

5 Diskussion

5.1 Einleitung

Eine ausreichende Energieversorgung von Wiederkäuern mit hoher Leistung erfordert die Fütterung konzentratreicher Diäten, wobei deren Menge und Zusammensetzung in Abhängigkeit vom Leistungsniveau variieren muss. Es ist bekannt, dass derartige Rationen zu Veränderungen im Pansenmilieu (z.B. erhöhte Konzentration von kurzkettigen Fettsäuren (SCFA), insbesondere von Butyrat, Anstieg des Kohlendioxidpartialdruckes ($p\text{CO}_2$) sowie Reduktion des intraruminalen pH-Wertes) und in der Folge zu morphologischen und funktionellen Adaptationsreaktionen am Pansenepithel führen (Dirksen *et al.*, 1984; Shen *et al.*, 2004; Suplie, 2005). Typischerweise entwickelt sich innerhalb mehrerer Wochen eine beträchtliche Oberflächenvergrößerung des Epithels, die aus einer Zunahme von Anzahl, Dicke, Länge und Form der Pansenzotten resultiert (Dirksen *et al.*, 1984; Liebich *et al.*, 1990). Weiterhin tritt eine verstärkte Keratinisierung des Epithels mit Zunahme der Anzahl an Zellen des *stratum corneum* auf (Galfi *et al.*, 1981; Kauffold *et al.*, 1975). Von großer Bedeutung sind weiterhin die innerhalb kürzerer Zeit auftretenden Adaptationsvorgänge auf funktioneller Ebene. Eine Zusammenfassung bisher bekannter Prozesse findet sich bei Suplie (2005). Erwähnt sei hier vor allem die erhöhte Transportleistung für Nährstoffe (SCFA) und Elektrolyte (Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^-) bei vermehrter Kraffutteraufnahme (Martens *et al.*, 1987; Shen *et al.*, 2004; Uppal *et al.*, 2003). So steigen beispielsweise die Natriumtransportraten bereits nach einer kurzen Konzentrat-Fütterungsperiode deutlich an (75% des Anstiegs nach einer Woche, maximale Werte nach vier Wochen) (Suplie, 2005).

Eine wesentliche Voraussetzung für die Erfüllung der transportphysiologischen Aufgaben und für die Aufrechterhaltung der Schutzfunktion des Epithels trotz wechselnder Bedingungen im luminalen Milieu ist die Aufrechterhaltung der pH-Homöostase der Pansenepithelzellen. Es ist daher überraschend, dass ungeachtet der Bedeutung dieser Thematik bisher nur eine Arbeit zur pH_i -Regulation bei ruminalen Epithelzellen publiziert wurde (Müller *et al.*, 2000). Die Autoren untersuchten den Einfluss schwacher Säuren auf den pH_i oviner PEZ und mögliche Prozesse, durch die nach Ansäuerung eine pH_i -Erholung ausgelöst werden kann. Erstmals wurde die Bedeutung von HCO_3^- -importierenden Mechanismen

($\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporters und/oder $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Austauschers) herausgestellt und die Rolle des Na^+/H^+ -Austauschers (NHE) im Rahmen der pH_i -Regulation nach Säurebelastung untersucht. Das Vorkommen des NHE bei Pansenepithelzellen ist seit längerer Zeit bekannt, jedoch wurde das multifunktionelle Transportprotein überwiegend im Zusammenhang mit dem transepithelialen Na^+ -Transport und der Osmoregulation untersucht (Böttcher, 2000; Gäbel *et al.*, 1996; Gäbel und Sehested, 1997; Gäbel *et al.*, 1991; Schweigel, 2001; Schweigel *et al.*, 2005).

In der eigenen Arbeitsgruppe wurde das Vorkommen eines weiteren H^+ -sezernierenden Transportproteins, einer vH^+ -ATPase, bei ovinen PEZ funktionell nachgewiesen und mit molekularbiologischen Methoden bestätigt (Schweigel, 2001; Schweigel *et al.*, 2004; Schweigel und Martens, 2003). In diesen Untersuchungen führte die Applikation von spezifischen Hemmstoffen (Bafilomycin A_1 und Foliomycin) der vH^+ -ATPase (Mattsson *et al.*, 1991) bei isolierten PEZ zu einer Reduktion der Mg^{2+} -Aufnahme (Schweigel und Martens, 2003). Dieser Effekt lässt sich über die Depolarisation des Membranpotentials (E_m) erklären, die infolge der Hemmung der aktiven, elektrogenen H^+ -Sekretion eintritt. Es wird daher angenommen, dass die vH^+ -ATPase an der Ausprägung und Aufrechterhaltung des Membranpotentials von ruminalen PEZ beteiligt ist, welches die wichtigste Triebkraft für die Mg^{2+} -Aufnahme (und möglicherweise anderer Solute) darstellt. Obwohl gezeigt werden konnte, dass der pH_i bzw. die pH_i -Erholung nach einem Säureload mit Butyrat und/oder CO_2 durch Inhibitoren der vH^+ -ATPase beeinflusst wurden, erfolgten in den vorgenannten Untersuchungen keine systematischen Experimente zu dieser Problematik. Wegen der teilweise starken H^+ -Gradienten zwischen Pansenlumen und Zytosol der PEZ könnte jedoch ein aktiver und somit von den chemischen Gradienten weitgehend unabhängiger Regulationsmechanismus von entscheidender Bedeutung für die pH_i -Homöostase der Zellen sein.

Deshalb wurde in der hier vorliegenden Arbeit systematisch die Rolle einer vH^+ -ATPase für die Regulation des basalen intrazellulären pH-Wertes (pH_i) und die pH_i -Erholung nach einer Säurebelastung in HCO_3^- -freien, HEPES-gepufferten Medien untersucht. Ein wesentlicher Bestandteil der Arbeit war die Untersuchung von möglichen Wechselwirkungen zwischen vH^+ -ATPase und NHE sowie die Quantifizierung ihrer Beteiligung an der pH_i -Regulation. Weiterhin erfolgten erste, sondierende experimentelle Arbeiten zur Regulation der vH^+ -ATPase.

5.2 Intrazellulärer pH-Wert und pH-Erholung

Im HEPES-gepufferten, HCO_3^- -freien Na^+ -Medium stabilisierte sich der pH_i der PEZ bei durchschnittlich $7,4 \pm 0,2$. Dieser Wert liegt in dem Bereich (7,2 – 7,5), der unter HCO_3^- -freien Bedingungen, an PEZ (Müller *et al.*, 2000) bzw. an anderen Zellsystemen (Ehrenfeld und Klein, 1997; Marshansky und Vinay, 1996) gemessen wurde.

Wie erwartet, bewirkte die Überführung von PEZ in Butyrat-haltige (20 mmol/l) Medien zunächst einen Abfall des pH_i um $0,45 \pm 0,07$ pH Einheiten. Diese Ansäuerung des Zytoplasmas resultiert hauptsächlich aus einer schnellen Diffusion der lipidlöslichen, protonierten Form der Fettsäure über die Zellmembran. Weiterhin ist die Aufnahme von ionisiertem Butyrat über einen Austausch gegen intrazelluläres HCO_3^- möglich (Gäbel und Sehested, 1997; Kramer *et al.*, 1996; Müller *et al.*, 2000). Dieser Prozess ist jedoch unter den gewählten experimentellen Bedingungen von geringer Bedeutung. Nach ihrer Aufnahme in das Zellinnere dissoziiert die nicht-ionisierte Buttersäure sehr schnell und führt so zu einer signifikanten Steigerung der H^+ -Konzentration ($[\text{H}^+]_i$) im Zytoplasma, die in den eigenen Versuchen bei 185% lag. In den Versuchen von Böttcher (2000) und Schweigel *et al.* (2000 und 2003) sowie von Müller *et al.* (2000) wurden nach dem Verbringen von PEZ in HEPES-gepufferte, Buttersäure-haltige Medien Anstiege der $[\text{H}^+]_i$ in ähnlichen Größenordnungen gemessen (Böttcher, 2000; Schweigel und Martens, 2003; Schweigel *et al.*, 2000). Jedoch wurde in den Untersuchungen von Böttcher (2000) und Schweigel *et al.* (2000 und 2003) der absolute pH_i , ausgehend von niedrigeren pH_i -Werten (zwischen 7,1 und 6,9) im Buttersäure-freien Kontrollmedium, unter dem Einfluss von Butyrat sehr viel stärker, auf $6,6 \pm 0,1$ bzw. $6,4 \pm 0,2$, abgesenkt (Böttcher, 2000; Schweigel und Martens, 2003; Schweigel *et al.*, 2000). Die Ursachen für diese Unterschiede konnten nicht sicher abgeklärt werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass Unterschiede in Art und Menge des Futters eine Rolle spielen. Während in den Versuchen von Böttcher (2000) und Schweigel *et al.* (2000 und 2003) die PEZ von heugefütterten Tieren isoliert wurden, kamen in den eigenen Versuchen überwiegend konzentratgefütterte Schafe zum Einsatz.

Wie in den Untersuchungen anderer Autoren (Böttcher, 2000; Müller *et al.*, 2000; Schweigel und Martens, 2003; Schweigel *et al.*, 2000) führte in den eigenen Versuchen der Butyrat-induzierte pH_i -Abfall zu einer schnellen Aktivierung von Transportmechanismen, die das Zytoplasma alkalisieren. Daher kommt es innerhalb der

10 min dauernden Messperiode zu einer pH_i -Erholung (um durchschnittlich $0,57 \pm 0,05$ pH-Einheiten), und der pH_i ($7,58 \pm 0,05$) unterscheidet sich am Ende der Messung nicht mehr signifikant von dem unter Kontrollbedingungen (Buttersäure-freies Medium) gemessenen Wert ($7,43 \pm 0,22$). Auch in den Kontrollmessungen zu den Studien mit dem NHE3-Inhibitor S3226 allein oder in Kombination mit dem NHE1-Inhibitor HOE694 lag die pH_i -Erholung mit 0,37 bis 0,49 pH-Einheiten/10 min bei vergleichsweise hohen Werten. Nach Ansäuerung von ovinen PEZ mittels der $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -Präpuls-Technik beobachteten Müller *et al.* (2000) im HCO_3^- -freien Medium zunächst eine pH_i -Erholung von $0,36 \pm 0,04$ pH-Einheiten in 10 min. Direkt im Anschluss erfolgte eine Säuebelastung der Zellen mit Butyrat, die nur noch eine pH-Erhholung von 0,16 pH Einheiten/10 min induzierte. Offensichtlich war die Kapazität der Zellen zur pH_i -Regulation reduziert, nachdem sie bereits die Ansäuerung mittels $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -Präpuls durchlaufen hatten. Wie in den eigenen Versuchen wurden auch von Böttcher (2000) und Schweigel (2001) die PEZ nur mit Butyrat stimuliert (Böttcher, 2000; Schweigel, 2001). Trotzdem war der gemessene pH_i -Anstieg von $6,58 \pm 0,05$ auf $6,83 \pm 0,13$ bzw. um $0,19 \pm 0,05$ pH-Einheiten/10 min geringer als in den eigenen Versuchen. Hier wurde lediglich in den Kontrollmessungen zu den Experimenten mit HOE694 und Amilorid eine pH_i -Erholung von 0,21 bzw. 0,23 pH-Einheiten/10 min gesehen, die ähnlich niedrig liegt. Beide Versuchsserien der oben genannten Autoren wurden mit institutseigenen, heugefütterten Tieren durchgeführt, während die eigenen Untersuchungen mit überwiegend konzentratgefütterten Tieren erfolgten. Eine unterschiedliche Expression von H^+ -sezernierenden Transportproteinen bei unterschiedlich gefütterten Tieren könnte somit eine Ursache für diese Unterschiede sein. Weiterhin ist an die verschiedene pH_i -Sensitivität von bekannten H^+ -sezernierenden Mechanismen zu denken.

Somit ergibt sich generell die Frage nach Art und quantitativer Beteiligung der an der pH_i -Regulation beteiligten Mechanismen.

Wie von Müller *et al.* (2000) gezeigt wurde, ist in HCO_3^- -gepufferten Lösungen ein $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Symporter der Hauptmechanismus für die pH_i -Regulation bei PEZ (Müller *et al.*, 2000). In den eigenen Versuchen wurde jedoch durchgängig mit HEPES-gepuffertem, nominal HCO_3^- -freiem Medium gearbeitet. Es ist bekannt, dass unter diesen Bedingungen und insbesondere in Anwesenheit von Butyrat im Messmedium die pH_i -Regulation stark von der NHE-Aktivität dieser Zellen bestimmt

wird (Böttcher, 2000; Gäbel *et al.*, 2002; McKinney und Moran, 1995; Müller, 2000; Rajendran *et al.*, 1995; Schweigel *et al.*, 2005; Schweigel *et al.*, 2000). Die Bedeutung des NHE für die pH_i -Regulation im HEPES-gepuffertem, nominal HCO_3^- -freiem Medium wird bei Natriumentzug und bei Anwendung von Amilorid deutlich.

In den Versuchen von Schweigel *et al.* (2000) und Böttcher (2000) wurde durch Verbringen der Zellen in nominal Na^+ -freies Medium ein signifikanter pH_i -Abfall ausgelöst, gleichzeitig wurde die intrazelluläre Na^+ -Konzentration vermindert (Böttcher, 2000; Schweigel *et al.*, 2000).

Es ist bekannt, dass das Diuretikum Amilorid in höheren Konzentrationen den NHE subtypenspezifisch hemmt, wobei es als kompetitiver Hemmer an der Na^+ -Bindungsstelle agiert (Noel und Pouyssegur, 1995). In einer Konzentration von 1 mmol/l hemmt Amilorid den NHE vollständig (Benos, 1982). Böttcher (2000) stellte in ihrer Arbeit an ovinen PEZ eine Konzentrationsabhängigkeit fest. So führte Amilorid in einer Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ zu einer mehr als doppelt so starken Abnahme des pH_i als in der Konzentration von 250 $\mu\text{mol/l}$ (Böttcher, 2000).

In den eigenen Versuchen wurde in einer ersten Versuchsserie Amilorid zunächst in einer Dosis von 250 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt. Diese Dosierung wurde gewählt, weil bei höheren Dosierungen eine Inhibition anderer Mechanismen nicht ausgeschlossen werden kann und eine Beeinflussung der pH_i -Regulation über die Hemmung anderer Mechanismen verursacht werden könnte. So hemmt Amilorid in höheren Konzentrationen neben der Aktivität verschiedener Kinasen z.B. auch die Na^+/K^+ -ATPase und andere Na^+ -abhängige Transporter (Gäbel *et al.*, 1996; Grinstein *et al.*, 1989). Andererseits ist zu erwarten, dass bei 250 $\mu\text{mol/l}$ der NHE ausreichend blockiert ist, um eine Aussage treffen zu können, in welcher Größenordnung der NHE an der pH_i -Regulation beteiligt ist. Die Amilorid-behandelten Zellen wiesen am Ende der Messung gegenüber den Kontrollzellen einen um $1 \pm 0,25$ pH-Einheiten reduzierten pH_i auf. Im Gegensatz dazu stellte Böttcher (2000) in ihrer Arbeit bei Verwendung von 250 $\mu\text{mol/l}$ Amilorid nur eine Reduktion des pH_i um 0,06 pH-Einheiten fest (Böttcher, 2000). Hierbei ist aber zu beachten, dass bei diesen Versuchen keine Butyrat-Belastung der Zellen wie in den eigenen Versuchen erfolgte. Die Ansäuerung der Zellen mittels Butyrat führt zu einer Aktivierung des NHE und somit zu ausgeprägteren Amilorid-Effekten (Gäbel *et al.*, 1996; Köttken *et al.*, 1994). Auch Fluxstudien am isolierten Pansenepithel mittels

Ussing-Kammern zeigten, dass kurzkettige Fettsäuren zu einer Stimulation des NHE führen (Gäbel *et al.*, 1991). Es ist zu beachten, dass bisher kaum Informationen über die Beteiligung spezifischer NHE-Subtypen an der pH_i -Regulation von PEZ existieren und die bisher getroffenen Aussagen zudem meist auf indirekten Ergebnissen beruhen.

In den meisten der früheren Untersuchungen wurde mit dem Hemmstoff Amilorid gearbeitet, der in hohen Konzentrationen von 0,1 – 1 mmol/l den NHE spezifisch hemmt. Dabei kamen zumeist hohe Amilorid-Konzentrationen ab 250 $\mu\text{mol/l}$, oft sogar 1 mmol/l Amilorid zum Einsatz (Benos, 1982; Böttcher, 2000; Delvaux *et al.*, 1990; Noel und Pouyssegur, 1995; Schwark *et al.*, 1998; Soleimani *et al.*, 1995) (siehe auch Kapitel 2.2.1). Eine Unterscheidung der verschiedenen NHE-Isoformen ist mittels Amilorid nur bedingt möglich. Generell weist der NHE3 die geringste Sensitivität gegenüber Amilorid auf, so dass gegenüber einer 50%igen Inhibition des NHE1 bei jeweils demselben Zelltyp eine 27 bis 63 -fach höhere Konzentration für eine 50%ige NHE3-Inhibition erforderlich ist (Orlowski, 1993; Schwark *et al.*, 1998). Je nach Zelltyp lag die IC_{50} für den NHE3 bei 40 bis 438 $\mu\text{mol/l}$ Amilorid (Noel und Pouyssegur, 1995; Schwark *et al.*, 1998; Soleimani *et al.*, 1995) und für den NHE1 bei 1,6 bis 40 $\mu\text{mol/l}$ Amilorid (Delvaux *et al.*, 1990; Orlowski, 1993). Neben der Amilorid-Sensitivität wurden andere NHE-Eigenschaften genutzt, um auf die Anwesenheit bestimmter Subtypen im Pansenepithel zu schließen. Untersuchungen über die im Pansenepithel vorkommenden Na^+/H^+ -Austauscher erfolgten dabei hauptsächlich im Zusammenhang mit der Absorption von Na^+ . Gäbel *et al.* (1996) fanden eine Abhängigkeit der Amilorid-sensitiven Na^+ -Aufnahme von Wachstumsfaktoren und vermuteten daher das Vorkommen des NHE1 in PEZ. Unabhängig von einander kamen Böttcher (2000) und Müller (2000) zu dem Schluss, dass der NHE1 in der Abwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ das wichtigste pH_i -regulierende System bei PEZ darstellt. In beiden Untersuchungen wurde neben Amilorid auch mit dem NHE1-spezifischen Hemmstoff HOE694 in Konzentrationen von 50 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 200 $\mu\text{mol/l}$ gearbeitet und in beiden Fällen eine Absenkung des pH_i erreicht. Böttcher (2000) postulierte zusätzlich das Vorkommen des NHE3. Der bei Epithelzellen apikal lokalisierte NHE3 wird durch Hyperosmolarität des extrazellulären Mediums sowie nach Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration gehemmt, während für die meisten NHE-Subtypen eine Aktivierung durch diese Parameter typisch ist (Bevenssee *et al.*, 1999). Ein Anstieg

der extrazellulären Osmolarität von 300 auf 340 mosmol/l löste eine Verminderung des pH_i um 0,28 pH-Einheiten und die Applikation von dB-cAMP eine Abnahme des pH_i um 0,1 pH-Einheiten aus (Böttcher *et al.*, 2000).

5.3 Einfluss der NHE-Subtypen 1 und 3 auf den pH_i und die pH_i -Erholung nach einem Säureload mit Butyrat

Erst kürzlich konnte die Existenz von NHE1 und NHE3 bei ovinen Pansenepithelzellen durch den Nachweis der mRNA beider Transporter mittels RT-PCR bestätigt werden (Schweigel *et al.*, 2005) (siehe auch Kapitel 2.2.2).

In der eigenen Arbeit wurden selektive Inhibitoren des NHE1 (HOE694, 10, 50 und 100 $\mu\text{mol/l}$) und des NHE3 (S3226, 10, 50 und 100 $\mu\text{mol/l}$) genutzt (Fischer *et al.*, 1999; Noel und Pouyssegur, 1995; Schwark *et al.*, 1998), um die NHE-Subtypen und ihre Effekte auf den pH_i und die pH_i -Erholung nach einer Säurebelastung mit Butyrat zu definieren. Beide Inhibitoren bewirkten sowohl bei alleiniger als auch bei kombinierter Anwendung deutliche Effekte auf den pH_i und die Butyrat-induzierte pH_i -Erholung, wobei maximale Effekte mit 100 $\mu\text{mol/l}$ HOE694 und 10 $\mu\text{mol/l}$ S3226 erzielt wurden. In höheren Konzentrationen ist daher auch mit Effekten auf andere NHE-Subtypen zu rechnen. Die Versuchsergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass beide NHE-Subtypen auch bei physiologischen pH_i -Werten aktiv sind.

Effekt von HOE694: Die Applikation von HOE694 löste einen konzentrationsabhängigen Abfall des pH_i aus. Maximale Hemmeffekte wurden mit 100 $\mu\text{mol/l}$ HOE694 erreicht. Ausgehend von einem pH_i von $6,74 \pm 0,14$ wurde bei dieser Dosierung der Ausgangs- pH_i um $0,29 \pm 0,01$ und der End- pH_i um $0,39 \pm 0,04$ pH-Einheiten reduziert. Zusätzlich verursachte HOE694 eine konzentrationsabhängige Verminderung der Butyrat-induzierten pH_i -Erholung. Auch hier wurden maximale Hemmeffekte mit einer HOE694-Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ erreicht. Bei dieser Dosierung wurde die pH_i -Erholungsrate um $0,07 \pm 0,02$ pH-Einheiten gegenüber dem Kontrollwert ($0,23 \pm 0,01$) reduziert. Daraus ergibt sich für die vorliegenden experimentellen Bedingungen ein Anteil des NHE1 an der pH_i -Erholung von 33 %. Böttcher (2000) führte ähnliche Versuche mit 50 $\mu\text{mol/l}$ HOE694 durch und fand eine gegenüber der Kontrolle um 25 % reduzierte

Butyrat-induzierte pH_i -Erholung (Böttcher, 2000). Auch in den eigenen Versuchen mit der niedrigeren HOE694-Dosierung (50 $\mu\text{mol/l}$) ergab sich eine Verminderung der pH_i -Erholung um 26% und somit eine sehr gute Übereinstimmung der Versuchsergebnisse.

Im Unterschied dazu arbeitete Müller (2000) mit 200 $\mu\text{mol/l}$ HOE694 und erzielte damit eine Reduktion der pH_i -Erholung nach Ansäuerung mittels $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -Präpuls um 70% gegenüber der Kontrolle. Direkt im Anschluss erfolgte eine Ansäuerung der Zellen mittels Butyrat. Darauf folgte eine pH -Erholung von 0,16 pH Einheiten, diese wurde durch die Zugabe von 200 $\mu\text{mol/l}$ HOE694 um 69% reduziert. In den eigenen Versuchen war also die pH_i -Erholungsrate auch unter dem Einfluss von HOE694 deutlich höher.

Hierbei sind drei Faktoren zu berücksichtigen: 1. Erfolgte in den eigenen Versuchen ausschließlich eine Ansäuerung mittels Butyrat, während die Zellen, die Müller für die Versuche mit einer Ansäuerung mittels Butyrat verwendete, bereits die Versuche einer Ansäuerung durch $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -Präpuls durchlaufen hatten. Es ist denkbar, dass die Zellen dadurch nicht mehr in der Lage waren, vollständig auf die Säurebelastung zu reagieren, weil z.B. bereits eine ATP-Verarmung eingetreten war oder ein Teil der Pufferkapazitäten (z.B. HCO_3^-) verbraucht war. 2. War in den Versuchen von Müller das HOE694 zum Zeitpunkt der Butyrat-Ansäuerung bereits 17 Minuten im Medium, während es bei den eigenen Versuchen erst direkt zu Versuchsbeginn der Zellsuspension zugegeben wurde. 3. Verwendete Müller eine doppelt so hohe HOE694-Konzentration wie in den eigenen Versuchen zur Anwendung kam. Aus der Literatur ist bekannt, dass beispielsweise der NHE3 bereits ab Konzentrationen über 100 $\mu\text{mol/l}$ gehemmt wird (Noel und Pouyssegur, 1995).

Effekt von S3226: In der hier vorliegenden Arbeit erfolgte erstmalig der Einsatz von S3226 bei ovinen Pansenepithelzellen. Das Bismethacryloyl-Guanidin-Derivat S3226 ist ein hoch wirksamer und spezifischer NHE3-Blocker. Beim NHE3 des Menschen wird eine 50%ige Hemmung (IC_{50}) mit 0,02 $\mu\text{mol/l}$ S3226 erreicht, wohingegen für die IC_{50} des humanen NHE1 sowie des NHE2 des Kaninchens 3,6 bzw. 80 $\mu\text{mol/l}$ benötigt wurden (Schwark *et al.*, 1998). Demzufolge ist die für die IC_{50} des humanen NHE1 erforderliche Konzentration 180-fach höher als für die IC_{50} des humanen NHE3. Es ist davon auszugehen, dass bei intakten PEZ insgesamt höhere Konzentrationen zur Anwendung kommen müssen, dass aber auch hierbei die zur

Inhibition des NHE1 notwendige Konzentration ein Vielfaches der zur Inhibition des NHE3 ausreichenden Konzentration beträgt. Daher wurde in den eigenen Versuchen mit 10, 50 und 100 µmol/l S3226 gearbeitet. Bei einer Dosierung von 10 µmol/l ist noch nicht anzunehmen, dass andere NHE-Isoformen (NHE1, NHE2) als der NHE3 blockiert werden. In dieser Dosierung führte S3226 bereits zu einer signifikanten und im gesamten Messverlauf bestehen bleibenden Reduktion des pH_i um $0,23 \pm 0,08$ pH-Einheiten. Diese pH_i -Erniedrigung bewegt sich in Größenordnungen, wie sie von Böttcher *et al.* (2000) nach NHE3-Inhibition im hyperosmolalen (340 mosmol/l) Medium ($-0,28$ pH-Einheiten) gefunden wurden (Böttcher, 2000). Darüber hinaus kam es zu einer Verminderung der Butyrat-induzierten pH_i -Erholung um $0,08 \pm 0,04$ pH-Einheiten/10min, d.h. um 20%.

Nach Erhöhung der Konzentration auf 50 µmol/l kam es zu einer starken Zunahme der Variation der Ergebnisse. Dieser Effekt kann als Ausdruck einer beginnenden Hemmwirkung auf andere NHE-Isoformen, insbesondere auf den NHE1, interpretiert werden (Schwark *et al.*, 1998). Diese Vermutung wird durch das Erreichen maximaler Hemmeffekte nach Erhöhung der S3226-Dosis auf 100 µmol/l bestätigt. Der End- pH_i wurde bei Anwendung dieser Konzentration um $0,33 \pm 0,07$ pH-Einheiten reduziert.

Effekt einer kombinierten Anwendung von HOE694 und S3226: Im Vergleich zu den Ergebnissen der Messungen mit 250µmol/l Amilorid fällt auf, dass in den Amilorid-Messungen die pH-Erholung weniger stark reduziert wurde, als in den Messungen mit einer kombinierten Applikation von HOE694 und S3226 (bei 250 µmol/l Amilorid pH_i -Erholung um $0,12 \pm 0,03$ pH-Einheiten vermindert, bei 100 µmol/l HOE694 und 10 bzw. 50 µmol/l S3226 pH_i -Erholung um $0,15 \pm 0,05$ bzw. $0,16 \pm 0,03$ pH-Einheiten vermindert). Mögliche Ursache ist, dass bei einer Dosierung von 250 µmol/l Amilorid der NHE noch nicht maximal gehemmt ist. Die Versuche von Böttcher (2000) ergaben, dass die Zugabe von 500 µmol/l Amilorid zu einer stärkeren pH_i -Reduktion führte als die Anwendung von 250 µmol/l Amilorid (48% bzw. 22%).

Wie bei Effekten auf NHE1 und NHE3 zu erwarten war, führte die Gabe von 100 µmol/l HOE694 mit 10 oder 50 µmol/l S3226 nicht zu stärkeren, sondern sehr ähnlichen Resultaten ($-0,29 \pm 0,05$ pH-Einheiten). Die pH_i -Erholung wurde mit 100 µmol/l S3226 im Medium um $0,24 \pm 0,04$ pH-Einheiten/10 min, d.h. um 51 %,

vermindert. Auch diese Daten stimmen gut mit den nach kombinierter Blockergabe beobachteten Werten überein. Nach Applikation von 100 µmol/l HOE695 mit 10 oder 50 µmol/l S3226 wurde die pH_i-Erholungsrate um 44% ± 10% bzw. 47% ± 6% (100 µmol/l HOE694 und 50 µmol/l S3226) vermindert. Auch die nach Einzelapplikation von 100 µmol/l HOE694 (-33 %) oder 10 µmol/l S3226 (-20 %) ermittelten Werte für die Reduktion der pH_i-Erholung ergeben summarisch eine Beteiligung beider NHE-Subtypen an der pH_i-Erholung von 53 %.

Im Unterschied zu den eigenen Ergebnissen erreichten Müller *et al.* (2000) bereits mit dem NHE1-Inhibitor HOE694 eine 69%-ige Hemmung der Butyrat-induzierten pH_i-Erholung. Wegen der in dieser Studie eingesetzten hohen Konzentration von 200 µmol/l ist es jedoch sehr wahrscheinlich, dass auch andere NHE-Subtypen beeinflusst wurden. Laut Counillon *et al.* (1993) ist bei Fibroblasten für die 50%igen Inhibition (IC₅₀) des NHE1 HOE694 in einer Konzentration von 0,16 µmol/l ausreichend, während die IC₅₀ des NHE2 5 µmol/l und die des NHE3 650 µmol/l beträgt. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass in Konzentrationen >100 µmol/l bereits Hemmeffekte auf den NHE3 zu erwarten sind, während der NHE2 schon in niedrigen Konzentrationen zusätzlich zum NHE1 inhibiert wird.

Erst kürzlich wurden von der eigenen Arbeitsgruppe Untersuchungen mittels quantitativer RT-PCR an primär kultivierten ovinen PEZ durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die NHE3- und die NHE2-mRNA im Vergleich zur NHE1-mRNA um das 400- bzw. 7000-fache niedriger exprimiert sind. Außerdem wurde nachgewiesen, dass der NHE2 hauptsächlich im Labmagen vorkommt. Wegen der außerordentlich geringen NHE2-Expression scheint es gerechtfertigt, die beobachteten HOE694-Effekte auf eine Hemmung des NHE1 zurückzuführen. Eine signifikante NHE2-Beteiligung an der pH_i-Regulation in diesem Gewebe ist nicht wahrscheinlich, kann aber auf Grund der bisher durchgeführten experimentellen Arbeiten nicht vollständig ausgeschlossen werden (Etschmann *et al.*, 2006).

Die Ergebnisse der im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Inhibitorstudien machen deutlich, dass neben der Isoform 1 des NHE bei ovinen, primärkultivierten PEZ auch der NHE3 ausgebildet ist. Für weitere Versuche werden Hemmstoffkonzentrationen von 100 µmol/l für HOE694 und von 10 µmol/l für S3226 vorgeschlagen.

Neben dem NHE1 (33 %) hat der NHE3 mit etwa 20% einen entscheidenden Anteil an der Butyrat-induzierten pH_i-Erholung. Im HEPES-gepufferten, Butyrat-haltigen

Medium waren beide Mechanismen auch bei physiologischen intrazellulären pH_i -Werten aktiv und an der pH_i -Regulation beteiligt.

Eine subtypspezifische Hemmung von NHE1 und NHE3 reduzierte die pH_i -Erholung nach intrazellulärer Ansäuerung in unabhängigen Versuchsserien um ca. 50 %, deshalb kann von der Existenz weiterer Mechanismen der pH_i -Regulation ausgegangen werden.

5.4 Bedeutung der vH^+ -ATPase für die pH_i -Regulation von ovinen ruminalen Epithelzellen

Als ein solcher weiterer Mechanismen der pH_i -Regulation kommt die vH^+ -ATPase in Betracht. In früheren Untersuchungen führte der spezifische vH^+ -ATPase-Inhibitor Bafilomycin zu einer Hemmung der Mg^{2+} -Aufnahme, gleichzeitig wurde der intrazelluläre pH-Wert gesenkt (Schweigel und Martens, 2003). Auch Foliomycin ist ein spezifischer Hemmstoff der vH^+ -ATPase (Bebas *et al.*, 2002; Ehrenfeld und Klein, 1997; Hou und Delamere, 2000; Mattsson *et al.*, 1991). Das auch als Concanamycin bekannte Foliomycin weist im Vergleich zu Bafilomycin eine höhere Spezifität für vH^+ -ATPasen auf (Drose *et al.*, 1993).

In den eigenen Versuchen wurde mit 2 $\mu\text{mol/l}$ Foliomycin gearbeitet. Mit der gewählten Dosierung wurden von der eigenen Arbeitsgruppe bereits bei früheren Versuchen an PEZ aussagekräftige Resultate erzielt (Schweigel *et al.*, 2004a; Schweigel *et al.*, 2004b; Schweigel und Martens, 2003).

5.4.1 Effekt von Foliomycin auf den pH_i ruminaler Epithelzellen

Foliomycin führte in HEPES-gepuffertem NaCl-Medium ohne bzw. mit 20 mmol/l Butyrat zu einer Erniedrigung des pH_i . Fünf Minuten nach der Applikation von Foliomycin war der pH_i im HEPES-gepufferten Na^+ -Medium um $0,16 \pm 0,03$ und im HEPES-gepufferten Na^+ -Medium mit Butyrat um $0,19 \pm 0,03$ pH-Einheiten gegenüber den Kontrollen erniedrigt. Dies entspricht einem Anstieg der H^+ -Konzentration im Zytosol ($[\text{H}^+]_i$) um 45 ± 11 % bzw. 53 ± 12 %.

Die beobachteten Effekte sind somit deutlich stärker ausgeprägt, als in vorhergehenden Untersuchungen an PEZ (Schweigel und Martens, 2003). In HCO_3^- -gepufferten NaCl-Medien sahen diese Autoren nach Applikation von 2 $\mu\text{mol/l}$ Foliomycin eine Verminderung des pH_i um 0,07 pH-Einheiten.

Dieses von den eigenen Ergebnissen abweichende Resultat lässt sich auf die Anwesenheit von HCO_3^- im Medium zurückführen. DIDS, ein Hemmstoff von HCO_3^- -abhängigen Transportsystemen, inhibierte in HCO_3^- -gepufferten Medien die pH_i -Erholung nach Säurebelastung durch $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -Präpuls fast vollständig (Müller *et al.*, 2000). Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass im HCO_3^- -haltigen Medium der pH_i der PEZ überwiegend durch einen Na^+ - HCO_3^- -Kotransporter eingestellt wird, während der Anteil des NHE an der pH_i -Regulation vermindert war (Müller *et al.*, 2000). HCO_3^- -haltige Medien müssen zur Aufrechterhaltung eines physiologischen pH mit CO_2 equilibriert werden. Das CO_2 diffundiert durch die Zellmembran ins Zellinnere und wird hier durch die Karboanhydrase in H_2CO_3 umgewandelt. H_2CO_3 dissoziiert dann in H^+ und HCO_3^- (Galfi *et al.*, 1981; Müller *et al.*, 2000). Aus der Literatur ist bekannt, dass insbesondere Protonen aus der Karboanhydrasereaktion als Substrat der vH^+ -ATPase genutzt werden. Deshalb war in HCO_3^- -gepufferten, CO_2 -haltigen Medien ein stärkerer Hemmeffekt von Foliomycin zu erwarten, als in den eigenen, mit HCO_3^- -freien Medien durchgeführten, Versuchen. Dass dies nicht der Fall war, lässt sich mit einer Dominanz der HCO_3^- -abhängigen Transportsysteme erklären, die offensichtlich einen Teil des Foliomycin-Effektes kompensieren. Eine Überprüfung dieser Hypothese wäre durch einen kombinierten Einsatz von DIDS und Foliomycin möglich.

Im Butyrat-haltigen NaCl-Medium fanden Schweigel und Martens (2003) nach Applikation von 5 $\mu\text{mol/l}$ Bafilomycin eine Reduktion des pH_i um $0,05 \pm 0,01$ pH-Einheiten (Schweigel und Martens, 2003). Auch mit diesem Medium wurde in den eigenen Versuchen ein stärkerer Hemmeffekt ($- 0,19 \pm 0,03$ pH-Einheiten) nach Foliomycin-Applikation (2 $\mu\text{mol/l}$) beobachtet. In den Versuchen anderer Autoren wurden Reduktionen des pH_i in einer ähnlichen Größenordnung wie in den eigenen Untersuchungen festgestellt. So wurde in den Untersuchungen von Heming *et al.* (1995) an alveolären und peritonealen Makrophagen vom Schaf der basale pH_i bei beiden Zelltypen durch Einsatz von 10 $\mu\text{mol/l}$ Bafilomycin A1 um durchschnittlich 0,2 pH-Einheiten reduziert. In den Untersuchungen von Hou und Delamere (2000) an unpigmentierten Epithelzellen aus dem Ziliarkörper von Kaninchen veränderte die alleinige Zugabe von Bafilomycin A1 (100 nmol/l) den pH_i nicht. Nach Vorbehandlung mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Dimethylamilorid (DMA), einem NHE-Inhibitor, verursachte Bafilomycin A1 eine Absenkung des pH_i um durchschnittlich 0,3 pH-Einheiten. Tomochika *et al.* (1997) verwendeten in ihren Untersuchungen über

die Ansäuerung des Urins in der Harnblase von Mäusen Bafilomycin und Foliomycin in Konzentrationen von jeweils 1 $\mu\text{mol/l}$. Hierbei wurde die Ansäuerung des Urins (Harn-pH = $5,62 \pm 0,24$) durch Foliomycin (Harn-pH = $6,64 \pm 0,32$) geringfügig stärker gehemmt als durch Bafilomycin (Harn-pH = $6,97 \pm 0,31$). Mit beiden Inhibitoren trat die Hemmwirkung sofort nach Zugabe des Blockers auf und hielt für mindestens 36 Stunden an (Tomochika *et al.*, 1997). Auch Kawasaki-Nishi *et al.* (2001) erzielten bei ihren Untersuchungen der Untereinheit a des in der Membran liegender V_0 -Komplexes der $v\text{H}^+$ -ATPase mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Foliomycin eine Hemmung der $v\text{H}^+$ -ATPase-Aktivität je nach Isoform um 90% (Vph1p) bzw. 64% (Stv1p). Diese Untersuchungen wurden jedoch nicht an intakten Zellen sondern an isolierten Vakuolen durchgeführt. Als mögliche Ursachen der unterschiedlichen Versuchsergebnisse innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe an dem gleichen Zelltyp und unter Verwendung derselben Methode sind Unterschiede hinsichtlich der Fütterung und des Alters der verwendeten Versuchstiere anzusehen. Das Pansenepithel verfügt über eine ausgeprägte fütterungsabhängige Adaptationsfähigkeit, die Veränderungen auf morphologischer, histologischer und funktioneller Ebene einschließt (Galfi *et al.*, 1981; Kauffold *et al.*, 1975; Liebich *et al.*, 1990; Shen *et al.*, 2004; Suplie, 2005). In den Versuchen von Schweigel und Martens (2003) wurde das Pansengewebe überwiegend von institutseigenen Tieren gewonnen, deren Futtermittel fast ausschließlich aus Heu bestand, während das Pansengewebe für die eigenen Versuche größtenteils von Tieren eines brandenburgischen Schlachthofes stammte. Bei den dort geschlachteten Tieren handelte es sich überwiegend um mit konzentratreichen Futtermitteln ernährte Mastlämmer. Es wurde häufig beschrieben, dass Pansenepithelien von konzentratreich gefütterten Schafen eine höhere Transportkapazität für verschiedene Elektrolyte aufweisen als die raufaserreich ernährten Schafen (Uppal *et al.*, 2003). Insbesondere die Natriumresorption stieg nach dem Übergang auf Konzentratfütterung sehr schnell an (Schweigel *et al.*, 2006). Diese Erhöhung war jedoch nicht mit Veränderungen der NHE-Transkription verbunden. Shen *et al.* (2004) fanden bei konzentratgefütterten Ziegen einen Anstieg der Plasmakonzentration an *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) sowie, neben proliferativen Veränderungen am Pansenepithel, eine gesteigerte Na^+ -Aufnahme. In einer nachfolgenden Untersuchung konnte ein aktivierender Effekt von IGF-1 auf den NHE direkt nachgewiesen werden (Shen *et al.*, 2005; Schweigel, pers.

Mitteilung, 2006). Suplie (2005) untersuchte den Einfluss verschiedener Parameter auf die Expression der vH^+ -ATPase. Nach Applikation der Wachstumsfaktoren IGF-1 und *epidermal growth factor* (EGF) kam es zu einer Aufregulation des Transportproteins. Eine erhöhte vH^+ -ATPase-Expression und/oder -Aktivität bei konzentratreich gefütterten Schafen könnte daher die unterschiedlichen Ergebnisse erklären. Denn nach Konzentratfütterung ist insbesondere der Anteil an Butyrat in der Pansenflüssigkeit erhöht (von Engelhardt, 2000; Etschmann *et al.*, 2005; Gäbel und Sehested, 1997; Shen *et al.*, 2004; Suplie, 2005; Uppal *et al.*, 2003). Dies führt zu einem Anstieg von Wachstumsfaktoren (z.B. IGF-1) und Hormonen (z.B. Insulin), sowohl lokal als auch systemisch (Shen *et al.*, 2004). In der Folge kommt es zu einer verstärkten Expression der vH^+ -ATPase und eventuell zu einem höheren Anteil an vH^+ -ATPase-exprimierenden Zellen im Pansenepithel (Suplie, 2005). Auch der Einbau von vH^+ -ATPasen aus den Membranen intrazellulärer Vesikel in die Plasmamembran ist variabel (Mattsson *et al.*, 1991; Nanda *et al.*, 1996; van Adelsberg und Al-Awqati, 1986). Wichtige Signale für den Einbau sind beispielsweise der pH_i und der pCO_2 (Ehrenfeld und Klein, 1997; Gluck *et al.*, 1992; Roussa *et al.*, 1998; Soleimani *et al.*, 1995). Auch das Substratangebot spielt eine Rolle (Wang und Telfer, 1998). Dies sind alle Faktoren, die bei Konzentratfütterung im Vergleich zur Heufütterung verändert sind.

In Abhängigkeit von den z.B. durch unterschiedliche Fütterung wechselnden Bedingungen (z.B. pH_e , pH_i und pCO_2) kann der Anteil an vH^+ -ATPase exprimierenden Zellen unterschiedlich sein, dies wurde durch Untersuchungen an der Froschhaut bewiesen (Ehrenfeld und Klein, 1997; Page *et al.*, 1990).

Auch Nordström *et al.* (1997) stellten bei Osteoklasten in den Kontrollmessungen bei einem pH_e von 7,5 fest, dass nur 5% der Zellen eine vH^+ -ATPase-Aktivität aufwiesen, während nach einer 4-6stündigen Inkubation bei einem pH_e von 6,5 40% der Zellen eine Bafilomycin-abhängige pH-Erholung zeigten (Nordström *et al.*, 1997).

Des Weiteren wurde eine Abhängigkeit der vH^+ -ATPase-Aktivität vom Alter bzw. Funktionszustand der Zellkultur beschrieben. So zeigten sich bei der Kultur von medullären Sammelrohrzellen der Ratte altersabhängige Unterschiede in der pH_i -Erholung nach Ansäuerung. In Phasen schnellen Wachstums waren vor allem NHE ausgebildet; es wurde keine oder nur eine geringe Na^+ -unabhängige pH_i -Erholung beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigten ruhende Zellen überwiegend

eine Na^+ -unabhängige, ATP-abhängige pH_i -Erholung (Stanton *et al.*, 1990). Die Autoren vermuteten bei den ruhenden Zellen die Aktivität von vH^+ -ATPasen. Die Zellen, die in den Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe zum Einsatz kamen, unterschieden sich teilweise um mehrere Tage im Kulturalter, so dass der erwähnte Effekt eine Rolle spielen könnte. Auch Gäbel *et al.* (1996) stellten eine Abhängigkeit des Na^+/H^+ -Austausches von der Proliferation und Differenzierung in verschiedene Zelltypen fest, wobei junge Zellen eine größere Amilorid-abhängigen Na^+ -Aufnahme zeigten (Gäbel *et al.*, 1996). Junge Kulturen haben einen hohen Anteil an Basalzellen, einem proliferierenden Zelltyp; mit zunehmender Kulturdauer kommt es auch zu einer Zunahme an differenzierten Zellen, dem *Stratum granulosum* entsprechend (Liebich *et al.*, 1990). Die Schlussfolgerung, dass der Anteil verschiedener Zelltypen eine Rolle spielt, steht in Einklang zu den Ergebnissen der Untersuchungen an der Froschhaut (Ehrenfeld und Klein, 1997; Page *et al.*, 1990).

In einigen der durchgeführten Experimente kam es zu einer zeitabhängigen Abschwächung des Foliomycin-induzierten pH_i -Abfalls, was zu einer stärkeren Variabilität der Foliomycineffekte ($-0,18 \pm 0,07$ pH-Einheiten) am Ende der Messperiode führte. Dies ist möglicherweise Folge eines H^+ -Efflux durch andere der pH_i -regulierende Mechanismen, z.B. via NHE. In Anwesenheit von Butyrat bzw. nach Absenkung des extra- oder intrazellulären pH-Wertes kommt es bei ovinen PEZ zu einer Aktivierung des NHE (Böttcher, 2000; Gäbel *et al.*, 1996). Eine solche Aktivierung könnte durch Foliomycin verstärkt werden. Die Aktivierung des NHE könnte daher die Foliomycin-abhängige Absenkung des pH_i teilweise kompensieren. Die meisten NHE-Isoformen zeigen eine rasche Aktivitätszunahme durch ansteigende $[\text{H}^+]_i$ infolge einer gesteigerten Affinität der allosterischen Bindungsstelle des Austauschers zu intrazellulären H^+ (Aronson, 1985). Nach Zugabe von Foliomycin kommt es zu einem Anstieg der $[\text{H}^+]_i$ um 60%, damit einhergehend nimmt die Antriebskraft für eine H^+ -Sekretion über den NHE zu ($E_{\text{Na}^+} - E_{\text{H}^+} = +107$ mV im Vergleich zu +95 mV unter Kontrollbedingungen). Diese Überlegungen werden durch die Ergebnisse der Versuche einer kombinierten Gabe von spezifischen NHE1- und NHE3-Inhibitoren (HOE694 und/oder S3226) zusammen mit Foliomycin unterstützt. Es war zu erwarten, dass sich die Foliomycin-induzierte Reduktion des pH_i nach Gabe von NHE-Inhibitoren verstärken würde. Tatsächlich führte bereits die zusätzliche Applikation von S3226 zu einer weiteren Absenkung des pH_i um 0,04 pH-Einheiten. Durch kombinierte Anwendung von Foliomycin mit S3226 und

HOE694 konnte eine signifikante Absenkung des pH_i um $0,64 \pm 0,2$ pH-Einheiten am Ende der Messung erreicht werden. Auch Hou und Delamere (1999) stellten bei ihren Untersuchungen am Ziliarepithel des Kaninchens nach Gabe von Bafilomycin eine Zunahme der $[Na^+]_i$ durch Amilorid-sensitive Mechanismen fest. So dass hier von einer teilweisen Überlagerung der Bafilomycin-Effekte durch eine gesteigerte NHE-Aktivität ausgegangen werden kann (Hou und Delamere, 2000).

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen machen deutlich, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen (HCO_3^- -freies Medium) die vH^+ -ATPase bei PEZ einen wesentlichen Anteil (ca. 30%) an der Aufrechterhaltung eines physiologischen pH_i hat.

5.4.2 Beteiligung der vH^+ -ATPase und der NHE an der Butyrat-induzierten pH_i -Erholung

Wie im Kapitel 5.2. sowie unter 5.4.1. dargelegt, werden etwa 50 % der Butyrat-induzierten pH_i -Erholung durch den NHE1 und den NHE3 vermittelt. Ergebnisse in einer ähnlichen Größenordnung wurden von Wu *et al.* (1998) an bovinen Korneaepithelzellen erzielt. Hier wurde die pH_i -Erholung durch 1 mmol/l Amilorid um 48% reduziert.

Dabei dominierte die NHE1-Aktivität, die zudem in Anwesenheit von Foliomycin deutlich stimuliert wurde. Dies führte in etwa der Hälfte der Experimente zu einer Kompensation der inhibitorischen Effekte von Foliomycin auf die pH_i -Erholung vergleichbar mit der oben beschriebenen Abschwächung des Foliomycin-Effektes auf den pH_i . Zum Beispiel lag an einem Messtag die pH_i -Erholungsrate der Kontrollzellen bei 0,61, die der Foliomycin-behandelten Zellen bei 0,56 bzw. 0,48 pH-Einheiten, während an einem anderen Messtag die Kontrollzellen eine pH_i -Erholungsrate von 0,57 und die Zellen der Foliomycinmessungen von 0,72 pH-Einheiten aufwiesen.

Nach Applikation von Foliomycin in Kombination mit dem NHE3-Inhibitor S3226 (10 μ mol/l) wurde die pH_i -Erholungsrate gegenüber der pH_i -Erholungsrate der unbehandelten Kontrollzellen vermindert. Eine signifikante Erniedrigung der pH_i -Erholungsrate um $0,19 \pm 0,08$ pH-Einheiten / 10 min trat jedoch erst ein, wenn zusätzlich zum Foliomycin die NHE-Inhibitoren HOE694 (100 μ mol/l) und S3226 (10 μ mol/l) appliziert wurden. Diese Versuchsergebnisse bestätigen, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen die Butyrat-induzierten pH_i -Erholung im

Wesentlichen von der Aktivität des NHE1 bestimmt wird. Die dominierende Rolle dieses NHE-Subtyps unter $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -freien Bedingungen für die pH_i -Erholung nach einem Säureload wurde auch von anderen Autoren dokumentiert (Böttcher, 2000; Müller *et al.*, 2000; Schweigel *et al.*, 2004b).

Es wurde zusätzlich eine Serie an Experimenten durchgeführt, bei denen die PEZ in einer $\text{CO}_2(5\%)/\text{HCO}_3^-(20 \text{ mmol/l})$ -haltigen Lösung inkubiert wurden. Unter diesen Bedingungen ist der $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ Kotransporter hauptsächlich für die pH_i -Erholung verantwortlich (88%) und die NHE-Aktivität ist nur von untergeordneter Bedeutung (Müller *et al.*, 2000). Bei diesen Versuchen war der hemmende Effekt von Foliomycin auf die pH_i -Erholung auf $0,17 \pm 0,01 \text{ pH-Einheiten}/10 \text{ min}$ ($P < 0,05$) im Gegensatz zu $0,22 \pm 0,02 \text{ pH-Einheiten}/10 \text{ min}$) bei den nicht behandelten Kontrollzellen reduziert (Daten nicht gezeigt).

Daneben wurden kooperative Wechselwirkungen zwischen vH^+ -ATPase und NHE3, beispielsweise für unpigmentierte Epithelzellen des Ziliarkörpers und für Cardiomyozyten, beschrieben (Hou und Delamere, 2000; Karwatowska-Prokopczuk *et al.*, 1998). Für die Cardiomyozyten wird angenommen, dass der durch die vH^+ -ATPase vermittelte H^+ -Efflux die intrazelluläre Na^+ -Überladung durch den Na^+ -Einstrom über den NHE verhindert. In PEZ führt die Aktivierung des cAMP-PKA-Weges zu einer Hemmung des NHE3 (Böttcher *et al.*, 2000) und zu einer Aktivierung unspezifischer Kationen-Kanäle, welche den Na^+ -Einstrom ermöglichen (Schweigel *et al.*, 2005). Noch ist unbekannt, ob die vH^+ -ATPase bei PEZ unter solchen Bedingungen aktiviert wird und eine Rolle für den Transport von Soluten spielt.

5.5 Einfluss von cAMP auf die pH_i -Regulation von Pansenepithelzellen

An verschiedenen Geweben bzw. Zelltypen wurde eine Stimulierung der vH^+ -Aktivität bzw. der vH^+ -ATPase-Expression über die cAMP-PKA-Kaskade beschrieben (Wieczorek *et al.*, 2000). Dieser Signalweg wurde auch für Follikelzellen aus dem Ovar der Motte *Hyalophora cecropia* dargestellt und führt hier zum osmotischen Anschwellen; der Prozess ließ sich durch Bafilomycin inhibieren (Wang und Telfer, 1998). Dies lässt den Schluss zu, dass die vH^+ -ATPase durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A aktiviert wurde, sich demzufolge cAMP auf die

vH⁺-ATPase-Aktivität auswirkt. Auch O'Donnell *et al.* (1996) beschreiben, dass cAMP den Ionen-Transport über die vH⁺-ATPase bei den Malpighi-Tubuli von *Drosophila melanogaster* zu stimulieren scheint (O'Donnell *et al.*, 1996). Wieczorek *et al.* (2000) erstellten ein Modell, wonach cAMP zu einer Aufregulation der Transkriptionsrate der vH⁺-ATPase führt. Interessanterweise zeigten aber auch Hefezell-Mutanten mit Defekt des ras-cAMP-Signalweges ein Angebot an vH⁺-ATPase vergleichbar zu dem des Wild-Typs (Kane und Smardon, 2003).

cAMP hat einen hemmenden Einfluss auf den NHE3 (Bevensee *et al.*, 1999; Böttcher, 2000; Gäbel *et al.*, 1999; Yun *et al.*, 1997), gleichzeitig kommt es zu einer Stimulierung des NHE1 und möglicherweise der vH⁺-ATPase. Dies konnte molekularbiologisch bestätigt werden: Unter Einfluss von cAMP und PGE₂, welches zu einer Erhöhung der [cAMP]_i führt (Böttcher, 2000; Schweigel, 2001; Suplie, 2005), wurde eine vermehrte Genexpression der vH⁺-ATPase und des NHE1 festgestellt (Suplie, 2005). In den eigenen Versuchen wurde nur mit dem membrangängigen dB-cAMP gearbeitet, weil dieses genauso wie PGE₂ zu einer Erhöhung der [cAMP]_i führt (Böttcher, 2000) und somit ähnliche Effekte zu erwarten sind.

Nach Zugabe von 100 µmol/l dB-cAMP kam es zu einer deutlichen Erniedrigung des pH_i über den gesamten Messverlauf. Die Ausgangswerte lagen unter Einfluss von 100µmol/l dB-cAMP $0,17 \pm 0,07$ pH-Einheiten unter den Kontrollwerten, die Endwerte waren um $0,07 \pm 0,04$ pH-Einheiten erniedrigt. Im Na⁺-Medium ist also die nach dB-cAMP-Applikation erwartete pH_i-Reduktion sichtbar, welche auf eine Hemmung des NHE3 zurückzuführen ist. Zu diesem Ergebnis führten auch die Versuche von Schweigel (Schweigel, 2001; Schweigel *et al.*, 2005; Schweigel *et al.*, 2000) und Böttcher (2000); hier kam es nach Erhöhung der [cAMP]_i zu einer Reduktion des pH_i und der [Na⁺]_i. Die in diesen Versuchen erzielten Effekte auf den pH_i liegen in einer ähnlichen Größenordnung wie in den eigenen Versuchen. Auch an anderen Epithelien und an Epithelzellen der Niere (Weinman und Shenolikar, 1993) und des Gastrointestinaltraktes (Bookstein *et al.*, 1999; Yun *et al.*, 1997) wurde eine Reduktion des Na⁺-Transportes bzw. eine herabgesetzte Aktivität des NHE durch erhöhte [cAMP]_i nachgewiesen. Dieser Effekt ist Ergebnis einer durch [cAMP]_i verminderten Affinität des NHE3 gegenüber H⁺ und einer reduzierten V_{max} (Bookstein *et al.*, 1999; Cabado *et al.*, 1996). Die Folge einer erhöhten [cAMP]_i ist außerdem eine verminderte Resorption von Natrium und von Chlorid (Gäbel *et al.*, 1999; Wolfram *et al.*, 1989). Die verminderte Aktivität des NHE3 führt

möglicherweise zu einer Erhöhung des Protonenangebotes und dadurch zu einer Stimulation der vH^+ -ATPase-Aktivität (Schweigel, 2001). Diese Annahme wird durch die Ergebnisse von Suplie bestätigt: Die Expression der vH^+ -ATPase und des NHE1 wird durch cAMP gesteigert und kann als Gegenregulationsphänomen gegen die intrazelluläre Akkumulation von Protonen gedeutet werden (Suplie, 2005). Diese Gegenregulation ist auch im Zusammenhang mit der Problematik der Pansenazidose und mit entzündlichen Vorgängen an der Pansenschleimhaut (z.B. Rumino-Reticulitis infolge des Abschluckens scharfer Metallteile) von Bedeutung, da PGE_2 als Entzündungsmediator bekannt ist (Bos *et al.*, 2004). Von großer Bedeutung sind hier die Erkenntnisse von Brisseau *et al.* (1996) an peritonealen Makrophagen der Maus. Interleukin-1 (IL-1) wird im Rahmen von Entzündungsgeschehen vermehrt freigesetzt. Nach Rezeptorbindung von IL-1 werden Tumornekrose-Faktor, Prostaglandine, Prokoagulantien, Thromboxane und weiteres IL-1 gebildet. Die Autoren stellten fest, dass IL-1 die vH^+ -ATPase-vermittelte pH_i -Erholungsrate nach Ansäuerung durch NH_4^+/NH_3 -Präpuls vergrößerte. Dieser Effekt wurde durch einen cAMP-abhängigen Signalweg vermittelt. Sowohl der Proteinkinase A- als auch der Proteinkinase C-Signalweg waren cAMP-abhängig. Weder die Aktivierung des Proteinkinase A- noch des Proteinkinase C-Signalweges allein vermochten die vH^+ -ATPase-Aktivität zu steigern; die kombinierte Aktivierung beider Wege ist also notwendig, um den stimulierenden Effekt von IL-1 zu vermitteln.

Unter Einfluss von $100\mu\text{mol/l}$ dB-cAMP erfolgte eine um $0,1 \pm 0,05$ pH-Einheiten stärkere pH-Erholung, jedoch bei insgesamt niedrigeren pH-Werten. Die Ergebnisse liegen somit in einer Größenordnung wie von früheren Untersuchungen. So führte in Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe die Zugabe von $100\mu\text{mol/l}$ dB-cAMP zu einer Reduktion des pH_i von $7,16 \pm 0,17$ auf $7,04 \pm 0,19$ (Böttcher *et al.*, 2000). Es ist anzunehmen, dass die verstärkte pH-Erholung Folge der oben beschriebenen Stimulation anderer pH_i -regulierender Mechanismen, insbesondere des NHE1 und der vH^+ -ATPase, ist.

5.6 Beeinflussung der vH^+ -ATPase- und NHE- Aktivität durch Veränderungen der extrazellulären Elektrolytkonzentration

5.6.1 Effekt einer reduzierten extrazellulären Cl^- -Konzentration

Effekt auf den pH_i : Die Verminderung der $[Cl^-]_e$ löste eine starke Reduktion des pH_i aus, die im gesamten Messzeitraum bestehen blieb. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit früheren Untersuchungen (Schweigel und Martens, 2003). Auch hier war der pH_i im Medium mit reduzierter $[Cl^-]_e$ niedriger (pH_i $6,68 \pm 0,001$) als im Kontrollmedium mit physiologischer $[Cl^-]_e$ (pH_i $6,83 \pm 0,1$). Ursache ist die Beeinflussung pH_i -regulierender Transportprozesse (siehe unten).

Einfluss einer verminderten $[Cl^-]_e$ auf die Effekte von Foliomycin, HOE694 und S3226: Die Applikation des vH^+ -ATPase-Inhibitors Foliomycin führte im Cl^- -reduzierten Medium nicht zu einer weiteren, signifikanten Absenkung des pH_i . Die gegenüber dem Normalmedium reduzierten Hemmstoffeffekte von Foliomycin legen die Vermutung nahe, dass die $[Cl^-]_e$ direkt oder indirekt die vH^+ -ATPase-Aktivität hemmend beeinflusst. Schon in anderen Arbeiten wurde die Rolle der $[Cl^-]_e$ für die Funktion der vH^+ -ATPase sowohl bei intrazellulären Organellen (Fernandez und Malnic, 1998; Wadsworth und van Rossum, 1994) als auch im Rahmen des nach extrazellulär gerichteten H^+ -Transportes über die Zellmembran (Fernandez und Malnic, 1998; Kaunitz *et al.*, 1985) nachgewiesen. Die Mechanismen, die der Bedeutung der $[Cl^-]_e$ zugrunde liegen, müssen noch aufgeklärt werden. Es werden verschiedene Mechanismen ursächlich für den negativen Effekt einer reduzierten $[Cl^-]_e$ auf die vH^+ -ATPase verantwortlich gemacht.

So haben zahlreiche Studien gezeigt, dass die elektrogene Pumpe einen parallelen Anionenstrom benötigt, um das aufgebaute Potential aufrecht halten zu können und dass ein Cl^- -Strom durch einen Cl^- -Kanal in Zusammenhang mit der vH^+ -ATPase-Aktivität steht (Kaunitz *et al.*, 1985; Marshansky und Vinay, 1996). Darüber hinaus scheint die Regulation der Leitfähigkeit des Kanals, z.B. über die cAMP-abhängige Protein-Kinase, ein wichtiger Mechanismus der Modulierung der vH^+ -ATPase-Aktivität zu sein (Wang und Telfer, 1998). Andererseits könnte ein herabgesetzter vH^+ -ATPase-vermittelter H^+ -Ausstrom Folge einer unzureichenden Sättigung einer spezialisierten Anionen-Bindestelle des in die Zellmembran eingebetteten Sektors der vH^+ -ATPase mit Cl^- sein (Kaunitz *et al.*, 1985) und/oder eine Verminderung der Anzahl an Pumpen, die auf der Oberfläche der PEZ exprimiert werden (Malnic und

Geibel, 2000). Das Zusammenfügen von vH^+ -ATPase-Untereinheiten, die aus den Membranen intrazellulärer Organellen bereit gestellt werden (*assembly* bzw. *reassembly*) (Kane und Parra, 2000; Merzendorfer *et al.*, 1997), und ihr anschließender Einbau in die Zellmembran ist ein allgemeiner Mechanismus, der in vielen Zelltypen arbeitet, um die vH^+ -ATPase-Aktivität an verschiedene Signale oder Stimuli anzupassen (Breton *et al.*, 2000; van Adelsberg und Al-Awqati, 1986). So beschrieben Madsen und Tisher (1985) für Sammelrohrzellen die Insertion von aus dem Golgi-Apparat stammenden Protonenpumpen-haltigen Vesikeln in die tubulovesikulären Membranen. Nach Stimulation der H^+ -Sekretion verschmelzen diese Membranen mit der luminalen Plasmamembran, so dass Protonenpumpen in der luminalen Membran zur Verfügung stehen. Ein negativer Effekt der Blockade von Cl^- -Kanälen auf den zellulären Transport von Vesikel (*vesicle trafficking*) wurde demonstriert, aber die Mechanismen sind noch nicht bekannt (Malnic und Geibel, 2000).

Nach Überführung der Zellen in ein Medium mit reduzierter $[Cl^-]$ war der beobachtete pH_i -Abfall größer als man bei alleiniger Hemmung der vH^+ -ATPase erwarten würde (initial $-0,52 \pm 0,03$ pH_i -Einheiten, am Ende der Messung $-0,72 \pm 0,08$ pH_i -Einheiten). Darüber hinaus ist nicht nur die durch Foliomycin hemmbare Komponente des pH_i , sondern auch die S3226- und HOE694- empfindlichen Anteile im Medium mit reduzierter $[Cl^-]$ deutlich herabgesetzt. Die Reduktion der am Ende der Messungen feststellbaren Blockereffekte betrug 52 ± 24 % (Foliomycin), 37 ± 20 % (Foliomycin + S3226) und 73 ± 1 % (Foliomycin + S3226 + HOE694). Diese Ergebnisse zeigen, dass Cl^- auch für eine normale NHE-Aktivität in PEZ notwendig ist. Verschiedene Untersuchungen anderer Autoren zeigen, dass Cl^- -Ionen sowohl die basale NHE-Aktivität modulieren als auch die infolge einer Hyperosmolalität gesteigerte NHE1-Aktivität beeinflussen (Aharonovitz *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 1997; Miyata *et al.*, 2000; Rajendran *et al.*, 1995).

Cl^- scheint für den Einbau vH^+ -ATPase-haltiger Vesikel in die Zellmembran von Bedeutung zu sein (Madsen und Tisher, 1985; Malnic und Geibel, 2000). Vergleichbar dazu wurde vorgeschlagen, dass die Cl^- -abhängige Stimulation der NHE-Aktivität die Insertion von NHE-haltigen Vesikeln in die Bürstensaummembran beinhaltet (Malnic und Geibel, 2000; Miyata *et al.*, 2000). Auch das Zusammenwirken von intrazellulärem Cl^- mit dem COOH-Region des Transporters oder mit einem damit verbundenen Protein, z.B. einem Cl^- -Kanal (Aharonovitz *et al.*,

2001; Sangan *et al.*, 2002) ist möglich. Intrazelluläre Komplexbildung von Ca^{2+} und dadurch herabgesetzte Ca^{2+} -Sensitivität der NHE-Aktivierung sowie der Cl^- -Bedarf verschiedener intrazellulärer Signalwege wurden ebenfalls als Ursache der Beeinflussung der NHE-Aktivität durch Cl^- diskutiert (Goss *et al.*, 2001).

Effekt auf die pH_i -Erholung: Im Gegensatz zu den vorangegangenen Versuchen (Schweigel und Martens, 2003) verminderte eine reduzierte $[\text{Cl}^-]_e$ die Rate der pH -Erholung nach Ansäuerung mittels Butyrat bei PEZ. Diese Unterschiede lassen sich durch die Verwendung verschiedener Medien erklären. In den eigenen Versuchen wurde HEPES-gepuffertes Medium verwendet, in den früheren Arbeiten war ein $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -haltiges Medium eingesetzt worden (siehe Kapitel 5.2). Wie die Arbeiten von Müller *et al.* (2000) zeigen, fungiert im $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferten Medium ein $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Symporter als dominanter Mechanismus für die pH -Erholung nach einer Ansäuerung. Im Gegensatz dazu ist der NHE in der Abwesenheit von HCO_3^- das wichtigste pH_i -regulierende System (Müller, 2000; Müller *et al.*, 2000; Daten der vorliegenden Arbeit). Daher muss die deutliche Inhibition der NHE1-Aktivität für einen Großteil der herabgesetzten H^+ -Abgabe verantwortlich sein. Diese Annahme wird durch den verminderten HOE694-sensitiven Anteil der Butyrat-induzierten pH_i -Erholung im Cl^- -reduzierten Medium bekräftigt. Wie die Foliomycin- und S3226-Effekte andeuteten, scheinen die durch die vH^+ -ATPase und den NHE3 vermittelten Komponenten unter diesen Bedingungen wichtiger zu sein. Interessanterweise verursachte die gleichzeitige Anwendung von Foliomycin, S3226 und HOE694 keine stärkere Hemmung der pH_i -Erholung als Foliomycin allein oder in Kombination mit S3226. Es ist anzunehmen, dass unter diesen Bedingungen andere Mechanismen kompensatorisch aktiviert werden, um die Zellen vor einer letalen Übersäuerung zu schützen. Es scheint auch möglich zu sein, dass der beobachtete Effekt darauf zurückzuführen ist, dass Protonen in intrazellulären Organellen eingeschlossen werden.

5.6.2 Effekt einer erhöhten extrazellulären K^+ -Konzentration

Im Butyrat-haltigen Medium mit hoher K^+ -Konzentration ($[K^+]_e = 135 \text{ mmol/l}$, $[Na^+]_e = 15 \text{ mmol/l}$) lag der initiale pH_i mit $7,16 \pm 0,05$ höher als im Butyrat-haltigen Medium mit hoher Na^+ -Konzentration ($[Na^+]_e = 145 \text{ mmol/l}$, $[K^+]_e = 5 \text{ mmol/l}$; $pH_i = 6,97 \pm 0,16$) und blieb im Messverlauf fast stabil. Im Unterschied hierzu lag in den Untersuchungen von Schweigel (2001) zum Carriervermittelten Mg^{2+} -Transport der basale pH_i im Medium mit hoher K^+ -Konzentration auf einem ähnlichen Niveau wie der im Kontrollmedium gemessene pH_i -Wert. Hierbei ist aber zu beachten, dass bei diesen Untersuchungen mit CO_2/HCO_3^- -haltigen Medien gearbeitet wurde, so dass die Ergebnisse nicht direkt vergleichbar sind. Wichtig ist jedoch die übereinstimmende Erkenntnis, dass PEZ in der Lage sind ihren pH_i auch bei deutlich erniedrigten $[Na^+]_e$ und stark erhöhten $[K^+]_e$ auf einem physiologischen Niveau zu halten. Im Gegensatz dazu stellte Böttcher eine starke Abhängigkeit des pH_i von der $[Na^+]_e$ fest. Die Autorin führte Untersuchungen in einem Na^+ -freien Medium durch. Dieses Medium enthielt im Unterschied zu den eigenen Versuchen kein Butyrat, das Na^+ war durch Glukonat ersetzt worden. Im Verlauf der Versuche wurde dann die $[Na^+]_e$ schrittweise erhöht. Hierbei kam es ausgehend von einem relativ niedrigen pH_i -Wert von $6,39 \pm 0,14$ ($[Na^+]_e = 0 \text{ mmol/l}$) zu einem Anstieg des pH_i bis auf einen Wert von ca. $7,0$ ($[Na^+]_e = 145 \text{ mmol/l}$) (Böttcher, 2000).

Die Aktivität des NHE3 wird deutlich von der $[Na^+]_e$ bestimmt (Noel und Pouyssegur, 1995). Dieser Subtyp besitzt eine hohe Affinität zur $[Na^+]_e$ bei einer gleichzeitig nur geringen pH_i -Sensitivität. Daher war zu erwarten, dass die Bedeutung des NHE3 für die pH_i -Regulation der PEZ abnimmt, wenn die $[Na^+]_e$ mit 15 mmol/l deutlich unter ihrer physiologischen Konzentration liegt. Ein Vergleich der pH_i reduzierenden Wirkung von dB-cAMP bzw. von S3226 in Medien mit normaler bzw. reduzierter $[Na^+]_e$ bestätigen diese Vermutung. Der inhibitorische Effekt von $100 \mu\text{mol/l}$ cAMP war im Medium mit reduzierter $[Na^+]_e$ um ca. 58% reduziert und der Hemmeffekt von S3226 war um ca. 40% niedriger als im Medium mit normaler $[Na^+]_e$.

Die deutlichsten Hemmeffekte wurden im niedrig- Na^+ /hoch- K^+ Medium mit dem NHE1-Inhibitor HOE694 gesehen. Hier betrug der Endwert $6,82 \pm 0,11$ im Gegensatz zur Kontrolle mit $7,06 \pm 0,07$. Die in der Literatur beschriebene Hemmung des NHE1 durch hohe $[K^+]_e$ konnte daher für ovine PEZ nicht bestätigt werden (Noel und Pouyssegur, 1995; Szabo *et al.*, 2000; Zachos *et al.*, 2005).

Unter physiologischen Bedingungen wird das Membranpotential (E_m) größtenteils durch die K^+ -Leitfähigkeit bestimmt, so dass hohe $[K^+]_e$ zu einer Depolarisation führen (Adrian, 1956; Martens *et al.*, 1987). Eine elektrogene vH^+ -ATPase könnte dadurch in ihrer Aktivität stimuliert werden (Fischer *et al.*, 1999; Gerard *et al.*, 1994; Schweigel, 2001; Wadsworth und van Rossum, 1994; Wu und Delamere, 1997; Wu *et al.*, 1998). Im Unterschied zu den Ergebnissen von Vorversuchen, bei denen der Foliomycin-sensitive Anteil des pH_i in Medien mit hoher $[K^+]$ zunahm, war dies in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht der Fall. Foliomycin löste zwar zu Beginn der Messung eine pH_i -Reduktion aus, die jedoch zum Ende der Messung hin bzw. durch zusätzliche Applikation des NHE3-Inhibitors S3226 schwächer wurde. Mögliche Ursache dieses Phänomens ist die kompensatorische Aktivierung des NHE1 nach Inhibition der vH^+ -ATPase. Außerdem liegt im niedrig- Na^+ /hoch- K^+ Medium eine physiologische Chloridkonzentration vor, so dass die vH^+ -ATPase in diesem Medium uneingeschränkt arbeiten kann (Fernandez und Malnic, 1998). Dadurch kommt es möglicherweise zu einem früheren Eintreten des maximalen Hemmeffektes als beispielsweise im chloridreduzierten Medium mit physiologischer Natriumkonzentration.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass auch im niedrig- Na^+ /hoch- K^+ Medium der NHE1 für die pH_i -Regulation eine größere Rolle spielt als die vH^+ -ATPase und der NHE3.

Zusammen mit den Ergebnissen aus den Versuchen mit S3226 und HOE694 lassen diese Versuchsergebnisse die Vermutung zu, dass die Reduktion des basalen pH_i -Wertes auf die Hemmung des NHE1 zurückzuführen ist. Die Inhibition des NHE3 wirkt sich scheinbar stimulierend auf die pH_i -Erholung aus, möglicherweise aufgrund des erhöhten Protonenangebotes, welches die NHE1-Aktivität steigert - vergleichbar mit den Versuchen, in denen S3226 zusammen mit Foliomycin angewendet wurde.

In den Messungen im niedrig- Na^+ /hoch- K^+ Medium erfolgt zu Messbeginn kein pH_i -Abfall, obwohl auch in diesem Medium 20mmol/l Butyrat enthalten waren. Dadurch findet hier bei den Kontrollmessungen nur ein pH-Wert-Anstieg um $0,03 \pm 0,04$ pH-Einheiten statt. Dieser dezente Anstieg wurde durch Amilorid nicht beeinflusst. Überraschenderweise wurden im Medium mit erhöhter $[K^+]_e$ der pH_i -Wert und die pH_i -Erholungsrate durch die kombinierte Anwendung von S3226, HOE694 und Foliomycin erhöht. Es kam zu einer ausgeprägten Stimulation der Zell-alkanisierenden Prozesse, so dass Anfangs- und End- pH_i -Wert und pH_i -Erholung bei

diesen Versuchen deutlich über den Kontrollmessungen liegen. Es scheinen also unter diesen Bedingungen gänzlich andere Mechanismen als der NHE und die vH^+ -ATPase nach deren Inhibition aktiviert zu werden. Welche Mechanismen dies sind, bedarf der Aufklärung durch weitere Versuchsreihen.

5.7 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass in der Zellmembran von ovinen Pansenepithelzellen (PEZ) eine vakuoläre Protonenpumpe (vH^+ -ATPase) existiert.

Untersucht wurde unter den Bedingungen eines nominell HCO_3^- -freien Mediums der Einfluss des Na^+/H^+ -Austauschers und der vH^+ -ATPase. Der $Na^+-HCO_3^-$ -Kotransporter und der $Na^+-HCO_3^-/Cl^-$ -Austauscher können in diesem Medium nicht arbeiten, so dass die Einstellung des basalen pH_i -Wertes und die pH_i -Erholung nach einer Säurebelastung mittels 20 mmol/l der kurzkettigen Fettsäure Butyrat dem Na^+/H^+ -Austauscher und der vH^+ -ATPase zugeschrieben werden können.

Die Absenkung des basalen pH_i -Wertes durch den für die vH^+ -ATPase selektiven Inhibitor Foliomycin und die Empfindlichkeit der pH_i -Regulation auf die $[Cl^-]_e$ stehen in Einklang mit einer vH^+ -ATPase-abhängigen Protonenabgabe in der Zellmembran von ovinen PEZ. Der Anteil der vH^+ -ATPase-abhängigen Protonenabgabe an dem gesamten H^+ -Efflux betrug unter den Bedingungen der eigenen Versuche (nominell CO_2/HCO_3^- -freies Medium) 30%. Die eigenen Ergebnisse bestätigen, dass unter diesen Bedingungen der pH_i bei PEZ im Wesentlichen durch den NHE reguliert wird. So betrug der Anteil des NHE1 am gesamten H^+ -Efflux 50% und der des NHE3 20%. Bezüglich der pH_i -Erholung ließen sich eine Beteiligung des NHE1 zu 33% und des NHE3 zu 20% feststellen.

Der Einfluss der $[Cl^-]_e$ auf die Aktivität des NHE bei PEZ wurde in diesen Versuchen erstmals dargestellt. Noch lassen sich die physiologischen Aufgaben der vH^+ -ATPase in PEZ nicht definieren. Jedoch scheint die vH^+ -ATPase in Anbetracht der sehr unterschiedlichen pH_i -Bereiche bei denen der NHE bzw. die vH^+ -ATPase maximal aktiviert sind (NHE: im sauren pH_i -Bereich, vH^+ -ATPase: im neutralen pH_i -Bereich), eine wichtige Rolle in der pH_i -Regulation bei PEZ zu spielen und auch am Aufbau von Transportgradienten beteiligt zu sein.

Bei der in der leistungsorientierten Intensivhaltung von Wiederkäuern üblichen energiereichen und rohfaserarmen Fütterung, kann die vH^+ -ATPase von Bedeutung für die Anpassung an diese Fütterung sein. Die Folge einer energiereichen Fütterung ist eine verstärkte Fermentation, die einen erhöhten pCO_2 verursacht. CO_2 wird durch die Carboanhydrase in H_2CO_3 umgewandelt, dieses dissoziiert dann in H^+ und HCO_3^- , somit steht mehr Substrat zur Verfügung. Dadurch wird möglicherweise die Einlagerung von vH^+ -ATPasen in die Zellmembran bzw. die Zusammenlagerung von V_0 - und V_1 – Untereinheiten zu funktionsfähigen Transportern induziert. Auf diese Weise könnte die vH^+ -ATPase einer intrazellulären Übersäuerung bei PEZ entgegenwirken.