

6. Zusammenfassung

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

Beim Wiederkäuer wird Magnesium hauptsächlich aus dem Vormagen, speziell dem Pansen resorbiert. Der gerichtete Transport über das Pansenepithel erfolgt transzellulär und setzt daher voraus, dass spezifische Transportproteine die Aufnahme bzw. Abgabe von Mg^{2+} über die apikale bzw. basolaterale Membran der ruminalen Epithelzellen vermitteln.

Funktionelle *in vitro*-Studien an verschiedenen Geweben und Zellsystemen zeigten, dass der Mg^{2+} -Efflux hauptsächlich über einen Na^+/Mg^{2+} -Austauscher erfolgt. Dieses Transportsystem dient der Aufrechterhaltung der physiologischen intrazellulären freien Mg^{2+} -Konzentration (Mg^{2+}_i), welche für eine Vielzahl biologischer Prozesse von Bedeutung ist. Darüber hinaus soll der Austauscher bei Epithelien die Abgabe von Mg^{2+} über die basolaterale Membran vermitteln.

Untersuchungen an isolierten Epithelien des Schafpansens und an kultivierten ruminalen Epithelzellen gaben Hinweise auf die Existenz eines Na^+ -abhängigen Mg^{2+} -Transportes am Pansenepithel. Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es daher, den Na^+/Mg^{2+} -Austauscher als Mg^{2+} -Effluxmechanismus auf zellulärer Ebene zu charakterisieren.

Zu diesem Zweck wurde mittels fluoreszenzspektrometrischer Methoden die Mg^{2+} -Abgabe aus kultivierten ruminalen Epithelzellen unter verschiedenen Bedingungen geprüft. Insbesondere wurden der Einfluss der extrazellulären $[Na^+]$, die Wirkung von Inhibitoren sowie mögliche Regulationsmechanismen untersucht.

Die experimentellen Arbeiten führten zu folgenden Ergebnissen:

- Die Abgabe von Mg^{2+} aus Pansenepithelzellen (PEZ) wird überwiegend durch einen Na^+/Mg^{2+} -Austauscher vermittelt. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen lag der Anteil des Na^+ -abhängigen Mg^{2+} -Efflux bei 97 Prozent.
- Die Transportkapazität des Austauschers war abhängig von der extrazellulären Na^+ -Konzentration ($[Na^+]_e$). Sie stieg von $18.3 \pm 9.5 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{Zellen} \cdot \text{min}^{-1}$ im Na^+ -freien Medium auf $0.62 \pm 0.31 \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{Zellen} \cdot \text{min}^{-1}$ im Medium mit physiologischer $[Na^+]$ und

zeigte eine typische Sättigungskinetik. Mit Bezug auf die $[\text{Na}^+]_e$ wurden ein K_M -Wert von 24 mmol/l und eine maximale Transportkapazität (V_{\max}) von $11 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{Zellen} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$ ermittelt.

- Imipramin, ein Hemmstoff, von dem bekannt ist, dass er den $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher inhibiert, reduzierte die Mg^{2+} -Abgabe aus PEZ um 48%.
- Die Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers wird durch die intrazelluläre cAMP-Konzentration ($[\text{cAMP}]_i$) moduliert. Eine Erhöhung der $[\text{cAMP}]_i$ steigert den Mg^{2+} -Efflux um 55% gegenüber den Ausgangswerten. Ein Effekt von cAMP auf andere Mg^{2+} -Transportsysteme konnte ausgeschlossen werden.
- Eine Stimulation des Mg^{2+} -Efflux wurde auch nach Applikation von Prostaglandin E_2 (PGE_2) nachgewiesen.
- Neben dem $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher kann eine Mg^{2+} -Abgabe über einen Cobalt(III)hexamin-sensitiven Mechanismus (Mg^{2+} -Kanal) erfolgen. Dieser Vorgang war in Einzelfällen, insbesondere bei Zellen in einem fortgeschrittenen Differenzierungsstadium, zu beobachten.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass in der Zellmembran kultivierter PEZ ein $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher existiert. Das Transportprotein vermittelt bei physiologischen intra- und extrazellulären $[\text{Na}^+]$ den Hauptteil des Mg^{2+} -Effluxes. Die Regulation der Mg^{2+} -Abgabe erfolgt dabei über cAMP-abhängige Signaltransduktionswege. Der Austauscher ist von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der $[\text{Mg}^{2+}]_i$ im Rahmen der zellulären Mg^{2+} -Homöodynamik. Es kann davon ausgegangen werden, dass dem ruminalen $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher eine wesentliche Rolle im Prozess der Mg^{2+} -Resorption zukommt.

Schlagworte:

Mg^{2+} -Efflux, $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher, Schaf, Pansenepithelzelle, Mag-fura-2

6. Summary

Characterization of Mg²⁺ efflux mechanisms in cultered ruminal epithelial cells

The rumen is the major site of Mg²⁺ absorption in ruminants. The unidirectional transport across the ruminal epithelium is mediated by a transcellular pathway, indicating the existence of specific transport proteins for the uptake and release of Mg²⁺ across the apical and basolateral side of ruminal epithelial cells.

A Na⁺/Mg²⁺ exchanger was identified as the predominant Mg²⁺ efflux mechanism in functional *in vitro* studies of various tissues and cell systems. This transport system was observed to maintain the physiological free intracellular concentration of Mg²⁺ ([Mg²⁺]_i) by Mg²⁺ extrusion on the basolateral side in epithelial tissues. Evidence of a Na⁺ dependent Mg²⁺ transport mechanism in the ruminal epithelium of sheep was found in prior studies on isolated ruminal epithelium and cultured ruminal epithelial cells.

The aim of the present study was to confirm the previous findings and to characterize the Na⁺/Mg²⁺ exchanger by fluorescence spectrometric analysis of the cellular Mg²⁺ efflux under different conditions. Influences of the extracellular concentration of Na⁺ ([Na⁺]_e), effects of inhibitors on Mg²⁺ efflux and regulation mechanism were primarily investigated.

The following results were achieved:

- Extrusion of Mg²⁺ from ruminal epithelial cells (REC) is predominantly mediated by the Na⁺/Mg²⁺ exchanger with a share of 97 percent of total Mg²⁺ efflux under selected experimental conditions.
- The transport capacity was increased depending on [Na⁺]_e from 18.3±9.5 μmol·l⁻¹ cells·min⁻¹ in a Na⁺-free medium to 0.62±0.31 mmol·l⁻¹ cells·min⁻¹ in a medium with a physiological [Na⁺]_e according to a typical saturation kinetic. A K_M for extracellular Na⁺ of 24 mmol/l and a maximal transport capacity (V_{max}) of 11 mmol·l⁻¹ cells·15 min⁻¹ was calculated.
- Imipramine, known as an inhibitor of the Na⁺/Mg²⁺ exchanger, decreased the Mg²⁺ efflux by 48%.

- The activity of the $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ exchanger was modulated by intracellular cAMP concentration ($[\text{cAMP}]_i$). Rise of $[\text{cAMP}]_i$ increased the Mg^{2+} efflux by 55% compared to the initial values. Other Mg^{2+} transport systems were not affected by cAMP.
- Mg^{2+} efflux was also stimulated after application of prostaglandine E_2 (PGE_2).
- Finally, a cobalt(III)hexamine sensitive mechanism (Mg^{2+} channel) was observed in several cases, especially in cells at a late stage of differentiation. It is assumed to mediate Mg^{2+} efflux in addition to the $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ exchanger .

These results clearly demonstrate the existence of a $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ exchanger in the cell membrane of cultured REC. With a physiological intracellular and extracellular $[\text{Na}^+]$, Mg^{2+} efflux is mainly mediated by this transport protein under the control of a cAMP-dependent signaling pathway. Therefore, the exchanger is of great importance for the maintenance of the free $[\text{Mg}^{2+}]_i$ within cellular Mg^{2+} homeodynamics. The ruminal $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ exchanger can be assumed to play a considerable role in the process of Mg^{2+} resorption.

Keywords:

Mg^{2+} efflux, $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ exchanger, sheep, ruminal epithelial cell, Mag-fura-2