

4 Ergebnisse

Die experimentellen Arbeiten hatten zum Ziel, die Rolle einer vH^+ -ATPase für die Regulation des intrazellulären pH-Wertes (pH_i) sowie für die pH_i -Erholung nach einer Säurebelastung mit der kurzkettigen Fettsäure Butyrat zu untersuchen.

Wegen der großen Bedeutung des ruminalen Na^+/H^+ -Austauschers (NHE) für die Aufrechterhaltung des pH_i , war es dazu notwendig, Na^+ -abhängige (NHE) und Na^+ -unabhängige (vH^+ -ATPase) Mechanismen der H^+ -Sekretion zu differenzieren und ihren quantitativen Anteil an der pH_i -Regulation bzw. an der Protonensekretion unter verschiedenen Bedingungen zu bestimmen. Die Identifizierung und Abgrenzung der Transportproteine erfolgte mittels spezifischer Inhibitoren:

- Amilorid, um Subtyp-unspezifisch den NHE zu hemmen
- HOE694, als spezifischem Hemmstoff des Subtyp 1 des NHE (NHE1)
- S3226, als spezifischem Hemmstoff des Subtyp 3 des NHE (NHE3)
- Foliomycin, als spezifischem Hemmstoff der vH^+ -ATPase.

Um eine Beteiligung des Na^+ - HCO_3^- -Kotransportes an der pH_i -Regulation auszuschließen, wurden alle Versuche in mit Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure (HEPES)-gepufferten, HCO_3^- -freien Medien durchgeführt. Da bekannt ist, dass die vH^+ -ATPase-Aktivität durch die ionale Zusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeitsraumes moduliert werden kann (Kane und Parra, 2000; Malnic und Geibel, 2000; Schweigel, 2001), wurden Versuchsreihen durchgeführt, in denen Medien mit einer reduzierten extrazellulären Cl^- -Konzentration bzw. einer erhöhten extrazellulären K^+ -Konzentration verwendet wurden.

Erste, sondierende Experimente wurden zur Rolle des second messengers cAMP für die pH_i -Regulation durchgeführt.

4.1 Rolle einer vH^+ -ATPase für die pH_i -Regulation

4.1.1 Effekt von Foliomycin auf den pH_i

Die PEZ wurden in HEPES-gepufferten NaCl-Medien mit bzw. ohne die kurzkettige Fettsäure Butyrat (20 mmol/l) aufgenommen. Danach wurde der spezifische vH^+ -ATPase-Inhibitor Foliomycin in einer Konzentration von 2 μ mol/l appliziert und der pH_i nach einer fünfminütigen Adaptationsphase über zehn Minuten gemessen.

Kontrollmessungen wurden mit gleich behandelten Zellen, jedoch ohne Inhibitorzusatz durchgeführt.

Abbildung 10 zeigt vergleichend den Zeitverlauf des pH_i bei PEZ, die in HEPES-gepufferten NaCl-Medien ohne bzw. mit Butyrat inkubiert wurden. Im HEPES-gepufferten Na^+ -Medium ohne Butyrat lag der pH_i der PEZ zum Beginn der Messung bei $7,59 \pm 0,19$ und stabilisierte sich im Messverlauf auf $7,43 \pm 0,22$. Bei Anwesenheit von Butyrat im Messmedium fiel der pH_i auf einen Wert von $7,02 \pm 0,12$ und stieg im Messverlauf auf einen Wert von $7,57 \pm 0,10$ an.

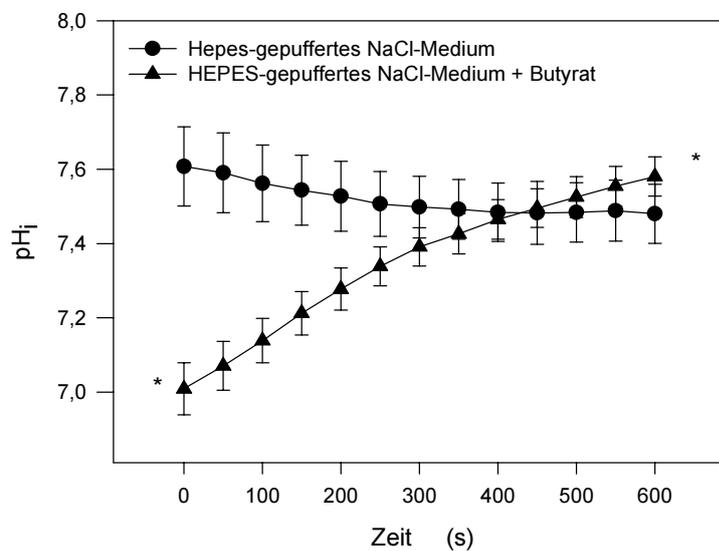


Abbildung 10: Zeitverlauf des pH_i von in HEPES-gepuffertem NaCl-Medium mit bzw. ohne Butyrat inkubierten ruminalen Epithelzellen. Jeder Messpunkt gibt den mittleren $\text{pH}_i \pm \text{SE}$ aus 5 (HEPES-gepuffertes NaCl-Medium) bzw. 6 (HEPES-gepuffertes NaCl-Medium mit Butyrat) Einzelmessungen wieder. * $P < 0,01$

In beiden Versuchsmedien führte die Applikation von Foliomycin zu einer Erniedrigung des pH_i . Im HEPES-gepufferten NaCl-Medium ohne Butyrat lag der pH_i nach Foliomycingabe bei $7,43 \pm 0,12$ zum Beginn und bei $7,35 \pm 0,18$ zum Ende der Messung. Abbildung 11 zeigt die sich durch Applikation des Inhibitors ergebende Reduktion von Ausgangs- ($-0,16 \pm 0,03$) und End- pH_i ($-0,07 \pm 0,07$) gegenüber den Kontrollwerten. Der Effekt von Foliomycin wird bei Betrachtung der H^+ -Konzentration im Zytosol ($[\text{H}^+]_i$) noch deutlicher. Fünf Minuten nach der Inhibitorapplikation war die

$[H^+]_i$ von $31,5 \pm 14,5$ nmol/l auf $48,9 \pm 25,7$ nmol/l, d.h. um 45 ± 11 %, angestiegen. Am Ende der Messungen lag die $[H^+]_i$ der Foliomycin-behandelten Zellen im Mittel nur noch 22 % über derjenigen der Kontrollzellen.

Im butyrathaltigen Medium war der initiale pH_i in Anwesenheit von Foliomycin auf $6,83 \pm 0,11$, also um $0,19 \pm 0,03$ pH-Einheiten, reduziert. Obwohl auch bei den Foliomycin-behandelten Zellen nach dem Säureload eine pH_i -Erholung eintrat, stieg der pH_i bis zum Ende der Messung nur auf $7,39 \pm 0,15$ an. Dies entspricht einer Reduktion des während der Messung erreichten Endwertes um $0,18 \pm 0,07$ pH-Einheiten. Die Daten sind zusammenfassend in Abbildung 11 dargestellt.

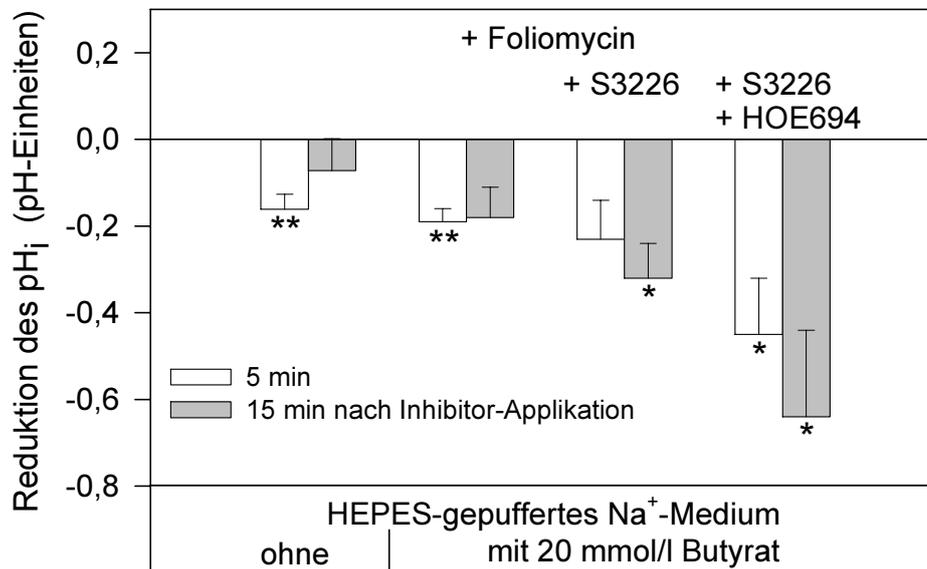


Abbildung 11: Effekt von Foliomycin sowie von Inhibitoren des Na^+/H^+ -Austauschers auf den intrazellulären pH -Wert von in HEPES-gepufferten $NaCl$ -Medien mit bzw. ohne Butyrat inkubierten Pansenepithelzellen. Dargestellt ist die gegenüber den Kontrollmessungen eingetretene Reduktion des pH_i am Beginn sowie am Ende der Messung. Foliomycin ($2 \mu\text{mol/l}$) wurde allein oder in Kombination mit S3226 ($10 \mu\text{mol/l}$) bzw. S3226 und HOE694 ($100 \mu\text{mol/l}$) verabreicht. Die Säulen geben die Mittelwerte \pm SE für jeweils 4 - 5 Einzelmessungen an. * $P < 0,05$ vs. Kontrollen; ** $P < 0,01$ vs. Kontrollen.

Bei einigen der im Butyrat-haltigen Medium durchgeführten Messungen (siehe Abbildung 12A) näherte sich der pH_i der Foliomycin-behandelten PEZ am Ende dem pH_i der Kontrollzellen an.

Dieser Effekt konnte mittels einer zusätzlichen Gabe der NHE-Inhibitoren HOE694 und/oder S3226 unterdrückt werden. Wie Abbildung 11 zeigt, wurde der pH_i der PEZ bei kombinierter Applikation von Foliomycin und S3226 um $0,23 \pm 0,1$ am Beginn und um $0,32 \pm 0,08$ pH-Einheiten am Ende der Messperiode abgesenkt. Waren neben Foliomycin beide NHE-Inhibitoren im Medium präsent, wurde der pH_i am Beginn der Messungen um $0,45 \pm 0,14$ und um $0,64 \pm 0,2$ pH-Einheiten am Ende der Messperiode reduziert.

4.1.2 Effekt von Foliomycin auf die pH_i -Erholung nach einem Säureload

Die extrazelluläre Gabe von Butyrat führt zu einer intrazellulären Ansäuerung der PEZ und anschließender pH_i -Erholung (siehe auch Kapitel 2.2).

Die Absenkung des pH_i führte bei Kontrollzellen, aber auch bei den Foliomycin-behandelten Zellen zur Aktivierung pH_i -regulierender Systeme und somit zu einer Erholung des pH_i im Verlaufe der Messung (Abbildungen 10 und 12 A). Die pH_i -Erholungsrate der Kontrollzellen lag im Mittel bei $0,57 \pm 0,05$ pH-Einheiten/10 min. Wie die in Abbildung 12 A dargestellten Originalmessungen verdeutlichen, war der Effekt von Foliomycin auf die pH_i -Erholung nicht einheitlich. In einigen Versuchen hemmte Foliomycin die pH_i -Erholung signifikant, während in anderen Versuchen die pH_i -Erholung nach der Foliomycin-Behandlung stimuliert wurde. Daher unterscheidet sich die durchschnittliche pH_i -Erholungsrate Foliomycin-behandelter PEZ mit $0,56 \pm 0,05$ nicht von derjenigen der in den Versuchen mitgeführten Kontrollzellen, welche bei $0,55 \pm 0,05$ lag.

Nach Applikation von Foliomycin in Kombination mit dem NHE3-Inhibitor S3226 ($10 \mu\text{mol/l}$) kam es tendenziell zu einer Verminderung der pH_i -Erholung, die jedoch keine Signifikanz erreichte. In den Kontrollmessungen lag die pH_i -Erholung bei $0,84 \pm 0,14$ pH-Einheiten und in den Messungen mit beiden Inhibitoren bei $0,75 \pm 0,12$ pH-Einheiten.

Erst wenn zusätzlich zum Foliomycin die NHE-Inhibitoren HOE694 ($100 \mu\text{mol/l}$) und S3226 ($10 \mu\text{mol/l}$) appliziert wurden, kam es zu einer signifikanten Erniedrigung der pH_i -Erholungsrate. Letztere lag in den Kontrollmessungen im Mittel bei $0,69 \pm 0,01$ pH-Einheiten / 10 min und wurde um $0,19 \pm 0,08$ pH-Einheiten / 10 min, d.h. auf $0,51 \pm 0,08$ pH-Einheiten / 10 min reduziert.

In Abbildung 12 B sind die Inhibitoreffekte zusammenfassend dargestellt.

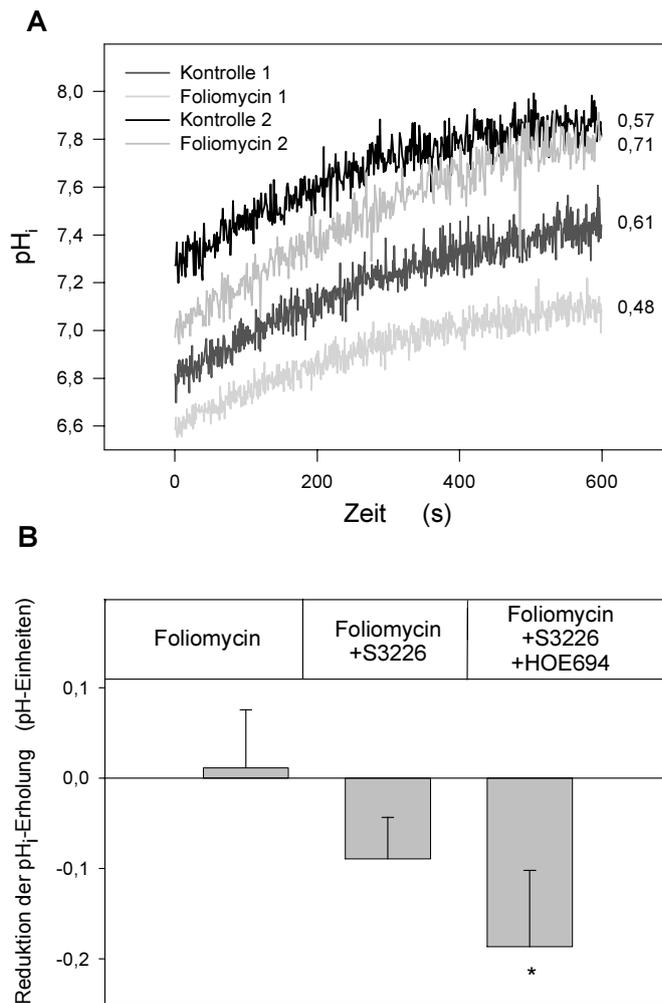


Abbildung 12: Effekt von Foliomycin und von NHE-Inhibitoren auf die Butyrat-induzierte p_{H_i}-Erholung.

A: Wirkung von Foliomycin (Originalmessung)

B: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung von Foliomycin und von Foliomycin in Kombination mit S3226 sowie von Foliomycin in Kombination mit S3226 und HOE694. Gezeigt werden die Mittelwerte ± SE aus jeweils 4 Einzelmessungen.

PEZ wurden mit Foliomycin (2 µmol/l, A) oder mit einer Kombination (B) aus Foliomycin (2 µmol/l), HOE694 (100 µmol/l) und S3226 (10 µmol/l) behandelt. Kontrollzellen wurden ohne Inhibitorzusatz inkubiert. * P < 0,05 vs. Kontrollen

4.2 Bedeutung des NHE für die pH_i -Regulation nach einem Säureload

Es ist bekannt, dass dem Na^+/H^+ -Austauscher (NHE) nach Ausschaltung HCO_3^- -abhängiger Mechanismen eine große Bedeutung für die pH_i -Regulation zukommt. Daher sollte durch Inhibitorstudien der Anteil des NHE bzw. seiner Subtypen 1 (NHE1) und 3 (NHE3) für die Einstellung des pH_i und die pH_i -Erholung nach einem Säureload untersucht werden. Alle Experimente wurden in HEPES-gepuffertem NaCl-Medium mit 20 mmol/l der SCFA Butyrat durchgeführt.

Wie Abbildung 13 zeigt, führte auch in den eigenen Untersuchungen Amilorid, ein Subtyp-unspezifischer NHE-Inhibitor, bereits in einer Dosis von 250 $\mu\text{mol/l}$ zu einer signifikanten Reduktion des pH_i der PEZ. Zu Beginn der Messungen lag der pH_i unter Kontrollbedingungen bei durchschnittlich $6,92 \pm 0,15$, während er in Anwesenheit von 0,25 mmol/l Amilorid auf $6,04 \pm 0,13$, also um $0,88 \pm 0,28$ pH-Einheiten, reduziert war. Im Messverlauf stieg der pH_i bei den Kontrollzellen auf durchschnittlich $7,13 \pm 0,09$ und bei den Amilorid-behandelten Zellen auf durchschnittlich $6,12 \pm 0,16$ an. Letztere wiesen somit am Ende der Messung gegenüber den Kontrollzellen einen um $1 \pm 0,25$ pH-Einheiten reduzierten pH_i auf. Nach Amilorid-Applikation wurde darüber hinaus die Butyrat-induzierte pH_i -Erholung von $0,21 \pm 0,06$ pH-Einheiten/10 min (Kontrollen) auf $0,09 \pm 0,03$ pH-Einheiten/10 min, d.h. um $0,12 \pm 0,03$ pH-Einheiten vermindert.

Um die Subtypen 1 und 3 zu differenzieren, wurden im Weiteren Experimente mit dem NHE1-spezifischen Inhibitor HOE694 und dem NHE3-spezifischen Inhibitor S3226 durchgeführt.

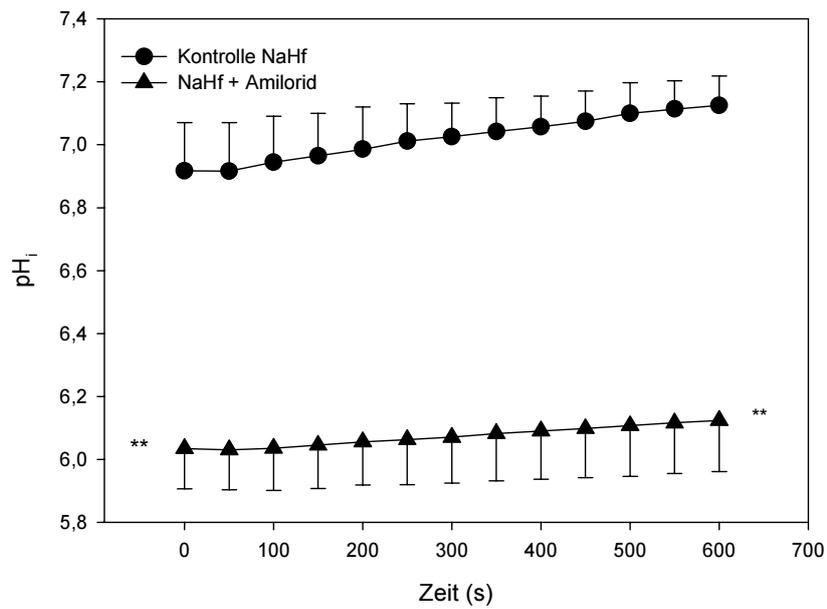


Abbildung 13: Zeitverlauf des pH_i bei Amilorid-behandelten Pansenepithelzellen. PEZ wurden in HEPES-gepuffertem, butyrathaltigem Na^+ -Medium aufgenommen und mit $250 \mu\text{mol/l}$ Amilorid behandelt. Kontrollmessungen wurden ohne Inhibitor durchgeführt. Jeder Messpunkt gibt den mittleren $\text{pH}_i \pm \text{SE}$ aus jeweils 3 Einzelmessungen an. ** $P < 0,01$

4.2.1 Effekt von HOE694 und von S3226 auf den pH_i

Abbildung 14 zeigt Originalmessungen des pH_i von PEZ unter Kontrollbedingungen sowie in Anwesenheit der NHE1- bzw. NHE3-Inhibitoren HOE694 und S3226. Es wird deutlich, dass beide Hemmstoffe eine Verminderung des pH_i bewirken.

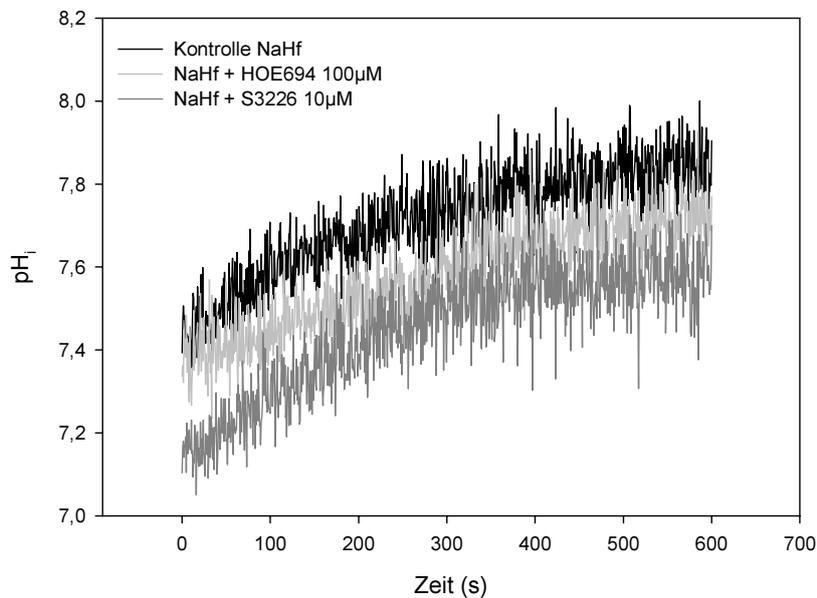


Abbildung 14: Wirkung von Inhibitoren der NHE-Subtypen 1 und 3 auf den pH_i von Panseneepithelzellen (Originalmessungen).

In Tabelle 5 wurden jeweils die am Beginn bzw. am Ende der Messung ermittelten pH_i -Werte für Kontrollzellen und für die mit den Inhibitoren behandelten Zellen zusammengefasst.

Abbildung 15 zeigt zusammenfassend die durch die Inhibitoren verursachten Reduktionen des pH_i -Wertes gegenüber den Werten bei unbehandelten Kontrollzellen.

Wie die Daten bzw. Darstellungen verdeutlichen, löste die Applikation von HOE694 einen konzentrationsabhängigen Abfall des pH_i aus. Maximale Hemmeffekte wurden mit 100 $\mu\text{mol/l}$ HOE694 erreicht. Bei dieser Dosierung wurden der Ausgangs- pH_i um $0,29 \pm 0,01$ und der End- pH_i um $0,39 \pm 0,04$ pH-Einheiten reduziert.

Der NHE3-Inhibitor S3226 löste bereits in einer Dosierung von 10 $\mu\text{mol/l}$ eine signifikante Reduktion des pH_i aus. Gegenüber den pH_i -Werten unbehandelter Kontrollzellen war der Ausgangs- pH_i bei Einsatz dieser Konzentration um $0,2 \pm 0,06$ pH-Einheiten und der End- pH_i um $0,23 \pm 0,08$ pH-Einheiten abgesenkt

(Abbildung 15). Mit höheren S3226-Dosierungen von 50 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 100 $\mu\text{mol/l}$ waren 5 min nach Blockergabe zunächst keine signifikanten Effekte auf den Ausgangs- pH_i nachweisbar ($-0,001 \pm 0,15$ bzw. $-0,09 \pm 0,09$ pH-Einheiten). Weiterhin fällt die große Streuung der Werte auf. Auch am Ende der 10 Minuten dauernden Messphase zeigte sich mit 50 $\mu\text{mol/l}$ S3226 nur eine geringe Wirkung ($-0,10 \pm 0,21$ pH-Einheiten) und eine große Varianz des Inhibitoreffektes. Im Unterschied dazu wurde mit 100 $\mu\text{mol/l}$ des Inhibitors eine signifikante pH_i -Reduktion des Endwertes um $0,33 \pm 0,07$ pH-Einheiten erreicht.

In einer weiteren Versuchsserie wurden die NHE-Inhibitoren HOE694 (100 $\mu\text{mol/l}$) und S3226 (10 $\mu\text{mol/l}$ oder 50 $\mu\text{mol/l}$) kombiniert appliziert (Tabelle 5, Abbildung 15). Bei beiden S3226-Dosierungen wurde der initiale pH_i um $0,14 \pm 0,04$ pH-Einheiten und der End- pH_i um $0,29 \pm 0,04$ pH-Einheiten reduziert.

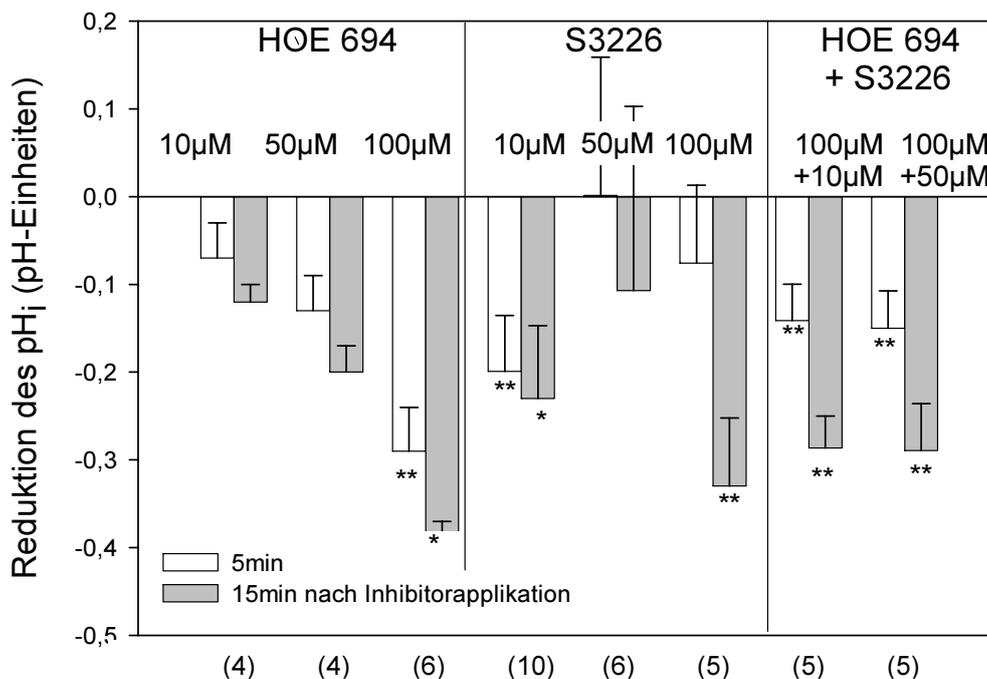


Abbildung 15: Effekt von HOE694 und von S3226 auf den pH_i ruminaler Epithelzellen. Angegeben ist die Reduktion des Ausgangs- bzw. End- pH_i gegenüber den Kontrollwerten. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SE. Die Zahlen in den Klammern geben die Anzahl der durchgeführten Einzelexperimente an. * $P < 0,05$ vs. Kontrollen; ** $P < 0,01$ vs. Kontrollen

Ergebnisse

| Inhibitor bzw. Dosis (in $\mu\text{mol/l}$) | n | AW \pm SE | EW \pm SE | $\Delta\text{pH}_i \pm$ SE |
|---|----|-------------------|-------------------|----------------------------|
| HOE694 | | | | |
| 0 (Kontrolle) | 4 | 6,74 \pm 0,14 | 6,99 \pm 0,16 | 0,23 \pm 0,01 |
| 10 | 3 | 6,67 \pm 0,12 | 6,87 \pm 0,11 | 0,19 \pm 0,01 |
| 50 | 3 | 6,61 \pm 0,14 | 6,79 \pm 0,15 | 0,17 \pm 0,02 |
| 100 | 3 | 6,45 \pm 0,06** | 6,6 \pm 0,06* | 0,16 \pm 0,01* |
| S3226 | | | | |
| 0 (Kontrolle zu 10 $\mu\text{mol/l}$) | 8 | 7,19 \pm 0,09 | 7,57 \pm 0,09 | 0,43 \pm 0,08 |
| 10 | 10 | 6,99 \pm 0,09** | 7,34 \pm 0,08* | 0,35 \pm 0,06 |
| 0 (Kontrolle zu 50 $\mu\text{mol/l}$) | 4 | 7,15 \pm 0,09 | 7,53 \pm 0,11 | 0,37 \pm 0,13 |
| 50 | 6 | 7,15 \pm 0,16 | 7,42 \pm 0,1 | 0,29 \pm 0,05 |
| 0 (Kontrolle zu 100 $\mu\text{mol/l}$) | 3 | 7,25 \pm 0,16 | 7,7 \pm 0,1 | 0,49 \pm 0,11 |
| 100 | 5 | 7,13 \pm 0,1 | 7,37 \pm 0,06** | 0,24 \pm 0,08** |
| HOE694 + S3226 | | | | |
| 0 (Kontrolle) | 5 | 7,35 \pm 0,31 | 7,57 \pm 0,26 | 0,45 \pm 0,12 |
| 100 + 10 | 5 | 7,11 \pm 0,19** | 7,23 \pm 0,21** | 0,25 \pm 0,11* |
| 100 + 50 | 5 | 7,1 \pm 0,22** | 7,23 \pm 0,24** | 0,24 \pm 0,09** |

Tabelle 5: Effekt von HOE694 und von S3226 auf den pH_i und die pH_i Erholungsrate von Pansenepithelzellen. Die Anzahl der durchgeführten Einzelerperimente wird in der Spalte „n“ angegeben. *P < 0,05; ** P < 0,01

4.2.2 Effekt von HOE694 und von S3226 auf die Butyrat-induzierte pH_i -Erholung

In Tabelle 5 wurden die Raten der pH_i -Erholung für Kontrollzellen sowie für die mit HOE694 und/oder S3226 behandelten PEZ zusammengestellt. Abbildung 16 zeigt zusammenfassend die durch die Applikation der Inhibitoren verursachte Abnahme der pH_i -Erholung.

Die Anwesenheit von 10, 50 oder 100 $\mu\text{mol/l}$ HOE694 im Medium führte zu einem konzentrationsabhängigen Abfall der pH_i -Erholung. Die stärksten Effekte wurden mit 100 $\mu\text{mol/l}$ HOE694 gesehen. Gegenüber dem Kontrollwert kommt es bei dieser Dosierung zu einer Verminderung der pH_i -Erholungsrate um $0,07 \pm 0,02$ pH-Einheiten (Abbildung 16).

Gegenüber dem Kontrollwert löste S3226 in einer Dosierung von 10 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 100 $\mu\text{mol/l}$ eine Reduktion der pH_i -Erholung aus, die bei $0,08 \pm 0,04$ bzw. bei $0,24 \pm 0,04$ pH-Einheiten lag. Wie Abbildung 16 zeigt wurde mit einer Dosierung von 50 $\mu\text{mol/l}$ die pH_i -Erholung um $0,07 \pm 0,09$ pH-Einheiten reduziert.

Die Butyrat-induzierte pH_i -Erholung wurde um $0,15 \pm 0,05$ pH-Einheiten vermindert, wenn neben HOE694 (100 $\mu\text{mol/l}$) 10 $\mu\text{mol/l}$ S3226 appliziert wurden und um $0,16 \pm 0,03$ pH-Einheiten mit 50 $\mu\text{mol/l}$ S3226 im Medium. Zum Vergleich wurde die mit 250 $\mu\text{mol/l}$ des Subtyp-unspezifischen NHE-Blockers Amilorid erzielte Reduktion der pH_i -Erholung in Abbildung 16 ebenfalls dargestellt. Sie liegt bei $0,14 \pm 0,02$ pH-Einheiten.

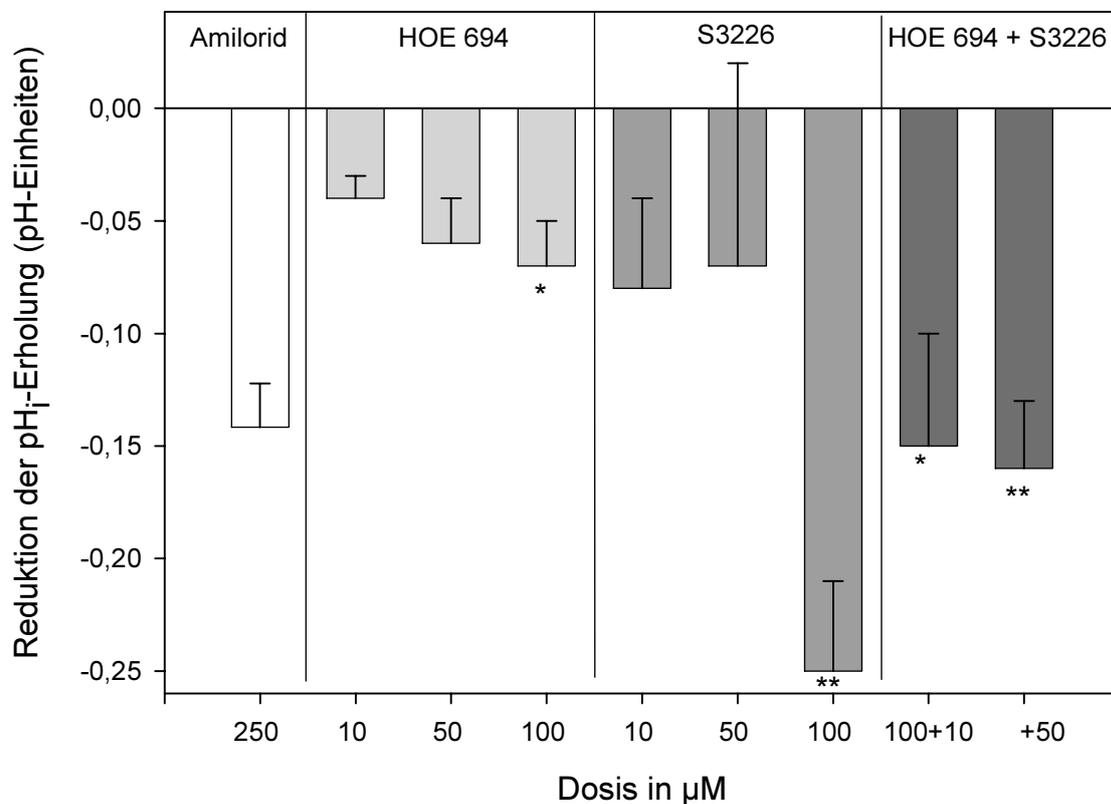


Abbildung 16: Effekt von Inhibitoren des Na^+/H^+ -Austauschers auf die pH_i -Erholung nach einem Säureload mit Butyrat. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

4.3 Versuche im Medium mit reduzierter Cl^- -Konzentration

Da in mehreren Studien eine starke Abhängigkeit der vH^+ -ATPase-Aktivität von der Cl^- -Konzentration im Medium bzw. von der Cl^- -Leitfähigkeit der Membran nachgewiesen werden konnte (Fernandez und Malnic, 1998; Fernandez *et al.*, 2000; Wadsworth und van Rossum, 1994) (siehe Kapitel 2.1.3.1), sollte im Rahmen dieser Dissertationsarbeit der Einfluss der Chlorid-Konzentration auf die pH_i -Regulation untersucht werden. Hierzu wurden die PEZ in Butyrat (20 mmol/l)-haltigem, HEPES-gepufferten Na^+ -Medium mit einer reduzierter $[\text{Cl}^-]$ von 36 mmol/l inkubiert. Kontrollzellen wurden in einem Butyrat (20 mmol/l)-haltigen, HEPES-gepufferten NaCl-Medium mit einer Chloridkonzentration von 136 mmol/l aufgenommen. Weiterhin wurde der Effekt des vH^+ -ATPase Inhibitors Foliomycin (2 $\mu\text{mol/l}$), des NHE1-Inhibitors HOE694 (100 $\mu\text{mol/l}$) sowie des NHE3-Inhibitors S3226 (10 $\mu\text{mol/l}$) unter den Bedingungen einer reduzierten $[\text{Cl}^-]_e$ geprüft.

4.3.1 Wirkung einer reduzierten $[\text{Cl}^-]_e$ auf die pH_i -Regulation

Abbildung 17 zeigt repräsentative Originalmessungen des pH_i von in Kontrollmedium bzw. Cl^- -reduziertem Medium inkubierten PEZ. In Abbildung 18 ist der Zeitverlauf des pH_i zusammenfassend dargestellt und in Tabelle 6 sind die Ausgangs- und End- pH_i -Werte sowie die berechneten pH_i -Erholungsraten für beide Bedingungen zusammengefasst.

Es wird deutlich, dass die Verminderung der $[\text{Cl}^-]_e$ eine starke Reduktion des pH_i auslöste, die im gesamten Messzeitraum bestehen blieb. Gegenüber dem initialen pH_i der Kontrollzellen $7,0 \pm 0,05$ kam es im Cl^- -reduzierten Medium zu einer Verminderung um $0,52 \pm 0,03$ pH_i -Einheiten. Am Ende der Messung war der pH_i der im Cl^- -reduzierten Medium inkubierten PEZ bereits um $0,72 \pm 0,08$ pH_i -Einheiten gegenüber dem pH_i der Kontrollzellen ($7,6 \pm 0,05$) erniedrigt.

Aus den Abbildungen 17 und 18 sowie aus den Daten in Tabelle 6 ist ersichtlich, dass im Cl^- -reduzierten Medium auch die pH_i -Erholung reduziert ist. Im Normalmedium ($[\text{Cl}^-]_e = 136$ mmol/l) liegt die pH_i -Erholungsrate bei $0,57 \pm 0,04$ pH-Einheiten. Sie wird im Medium mit erniedrigter $[\text{Cl}^-]_e$ um $0,19 \pm 0,07$ pH-Einheiten/10 min vermindert und liegt bei $0,38 \pm 0,05$ pH-Einheiten/10 min.

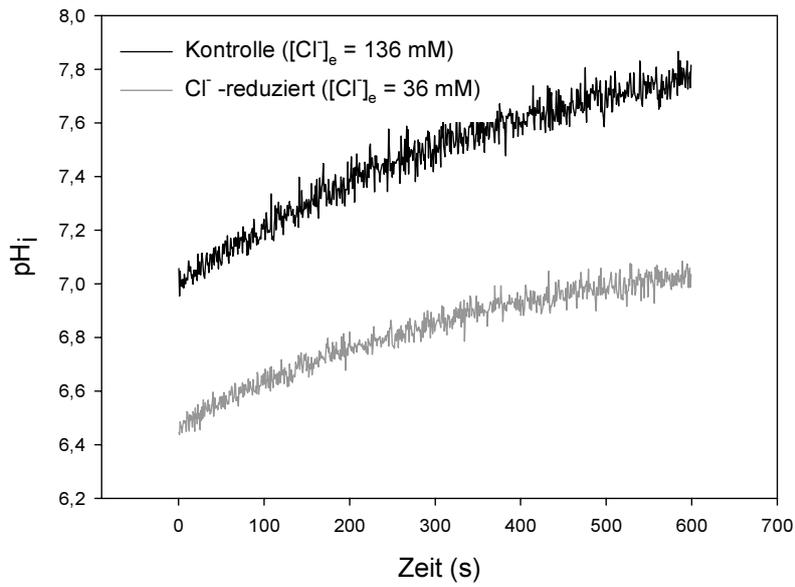


Abbildung 17: Effekt einer Reduktion der extrazellulären Cl⁻-Konzentration auf den pH_i von PEZ (Repräsentative Originalmessung).

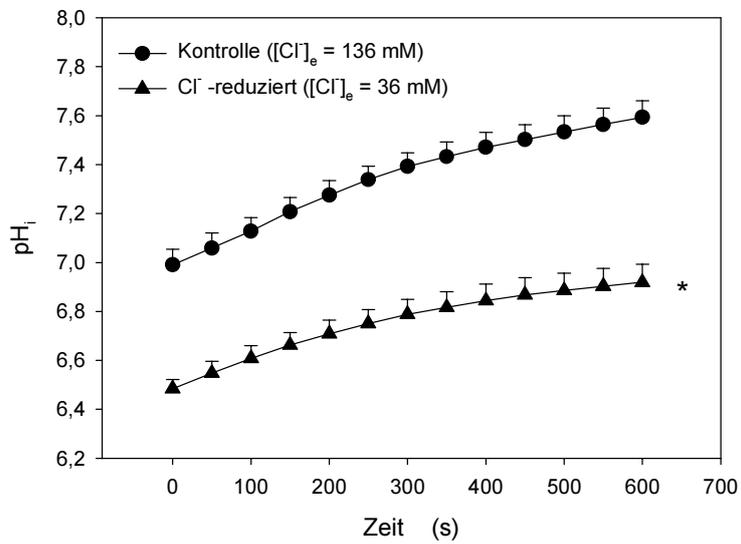


Abbildung 18: Effekt einer Reduktion der extrazellulären Cl⁻-Konzentration auf den pH_i von PEZ. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SE aus jeweils 4 Einzelmessungen.
* P < 0,05 vs. Kontrollen

| Ansatz | AW ± SE | EW ± SE | ΔpH _i ± SE |
|--|---------------|---------------|-----------------------|
| [Cl ⁻] _e = 136 mmol/l (Kontrolle) | 6,99 ± 0,05 | 7,60 ± 0,05 | 0,57 ± 0,04 |
| [Cl ⁻] _e = 36 mmol/l | 6,48 ± 0,03** | 6,88 ± 0,07** | 0,38 ± 0,05* |

Tabelle 6: Effekt einer reduzierten extrazellulären [Cl⁻] auf den pH_i und die pH_i-Erholungsrate von Pansenepithelzellen. *P < 0,05; **P < 0,01

4.3.2 vH⁺-ATPase- und NHE-Aktivität in einem Medium mit reduzierter Cl⁻-Konzentration

Die PEZ wurden in Butyrat (20 mmol/l)-haltigem Na⁺-Medium mit einer [Cl⁻] von 36 mmol/l ohne (Kontrolle) bzw. mit verschiedenen Inhibitoren aufgenommen.

Getestet wurde der Effekt von:

- Foliomycin (2 μmol/l),
- S3226 (10 μmol/l)
- S3226 (10 μmol/l) in Kombination mit Foliomycin (2 μmol/l),
- S3226 (10 μmol/l, 50 μmol/l) in Kombination mit HOE694 (100 μmol/l),
- Foliomycin (2 μmol/l) in Kombination mit S3226 (10 μmol/l) und HOE694 (100 μmol/l).

Untersucht wurde jeweils der Einfluss der Inhibitoren auf den pH_i und die pH_i-Erholungsrate.

In Tabelle 7 wurden die Daten zum pH_i sowie die pH_i-Erholungsraten unter den verschiedenen Bedingungen zusammengefasst.

Ergebnisse

| | n | AW ± SE | EW ± SE | ΔpH _i ± SE |
|-----------------------------|---|-------------|--------------|-----------------------|
| Kontrolle 1 | 4 | 6,48 ± 0,03 | 6,88 ± 0,07 | 0,38 ± 0,05 |
| Foliomycin | 5 | 6,47 ± 0,06 | 6,80 ± 0,08 | 0,31 ± 0,04 |
| S3226 | 5 | 6,46 ± 0,11 | 6,74 ± 0,1 | 0,26 ± 0,02* |
| Foliomycin + S3226 | 5 | 6,42 ± 0,08 | 6,68 ± 0,09* | 0,25 ± 0,03* |
| Kontrolle 2 | 4 | 6,58 ± 0,06 | 6,97 ± 0,07 | 0,38 ± 0,04 |
| S3226 (10 μmol/l) + HOE694 | 4 | 6,54 ± 0,07 | 6,85 ± 0,09 | 0,32 ± 0,02 |
| S3226 (50 μmol/l) + HOE694 | 4 | 6,41 ± 0,1 | 6,68 ± 0,07 | 0,27 ± 0,05 |
| Foliomycin + S3226 + HOE694 | 4 | 6,56 ± 0,01 | 6,86 ± 0,01* | 0,3 ± 0,01 |

Tabelle 7: Effekt von vH⁺-ATPase- und NHE-Inhibitoren auf den pH_i und die pH_i-Erholungsrate von in Cl⁻-reduziertem Medium inkubierten Pansenepithelzellen. *P < 0,05

4.3.2.1 Effekt der Inhibitoren auf den pH_i

Effekt von Foliomycin: Abbildung 19 zeigt eine repräsentative Einzelmessung mit dem vH⁺-ATPase-Inhibitor Foliomycin im Vergleich zu einer entsprechenden Kontrollmessung im Medium mit reduzierter Chloridkonzentration. Fünf Minuten nach Foliomycingabe waren keine Unterschiede zum pH_i der Kontrollzellen nachweisbar. Am Ende der Messperiode war der pH_i Foliomycin-behandelter Zellen um 0,07 ± 0,03 pH-Einheiten reduziert. Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant. Eine Zusammenfassung der Messergebnisse ist in Abbildung 20 dargestellt.

Ergebnisse

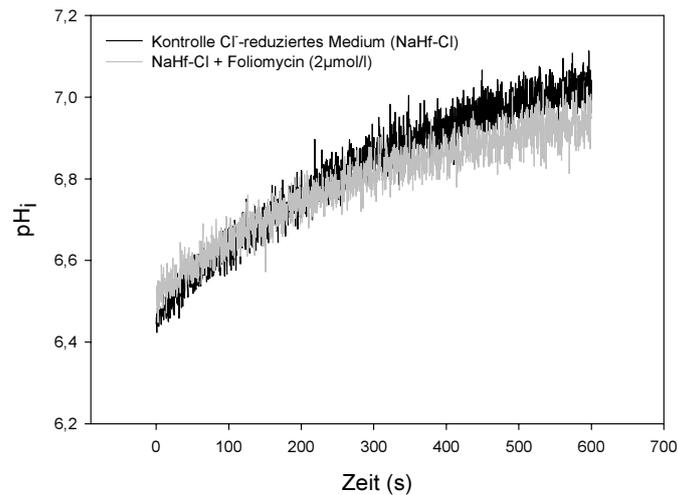


Abbildung 19: Effekt einer Reduktion der extrazellulären Cl⁻-Konzentration auf die vH⁺-ATPase-Aktivität von PEZ. Gezeigt wird die Wirkung des vH⁺-ATPase-Inhibitors Foliomycin (2 µmol/l) auf den pH_i und die pH_i-Erholungsrate von in Cl⁻-reduziertem Medium inkubierten Pansenepithelzellen (Repräsentative Originalmessung).

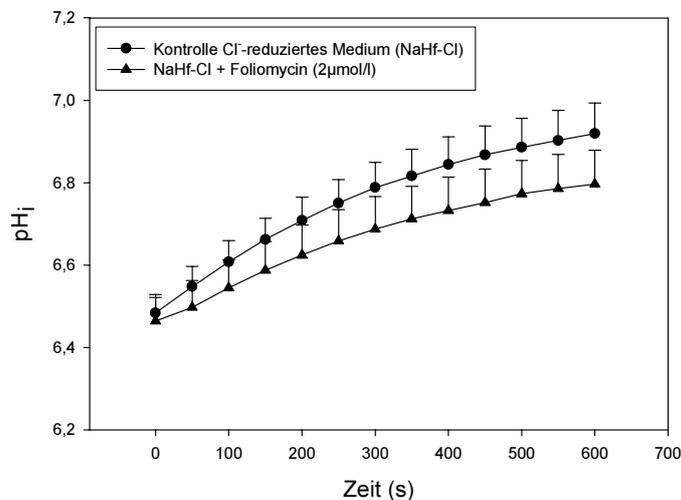


Abbildung 20: Effekt einer Reduktion der extrazellulären Cl⁻-Konzentration auf die vH⁺-ATPase-Aktivität von PEZ. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE aus jeweils 4 Einzelmessungen.

Effekt von Foliomycin in Kombination mit S3226: Ausgehend von einem Kontrollwert von $6,48 \pm 0,03$ führte die kombinierte Anwendung von Foliomycin und S3226 zu einer Absenkung des pH_i um $0,06 \pm 0,09$ pH-Einheiten zu Beginn der Messungen und um $0,2 \pm 0,06$ am Ende der Messungen (absolute Werte siehe Tabelle 7).

Effekt einer kombinierten Anwendung von Foliomycin, S3226 und HOE694: In Anwesenheit von Foliomycin, S3226 und HOE694 wurde der Ausgangs-pH_i im Vergleich zur Kontrolle ($6,58 \pm 0,06$) um $0,12 \pm 0,03$ pH-Einheiten abgesenkt. Am Ende der Messung lag der pH_i-Wert $0,11 \pm 0,07$ pH-Einheiten unter dem Kontrollwert.

Effekt von S3226: Der NHE3-Inhibitor S3226 führte in einer Dosierung von 10 µmol/l bei Messbeginn zu einer Reduktion des pH_i um $0,02 \pm 0,1$ pH-Einheiten und am Ende der Messungen um $0,14 \pm 0,06$ pH-Einheiten gegenüber dem pH_i von nicht Inhibitor-behandelten PEZ.

Effekt von HOE694 in Kombination mit S3226: Bei den Kombinationsmessungen zeigte sich eine Abhängigkeit der Effekte von der Konzentration des NHE3-Inhibitors S3226. Ausgehend von einem Kontrollwert von $6,58 \pm 0,06$ führte die kombinierte Anwendung von HOE694 (100 µmol/l) und S3226 (10 µmol/l bzw. 50 µmol/l) zu einer Absenkung des pH_i um $0,05 \pm 0,09$ bzw. $0,18 \pm 0,1$ pH-Einheiten zu Beginn der Messungen und um $0,11 \pm 0,14$ bzw. $0,29 \pm 0,12$ am Ende der Messungen.

Eine zusammenfassende Darstellung der Inhibitoreffekte auf den pH_i zu Beginn und am Ende der Messungen ist in Abbildung 21 aufgeführt.

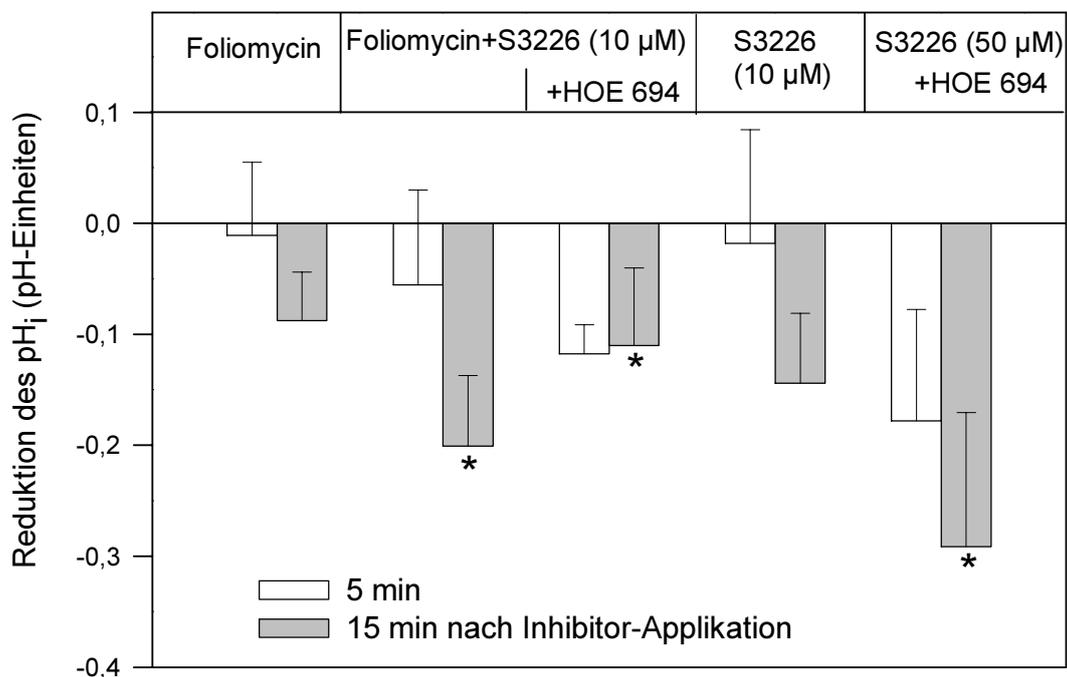


Abbildung 21: Effekt von Inhibitoren der vH⁺-ATPase bzw. des NHE auf den pH_i ruminaler Epithelzellen. Dargestellt ist die Reduktion des Ausgangs- bzw. End-pH_i gegenüber dem Kontrollwert im Cl⁻-reduzierten Medium. Gezeigt werden die Mittelwerte aus jeweils 5 Einzelerperimenten ± Standardabweichung.

* P < 0,05 vs. Kontrollen

4.3.2.2 Effekt der Inhibitoren auf die pH_i -Erholungsrate

Unter Kontrollbedingungen lag die Butyrat-induzierte pH_i -Erholung bei $0,38 \pm 0,05$ pH-Einheiten/10 min.

In Anwesenheit von Foliomycin im Medium wurde die pH_i -Erholung um $0,07 \pm 0,04$ pH-Einheiten reduziert. Interessanterweise führte die zusätzliche Gabe von S3226 und HOE694 nicht zu einer Verstärkung der Reduktion ($-0,05 \pm 0,03$ pH-Einheiten). Eine signifikante Verminderung der pH_i -Erholung wurde beobachtet, wenn Foliomycin zusammen mit S3226 appliziert wurde ($-0,14 \pm 0,04$ pH-Einheiten). Dies ist in Abbildung 22 anhand einer repräsentativen Originalmessung dargestellt.

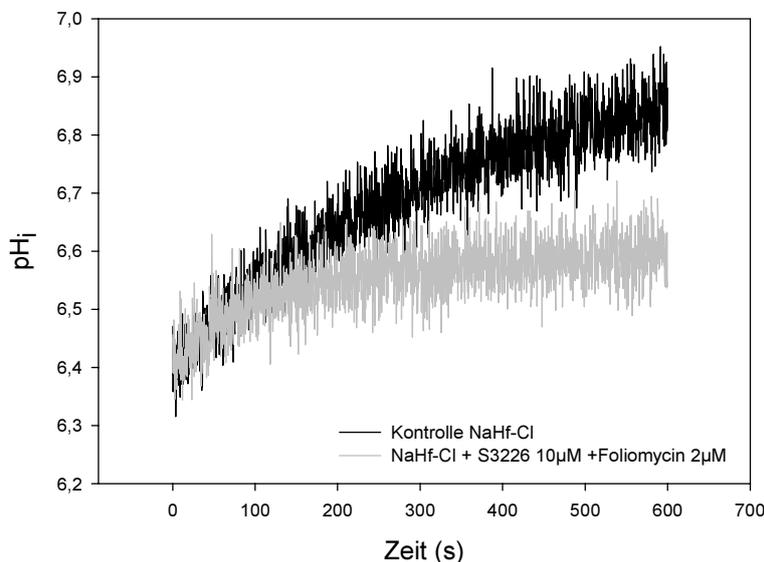


Abbildung 22: Wirkung von S3226 ($10 \mu\text{mol/l}$) in Kombination mit Foliomycin ($2 \mu\text{mol/l}$) auf den pH_i von PEZ nach einem Säureload mit Butyrat (Originalmessung).

Die alleinige Gabe von S3226 ($10 \mu\text{mol/l}$) bewirkte eine Reduktion der pH_i -Erholung um $0,12 \pm 0,05$ pH-Einheiten. Eine Kombination von $50 \mu\text{mol/l}$ S3226 und $100 \mu\text{mol/l}$ HOE694 wirkt sich auf die der pH_i -Erholung ähnlich aus ($-0,11 \pm 0,04$). Schwächer wirkte sich die Kombination von $10 \mu\text{mol/l}$ S3226 und $100 \mu\text{mol/l}$ HOE694 aus ($-0,07 \pm 0,06$).

Die nach Applikation der verschiedenen Inhibitoren eingetretene Reduktion der pH_i -Erholungsrate ist in Abbildung 23 zusammenfassend dargestellt.

Ergebnisse

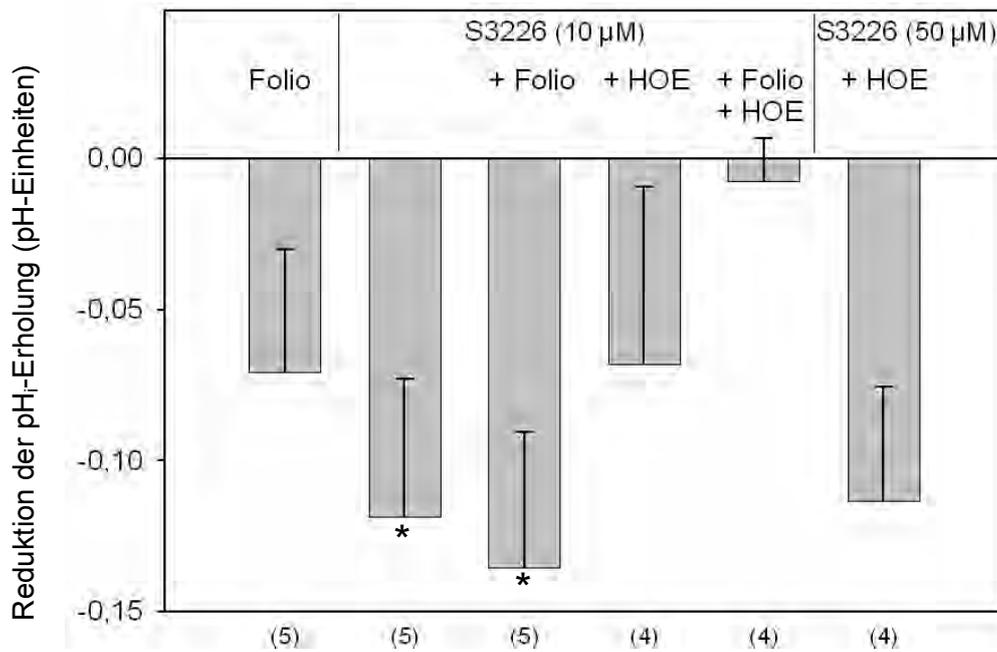


Abbildung 23: Effekt von Inhibitoren der vH^+ -ATPase bzw. des NHE auf die pH_i -Erholungsrate von in Cl^- -reduzierten Medien inkubierten PEZ. Dargestellt ist die Verminderung der pH_i -Erholungsrate gegenüber dem Kontrollwert im Cl^- -reduzierten Medium ($0,38 \pm 0,05$ pH-Einheiten) \pm SE. Die Zahlen in den Klammern geben die Anzahl der durchgeführten Einzelerperimente an.
* $P < 0,05$ vs. Kontrollen

4.4 Versuche im Medium mit hoher K^+ -Konzentration

Für die Experimente wurden die PEZ in Butyrat (20 mmol/l)-haltigen, HEPES-gepufferten NaCl-Medien ($[Na^+]_e = 145$ mmol/l) mit physiologischer Kaliumkonzentration ($[K^+]_e = 5$ mmol/l; Kontrolle) bzw. in Butyrat (20 mmol/l)-haltigen, HEPES-gepufferten Medien mit erhöhter $[K^+]$ ($[K^+]_e = 135$ mmol/l) und erniedrigter $[Na^+]$ ($[Na^+]_e = 15$ mmol/l) aufgenommen. Abbildung 24 zeigt zunächst vergleichend den Verlauf des pH_i von PEZ in beiden Medien. Der initiale pH_i der PEZ lag im Medium mit physiologischen Ionen-Konzentrationen bei $6,97 \pm 0,16$ und stieg im Messverlauf um $0,28 \pm 0,03$ pH-Einheiten, d.h. auf einen pH_i von $7,26 \pm 0,2$ an. Im Medium mit hoher K^+ -Konzentration war der am Beginn der Messung ermittelte pH_i höher ($7,16 \pm 0,05$) als im Medium mit hoher Na^+ -Konzentration und zeigte im Messverlauf nur einen gering ausgeprägten Anstieg um $0,05 \pm 0,05$ pH-Einheiten, d.h. auf $7,22 \pm 0,07$. Da es trotz der Anwesenheit von Butyrat nicht zu einer nennenswerten Absenkung des pH_i gekommen ist, wird im Folgenden für das Medium mit hoher K^+ -Konzentration nicht von einer pH_i -Erholung sondern von einer pH_i -Wert-Änderung gesprochen. Die Änderungen des pH_i während des Messverlaufes sind für beide Medien vergleichend in Abbildung 25 dargestellt.

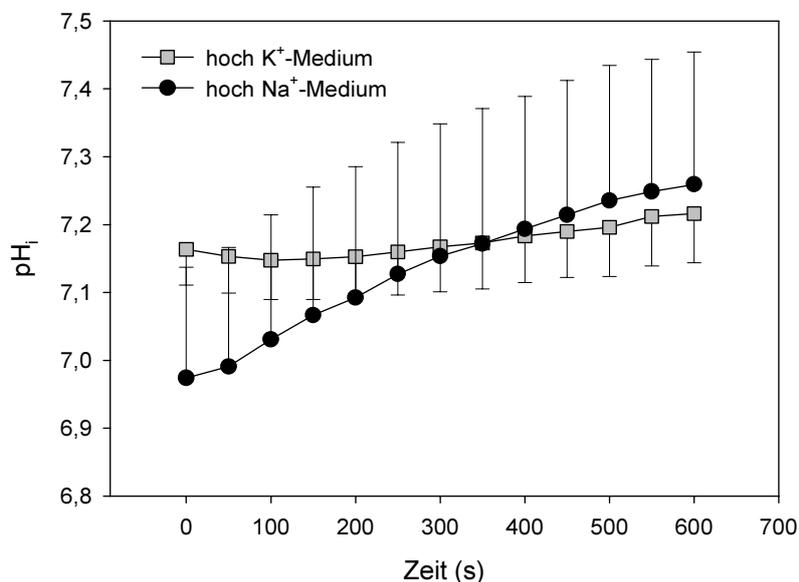


Abbildung 24: Verlauf des pH_i von PEZ in Medien mit hoher K^+ - bzw. Na^+ -Konzentration. Beide Medien enthielten 20 mmol/l der kurzkettigen Fettsäure Butyrat. Daten sind Mittelwerte \pm SE; $n = 6$ (hoch K^+ -Medium) bzw. 7 (hoch Na^+ -Medium) Einzelmessungen.

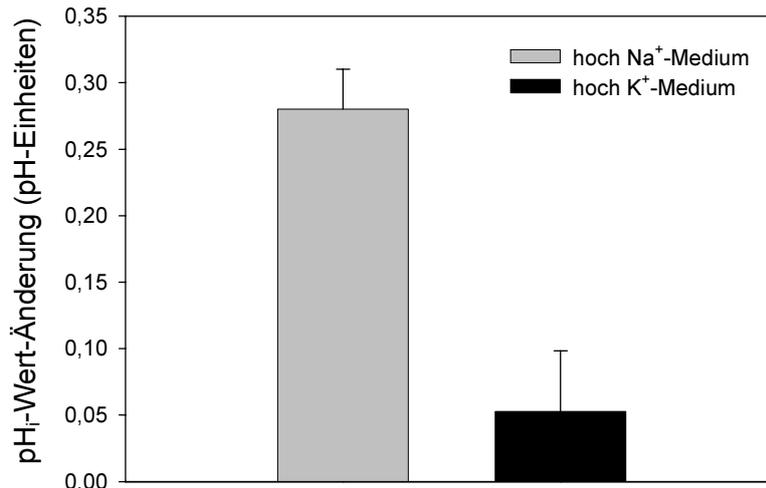


Abbildung 25: Vergleich der pH_i-Wert-Änderungen von Kontrollmessungen im hoch Na⁺-Medium und hoch K⁺-Medium. Daten sind Mittelwerte ± SE; n = 6 (hoch K⁺-Medium) bzw. 7 (hoch Na⁺-Medium) Einzelmessungen.

4.4.1 vH⁺-ATPase- und NHE-Aktivität in einem Medium mit hoher [K⁺]

In weiteren Versuchsserien wurde der Effekt des vH⁺-ATPase Inhibitors Foliomycin (2 µmol/l) sowie der NHE-Inhibitoren Amilorid (250 µmol/l), HOE694 (100 µmol/l) und S3226 (100 µmol/l) auf den pH_i und die Butyrat-induzierte pH_i-Erholung unter den Bedingungen einer erhöhten extrazellulären [K⁺]_e geprüft.

In Tabelle 8 werden die Daten zum pH_i sowie die pH_i-Wert-Änderung unter den verschiedenen Bedingungen zusammengefasst.

| | n | AW ± SE | EW ± SE | ΔpH _i ± SE |
|-----------------------------|----|-------------|--------------|-----------------------|
| Kontrolle | 11 | 7,03 ± 0,06 | 7,06 ± 0,07 | 0,03 ± 0,03 |
| Foliomycin | 5 | 6,89 ± 0,07 | 7,01 ± 0,05 | 0,11 ± 0,04 |
| Foliomycin + S3226 | 4 | 6,96 ± 0,07 | 7,00 ± 0,06 | 0,05 ± 0,05 |
| Foliomycin + S3226 + HOE694 | 4 | 7,15 ± 0,03 | 7,39 ± 0,02* | 0,24 ± 0,02** |
| S3226 | 5 | 6,99 ± 0,09 | 7,04 ± 0,07 | 0,04 ± 0,03 |
| HOE694 | 5 | 6,79 ± 0,13 | 6,82 ± 0,11 | 0,02 ± 0,02 |

Tabelle 8: Effekt von vH⁺-ATPase- und NHE-Inhibitoren auf den pH_i und die pH_i-Wert-Änderung im Messverlauf von in Medien mit hoher K⁺-Konzentration inkubierten Pansenepithelzellen. *P<0,05 vs. Kontrolle; **P<0,01 vs. Kontrolle.

Abbildung 26 gibt eine Übersicht über die nach Applikation der verschiedenen Inhibitoren gegenüber den Kontrollen eingetretene Reduktion der zu Beginn und am Ende der Messung vorliegenden pH_i -Werte.

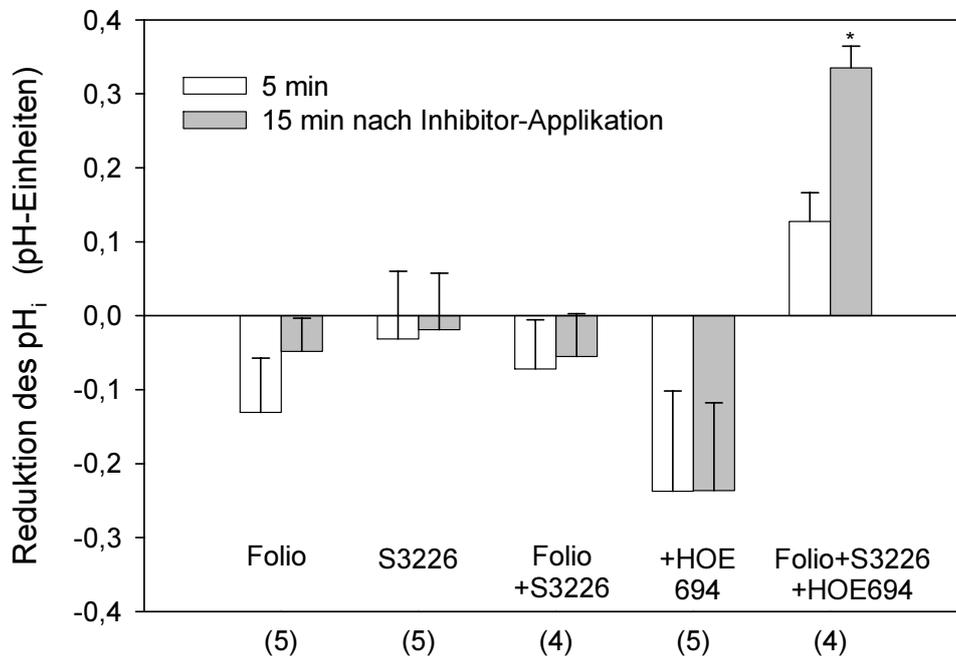


Abbildung 26: Effekt von Inhibitoren der vH^+ -ATPase bzw. des NHE auf den pH_i von in Medien mit hoher $[\text{K}^+]$ inkubierten PEZ. Dargestellt ist die Absenkung des pH_i zu Beginn bzw. am Ende der Messung gegenüber dem Kontrollwert ($\text{AW}_{\text{Kontrolle}} = 7,03 \pm 0,06$; $\text{EW}_{\text{Kontrolle}} = 7,06 \pm 0,07$). Die Zahlen in den Klammern geben die Anzahl der durchgeführten Einzelexperimente an.
* $P < 0,01$ vs. Kontrolle

Es ist erkennbar, dass Foliomycin zu Beginn der Messung eine pH_i -Reduktion auslöste, die zum Ende der Messung hin bzw. durch zusätzliche Applikation des NHE3-Inhibitors S3226 schwächer wurde. Im Unterschied zu den Messungen im Na^+ -Medium kam es im Medium mit hoher K^+ -Konzentration nach Applikation einer Kombination von Foliomycin mit S3226 und HOE694 zu einem Anstieg des intrazellulären pH.

Bei den in Medien mit physiologischer Na^+ - und K^+ -Konzentration durchgeführten Versuchen wurden mit Inhibitoren des NHE starke hemmende Effekte auf die pH_i -Regulation nachgewiesen. Im Unterschied dazu hatte S3226 im niedrig- Na^+ /hoch- K^+ -Medium keine Wirkung auf den pH_i , während deutliche Effekte mit dem NHE1-Inhibitor HOE694 gesehen wurden. Zusätzlich wurden

Untersuchungen mit Amilorid durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 27 dargestellt werden. Der initiale pH_i lag unter Kontrollbedingungen bei durchschnittlich $6,87 \pm 0,12$, während er in Anwesenheit von $250 \mu\text{mol/l}$ Amilorid auf $6,78 \pm 0,11$, also um $0,08 \pm 0,02$ pH-Einheiten, reduziert war. Am Ende der Messung wurde bei den Kontrollzellen ein pH_i von durchschnittlich $6,9 \pm 0,16$ und bei den Amilorid-behandelten Zellen ein pH_i von durchschnittlich $6,81 \pm 0,14$ gemessen. Dies entspricht einer Reduktion des während Messung erreichten Endwertes um $0,09 \pm 0,02$ pH-Einheiten. In beiden Gruppen blieb der pH_i während der Messung nahezu stabil. Es wurde ein nur geringfügiger Anstieg des pH_i um $0,03 \pm 0,03$ pH-Einheiten beobachtet.

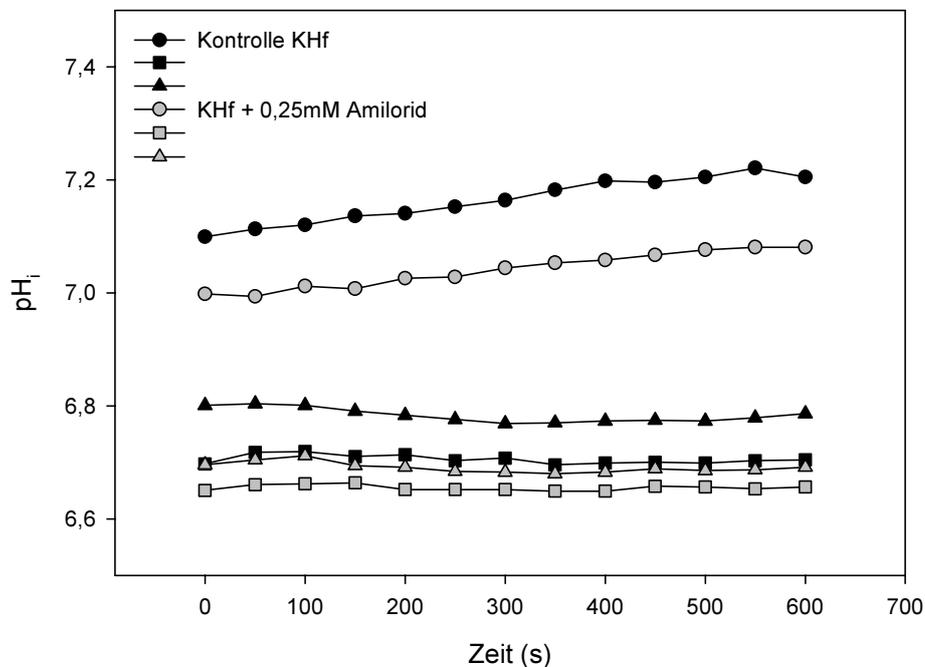


Abbildung 27: Einzelne Zeitverläufe der Kontrollmessungen und der Messungen mit $250 \mu\text{mol/l}$ Amilorid. Für jeden Messtag wurde ein anderes Symbol (Kreis, Quadrat oder Dreieck) verwendet.

Die pH_i -Wert-Änderung während des Messverlaufes betrug in den Kontrollmessungen $0,03 \pm 0,03$. Unter Einfluss von Foliomycin kommt es interessanterweise zu einer verstärkten pH_i -Wert-Änderung. Am deutlichsten war dieser Effekt bei der kombinierten Anwendung von Foliomycin, S3226 und HOE694. Die Ergebnisse sind zusammenfassend in Abbildung 28 dargestellt.

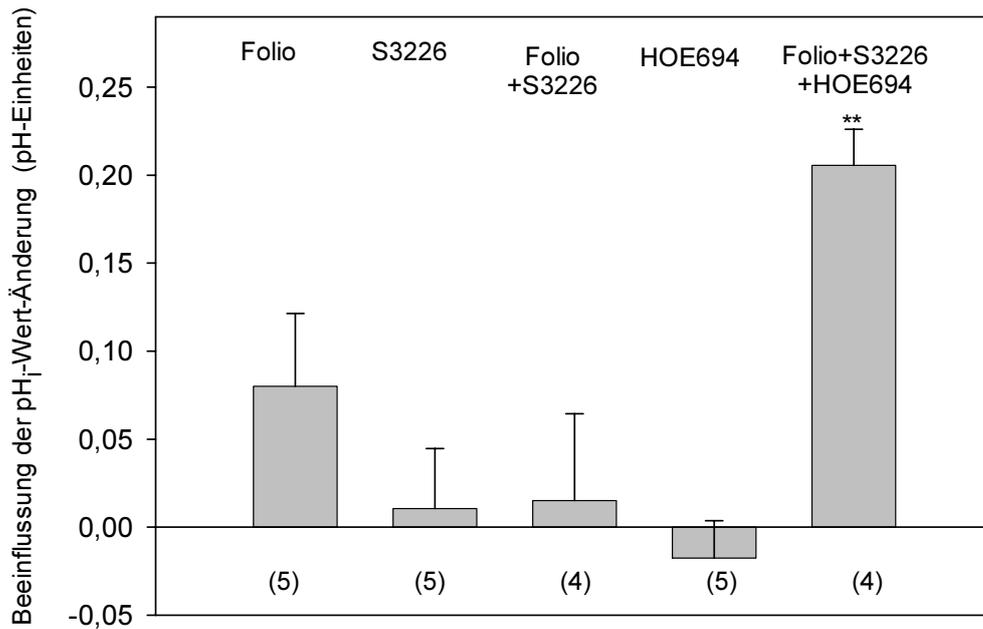


Abbildung 28: Effekt von Inhibitoren der vH^+ -ATPase bzw. des NHE auf die pH_i -Wert-Änderung von in Medien mit hoher $[K^+]$ inkubierten PEZ. Die Zahlen in den Klammern geben die Anzahl der durchgeführten Einzelexperimente an.
** $P < 0,01$ vs. Kontrolle

4.5 Effekt von cAMP auf die pH_i -Regulation

Es ist aus der Literatur bekannt, dass eine Erhöhung der $[cAMP]_i$ die vH^+ -ATPase-Aktivität (O'Donnell *et al.*, 1996; Suplie, 2005; Wang und Telfer, 1998; Wieczorek *et al.*, 2000) und die Aktivität des NHE1 stimuliert und den NHE3 hemmt (Bevensee *et al.*, 1999; Böttcher, 2000; Gäbel *et al.*, 1999; Noel und Pouyssegur, 1995; Wakabayashi *et al.*, 1997; Yun *et al.*, 1997). Deshalb wurden sowohl im hoch Na^+ - als auch im hoch K^+ -Medium Versuche mit dem membrangängigen cAMP-Analogen dB-cAMP durchgeführt.

Im HEPES-gepufferten NaCl-Medium bewirkte die Applikation von 100 $\mu\text{mol/l}$ dB-cAMP eine Erniedrigung des initialen pH_i um $0,54 \pm 0,03$ pH-Einheiten. Auch am Ende der Messungen war der pH_i unter Einfluss von cAMP in der gleichen Größenordnung erniedrigt.

Im HEPES-gepufferten NaCl-Medium mit 20mmol/l Butyrat erfolgte unter dB-cAMP-Einfluss eine um $0,1 \pm 0,05$ pH-Einheiten stärkere pH-Erholung, jedoch bei insgesamt niedrigeren pH-Werten.

Ergebnisse

Im hoch K^+ -Medium bewegte sich die pH_i -Wert-Änderung unter cAMP-Wirkung auf einem ähnlichen Niveau wie in der Kontrolle bei $0,16 \pm 0,02$.

Tabelle 9 dient der zusammenfassenden Darstellung der Messergebnisse in den verschiedenen Messmedien.

| | n | AW \pm SE | EW \pm SE | $\Delta pH_i \pm SE$ |
|-------------------------------|----------|-------------------------------|-------------------------------|--|
| Kontrolle hoch Na^+ -Medium | 3 | $7,65 \pm 0,04$ | $7,57 \pm 0,03$ | $- 0,08 \pm 0,06$ |
| cAMP | 5 | $7,12 \pm 0,01^{**}$ | $7,02 \pm 0,01^{**}$ | $- 0,1 \pm 0,09$ |
| hoch Na^+ -Medium + Butyrat | 5 | $7,25 \pm 0,08$ | $7,97 \pm 0,14$ | $0,72 \pm 0,1$ |
| cAMP | 4 | $7,08 \pm 0,11$ | $7,9 \pm 0,15$ | $0,82 \pm 0,05$ |
| hoch K^+ -Medium + Butyrat | 1 | 7,17 | 7,29 | 0,12 |
| cAMP | 3 | $7,1 \pm 0,01$ | $7,27 \pm 0,03$ | $0,16 \pm 0,02$ |

Tabelle 9: Effekt von $100 \mu\text{mol/l}$ cAMP auf den pH_i und die pH_i -Wert-Änderung im Messverlauf in Medien mit physiologischer ($[K^+]_e = 5 \text{ mmol/l}$) oder hoher ($[K^+]_e = 135 \text{ mmol/l}$) K^+ -Konzentration. ****** $P < 0,01$ vs. Kontrolle