

## 5. Diskussion

### 5.1. Methodenkritik

Zur Charakterisierung des  $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers wurden *in vitro*-Versuche an kultivierten, durch Isolation aus Pansengewebe gewonnenen, Pansenepithelzellen (PEZ) durchgeführt. Um sicherzustellen, dass die im Versuch eingesetzten Zellen hinsichtlich ihrer Transporteigenschaften weitgehend den nativen Zellen entsprachen, wurden ausschließlich PEZ aus Primärkulturen verwendet. Der Zeitraum zwischen der Isolierung der PEZ und ihrem Einsatz im Experiment wurde kurz gehalten, um eine Veränderung der zellulären Eigenschaften, z.B. durch Anpassung der Zellen an das Kulturmedium oder durch Entdifferenzierungsprozesse, auszuschließen.

Ungeachtet dessen wurden die für den  $\text{Mg}^{2+}$ -Transport interessanten transportphysiologischen Eigenschaften auch bei PEZ aus einer Zelllinie geprüft und mit denen der primärkultivierten PEZ verglichen.

Im Rahmen der durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen wurden die transportkinetischen Daten des  $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers, über den der überwiegende Teil der  $\text{Mg}^{2+}$ -Abgabe aus den PEZ erfolgte, bestimmt. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen können aber nicht ohne einige Überlegungen auf die *in vivo*-Situation übertragen werden.

Die adhärennten Zellen mussten zur Messung in eine Suspension überführt werden. Dies führt zum Verlust der polaren Eigenschaften der Zelle und zur Verteilung der unterschiedlichen Transportsysteme, die unter *in vivo*-Bedingungen funktionsabhängig entweder apikal oder basolateral lokalisiert sind, über die gesamte Zellmembran. Somit war es im Rahmen der eigenen Untersuchungen nicht möglich, aus den Messergebnissen Rückschlüsse über die funktionsbedingte Lokalisation der am  $\text{Mg}^{2+}$ -Efflux beteiligten Transportsysteme zu treffen.

Eine Abweichung von den physiologischen Bedingungen stellt auch die Beladung der Zellen mit  $\text{Mg}^{2+}$  dar. Die freie intrazelluläre  $[\text{Mg}^{2+}]_i$  ist ein wichtiger Regulator des  $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers (GÜNTHER et al., 1984). Bei einigen Zellsystemen ist ein Anstieg der  $[\text{Mg}^{2+}]_i$  über den physiologischen Wert (0.5 bis 1 mmol/l) essentiell für eine Aktivierung des Austauschers (FLATMAN und SMITH, 1996). Generell weisen daher mit  $\text{Mg}^{2+}$  beladene Zellen

(zwischen 5 und 12 mmol/l) eine höhere Transportrate auf (GÜNTHER und VORMANN, 1987; 1989; HANDY et al., 1996; ZHANG und MELVIN, 1995) als Zellen, die nicht mit  $Mg^{2+}$  vorbeladen wurden (FLATMAN und SMITH, 1990; HANDY et al., 1996).

Der  $Na^+/Mg^{2+}$ -Austauscher von PEZ ist bereits bei der für diese Zellen normalen intrazellulären  $[Mg^{2+}]_i$  (0.5 und 1.3 mmol/l bei einer  $[Mg^{2+}]_e$  von 0.8-1.2 mmol/l ) aktiv (SCHWEIGEL et al., 1999). Dennoch wurden die PEZ für die eigenen Versuche mit  $Mg^{2+}$  (6 mmol/l) beladen, um eine maximale Aktivierung des  $Na^+/Mg^{2+}$ -Austauschers zu induzieren und für alle Experimente die gleiche Ausgangssituation zu schaffen.

Durch die Beladung mit  $Mg^{2+}$  können aber auch andere  $Mg^{2+}$ -Tranportsysteme beeinflusst werden. NADLER et al. (2001) zeigten, dass der  $Mg^{2+}$ -Transport über spezifische Kanäle (TRP7) gehemmt wurde, wenn die  $[Mg^{2+}]_i$  über einen bestimmten Wert anstieg.

Die Beladung der Zellen ermöglicht also die maximale Aktivierung bzw. Hemmung verschiedener Transportsysteme zum selben Zeitpunkt, erschwert aber gleichzeitig die Übertragung der ermittelten kinetischen Daten auf die *in vivo*-Situation.

Als kritisch stellt sich auch der Einfluss von verhornten Zellen (Keratinocyten) auf die extrazellulär gemessenen Fluoreszenzintensitäten dar. Bei Kontrollmessungen mit einem relativ hohen Anteil verhornter Zellen in der Suspension wurde das Fluoreszenzsignal, insbesondere bei einer Wellenlänge von 380 nm, scheinbar „verschluckt“. Da nicht jede Messsuspension vollständig frei von verhornten Zellen war, bestand die Möglichkeit, dass bei einem größeren Anteil verhornter Zellen in der Suspension die Bestimmung der Transportdaten beeinflusst wurde.

Dennoch war die fluoreszenzspektrometrische Bestimmung der Fluxraten aufgrund der hohen Ionenspezifität der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und der Möglichkeit zur unmittelbaren Erfassung von Änderungen der Ionenkonzentrationen die ideale Messmethode.

## 5.2. Funktionelle Untersuchung des $Na^+/Mg^{2+}$ -Austauschers

Erste Hinweise auf die Existenz des  $Na^+/Mg^{2+}$ -Austauschers am Pansenepithel ergaben sich aus Untersuchungen am isolierten Epithel, bei denen nach Verringerung der serosalen  $[Na^+]$  eine Reduzierung des von mukosal nach serosal gerichteten  $Mg^{2+}$ -Fluxes ( $J_{ms}^{Mg^{2+}}$ ) festgestellt wurde (LEONHARD-MAREK und MARTENS, 1994) und aus Studien an kultivierten PEZ, bei

denen nach der Umkehr des physiologischen  $\text{Na}^+$ -Gradienten (intrazelluläre  $[\text{Na}^+] >$  extrazelluläre  $[\text{Na}^+]$ ) eine  $\text{Na}^+$ -abhängige  $\text{Mg}^{2+}$ -Aufnahme beobachtet werden konnte.

### 5.2.1. Abhängigkeit des $\text{Mg}^{2+}$ -Effluxes von der $[\text{Na}^+]_e$

In Analogie zu anderen Zellsystemen (CEFARATTI et al., 1998; FERAY und GARAY, 1986; FLATMAN und SMITH, 1996; GÜNTHER und VORMANN, 1985; LÜDI und SCHATZMANN, 1987; WOLF et al., 1994a) konnte auch bei PEZ ein  $\text{Na}^+$ -abhängiger  $\text{Mg}^{2+}$ -Efflux beobachtet werden, wenn ein physiologischer  $\text{Na}^+$ -Gradient ( $[\text{Na}^+]_e=145$  mmol/l,  $[\text{Na}^+]_i=19$  mmol/l; SCHWEIGEL et al., 1999) existiert. Die eigenen Untersuchungen zeigten eindeutig, dass  $\text{Mg}^{2+}$  aus den PEZ transportiert wird, sobald im extrazellulären Medium  $\text{Na}^+$  vorhanden ist. Die Intensität der  $\text{Mg}^{2+}$ -Abgabe in das extrazelluläre Medium war von der  $[\text{Na}^+]_e$  abhängig, wobei sich nach etwa 15 Minuten ein Transportgleichgewicht einstellte. Ab diesem Zeitpunkt konnten in der Regel keine Änderungen der  $[\text{Mg}^{2+}]_e$  mehr festgestellt werden.

Die Berechnung der transportkinetischen Daten wurden auf Grundlage des Michaelis-Menten-Modells durchgeführt. Aus den Effluxdaten wurden für den  $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher ruminaler Epithelzellen eine maximale Transportkapazität ( $V_{\max}$ ) von  $11.1$  mmol·l<sup>-1</sup> Zellen·15 min<sup>-1</sup>  $\text{Mg}^{2+}$  und ein  $K_M$ -Wert für das extrazelluläre  $\text{Na}^+$  von 24 mmol/l errechnet.

Der  $K_M$ -Wert für extrazelluläres Natrium lag damit in einem Bereich (um 20 mmol/l), der auch für andere Zellen ermittelt wurde (CEFARATTI et al., 1998; 2000a; GÜNTHER, 1996; GÜNTHER und VORMANN, 1985; MAGUIRE et al., 1984; TASHIRO und KONISHI, 1997). Da der  $K_M$ -Wert deutlich unter der physiologischen extrazellulären  $[\text{Na}^+]$  von 145 mmol/l (Serum) liegt, kann davon ausgegangen werden, dass der Austauscher in der Lage ist, auch bei sehr stark erniedrigten  $[\text{Na}^+]_e$  eine Netto- $\text{Mg}^{2+}$ -Abgabe zu gewährleisten. Damit wird sichergestellt, dass PEZ, die als  $\text{Mg}^{2+}$ -transportierende Zellen auch über stark ausgeprägte Influx-Mechanismen verfügen (SCHWEIGEL et al., 1999; 2000), ihre  $[\text{Mg}^{2+}]_i$  in dem für die Zellfunktion optimalen Bereich halten können.

Die maximale bei den Messungen ermittelte Effluxrate lag bei  $9.37 \pm 4.67$  mmol·l<sup>-1</sup> Zellen·15 min<sup>-1</sup>. Eine vergleichbar hohe Effluxrate ( $9.45 \pm 0.38$  mmol·l<sup>-1</sup> Zellen·30 min<sup>-1</sup>) wurde allein bei hoch  $\text{Mg}^{2+}$ -beladenen (12 mmol/l) Rattenerthrozyten ermittelt (GÜNTHER und VORMANN, 1989), wobei die Messung über einen Zeitraum von 30 Minuten

erfolgte. Wie **Tabelle 10** zeigt, waren die bei allen anderen Zellsystemen gemessenen  $Mg^{2+}$ -Effluxraten weitaus geringer.

**Tab. 10:** Kinetische Daten des  $Na^+/Mg^{2+}$ -Austauschers bei verschiedenen Zellsystemen

Zelltyp	$Mg^{2+}$ -Effluxrate	$K_M [Na^+]_e$ (mmol/l)	$K_M [Mg^{2+}]_i$ (mmol/l)	Beladung m. $Mg^{2+}$ (mmol/l)	Literatur
Erythrozyten (Mensch)	35-370 *	$20.5 \pm 1.9$	$2.6 \pm 1.4$	nein	(FERAY und GARAY, 1986)
Erythrozyten (Mensch)	200 *	16-17	1.3		(LÜDI und SCHATZMANN, 1987)
Erythrozyten (Mensch)	$0.49 \pm 0.05$ **	16-17	1.3	12	(GÜNTHER und VORMANN, 1989)
Erythrozyten (Frettchen)	$41 \pm 2$ *	22	-	nein	(FLATMAN und SMITH, 1990)
Erythrozyten (Ratte)	150-1200 *	$11 \pm 3$	-	nein	(FERAY und GARAY, 1987)
Erythrozyten (Ratte)	$9.45 \pm 0.38$ **	-	-	12	(GÜNTHER und VORMANN, 1989)
Erythrozyten (Huhn)	$1.8 \pm 0.07$ **	25	1.1	12	(GÜNTHER und VORMANN, 1985; 1987; 1989)
Azinuszellen der Glandula sublingualis (Ratte)	$86.7 \pm 17.9$ ***	-	-	5	(ZHANG und MELVIN, 1995)
Glatte Muskelzelle (Meerschweinchen)	$0.16 \pm 0.01$ ****	30	-		(TASHIRO und KONISHI, 1997)

\*  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  Zellen $\cdot\text{h}^{-1}$

\*\*  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Zellen $\cdot 30 \text{ min}^{-1}$

\*\*\*  $\mu\text{mol}/\text{min}$

\*\*\*\*  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$

Wegen der methodischen Unterschiede (verschiedene Beladungskonzentrationen und unterschiedliche Messdauer) und wegen der Tatsache, dass sehr unterschiedliche Zellsysteme untersucht wurden, ist der Vergleich der kinetischen Daten schwierig.

Die eigenen Untersuchungen zeigen aber, dass PEZ, die zu den wenigen Zellsystemen gehören, bei denen ohne eine künstliche  $Mg^{2+}$ -Verarmung eine  $Mg^{2+}$ -Aufnahme in beträchtlichem Umfang (37.5 bis 41.9  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) nachgewiesen werden konnte (SCHWEIGEL et al., 1999; SCHWEIGEL und MARTENS, 2003; SCHWEIGEL et al., 2000), über einen effektiven  $Mg^{2+}$ -Effluxmechanismus verfügen. Dieser gewährleistet, dass die  $[Mg^{2+}]_i$  trotz des erheblichen  $Mg^{2+}$ -Influges im Rahmen des transzellulären  $Mg^{2+}$ -Transportes konstant bei Werten von 0.5 bis 1.3 mmol/l gehalten wird.

Die bei PEZ gemessene, überdurchschnittlich hohe Effluxrate unterstreicht zudem die Bedeutung des Pansens beim Schaf als Hauptresorptionsort für  $Mg^{2+}$  (FIELD und MUNRO, 1977; MARTENS et al., 1976; TOMAS und POTTER, 1976).

### 5.2.2. Hemmung der durch $Na^+$ bestimmten Komponente des Austauschers

Neben dem  $Na^+/Mg^{2+}$ -Austauscher existieren in der Zellmembran der PEZ auch andere Transportsysteme, die einen  $Mg^{2+}$ -Efflux vermitteln könnten. So ist in Abhängigkeit von dem bestehenden elektrochemischen Gradienten die Abgabe von  $Mg^{2+}$  über einen  $Mg^{2+}$ -Kanal (SCHWEIGEL et al., 1999) denkbar. Weiterhin wurde ein Anionen-abhängiges Transportsystem nachgewiesen, bei dem  $Mg^{2+}$  zusammen mit Chlorid ( $Cl^-$ ) in die Zellen aufgenommen wird (SCHWEIGEL und MARTENS, 2003). Bei anderen Zellen wird durch einen  $Mg^{2+}$ - $Cl^-$ -Kotransport die  $Mg^{2+}$ -Abgabe vermittelt (BIJVELDS et al., 1996). Es erschien daher wichtig, den Anteil der  $Na^+$ -abhängigen Komponente der  $Mg^{2+}$ -Abgabe aus ruminalen Epithelzellen zu quantifizieren. Zu diesem Zweck wurden Versuche durchgeführt, bei denen das  $Na^+$  im Messmedium komplett ersetzt worden war. In weiteren Experimenten wurde der  $Na^+$ -Kanalblocker Imipramin eingesetzt, von dem bekannt ist, dass er den  $Na^+/Mg^{2+}$ -Austauscher inhibiert (FERAY und GARAY, 1988).

### Hemmung des Austauschers durch $Na^+$ -Entzug

Nachdem das  $Na^+$  im Messmedium vollständig durch NMDG (N-Methyl-D-Glukamin) ersetzt worden war, kam es zu einer signifikanten Reduktion der  $Mg^{2+}$ -Abgabe. Bei normaler  $[Na^+]_e$  wurde eine Effluxrate von  $9.37 \pm 4.67 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Zellen} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$  gemessen. Demgegenüber wurde  $Mg^{2+}$  unter  $Na^+$ -freien Bedingungen lediglich mit einer Restaktivität von  $0.27 \pm 0.14 \text{ mmol } Mg^{2+} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Zellen} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$  aus den Zellen abgegeben. Dies entspricht einer Verminderung des  $Mg^{2+}$ -Efflux um 97%. Selbst bei extrem niedrigen  $[Na^+]_e$  von 2.5 mmol/l war die  $Mg^{2+}$ -Abgabe noch signifikant höher als im  $Na^+$ -freien Medium.

Damit ergibt sich, dass der weitaus größte Teil des gesamten  $Mg^{2+}$ -Effluxes über den  $Na^+/Mg^{2+}$ -Austauscher vermittelt wird. Lediglich  $2.9 \pm 1.5\%$  werden über  $Na^+$  unabhängige Mechanismen (**Kap. 5.2.3**) oder einen unspezifischen Leak über die Zellmembran abgegeben. Der  $Na^+/Mg^{2+}$ -Austauscher ist also bei PEZ der Haupteffluxmechanismus für  $Mg^{2+}$ .

### Hemmung des Austauschers durch Imipramin

Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass der  $Mg^{2+}$ -Efflux durch Imipramin (250  $\mu\text{mol/l}$ ) gehemmt wird. Dabei war die Transportrate im Vergleich zur Kontrolle um  $47.82 \pm 20.97\%$  reduziert. Dies bestätigt die bei einer Vielzahl anderer Zellsysteme sowie bei PEZ gemachten Beobachtungen.

In verschiedenen Untersuchungen konnte bei Erythrozyten verschiedener Tierarten (FERAY und GARAY, 1988; FLATMAN und SMITH, 1990), bei Leberzellen (CEFARATTI et al., 2000; GÜNTHER und HOLLRIEGL, 1993), Herzmuskelzellen (HANDY et al., 1996) sowie Tumorzellen (KUBOTA et al., 2003; WOLF et al., 1994a) mit Imipraminkonzentrationen zwischen 10 und 500  $\mu\text{mol/l}$  eine Hemmung des  $Mg^{2+}$ -Transportes um 33 bis 85% induziert werden. Die Hemmung des  $Na^+/Mg^{2+}$ -Austauschers war dabei trotz der relativ hohen Imipraminkonzentrationen in keinem der Fälle vollständig.

Ein Grund dafür könnte sein, dass eine spezifische Blockade von Imipramin bisher nur bei  $Na^+$ -Kanälen festgestellt werden konnte. Dabei bindet Imipramin sowohl mit einer hohen Affinität an inaktivierte  $Na^+$ -Kanäle, so dass es zu einer Stabilisierung des Inaktivitätszustandes kommt, als auch an native, offene  $Na^+$ -Kanäle, die dadurch direkt blockiert werden (YANG und KUO, 2002). Übertragen auf den  $Na^+/Mg^{2+}$ -Austauscher bedeutet dies, dass nur der  $Na^+$ -abhängige Teil des Austauschers oder andere  $Na^+$ -abhängige Transportsysteme, die den Austauscher indirekt beeinflussen, durch Imipramin gehemmt werden können. Der durch  $Mg^{2+}$  bestimmte Teil des Austauschers wird möglicherweise nicht blockiert, wodurch  $Mg^{2+}$  immer noch in einem gewissen Umfang transportiert werden kann. So ist die Hemmung von Imipramin auf den Austauscher weder spezifisch noch vollständig.

Auch bei PEZ, bei denen durch Umkehr des  $Na^+$ -Gradienten eine  $Mg^{2+}$ -Aufnahme induziert worden war, erfolgte die Hemmung des  $Na^+/Mg^{2+}$ -Austauschers nach der Applikation von 100 bzw. 500  $\mu\text{mol/l}$  Imipramin nur unvollständig (SCHWEIGEL, 2001; SCHWEIGEL et al., 2000). Die  $Mg^{2+}$ -Aufnahme wurde dabei in einer Größenordnung gehemmt (25.45 bzw. 49.90 %), die mit den Resultaten der eigenen Messungen gut übereinstimmte.

### 5.2.3. Besonderheiten bei weit differenzierten Zellen

Unerwarteter Weise war bei einigen Messungen nach der Imipraminapplikation kein Hemmeffekt auf den  $Mg^{2+}$ -Efflux zu beobachten. Zudem wurde im Rahmen der Versuche zur Abhängigkeit des  $Mg^{2+}$ -Efflux von der  $[Na^+]_e$  bei einigen Messungen nach dem Erreichen der Transportsättigung ein linearer Wiederanstieg der  $[Mg^{2+}]_e$  beobachtet, der offensichtlich nicht auf einer Zerstörung der Zellmembran beruhte.

Diese abweichenden Befunde, die insbesondere in Messungen auftraten, bei denen Zellen mit relativ weit fortgeschrittenem Differenzierungsgrad verwendet wurden, ließen vermuten, dass der  $Mg^{2+}$ -Efflux aus PEZ auch über andere Transportmechanismen, vorzugsweise Kanäle, erfolgen kann. Dieser Hypothese wurde in weiteren Versuchsserien nachgegangen.

### 5.2.4. Beteiligung von $Mg^{2+}$ -Kanälen am $Mg^{2+}$ -Efflux

Um zu prüfen, ob Kanalproteine, wie die kürzlich beschriebenen TRPM6- und TRPM7- $Mg^{2+}$ -Kanäle (NADLER et al., 2001; SCHLINGMANN et al., 2002) eine Rolle für den  $Mg^{2+}$ -Efflux spielen, wurden Versuche durchgeführt, bei denen der spezifische  $Mg^{2+}$ -Kanalblocker Cobalt(III)hexamin (KUCHARSKI et al., 2000) zum Einsatz kam.

#### Hemmung des $Mg^{2+}$ -Effluxes durch Cobalt(III)hexamin

Die Applikation von Cobalt(III)hexamin (0.5 mmol/l) hatte innerhalb der ersten 10 Minuten einer Messung in der Regel keinen Einfluss auf den  $Mg^{2+}$ -Efflux bei PEZ. Auch der Imipramineffekt konnte durch eine zusätzliche Gabe von Cobalt(III)hexamin nicht signifikant verstärkt werden. Einzelversuche mit Zellsuspensionen, die einen überproportionalen Anteil höher differenzierter Zellen (granulierte Zellen, Keratinozyten) aufwiesen und die über einen längeren Zeitraum durchgeführt wurden, zeigten dagegen, dass der nach dem Sättigungseintritt zu beobachtende zweite lineare Anstieg des  $Mg^{2+}$ -Effluxes (s.o.) nach der Applikation von Cobalt(III)hexamin in einer Konzentration von 0.5 mmol/l vollständig unterbunden war.

### **CorA-Mg<sup>2+</sup>-Transporterfamilie**

Cobalt(III)hexamin-sensitive Kanäle wurden bisher in der Plasmamembran von Prokaryonten (KEHRES und MAGUIRE, 2002; SMITH et al., 1993) und Pilzen (MACDIARMID und GARDNER, 1998) sowie in der Mitochondrienmembran von Hefen (BUI et al., 1999; KOLISEK et al., 2003) und Säugern (SCHWEYEN, 2000) gefunden. Da alle diese Kanäle spezifisch durch Cobalt(III)hexamin gehemmt werden (KUCHARSKI et al., 2000), sind sie definitionsgemäß der sogenannten CorA (cobalt resistance)-Mg<sup>2+</sup>-Transporterfamilie zugeordnet. KUCHARSKI et al. (2000) sowie MAGUIRE (2001) nahmen an, dass Cobalt(III)hexamin, das dem hydratisierten Mg<sup>2+</sup>-Ion in Geometrie und Größe ähnelt, die extrazelluläre Mg<sup>2+</sup>-Bindungsstelle aufgrund seiner höheren Affinität, blockiert und somit den Kanal kompetitiv inaktiviert.

### **TRP-Mg<sup>2+</sup>-Kanäle**

Erst vor kurzem konnten auch in der Plasmamembran von Säugetierzellen Mg<sup>2+</sup>-transportierende Kanäle (TRPM6 und TRPM7) nachgewiesen werden. Es ist nicht bekannt, ob Cobalt(III)hexamin diese Kanäle inhibiert und ob bzw. inwieweit sie sich von den Transportern der CorA-Familie unterscheiden. Es besteht daher die Möglichkeit, dass zur TRP (transient receptor protein)-Kationenkanalfamilie gehörende Kanäle unter bestimmten Bedingungen am Mg<sup>2+</sup> Efflux aus PEZ beteiligt sind, obwohl sie unter physiologischen Bedingungen eher einen Mg<sup>2+</sup> Influx vermitteln.

Bei Pansenepithelzellen (SCHWEIGEL, persönliche Mitteilung) sowie am Fischdarm (BIJVELDS et al., 2001) hemmte Cobalt(III)hexamin die elektrodiffusive, Kanal-vermittelte Mg<sup>2+</sup>-Aufnahme. Dabei war auffällig, dass wie bei anderen nicht bakteriellen Mg<sup>2+</sup>-Kanälen (KOLISEK et al., 2003) relativ hohe Inhibitor-Konzentrationen (bis 1 mmol/l) benötigt wurden, um signifikante Effekte zu erreichen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die entsprechenden Kanäle eher der TRP- als der CorA-Familie zugehörig sind.

TRPM7 und andere Kanäle dieser Gruppe werden u.a. durch die [Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> reguliert, wobei hohe zytosolische [Mg<sup>2+</sup>] hemmend wirken (NADLER et al., 2001). Da die Zellen in den eigenen Versuchen mit Mg<sup>2+</sup> (6 mmol/l) beladen wurden, könnte die Beladung trotz des starken auswärts gerichteten Mg<sup>2+</sup>-Gradienten zunächst zu einer Blockade der Kanäle führen. Im Rahmen der Na<sup>+</sup>-abhängigen Mg<sup>2+</sup>-Abgabe sinkt die [Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> jedoch wieder auf ein physiologisches Niveau ab, wobei die Geschwindigkeit dieses Prozesses von der [Na<sup>+</sup>]<sub>e</sub>



bestimmt wird. Möglicherweise werden Kanäle nach Unterschreitung einer Schwellenkonzentration aktiviert und es kommt zu dem beobachteten linearen Anstieg der  $Mg^{2+}$ -Abgabe.

### 5.2.5. Modell zum $Mg^{2+}$ -Transport über das Epithel

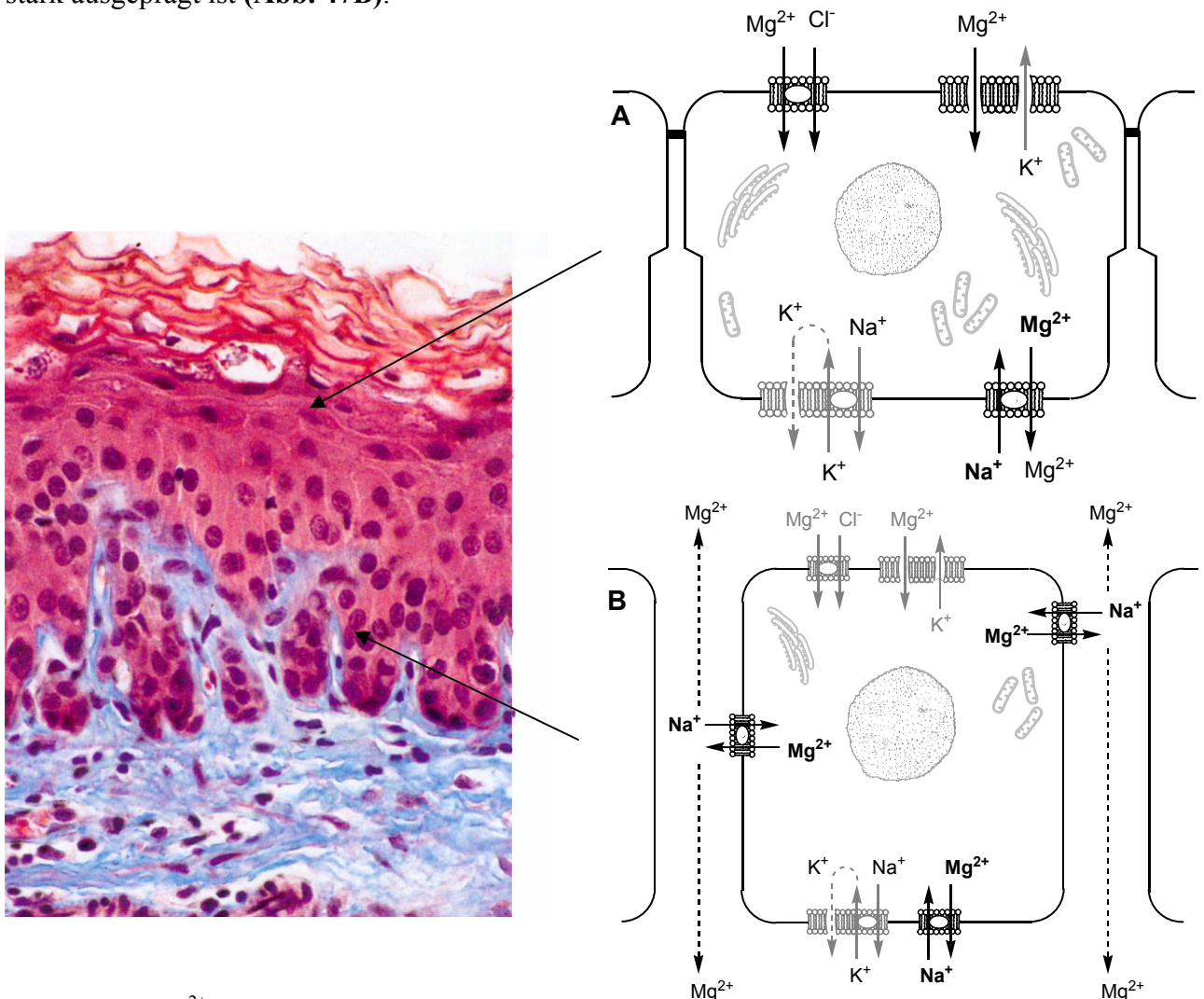
Die verschiedenen Beobachtungen führten zur Annahme, dass die verschiedenen am zellulären  $Mg^{2+}$ -Transport beteiligten Transportsysteme ( $Na^+/Mg^{2+}$ -Austauscher,  $Mg^{2+}$ -Kanäle,  $Mg^{2+}/Cl^-$ -Cotransporter) abhängig vom Differenzierungsgrad der PEZ unterschiedlich stark in der Zellmembran ausgebildet bzw. aus nicht näher definierten Gründen aktiviert sind. Es stellte sich die Frage, wie der Magnesiumtransport über das mehrschichtige Pansenepithel ablaufen könnte.

Durch *in vitro*-Studien am isolierten Pansenepithel wurde klar definiert, dass die  $Mg^{2+}$ -Resorption ein überwiegend transzellulärer Vorgang ist (MARTENS und BLUME, 1986; MARTENS und HARMEYER, 1978). Diese Transportform setzt voraus, dass zumindest in einer Zellebene eine Diffusionsbarriere vorhanden ist. In ultrastrukturellen Untersuchungen des Pansenepithels wiesen HENRIKSON (1970) sowie HENRIKSON und STACY (1971) im Stratum corneum Maculae occludentes nach. Tight junctions wurden im Pansenepithel nicht gefunden. Neuere Untersuchungen, bei denen an der Epidermis von Mäusen entgegen der alten Vorstellung, dass bei mehrschichtige Epithelien von Säugetieren keine tight junctions vorhanden sind, durchgehende tight junction-Stränge im Stratum granulosum nachgewiesen wurden (FURUSE et al., 2002; TSUKITA und FURUSE, 2002), lassen jedoch vermuten, dass auch beim Pansenepithel tight junctions in einer vergleichbaren Lokalisation vorliegen.

Die Diffusionsbarriere wird beim Pansenepithel im Bereich des Stratum granulosum vermutet. Die Zellen dieser Zellebene müssen einen gerichteten  $Mg^{2+}$ -Transport vermitteln und über eine entsprechende polare Anordnung spezifischer Transportproteine für die apikale Aufnahme und die basolaterale Abgabe von  $Mg^{2+}$  verfügen (**Abb. 47A**).

Die eigenen Untersuchungen, bei denen beobachtet wurde, dass stark granulierte Zellen über Cobalt(III)hexamin-sensitive  $Mg^{2+}$ -Transportmechanismen verfügen, lassen vermuten, dass Kanäle bei Zellen dieser Zellschicht vermehrt exprimiert bzw. aktiviert sind.

In den darunterliegenden Schichten verläuft der  $Mg^{2+}$ -Transport aufgrund der fehlenden Diffusionsbarriere parazellulär (POWELL, 1981). Bei diesen Zellen steht die Aufrechterhaltung der  $[Mg^{2+}]_i$  im Vordergrund. Der durch die in den Zellen ablaufenden proliferativen und funktionsabhängigen (Keratinsynthese) Prozesse bedingte, hohe Stoffwechselumsatz führt zu einem erhöhten Bedarf an  $Mg^{2+}$ , der durch einen gesteigerten  $Mg^{2+}$ -Influx bzw. durch die Freisetzung von  $Mg^{2+}$  aus den zellulären Speichern gedeckt wird. Gleichzeitig darf die  $[Mg^{2+}]_i$  nicht über die physiologische Konzentration von 0.5 bis 1.3 mmol/l (SCHWEIGEL et al., 1999) ansteigen, sodass überschüssiges freies  $Mg^{2+}$  aus der Zelle entfernt werden muss. Da bei den eigenen Untersuchungen an wenig differenzierten Zellen Imipramin eine hohe Wirksamkeit hatte, wurde angenommen, dass der  $Na^+/Mg^{2+}$ -Austauscher bei diesen Zellen stark ausgeprägt ist (Abb. 47B).



**Abb. 47AB:**  $Mg^{2+}$ -Transport über das Pansenepithel

In den tiefer gelegenen Zellebenen (Stratum basale, parabasale, spinosum) überwiegt der parazelluläre  $Mg^{2+}$ -Transport (B). Mit zunehmender Differenzierung ändert sich in den höher gelegenen Zellebenen (Statum granulosum, corneum) die Morphologie der Zellen. Es ist anzunehmen, dass sich auch die Aktivität verschiedener  $Mg^{2+}$ -Transportmechanismen im Verlauf der Differenzierung ändert. Vor allem im Bereich der Zellebenen, in denen Tight junctions als Diffusionsbarrieren ausgebildet sind (A).

(Histologischer Schnitt aus: Weyrauch; Histologiekurs für Veterinärmediziner; Enke, 1998)

Um dieses theoretische Modell zu verifizieren muss in weiteren, insbesondere elektrophysiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen geklärt werden, ob auch bei PEZ tatsächlich TRP-Kanäle ausgebildet sind.

### 5.2.6. Regulation des $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers

#### Einfluss von cAMP auf die $\text{Mg}^{2+}$ -Abgabe

Die Applikation von db-cAMP (100  $\mu\text{mol/l}$ ) führte bei Versuchen mit PEZ in einem  $\text{Na}^+$ -haltigen Messmedium ( $[\text{Na}^+]_e = 20 \text{ mmol/l}$ ) zu einer starken Stimulation der  $\text{Mg}^{2+}$ -Abgabe um  $54.8 \pm 19.7\%$ . Bei Versuchen, bei denen das Messmedium komplett  $\text{Na}^+$ -frei war, konnte kein cAMP-Effekt nachgewiesen werden.

Auch bei Untersuchungen an verschiedenen anderen Zellsystemen wurde der  $\text{Mg}^{2+}$ -Efflux bzw. die zelluläre  $\text{Mg}^{2+}$ -Homöodynamik durch cAMP beeinflusst. Dabei wurde auf unterschiedlichem Wege versucht die  $[\text{Mg}^{2+}]_i$  zu erhöhen. FAGAN und ROMANI (2000) beobachteten bei Leberzellen nach der Applikation von 8-Chloro-cAMP (250  $\mu\text{mol/l}$ ) einen Anstieg des  $\text{Mg}^{2+}$ -Effluxes um etwa 50%. Herzmuskelzellen, die mit Forskolin (50  $\mu\text{mol/l}$ ), einem Aktivator der Adenylatzyklase, und verschiedenen cAMP-Analogen (db-cAMP, 100  $\mu\text{mol/l}$ ; 8-Chloro-cAMP, 100  $\mu\text{mol/l}$ ; 8-Bromo-cAMP, 250  $\mu\text{mol/l}$ ) inkubiert wurden, zeigten eine Steigerung um bis zu 60% (ROMANI und SCARPA, 1990). WOLF et al. (1994; 1997) konnten sowohl bei Lymphozyten als auch bei Asziteszellen eine Stimulation des Effluxes nach der Gabe von db-cAMP (100  $\mu\text{mol/l}$ ) bzw. 8-Bromo-cAMP (500  $\mu\text{mol/l}$ ) um 30 bzw. 50% nachweisen.

Im Rahmen intrazellulärer Messungen bei PEZ führte die Applikation von db-cAMP (100  $\mu\text{mol/l}$ ) zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration ( $[\text{cAMP}]_i$ ). Gleichzeitig wurde eine Abnahme der  $[\text{Mg}^{2+}]_i$  um bis zu 30% festgestellt. Da in den eigenen Versuchen eine  $\text{Mg}^{2+}$ -Abgabe von 50% beobachtet wurde, kann angenommen werden, dass ein Teil des aus der Zelle transportierten  $\text{Mg}^{2+}$  cAMP-abhängig aus den zellulären Speichern freigesetzt wurde. Damit spielt cAMP auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der  $[\text{Mg}^{2+}]_i$  (MATSUURA et al., 1993).

Weiterhin scheint cAMP wichtig für die Regulation des gerichteten  $Mg^{2+}$ -Transportes über das Pansenepithel zu sein. *In vitro*-Untersuchungen am isolierten Pansenepithel (LEONHARD-MAREK, 2002) zeigten, dass sich der mukosal-serosale Kurzschlussstrom nach der Applikation von Theophyllin, welches den Abbau von cAMP durch Hemmung der Phosphodiesterase vermindert, erhöht. Das Entfernen von  $Na^+$  auf der serosalen Seite hatte ebenfalls eine Reduktion des Kurzschlussstroms zur Folge. LEONHARD-MAREK (2002) leitete daraus ab, dass die Erhöhung des Kurzschlussstroms über eine Aktivierung des  $Na^+/Mg^{2+}$ -Austauschers erfolgte. Auch die eigenen Untersuchungen machten deutlich, dass die Stimulation des  $Mg^{2+}$ -Effluxes streng an den  $Na^+/Mg^{2+}$ -Austauscher gebunden ist.

Untersuchungen zum Mechanismus, über den der  $Na^+/Mg^{2+}$ -Austauscher stimuliert wird, lassen vermuten, dass der Austauscher cAMP-abhängig phosphoryliert wird, sodass dessen Affinität für intrazelluläres  $Mg^{2+}$  steigt (GÜNTHER und VORMANN, 1992a). Gestützt wird dies dadurch, dass der cAMP-stimulierte  $Mg^{2+}$ -Efflux nach dem Einsatz der Proteinkinasehemmer H7 und Staurosporin bis auf eine basale Transportrate abfiel (WOLF et al., 1994). Dagegen konnte ein hemmender Effekt der Proteinkinasehemmer auf den unstimulierten  $Mg^{2+}$ -Efflux nicht nachgewiesen werden.

### **Einfluss von $PGE_2$ auf die $Mg^{2+}$ -Abgabe**

Auch nach der Applikation von  $PGE_2$  (100 nmol/l) kam es bei PEZ zu einer Erhöhung des  $Mg^{2+}$ -Effluxes. Der Anstieg lag bei  $16.4 \pm 8.6\%$ . Damit wurde der  $Mg^{2+}$ -Efflux durch  $PGE_2$  deutlich weniger stimuliert als durch cAMP, obwohl bei den PEZ nachgewiesen werden konnte, dass  $PGE_2$  die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht (BÖTTCHER, 2000).

Zum Einfluss von  $PGE_2$  auf die  $Mg^{2+}$ -Abgabe bei anderen Zellsystemen gibt es bisher nur wenige Untersuchungen. WOLF et al. (1994; 1997; 1998) stellten bei Asziteszellen, Lymphozyten und HL60-Leukämiezellen fest, dass Prostaglandine ( $PGE_1$ , 10 nmol/l;  $PGE_2$ , 20 nmol/l) über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration den  $Mg^{2+}$ -Efflux um bis zu 75% stimulierten, wogegen höhere Konzentrationen zu einer Hemmung führten.

Im Rahmen intrazellulärer Messungen bei PEZ stieg die  $[Mg^{2+}]_i$  entgegen allen Erwartungen nach der Gabe von  $PGE_2$  (100 nmol/l) an (SCHWEIGEL, 2001). Wurde derselbe Versuch in einem  $Na^+$ -freien Medium durchgeführt, war die durch  $PGE_2$  bedingte Erhöhung der  $[Mg^{2+}]_i$

nicht mehr festzustellen. Dies führte zur Annahme, dass der  $Mg^{2+}$ -Efflux durch die gleichzeitige Stimulation der  $Mg^{2+}$ -Aufnahme überdeckt wurde. Auch bei den eigenen Versuchen wurde die  $Mg^{2+}$ -Abgabe im Vergleich zu den cAMP-Versuchen und zu der bei WOLF et al. (1994; 1997; 1998) ermittelten Steigerung des Effluxes nicht besonders stark stimuliert. Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass  $PGE_2$  in der hohen, im Rahmen der Versuche verwendeten Konzentration stärker die  $Mg^{2+}$ -Aufnahme als die  $Mg^{2+}$ -Abgabe stimuliert. Die Regulation der verschiedenen Transportmechanismen ist besonders im Hinblick auf den gerichteten, transepithelialen  $Mg^{2+}$ -Transport von Bedeutung, da dadurch eine maximale Transportkapazität unter Erhaltung der zellulären  $Mg^{2+}$ -Homöodynamik gewährleistet ist.

Es wird davon ausgegangen, dass die Regulation über Prostaglandine auf unterschiedlichen zellulären Signaltransduktionswegen erfolgt. Untersuchungen an Ehrlich Aszites Tumorzellen wiesen für die Regulation des  $Mg^{2+}$ -Effluxes einen Signalweg aus, der über eine Aktivierung der Phospholipase A mit nachfolgender Erhöhung der Arachidonsäurekonzentration zu einer Steigerung der Cyclooxygenaseaktivität sowie der Prostaglandinsynthese und über cAMP zur Aktivierung der Proteinkinase A und damit letztendlich zur einer Stimulation des  $Mg^{2+}$ -Effluxes führt (WOLF et al., 1996). Der Lipooxygenaseweg wurde ausgeschlossen.

Die cAMP- und  $PGE_2$ -Versuche legen die Vermutung nahe, dass die Aktivität des  $Na^+/Mg^{2+}$ -Austauscher über den cAMP-Proteinkinase A-Weg u.a. durch  $PGE_2$  reguliert wird.

### **5.3. Primärkultivierung versus Zelllinie**

In einer vergleichenden Untersuchung an PEZ aus einer Primärkultur sowie an PEZ einer Pansenepithelzelllinie (PES RIE 154) wurde geprüft, ob die entdifferenzierten Zellen der Zelllinie zur Charakterisierung transportphysiologischer Prozesse geeignet sind.

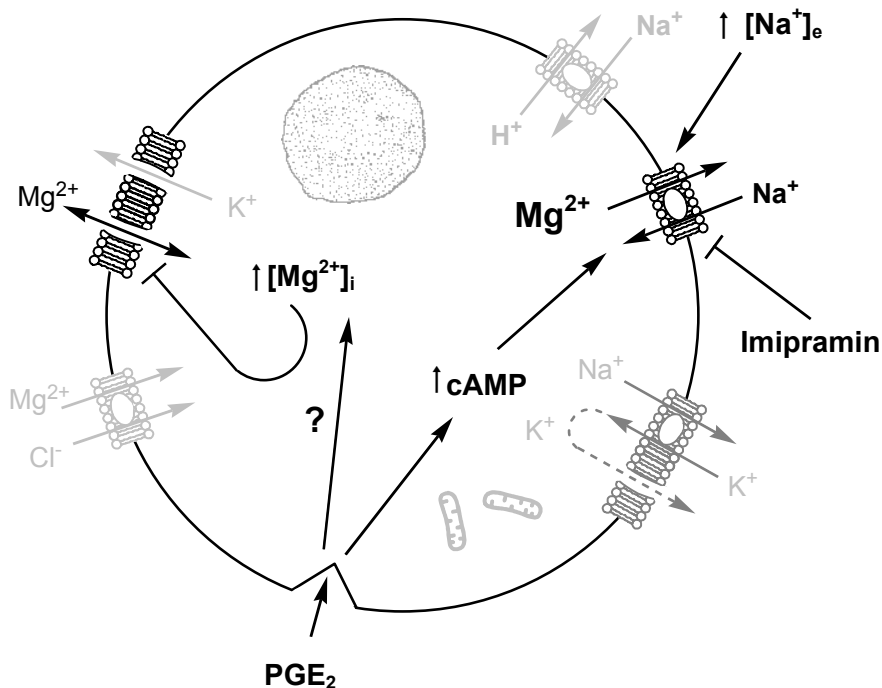
Im Verlauf dieser Untersuchung, bei der durch die Umkehr des  $\text{Na}^+$ -Gradienten ( $[\text{Na}^+]_i > [\text{Na}^+]_e$ ) eine  $\text{Mg}^{2+}$ -Aufnahme induziert wurde, zeigten sich Unterschiede beim  $\text{Na}^+$ -abhängigen  $\text{Mg}^{2+}$ -Transport und bei der zellulären pH-Regulation. Die Primärzellen zeigten eine sättigbare  $\text{Na}^+$ -abhängige  $\text{Mg}^{2+}$ -Aufnahme, wobei der intrazelluläre pH-Wert während der Messung konstant blieb. Die  $\text{Mg}^{2+}$ -Aufnahme bei den Zellen aus der Zelllinie verlief dagegen linear und der pH-Wert stieg im Verlauf der Messung kontinuierlich an. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde angenommen, dass die  $\text{Mg}^{2+}$ -Aufnahme bei den Primärzellen überwiegend über den  $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher vermittelt wird, wogegen die  $\text{Mg}^{2+}$ -Aufnahme bei den Zelllinienzellen elektrodifusiv über einen Kanal erfolgt.

Die Untersuchung zeigt deutlich, dass Primärzellen bei Untersuchungen zur zellulären  $\text{Mg}^{2+}$ -Abgabe nicht durch Zellen aus der Zelllinie zu ersetzen sind. Es ist aber denkbar, dass Zelllinienzellen für die Charakterisierung anderer Transportsysteme durchaus geeignet sind.

## 5.4. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass bei Pansenepithelzellen ein mit einer hohen Transportrate arbeitender Effluxmechanismus existiert. Ein geregelter Mechanismus mit einer hohen Transportkapazität ist sowohl im Zusammenhang mit dem aktiven transzellulären Transport von  $Mg^{2+}$  über das Pansenepithel als auch in Bezug auf die zelluläre  $Mg^{2+}$ -Homöodynamik von Bedeutung.

Der weitaus größte Teil des Effluxes wurde von einem  $Na^+$ -abhängigen Mechanismus vermittelt, der die typischen Charakteristika (Hemmung durch  $Na^+$ -Entzug und Imipramin,  $K_M$  für  $[Na^+]_e$  von etwa 20 mmol/l und Aktivierung durch cAMP) des  $Na^+/Mg^{2+}$ -Austauschers aufwies (**Abb. 48**).



**Abb. 48:** Modell zur  $Mg^{2+}$ -Abgabe aus PEZ

Der überwiegende Teil der  $Mg^{2+}$ -Abgabe aus PEZ erfolgt über den  $Na^+/Mg^{2+}$ -Austauscher. Die Transportkapazität ist dabei von der extrazellulären  $[Na^+]$  abhängig. Der Austauscher wird durch  $PGE_2$  und cAMP als second messenger reguliert. Imipramin hemmt den  $Na^+$ -abhängigen Teil des Austauschers.  $Mg^{2+}$  kann aber auch über einen Kanal aus der Zelle transportiert werden. Eine hohe  $[Mg^{2+}]_i$  hemmt diesen Transportmechanismus, der wahrscheinlich eine Bedeutung für die  $Mg^{2+}$ -Aufnahme hat.

Durch den Entzug von  $\text{Na}^+$  und durch Imipramin wurde der Efflux signifikant gehemmt, wogegen nach der Applikation von cAMP und  $\text{PGE}_2$  eine mehr oder weniger starke Stimulation des  $\text{Mg}^{2+}$ -Effluxes erfolgte. Durch die Untersuchungen wurde verdeutlicht, dass die Regulation des  $\text{Mg}^{2+}$ -Effluxes über Mediatoren eine wichtige Rolle beim transepithelialen Transport wie auch bei der zellulären  $\text{Mg}^{2+}$ -Homöodynamik spielt.

Die abweichenden Messergebnisse bei Zellen, die im Mikroskop betrachtet einen hohen Granulierungsgrad aufwiesen, führten zu der Annahme, dass bei Zellen, die in ihrer Morphologie den *in vivo* im Stratum granulosum lokalisierten Zellen entsprachen, auch  $\text{Mg}^{2+}$ -Kanäle am Efflux beteiligt sind (**Abb. 48**), wogegen diese bei Zellen aus dem Stratum basale eine geringere Rolle spielen. Da eine hohe intrazelluläre  $[\text{Mg}^{2+}]$  diese Kanäle hemmt, wurde vermutet, dass diese nach der Beladung der Zellen im Regelfall nicht am Efflux beteiligt waren. Bei Zellen, die dennoch eine biphasische  $\text{Mg}^{2+}$ -Abgabe aufwiesen, wurde die linear verlaufende zweite Phase des  $\text{Mg}^{2+}$ -Effluxes durch Cobalt(III)hexamin gehemmt. Diese Cobalt(III)hexamin-Sensitivität stützt die Annahme, dass Kanäle unter bestimmten Bedingungen am  $\text{Mg}^{2+}$ -Efflux beteiligt sind.

Bei der vergleichenden Studie von Transportprozessen bei PEZ aus Primärkulturen und Zellen aus einer Pansenepithelzelllinie waren die untersuchten Transportsysteme unterschiedlich stark ausgeprägt. Unterschiede zeigten sich hinsichtlich der pH-Regulation und vor allem bei den  $\text{Mg}^{2+}$ -Transportern. Dies macht deutlich, dass Zellen aus der Zelllinie bei Studien zum  $\text{Mg}^{2+}$ -Transport keinen adäquaten Ersatz für Primärzellen darstellen.

Mit dieser funktionellen Charakterisierung der  $\text{Mg}^{2+}$ -Effluxmechanismen bei PEZ ist eine Grundlage für weitergehende Untersuchungen gegeben, um den  $\text{Mg}^{2+}$ -Transport über das Pansenepithel in seiner Gesamtheit zu erfassen. Um die in dieser Studie gefundenen Hinweise, dass bei PEZ abhängig von ihrer Lokalisation und Funktion im Epithel verschiedene Transportmechanismen in unterschiedlicher Ausprägung am  $\text{Mg}^{2+}$ -Efflux beteiligt sind, zu untermauern, sind Folgeuntersuchungen notwendig. Sowohl der Nachweis einer durch tight junction-Proteine gebildeten, ‚echten‘ Diffusionsbarriere als auch die weitere Charakterisierung der unterschiedlichen Transportmechanismen in den verschiedenen Zellschichten des mehrschichtigen Epithels mittels spezifischer Hemmstoffe würden einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung des  $\text{Mg}^{2+}$ -Transportes über das Pansenepithel leisten.