 0.26 mmol·l⁻¹ Zellen nach 10 Minuten. Nach Imipramingabe (0.25 mmol/l) verringerte sich der Efflux um $47.82 \pm 20.97\%$. Die Gabe von Cobalt(III)hexamin (0.5 mmol/l) führte im Mittel nicht zu einer Erniedrigung der $[Mg^{2+}]_e$. Es wurde eine Erniedrigung um $0.73 \pm 29.37\%$ nach 10 Minuten festgestellt. Die Gabe von Imipramin und Cobalt(III)hexamin führte zu einer Verminderung des Mg^{2+} -Effluxes um $52.46 \pm 4.91\%$ im Vergleich zur Kontrolle. Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl (n) der Messungen (* $p < 0.05$ vs Kontrolle).

4.4. Regulation der Mg^{2+} -Abgabe

Um zu untersuchen, wie der Mg^{2+} -Efflux aktiviert und reguliert wird, wurden Änderungen der $[Mg^{2+}]_e$ nach Gaben von zyklischem Dibutyryl-Adenosinmonophosphat (db-cAMP), einem cAMP-Analog mit erhöhter Membranpermeabilität, und Prostaglandin E_2 (PGE_2) gemessen. Analog zu den vorangegangenen Versuchen wies das Messmedium eine $[Na^+]_e$ von 20 mmol/l auf (vgl. Kap. 4.3.1).

4.4.1. Effekt von db-cAMP auf die Mg^{2+} -Abgabe

Nach Verabreichung von db-cAMP (0.1 mmol/l) wurde eine Stimulation der Mg^{2+} -Abgabe von 4.95 ± 0.26 mmol \cdot l $^{-1}$ Zellen auf 7.66 ± 0.97 mmol \cdot l $^{-1}$ Zellen nach 10 Minuten festgestellt (Abb. 39). Dies entsprach einer Steigerung um $54.76 \pm 19.67\%$.

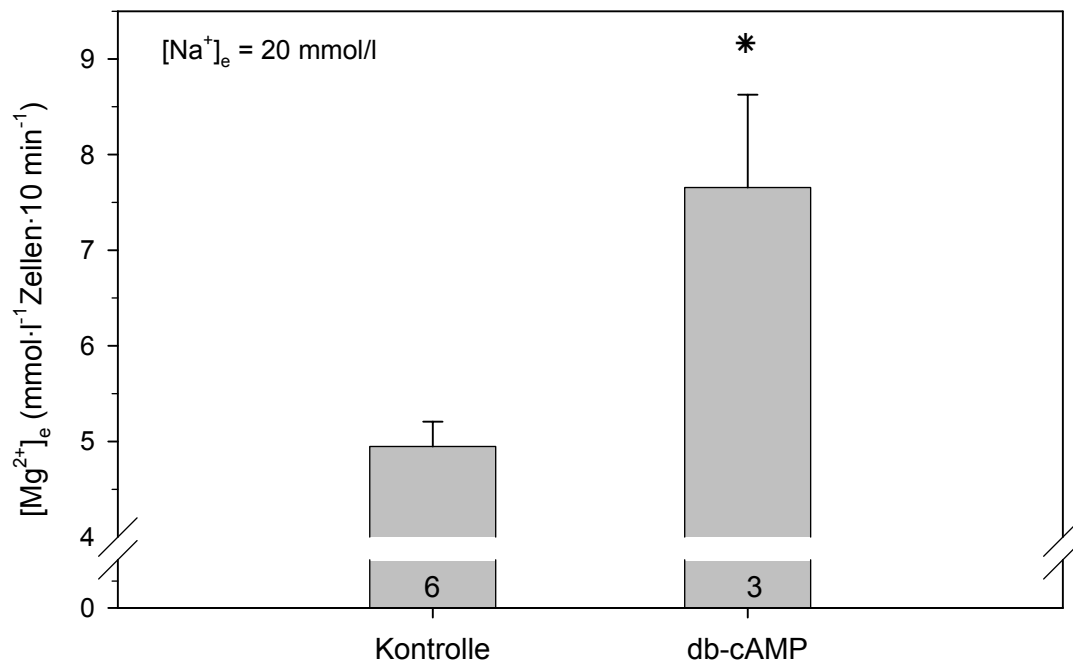


Abb. 39: Einfluss von db-cAMP auf den Mg^{2+} -Efflux

Nach Zugabe von db-cAMP (0.1 mmol/l) in das Messmedium ($[Na^+]_e = 20$ mmol/l) wurde 10 Minuten nach Messbeginn eine $[Mg^{2+}]_e$ von 7.66 ± 0.97 mmol \cdot l $^{-1}$ Zellen beobachtet. Die $[Mg^{2+}]_e$ im Messmedium war damit im Vergleich zur Kontrolle (4.95 ± 0.26 mmol \cdot l $^{-1}$ Zellen) deutlich erhöht. Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl (n) der Messungen (* $p < 0.05$ vs Kontrolle).

Um zu klären, welche Mg^{2+} -Effluxmechanismen durch db-cAMP aktiviert bzw. stimuliert werden, erfolgten Messungen, in denen das Na^+ im Messmedium durch NMDG ersetzt wurde. Nach der Applikation von db-cAMP in das NMDG-Medium konnte kein stimulierender Effekt auf die Mg^{2+} -Abgabe beobachtet werden (**Abb. 40AB**).

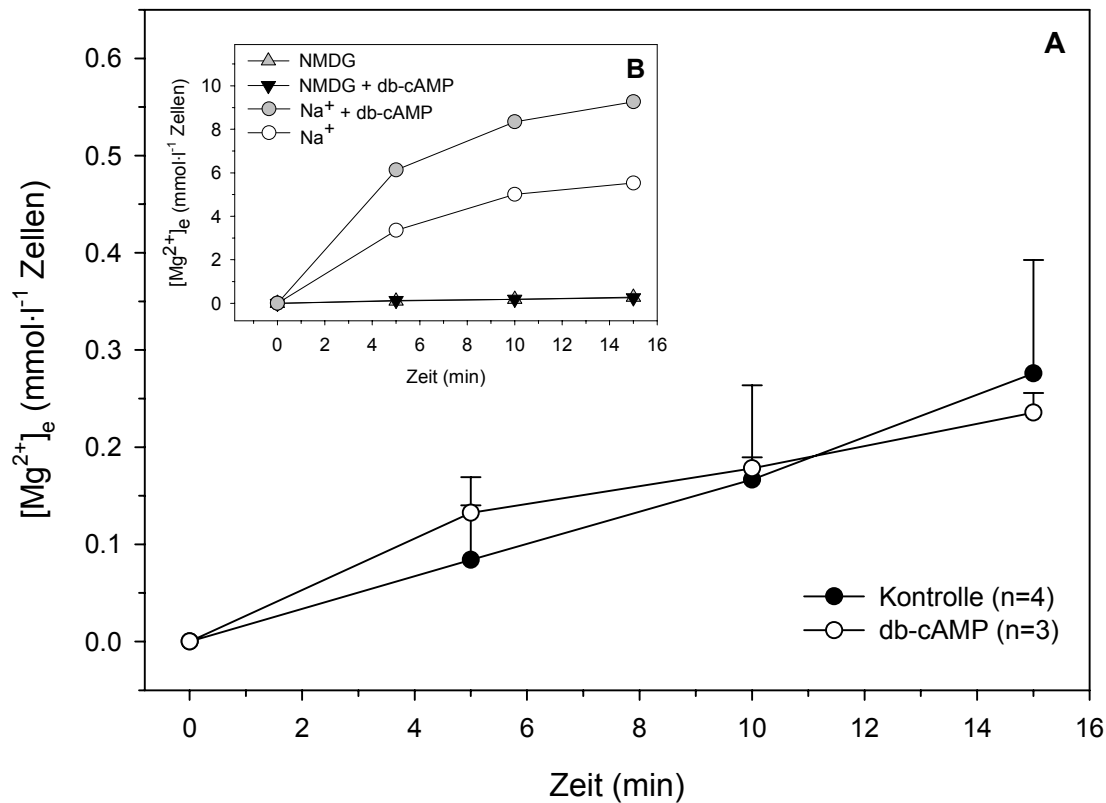


Abb. 40AB: Einfluss des Na^+ -Entzugs auf die db-cAMP-stimulierte Mg^{2+} -Abgabe

Nach Zugabe von db-cAMP (0.1 mmol/l) in das Messmedium ($[Na^+]_e = 0$ mmol/l) wurde die $[Mg^{2+}]_e$ nach 5, 10 und 15 Minuten bestimmt. Im NMDG-Medium konnte kein stimulierender Effekt von db-cAMP auf die Mg^{2+} -Abgabe festgestellt werden.

Die $[Mg^{2+}]_e$ im db-cAMP-Medium betragen 0.13 ± 0.04 , 0.18 ± 0.01 bzw. 0.24 ± 0.02 mmol·l⁻¹ Zellen, die $[Mg^{2+}]_e$ im Kontrollmedium 0.08 ± 0.06 , 0.17 ± 0.10 bzw. 0.28 ± 0.12 mmol·l⁻¹ Zellen (**A**). Zur besseren Übersicht sind zusätzlich Einzelmessungen dieser Versuchsserie und von db-cAMP-Messungen im Na^+ -Medium ($[Na^+]_e = 20$ mmol/l) dargestellt (**B**).

4.4.2. Stimulation mittels PGE₂

Auch die Applikation von PGE₂ (0.1 µmol/l) in die Zellsuspension führte zur Erhöhung der Mg²⁺-Abgabe. Die [Mg²⁺]_e in der Messsuspension betrug nach 10 Minuten 5.76±0.43 mmol·l⁻¹Zellen (Abb. 41).

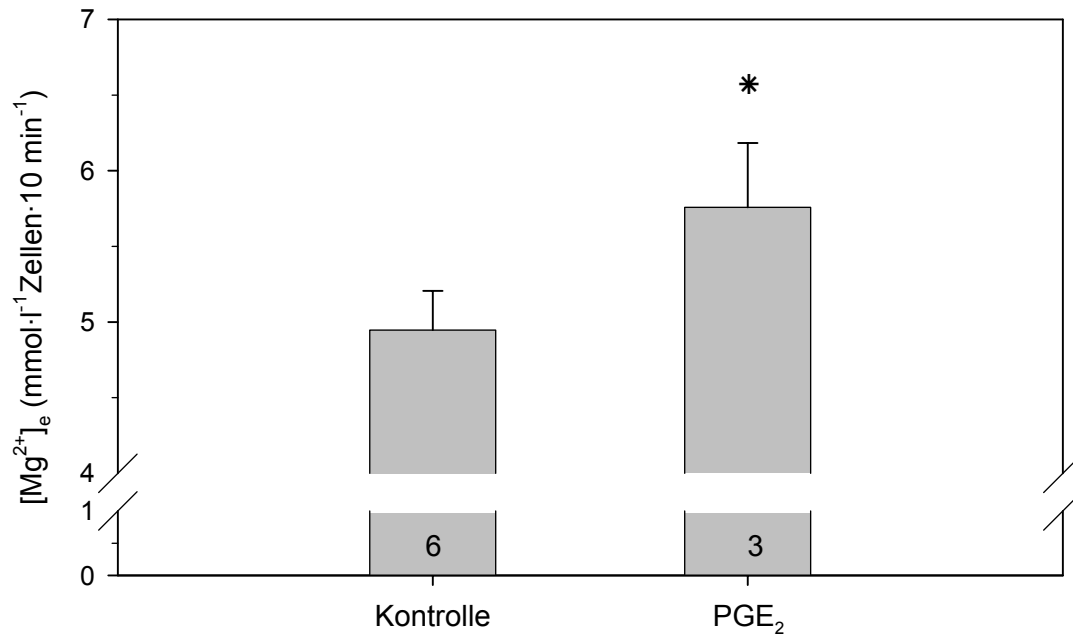


Abb. 41: Einfluss von PGE₂ auf den Mg²⁺-Efflux

Nach Zugabe von PGE₂ (0.1 µmol/l) in das Messmedium ([Na⁺]_e = 20 mmol/l) wurde 10 Minuten nach Messbeginn eine [Mg²⁺]_e von 5.76±0.43 mmol·l⁻¹Zellen festgestellt. Die [Mg²⁺]_e im Messmedium war im Vergleich zur Kontrolle (4.95±0.26 mmol·l⁻¹Zellen) um 16.39±8.59% erhöht. Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl (n) der Messungen (*p<0.05 vs Kontrolle).

4.4.3. Zusammenfassung der Ergebnisse zur hormonellen Stimulation

Die Zugabe von db-cAMP und PGE₂ führte in beiden Fällen zu einer Erhöhung der Mg²⁺-Abgabe gegenüber den Kontrollmessungen (**Abb. 42**). Die Mg²⁺-Abgabe war nach der Applikation von db-cAMP deutlich höher (Steigerung um 54.76±19.67%) als nach der Applikation von PGE₂ (Steigerung um 16.39±8.59%).

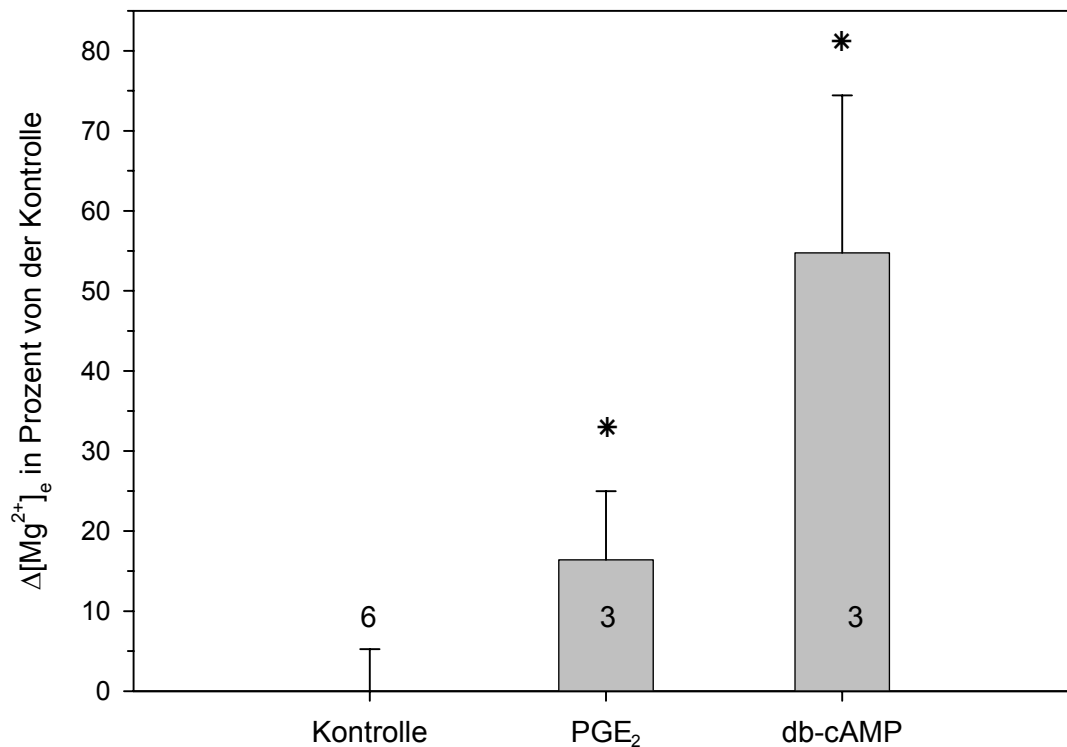


Abb. 42: Stimulation des Na⁺-abhängigen Mg²⁺-Effluxes durch db-cAMP und PGE₂. Der Mg²⁺-Efflux wurde bei einer [Na⁺]_e von 20 mmol/l bestimmt. Die [Mg²⁺]_e wurde nach 10 Minuten gemessen. Die [Mg²⁺]_e in der Kontrollsuspension betrug 4.95±0.26 mmol/l nach 10 Minuten. Nach PGE₂-Gabe (0.1 μmol/l) erhöhte sich die Effluxrate um 16.39±8.59%. Nach Stimulation durch db-cAMP wurde eine Erhöhung der Mg²⁺-Abgabe ins Messmedium um 54.76±19.67% nach 10 Minuten festgestellt. Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl (n) der Messungen (* p<0.05 vs Kontrolle).

4.5. Vergleichende Untersuchung an PEZ aus einer Zelllinie und aus der Primärkultur

Für die extrazellulären Messungen wurden weitaus größere Zellzahlen benötigt als bei intrazellulären Messungen. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit von PEZ aus der Primärkultivierung wurde in Betracht gezogen, Untersuchungen auch mit Zellen aus einer Pansenepithelzelllinie durchzuführen.

Vor dem Einsatz dieser Zellen musste jedoch überprüft werden, ob sich die transportphysiologischen Eigenschaften der Zelllinien-PEZ im Rahmen der Entdifferenzierung im Vergleich zu den verhornenden Primärkulturzellen verändert hatten.

Die Überprüfung fand speziell im Hinblick auf den Mg^{2+} -Transport statt. Dazu wurde bei primären PEZ und Zellen aus der Zelllinie Änderungen der $[Mg^{2+}]_i$, der $[Na^+]_i$ und des pH_i -wertes bestimmt, nachdem durch die Umkehr des physiologischen Na^+ -Gradienten ($[Na^+]_i > [Na^+]_e$) ein Na^+ -abhängiger Mg^{2+} -Influx induziert worden war.

4.5.1. Die intrazelluläre Mg^{2+} - und Na^+ -Konzentration sowie der pH_i bei Primärzellen und PEZ aus einer Zelllinie

Die vergleichenden Messungen wurden an unbeladenen Zellen durchgeführt. Bei der ersten Messreihe war im Suspensionsmedium, d.h. extrazellulär, kein Mg^{2+} vorhanden.

Über einen Zeitraum von 10 Minuten wurden entweder die intrazelluläre $[Mg^{2+}]$ ($[Mg^{2+}]_i$) in Kombination mit dem intrazellulären pH-Wert (pH_i) oder die intrazelluläre $[Na^+]$ ($[Na^+]_i$) in Kombination mit dem intrazellulären pH (pH_i SBF1) kontinuierlich gemessen.

Bei den Primärzellen waren nach 10 Minuten keine wesentlichen Änderungen der Messgrößen im Vergleich zu den Ausgangswerten zu beobachten. Die $[Mg^{2+}]_i$ lag im Mittel bei 0.6 mmol/l und die $[Na^+]_i$ erhöhte sich leicht von 21.63 auf 22.73 mmol/l. Der bei den Messungen ermittelte pH_i blieb konstant bei etwa 6.54 bzw. fiel leicht von 6.36 auf 6.26 (**Abb. 43**).

Die Zellen der Pansenepithel-Zelllinie PES zeigten bei Messungen, die unter denselben Bedingungen durchgeführt wurden, keine wesentlichen Veränderungen der $[Mg^{2+}]_i$ und $[Na^+]_i$ im Messverlauf. Bei den parallel durchgeführten Messungen des pH-Wertes wurde jedoch ein Anstieg des pH-Wertes von 6.27 auf 6.37 (pH) bzw. von 6.78 auf 6.93 (pH_i SBF1) festgestellt (**Abb. 44**).

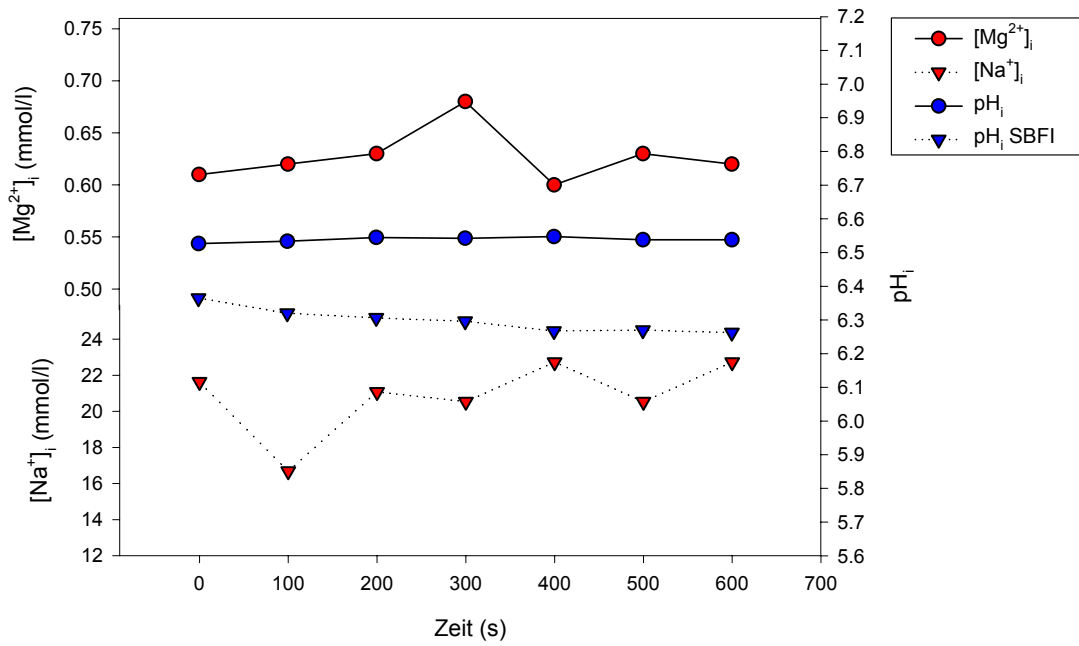


Abb. 43: $[Mg^{2+}]_i$, $[Na^+]_i$ und der pH_i -Wert von primären PEZ in einem Na^+ - und Mg^{2+} -freien Medium

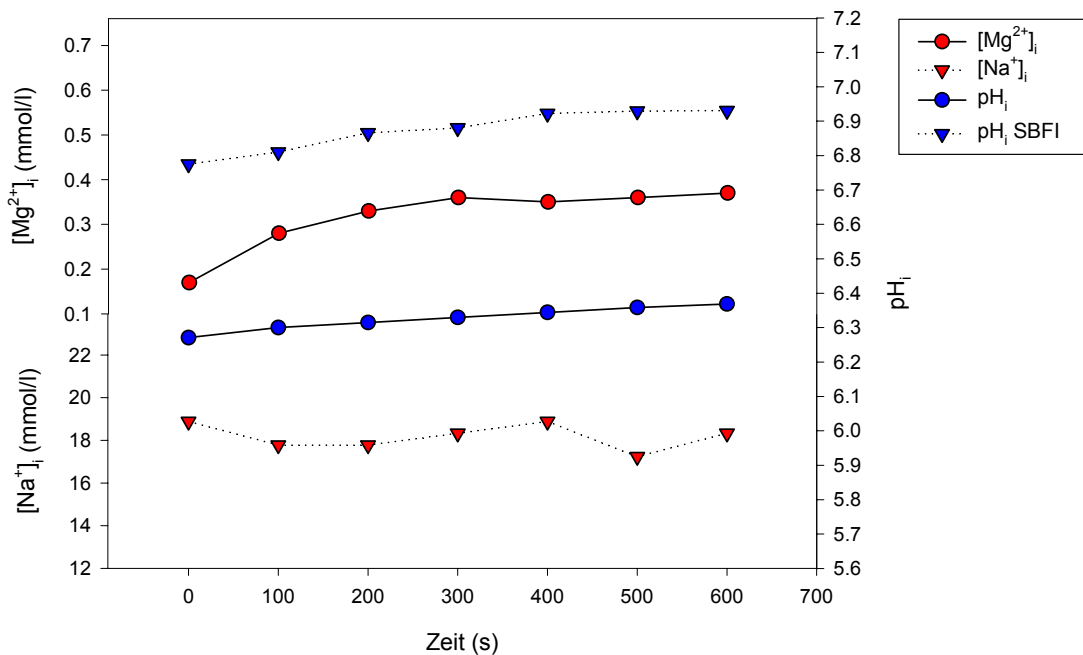


Abb. 44: $[Mg^{2+}]_i$, $[Na^+]_i$ und pH_i -Werte von PEZ der Zelllinie PES in einem Na^+ - und Mg^{2+} -freien Medium

Die Messungen wurden ohne Mg^{2+} in der Zellsuspension durchgeführt. Die $[Mg^{2+}]_i$ stieg nach 10 Minuten von 0.17 auf 0.37 mmol/l. Die kombinierte Messung des pH ergab einen pH -Anstieg von 6.27 auf 6.37. Die $[Na^+]_i$ verringerte sich von 18.88 auf 18.33 mmol/l. Der bei dieser Messung parallel festgestellte pH -Wert (pH_i SBFi) erhöhte sich von 6.78 auf 6.93.

Bei einer weiteren Messreihe wurden dem Zellsuspensionsmedium 5 mmol/l Mg^{2+} beigefügt, um den Mg^{2+} -Transport zu stimulieren. Auch hier wurden die Messungen an unbeladenen Zellen durchgeführt und entweder die intrazelluläre $[Mg^{2+}]_i$ ($[Mg^{2+}]_i$) in Kombination mit dem pH-Wert (pH) oder die intrazelluläre $[Na^+]_i$ ($[Na^+]_i$) in Kombination mit dem pH (pH_i SBF1) kontinuierlich über einen Zeitraum von 10 Minuten gemessen.

Bei den Primärzellen waren nach 10 Minuten deutliche Änderungen der $[Mg^{2+}]_i$ und der $[Na^+]_i$ festzustellen. Der Verlauf beider Kurven wies ähnlich den bei den extrazellulären Messungen zum Na^+ -abhängigen Mg^{2+} -Transport gemachten Beobachtungen (**Kap. 4.2.1**) Eigenschaften einer Sättigungskinetik auf. Die $[Mg^{2+}]_i$ stieg deutlich von 0.52 auf 0.90 mmol/l. Dabei nahm die $[Na^+]_i$ entsprechend einem spiegelverkehrten Verlauf zur $[Mg^{2+}]_i$ von 18.33 auf 10.00 mmol/l ab. Der pH_i veränderte sich im Messverlauf nur geringfügig (**Abb. 45**).

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen war die initiale $[Mg^{2+}]_i$ bei den Zellen der Zelllinie (0.28 mmol/l) deutlich niedriger als bei Primärzellen (0.52 mmol/l). Die $[Mg^{2+}]_i$ stieg bei den Zellen der Zelllinie im Verlauf der Messung linear an. Dabei war der Anstieg stärker ausgeprägt ($\Delta[Mg^{2+}]_i=0.42$ mmol/l) als bei den Primärzellen ($\Delta[Mg^{2+}]_i=0.38$ mmol/l). Wie bei den Primärzellen verringerte sich die $[Na^+]_i$ parallel zur Erhöhung der $[Mg^{2+}]_i$, wobei die Abnahme der $[Na^+]_i$ vergleichsweise niedrig ausfiel (Verringerung der $[Na^+]_i$ von 21.63 auf 17.23 mmol/l). Der pH_i stieg auch bei den Messungen im Mg^{2+} -haltigen Medium konstant an (**Abb. 46**).

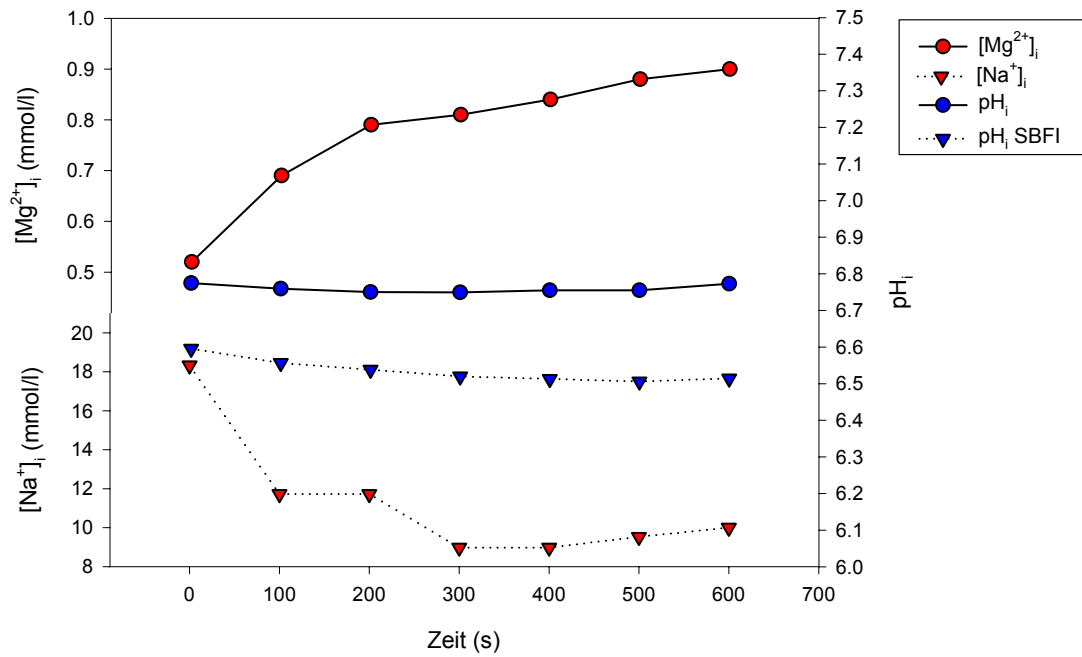


Abb. 45: $[Mg^{2+}]_i$, $[Na^+]_i$ und pH_i -Werte bei primär kultivierten PEZ in einem Na^+ -freien, Mg^{2+} -haltigen Medium

Die Messungen wurden mit 5 mmol/l Mg^{2+} in der Zellsuspension durchgeführt. Die $[Mg^{2+}]_i$ stieg nach 10 Minuten von 0.52 auf 0.90 mmol/l. Parallel dazu verringerte sich die $[Na^+]_i$ deutlich von 18.33 auf 10.00 mmol/l.

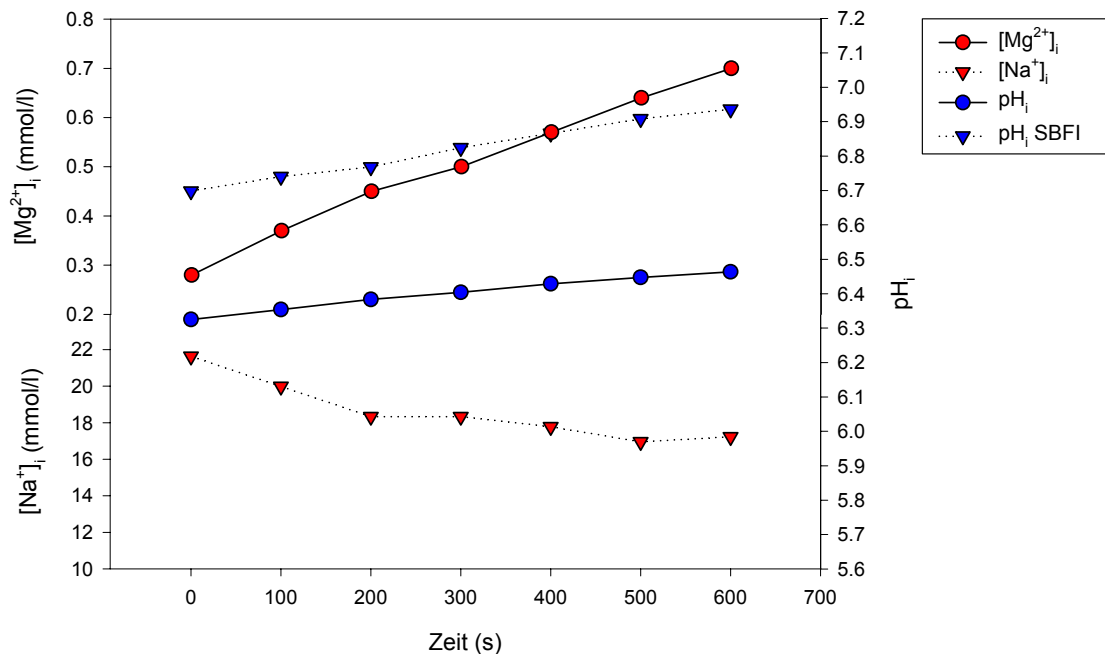


Abb. 46: Messung von $[Mg^{2+}]_i$, $[Na^+]_i$ und des pH -Wertes bei PEZ der Zelllinie PES mit 5 mmol/l Mg^{2+} in der Suspension

Die Messungen wurden mit 5 mmol/l Mg^{2+} in der Zellsuspension durchgeführt. Die $[Mg^{2+}]_i$ stieg nach 10 Minuten von 0.28 auf 0.70 mmol/l. Während der parallel geführten Bestimmung des pH -Wertes wurde eine Erhöhung des pH -Wertes von 6.33 auf 6.46 festgestellt. Die $[Na^+]_i$ verringerte sich von 21.63 auf 17.23 mmol/l. Der in Kombination zu dieser Messung bestimmte pH -Wert (pH_i SBF1) erhöhte sich von 6.70 auf einen Wert von 6.93.