

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13. Jg. 1975, S. 361–366

Die Rolle von cyclischem AMP und Ca bei der Permeabilitätsänderung Mg-arm gewachsener Tumorzellen

Von R. Averdunk, B. Ostapowicz und Th. Günther

Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie und Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik der Freien Universität Berlin

(Eingegangen am 10. Februar/13. Mai 1975)

Zusammenfassung: Bei Mg-arm gewachsenen Yoshida-Ascites Tumorzellen ist die passive Permeabilität erhöht. Dies führt zu einem beschleunigten Na^+ -Efflux. Die Aufnahme von γ -Aminobuttersäure ist verringert. Ihre Abgabe, sowie die Aufnahme und Abgabe von α -Methylglucopyranosid sind unverändert. Der Gehalt an Ado-3':5'P ist bei den Mg-arm gewachsenen Zellen leicht erhöht. Zugabe von Dibutyryl-Ado-3':5'P führt zu ähnlichen, aber geringeren Veränderungen der zellulären Kationenkonzentrationen als der Mg-Mangel. Es wird diskutiert, ob die Auswirkungen des Mg-Mangels durch Ado-3':5'P und/oder durch eine Erhöhung des Ca-Gehaltes in der Zelle ausgelöst werden können.

The role of cyclic AMP and Ca in the altered permeability of tumour cells grown with a deficiency of Mg

Summary: Yoshida-Ascites tumour cells grown with a deficiency of Mg show an increased passive permeability. This results in an accelerated efflux of Na^+ . The uptake of aminobutyric acid is decreased, while its release is unchanged. The uptake and release of α -methylglucopyranoside are unchanged. In the cells grown with a deficiency of Mg, the concentration of cyclic AMP is slightly increased. The addition of dibutyryl cyclic AMP results in similar but smaller changes in the cellular concentration of cations, to those found in Mg deficiency. It is suggested that the effects of Mg deficiency result from the action of cyclic AMP and/or an increase in the Ca concentration of the cell.

Einführung

Im Mg-Mangel treten hauptsächlich Veränderungen des Elektrolytstoffwechsels auf (1, 2). Besonders ausgeprägt ist eine Abnahme des K^+ -Gehaltes und eine etwas geringere Zunahme des Na^+ -Gehaltes der Zellen. Die extrazellulären Konzentrationen von Na^+ und K^+ bleiben konstant (1). Im Tierversuch findet man bei Mg-Mangelernährung eine starke Abnahme der Mg-Konzentration im Serum und eine geringe Abnahme des Mg-Gehaltes in den Zellen. Der Ca-Gehalt der Zellen steigt an (1, 3, 4).

Die einzelnen Organe verhalten sich im Mg-Mangel unterschiedlich. Die stärksten Veränderungen wurden im braunen Fettgewebe der Ratte gefunden (3). Wahrscheinlich wird hier im Mg-Mangel durch die starke sympathische Innervation besonders viel Noradrenalin freigesetzt (4). Es erscheint daher möglich, daß die im Mg-Mangel auftretenden Veränderungen des Elektrolytstoffwechsels zum Teil auf einer Zunahme des Ado-3':5'P-

Gehaltes der Zellen beruhen. Eine andere Möglichkeit wäre eine direkte Alteration der Zellmembran bzw. ihrer Permeabilität. Zur Klärung dieser Fragen untersuchten wir verschiedene Transportsysteme, sowie den Gehalt an Ado-3':5'P und Ca von Tumorzellen, die in einem Mg-armen Medium gezüchtet wurden, weil bei diesen Zellen eine Beeinflussung durch Catecholamine entfällt.

Material und Methoden

Yoshida-Ascites-Tumorzellen wurden 5 Tage in der Suspensionskultur in Eagle-Spinner-Medium, dem 10% Mg-frei dialysiertes Kälberserum und 5% fötales Kälberserum zugegeben wurde, gezüchtet (2). Die Mg-Konzentration betrug im Normalmedium 1,2 mmol/l und im Mg-armen Medium 0,18 mmol/l.

Zur Bestimmung der abgestorbenen Zellen wurden 0,2 ml Zellsuspension (5×10^6 Zellen/ml) mit 0,1 ml Trypanblaulösung (10 g/l in 0,15 mol/l NaCl) versetzt und 30 min danach der Anteil der blaugefärbten (d.h. abgestorbenen) Zellen zur

Beurteilung der Kultur (2) ausgezählt. Zellzählungen wurden mit dem Coulter-Counter Modell B vorgenommen.

Die Proteinbestimmungen erfolgten mit der Biuretmethode nach Auflösen der Zellen in 0,1 mol/l NaOH (5).

Zur Bestimmung des zellulären Na⁺- und K⁺-Gehaltes wurden die Zellen durch 10 min Zentrifugieren bei 70 g vom Kulturmedium abgetrennt und zweimal auf der Zentrifuge mit 0,1 mol/l MgCl₂ gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 1 kg/l Trichloressigsäure versetzt und anschließend 1:10 mit dest. Wasser verdünnt. Das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert und im Überstand Na⁺ und K⁺ flammenfotometrisch gemessen.

Zur Bestimmung des Mg- und Ca-Gehaltes wurden die Zellen in 0,15 mol/l NaCl gewaschen und in gleicher Weise mit Trichloressigsäure aufgeschlossen. Im Trichloressigsäure-Extrakt wurde Mg und Ca mit dem Atomabsorptionsspektrometer gemessen. Vergleichsuntersuchungen, bei denen die Zellen durch Phthalsäuredibutylester zentrifugiert wurden (6), führten zu gleichen Ergebnissen.

Zur Bestimmung der [³H]Ouabain-Bindung wurden die Zellen bis zum Erreichen eines Sättigungswertes bei 37 °C und bei 4 °C mit 100 nmol/l [³H]Ouabain inkubiert. Die Zellen wurden durch 30 s langes Zentrifugieren bei 10.000 U/min (Eppendorf-Mikroeinheit) vom Medium abgetrennt, dreimal mit eiskalter 0,15 mol/l NaCl gewaschen, in 0,01 mol/l NaOH aufgelöst, quantitativ in Szintillationsflüssigkeit aufgenommen und in einem Beckman-Szintillationsspektrometer gemessen. Die Anzahl der gebundenen Ouabain-Moleküle pro Zelle (OBS) wurde nach folgender Formel (Gleichung (1)) berechnet (6):

$$\text{OBS} = \frac{\text{Imp./min} \cdot \text{Zelle} \times 100/e \times N}{S \times 2,2 \times 10^{12}} \quad \text{Gl. (1)}$$

e = Zählausbeute in %
S = spezifische Aktivität in Ci/mol
N = Loschmidt'sche Zahl.

Zur Bestimmung der unspezifischen Ouabain-Bindung wurden die Zellen 10 min mit 1 mmol/l unmarkiertem Ouabain vorinkubiert. Anschließend wurden 100 nmol/l [³H]Ouabain zugesetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 60 min wurden die Zellen gewaschen, aufgeschlossen und die ³H-Aktivität bestimmt (s. o.). Die gefundene unspezifische ³H-Aktivität wird von den Werten subtrahiert, die in Gegenwart von 100 nmol/l [³H]Ouabain gefunden wurden.

Zur Bestimmung des Na⁺-Efflux wurden die Zellen bei 37 °C mit 20 mCi ²²Na/l in Eagle-Medium, das 5% fötales Kälberserum enthielt, beladen. Nach 60 min wurden die Zellen zweimal mit radionuklidfreiem, gekühltem Eagle-Medium gewaschen und im gleichen Medium bei 37 °C in einer Zelldichte von 1 × 10⁷ Zellen/ml weiter inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden 0,5 ml der Zellsuspension entnommen, auf der Eppendorf-Zentrifuge bei 10.000 U/min zentrifugiert und die Zellen, sowie ein Aliquot des Überstandes im Packard-Autogamma-Zähler gemessen. Die Geschwindigkeitskonstante wurde nach Radcliffe (7) ermittelt:

$$\text{Geschwindigkeitskonstante} = \ln \frac{\text{Imp./min} \cdot \mu\text{l Zellwasser nach 10 min}}{\text{Imp./min} \cdot \mu\text{l Zellwasser nach 0 min}} \times \text{h}^{-1} \quad \text{Gl. (2)}$$

Zur Bestimmung der Aufnahme von γ -Aminobuttersäure und α -Methylglucopyranosid wurden die Zellen bei 37 °C in einer Konzentration von 1–2 × 10⁷ Zellen/ml in Krebs-Ringerphosphatlösung pH 7,0 und einer Osmolarität von 275 m osmol/l nach Zugabe von [¹⁴C] γ -Aminobuttersäure bzw. [¹⁴C] α -Methylglucopyranosid inkubiert und zu verschiedenen Zeiten 1 ml der Zellsuspension entnommen, in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 10.000 U/min 30 s zentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Gefäß ausgetupft und das Gewicht der Zellen bestimmt. Bei der Bestimmung der α -Methylglucopyranosid-Aufnahme und Abgabe wurde dem Medium 1 mmol/l Natriumpyruvat zugesetzt. Die Zellen wurden mit 0,5 ml 100 g/l Trichloressigsäure aufgeschlossen, das Protein bei 1.400 g abzentrifugiert, die Trichlor-

essigsäure ausgeäthert und 0,1 ml des Überstandes mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die ¹⁴C-Aktivität wurde im Beckman-Szintillationsspektrophotometer LS 100 gemessen.

Da in dieser Versuchsanordnung die im Extrazellulärraum enthaltene ¹⁴C-Aktivität mitgemessen wird, dieser sich aber durch einen unterschiedlichen Anteil von abgestorbenen Zellen in den einzelnen Versuchen unterschied, wurde der Extrazellulärraum mit ¹⁴C-Inulin in jedem einzelnen Versuch bestimmt. Die Werte lagen zwischen 15 und 20% des Volumens des Zellsediments. Zur Bestimmung der Aufnahmegeschwindigkeit wurde die dem extrazellulären Raum entsprechende ¹⁴C-Aktivität der γ -Aminobuttersäure bzw. des α -Methylglucopyranosids subtrahiert.

Zur Bestimmung der Abgabe von γ -Aminobuttersäure und α -Methylglucopyranosid wurden die Zellen unter gleichen Bedingungen wie bei den Aufnahme-Versuchen vorinkubiert. Nach Erreichen der Steady-State-Konzentration, was 60 min dauerte, wurden die Zellen zweimal gewaschen und in γ -Aminobuttersäure- sowie α -Methylglucopyranosid-freiem Medium inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurde 1 ml Zellsuspension entnommen, zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die ¹⁴C-Aktivität der Zellen in gleicher Weise gemessen, wie bei den Versuchen zur Aufnahme von α -Methylglucopyranosid und γ -Aminobuttersäure. Die Werte wurden graphisch dargestellt. Aus dem linearen Teil der Kurve wurde unter Berücksichtigung der bekannten spez. Aktivität und Zählausbeute die Aufnahme- bzw. Abgabegeschwindigkeit errechnet.

Der Gehalt an Ado-3':5'P wurde nach Aufschluß der Zellen mit 0,1% Triton X-100 mit dem Test-Kit der Fa. Boehringer, Mannheim, bestimmt. Wurden mit dieser Methode 10 Einzelbestimmungen aus der gleichen Zellsuspension vorgenommen, ergab sich ein VK von 4,12%. In einer Zmisch-Analyse wurde zu dem Extrakt von 1 × 10⁸ Zellen, die für die Messung eingesetzt wurden, 1–8 μ g Ado-3':5'P zugesetzt. Es wurden durchschnittlich 96% der zugegebenen Ado-3':5'P-Menge wiedergefunden. Wurden größere Mengen zugemischt, sank die Menge des wiedergefundenen Ado-3':5'P.

Ergebnisse

Na⁺-Transport

In früheren Versuchen (2) hatte sich gezeigt, daß bei Mg-arm gewachsenen Yoshida-Zellen der intrazelluläre K⁺-Gehalt ab- und der intrazelluläre Na⁺-Gehalt zugenommen hatten, der ⁴²K-Efflux war beschleunigt. Da K⁺- und Na⁺-Transport bei somatischen Zellen gekoppelt sind, bestimmten wir den ²²Na-Efflux (Abb. 1). Errechnet man aus den halblogarithmischen Auftragungen der Gleichung (2) die Geschwindigkeitskonstanten des Na⁺-Efflux, so ergibt sich für normal gewachsene Zellen eine Geschwindigkeitskonstante k = 0,015 × h⁻¹ und für die Mg-armen Zellen k = 0,020 × h⁻¹. Dies zeigt, daß bei den Mg-arm gewachsenen Zellen der Na⁺-Efflux, d. h. der aktive Na⁺-Transport aus der Zelle, erhöht ist. Daraus ergibt sich die Frage, ob die Aktivität der Na⁺-, K⁺-abhängigen ATPase auch erhöht ist. Eine solche veränderte ATPase-Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden (2). Allerdings wurde die Bestimmung der ATPase-Aktivität an aufgeschlossenen Zellen jeweils bei den gleichen optimalen Na⁺-, K⁺- und ATP-Konzentrationen durchgeführt und auf die Proteinmenge im Ansatz bezogen. Die Anzahl der Na⁺-, K⁺-Pumpstellen pro Zelle und die Aktivität der ATPase in der intakten Zelle können aber von der ATPase-Aktivität einer Membranpräparation verschieden sein. Deshalb haben wir die Ouabainbindung an intakten Zellen bestimmt.

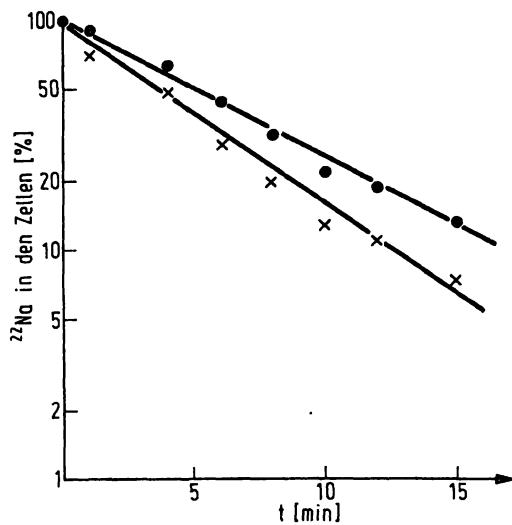


Abb. 1. Na-Efflux bei Mg-arm gewachsenen Yoshida-Tumorzellen. Die Inkubation der mit ^{22}Na vorbeladenen Zellen wurde zu verschiedenen Zeiten unterbrochen und die ^{22}Na -Aktivität der Zellen bestimmt. Der Variationskoeffizient der Methode beträgt 2,96% bei $n = 10$ Bestimmungen.
 ● —● normale Zellen, $k = 0,015 \cdot \text{h}^{-1}$
 x —x Mg-arme Zellen, $k = 0,020 \cdot \text{h}^{-1}$

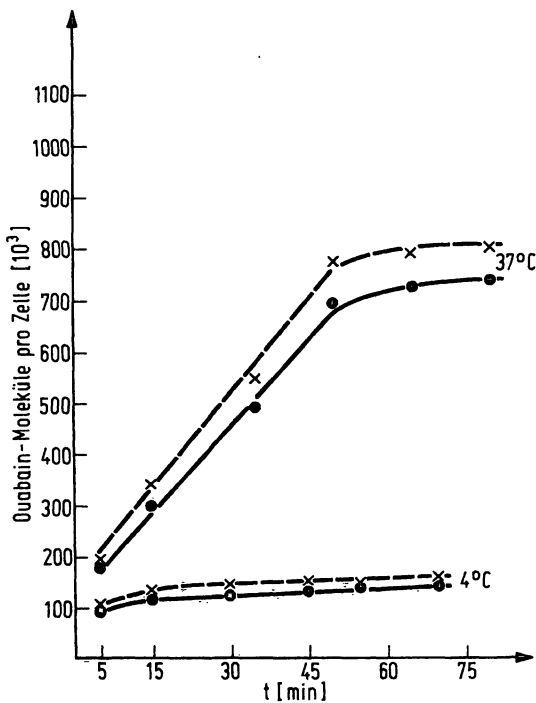


Abb. 2. Bindung von Ouabain an Yoshida-Tumorzellen. 5×10^6 Zellen wurden in Gegenwart von 100 nmol/l [^3H]Ouabain bei 37 °C bzw. 4 °C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurde die ^3H -Aktivität der Zellen bestimmt. Die angegebenen Werte wurden nach Subtraktion der unspezifischen Bindung erhalten. Der Variationskoeffizient beträgt 3,81% bei $n = 9$ Bestimmungen.
 ● —● normale Zellen
 x —x Mg-arme Zellen

[^3H]Ouabain-Bindung

Aus Abbildung 2 ist zu ersehen, daß Yoshida-Ascites-Tumorzellen bei 37 °C etwa 8×10^5 Ouabain-Bindungsstellen pro Zelle besitzen. Bei 4 °C wurden nur etwa 2×10^5 Ouabain-Moleküle pro Zelle gebunden. Mg-arm gewachsene Zellen binden [^3H]Ouabain, wie aus den Steigungen der Bindungskurven zwischen 5 und 45 min hervorgeht, nicht schneller. Die Anzahl der Ouabain-Bindungsstellen pro Zelle ist aber um 8% höher als bei den Kontrollzellen. Dieser geringe Unterschied ist bei dem dieser Methode anhaftenden Variationskoeffizienten von $\text{VK} = 4,37\%$ ($n = 10$ Einzelmessungen) nicht signifikant, so daß geschlossen werden kann, daß die Zahl der Na^+ , K^+ -Pumpstellen bei Mg-arm gewachsenen Zellen sich nicht verändert hat.

Aminosäure- und Glucosetransport

Neben dem aktiven Transport von Na^+ und K^+ sind auch die Transportsysteme für Aminosäuren und Zucker für den Zellstoffwechsel wichtig. Zur Charakterisierung weiterer Membranfunktionen untersuchten wir, ob bei den Yoshida-Zellen durch den Mg-Mangel auch der Transport von Aminosäuren und Glucose betroffen ist. Veränderungen des Aminosäure- und Glucosetransportes könnten zusätzlich für die beschriebene Verringerung des Wachstums der Zellen (2) in der Mg-armen Kultur verantwortlich sein. Außerdem kann der Aminosäuretransport vom Na^+ -Gradienten abhängig sein (8). Unter Mg-Mangelbedingungen gewachsene Zellen haben um 18% weniger γ -Aminobuttersäure aufgenommen als die Kontrollzellen (Tab. 1). Die Abgabe von γ -Aminobuttersäure und die Aufnahme und Abgabe von α -Methylglucopyranosid unterschieden sich nicht. (Tab. 1).

Tab. 1. Aufnahme und Abgabe von γ -Aminobuttersäure (ABS) und α -Methylglucopyranosid (MGP) bei normalen und Mg-arm gewachsenen Tumorzellen.

Angaben in $\mu\text{mol}/\text{min} \times 1$ Zellwasser

Die Aufnahmegeschwindigkeiten von γ -Aminobuttersäure oder α -Methylglucopyranosid wurden bei einer Konzentration von 0,5 mmol und 1 mCi/l bestimmt. Die ^{14}C -Aktivität in den Zellen wurde alle 5 min gemessen. Nach Auftragen der intrazellulären Konzentration von γ -Aminobuttersäure bzw. α -Methylglucopyranosid gegen die Zeit wurde die Aufnahmegeschwindigkeit aus der Steigung des linearen Anteils der Kurve ermittelt. Zur Bestimmung der Abgabegeschwindigkeit wurden die Zellen mit [^{14}C] γ -Aminobuttersäure bzw. α -Methylglucopyranosid vorbeladen und die nach Waschen und Reinkubation in den Zellen verbliebene ^{14}C -Aktivität in 5 min-Abständen bestimmt. Die Berechnung erfolgte wie bei der Aufnahme.

	Kontrolle	Mg-arm
ABS-Aufnahme	$1,87 \pm 0,15$	$1,52 \pm 0,10$
ABS-Abgabe	$1,01 \pm 0,15$	$0,92 \pm 0,10$
MGP-Aufnahme	$6,67 \pm 0,70$	$5,19 \pm 0,62$
MGP-Abgabe	$4,33 \pm 0,51$	$3,78 \pm 1,63$

Ado-3':5'P und Ca-Gehalt

Ein vermehrter passiver K⁺-Efflux und Ca-Influx wird in Leberzellen durch Noradrenalin bzw. Ado-3':5'P ausgelöst (9). Bei normalen Yoshida-Zellen beträgt der Ca-Gehalt 1,47 mmol/kg Feuchtgewicht und der Mg-Gehalt 15,7 mmol/kg Feuchtgewicht, während die Mg-arm gewachsenen Zellen einen Ca-Gehalt von 2,19 mmol/kg Feuchtgewicht und einen Mg-Gehalt von 12,7 mmol/kg Feuchtgewicht aufweisen. Da im Mg-Mangel in einzelnen Tierorganen eine erhöhte Ado-3':5'P-Konzentration gefunden wurde (3, 4), prüften wir, ob der veränderte Kationen-Gehalt durch unterschiedliche Ado-3':5'P-Konzentrationen der Zellen verursacht ist. Der Ado-3':5'P-Gehalt von Yoshida-Zellen, die im normalen Medium vermehrt wurden, beträgt $4,3 \pm 0,16$ pmol/mg Protein, der der Mg-arm gewachsenen Zellen $4,9 \pm 0,17$ pmol/mg Protein. Die Mg-arm gewachsenen Zellen haben damit einen um 14% höheren Ado-3':5'P-Gehalt als die Kontrollzellen.

Wenn Ado-3':5'P die Permeabilität der Mg-armen Tumorzellen geändert hat, so sollte durch Zusatz von Ado-3':5'P die Auswirkung des Mg-Mangels nachgeahmt werden können. Es wurden deshalb verschiedene Konzentrationen von Dibutyryl-Ado-3':5'P normalen Tumorzellen zugesetzt und 1 h später der Gehalt an Na⁺, K⁺, Ca und Mg bestimmt. Es zeigte sich (Tab. 2), daß nach Zugabe von 10 bis 100 µmol/l Dibutyryl-Ado-3':5'P die intrazelluläre K⁺-Konzentration erniedrigt und der Na⁺ und Ca-Gehalt erhöht waren. Der Ca-Gehalt war jedoch weniger angestiegen als im Mg-Mangel. Um auszuschließen, daß die intrazellulären Elektrolyte sich durch die wiederholten Waschvorgänge verändern, wurde die Abtrennung der extrazellulären Flüssigkeit von den Zellen durch eine Zentrifugation durch eine Phthalsäuredibutylesterschicht durchgeführt (6). Die Kationenkonzentrationen lagen danach um etwa 10% höher als die in der Tabelle 2 angegebenen Werte. Die Differenzen nach Dibutyryl-Ado-3':5'P-Zusatz zu den Kontrollkulturen blieben bestehen.

Tab. 2. Einfluß von Dibutyryl-Ado-3':5'P auf die intrazellulären Konzentrationen von Na⁺, K⁺, Ca und Mg von normalen Tumorzellen

1×10^7 Zellen/ml wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Dibutyryl-Ado-3':5'P 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, anschließend die intrazellulären Konzentrationen der Kationen bestimmt. Der Variationskoeffizient der Methode beträgt bei n = 14 Einzelbestimmungen 5,16%.

Konzentration von Dibutyryl-Ado-3':5'P [µmol/l]	Na ⁺ mmol/kg Trockengewicht	K ⁺ mmol/kg Trockengewicht	Ca mmol/kg Feuchtgewicht	Mg
100	69,0	280,5	1,91	14,6
10	64,5	284,3	1,73	14,7
1	62,4	278,5	1,62	15,8
0,1	61,6	287,8	1,62	15,9
0	60,0	289,5	1,47	15,8

Die Bestimmungen des Ca-Gehaltes der Zellen gestatten jedoch keine Differenzierung zwischen intrazellulärem Ca und dem Ca, das außen an der Zellmembran gebunden ist. Wahrscheinlich wird im Mg-Mangel infolge der geringeren Konkurrenz zwischen extrazellulärem Mg und Ca an den Liganden der Zellmembran mehr Ca gebunden als nach Zugabe von Dibutyryl-Ado-3':5'P; denn die extrazelluläre Mg-Konzentration ist im Mg-Mangel stark erniedrigt. Die Abnahme des Mg-Gehaltes der Zellen nach Zugabe von Dibutyryl-Ado-3':5'P kann durch Efflux von Mg bzw. durch Verdrängung von intrazellulärem Mg durch eingeströmtes Ca bedingt sein.

Diskussion

In vorhergehenden Untersuchungen (2) hatte sich gezeigt, daß in der Kultur unter Mg-Mangel wachsende Zellen vom 3. Tag an wesentlich langsamer wachsen (Zellzahl am 7. Tag in der Kontrollkultur 8×10^7 , in der Mg-arm gewachsenen Kultur 4×10^7 Zellen). Nach 7 Tagen war der intrazelluläre K⁺-Gehalt von 280 auf 120 mmol/kg Trockengewicht abgesunken, der Na⁺-Gehalt von 84 auf 180 mmol/kg angestiegen. Die Protein-, RNA-, und DNA-Synthese zeigte eine der Wachstumsverlangsamung entsprechende Verminderung. Der Energiestoffwechsel war wenig verändert. Studien mit ⁴²K hatten ergeben, daß der K⁺-Efflux zugenommen hatte. Ein signifikanter Unterschied in der Aktivität der Membran-ATPase konnte nicht gefunden werden.

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen weiterhin, daß im Mg-Mangel der aktive Na⁺-Transport erhöht ist, der intrazelluläre Ca-Gehalt angestiegen und der Mg-Gehalt abgenommen hat. Die [³H]Ouabainbindung ist unverändert. Die intrazelluläre Konzentration von Ado-3':5'P hat geringfügig zugenommen. Der Aminosäuretransport ist wenig, der Glucosetransport nicht verändert.

Es soll diskutiert werden, welche Zusammenhänge zwischen diesen Veränderungen bestehen und wodurch die im Mg-Mangel auftretenden Veränderungen, wie der verringerte Na⁺/K⁺-Gradient und die Verlangsamung des Zellwachstums, in der Kultur verursacht werden.

Ein verlangsamtes Zellwachstum könnte auf einem veränderten Aminosäuretransport beruhen, der durch die Kopplung von Aminosäure-Transport und Na⁺-Gradient bedingt sein könnte (8). Die geringfügig erniedrigte γ-Aminobuttersäure-Aufnahme bei den Mg-arm gewachsenen Zellen ist bei den hohen Aminosäurekonzentrationen des Eagle-Spinner-Mediums nicht für die Verringerung des Zellwachstums verantwortlich. Außerdem ist die Kopplung von Aminosäuretransport und Na⁺-Gradient bei intaktem Energiestoffwechsel gering (8). Die Reduzierung der Proteinsynthese und des Wachstums sind daher wahrscheinlich durch die verringerte intrazelluläre K⁺-Konzentration bedingt (10). Ob bei diesen Zellen eine zusätzliche Abnahme von Polyribosomen vorliegt, ist offen.

Die Abnahme der intrazellulären K^+ -Konzentration im Mg-Mangel beruht auf einem stark erhöhten passiven K^+ -Efflux (2). Gleichzeitig besteht ein erhöhter Na^+ -Efflux (aktiver Na-Transport). Daraus folgt, daß im Steady-State auch beim Na^+ eine verstärkte passive Permeabilität vorliegen muß. Durch das verstärkt einströmende Na^+ und ausströmende K^+ kommt es zu einer veränderten intrazellulären Konzentration von K^+ und Na^+ und folglich zu einer Aktivierung der Na^+ - K^+ -Pumpe und so zu einem erhöhten Na^+ -Efflux. Da Na^+ und K^+ -Transport gekoppelt sind, folgt auch ein erhöhter K^+ -Transport. Eine Aktivierung der Na^+ - K^+ -Pumpe durch die Veränderung der intrazellulären Kationenkonzentrationen führt offenbar nicht zu einer Veränderung der [3H]Ouabainbindungsgeschwindigkeit. Auch eine Zunahme der Pumpstellen konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Als Ursache für die erhöhte passive Permeabilität könnte ein erhöhter Ca-Gehalt der Mg-armen Zellen (11, 12) und/oder ein erhöhter Ado-3':5'P-Gehalt in Frage kommen (9). Ca und Ado-3':5'P haben auch ähnliche Wirkungen, z. B. bei der Aktivierung der Phosphorylase oder Lipase (13–17). Die Zunahme des Ca-Gehaltes kann durch einen vermehrten Ca-Influx (infolge der Abnahme der extrazellulären Mg-Konzentration und einer dadurch verringerten Konkurrenz mit Ca) zustande kommen. Durch die Abnahme des membrangebundenen Mg kann sich auch eine erhöhte passive Permeabilität für Ca auf die gleiche Weise, wie für K^+ und Na^+ ergeben. Daneben könnte im Mg-Mangel ein Protein, das für die normale Anreicherung dieser Substanzen nötig ist, nicht mehr in ausreichender Menge gebildet werden (20). Außerdem könnte Ca, das normalerweise in den Mitochondrien angereichert ist, aus diesen in das Zytoplasma gelangen (18) und dadurch die normale Ca-Verteilung in der Zelle verändern.

Eine Erhöhung des intrazellulären Ca-Gehaltes scheint allerdings nicht immer beim Mg-Mangel-Effekt beteiligt zu sein. So konnte Lehr (19) am Herzmuskel von

parathyreoidektomierten Ratten, deren Ca im Serum niedrig war, die typischen Mg-Mangelercheinungen ohne Erhöhung des zellulären Ca-Gehaltes hervorrufen. An Mg-armen *E. coli*, bei denen ebenfalls die typischen Mg-Mangeleffekte beobachtet werden, ist eine Beteiligung des Ca auszuschließen, da diese Zelle ohne Ca im Medium gewachsen waren (20).

Die Zunahme des Ado-3':5'P-Gehaltes bei Mg-verarmten Kulturzellen ist sehr gering. Wahrscheinlich hängt die Zunahme des Ado-3':5'P im Mg-Mangel von der sympathischen Innervation des jeweiligen Organs ab. Die in der Mg-Mangel-Kultur erhöhte intrazelluläre Ado-3':5'P-Konzentration kann durch eine veränderte Struktur der Zellmembran bzw. Aktivität membrangebundener Enzyme verursacht werden. Der gleichzeitig erhöhte Ca-Gehalt kann die Wirkung des Ado-3':5'P verstärken (17).

Falls die Effekte des Mg-Mangels durch Ado-3':5'P verursacht werden, so muß eine funktionelle Kompartimentierung des Ado-3':5'P in der Zelle angenommen werden (s. hierzu auch l.c. (21)). Eine derartige Kompartimentierung des Ado-3':5'P wird auch bei der Wirkung des Insulins diskutiert (22). Für eine Wirkung des Ado-3':5'P auf den K^+ - Na^+ -Transport spricht, daß Zugabe von Dibutyryl-Ado-3':5'P zu normalen Tumorzellen den Mg-Mangeleffekt imitiert (Tab. 2). Eine Änderung des Na^+ -Influx nach einem vorhergehenden Anstieg des Ado-3':5'P wurde von Sapirstein (23) beobachtet.

Gegen eine generelle Beteiligung des Ado-3':5'P an Mg-mangelbedingten Veränderungen spricht aber, daß z. B. an der Schilddrüse im Mg-Mangel keine Veränderungen des Ado-3':5'P gefunden wurden, obgleich typische Mangelveränderungen auch in diesem Organ auftreten (24). Es ist daher möglich, daß die durch Mg-Mangel bedingten Effekte je nach Organ oder Versuchsbedingungen verschieden ausgelöst werden. Bei einigen scheint die Zunahme des intrazellulären Ca die auslösende Ursache zu sein, bei ausgeprägter sympathischer Innervation ist Ado-3':5'P beteiligt.

Literatur

- Günther, T. (1970), diese Z. 8, 65–68.
- Günther, T. & Averdunk, R. (1970), diese Z. 8, 621–625.
- Günther, T., Schmalbeck, J. & Merker, H. J. (1973), diese Z. 10, 425–429.
- Günther, T., Schmalbeck, J. & Merker, H. J. (1973), diese Z. 11, 233–236.
- Weichselbaum, T. E. (1946), Amer. J. Clin. Path. 16, 40–52.
- Averdunk, R. & Lauf, P. K. (1975), Exp. Cell Res. (im Druck).
- Radcliffe, M. A. (1974), Biochim. Biophys. Acta 339, 303–310.
- Geck, P., Heinz, E. & Pfeiffer, B. (1972), Biochim. Biophys. Acta 288, 486–491.
- Friedmann, N. & Park, C. R. (1968), Proc. Nat. Acad. Sci. 61, 504–508.
- Lubin, M. (1967), Nature (London) 213, 451–453.
- Whittam, R. (1968), Nature (London) 219, 610–612.

12. Van Rossum, G. D. V. (1970), *Nature (London)* 225, 638-639.
13. Rizack, H. (1964), *J. Biol. Chem.* 239, 392-395.
14. Mansour, T. E. & Mansour, J. M. (1962), *J. Biol. Chem.* 237, 629-634.
15. Appelman, M. M., Thomson, W. J. & Russel, T. R. (1973), *Advances in Cyclic Nucleotide Res.* 3, 65-98.
16. Rasmussen, H. & Tenenhouse, A. (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 59, 1364-1370.
17. Ozawa, E. & Ebashi, S. (1967), *J. Biochem.* 62, 285-293.
18. Borle, A. B. (1974), *Ann. Rev. Physiol.* 36, 361-390.
19. Lehr, D. (1973), Myocardial cell damage, VI. Annual Meeting of the Int. Study Group, Freiburg.
20. Günther, T. & Mariss, P. (1969), *Z. Naturforschung* 23b, 334-338.
21. Butcher, R. W., Sneyd, J. G. T., Park, C. R. & Sutherland, E. W. (1966), *J. Biol. Chem.* 241, 1651-1653.
22. Walaas, O. & Walaas, E. (1974), *Acta Endocrinol.* 191, 93-129.
23. Sapirstein, U. S. & Scott, W. N. (1973), *J. Clin. Invest.* 52, 2379-2382.
24. Heaton, F. W. & Humphray, H. P. (1974), *J. Endocrinol.* 61, 53-61.

Priv.-Doz. Dr. R. Averdunk
Klinikum Steglitz
1000 Berlin 45
Hindenburgdamm 30