

## 2 Literatur

### 2.1 Eigenschaften und Funktionen von $vH^+$ -ATPasen

#### 2.1.1 Struktur der $vH^+$ -ATPasen

Die  $vH^+$ -ATPase ist ein relativ großes Protein mit einem Molekulargewicht von 750 kDa. Ihr in der Membran liegender  $V_0$ -Komplex besteht aus mindestens 3 Untereinheiten (a, d und c) und funktioniert als  $H^+$ -Kanal. Der im Zytosol lokalisierte  $V_1$ -Komplex besteht aus mindestens 7 Untereinheiten (A, B, C, D, E, F, G und H) und stellt unter ATP-Verbrauch die Triebkraft für den  $H^+$ -Transport bereit (Kane und Smardon, 2003; Wieczorek *et al.*, 2000).

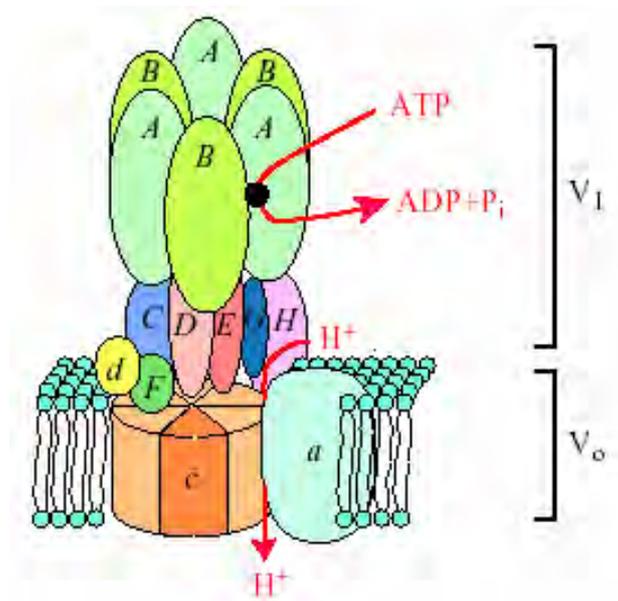


Abbildung 1: Aufbau der  $vH^+$ -ATPase übernommen aus: Futai *et al.*, 2000

### 2.1.2 Pharmakologie der vH<sup>+</sup>-ATPasen

In älteren Studien (Stanton *et al.*, 1990; Zeidel *et al.*, 1986) wurde zunächst N-ethylmaleimid (NEM) zur Hemmung der vH<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität genutzt, welches jedoch in höheren Konzentrationen ( $10^{-3}$  bis  $10^{-4}$  mol/l) auch P-ATPasen (z.B. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasen) inhibiert (Ehrenfeld und Klein, 1997; Kuwahara *et al.*, 1990). Substanzen, welche die ATP-Synthese (KCN, Oligomycin) oder allgemein den aktiven H<sup>+</sup>-Transport (Dicyclohexylcarbodiimide – DCCD; Diethylstilboestrol – DES) hemmen, sind ebenfalls wirksame Inhibitoren der vH<sup>+</sup>-ATPase (Stanton *et al.*, 1990; Zeidel *et al.*, 1986).

Ein beträchtlicher Fortschritt war die Auffindung von Substanzen (Bafilomycin A<sub>1</sub> bzw. Foliomycin, auch Concanamycin A genannt), welche die vH<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität spezifisch zu hemmen vermögen (Bebas *et al.*, 2002; Ehrenfeld und Klein, 1997; Hou und Delamere, 2000; Mattsson *et al.*, 1991). Beide Inhibitoren interagieren mit der V<sub>0</sub>-Untereinheit des Transportproteins (Zhang *et al.*, 1994).

In Tabelle 1 werden wesentliche Studien mit Bafilomycin A<sub>1</sub> bzw. Foliomycin und ihre Ergebnisse tabellarisch zusammengefasst. Es wird deutlich, dass Bafilomycin A<sub>1</sub> und Foliomycin wegen ihrer hohen Spezifität in niedrigen Konzentrationen von 5 nmol/l bis 50 µmol/l (Bafilomycin A<sub>1</sub>) bzw. von 1 pmol/l bis 5 µmol/l (Foliomycin) (in einer Studie von Marshansky und Vinay (1996) zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit bis 100 µmol/l) zum Einsatz kommen können. Es fällt auf, dass sehr unterschiedliche Konzentrationen zu Effekten führen. Daher kann die effektive Dosis nur in einem bestimmten Rahmen aus der Literatur entnommen werden und muss jeweils entsprechend der konkreten Umstände (z.B. Gewebetyp, Versuchsaufbau) angepasst werden.

## Literatur

Literatur	Tierart/Gewebe/Zelltyp	Inhibitor/Behandlung	Effekt
Mattsson <i>et al.</i> (1991)	Rind/Nierenmark Huhn/Knochenmark /präparierte Membran-Vesikel	Bafilomycin A1 ( $10^{-8}$ mol/l)	komplette Hemmung des $H^+$ -Transportes
Armitage und Wingo (1994)	Kaninchen/Niere/Innerer Streifen des äußeren medullären Sammelrohres (OMCD <sub>i</sub> )	Bafilomycin A1 (5 und $10 \times 10^{-9}$ mol/l)	Hemmung des $CO_2$ -Flux
Gerard <i>et al.</i> (1994)	NG108-15 Zellen Neuroblastoma x glioma hybrid	Bafilomycin A1 (1 bzw. $10 \times 10^{-6}$ mol/l)	Depolarisation der Membran um $15 \pm 2$ mV bzw. $16 \pm 2$ mV
McKinney und Moran (1995)	Maus/Makrophagen (J774)	Bafilomycin A1 ( $1,3 \times 10^{-5}$ mol/l)	Basaler $pH_i$ um 0,2 pH-Einheiten reduziert, späte Phase der pH-Erholung gehemmt.
Nordström <i>et al.</i> (1994)	Kaninchen/Osteoklasten	Bafilomycin A1 ( $2 \times 10^{-7}$ mol/l)	$NH_4Cl$ -Präpuls, $K^+$ -Medium: $pH_i$ -Erholung unbeeinflusst
Wadsworth und van Rossum (1994)	Ratte/Hepatozyten	Bafilomycin A1 ( $1 - 50 \times 10^{-6}$ mol/l)	Bafilomycin A1: kein $pH_i$ -Effekt, aber Anstieg des vesikulären pH mit $4$ und $8 \times 10^{-6}$ mol/l; Beeinflussung der $[K^+]_i$ ab $10^{-6}$ mol/l, $K^+$ -Verlust ab $10 \times 10^{-6}$ mol/l.
Zhang <i>et al.</i> (1994)	Kalb/Gehirn/ $V_o$ -Komplex-haltige Membranvesikel aus Neuronen	Bafilomycin A1 ( $5 \times 10^{-9}$ mol/l)	Hemmung des passiven $H^+$ -Transportes
Heming <i>et al.</i> (1995)	Schaf/ Alveoläre und peritoneale Makrophagen	Bafilomycin A1 ( $10^{-5}$ mol/l)	Reduktion des basalen $pH_i$ ; Verlangsamung der $pH_i$ -Erholung nach intrazellulärer Säurebelastung
Peral <i>et al.</i> (1995)	Huhn/Enterozyten	Bafilomycin A1 ( $2 \times 10^{-5}$ mol/l)	Kein Effekt auf die $pH_i$ -Erholung nach Ansäuerung
Marshansky und Vinay (1996)	Hund/Niere/kortikaler Tubulus/Bürstensaummembran-vesikel, angereichert mit Endosomen	Bafilomycin A1 ( $10^{-12}$ bis $10^{-8}$ mol/l) Foliomycin ( $10^{-12}$ - $10^{-8}$ mol/l)	Konzentrationsabhängige Hemmung der endosomalen Ansäuerung

## Literatur

Literatur	Tierart/Gewebe/Zelltyp	Inhibitor/Behandlung	Effekt
Nanda <i>et al.</i> (1996)	Mensch/Blut/Neutrophile	Bafilomycin A1 ( $10^{-7}$ mol/l) Foliomycin ( $10^{-7}$ mol/l)	Die Alkalisierung nach Stimulierung durch formyl-met-leu-phe (fMLP) wird durch die Inhibitoren verhindert.
Ehrenfeld und Klein (1997)	Frosch/Haut	Bafilomycin A1 ( $5 \times 10^{-6}$ mol/l) Foliomycin ( $5 \times 10^{-6}$ mol/l)	Hemmung der $\text{Na}^+$ -Absorption und der $\text{H}^+$ -Sekretion
Fernandez <i>et al.</i> (1997)	Ratte/Niere/Kortex/distaler Tubulus	Bafilomycin A1 ( $2 \times 10^{-7}$ mol/l) Foliomycin ( $4,6 \times 10^{-8}$ mol/l)	Kein Anstieg der transepithelialen Potentialdifferenz, erst nach Blockierung der $\text{Cl}^-$ -Kanäle
Nordström <i>et al.</i> (1997)	Kaninchen/Osteoklasten	Bafilomycin A1 ( $2 \times 10^{-7}$ mol/l)	$\text{pH}_i$ -Erholung nach $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Präpuls verhindert
Tomochika <i>et al.</i> (1997)	Maus/Harnblase	Kontrolle	$\text{pH}$ des Urin $5,62 \pm 0,24$
		Bafilomycin A1 ( $10^{-6}$ mol/l)	$\text{pH}$ des Urin $6,97 \pm 0,31$
		Foliomycin A ( $10^{-6}$ mol/l)	$\text{pH}$ des Urin $6,64 \pm 0,32$
Wu und Delamere (1997)	Kaninchen/ un pigmentierte Epithelzellen isoliert aus dem Ziliarkörper	Bafilomycin A1 ( $10^{-7}$ mol/l)	Verhindert $\text{pH}_i$ -Anstieg verursacht durch hohe $[\text{K}^+]_e$ . Verlangsamt $\text{pH}_i$ -Anstieg nach $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Präpuls. Kein Effekt auf basalen $\text{pH}_i$ .
Fernandez und Malnic (1998)	Hund/Niere/permanente Epithelzell-Linie: Madin-Darby canine kidney (MDCK)	Foliomycin ( $4,6 \times 10^{-8}$ mol/l)	Hemmung der $\text{Na}^+$ -unabhängigen $\text{pH}_i$ -Erholung
Wang und Telfer (1998)	Motte/Ovarien/Oozyten und Follikel-Zellen	Bafilomycin A1 ( $1,5 \times 10^{-7}$ mol/l)	Verhindert osmotisches Anschwellen als Antwort auf Protein-Kinase-Aktivierung

## Literatur

Literatur	Tierart/Gewebe/Zelltyp	Inhibitor/Behandlung	Effekt
Beyenbach <i>et al.</i> (2000)	Gelbfieber-Mosquito <i>Aedes aegypti</i> /Malpighi-Röhrchen	Bafilomycin A1 ( $5 \times 10^{-6}$ mol/l)	Reduktion der transepithelialen Flüssigkeitssekretion und des eigentlichen Kurzschluss-Stromes. Ohne Effekt wenn Applikation über Tubulus-Lumen.
Fernandez <i>et al.</i> (2000)	Hund/Niere/MDCK-Zellen	Foliomycin ( $4,6 \times 10^{-8}$ mol/l)	Hemmung der $\text{Na}^+$ -unabhängigen $\text{pH}_i$ -Erholung
Hou und Delamere (2000)	Kaninchen/ unpigmentierte Epithelzellen isoliert aus dem Ziliarkörper	Bafilomycin A <sub>1</sub> ( $10^{-7}$ mol/l)	Anstieg der $[\text{Na}^+]_i$
Bebas <i>et al.</i> (2002)	Spodoptera littoralis (Baumwoll-Blattwurm)/Vas deferens adulter Männchen	Bafilomycin A1 ( $2 \times 10^{-7}$ mol/l)	Alkalisierung des luminalen pH-Wertes
Schweigel und Martens (2003)	Schaf/Pansenepithelzellen	Bafilomycin A1 ( $5 \times 10^{-6}$ mol/l) Foliomycin ( $2 \times 10^{-6}$ mol/l)	Verminderung der $[\text{Mg}^{2+}]_i$ um 36% und des $\text{Mg}^{2+}$ -Influx um 38%.
Weng <i>et al.</i> (2003)	Gelbfieber-Mosquito <i>Aedes aegypti</i> /Malpighi-Röhrchen	Bafilomycin A1 ( $2,5 \times 10^{-5}$ mol/l)	Hemmung der $\text{vH}^+$ -ATPase-Aktivität
Nakamura (2004)	Schwein/Niere/Epithelzellen Linie LLC-PK <sub>1</sub>	Foliomycin ( $10^{-7}$ mol/l)	Vollständige Hemmung der $\text{pH}_i$ -Erholung nach $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ -Präpuls
Schweigel <i>et al.</i> (2004b)	Schaf/Pansenepithelzellen	Bafilomycin A1 ( $5 \times 10^{-6}$ mol/l) Foliomycin ( $2 \times 10^{-6}$ mol/l)	Verminderung der $\text{pH}_i$ -Erholungsrate um ca. 23%.

Tabelle 1: Chronologisch geordnete Zusammenstellung der Ergebnisse von Studien mit spezifischen Inhibitoren der  $\text{vH}^+$ -ATPase (ohne Anspruch auf Vollständigkeit)

### 2.1.3 Regulation der vH<sup>+</sup>-ATPasen

Im wesentlichen kommen drei verschiedene Mechanismen der Regulation in Betracht: (1) Änderung der kinetischen Aktivität der vH<sup>+</sup>-ATPase, (2) eine intrazelluläre Umverteilung der vH<sup>+</sup>-ATPase zwischen einem intrazellulären Pool und der Plasmamembran und (3) eine veränderte Anzahl der vorhandenen Pumpen (Gluck *et al.*, 1992). Darüber hinaus können der V<sub>1</sub> - und der V<sub>0</sub> - Komplex von einander getrennt werden (*disassembly*) und bei Bedarf wieder zusammengesetzt werden (*reassembly*) (Kane und Parra, 2000; Kane und Smardon, 2003; Merzendorfer *et al.*, 1997). Außerdem ist die allosterische Hemmung durch Bindung von Nucleosid Diphosphaten möglich (Finbow und Harrison, 1997) und es gibt spezifische aktivierende oder inhibierende Proteine (Gluck *et al.*, 1992).

#### 2.1.3.1 Membranpotential und extrazelluläre Ionenkonzentrationen

An verschiedenen Zellsystemen konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivität der elektrogenen H<sup>+</sup>-Pumpe durch Hyperpolarisation des Membranpotentials (E<sub>m</sub>) vermindert und durch Depolarisation des E<sub>m</sub> gesteigert werden kann (Fischer *et al.*, 1999; Gerard *et al.*, 1994; Wu und Delamere, 1997; Wu *et al.*, 1998). Zum Beispiel kam es in Untersuchungen, bei denen mittels Quabain die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibiert wurde, zu einer Bafilomycin-sensitiven Alkalisierung des Zytosols (Wadsworth und van Rossum, 1994; Wu und Delamere, 1997). Bei sehr vielen Zelltypen ist die K<sup>+</sup>- bzw. Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit von entscheidender Bedeutung für das Ruhemembranpotential (Fernandez *et al.*, 1997; Gerard *et al.*, 1994; Giglione und Gross, 1995; Harvey und Wieczorek, 1997; Wang und Telfer, 1998). Durch den Ausstrom von K<sup>+</sup>-Ionen über K<sup>+</sup>-Kanäle wird das Membranpotential an der Zellinnenseite negativ gegenüber der Zellaußenseite gehalten. Die Bedeutung der elektrogenen vH<sup>+</sup>-ATPase nimmt zu, wenn das E<sub>m</sub> depolarisiert wird. Dies geschieht z.B. durch eine Steigerung der extrazellulären Kaliumkonzentration ([K<sup>+</sup>]<sub>e</sub>) oder eine Inhibition von K<sup>+</sup>-Kanälen beispielsweise mittels BaCl<sub>2</sub>; siehe Wu und Delamere (1997). Durch hohe [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> wird das E<sub>m</sub> kurzgeschlossen (Schweigel, 2001); während eine Reduktion der [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> oder die Aktivierung von K<sup>+</sup>-Kanälen eine Hyperpolarisation verursachen. Durch Aktivierung bzw. Inaktivierung entsprechender Ionenkanäle und auch durch Veränderung der extrazellulären Konzentration dieser Ionen kann die vH<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität moduliert werden.

Bei Zellen aus dem nicht pigmentierten Ziliarepithel des Kaninchens konnten eine Alkalisierung des  $pH_i$  um 0,53 pH-Einheiten nachgewiesen werden, wenn diese in einer  $K^+$ -reichen Lösung ( $[K^+]_e = 81,5 \text{ mmol/l}$ ) inkubiert wurden (Wu und Delamere, 1997). Durch Applikation von Bafilomycin  $A_1$  wurde dieser Effekt signifikant reduziert. Auch eine spätere Studie von Wu *et al.* bestätigte den raschen Anstieg des  $pH_i$  infolge einer Membrandepolarisation durch eine hohe  $[K^+]_e$  ( $[K^+]_e = 81,5 \text{ mmol/l}$ ) (Wu *et al.*, 1998). Dass die ausgelöste Alkalisierung durch Hemmung der Carboanhydrase (Bereitstellung von Protonen aus  $CO_2$ ), nicht aber durch Amilorid (einen Inhibitor des NHE) reduziert werden konnte, bestätigt die Beteiligung einer  $H^+$ -ATPase-Aktivität an diesem Prozess.

In verschiedenen Studien wurde eine starke Abhängigkeit zwischen der  $vH^+$ -ATPase-Aktivität von der  $Cl^-$ -Konzentration ( $[Cl^-]$ ) im Medium bzw. von der  $Cl^-$ -Leitfähigkeit der Membran nachgewiesen (Fernandez und Malnic, 1998; Fernandez *et al.*, 2000). In  $Cl^-$ -freiem Medium bzw. nach Hemmung von apikalen  $Cl^-$ -Kanälen mittels NPPB kam es zu einer signifikanten Verminderung der  $vH^+$ -ATPase-vermittelten  $H^+$ -Sekretion. NPPB ist eine Substanz aus der Gruppe der Arylaminobenzoate oder auch Carboxylat-Analoga mit blockierender Wirkung auf  $Cl^-$ -Leitfähigkeiten. Bei Studien am distalen kortikalen Nierentubulus der Ratte führte NPPB zu einer Vertiefung der negativen transepithelialen Potentialdifferenz am Tubuluslumen und verhinderte eine luminale Ansäuerung (Fernandez *et al.*, 1997). NPPB verhindert sowohl die  $Na^+$ -unabhängige  $pH_i$ -Erholung als auch die zelluläre Alkalisierung nach luminaler Perfusion mit  $Cl^-$  (Malnic und Geibel, 2000). In dieser Studie fiel im  $Na^+$ - und  $Cl^-$ -freien Medium der  $pH_i$  ab und begann nach einigen Minuten wieder langsam anzusteigen. Dieser Anstieg wurde durch Bafilomycin und den  $Cl^-$ -Kanal-Blocker NPPB reduziert, nicht aber durch DIDS. DIDS ist ein Inhibitor von Anionenaustauschern (Wu und Delamere, 1997) und hemmt viele Bikarbonat-Transportwege (Huhn *et al.*, 2003).

An S3-Segmenten aus dem renalen proximalen Tubulus, die luminal und basolateral mit  $Na^+$ - und  $Cl^-$ -freiem Medium perfundiert wurden, wiesen Malnic und Geibel eine Bafilomycin- und NPPB-sensitive  $pH_i$ -Erholung (0,17 pH-Einheiten/min) nach (Malnic und Geibel, 2000). Diese  $vH^+$ -ATPase-abhängige Alkalisierung konnte durch Normalisierung der extrazellulären  $[Cl^-]$  (140 mmol/l) gesteigert werden. Weiterhin zeigten die Autoren, dass nach Azidifizierung des Zytosols eine Umverteilung intrazellulärer Vesikel von basolateral und perinukleär nach apikal erfolgt. Es kann

daher davon ausgegangen werden, dass präformierte, vesikuläre  $vH^+$ -ATPasen in die Zellmembran eingebaut werden. Die Translokation der Vesikel, sowie ihr Einbau in die apikale Membran waren ebenfalls  $Cl^-$ -abhängig. Auch Fernandez *et al.* bewiesen die Rolle von  $Cl^-$  für die elektrogene  $H^+$ -Sekretion an kortikalen distalen Tubuli von Schildkröten (Fernandez *et al.*, 1997). Die Tubuli wurden mit Elektrolytlösungen durchspült, die Bafilomycin  $A_1$ , Concanamycin A oder Amilorid enthielten. Unter diesen Bedingungen trat zunächst keine Veränderung der transepithelialen Potentialdifferenz ( $PD_t$ ) gegenüber der Kontrolle ein. Erst nach Hemmung der  $Cl^-$ -Kanäle mittels NPPB ( $10^{-5}$  mol/l) vertiefte sich die luminal negative  $PD_t$  um 2-4 mV.

Untersuchungen an der einzelligen Amöbe *Dictyostelium discoideum*, einem zellulären Schleimpilz, der sich an der Grenze zwischen einzelligen und vielzelligen Organismen befindet, zeigten, dass Chlorid-Ionen den ATP-abhängigen Aufbau eines Protonengradienten stimulieren (Giglione und Gross, 1995).

Marshansky und Vinay führten Untersuchungen an Endosomen von proximalen Tubuli durch. In Anwesenheit von Chlorid-Ionen und ATP wurde der Aufbau eines Protonengradienten beobachtet. Dieser Prozess ist von der Aktivität einer elektrogenen  $vH^+$ -ATPase abhängig und kann durch Bafilomycin  $A_1$  oder Foliomycin gehemmt werden. Blocker der  $Cl^-$ -Kanäle (DIDS und NPPB) reduzieren die Ansäuerung der Endosomen (Marshansky und Vinay, 1996).

Für die gut belegte Kopplung zwischen der  $vH^+$ -ATPase-Aktivität und der  $[Cl^-]$  des extrazellulären Milieus bzw. der  $Cl^-$ -Leitfähigkeit der Membran werden verschiedene Ursachen diskutiert (Fernandez und Malnic, 1998; Kaunitz *et al.*, 1985; Malnic und Geibel, 2000; Marshansky und Vinay, 1996; Schweigel und Martens, 2003; Wadsworth und van Rossum, 1994; Wang und Telfer, 1998). Zum einen wird angenommen, dass durch eine parallel zur elektrogenen  $H^+$ -Sekretion erfolgende  $Cl^-$ -Abgabe die Potentialeffekte der  $vH^+$ -ATPase teilweise kompensiert werden (Beyenbach *et al.*, 2000; Fernandez *et al.*, 1997; Fernandez und Malnic, 1998; Kaunitz *et al.*, 1985). Neben dem Shunt-Effekt wird zum anderen auch eine darüber hinaus gehende regulative Funktion von  $Cl^-$  angenommen. In Untersuchungen von Kaunitz *et al.* blieb die  $Cl^-$ -Abhängigkeit des  $H^+$ -Transportes auch nach Kurzschluss des  $E_m$  mit Valinomycin, einem  $K^+$ -Ionophor, bestehen und nur in Medien mit erniedrigter  $[Cl^-]$  zeigte sich eine deutliche Potentialabhängigkeit des  $H^+$ -Transportes (Kaunitz *et al.*, 1985). Die Autoren leiteten aus diesen Ergebnissen die Existenz einer

regulativen  $\text{Cl}^-$ -Bindungsstelle im intramembranösen Pumpensegment ab. Weiterhin scheint  $\text{Cl}^-$  für den Einbau  $\text{vH}^+$ -ATPase-haltiger Vesikel in die Zellmembran von Bedeutung zu sein (Malnic und Geibel, 2000). Madsen und Tisher beschrieben für Sammelrohrzellen die Insertion von aus dem Golgi-Apparat stammenden Protonenpumpen-haltigen Vesikeln in die tubulovesikulären Membranen, welche nach Stimulation der  $\text{H}^+$ -Sekretion mit der luminalen Plasmamembran verschmelzen, so dass Protonenpumpen in der luminalen Membran zur Verfügung stehen (Madsen und Tisher, 1985). Dieser zelluläre Transport von Vesikel wird durch Blockade von  $\text{Cl}^-$ -Kanälen gehemmt, die Mechanismen sind noch unklar (Malnic und Geibel, 2000).

### 2.1.3.2 Verfügbarkeit von Protonen

Neben dem  $E_m$  beeinflusst die intrazelluläre Verfügbarkeit von  $\text{H}^+$  die Aktivität der  $\text{vH}^+$ -ATPase. Die über die  $\text{vH}^+$ -ATPase sezernierten  $\text{H}^+$ -Ionen stammen größtenteils aus der Carboanhydrase-Reaktion, in welcher  $\text{CO}_2$  durch die Carboanhydrase in  $\text{H}_2\text{CO}_3$  umgewandelt wird.  $\text{H}_2\text{CO}_3$  dissoziiert dann in  $\text{H}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$  (Galfi *et al.*, 1981; Müller *et al.*, 2000). Daher wurden der transepitheliale Strom bzw. die  $\text{H}^+$ -Sekretion durch Erhöhung der extrazellulären  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -Konzentration signifikant gesteigert, weil  $\text{CO}_2$  durch die Zellmembran ins Zellinnere diffundiert (Galfi *et al.*, 1981; Müller *et al.*, 2000), während Inhibitoren der Carboanhydrase (Acetazolamid, Ethoxazolamid) zu einer Reduktion führten (Jensen *et al.*, 1997; Stetson und Steinmetz, 1983; Wu *et al.*, 1998).

Nach Untersuchungen von Stetson und Steinmetz (1983) scheint eine erhöhte  $\text{CO}_2$ -Konzentration insbesondere den Einbau von Pumpen aus vesikulären Membranen in die apikale Membran zu fördern, während die Neusynthese von Protonenpumpen kaum beeinflusst wird.

Wang und Telfer stellten Zusammenhänge zwischen dem Membranpotential und dem cytoplasmatischen pH-Wert fest, woraus sie schlossen, dass die Verfügbarkeit von Substrat für die Protonenpumpe diese aktiviert und so zur Hyperpolarisierung beitragen könnte (Wang und Telfer, 1998).

Gluck und Caldwell (1987) beschrieben für die aus boviner Niere gewonnene  $\text{vH}^+$ -ATPase ein pH-Optimum von 6,5 bis 7,2. Es zeigt sich aber ein gespaltenes pH-Optimum. Möglicherweise ist das durch Affinitätschromatographie gereinigte Enzym die Summe einer Mischung von Enzymen mit verschiedenen pH-Optima (Gluck und Caldwell, 1987). Doch auch bei einem pH-Optimum von 6,2

bei isolierter mikrosomaler  $vH^+$ -ATPase unterschied sich die Aktivität der Pumpe zwischen einem pH-Wert von 7,2 und 6,2 nur um 30% (Gluck *et al.*, 1992). Demnach spielen Änderungen des pH-Wertes innerhalb seiner physiologischen Grenzen keine herausragende Rolle für die Regulation der Pumpenaktivität. Bei Zitrusfrüchten arbeitet die  $vH^+$ -ATPase sogar im sehr sauren pH-Bereich bis zu 2,2 und im Insektendarm (Larven von *Manduca sexta*) im alkalischen Bereich bis zu einem pH-Wert von 12 (Finbow und Harrison, 1997).

### 2.1.3.3 Endo- bzw. Exozytose

Die  $vH^+$ -ATPase-Aktivität wird in Epithelien (Niere, Epididymis, Vas deferens, Harnblase, Froschhaut) häufig durch die Endo- bzw. Exozytose von  $vH^+$ -ATPase-haltigen Vesikeln in bzw. aus der Zellmembran gesteuert (Breton *et al.*, 2000; Ehrenfeld und Klein, 1997; Roussa *et al.*, 1998).

Wichtige Signale für den Einbau  $vH^+$ -ATPase-haltiger Vesikeln in die apikale Membran sind der  $pH_i$  bzw. der  $pCO_2$  (Ehrenfeld und Klein, 1997; Gluck *et al.*, 1992; Roussa *et al.*, 1998; Soleimani *et al.*, 1995). Entscheidend für die verstärkte Endozytose scheint ein initialer pH-Abfall zu sein, der durch  $CO_2$  induziert wird und welcher zu einer Steigerung der intrazellulären Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) führt (van Adelsberg und Al-Awqati, 1986).

Als regulatorische Signale für eine gesteigerte Aktivität der  $vH^+$ -ATPase kommen ebenfalls hohe extrazelluläre  $[Ca^{2+}]$  und niedrige  $[Na^+]$  in Betracht (Ehrenfeld und Klein, 1997). Fernandez *et al.* (2000) wiesen nach, dass der Einbau  $vH^+$ -ATPase-haltiger Vesikel in die Zellmembran  $Cl^-$ -abhängig ist.

Verschiedene bakterielle Toxine (Clostridien-Toxine, Botulinum Toxin A oder E, Tetanus-Toxin) können die Translokation der  $vH^+$ -ATPase und somit die elektrogene  $H^+$ -Sekretion inhibieren (Breton *et al.*, 2000). Außerdem sind Elemente des Zytoskeletts für den Transport der  $vH^+$ -ATPase zum apikalen Bereich der Epithelzellen notwendig (Bebas *et al.*, 2002; Breton *et al.*, 2000; Fernandez *et al.*, 2000).

### 2.1.3.4 Energiestatus der Zellen

Ein allgemein gültiger Regulationsmechanismus scheint die Dissoziation der  $V_1$ - von der  $V_0$ -Untereinheit der  $vH^+$ -ATPase zu sein, ein Prozess, der reversibel ist und im Zusammenhang mit Energie-/Substratmangel bzw. hohen Konzentrationen an ADP (Adenosindiphosphat) und freiem Phosphat ausgelöst wird (Finbow und Harrison,

1997; Kane und Parra, 2000; Merzendorfer *et al.*, 1997). Unter solchen Bedingungen steigt der Anteil zytosolischer, „freier“  $V_1$ -Untereinheiten stark an, welche nicht mehr zur ATP-Hydrolyse befähigt sind. Weiterhin wirken die isolierten  $V_0$ -Untereinheiten nicht als  $H^+$ -Kanal (Finbow und Harrison, 1997). Bei Normalisierung des Nährstoffangebotes lagern sich die  $V_1$ - und  $V_0$ -Untereinheiten sehr schnell wieder zu aktiven Pumpen zusammen, wofür der Abfall des  $pH_i$  als wichtiges Signal angesehen wird. Auch der häufig beschriebene hemmende Effekt von Nitrat auf die  $vH^+$ -ATPase (Gluck *et al.*, 1992) ist u.a. auf eine Dissoziation der  $V_1$ - von der  $V_0$ -Untereinheit zurückzuführen (Finbow und Harrison, 1997).

Nakamura konnte an Epithelzellen aus der Niere vom Schwein den aktivierenden Einfluss von Glukose beweisen. Die Glykolyse erforderte den Signalweg über die Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Nakamura, 2004).

### *2.1.3.5 Regulation durch intrazelluläre Proteine, intrazelluläre Signalkaskaden und Hormone*

Die Regulation der Pumpenaktivität erfolgt unter anderem durch zytosolische Proteine, welche inhibitorisch (14 – 20 kDa) bzw. aktivierend (35 kDa) wirken und bei verschiedenen intrazellulären pH-Werten aktiviert werden (Gluck *et al.*, 1992; Voltz *et al.*, 2001).

Weiterhin gibt es Hinweise auf eine hormonale Steuerung. Eine Steigerung der  $vH^+$ -ATPase-Aktivität wurde u.a. durch Aldosteron, Sekretin, Cortisol, Parathormon, Interleukin-1 und  $PGE_2$  (Prostaglandin  $E_2$ ) induziert, während hemmende Effekte nach Applikation von  $NO_2$  (Stickstoffdioxid), Calcitonin und Angiotensin II auftraten (Merzendorfer *et al.*, 1997; Väänänen *et al.*, 1990; Wu und Delamere, 1997).

Durch Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) konnte bei Follikelzellen der Motte *Hyalophora cercropia* eine Bafilomycin  $A_1$ -sensitive Hyperpolarisation des  $E_m$  nachgewiesen werden (Wang und Telfer, 1998). Diese wurde von einem Abfall des  $pH_i$  um 0,2 pH-Einheiten, einer Zunahme der normalerweise niedrigen  $Cl^-$ -Leitfähigkeit sowie einer osmotischen Schwellung der Follikelzellen begleitet. Letztere wurde durch nanomolare Konzentrationen von Bafilomycin  $A_1$  verhindert.

### 2.1.3.6 Regulation der Biosynthese

Die Biosynthese der  $vH^+$ -ATPase scheint in solchen Zellen strikt reguliert zu werden, in denen neben der Funktion bei der Ansäuerung intrazellulärer Kompartimente („house-keeping“) andere Funktionen erfüllt werden (Merzendorfer *et al.*, 1997). Die Transkription von Genen, welche für die B-Untereinheit kodieren, wird z.B. während des Wachstums oder während der Differenzierung (hämatopoetisches System) über cAMP/cGMP-abhängige Wege der Signaltransduktion gesteigert und durch Ecdysteroide gehemmt. Auch nach der Transkription ist eine Kontrolle durch *antisenseRNA* möglich (Wieczorek *et al.*, 2000). Im Zusammenhang mit einer respiratorischen Azidose (Hyperkapnie) konnte eine kurzfristige Zunahme der mRNA für die regulatorische B-Untereinheit der  $vH^+$ -ATPase nachgewiesen werden (Perry *et al.*, 2000).

### 2.1.4 Lokalisation und Funktionen von vH<sup>+</sup>-ATPasen

Die vH<sup>+</sup>-ATPasen befinden sich sowohl in den Membranen intrazellulärer Organellen und Strukturen (Mitochondrien; Golgi-Apparat, sekretorische und synaptische Vesikel, Lysosomen, Clathrin-coated Vesikel) (Harvey und Wieczorek, 1997; Merzendorfer *et al.*, 1997; Wieczorek *et al.*, 2000) als auch in Zellmembranen von nicht polarisierten Zellen (Makrophagen (Heming *et al.*, 1995) und Osteoklasten (Mattsson *et al.*, 1991; Väänänen *et al.*, 1990)) und von polarisierten Zellen (Epithelzellen des Magen-Darm-Traktes (Mattsson *et al.*, 1991; Schweigel und Martens, 2003; Suzuki und Kaneko, 1987; Wieczorek *et al.*, 1999), der Niere (Armitage und Wingo, 1994; Gluck *et al.*, 1992; Malnic und Geibel, 2000; Nakamura, 2004; Zeidel *et al.*, 1986), der Blase (Fernandez *et al.*, 1997; Harvey und Wieczorek, 1997; Madsen und Tisher, 1985; van Adelsberg und Al-Awqati, 1986), des Nebenhodens (Breton *et al.*, 2000; Harvey und Wieczorek, 1997; Pushkin *et al.*, 2000) und der Follikelzellen von Insekten (Wang und Telfer, 1998)). Auch die Plasmamembranen bestimmter Tumorzellen werden durch die vH<sup>+</sup>-ATPase energetisiert (Finbow und Harrison, 1997; Gerard *et al.*, 1994; Harvey und Wieczorek, 1997; Voltz *et al.*, 2001).

Da vH<sup>+</sup>-ATPasen Protonen elektrogen aus dem Zytosol in den extrazellulären Raum oder in Zellorganellen hinein transportieren, führt ihre Aktivität nicht nur zu einer Reduktion der Säurebelastung des Zytosols, sondern auch zu einer Ansäuerung der entsprechenden Kompartimente, zur Beeinflussung des E<sub>m</sub> und zur Schaffung eines Protonengradienten.

#### 2.1.4.1 Intrazelluläre Organellen

Eukaryotische Zellen besitzen in ihrem Zytoplasma Organellen, die von einer einfachen Membran umgeben sind. Diese Organellen haben verschiedene Funktionen im Rahmen der Endo- und Exozytose. Ihre Lumina sind sauer mit pH-Werten zwischen 4,5 und 6,5. Diese Ansäuerung wird durch vH<sup>+</sup>-ATPasen erreicht (Futai *et al.*, 2000; Wieczorek *et al.*, 1999). vH<sup>+</sup>-ATPasen wurden in ganz verschiedenen Organellen (Vakuolen von Hefen und Pflanzenzellen) nachgewiesen. Hier sind sie für die Akkumulation und den Transport spezifischer Substanzen (Hormone, Transmitter) von Bedeutung (Futai *et al.*, 2000; Moriyama *et al.*, 1992).

#### 2.1.4.2 Nicht polarisierte Körperzellen

Heming *et al.* zeigten, dass die  $vH^+$ -ATPase bei Makrophagen nicht nur wesentlich an der Aufrechterhaltung des basalen  $pH_i$  beteiligt ist, sondern auch an der  $pH_i$ -Erholung nach intrazellulärer Ansäuerung (Heming *et al.*, 1995). Bei ihren Untersuchungen führte Bafilomycin  $A_1$ , ein spezifischer Inhibitor der  $H^+$ -ATPase, zu einem schnellen und signifikanten Abfall des basalen  $pH_i$  um 0,2 pH-Einheiten. Weiterhin verursachte Bafilomycin  $A_1$  eine Verlangsamung der initialen Rate der  $pH_i$ -Erholung nach einer intrazellulären Säurebelastung.

#### 2.1.4.3 Epithelien

Bei Epithelzellen sind  $vH^+$ -ATPasen fast immer apikal lokalisiert. Durch die Aktivität der Pumpe werden Protonen aus dem Zytosol in das Lumen sezerniert ( $H^+$ -Gradient, proton-motif-force; pmf) und dabei ein elektrischer Gradient aufgebaut, d.h. die Potentialdifferenz über der apikalen Membran wird hyperpolarisiert (Innenseite negativ gegenüber der Außenseite). Entscheidend ist dabei, dass  $vH^+$ -ATPasen solche Gradienten in einem weiten Bereich unabhängig von der ionalen Zusammensetzung des extrazellulären Milieus aufrechterhalten können (Ehrenfeld und Klein, 1997).

Durch die Kopplung von  $vH^+$ -ATPasen mit unterschiedlichen Transportern können verschiedene Prozesse energetisiert werden. Sie sind bei einigen Zellen an der pH-Regulation beteiligt, dienen der Ansäuerung (Niere, Harnblase, Nebenhoden) oder der Alkalisierung (Mitteldarm von Insektenlarven) extrazellulärer Kompartimente und/oder dem Aufbau von Gradienten für die Resorption von Elektrolyten und Wasser (Froschhaut, Mitteldarm von Insektenlarven; Kiemen; Niere) (Ehrenfeld und Klein, 1997; Hou und Delamere, 2000; Kuwahara *et al.*, 1990; Wang und Telfer, 1998; Wieczorek *et al.*, 1999). So wird die Resorption von NaCl über die Froschhaut, ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel, unter physiologischen Bedingungen (extrem niedrige extrazelluläre  $[Na^+]$  von etwa 0,1 mmol/l) durch eine  $vH^+$ -ATPase energetisiert, die in den mitochondrienreiche Zellen des Stratum granulosum exprimiert wird (Ehrenfeld und Klein, 1997; Jensen *et al.*, 1997).

Bestimmte Veränderungen des extraepithelialen Milieus (z.B. im Säuren-Basen- oder Elektrolythaushalt) induzieren längerfristige Umstellungen im Sinne einer Adaptation. So konnte gezeigt werden, dass bei verstärktem Anfall von  $CO_2$  und/oder von schwachen Säuren ( $NH_4^+$ ) sowie unter dem Einfluss erhöhter extrazellulärer  $[K^+]$  und

erniedrigter  $[Na^+]$ , die Anzahl mitochondrienreicher Zellen in Epithelien ansteigt bzw. ihre Morphologie verändert wird (Ehrenfeld und Klein, 1997; Stetson und Steinmetz, 1983). Bestimmte Hormone (Aldosteron, Prostaglandine) scheinen diesen Prozess zu stimulieren (Page *et al.*, 1990). Man kann mitochondrienreiche Zellen als morphologisches Substrat der  $vH^+$ -ATPase bezeichnen. Eine Stimulation oder Hemmung der  $H^+$ -Sekretion wurde mit charakteristischen ultrastrukturellen Änderungen in verschiedenen epithelialen Zellen assoziiert, darunter auch die parietalen Zellen der Magenschleimhaut, die Carboanhydrase-reichen Zellen (CA-reiche Zellen) der Schildkrötenblase und die Zwischenzellen vom Typ I (I-Zellen) im Sammelrohr der Säugernieren. Eine elektroneutrale Kalium-aktivierte  $H^+$ -ATPase ist verantwortlich für  $H^+$ -Sekretion im Magen, wohingegen die Ansäuerung des Harnes in der Schildkrötenblase und in den Sammelrohren der Säugernieren durch eine elektrogene  $vH^+$ -ATPase vermittelt wird. Ungeachtet dieser Unterschiede haben die parietalen Zellen, die CA-reichen Zellen und die I-Zellen verschiedene morphologische Merkmale gemeinsam. Sie sind reich an Mitochondrien und enthalten zahlreiche tubulovesikuläre Membranstrukturen in ihrer apikalen Region. Nach Stimulation der  $H^+$ -Sekretion gibt es einen signifikanten Anstieg in der Oberfläche der apikalen Membran begleitet von einem Abfall der tubulovesikulären Membrankompartimente in diesen Zellen, wie durch morphometrische Analysen aufgedeckt wurde. Diese Entdeckungen lassen vermuten, dass  $vH^+$ -ATPase-haltige Membranen, aus dem tubulovesikulären Kompartiment in die apikale Membran eingebaut werden, um die  $H^+$ -Sekretion anzuregen. Eine Hypothese über Membran-Recycling wird vorgeschlagen, um die beobachteten morphologischen Veränderungen zu erklären (Madsen und Tisher, 1985).

Auch Jensen *et al.* bestätigen die Bedeutung von mitochondrienreichen Zellen als morphologisches Substrat der  $vH^+$ -ATPase. So wie bei dem häufigsten Zelltyp, den Hauptzellen, die basolateral lokalisierte  $Na^+/K^+$ -ATPase die aktive  $Na^+$ -Aufnahme ermöglicht, sind in den mitochondrienreichen oder Zwischenzellen in der apikalen Membran Protonenpumpen ausgebildet (Jensen *et al.*, 1997).

## 2.2 H<sup>+</sup>-sezernierende Prozesse bei ruminalen Epithelzellen

Für alle Zelltypen ist die Homöostase des zytosolischen pH-Wertes von immenser Bedeutung. Wichtige Transportsysteme für Protonen sind die Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher (NHE) sowie Protonenpumpen (H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase und vH<sup>+</sup>-ATPase) (Beyenbach *et al.*, 2000; Köttken *et al.*, 1994). Weiterhin werden H<sup>+</sup>-Leitfähigkeiten beschrieben (Peral *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1994). Auch andere Transportsysteme sind an der pH-Regulation wesentlich beteiligt. Bei vielen Zellen gibt es ein HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup>-Austauschersystem sowie weitere Bikarbonattransportsysteme (Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Symporter und Cl<sup>-</sup>/Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher) (Busche *et al.*, 1993; Ehrenfeld und Klein, 1997; Huhn *et al.*, 2003; Tobey *et al.*, 1993).

Am Pansenepithel sind nach bisherigen Kenntnissen der NHE (Böttcher, 2000; Gäbel *et al.*, 1996; Müller, 2000), verschiedene HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Transportsysteme (Bilk *et al.*, 2005; Müller, 2000), ein H<sup>+</sup>/Monokarboxylat-Kotransporter (MCT) (Müller, 2000) und die vH<sup>+</sup>-ATPase (Schweigel *et al.*, 2004a; Schweigel *et al.*, 2004b; Schweigel und Martens, 2003; Suplie, 2005) ausgebildet.

Der pH<sub>i</sub> ruminaler Epithelzellen wurde bisher nur in wenigen Studien direkt gemessen. In der nachfolgenden Tabelle 2 wurden Daten tabellarisch zusammengestellt, die zeigen, in welchem Rahmen sich bei diesem Zelltyp die pH<sub>i</sub>-Regulation abspielt.

In den eigenen Versuchen erfolgte eine Säurebelastung der PEZ durch extrazelluläre Gabe von 20 mmol/l Butyrat. Dies führt zu einer intrazellulären Ansäuerung der PEZ und anschließender pH<sub>i</sub>-Erholung. Es gibt zwei Wege, über die kurzkettige Fettsäuren (SCFA) von den Pansenepithelzellen aufgenommen werden (Müller, 2000). Undissoziierte SCFA sind lipophil und gelangen so durch die Zellmembran (Gäbel und Sehested, 1997; Gäbel *et al.*, 1991). Dissoziierte SCFA können mittels eines Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauschers oder eines SCFA<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher in die Zelle transportiert werden (John, 1996; Kramer *et al.*, 1996). Der Abbau der SCFA im Zellinneren führt zu einer Akkumulation ihrer Metaboliten (Laktat, β-Hydroxybutyrat und Azetoazetat), welche aufgrund ihrer nur geringen Lipophilität nicht oder kaum zellpermeabel sind. Da sie sehr niedrige pK-Werte haben, liegen sie bei einem pH<sub>i</sub> von 7,2 – 7,4 zu über 99% dissoziiert als Anionen vor (Müller, 2000).

Butyrat gelangt überwiegend in protonierter Form über den Weg der passiven Diffusion in die PEZ hinein (Gäbel und Sehested, 1997; Gäbel *et al.*, 1991;

John, 1996). Im Zellinneren dissoziiert Butyrat sehr rasch, wobei  $H^+$  freigesetzt werden. Dies führt zu einer Absenkung des  $pH_i$ .

Nach den bisher vorliegenden Untersuchungen kommt auch beim Pansenepithel dem NHE eine besondere Bedeutung für die  $pH$ -Regulation zu. Dies ergibt sich u.a. aus dem starken  $pH_i$ -Abfall nach Applikation von hohen Dosen (1 mmol/l) des Diuretikums Amilorid (Böttcher *et al.*, 2000) bzw. nach Entzug des extrazellulären Natriums (Schweigel *et al.*, 2000).

Medium (Zelltyp)	basaler $pH_i$	Ansäuerung mittels	$pH_i$ -Absenkung in $pH$ -Einheiten	$pH_i$ -Erholung in $pH$ -Einheiten	Autor
HEPES-gepuffertes $Na^+$ -Medium, $HCO_3^-$ -frei (Pk)	$7,4 \pm 0,07$	$NH_4^+/NH_3^-$ Präpuls	$0,53 \pm 0,05$	$0,36 \pm 0,04$ in 10 min	1
HEPES-gepuffertes $Na^+$ -Medium, $HCO_3^-$ -frei (Sk)	$7,6 \pm 0,08$	$NH_4^+/NH_3^-$ Präpuls	$0,52 \pm 0,04$	$0,22 \pm 0,04$ in 10 min	1
HEPES-gepuffertes $Na^+$ -Medium, $HCO_3^-$ -frei (Pk)	$7,37 \pm 0,09$	$CO_2/HCO_3^-$	$0,24 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,04$ in 11 min	1
HEPES-gepuffertes $Na^+$ -Medium, $HCO_3^-$ -frei (Sk)	$7,32 \pm 0,1$	$CO_2/HCO_3^-$	$0,25 \pm 0,05$	$0,24 \pm 0,04$ in 11 min	1
HEPES-gepuffertes $Na^+$ -Medium, $HCO_3^-$ -frei (Pk)	$7,35 \pm 0,05$	20 mmol/l Butyrat	$0,28 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,02$ in 10 min	1
HEPES-gepuffertes $Na^+$ -Medium, $HCO_3^-$ -frei (Sk)	$7,36 \pm 0,05$	20 mmol/l Butyrat	$0,35 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,01$ in 10 min	1
HEPES-gepuffertes $Na^+$ -Medium, $HCO_3^-$ -frei (Pk)	$7,43 \pm 0,04$	20 mmol/l D/L-Laktat	$0,21 \pm 0,03$	Keine Angabe	1

Medium (Zelltyp)	basaler pH <sub>i</sub>	Ansäuerung mittels	pH <sub>i</sub> -Wert nach Ansäuerung	pH <sub>i</sub> -Wert nach pH <sub>i</sub> -Erholung	Autor
HEPES-gepuffertes Na <sup>+</sup> -Medium, HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -frei ( <i>Pk</i> )	6,83 ± 0,1	20 mmol/l HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	6,67 ± 0,2	6,87 ± 0,2 in 10 min	2
HEPES-gepuffertes Na <sup>+</sup> -Medium, HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -frei ( <i>Pk</i> )	6,83 ± 0,1	20 mmol/l HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 20 mmol/l Butyrat	6,58 ± 0,13	6,76 ± 0,12 in 10 min	2
HEPES-gepuffertes Na <sup>+</sup> - und HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - freies Medium ( <i>Pk</i> )	6,42 ± 0,2	hohe [Mg <sup>2+</sup> ] <sub>e</sub>	6,24 ± 0,2	Keine pH <sub>i</sub> -Erholung in Abwesenheit von Na <sup>+</sup>	2
HEPES-gepuffertes K <sup>+</sup> -Medium, HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -frei ( <i>Pk</i> )	6,81 ± 0,03	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	2

Autoren: 1: Müller (Müller, 2000) 2: Schweigel (Schweigel *et al.*, 2000)  
*Pk*: primärkultivierte PEZ; *Sk*: subkultivierte PEZ

Tabelle 2: Tabellarische Übersicht zum basalen pH<sub>i</sub> und zur pH-Erholung nach einem Säureload bei kultivierten ruminalen Epithelzellen des Schafes

### 2.2.1 Allgemeine Charakteristika der Natrium-Protonenaustauscher

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher katalysieren den elektroneutralen Austausch von extrazellulären Na<sup>+</sup>-Ionen gegen intrazelluläre H<sup>+</sup>-Ionen im Verhältnis 1:1 und kommen in nahezu allen Säugerzellen ubiquitär vor. Es handelt sich um integrierte Membranproteine aus ca. 800 Aminosäuren, die sich aus transmembranären Domänen und einer zytoplasmatischen Domäne zusammensetzen (Noel und Pouyssegur, 1995). Alle bisher bekannten NHE-Isoformen werden durch intrazelluläre Protonen allosterisch aktiviert, regulieren den intrazellulären pH auf eine Na<sup>+</sup>-abhängige Weise und werden durch hohe Dosen des Diuretikums Amilorid gehemmt (Noel und Pouyssegur, 1995). Bisher sind neun verschiedene Isoformen des NHE bekannt (Zachos *et al.*, 2005). Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit unterscheiden sich die NHE-Isoformen hinsichtlich ihres Vorkommens in verschiedenen Geweben,

hinsichtlich ihrer kinetischen Charakteristika und in ihren Antworten auf äußere Stimuli (Yun *et al.*, 1995). Weiterhin zeigen sie Unterschiede in der Art ihrer transkriptionalen und posttranskriptionalen Regulation und in ihrer Sensibilität gegenüber Inhibitoren (Wakabayashi *et al.*, 1997). Der NHE1, die so genannte „housekeeper-Isoform“, kommt ubiquitär vor und ist bei polarisierten Zellen überwiegend in der basolateralen Membran lokalisiert. Seine Hauptfunktion ist die Regulation des  $\text{pH}_i$  und des Zellvolumens, wodurch ihm eine Bedeutung für das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung zukommt (Noel und Pouyssegur, 1995; Wakabayashi *et al.*, 1997; Yun *et al.*, 1995). Neben dem NHE1 wird auch der mitochondriale NHE6 in allen Zellen bzw. Geweben exprimiert (Counillon und Pouyssegur, 2000). Die NHE-Subtypen 2 und 3 kommen nur in den Epithelien der Niere (Noel und Pouyssegur, 1995; Schwark *et al.*, 1998), des Darmtraktes (Zachos *et al.*, 2005) und des Epididymis (Pushkin *et al.*, 2000) vor und sind hier apikal lokalisiert (Pushkin *et al.*, 2000; Zachos *et al.*, 2005). Zu den epithelialen Isoformen gehört auch der NHE4, der neben den genannten Organen auch im Magen und im Hippocampus exprimiert wird (Noel und Pouyssegur, 1995; Wakabayashi *et al.*, 1997). Alle epithelspezifischen Isoformen (NHE2, NHE3 und NHE4) haben Funktionen im Rahmen von transepithelialen Transportvorgängen, insbesondere im Zusammenhang mit der Resorption von  $\text{Na}^+$  (Noel und Pouyssegur, 1995).

Die NHE-Isoformen werden durch das Diuretikum Amilorid und seine analogen, auf Benzylguanidinium basierenden Derivate (z.B. HOE642 oder Cariporid, HOE694), Cimetidin, Clonidine und Hamalin gehemmt (Orlowski und Grinstein, 2004). Die Affinität zu diesen Inhibitoren ist Isoform-spezifisch. Die höchste Sensitivität zeigt der NHE1 ( $\text{NHE1} \geq \text{NHE2} \geq \text{NHE5} \geq \text{NHE3} \geq \text{NHE4}$ ) (Orlowski und Grinstein, 2004). Die um ein vielfaches höhere Sensitivität des NHE1 gegenüber dem NHE3 für Amilorid und dessen Analoga zeigt sich unabhängig von Tierart, Gewebe, Zelltyp, verschiedenen extrazellulären Bedingungen und Methoden. Ein hochselektiver Inhibitor des NHE3 ist S3226 (Schwark *et al.*, 1998). Tabelle 3 dient der zusammenfassenden Darstellung.

Subtypen	Amilorid (IC <sub>50</sub> µmol/l)	EIPA (IC <sub>50</sub> µmol/l)	HOE694 (IC <sub>50</sub> µmol/l)	S3226 (IC <sub>50</sub> µmol/l)	Zellen/Gewebe	Autor
NHE1	1,6	0,15			NHE der Ratte in AP-1 Zellen	1
	3	0,02	0,15		Übersichtsreferat	2
	10,7			3,6	Fibroblasten des Menschen	3
	40	0,1			Pankreaszellen der Ratte	4
NHE3	100	2,4			NHE der Ratte in AP-1 Zellen	1
	40-100	2-8	800		Übersichtsreferat	2
	49				LLC-PK <sub>1</sub> Zellen	5
	65				OK Zellen (Opossum)	5
	79				Kaninchen-BBM-Vesikel	5
	>100			0,71	OK Zellen (Opossum)	3
	160				PS-120 Fibroblasten	5
	200				Gallenblase des Kaninchen	6
	283			0,02	Fibroblasten des Menschen	3
	438			0,23	Fibroblasten der Ratte	3
				0,2	Porcine BBM-Vesikel	3

Autoren: 1: J. Orlowski (1993) 2: Noel und Pouyssegur (1995)  
 3: Schwark *et al.* (1998) 4: Delvaux *et al.* (1990)  
 5 : Soleimani *et al.* (1994) 6 : Silviani *et al.* (1996)

Tabelle 3: Tabellarische Übersicht zur Sensitivität des NHE1 bzw. NHE3 gegenüber spezifischen Hemmstoffen (übernommen von Böttcher (2000), modifiziert und ergänzt durch weitere Daten)

### 2.2.2 Natrium-Protonen-Austauscher bei Pansenepithelzellen

Die Kenntnisse über die im Pansenepithel vorkommenden NHE-Isoformen sowie deren funktionelle Bedeutung und Regulation sind bisher beschränkt. Die vorliegenden Untersuchungen erfolgten hauptsächlich im Zusammenhang mit der Absorption von  $\text{Na}^+$  (Gäbel *et al.*, 1996; Gäbel *et al.*, 1991). In diesen Versuchen zeigte sich eine Zeit- und Dosisabhängigkeit. Nach einer Minute waren 63%, nach 3 Minuten 57% und nach 10 Minuten 44% der  $\text{Na}^+$ -Aufnahme durch 2 mmol/l Amilorid zu hemmen. Der hemmende Effekt von Amilorid wurde durch einen Konzentrationsanstieg von 0,01 auf 2 mmol/l intensiviert.

Arbeiten von Böttcher (2000), Gäbel *et al.* (2002), Gäbel und Sehested (1997), Müller (2000) und Schweigel *et al.* (2000) bewiesen darüber hinaus die Bedeutung des NHE für die  $\text{pH}_i$ -Regulation bei ovinen PEZ. So wurden sowohl der basale  $\text{pH}_i$ , als auch die  $\text{pH}_i$ -Erholung nach intrazellulärer Ansäuerung durch Hemmstoffe des NHE (Amilorid, EIPA, HOE694) sowie durch  $\text{Na}^+$ -Entzug signifikant vermindert. In den Versuchen von Böttcher und Schweigel (2000) wurde durch die Zugabe von 1 mmol/l Amilorid eine Absenkung des  $\text{pH}_i$  von 7,06 auf 6,75 erreicht (Böttcher *et al.*, 2000). In den Versuchen von Müller (2000) war nach  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -Präpuls die  $\text{pH}_i$ -Erholung nach Zusatz von 10  $\mu\text{M}$  EIPA bei primärkultivierten PEZ um 58% und bei subkultivierten PEZ um 73% gegenüber der Kontrolle reduziert. Auch im Butyrat-haltigen Medium wurde die  $\text{pH}_i$ -Erholung durch Zusatz von EIPA vermindert, die Ergebnisse waren jedoch zum Teil statistisch nicht abzusichern.

Aufgrund der Reaktion auf bestimmte Stimuli (Hyperosmolalität, cAMP, Wachstumsfaktoren) sowie der Empfindlichkeit gegenüber spezifischen Hemmstoffen des NHE (Amilorid, EIPA, HOE694), wurde vermutet, dass bei PEZ mindestens die Subtypen 1 und 3 des NHE ausgebildet sind (Böttcher, 2000; Schweigel *et al.*, 2005). Versuche von Böttcher *et al.* (2000) und Gäbel *et al.* (1999) zeigten, dass der Amilorid-sensitive  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch durch cAMP gehemmt werden kann. Durch eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration ( $[\text{cAMP}]_i$ ) wird die Phosphorylierung durch Proteinkinasen angeregt (Böttcher, 2000). Da der NHE1 über die Proteinkinase aktiviert wird (Tse *et al.*, 1993), der NHE3 jedoch über die Proteinkinase gehemmt wird (Bookstein *et al.*, 1999), konnte aus der cAMP-vermittelten Reduktion des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausches indirekt auf die Existenz des NHE3 geschlossen werden (Böttcher *et al.*, 2000). Fetales Kälberserum, ein Wachstumsfaktor, stimuliert den Amilorid-sensitiven  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch (Gäbel *et al.*, 1996). Da bekannt ist, dass der

NHE1 durch Wachstumsfaktoren aktiviert wird (Noel und Pouyssegur, 1995), wurde aufgrund dieser Versuchsergebnisse die Existenz des NHE1 bei PEZ angenommen. Weil hohe Dosen von Amilorid die Proliferation von PEZ hemmten, während es durch Serumzugabe stimuliert werden konnte, vermuteten bereits Gäbel *et al.* (1996) dass die Zellen einen NHE1 exprimieren. Dies wurde durch Daten von Böttcher (2000) bestätigt. Die  $\text{pH}_i$ -Erholung nach einem Säureload mit Butyrat wurde in diesen Experimenten durch Applikation des NHE1-spezifischen Blockers HOE694 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) um 25 % reduziert. Steigende Amilorid-Konzentrationen führten zu einer vermehrten  $\text{pH}_i$ -Reduktion. So führte eine Konzentration von 250  $\mu\text{mol/l}$  zu einer 22%igen  $\text{pH}_i$ -Reduktion, 500  $\mu\text{mol/l}$  führten zu einer 48%igen  $\text{pH}_i$ -Reduktion und 1000  $\mu\text{mol/l}$  zu einer 100%igen  $\text{pH}_i$ -Reduktion (Böttcher, 2000).

In neueren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Hyperosmolalität den  $\text{Na}^+$ -Flux hemmt und den  $\text{pH}_i$  reduziert, während eine Erhöhung der  $[\text{cAMP}]_i$  durch Theophyllin den  $\text{pH}_i$  reduziert. Dieser  $\text{pH}_i$ -Abfall ist Folge der Hemmung des NHE3; es folgt eine  $\text{pH}_i$ -Erholung durch Aktivierung des NHE1 (Schweigel *et al.*, 2005).

Die Existenz von NHE1 und NHE3 konnte kürzlich durch den Nachweis der mRNA beider Transporter mittels RT-PCR bestätigt werden (Etschmann *et al.*, 2005; Schweigel *et al.*, 2005; Suplie, 2005).

### 2.2.3 $\text{H}^+$ -Monokarboxylat-Kotransporter

Das Pansenepithel deckt seinen hohen Energiebedarf durch den intraepithelialen Katabolismus von SCFA. Neben  $\text{CO}_2$  entstehen dabei Laktat,  $\beta$ -Hydroxybutyrat und Azetoazetat. Diese Säuren sind aufgrund ihrer geringen Lipophilität schlecht permeabel für Zellmembranen und bergen so die Gefahr einer intrazellulären Übersäuerung. Von anderen Zellarten ist bekannt, dass sie einen  $\text{H}^+$ /Monokarboxylat-Kotransporter (MCT) ausbilden, dieser konnte auch bei Pansenepithelzellen nachgewiesen werden (Gäbel *et al.*, 2002; Müller, 2000).

#### 2.2.4 vH<sup>+</sup>-ATPase

Erste Hinweise auf die Existenz einer vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase bei PEZ wurden im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Charakterisierung der Mechanismen des Mg<sup>2+</sup>-Transportes gefunden (Schweigel und Martens, 2003). Die Applikation von spezifischen Hemmstoffen (Bafilomycin A<sub>1</sub> und Foliomycin) der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase (Mattsson *et al.*, 1991) führte zu einer Absenkung der freien intrazellulären [Mg<sup>2+</sup>] und zu einer Verminderung der Mg<sup>2+</sup>-Aufnahme in isolierte Pansenepithelzellen (PEZ). Die beobachteten Effekte auf die Mg<sup>2+</sup>-Homöostase der PEZ und den Mg<sup>2+</sup>-Transport lassen sich über die Depolarisation des Membranpotentials (E<sub>m</sub>) erklären, die infolge der Hemmung der aktiven, elektrogenen H<sup>+</sup>-Sekretion eintritt. Eine Messung des E<sub>m</sub> erfolgte in diesen ersten Versuchen jedoch nicht. Im Zusammenhang mit dem Hemmstoffeinsatz kam es weiterhin zu der erwarteten Reduktion des basalen intrazellulären pH-Wertes (pH<sub>i</sub>). Nach Applikation von Bafilomycin A<sub>1</sub> war der pH<sub>i</sub> um 0,05 ± 0,01 pH-Einheiten und unter Foliomycin um 0,074 ± 0,05 pH-Einheiten erniedrigt.

Die Existenz von vH<sup>+</sup>-ATPasen wurde molekularbiologisch (RT-PCR und Western-Blot) sowie immunozytochemisch bestätigt (Schweigel *et al.*, 2004a). So wurde in der Gesamt-RNA von ovinen PEZ die mRNA der vH<sup>+</sup>-ATPase-Untereinheiten E und B durch RT-PCR gefunden. Sequenz-Vergleiche zwischen diesen PCR-Produkten und bovinen Sequenzen zeigten eine 99%ige (277/278) und 96%ige (433/448) Übereinstimmung für die vH<sup>+</sup>-ATPase-Untereinheiten E bzw. B. Ein 60-kDa immunoreaktiver Streifen, der zur vH<sup>+</sup>-ATPase-Untereinheit B gehört, wurde in Proteinlysaten von PEZ durch Immunoblotting identifiziert. Mit polyklonalen Antikörpern gegen die 60-kDa-Untereinheit der vH<sup>+</sup>-ATPase ließen sich PEZ intensiv anfärben.

### 2.3 Zusammenfassung der Literatur für die eigene Fragestellung

Vakuoläre  $H^+$ -ATPasen haben Bedeutung für die Ausbildung von chemischen und elektrischen Gradienten an Plasmamembranen. Bei Epithelzellen wird durch die elektrogene Sekretion von Protonen speziell die apikale Membran energetisiert, da infolge der Hyperpolarisation der Membran eine einwärts gerichtete elektrische Triebkraft für Kationen aufgebaut wird (siehe Abbildung 2). Die sezernierten  $H^+$ -Ionen stammen größtenteils aus der Carboanhydrase-Reaktion, in welcher  $CO_2$  (aus dem Zellstoffwechsel bzw. aus extrazellulären Quellen) zu  $H^+$  und  $HCO_3^-$  umgesetzt wird. Daher ergeben sich Beziehungen zwischen dem energetischen Status der Zellen, der Pumpenaktivität und der zellulären Transportleistung. Weiterhin ist bekannt, dass verschiedene Signale (cAMP,  $PGE_2$ , Angiotensin II u.a.) bzw. zelluläre (De- oder Hyperpolarisierung des  $E_m$ ,  $pH_i$ ,  $pCO_2$ ,  $[Ca^{2+}]_i$  u.a.) oder extrazelluläre Faktoren ( $[K^+]_e$ ,  $[Cl^-]_e$  u.a.) die Pumpenaktivität, den Ein- oder Ausbau in die Zellmembran und/oder die Biosynthese von  $vH^+$ -ATPasen beeinflussen und so regulatorisch wirksam werden.

Erst kürzlich konnte das Vorhandensein derartiger  $vH^+$ -ATPasen bei PEZ immunzytochemisch, durch den mRNA-Nachweis sowie durch den Nachweis des Proteins im Western-Blot gezeigt werden. Die bisher an isolierten ruminalen Epithelzellen durchgeführten funktionellen Untersuchungen machen deutlich, dass die  $Mg^{2+}$ -Aufnahme und die  $H^+$ -Sekretion in ihrer Ausprägung von der  $H^+$ -ATPase-Aktivität abhängig sind. Eine Beeinflussung anderer Vorgänge ( $Cl^-$ - und SCFA<sup>-</sup>-Influx sowie die  $HCO_3^-$ -Sekretion/Absorption) ist anzunehmen. Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass vakuoläre  $H^+$ -ATPasen durch ihre Beteiligung an der Ausbildung bzw. Aufrechterhaltung des  $E_m$  (elektrischer Gradient) von entscheidender Bedeutung für die Transportfunktion von PEZ sind (siehe Abbildung 2).

Produkte aus der bakteriellen Fermentation (z.B.  $CO_2$ , SCFA) scheinen die Aktivität der ruminalen  $vH^+$ -ATPase zu modulieren; dadurch können sie sich auf den Transport verschiedener Ionen (wie  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Mg^{2+}$ ) durch das Pansenepithel auswirken (Schweigel *et al.*, 2004b).

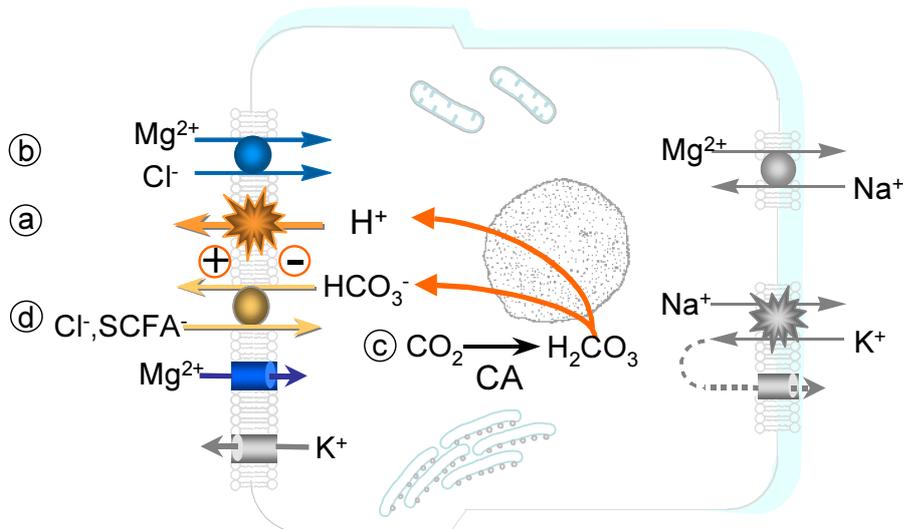


Abbildung 2: Lokalisation der  $vH^+$ -ATPase und ihre mögliche Bedeutung für einige ruminale Transportprozesse.

a: Energetisierung der (apikalen) Zellmembran durch die elektrogene Sekretion von  $H^+$ .

b: Es besteht eine einwärts gerichtete, elektrische Triebkraft für Kationen, durch welche u.a. die  $Mg^{2+}$ -Aufnahme ( $Mg^{2+}$ - $Cl^-$ -Kotransporter;  $Mg^{2+}$ -Kanal) ermöglicht wird. Bei hohen luminalen  $[K^+]$  nimmt die Bedeutung der elektrogenen  $H^+$ -ATPase zu. Die negativen Effekte einer erhöhten ruminalen  $[K^+]$  könnten daher unter bestimmten Bedingungen kompensiert werden.

c: Die  $H^+$  für die ATPase-Aktivität stammen in erster Linie aus der Carboanhydrase-Reaktion. Außerdem besteht ein Bedarf an ATP.

d: Kopplung zwischen  $H^+$ -ATPase,  $HCO_3^-$ -Sekretion und  $Cl^-$  bzw.  $SCFA^-$ -Resorption.

Im Rahmen der Dissertation wurden die Anteile verschiedener  $pH_i$ -Regulationsmechanismen am basalen  $pH$ -Wert und an der  $pH_i$ -Erholung nach einer Säurebelastung quantifiziert und es wurden Faktoren identifiziert, durch welche die  $vH^+$ -ATPase reguliert bzw. in ihrer Aktivität beeinflusst wird.

Zu diesem Zweck wurden fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an kultivierten, ruminalen Epithelzellen des Schafes durchgeführt, die es gestatteten, den intrazellulären  $pH$ -Wert sowie seine Veränderungen unter verschiedenen Bedingungen zu bestimmen.