

6 Zusammenfassung

Die vH⁺-ATPase

und ihre Bedeutung für die pH-Regulation bei ovinen Pansenepithelzellen

Die hohe Sekretions- und Resorptionsleistung des Pansenepithels der Wiederkäuer ist an die Existenz aktiver Transportmechanismen geknüpft. In diesem Zusammenhang konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass bei ovinen ruminalen Epithelzellen neben der Na⁺/K⁺-ATPase eine H⁺-ATPase vom vakuolären Typ (vH⁺-ATPase) exprimiert wird.

Ziel der hier vorliegenden Untersuchungen war es daher, die funktionelle Bedeutung der vH⁺-ATPase für die Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes (pH_i) aufzuklären und Faktoren zu identifizieren, welche die Aktivität der vH⁺-ATPase bestimmen.

Zu diesem Zweck wurden fluoreszenzspektroskopische Messungen an primärkultivierten, mit dem pH-sensitiven Farbstoff BCECF beladenen und in CO₂/HCO₃⁻-freien Medien inkubierten Pansenepithelzellen (PEZ) des Schafes durchgeführt. Die Abgrenzung von vH⁺-ATPase- und Na⁺/H⁺-Austauscher (NHE)-Aktivität erfolgte mittels spezifischer Inhibitoren (Foliumycin, HOE694, S3226).

Die experimentellen Arbeiten führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Im HEPES-gepufferten Na⁺-Medium lag der pH_i ruminaler PEZ bei 7,43 ± 0,22. Durch die Anwesenheit von 20 mmol/l Buttersäure im extrazellulären Medium wurde er auf 7,02 ± 0,12 erniedrigt. Die intrazelluläre Ansäuerung induzierte eine pH_i-Erholung von 0,57 ± 0,05 pH-Einheiten/10min.
2. Der Einsatz des vH⁺-ATPase-spezifischen Inhibitors Foliumycin (2 µmol/l) bewirkte in beiden Medien eine Absenkung des pH_i-Wertes um etwa 0,2 pH-Einheiten und führte zu einer Reduktion der Butyrat-induzierten pH_i-Erholung. Die Ergebnisse zeigen eindeutig eine funktionelle und quantitativ bedeutsame vH⁺-ATPase-Aktivität bei ovinen PEZ.

3. Wurden zusätzlich zum Foliomycin spezifische Hemmstoffe der Subtypen 1 (HOE694) und 3 (S3226) des NHE appliziert, kam es zu einer Verstärkung der Effekte auf den pH_i ($-0,64 \pm 0,2$ pH-Einheiten) und auf die pH_i -Erholung ($-0,2 \pm 0,1$ pH-Einheiten/10 min).
4. Auf der Basis der durchgeführten Inhibitorstudien kann festgestellt werden, dass unter nominell HCO_3^- -freien Bedingungen die vH^+ -ATPase-Aktivität zu etwa 30 % und die NHE1- bzw. die NHE3-Aktivität zu etwa 50 und 20 % zur Einstellung des pH_i der PEZ beitragen.
5. Die Ergebnisse bestätigten die dominante Rolle des NHE1 für die pH_i -Erholung nach einem Säureload unter HCO_3^- -freien Bedingungen.
6. Inkubation von PEZ in einem Medium mit einer von 136 mmol/l auf 36 mmol/l reduzierten Chlorid-Konzentration führte zu einer signifikanten Erniedrigung des pH_i ($-0,51 \pm 0,03$ pH-Einheiten) sowie der Butyrat-induzierten pH_i -Erholung von $0,57 \pm 0,04$ auf $0,38 \pm 0,05$ pH-Einheiten/10 min. Darüber hinaus waren die hemmenden Foliomycin-Effekte nicht mehr nachweisbar und die HOE694- bzw. S3226-sensitiven Komponenten des pH_i vermindert.
7. Die Ergebnisse machen deutlich, dass die extrazelluläre $[\text{Cl}^-]$ über bisher unbekannte Mechanismen Einfluss auf die funktionelle Aktivität dieser wesentlichen H^+ -sezernierenden Mechanismen (vH^+ -ATPase, NHE) nimmt. Die Chlorid-Abhängigkeit des ruminalen NHE wurde erstmalig gezeigt.