Charakterisierung des Na⁺-Transportes am isolierten Psalterepithel des Schafes



Inaugural – Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Maren Dölle

Tierärztin aus Berlin

Berlin 2008

Journal – Nr. 3235

Gefördert durch ein Stipendium nach dem Nachwuchsförderungs-Gesetz (NaFöG) des Landes Berlin

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ. – Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter:	Univ. – Prof. Dr. Holger Martens
Zweiter Gutachter:	Univ. – Prof. Dr. Jürgen Zentek
Dritter Gutachter:	Univ. – Prof. Dr. Karl Dietrich Weyrauch

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): Sheep, animal models, sodium, bicarbonates, ion transport, omasum, in vitro

Tag der Promotion: 16.07.2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.ddb.de abrufbar.

ISBN-13: 978-3-86664-457-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008 D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law. No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved © mensch und buch verlag 2008 Nordendstr. 75 - 13156 Berlin – 030-45494866 verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de Für meinen VATER und meine MUTTER

Inhalt

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Der Blättermagen – Anatomie und Physiologie	
2.2	Physiologie des Membrantransportes	4
2.3	Transepitheliale Transportmechanismen des Blättermagenepithels	5
2	2.3.1 Transport von Wasser	6
2	2.3.2 Transport von Anionen	6
2	2.3.3 Transport von Kationen	
2	2.3.4 Transport von kurzkettigen Fettsäuren	
2	2.3.5 Transport von Ammoniak	
2	2.3.6 Transport von Peptiden	
2	2.3.7 Effekt der Fütterung auf den Transport	
2.4	Bedeutung des Na ⁺ -Transportes für die pH-Regulation in epithelialen	Geweben –
der	r Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher (NHE)	
2	2.4.1 Einleitung	
2	2.4.2 Vorkommen und Lokalisation	14
2	2.4.3 Funktion	
2	2.4.4 Struktur	
2	2.4.5 Kinetik	17
2	2.4.6 Regulation	
2.5	Zusammenfassung und Fragestellung	
3	MATERIAL UND METHODEN	
3.1	Versuchstiere	
3.2	Gewinnung des epithelialen Gewebes	
3.3	Inkubationstechnik	
3.4	Elektrophysiologisches Messprinzip	
3	3.4.1 "Open-Circuit"-Modus	
3	3.4.2 "Short-Circuit"-Modus	
3.5	Versuchsablauf	
3.6	Bestimmung der Transportraten für Natrium und Acetat	
3.7	Pufferlösungen	
3.8	Pharmaka	
3	3.8.1 Amilorid	

3.8.2	2 HOE 642	33
3.8.3	3 S3226	33
3.8.4	4 Hydrochlorothiazid	34
3.8.5	5 Wortmannin	34
30	Statistik	35
3.9	1 Ermittlung der Ionen-Transportraten	35
3.9.2	2 Elektrophysiologische Parameter	
3.9.3	3 Signifikanzen	37
4 E	RGEBNISSE	
4.1	Kinetik des elektroneutralen Na ⁺ -Transportes	38
4.1.	1 Einleitung	38
4.1.2	2 Sättigungskinetik bei pH 7,4	38
4.1.	3 Sättigungskinetik bei pH 6,4	40
4.1.4	4 Kinetische Berechnungen	42
42	Differenzierung des elektroneutralen Na ⁺ -Transportes	44
4 2	1 Finleitung	4 4
4 2 3	2 Amilorid und Hydrochlorothiazid	45
4.2.3	3 S 3226 und HOE642	47
4.2.4	4 Amilorid und S 3226	50
4.3	"Trafficking"	54
4.3.1	1 Einleitung	54
4.3.2	2 Wortmannin	55
1 1	Kornelation von Lund L. Na ⁺	56
4.4	Korrelation von J _{ms} und J _{sm} wa	50 56
441	2 Transport von Acetat bei steigenden Acetatkonzentrationen auf der	
muk	tosalen Seite	
4.4.3	3 Transport von Natrium bei steigenden Acetatkonzentrationen auf der	
muk	cosalen Seite	58
4.4.4	4 Transport von Acetat und Natrium bei steigenden Acetatkonzentrationen auf	
der s	serosalen Seite	59
4.4.5	5 Grafische Darstellung der Korrelation von $J_{ms} Na^+$ und $J_{sm} Na^+$	61
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	62
5 D	DISKUSSION	64
51	Finleitung	64
5.1	Dimentung	····· 07
5.2	Kinetik des elektroneutralen Na ⁺ -Transportes	65
5.3	Differenzierung des elektroneutralen Na ⁺ -Transportes	67
5.4	"Trafficking"	70
5 5	Kompletion von L und L Na ⁺	71
3.3	NOT REALIBIT VOID J_{ms} und J_{sm} in a	, / 1

5.6	Bestätigung des Models/Ausblick/Hypothesen	73
6	ZUSAMMENFASSUNG	75
6	SUMMARY	77
7	LITERATURVERZEICHNIS	79
8	ANHANG	95
8.1	Tabellen zu den Ergebnissen	95
8.2	Zusammensetzung der Inkubationslösungen1	101

Abkürzungen und Definitionen

AE	<u>a</u> nion <u>e</u> xchanger = Anionenaustauscher
Ap	Apikal
BLM	Basolateral
CA	Carboanhydrase
DIDS	4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-Disulfonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
G _t	Gewebeleitfähigkeit (mS \cdot cm ⁻²)
I _{sc}	Kurzschlussstrom ($\mu eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$)
J _{ms}	unidirektionaler Ionentransport von mukosal nach serosal ($\mu eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$)
J _{sm}	unidirektionaler Ionentransport von serosal nach mukosal ($\mu eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$)
J _{sm}	unidirektionaler Ionentransport von serosal nach mukosal ($\mu eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$)
J _{net}	Netto-Transport eines Ions ($\mu eq \cdot cm \cdot h$)
Ν	Anzahl der Schafe im Versuch
n	Anzahl der Epithelien/Gewebestücke
NHE	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher
Pd _t	Transepitheliale Potentialdifferenz (mV)
PM	Plasmamembran
R _t	Widerstand des Gewebes
RE	Recyclierende Endosomen
S3226	3-[2-(3-guanidino-2-methyl-3-oxo-propenyl)-5-methyl-phenyl]-N-
	isopropylidene-2-methyl-acrylamide dihydrochloride
SCFA	<u>s</u> hort <u>c</u> hain <u>fatty</u> <u>a</u> cids = kurzkettige Fettsäuren
SV	Synaptische Vesikel
TGN	trans-Golgi Netzwerk
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
\overline{x}	arithmetischer Mittelwert

1 Einleitung

Das Vormagensystem der Wiederkäuer setzt sich aus 3 Abteilungen zusammen: Netzmagen (Retikulum), Pansen (Rumen) und Blättermagen (Omasum). Der Blättermagen zeigt hinsichtlich seiner Anatomie die charakteristische Ausbildung von unterschiedlich großen Blättern, welche in das Lumen hineinragen und so die Oberfläche um ein Vielfaches vergrößern. Aufgrund dieser Tatsache wurde dem Blättermagen anfangs als Hauptfunktion die Nahrungszerkleinerung oder – zerreibung zugeschrieben (Ellenberger, 1881; Stevens *et al.*, 1960), neben der Funktion als "Saug- und Druckpumpe" (Bueno und Ruckebusch, 1974; Stevens, *et al.*, 1960). Weitere Untersuchungen ließen darauf schließen, dass die schon früh vermutete resorptive Funktion (Ekmann, 1953; Favilli, 1937; Oyaert und Bouckaert, 1961; Trautmann, 1935) gegenüber der mechanischen Funktion größere Bedeutung hat als bisher angenommen (Edrise *et al.*, 1986; Hauffe und von Engelhardt, 1975).

Der Blättermagen ist ein wichtiger Ort der Absorption von Wasser und Elektrolyten im proximalen Verdauungstrakt (Edrise 1986, von Engelhardt und Hauffe 1975, Oyaert und Bouckaert, 1961). Es besteht eine positive lineare Relation zwischen der Menge an Wasser und Elektrolyten welche in den Blättermagen gelangen und deren dortiger Absorption. Edrise et al. (1986) beobachteten bei Kälbern eine Absorption von 40-60%, während v. Engelhardt und Hauffe (1975) für Schafe eine absorbierte Menge von 10-20% fanden. Demzufolge ist der Blättermagen in der Lage, einen Teil des durch die Speichelsekretion verlorenen Wassers und Natriums zu kompensieren. Darüber hinaus findet im Blättermagen eine bedeutende Absorption von kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) und Bikarbonat (HCO₃⁻) statt. Letztere erfolgt im Austausch mit Cl⁻ (Ekmann, 1953; Niebuhr, 2003; Oyaert und Bouckaert, 1961; Tiling, 1997) und zählt zu den wichtigsten Funktionen des Blättermagens: Zum einen, um eine übermäßige Gasbildung in Form von CO₂ im Labmagen zu verhindern und zum anderen, um eine ausreichende Ansäuerung der Ingesta im Labmagen gewährleisten zu können.

Für den effektiven transepithelialen Transport von HCO₃⁻ müssen (mindestens) zwei Voraussetzungen gegeben sein: Die wirksame Regulation des intrazellulären pH-Wertes und die Energetisierung des apikalen Cl⁻/ HCO₃⁻ Austauschers. Die pH-Regulation im Blättermagenepithel erfolgt subapikal wahrscheinlich zunächst primär über die Aktivität des Na⁺/H⁺-Austauschers (NHE). Die Energetisierung des HCO₃⁻ Transportes ergibt sich indirekt durch die Koppelung mit dem Transport von Natrium: Die passive Aufnahme von HCO₃⁻ im Austausch mit Chlorid (Anionen-Austauscher) erfordert einen entsprechenden Chloridgradienten. Dieser wird primär durch den NaCl-Cotransporter in der apikalen Membran sicher gestellt (Ali, 2005b; Beisele *et al.*, 2007), so dass die Aktivität des NaCl-Cotransporters als wichtige Voraussetzung für die Energetisierung des HCO_3^- Transportes anzusehen ist. Subapikales Chlorid ist zudem Voraussetzung für die Aktivität des NHE und somit für die pH-Regulation (Aharonovitz *et al.*, 2001). Anhand dieser Fakten wird die Abhängigkeit des HCO_3^- Transportes vom elektroneutralen Natriumtransport (NHE und NaCl-Cotransport) deutlich. Bei niedrigen Na⁺-Konzentrationen könnte diese Interaktion beeinträchtigt werden.

Die vorliegende Studie beinhaltet daher Untersuchungen, um a) nähere Erkenntnisse über die kinetischen Eigenschaften des elektroneutralen Na⁺-Transportes (via NHE und NaCl-Cotransporter) in der apikalen Membran des Blättermagens zu erzielen und um b) die Art und Weise der Stimulierung des NHE (NHE3 Trafficking; Kinetik: V_{max} und K_m) in der apikalen Membran infolge luminaler pH-Absenkung zu charakterisieren. Zusätzlich (c) sollen die hohen unidirektionalen Na⁺-Fluxraten im Hinblick auf eine mögliche Kopplung eines postulierten Na⁺/Na⁺-Austausches und des Na⁺/H⁺-Austausches in der apikalen Membran untersucht werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Der Blättermagen – Anatomie und Physiologie

Der Blättermagen (Syn.: Psalter, Omasum) ist nach Haube und Pansen der dritte Vormagen der Wiederkäuer vor dem sich anschließenden Labmagen. Er hat eine runde bis ovale Form und liegt medial der Haube im intrathorakalen Raum der Bauchhöhle, auf Höhe der 8. bis 10. Rippe. Das Fassungsvolumen beträgt beim Rind zwischen 4 und 8 Litern und beim kleinen Wiederkäuer zwischen 0,2 und 0,4 Litern (Nickel *et al.*, 1999).

Im Inneren des Blättermagens wird anatomisch unterschieden zwischen Psalterkörper, -kanal und -blättern. Der Blättermagen ist mit einem mehrschichtigen Plattenepithel ausgekleidet. Von der Innenseite der Wand des Körpers ziehen unterschiedlich große mondsichelförmige Schleimhautfalten, die als Psalterblätter bezeichnet werden, in das Innere (siehe Abbildung 1). Die Psalterblätter kommen in vier verschiedenen Größen vor, welche mit den Ziffern 1 bis 4 bezeichnet werden. Sie sind in einer bestimmten Reihenfolge angelegt: 1-4-3-4-2-4-3-4-1. Die Anzahl der Blätter differiert beim Rind zwischen 90 und 130 Blättern und beim Schaf zwischen 72 und 80 Blättern (Nickel et al., 1999), bzw. 33 und 35 Blättern (Mc Sweeney, 1988). Die Blätter werden von einer intermediären und zwei lateralen Muskelschichten durchzogen (Yamamoto et al., 1991). Die subepithelial stark vaskularisierte Schleimhaut zeigt auf der Oberfläche zahlreiche Papillen, die der Oberflächenvergrößerung dienen. Die Papillen sind auf der proximalen (haubenwärtigen) Seite eines jeden Blattes größer und stärker verhornt als auf der distalen (labmagenwärtigen) Seite (Scott und Gardner, 1971). Das Epithel ist vor allem im interpapillären Bereich sehr dünn (Hofmann, 1982), was in Kombination mit dem stark ausgebildeten subepithelialen Gefäßnetz auf eine hohe Resorptionsfähigkeit schließen lässt.



Abbildung 1: Querschnitt des Blättermagens

Die Zusammensetzung der Mikroflora im Blättermagen entspricht der des Pansens, lediglich die Anzahl der Mikroorganismen ist entsprechend der geringeren Größe des Blättermagens niedriger als im Pansen (Smith, 1984).

Der ventral an der Basis des Blättermagens gelegene Psalterkanal stellt eine muskulöse Rinne zwischen der Hauben-Psalteröffnung und der Psalter-Labmagenöffnung dar. Die Motorik des Blättermagens wird nach den Untersuchungsergebnissen von Bueno und Ruckebusch (1974) folgendermaßen beschrieben: Während der zweiten Haubenkontraktion entspannt sich der Psalterkanal, die Ingesta wird angesogen (Saugphase). Es folgt eine Kontraktion des Psalterkanals (Druckphase), die Ingesta wird so zwischen die Psalterblätter gepresst. Die Blätter kontrahieren sowohl von ihrem freien Rand zur Basis als auch von oral nach aboral gemeinsam mit dem Psalterkörper, sodass eine Weiterpassage der Ingesta in den Labmagen erfolgen kann. Die Motilität ist hauptsächlich volumenabhängig: Mit zunehmendem Volumen der Ingesta im Blättermagen steigt dessen Motilität unabhängig von nervalen Einflüssen. Durchschnittlich fließen beim Schaf ca. 400 ml Ingesta pro Stunde pro kg Trockenmasseaufnahme durch den Blättermagen, wobei reine Flüssigkeit und kleine Teilchen schneller in den Labmagen passieren als größere (Oyaert und Bouckaert, 1961). Die Retentionszeit verhält sich dabei umgekehrt proportional zur Durchflussrate (Hauffe und Engelhardt, 1973).

2.2 Physiologie des Membrantransportes

Die begrenzende Struktur einer jeden Zelle ist die Plasmamembran, welche als Lipid-Doppelschicht beschrieben wird. Als Transportwege in einer derartigen selektivpermeablen Membran kommen die Lipidphase und die intrinsischen Proteine, welche die Membran durchsetzen, in Frage. Unter energetischen Gesichtspunkten lassen sich Transportprozesse in *passive* und *aktive* Vorgänge unterteilen. Die treibenden Kräfte des passiven Transportes durch eine Membran sind Konzentrationsunterschiede und elektrische Potentialdifferenzen, welche zusammen als elektrochemische Gradienten wirken können. Der passive Transport erfolgt "bergab" in Form von Diffusion oder Osmose und endet mit dem Ausgleich der Gradienten. Der aktive Transport erfolgt "bergauf". Stoffe werden hierbei entgegen elektrochemischer Gradienten unter der Aufwendung von Stoffwechselenergie transportiert.

Aus kinetischer Sicht unterscheidet man *einfachen* und *vermittelten* Transport. Ersteres bezeichnet Teilchen, die die Membran penetrieren und dabei nur einfache Wechselwirkungen, wie Reibung und/oder Elektrostatik, erfahren, wie bei der "einfachen Diffusion". Beim

vermittelten Transport hingegen werden Teilchen mithilfe von Kanälen, Poren oder Carriern transportiert. Hierunter fallen die passive "erleichterte Diffusion" und der aktive Transport.

Der Transport durch ein polares Epithel, wie er z. Bsp. im Magen-Darm-Trakt vorkommt, kann *parazellulär* oder *transzellulär* verlaufen. Der transzelluläre Transport erfordert die Aufnahme des Teilchens auf der apikalen Seite und dessen Abgabe auf der gegenüberliegenden basolateralen Seite. Transzellulärer Transport verläuft in der Regel aktiv, parazellulärer Transport erfolgt grundsätzlich passiv. Der unidirektionale Transport eines Ions entlang eines Epithels besteht nach Sauer (1973) aus der Summe von aktivem und passivem Transport des Ions, wobei der passive Transport aus *Solvent Drag* (= parazellulär mit dem Wasser resorbierte Substanzen) und Diffusion besteht.

Eine selektivpermeable Membran stellt einen Widerstand dar, der bewirkt, dass verschiedene Ionenarten unterschiedlich schnell durch die Membran diffundieren, sodass eine Potentialdifferenz (PD) entsteht. Am Epithel des Magen-Darm-Traktes ist dementsprechend sowohl eine apikale (PD_a) als auch eine basolaterale (PD_b) Potentialdifferenz messbar, welche in der Summe die transepitheliale Potentialdifferenz (PD_t) darstellen. Der Gesamtwiderstand eines Epithels (R_t) ergibt sich aus dem zellulären Widerstand (R_c), der sich aus der Summe der Widerstände der apikalen (R_a) und basolateralen Membran (R_b) ergibt, und dem parazellulären Widerstand (R_s), der hauptsächlich durch die *tight junctions* bestimmt wird. Wichtig für die physiologische Leistung des Epithels als Barriere ist die Größe des parazellulären Widerstand (R_s), die bestimmt, ob ein Epithel als *leaky* (durchlässig) oder *tight* (dicht) anzusehen ist. Bei elektrophysiologischen Messungen wird häufig die Leitfähigkeit der Gewebe berechnet: G = 1/R.

2.3 Transepitheliale Transportmechanismen des Blättermagenepithels

Im Vorfeld der folgenden Ausführungen soll kurz eine allgemeine kritische Betrachtung zu den jeweiligen Untersuchungsmethoden erfolgen. Es gibt drei Möglichkeiten den Stofftransport durch das Epithel in den Vormägen der Wiederkäuer zu untersuchen: *post mortem, in vivo* und *in vitro*. Bei post mortem Untersuchungen kann man beispielsweise eine irreguläre Motorik während der Agonie des Tieres nicht ausschließen, welche eine unphysiologische Verteilung der Ingesta in den einzelnen Vormagenabteilungen zur Folge haben kann. *In vivo* Methoden erfordern unterschiedliche Manipulationen (Kanülen etc.), welche in punkto Dichtigkeit und Flexibilität kritisch betrachtet werden müssen. Eine starre Kanüle könnte die Motilität des Magenabschnittes beeinträchtigen. Zudem ist die

Verwendung von Markersubstanzen in Bezug auf deren Verteilung in flüssiger und/oder fester Phase zu beachten. Bei *in vitro* Untersuchungen ist die größte Variable die Inkubationslösung, welche je nach Versuchsziel differiert und nicht immer *in vivo* Verhältnissen entsprechen kann. Dies ist bei dem Vergleichen und Interpretieren von Versuchsergebnissen zu berücksichtigen.

2.3.1 Transport von Wasser

In der Vergangenheit wurde die Absorption von Wasser im Psalter als dessen Hauptaufgabe angesehen. Aufgrund damaliger unzulänglicher Kenntnisse über die Physiologie des Blättermagens, zum Beispiel in Bezug auf die Verweildauer der Ingesta und des so zu erklärenden hohen Trockenmassegehaltes, muss diese Aussage heute relativiert werden. Es besteht eine positive lineare Relation zwischen der Menge an Wasser und Elektrolyten, welche in den Blättermagen gelangen, und deren dortiger Absorption. Edrise et al. (1986) beobachteten bei Kälbern eine Absorption von 40-60%, während von Engelhardt und Hauffe (1975) für Schafe eine absorbierte Menge von 10-20% fanden. Die Menge an resorbiertem Wasser hängt dabei von der Molarität des Inhaltes ab (Oyaert und Bouckaert, 1961). Die Wasserresorption nahm mit steigender Konzentration an Natrium, Kalium und flüchtigen Fettsäuren (engl. *Short chain fatty acids*; SCFA) hochsignifikant zu. Bezogen auf die Schleimhautoberfläche (unter Berücksichtigung der Zotten) scheint die Wasserresorption im Blättermagen ebenso groß wie die in Haube und Pansen (von Engelhardt und Hauffe, 1975).

2.3.2 Transport von Anionen

2.3.2.1 Bicarbonat und Chlorid

Aufgrund der Tatsache, dass in der einschlägigen Literatur der Transport von Bikarbonat (HCO_3^{-}) und Chlorid (Cl^{-}) meist parallel untersucht wurde, sollen nachfolgend die Transportwege beider Anionen gemeinsam beschrieben werden. Zudem sei darauf hingewiesen, dass die Messungen an HCO_3^{-} häufig in CO_2 -Mengen angegeben werden, was auf das in wässriger Lösung herrschende Gleichgewicht von HCO_3^{-} und CO_2 , infolge der Carboanhydrase-Reaktion, zurückzuführen ist (siehe Formel 1):

$$H^+ + HCO_3^- \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow CO_2 + H_2O$$

Formel 1: Die Carboanhydrase-Reaktion

Ekman und Sperber (1953) fanden im Rahmen von post mortem Untersuchungen bei Kühen von proximal nach distal eine Zunahme des Cl⁻- Gehaltes und gleichzeitig eine Abnahme des HCO₃⁻ Gehaltes. Die HCO₃⁻ - Konzentration in den ventralen Teilen des Omasums entspricht mit 8,5 mmol (angegeben in mmol CO_2 pro kg Ingesta) lediglich 1/6 der Konzentration des Panseninhalts (49 mmol), sowie 1/3 der Plasmakonzentration. Die Cl⁻-Konzentration entspricht im distalen Abschnitt des Blättermagens mit 49 mmol etwa der vierfachen Konzentration an Cl⁻ im Pansen (13-24 mmol). Diese Ergebnisse wurden bei in vivo Untersuchungen an Schafen bestätigt (Oyaert und Bouckaert, 1961): Der CO₂-Gehalt im Psalterausfluss war mit 24 mmol im Mittel nur halb so hoch wie im Pansen (45 mmol), während die Cl⁻ Konzentration im Psalterausfluss mit 47 mmol mehr als das Doppelte im Vergleich zum Pansen betrug (16 mmol). In weiteren in vivo Untersuchungen an Schafen, durch von Engelhardt und Hauffe (1975) wurden 50% der im Psalterzufluss enthaltenden Menge an SCFA und Gesamt-CO₂ resorbiert. Die mittlere Absorptionsrate für CO₂ betrug 3,9 mmol/h. Etwa die gleiche Menge an Chlorid, die im Psalterzufluss enthalten war $(3,76 \pm 1,89)$ mmol), wurde im Blättermagen zusätzlich sezerniert. Die Cl⁻-Sekretion im Blättermagen war im Mittel genauso groß wie die HCO₃⁻-Resorption. Es liegt der Schluss nahe, dass eine Verbindung zwischen dem Cl⁻ - und dem HCO₃⁻ -Transport besteht.

Erste in vitro Untersuchungen mit der Ussing-Kammer -Technik stellten im Gegensatz zu den oben genannten in vivo Ergebnissen eine Netto-Absorption von Cl fest, wobei die Konzentration an Cl⁻ in der mukosalen Inkubationslösungen (= serosal) unphysiologisch hoch war (Harrison, 1971; Martens und Gäbel, 1988; Tiling, 1997). Darüber hinaus wurden hohe unidirektionale Cl⁻-Fluxraten (6 bis 15 μ eq·cm⁻²·h⁻¹) gemessen, welche auf einen transzellulären Transportweg hindeuten. Tiling (1997) postulierte einen Anionen-Austauscher auf apikaler und basolateraler Seite (in Serie geschaltet), welcher selektiv für Cl⁻ und HCO₃⁻ sei. Die Simulation von *in vivo* Bedingungen (Cl⁻ serosal > mukosal; HCO_3^- mukosal > serosal) in in vitro Untersuchungen führte zu einer Cl⁻-Sekretion und einer HCO₃⁻-Absorption (Niebuhr, 2003; Tiling, 1997). Die Selektivität des Anionen-Austauschers für Cl und HCO3⁻ wurde bestätigt durch die signifikante Abnahme des Cl⁻ -Transportes infolge des Ersatzes von Cl⁻ durch SCFA oder Glukonat. Höhe und Richtung des Cl⁻ und HCO₃⁻ -Transportes via Anionen-Austauscher sind abhängig von der Konzentration des jeweiligen Ions auf beiden Seiten des Epithels (Tiling, 1997). Die Hypothese des Anionen-Austauschers konnte zudem durch die Reduzierung der jeweiligen Transportraten infolge der Zugabe von DIDS - einem Anionen-Austauscher -Hemmstoff - bestätigt werden (Niebuhr, 2003; Tiling, 1997).

Demnach ist der Anionen-Austauscher im Blättermagenepithel physiologisch in die *Absorption* von HCO_3^- und nicht dessen Sekretion involviert, wie dies in den meisten anderen Epithelien des Magen-Darm-Trakts der Fall ist, beispielsweise am Pansenepithel, wo nachweislich eine HCO_3^- - *Sekretion* erfolgt. Die physiologische Bedeutung liegt höchstwahrscheinlich darin, dass eine erniedrigte Pufferkapazität infolge der HCO_3^- - Absorption im Blättermagen das Ansäuern der Ingesta im Labmagen erleichtert und die Freisetzung von CO_2 verringert.

2.3.2.2 Phosphat

Der Hauptresorptionsort von Phosphat ist beim Wiederkäuer der Dünndarm (Breves, 1991). Im Blättermagen beobachteten von Engelhardt und Hauffe (1975) *in vivo* eine Absorptionsrate von weniger als 0,5 mmol/h. *In vitro* Untersuchungen am isolierten Blättermagenepithel ließen auf einen passiven Transport in beide Richtungen schließen. Bei den unidirektionalen Phosphatfluxen konnten eine PD-abhängige, elektrogene, und eine PDunabhängige, elektroneutrale, Komponente differenziert werden. Dies lässt Rückschlüsse auf die Existenz para- und transzellulären Transportes zu. Unter *in vivo* vorherrschenden Bedingungen kann somit auf eine Nettoresorption geschlossen werden (Dubberke, 1988; Holler *et al.*, 1988).

2.3.3 Transport von Kationen

2.3.3.1 Natrium

Der Wiederkäuer nimmt Natrium zum einen mit dem Futter auf, zum anderen gelangt ein großer Teil über die Speichelsekretion (bei der Kuh > 500g Na⁺/d) in die Vormägen. Bereits frühe Studien ergaben, dass Natrium in den Vormägen resorbiert wird: Die Na⁺-Konzentration im Blättermagen ist deutlich geringer als die im Pansen (Pfeffer *et al.*, 1966; Sklan und Hurwitz, 1985); 50 % des über den Speichel sezernierten Natriums wird bereits vor dem Erreichen des Duodenums wieder resorbiert (Gäbel und Martens, 1991; Pfeffer *et al.*, 1970). Nach *in vivo* Untersuchungen von v. Engelhardt und Hauffe (1975) beträgt die Menge an resorbiertem Na⁺ im Blättermagen bei Schafen 4,3 mmol/h bzw. 20-30 % des Zuflusses an Natrium.

Da die Na⁺-Konzentration im Lumen der Vormägen immer geringer ist als im Blut und die transepitheliale Potentialdifferenz (PD_t) zwischen 20 und 60 mV beträgt (Blutseite positiv), muss die Natriumresorption gegen den transepithelialen elektrochemischen Gradienten erfolgen, was aktive Transportmechanismen erfordert (Engelhardt und Breves, 2000). *In vitro*

Untersuchungen am Psalterepithel zeigten unter Kurzschlussstrombedingungen (Erläuterungen dazu siehe Kapitel Material und Methoden) hohe unidirektionale Na⁺-Transportraten und eine große Nettoresorption, was auf einen aktiven Transport hinweist (Ali, 2005a; Harrison, 1971; Martens und Gäbel 1988).

Der Natriumtransport am Blättermagenepithel kann aufgrund der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen in eine elektrogene und eine elektroneutrale Komponente unterteilt werden.

Der elektrogene Na⁺-Transport:

Martens und Gäbel (1988) konnten bei *in vitro* Untersuchungen am Blättermagenepithel folgende Beobachtungen machen: Die Eliminierung von Na⁺ aus der Inkubationslösung führte zu einem Abfall des Kurzschlussstromes (I_{sc}). Das bedeutet, dass der I_{sc} am Psalterepithel vom Na⁺-Transport abhängt. Der Einsatz von Ouabain, ein Na⁺/K⁺-ATPase-Hemmstoff, bewirkte die Eliminierung des I_{sc}. Sowohl der Ersatz von Chlorid auf der mukosalen Seite als auch der Einsatz von Amilorid, ein NHE-Hemmstoff, zeigten keinen Effekt auf den I_{sc}. Schultheiss et al. (1998) zeigten zudem, dass die Applikation von Aldosteron auf der serosalen Seite keinen Einfluss auf den I_{sc} hat, wie es sonst bei Epithelien mit klassischem Natrium-Transport der Fall ist. Darüber hinaus wiesen sie nach, dass das Fehlen von divalenten Kationen (Ca²⁺, Mg²⁺) in der Inkubationslösung auf der mukosalen Seite zu einer Erhöhung des I_{sc} führt.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass am Blättermagenepithel ein elektrogener Transport von Na⁺ durch einen apikal gelegenen amilorid-insensitiven Kanal und einer basolateral seriell angeordneten Na⁺/K⁺-ATPase erfolgt. Im Gegensatz zu ähnlichen Transportsystemen in Magen-Darm-Trakt oder Niere beispielsweise lässt sich der Na⁺-Transport am Blättermagenepithel nicht durch Aldosteron stimulieren.

Der elektroneutrale Na⁺-Transport:

In vitro Untersuchungen am Blättermagenepithel zeigten, dass der Netto-Na⁺-Transport deutlich größer ist als der I_{sc} (Harrison *et al.*, 1970; Martens und Gäbel, 1988), d.h. es findet elektroneutraler Transport statt. Der Na⁺-Transport konnte durch die luminale Absenkung des pH-Wertes von 7,4 auf 6,4 signifikant erhöht werden (Ali, 2005a). Martens und Gäbel (1988) zeigten, dass der elektroneutrale Transport amilorid-sensitiv ist: Sowohl J_{ms} Na⁺ als auch J_{sm} Na⁺ wurden durch Amilorid signifikant reduziert, der Netto-Transport blieb dementsprechend unverändert. Darüber hinaus zeigte sich eine Abhängigkeit von Cl⁻, wobei die Zugabe von Bumetanid keinen Effekt hatte. Ali (2005a) bestätigte diese Ergebnisse und zeigte zudem,

dass 1 mmol Hydrochlorothiazid (HCTZ) den Transport von Na⁺ (J_{ms} und J_{net}) und Cl⁻ in gleichem Maße signifikant reduziert. Die maximale Reduktion des Na⁺-Transportes wurde ab 1 mmol Amilorid nachgewiesen, wobei stets ein restlicher elektroneutraler Na⁺-Transport bestehen blieb. Lediglich durch die Applikation von 1 mmol Amilorid unter Cl⁻-freien Bedingungen in der Inkubationslösung konnte der elektroneutrale Transport gänzlich eliminiert werden (J_{net} Na⁺ = I_{sc}).

Aufgrund der Ergebnisse ist anzunehmen, dass der elektroneutrale Transport von Na⁺ am Blättermagenepithel in der apikalen Membran hauptsächlich über einen NHE erfolgt und zusätzlich über einen NaCl-Cotransporter.

Im Unterschied zum Pansen und auch zu anderen epithelialen Geweben sei darauf hingewiesen, dass der Transport von Na⁺ in mukosaler Richtung (J_{sm}), deutlich größer ist als die gemessene Leitfähigkeit der Gewebe (G_t) (Ali, 2005a; Martens und Gäbel, 1988). Ali (2005a) konnte anhand seiner Untersuchungsergebnisse keinerlei Korrelation zwischen G_t und J_{sm} Na⁺ aufzeigen. Dies weist auf einen transzellulären elektoneutralen Na⁺-Transport von der serosalen zur mukosalen Seite des Blättermagenepithels hin. Jedoch zeigte der Einsatz von Amilorid, Bumetanid und Cariporiden auf der serosalen Seite keinen Effekt. Die Reduktion der Na⁺-Konzentration in der serosalen Inkubationslösung verursachte eine signifikante Reduktion sowohl von J_{sm} Na⁺ als auch von J_{ms} Na⁺ in gleicher Größenordnung. Es bestand eine lineare Abhängigkeit von J_{ms} und J_{sm} Na⁺ (r²=0,99). Diese war unabhängig von der Art der durchgeführten Manipulation.

2.3.3.2 Kalium

Die Transportraten von Kalium im Blättermagen sind sehr gering. Pfeffer et al. (1966) fanden keine signifikante Resorption im Blättermagen. In den Studien von v. Engelhardt und Hauffe (1975) wurde eine Transportrate von etwa 0,8 mmol/h gemessen, also etwa 9 % des Zuflusses in den Blättermagen. In *in vitro* Studien (Harrison, 1971; Harrison *et al.*, 1970) wurde eine sehr geringe Netto-Absorption von 0,04 bis 0,13 μ eq \cdot cm⁻² \cdot h⁻¹ gefunden.

2.3.3.3 Magnesium

Die Angaben zum Transport von Magnesium am Blättermagenepithel sind teilweise sehr kontrovers (Edrise *et al.*, 1986; Harrison, 1971; Pfeffer *et al.*, 1966; Sklan und Hurwitz, 1985). Die Bedeutung der Mg²⁺-Resorption im Blättermagen scheint gegenüber der im Pansen gering.

2.3.3.4 Calcium

Erste *post mortem* Untersuchungen an Schafen (Pfeffer *et al.*, 1966) zeigten eine um 50% erhöhte Calcium-Konzentration im Blättermagen gegenüber der im Pansen. Auch Sklan und Hurrwitz (1985) konnten keine Netto-Resorption aufzeigen. *In vitro* Untersuchungen am Psalterepithel zeigten eine geringfügige Netto-Resorption von Calcium, welche aus einer PD-abhängigen und einer PD-unabhängigen Komponente bestand (Holler *et al.*, 1988). Die geringe Netto-Resorption war dabei überwiegend auf die PD-abhängige Komponente zurückzuführen und wurde nach ihrer Meinung durch aktiven transzellulären sowie passiven parazellulären Transport realisiert werden. Der Netto-Transport sei jedoch zu klein, um eine Bedeutung *in vivo* zu erlangen. Zur gleichen Interpretation seiner Ergebnisse kam Dubberke (1988).

2.3.4 Transport von kurzkettigen Fettsäuren

Pflanzliche Substanzen wie Cellulose, Hemicellulose, Pectine oder Lignin können mithilfe der mikrobiellen Aktivität in den Vormägen der Wiederkäuer zu kurzkettigen Fettsäuren (short chain fatty acids = SCFA) abgebaut werden. Es handelt sich dabei hauptsächlich um Acetat, Propionat und Butyrat, welche abhängig von der Fütterung in einem Verhältnis von etwa 75:15:10 bis 40:40:20 produziert werden (Bergman, 1990). Bei Schafen lag bei einer Trockenmasse-Aufnahme von 600 bis 900 g die Gesamt-SCFA-Produktionsrate zwischen 3 und 6 Mol pro Tag (Engelhardt und Breves, 2000). Schätzungen zufolge decken die SCFA etwa 70 bis 80 % des Energiebedarfes beim Wiederkäuer (Bergman, 1990; Gäbel und Sehested, 1997). Hauptproduktions- und Hauptresorptionsort stellt dabei der Pansen dar. Im Blättermagen findet eine Produktion von 8 mmol/h oder 12 mmol pro Gramm Trockenmasse pro Stunde statt, was einer Produktion von 4 % derer im Pansen entspricht (Giesecke und von Engelhardt, 1975). Murray et al. (1962) kamen zu dem Schluss, dass im Pansen 85 % der dort gebildeten SCFA resorbiert werden und etwa 6 % im Blättermagen. Von Engelhardt und Hauffe (1975) korrigierten unter Einbeziehung der dortigen SCFA-Produktion diesen Prozentsatz auf 10 % Resorption von SCFA im Blättermagen. Die Zusammensetzung der Mikroorganismen im Blättermagen entspricht derer im Pansen, lediglich die Anzahl ist entsprechend der Größe des Blättermagens im Verhältnis zum Pansen geringer (Smith, 1984). Die Transportmechanismen von SCFA in den Vormägen der Wiederkäuer sind für den Pansen hinreichend belegt: Neben einem passiven Transport via Diffusion der undissoziierten Form entlang der Gradienten (mukosal > serosal) existiert offensichtlich ein sekundär aktiver

Transport in Form eines Anionen-Austauschers (SCFA/ HCO₃⁻Austauscher). Die SCFA

können wahrscheinlich einen in der apikalen Membran gelegenen NHE-Transporter aktivieren, der SCFA-Transport selbst ist aber offenbar unabhängig vom Na⁺-Transport (Gäbel und Sehested, 1997). Die Pufferkapazität des sezernierten HCO₃⁻ trägt zur Regulation des pH Wertes in Pansen bei. Über die Transportmechanismen von SCFA im Blättermagen Untersuchungen Aufschluss (Ali, 2005a): geben in vitro SCFA werden am Blättermagenepithel vermutlich nur per einfacher Diffusion transportiert. Die Untersuchungsergebnisse sprechen gegen einen Anionen-Austauscher, wie er in der apikalen Membran des Pansens existiert. Zudem scheint ein wesentlicher Unterschied zum Pansenepithel eine mögliche Abhängigkeit des SCFA-Transportes vom NHE in der apikalen Membran des Blättermagens zu sein. Durch die Applikation von 1 mmol Amilorid (NHE-Blocker) konnte der Transport von Acetat bei hohen Konzentrationen (100 mM) auf mukosaler Seite und niedrigem pH-Wert (6,4) signifikant reduziert werden. Dies weist auf eine Interaktion zwischen SCFA-Aufnahme, der intrazellulären Dissoziation eines Protons und der resultierenden Aktivierung des NHE hin, welche auch für das Pansenepithel beschrieben wurde (Gäbel et al., 1991; Müller et al., 2000). Mutmaßliche Interaktionen zwischen dem Transport von SCFA und Na⁺ wurden bereits an vielen Geweben untersucht (Binder und Mehta, 1989; Gäbel et al., 1991; Petersen et al., 1981). Bemerkenswert ist, dass die Steigerung des Na⁺-Transportes infolge luminaler pH-Absenkung im Verhältnis deutlich größer ist als die Steigerung der SCFA-Aufnahme (Ali, 2005a; Petersen et al., 1981). Die pHinduzierte Erhöhung der Acetatfluxe beträgt etwa 1 µeq·cm⁻²·h⁻¹ (25 mmol/l in der Inkubationslösung), gegenüber einer Erhöhung von 8 μ eq·cm⁻²·h⁻¹ beim Na⁺-Transport (J_{ms}) (Ali, 2005a). Selbst wenn man annimmt, dass der Transport von Propionat (10 mmol/l) und Butyrat (5 mmol/l) ebenfalls durch den niedrigen pH von 6,4 stimuliert wird, war die Steigerung von J_{ms} Na⁺ deutlich höher als erwartet. Antworten auf die offene Frage nach der Aktivierung bzw. Regulation des NHE in der apikalen Membran könnten gegebenenfalls Aufschluss über diese aufgezeigte Diskrepanz geben.

2.3.5 Transport von Ammoniak

Oyaert und Bouckaert (1961) ermittelten mit einem Ammoniakgehalt von 4-15 mmol im Psalterausfluss einen um 40 % niedrigeren Gehalt an Ammoniak gegenüber dem im Pansen. Die mittlere absolute Resorption von Ammoniak im Blättermagenepithel beträgt 0,9 mmol/h (von Engelhardt und Hauffe, 1975). Dies entspricht etwa 30-40 % des Zuflusses in den Blättermagen. Martens et al. (2004) kommen zu der Schlussfolgerung, dass Ammoniak überwiegend als NH₃ resorbiert wird.

2.3.6 Transport von Peptiden

Proteine werden in den Vormägen der Wiederkäuer durch die Aktivität von Mikroorganismen zu Peptiden abgebaut. Die *in vivo* Untersuchungen (Seal und Parker, 1996; Webb *et al.*, 1993) und die *in vitro* Untersuchungen (Matthews *et al.*, 1996; McCollum und Webb, 1998) zeigen insbesondere im Hinblick auf die Mechanismen des Transportes für Peptide widersprüchliche Ergebnisse. Nach Martens et al. (2001) kann es sich um keinen gekoppelten oder elektrogenen Peptid-Transport handeln. Wahrscheinlicher liegt vielmehr ein passiver parazellulärer Transport der Peptide vor, der physiologisch nicht relevant ist.

2.3.7 Effekt der Fütterung auf den Transport

Die in einigen Studien stark variierenden Fluxraten am Blättermagenepithel begründeten Martens und Gäbel (1988) mit der Modulation der Transportfunktion durch die Fütterung. Die Na⁺-Fluxraten sind bei Tieren, welche mit Kraftfutter gefüttert wurden, signifikant höher als bei heugefütterten Tieren (Ali, 2005a). Die Fütterung hatte dabei keinen Einfluss auf die elektrophysiologischen Parameter. Am Pansen ist dieses Phänomen bereits einschlägig dokumentiert (Shen *et al.*, 2004). Am Blättermagen scheint eine ähnliche Adaptation stattzufinden. Im Gegensatz zum Pansenepithel erfährt das Blättermagenepithel aber nicht eine derart starke Oberflächenvergrößerung durch Papillen, deren Expression infolge Kraftfuttergabe sich erhöht. Demzufolge muss die Steigerung der Transportkapazität eher auf eine Hochregulation von Transportern und Kanälen zurückgeführt werden. Die oben beschriebene Interaktion zwischen Na⁺- und SCFA-Transport wird beispielsweise so schnell realisiert, dass eine zugrunde liegende Oberflächenvergrößerung als Mechanismus ausgeschlossen werden kann.

2.4 Bedeutung des Na⁺-Transportes für die pH-Regulation in epithelialen Geweben – der Na⁺/H⁺-Austauscher (NHE)

2.4.1 Einleitung

Die Na⁺/H⁺-Austauscher (NHE) - Genfamilie spielt eine zentrale Rolle für die neutrale Na⁺-Absorption in Geweben von Säugetieren. Die NHE-Genfamilie besteht aus 9 Isoformen, welche ihrer zellulären Lokalisation nach in primär intrazellulär oder primär in der Plasmamembran vorkommende Isoformen eingeteilt werden können (Brett *et al.*, 2005). Im Magen-Darm-Trakt diverser Spezies gibt es in der Plasmamembran vorkommende Isoformen, wie NHE1 (basolateral) und NHE2 (apikal), rezyklierende Isoformen (NHE3; apikal), sowie intrazelluläre Isoformen (NHE6, 7, 9). NHE3 rezykliert zwischen endosomalen Kompartimenten und der apikalen Plasmamembran (Trafficking) und zeigt an beiden Orten Funktion. NHE3-Regulation findet während normaler Verdauungsprozesse statt. Der C-Terminus des NHE3 kann multiple regulative Proteine binden. Auf diese Weise werden große Protein-Komplexe gebildet, welche an der Regulation des NHE3 beteiligt sind. NHE1 und NHE2 werden nicht durch Trafficking reguliert.

2.4.2 Vorkommen und Lokalisation

Eine Übersicht über Vorkommen und Lokalisation der einzelnen Isoformen ist der Tab. 1 und der Abbildung 2 zu entnehmen.

ISOFORM	ZELLULÄRE LOKALISATION	VORKOMMEN		
NHE1	PM (BLM)	Ubiquitär in allen Säugetier-Zellen.		
NHE2	PM (Ap; BLM)	GIT; Niere; Skelettmuskulatur; Hoden		
NHE3	PM (Ap); RE	GIT; Niere.		
NHE4	PM (BLM)	Magen; Leber.		
NHE5	PM; SV; RE	Gehirn; Hoden, Skelettmuskulatur, Milz.		
NHE6	RE	GIT, Gehirn, Skelettmuskulatur, Herz.		
NHE7	TGN	GIT, Gehirn, Skelettmuskulatur, Pankreas, Prostata, Schilddrüse.		
NHE8	PM (Ap); TGN	Leber, Darm, Niere.		
NHE9	RE	Gehirn, Herz, Skelettmuskulatur, Leber, Darm.		

Tab. 1 Vorkommen und Lokalisation des NHE*

*Modifiziert nach Donowitz und Li (2007), Malo und Fliegel, (2006), Masereel *et al.*, (2003), Wakabayashi *et al.*, (1997) und Zachos *et al.*, (2005)



Abbildung 2: Zelluläre Lokalisation der NHE-Isoformen (AM – Apikale Membran; BLM – Basolaterale Membran; TGN – t*rans*-Golgi-Netzwerk; GA – Golgi-Apparat); modifiziert nach Brett *et al.* (2005)

2.4.3 Funktion

In der Plasmamembran lokalisierte NHEs wirken entscheidend an der Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes, des Volumens und der transzellulären Absorption von Na⁺, Cl⁻ und Na⁺HCO₃⁻ epithelialer Zellen mit. Insbesondere der ubiquitär vorkommenden NHE1-Isoform wird eine *housekeeping* Funktion für die Regulation des pH_i zugeschrieben. NHE3 und NHE5 haben zusätzlich eine Funktion in intrazellulären Kompartimenten mit dem Ziel des Ansäuerns früher Endosomen oder sekretorischer Granula (Zachos *et al.*, 2005). Zudem scheint die intestinale Absorption von Nahrungsstoffen zumindest partiell unter der Kontrolle von NHEs zu stehen (Thwaites *et al.*, 2002).

Die Funktion der intrazellulären NHEs, auch wenn bislang primär an prokaryotischen Zellen erforscht, schließt wahrscheinlich die intrazelluläre Na⁺/K⁺-Homöostase und die Regulation des Trafficking in und aus TGN (*trans*-Golgi Netzwerk) sowie endosomaler und lysosomaler Kompartimente mit ein (Zachos *et al.*, 2005). Außerdem stellen sie einen H⁺-Efflux-Weg dar,

um die Azidifizierung der Organellen durch die V-Typ H⁺-ATPase zu kompensieren (Grabe und Oster, 2001). Im Gegensatz zur NHE3-Isoform, welche frühe Endosomen ansäuern kann, führt die Aktivität der intrazellulären NHEs also zu einer Alkalisierung der Kompartimente. NHE3 ist dabei an den Na⁺-Gradienten gekoppelt, intrazelluläre NHE-Isoformen hingegen an den elektrochemischen Gradienten von H⁺ (Brett *et al.*, 2005).

2.4.4 Struktur

Alle NHE-Isoformen haben eine ähnliche Struktur und zeigen eine Homologie von 20 - 60 % in ihrer Aminosäuresequenz. Das molekulare Gewicht beträgt zwischen 74-99 kDa (Masereel et al., 2003). Sie bestehen aus 10 bis 12 helikalen transmembranären Regionen (TM), einer Nterminalen Domäne und einer hydrophilen C-terminalen Domäne (Wakabayashi et al., 1994) (siehe Abbildung 3). Die transmembranäre Domäne ist verantwortlich für den Austausch von Na⁺ und H⁺, während die C-terminale Domäne im Zytoplasma eine regulative Funktion besitzt. Der C-Terminus kann in mehrere Subdomänen unterteilt werden (Levine et al., 1995; Li et al., 2002). Während die Struktur der N-terminalen Domäne sehr homolog bei den einzelnen Isoformen ist, variiert sie stark bei der C-terminalen Domäne (Wakabayashi et al., 1994). Die plasmamembranären NHEs besitzen längere C-Termini als die Organellen NHEs, was vermutlich mit der extensiveren Regulation ersterer zusammenhängt (Zachos et al., 2005). Die detaillierteste Beschreibung der Struktur wurde bisher über den NHE von E. coli (NhaA) gemacht (Hunte et al., 2005). Der Ionentransport läuft demnach wie folgt ab: Ein negativ geladener Ionen-Tunnel, welcher in der Mitte der Membran an der mutmaßlichen Ionen-Bindungsstelle endet, öffnet in Richtung Zytoplasma. Dort befindet sich eine einzigartige Ansammlung von zwei Paaren von Helices, verbunden durch sich kreuzende verlängerte Ketten, die eine balancierte elektrostatische Umgebung schaffen. Hunte et al. (2005) vermuten, dass die Bindung eines geladenen Substrates eine elektrische Imbalance verursacht, gefolgt von Bewegungen, welche einen schnellen wechselnden Zugang/Durchgang von Ionen erlauben. Dieser Ionen-Austausch-Mechanismus sei durch einen Konformationswechsel realisiert, ausgelöst durch ein pH-Signal, welches am zytoplasmatischen Tunnel wahrgenommen wird.

16



Abbildung 3: Struktur der NHE3-Isoform (modifiziert nach Zachos et al. (2005))

2.4.5 Kinetik

Die NHEs gehören zu den sekundär aktiven Transporter-Familien, welche den Transport von Ionen oder Substraten mithilfe einer durch aktive Ionen-Pumpen erzeugten Triebkraft katalysieren. NHEs katalysieren den elektroneutralen Austausch von extrazellulärem Na⁺ gegen intrazelluläre H⁺ in einer Stöchiometrie von 1:1 (Aronson *et al.*, 1982; Aronson, 2006; Wakabayashi *et al.*, 1997). Die Triebkraft für diesen Transport wird durch die Na⁺/K⁺-ATPase erzeugt (Wakabayashi *et al.*, 2003a). ATP ist also nicht (direkt) in den Austausch von Na⁺ und H⁺ involviert, trotzdem ist die Funktion aller NHE-Isoformen abhängig von zellulärem ATP, auch wenn der zugrunde liegende Mechanismus bislang ungeklärt ist (Aharonovitz *et al.*, 2000; Aharonovitz *et al.*, 2001; Cabado *et al.*, 1996; Cassel *et al.*, 1986; Demaurex *et al.*, 1997; Kapus *et al.*, 1994). Die Transportkinetik der NHEs umfasst eine Michaelis-Menten-Kinetik für die extrazelluläre Na⁺-Aufnahme und eine komplexere Kinetik für den Export intrazellulärer H⁺. NHEs sind durch extrazelluläres Natrium sättigbar, die stark variierenden Affinitätskonstanten (K_m) der einzelnen Isoformen (siehe Tab. 2) liegen alle deutlich unter der extrazellulären Konzentration von Natrium (Masereel *et al.*, 2003). Eine Ausnahme stellt die Isoform NHE4 dar: hier zeigt sich eine sigmoidale Abhängigkeit zur extrazellulären Na⁺-Konzentration (Bookstein *et al.*, 1996). Protonen werden zum einen transportiert, zum anderen scheinen sie den Transporter über eine weitere Bindungsstelle - welche als ,H⁺-Modifier-Site⁴ bezeichnet wird - allosterisch zu aktivieren (Aronson *et al.*, 1982; Hayashi *et al.*, 2002; Wakabayashi *et al.*, 1997; Wakabayashi *et al.*, 2003b). Die Kinetik für den H⁺-Transport wird mit einem Hill-Koeffizienten von ~2 beschrieben (Aronson *et al.*, 1982).

Die extrazelluläre Kationen-Bindungsstelle der NHEs ist nicht absolut selektiv für Natrium. Intrazelluläre NHEs vieler Spezies transportieren $K^+ > Na^+$, plasmamembranäre NHEs transportieren Na⁺ >> K⁺ (Zachos *et al.*, 2005). H⁺ und Li⁺ können mit Na⁺ um die extrazelluläre Bindungsstelle konkurrieren (Aronson *et al.*, 1983; Ives *et al.*, 1983), entsprechende Affinitätskonstanten können der Tabelle 2 entnommen werden. Auch NH4⁺ kann im Austausch mit H⁺ transportiert werden (Binder *et al.*, 1986; McDougal *et al.*, 1995; Rajendran und Binder, 1990; Ramirez *et al.*, 1999). Desweiteren postulieren Morgan und Canessa (1990) einen optionalen Na⁺/Na⁺-Austausch des NHE, welcher über eine zusätzliche intrazelluläre regulative Bindungsstelle für Na⁺ initiiert werde. Na⁺/Na⁺ - und Na⁺/H⁺- Austausch könnten dabei einzeln oder gleichzeitig ablaufen, da es zwei verschiedene Transportwege im NHE gebe. Escobales und Figueroa (1991) hingegen führten einen Na⁺/Na⁺-Austausch auf einen eigenständigen Transporter zurück, der neben einem NHE existiere.

Eine postulierte eigenständige Cl⁻abhängige NHE-Isoform (Rajendran *et al.*, 1995; Rajendran *et al.*, 2001; Sangan *et al.*, 2002) wird eher für ein durch Klonen erzeugtes Artefakt gehalten (Schultheis *et al.*, 1998). Vielmehr seien die physiologischen Studien auf die mittlerweile anerkannte Cl⁻ -Abhängigkeit der verschiedenen bereits bekannten Isoformen (NHE 1-3) zurückzuführen (Aharonovitz *et al.*, 2001).

Kation	NHE1	NHE2	NHE3	NHE5
$Na_{o}^{+}(mM)$	10	50,0	4,7	18,6
$Li_{o}^{+}(mM)$	3,4	2,2	2,6	0,32
$K_{o}^{+}(mM)$	19,5	-	-	Leichte Hemmung
$H_0^+(pK)$	7,0	7,9	7,0	8,13
$H_i^+(pK)$	6,75	6,9	6,45	6,43

Tab. 2Scheinbare Affinitätskonstanten (Km-Werte) der NHE1-3 der Ratte und
der humanen NHE5-Isoform für monovalente Kationen*

*modifiziert nach Masereel et al. (2003)

2.4.6 Regulation

Die Regulation der NHE-Isoformen ist ein sehr komplexes Geschehen. Auch wenn zahlreiche beteiligte Komponenten der Regulation des NHE bereits erforscht sind, fehlt nach wie vor das Verständnis für deren Integration. NHE1 und NHE3 sind in Bezug auf ihre Regulation die am besten untersuchtesten Isoformen. Nachfolgend soll ein Überblick der Regulationsmechanismen des NHE gegeben werden. Man kann zwischen akuter und chronischer Regulation unterscheiden.

Akute Regulation:

Die akute Regulation erfolgt im Darm als Teil der Verdauung innerhalb von Minuten entweder infolge luminaler Konzentrationsänderung an Verdauungsprodukten (Bsp.: SCFA, Glukose), aufgrund neuronaler und/oder hormonaler Stimulation. In der Niere dauert die akute Regulation einige Minuten bis wenige Stunden, ausgelöst durch Pharmaka, Konzentrationsänderungen von Ionen (Bsp.: Na⁺, K⁺) oder einer Änderung des Blutdrucks bzw. Gefäßvolumens. Ein Auszug der Bandbreite an stimulierenden und hemmenden Einflüssen auf die NHE-Isoformen NHE1-3 ist in Tab. 3 dargestellt (Zachos *et al.*, 2005).

	NHE1	NHE2	NHE3
cAMP	S	S	Ι
EGF	-	-	S
Insulin	-	-	S
Glukokortikoide	S	-	S
PMA	S	S	Ι
Hyperosmolarität	S	S;I ^a	S
SCFA	-	-	S

Tab. 3Akute Regulation der Isoformen NHE1, 2 und 3*

**Modifiziert nach Zachos et al. (2005)

S, stimuliert; I, inhibiert; - nicht bekannt

^aabhängig von der Zelle, in der NHE exprimiert ist

Die akute Regulation umfasst Änderungen in der Umsatzrate, in der Variation der Anzahl an NHE (durch Trafficking) und bei NHE3 auch deren Halbwertzeit.

<u>H</u>⁺-<u>Modifier-Site:</u> Aronson et al. (1982) und Wakabayashi et al. (2003a) vermuteten neben der Transportbindungsstelle für H⁺ eine weitere regulative Bindungsstelle für H⁺, welche die Affinität für H⁺ erhöht (H⁺-Modifier-Site oder pH-Sensor-Site). Eine Aktivierung des NHE würde also durch einen Konformationswechsel bewirkt, verursacht durch die Protonierung dieser regulativen Bindungsstelle. Eine andere Theorie wurde durch Lacroix et al. (2004) aufgestellt: Während intrazellulären Ansäuerns würde eine niedrig-affine Form des NHE in eine hoch-affine Form konvertieren, ohne das Vorhandensein einer zusätzlichen regulativen Bindungsstelle für H⁺. Diese Theorie könne laut Ammar (2006) und Wakabayashi (2003a) jedoch nicht gänzlich die Aktivierung des ²²Na⁺-Efflux, also die umgekehrte Richtung des Transportes, durch zytosolisches Ansäuern erklären.

<u>Set Point:</u> Der NHE zeigt relativ wenig Aktivität bei intrazellulären pH-Werten von \geq 7,2. Dieses Verhalten wird der Existenz einer allosterischen pH-sensitiven Seite zugeschrieben, lokalisiert in der zytoplasmatischen Domäne. Der *Set Point*, bei welchem diese Ruhephase eintritt, scheint über diese allosterische oder ,modifier' Seite reguliert und dient der intrazellulären pH-Stabilisierung in der Nähe des physiologischen Optimums (Aronson *et al.*, 1982; Grinstein *et al.*, 1984). Die Deletion der zytoplasmatischen Domäne führt die NHE1-Aktivität in einen saureren Bereich (Wakabayashi *et al.*, 1992) und Mutation von Histidin in der zytoplasmatischen Domäne erniedrigt den Set Point von NHE3 um 0,3 - 0,6 pH-Einheiten (Cha *et al.*, 2003). Trafficking: Im GIT wurde bisher nur für die Isoform NHE3 Trafficking unter basalen Bedingungen nachgewiesen (Donowitz et al., 2000; D'Souza et al., 1998; Janecki et al., 1998). In allen Geweben, in denen NHE3 studiert worden ist, werden Stimulation oder Inhibierung zumindest partiell durch Trafficking realisiert, durch separate und unabhängig (!) regulierbare Endo- und Exozytose (Chow et al., 1999; Collazo et al., 2000; Janecki et al., 1998; Kurashima et al., 1998; Zachos et al., 2005). Die Endozytose bzw. der Vorgang der Internalisierung von NHE3 wird über Chlatrin-beschichtete Vesikel ermöglicht (Silviani et al., 1996) und involviert Lipid Rafts (Chow et al., 1999; Li et al., 2001). Die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) ist zumindest bei der Regulation der Exozytose beteiligt. Schätzungsweise 50 % der basalen Aktivität und des Vorkommens in der Plasmamembran von NHE3 sind abhängig von der Aktivität der PI3-K (Akhter et al., 2002; Janecki et al., 2000). Die einzige Ausnahme diesbezüglich stellt bisher das Ileum-Epithel beim Kaninchen dar, hier konnte Wortmannin - ein PI3-K-Hemmer - nicht die basale Na⁺Cl⁻-Absorption beeinflussen (Khurana et al., 1996). Im Kontrast dazu inhibiert Wortmannin ~50 % der basalen NHE3-Aktivität in NHE-Null-Fibroblasten, in denen nur NHE3 exprimiert wird, sowie in Caco-2-Zellen (Zellkultur) und OK-Zellen (Opossum Kidney-Zellen) (Akhter et al., 2002; Donowitz et al., 2000; Janecki et al., 2000; Kurashima et al., 1998). Die PI3-Kinase ist auch an der Stimulation des NHE3 beteiligt: In Fibroblasten konnte die durch Wachstumsfaktoren initiierte Stimulation des NHE3 durch Wortmannin um 50 % geblockt werden (Janecki et al., 2000; Lee-Kwon et al., 2001); sogar zu 100 % konnte die LPA (Lysophosphatidsäure)-induzierte Aktivierung des NHE3 durch Wortmannin gehemmt werden (Lee-Kwon et al., 2003). Interessanterweise ist manchmal die Änderung der Trafficking-Rate erst nach der Veränderung der Umsatzrate messbar (Donowitz und Tse, 2001; Zachos et al., 2005).

Die beteiligten Komponenten der akuten Regulation (Phosphorylierung, Komplexbildung, Assoziation mit dem Zytoskelett) sind auf molekularer Ebene hinreichend bekannt, allerdings ist deren Integration bisher nicht verstanden.

<u>Phosphorylierung:</u> Unter basalen Bedingungen liegen NHE1-3 phosphoryliert vor (Donowitz und Tse, 2001; Kurashima *et al.*, 1997; Moe *et al.*, 1995; Sardet *et al.*, 1990; Yip *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1999). Im Rahmen der akuten Regulation geht oft eine Änderung in der Phosphorylierung einher. Sie scheint nötig für einige akute Regulationsmechanismen, jedoch bei weitem nicht für alle. Zudem scheint sie alleinig nicht auszureichen, um eine Stimulation oder Inhibierung auszulösen (Moe, 1999; Wiederkehr *et al.*, 1999; Yip *et al.*, 1997).

NHE-Komplexe: Die C-Termini der NHE sind Ort der Regulation der NHE-Aktivität. Im Gegensatz zu den C-Termini des NHE1 ist die Organisation der C-Termini von NHE2 und NHE3 sehr viel komplexer: Unter anderem finden indirekte Protein-Protein-Interaktionen mithilfe so genannter scaffold Proteine (Gerüstproteine) statt, welche die Grundlage für die Organisation von größeren Proteinkomplexe bilden. Diese Gerüstproteine besitzen spezifische PDZ-Domänen (benannt nach den ersten drei identifizierten Proteinen mit diesen Domänen, PSD-95, Discs large, und ZO1), welche die direkte Interaktion zwischen den Proteinen vermitteln. Speziell NHE3 liegt in großen multiplen Multiprotein-Komplexen vor, insbesondere in der Plasmamembran unter basalen Bedingungen (Li et al., 2004). Diese NHE-Komplexe variieren im Rahmen der akuten Regulation des NHE3 bezüglich ihrer Größe und ihrer assoziierten Proteine. Ein Beispiel für Proteine mit PDZ-Domänen ist die NHERF (NHE-Regulations-Faktor)-Familie. NHERF assoziiert unter anderem mit Proteinen der Ezrin/Radixin/Moesin-Familie (Aktin-bindende Proteine) und verbindet so den NHE mit dem Zytoskelett. Die Bildung von Multiproteinkomplexen vereinfacht die Phosphorylierung und die hormonelle Kontrolle des NHE3. NHERF spielt ebenso in der Zielführung von Transportproteinen zur apikalen Membran eine Rolle. Darüberhinaus stellt NHERF eine regulative Einheit für die Kontrolle des Traffickings dar (Shenolikar und Weinman, 2001). Ein Auszug der Proteine, die an den C-Terminus der NHE1-3 binden, sind der Tab. 4 und Abbildung 3 zu entnehmen.

Tab. 4Beispiele für regulative Proteine, die an den C-Terminus der NHE-
Isoformen 1-3 binden können*

NHE1	Calmodulin (CaM); Calcineurin Homologes Protein (CHP); PIP2; Carboanhydrase II; Ezrin
NHE2	Calmodulin (CaM); alpha-Spectrin
NHE3	Calmodulin (CaM); Calcineurin Homologes Protein (CHP); NHERF 1; NHERF2; Megalin; PDZK1

*modifiziert nach Zachos et al. (2005)

Einige Untersuchungen an Zellen geben Hinweise auf die Beteiligung von Komplexbildungen (Di- oder Oligomerisation) der NHE an der akuten Regulation. Deletion der Domäne 1 des C-Terminus von NHE1 unterbrach eine Disulfid-Bindung zweier NHE1-Moleküle und reduzierte die pH-Sensitivität deutlich, woraus geschlossen wurde, dass dieser Aspekt des Dimers notwendig für die pH-abhängige Regulation des NHE1 sei (Hisamitsu *et al.*, 2004). Multimerisation von NHE3 wurde ebenfalls beschrieben, wenn NHE3 mittels SDS-Page und

Western-Blotting unter denaturierten Bedingungen untersucht wurde (Kim *et al.*, 2002). Es ist nicht bekannt, ob dies unter *in vivo* Bedingungen in intaktem Gewebe auch der Fall ist.

Zytoskelett: NHE1 und NHE3 zeigen eine mögliche Assoziation mit dem Zytoskelett (Denker *et al.*, 2000; Donowitz und Tse, 2001; Yun, C. H. *et al.*, 1998). NHE3 ist zumindest indirekt via Ezrin mit dem Zytoskelett verbunden (Lamprecht *et al.*, 1998; Yun *et al.*, 1998), über Interaktionen mit NHERF1, NHERF2 und/oder PDZK1 (Gisler *et al.*, 2003; Lamprecht *et al.*, 1998; Yun *et al.*, 1997). Einige Aspekte des Traffickings von NHE3 sind abhängig von einem intakten Zytoskelett, was Untersuchungen mit dem Einsatz von Colchicin zeigten (Hayashi *et al.*, 2004; Sabolic *et al.*, 2002). Das Aktin-Zytoskelett scheint eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die Verankerung des NHE in der Membran, der Bewegung von NHE3 in die apikale Membran sowie der Komplexbildung von NHE3 zu spielen. Das Mikrotubuli-Netzwerk hingegen scheint notwendig für das genaue *Targeting* zu sein (Zachos *et al.*, 2005).

Langfristige / Chronische Regulation:

Die chronische Regulation spielt sich in einem Zeitrahmen von mehreren Stunden bis einigen Tagen ab. Viele der beteiligten Reaktionen werden via Änderung der Gen-Transkription verwirklicht, auch wenn es an detailiertem Wissen darüber bisher fehlt. Die NHE2- und NHE3-Gen-Regulation wird möglicherweise über vielerlei Transkriptionsfaktoren vermittelt, mit resultierender *Up*- oder *Down*- Regulation der NHE-mRNA Expression (Zachos *et al.*, 2005). Zum Beispiel erhöhte die chronische Exposition epithelialer Zellen gegenüber niedrigem pH die Menge an NHE3-mRNA und Proteinen. Die 24h-Exposition von humanen Caco2/bbe-Zellen (Colon-Zell-Monolayer) gegenüber SCFA hatte eine zeit- und konzentrationsabhängige Erhöhung der NHE3-Aktivität, sowie der NHE3-Proteine und m-RNA zur Folge (Musch *et al.*, 2001). Ein Beispiel für eine Langzeit-Regulation ohne Beteiligung einer Änderung in der Gen-Expression ist die Dexamethason-induzierte Protein-Kinase). Die SGK1 ist abhängig von der PI3-Kinase und benötigt NHERF2 um die NHE3-Aktivität zu erhöhen (Yun *et al.*, 2002).

2.5 Zusammenfassung und Fragestellung

Ziel der vorliegenden Studie ist es, den Na⁺-Transport am Blättermagenepithel im Hinblick auf dessen wichtige Bedeutung (NHE und NaCl-Cotransport) für den HCO₃⁻-Transport näher zu charakterisieren. In der nachfolgenden Zusammenfassung soll daher insbesondere auf die Interaktion der einzelnen Transportwege in Bezug auf den Na⁺-Transport eingegangen sowie resultierende Hypothesen und Fragestellungen der Untersuchung erläutert werden.

Der Blättermagen absorbiert Wasser und Elektrolyte (Na⁺, K⁺, Mg²⁺). Er verfügt über die einzigartige Fähigkeit, *gleichzeitig* HCO₃⁻ (eine Base) *und* protonierte SCFA (HSCFA) zu transportieren (Absorption). Dieser parallele Transport einer Base und einer Säure erfordert effektive Mechanismen der Regulation des intrazellulären pH-Wertes. Eine der wichtigsten Funktionen des Blättermagens der Wiederkäuer ist die Absorption von großen Mengen HCO₃⁻ im Austausch mit Cl⁻, um eine übermäßige Gasbildung in Form von CO₂ im Labmagen zu verhindern und um eine ausreichende Ansäuerung der Ingesta im Labmagen gewährleisten zu können (siehe Abbildung 4).



Abbildung 4: Vormagensystem eines Wiederkäuers

Der Transport von HCO₃⁻ und Cl⁻ wird wahrscheinlich über zwei in Serie geschaltete Anionenaustauscher realisiert (siehe Abbildung 5). *Die Absorption von HCO₃⁻ und die Sekretion von Cl⁻ hängen indirekt vom elektroneutralen Na⁺-Transport in der apikalen Membran ab*: Der Na⁺/H⁺-Austauscher (NHE) ist für die Regulation des intrazellulären pH-Wertes zuständig und der Na⁺Cl⁻-Cotransporter sorgt für den notwendigen Cl⁻-Gradienten, welcher die passive Kraft für den HCO₃⁻/Cl⁻-Austauscher darstellt (Ali, 2005b; Beisele *et al.*, 2007).

Die kinetischen Eigenschaften des elektroneutralen Na⁺-Transportes (via NHE und NaCl-Cotransporter) in der apikalen Membran des Blättermagens sollen daher untersucht werden, weil beide Transportsysteme (apikale Aufnahme) passiv erfolgen und somit von den chemischen Gradienten der beteiligten Ionen abhängig sind. Eine Verringerung der luminalen Na⁺ -Konzentration muss daher beide Mechanismen beeinflussen (und damit indirekt den HCO₃⁻-Transport).

Die Absenkung des pH_i durch die luminale Aufnahme von HSCFA induziert eine Stimulation des Na⁺/H⁺ Austauschers (NHE), eine wechselseitige Beeinflussung des Transportes von SCFA und NHE und wahrscheinlich auch eine Erhöhung des NaCl-Cotransportes (siehe Abbildung 5). Interessanterweise ist die luminale Aufnahme von Protonen via HSCFA viel geringer als die daraus resultierende Stimulation des NHE, die daher nicht mit der Annahme des klassischen Modells der HSCFA Aufnahme, Freisetzung eines Protons und Stimulation des NHE im Verhältnis von 1 : 1 für H⁺ Aufnahme und H⁺ Recycling via NHE erklärt werden kann. Es wird ein "*Acid Sensing" Mechanismus* angenommen, der die beobachtete Steigerung der Natrium Aufnahme nach Erhöhung der SCFA im Blättermagen vermittelt. Es wird angenommen, dass Aspekte der akuten Regulation des NHE, wie die Änderung des *set points* und/oder der Änderung der Transportkapazität, Teil dieses "Acid Sensing" Mechanismus im Blättermagenepithel sind.

Der Na⁺/H⁺ Austauscher wird durch ein erhöhtes Angebot von Protonen stark aktiviert. Es soll versucht werden, die der Aktivierung zugrunde liegenden Mechanismen zu charakterisieren (NHE3 Trafficking; Kinetik: V_{max} und/oder K_m).

In Bezug auf die oben erwähnte Korrelation zwischen J_{ms} und J_{sm} Na⁺ postulierte Ali (2005) einen Na⁺/Na⁺-Austauscher in der basolateralen Membran. Es könnte ein "Crosstalk" zwischen dem angenommenen basolateralen Na⁺/Na⁺-Austauscher und dem apikalen NHEs existieren, der z. T. auch als Na⁺/Na⁺ Austauscher fungieren und somit die hohen transzellulären Fluxraten (J_{ms} und J_{sm}) erklären könnte. Der apikale NHE transportiert primär H⁺, sekundär aber auch Na⁺-Ionen. Über die basolaterale Membran eintretende Na⁺-Ionen könnten die Zelle über die apikale Membran via NHE (im Austausch für Na⁺!) verlassen. Dieser transzelluläre Na-Transport via Na⁺/Na⁺ Austausch in der apikalen und basolateralen Membran ist ungewöhnlich und bisher in keinem Epithel beschrieben worden. Es ist auch schwierig, diesem Austausch eine physiologische Bedeutung zuzuschreiben. Da der apikale Na^{+}/Na^{+} Austausch amilorid-sensitiv ist (Ali, 2005a), wurde die Hypothese angenommen, dass der Na^{+}/Na^{+} Austausch in einen Na^{+}/H^{+} Austausch überführt werden kann, wenn eine Protonenbelastung des Zytosols z. B. durch apikale HSCFA-Aufnahme erfolgt.

In den Untersuchungen soll ein möglicher Wechsel von Na⁺/Na⁺-Austausch zu einem Na⁺/H⁺-Austausch in der apikalen Membran provoziert werden, um eine "Entkopplung" der aufgezeigten Korrelation von J_{ms} und J_{sm} Na⁺ zu verursachen und ggf. weitere Rückschlüsse auf die Regulationsmechanismen des NHE ziehen zu können.



Abbildung 5: Modell der Transportmechanismen des Blättermagenepithels

Schematische Darstellung der den Untersuchungen zugrunde liegenden Mechanismen für Na, Cl, HCO_3^- und SCFA. Die postulierte Richtung des HCO_3^- -Transportes (Absorption) und des Cl⁻-Transportes (Sekretion) via Anionen-Austauscher geschieht entlang der vorherrschenden Gradienten. Der parallele transzelluläre Transport von HCO_3^- und HSCFA verdeutlicht die Notwendigkeit eines konstanten pH_i. Es wird angenommen, dass der NHE den primären und wichtigsten Mechanismus zur pH-Regulation darstellt. Die Interaktion zwischen HSCFA-Dissoziation und Recycling von H⁺ via NHE ist stark vereinfacht dargestellt. Vermutlich beinhaltet dieser Schritt die Funktion eines "Acid sensing" Mechanismus (\uparrow).C – Carrier; P – Pumpe (Na⁺/K⁺-ATPase). Die zylindrische Form repräsentiert einen Kanal. Der Mechanismus der SCFA-Extrusion ist bisher nicht identifiziert (?).

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die untersuchten Gewebeproben stammten von Schafen, welche hinsichtlich Alter (überwiegend Tiere < 1 Jahr), Rasse und Geschlecht differierten. Alle Versuchstiere wurden ausschließlich mit Heu ad libitum gefüttert. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Lecksteinen.

3.2 Gewinnung des epithelialen Gewebes

Unmittelbar nach dem Betäuben und Entbluten der Tiere wurde die Bauchhöhle eröffnet und der Magen-Darm-Trakt heraus verlagert. Der Blättermagen wurde abgesetzt und entlang des Psalterkanals eröffnet. Die großen Psalterblätter wurden an ihrer Basis abgetrennt, mehrfach in der Transportpufferlösung (siehe Anhang, Tafel 4) gespült und stumpf in der mittleren Muskelschicht auseinander präpariert. Der Transport des Gewebes in das Labor erfolgte im 38° C warmen Transportpuffer unter kontinuierlicher Begasung mit Carbogen (95% O₂ + 5% CO₂).

3.3 Inkubationstechnik

Die Experimente wurden mithilfe der Ussing-Kammer-Technik (siehe Abbildung 6) durchgeführt, welche von dem dänischen Physiologen Hans Ussing (Ussing und Zerahn, 1951) erfunden und u. a. von Stevens (1964) weiterentwickelt wurde. Die Versuchsanlage besteht aus zwei funktionellen Teilen: dem Wasserkreislauf und dem elektrischen Kreislauf (siehe Abbildung 6). Das Wasser zirkuliert in zwei U-förmigen doppelwandigen Glasröhren, in deren Wandung mithilfe einer Wasserpumpe (Firma Lauda) 38°C warmes Wasser zur Temperaturregelung zirkuliert und in deren Hohlraum die jeweiligen Pufferlösungen (siehe Anhang) eingefüllt werden können. Die Glasröhren sind über zwei Gummischläuche mit den beiden Kammerhälften aus Plexiglas verbunden, sodass die erwärmten Pufferlösungen in beide Hälften gelangen und somit das in der Mitte eingespannte Epithel umspülen können. Zusätzlich wird über zwei hintere Zugänge zum Röhrensystem Gas eingeschleust, sodass eine kontinuierliche Begasung und zusätzlich eine kontinuierliche Zirkulation der Pufferlösungen gewährleistet sind. Zum Schutz des Epithels vor mechanischen Schäden wird beidseits ein Silikonring zwischen Epithel und Kammer eingespannt. Aufgrund der Polarität des senkrecht eingespannten Epithels lassen sich links eine mukosale (= luminale = apikale) und rechts eine serosale (= dem Blut zugewandte = basolaterale) Seite definieren. Die Größe der mit dem Medium in Kontakt tretenden Fläche des Epithels innerhalb der Kammer beträgt ca. 3,14cm².



Abb.6 Schema der Ussing Kammer Technik

- A = Plexiglas -Kammer zum Einspannen des Epithels
- B = doppelwandiges Röhrensystem
- C = Öffnung zum Einfüllen von Puffer und Lösungen
- D = Elektrodenbehälter mit KCI
- E = vordere Ag/ AgCl -Brücke ; Potentialelektrode F = Hintere Ag/ AgCl -Brücken ; Stromelektrode
- G = Potentiometer
- H = Amperemeter
- J = Stromzufuhr
- K = Anschluss des äußeren Hohlraumes an das Wasserbad
- L = Anschluss des inneren Hohlraumes an die Gaszufuhr
3.4 Elektrophysiologisches Messprinzip

Der elektrische Kreislauf wird über zwei vordere und zwei hintere Agar-Brücken geschlossen, welche durch Bohrungen in den Plexiglas-Kammern in das Kammerinnere reichen. Die vorderen Brücken befinden sich mit weniger als 3 Millimetern nah am Epithel, während die hinteren Brücken mit ca. 25 Millimetern fern vom Epithel lokalisiert sind. Die vorderen Brücken treten über einen KCI-Behälter mit Ag/CI-Elektroden in Verbindung, sodass über diesen geschlossenen Kreislauf eine Messung der transepithelialen Potentialdifferenz (PD_t) erfolgen kann. Über die hinteren Brücken erfolgt die Einspeisung von externem Strom. Die Messung der transepithelialen Potentialdifferenz (PD_t) und des Stromes (I_{sc}) erfolgt mittels einer mikrocomputergesteuerten Voltage/Current Clamp–Einrichtung für Windows, Clamp Version 2.02 (Dipl. Ing. K. Mußler, Aachen). Durch das Aussenden definierter Strompulse (Δ I) und die Erfassung der resultierenden Veränderungen der Potentialdifferenz (Δ PD) kann die dazugehörige Gewebeleitfähigkeit (G_t) errechnet werden (siehe Kapitel 3.4.1). Somit werden im Laufe eines Versuches folgende elektrophysiologischen Parameter aufgezeichnet:

- Transepitheliale Potential differenz: $PD_t [mV]$,
- Kurzschlusstrom: $I_{sc} \left[\mu eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1} \right],$
- Gewebeleitfähigkeit: $G_t \left[mS \cdot cm^{-2} \right]$.

Die elektrophysiologischen Parameter wurden nach dem Einspannen des Epithels im "Open-Circuit"-Modus gemessen und anschließend - nach einer 20-minütigen Äquilibrierungsperiode - im "Short-Circuit"-Modus gemessen.

3.4.1 "Open-Circuit"-Modus

Im "Open-Circuit"-Modus wird die transepitheliale Potentialdifferenz (PD_t) gemessen. Um die Gewebeleitfähigkeit (G_t) errechnen zu können, werden Strompulse mit einer Amplitude von 50 μ A (Dauer 0,5 Sekunden) ausgesendet, welche zu einer entsprechenden Änderung in der Potentialdifferenz führen. Unter zu Hilfenahme des Ohmschen Gesetzes kann der transepitheliale Widerstand (R_t) errechnet werden, aus dessen reziproken Wert sich die Gewebeleitfähigkeit (G_t) ergibt.

$$R_t = \frac{\Delta P d_t}{\Delta I} \qquad \longrightarrow \qquad \qquad G_t = \frac{1}{R_t}$$

Alle Experimente wurden im "Open-Circuit"-Modus gestartet.

3.4.2 "Short-Circuit"-Modus

Im "Short-Circuit"-Modus wird die epitheliale Potentialdifferenz auf 0 mV "geklemmt", d.h. wenn Ionen elektrogen transportiert werden und dadurch die epitheliale Potentialdifferenz wird eine Änderung erfährt, für deren Aufrechterhaltung ein entsprechender Kurzschlussstrom (Isc) zugeführt. Demzufolge entspricht der aufgezeichnete Isc genau der Summe aller elektrogen transportierten Ionen durch das Gewebe. Die Folge ist, dass kein elektrischer Gradient über dem Gewebe besteht. Durch die Applikation gleicher Puffersubstanzen auf beiden Seiten des epithelialen Gewebes wird ebenso ein chemischer Gradient ausgeschlossen. Aufgrund dieser Tatsache können bei diesem Messprinzip im Laufe der Experimente gemessene Netto-Ionentransportraten einem aktiven Transportmechanismus zugeordnet werden.

Die Gewebeleitfähigkeit (G_t) wird wie im "Open-Circuit"-Modus im Abstand von 6 Sekunden bestimmt.

3.5 Versuchsablauf

Alle durchgeführten Experimente wurden folgendermaßen durchgeführt:

- Vor dem Einspannen des Gewebes wurden das Elektrodeneigenpotential sowie der Flüssigkeitswiderstand der verwendeten Pufferlösung gemessen. Die Werte wurden gespeichert und dienten der Korrektur der im nachfolgenden Versuch gemessenen elektrophysiologischen Parameter.
- Nach dem Einbau der epithelialen Gewebe in die Kammern wurde zunächst eine 20minütige Äquilibrierungsperiode im "Open-Circuit"-Modus durchgeführt. Diese Zeit dient der Anpassung des Gewebes an die Versuchsbedingungen und der "Erholung" (Präparation, Transport, Einspannen in die Apparatur).
- Nachdem die elektrophysiologischen Werte sich "steady state" Bedingungen näherten, wurde auf den "Short-Circuit"-Modus gewechselt.
- Nach weiteren 10 Minuten wurden die epithelialen Gewebe, welche maximal zu 25% abweichende G_t-Werte besaßen, zu "Epithelien" "gepaart", um später die Ionenfluxraten sowohl von mukosaler zu serosaler Seite (J_{ms}) als auch in umgekehrter Richtung (J_{sm}) bestimmen zu können. Hierbei wurden nur die Gewebe genommen, deren G_t -Werte nicht größer als 6 mS/cm² waren. Es waren 12 Paarungen pro Tier bzw. Versuchstag möglich.

- Die Inkubationslösungen dieser Äquilibrierungsperiode besaßen immer einen pH-Wert von 7,4. Falls für den Versuch ein pH von 6,4 vorherrschen sollte, folgte an dieser Stelle ein Pufferwechsel.
- Es folgte die f
 ür die Bestimmung der Na⁺/Acetat-Transportraten notwendige Applikation von 70 kBq des radioaktiven Isotopes ²²Na bzw. 23 kBq von ¹⁴C-Acetat auf die jeweils markierte "Heiße Seite": Zur Messung von J_{ms} auf der mukosalen Seite, zur Messung von J_{sm} auf der serosalen Seite.
- Nach ca. 15 Minuten wurde eine Probe (100µl) von der "Heißen Seite" entnommen (H1). Gleiches wurde am Ende des Versuches wiederholt (H2). Aus dem Mittelwert beider Proben wurde nach dem Versuch die spezifische Aktivität errechnet (siehe Kapitel 1.6).
- 40 Minuten nach Applikation des radioaktiven Isotopes wurde die erste Probe (1ml) von der gegenüber liegenden "kalten Seite" für die Berechnung der Na⁺/Acetat-Transportraten entnommen. Das entnommene Volumen wurde durch den entsprechenden Puffer ersetzt. Alle weiteren kalten Proben wurden in einem Zeitintervall von 30 min entnommen. Je nach Versuchsdesign wurden 3 9 Fluxperioden gemessen.
- Alle entnommenen Proben wurden mit Szintillatorflüssigkeit (Zinsser Analytic Quicksafe A) auf 4 ml aufgefüllt und anschließend wurde im β-Counter (Perkin Elmer Wallac GmbH, Freiburg) die enthaltene Radioaktivität bestimmt.

3.6 Bestimmung der Transportraten für Natrium und Acetat

Die spezifische Radioaktivität wurde in jedem Experiment aus den Mittelwerten der heißen Proben (H1 und H2) bestimmt:

Spezifisch e Radioakti vität = $\frac{cpm_{\text{H}}}{V_{\text{H}} \times c}$

cpm_H=Counts pro Minute (Mittelwert von H1 und H2)V_H=Volumen der heißen Probe (ml)c=Konzentration des gemessenen nicht-radioaktiven Isotopes im Puffer (mmol/l)

Die unidirektionalen Fluxraten pro Stunde und pro cm² werden anhand der entnommenen Proben ("kalte Seite") unter Zuhilfenahme folgender Formel errechnet:

$$J = \frac{cpm_2 \cdot \frac{V_s}{V_p} - (cpm_1 \cdot \frac{V_s - V_p}{V_p})}{\frac{cpm_H}{V_H \cdot c} \cdot t \cdot A}$$

cpm _{1/2}	=	Counts pro Minute der zum Zeitpunkt t1 oder t2 entnommenen Probe der kalten Seite
cpm _H	=	Counts pro Minute (Mittelwert von H1 und H2)
V _s	=	Säulenvolumen
VP	=	Probenvolumen
V _H	=	Probenvolumen der "Heißen Seite"
t	=	Zeitintervall
А	=	Fläche des in der Kammer frei liegenden Epithels (3,14cm ²)

Aus den errechneten unidirektionalen Transportraten kann der Nettoflux für Natrium bzw. Acetat folgendermaßen bestimmt werden:

$$J_{net} = J_{ms} J_{sm} \quad (\mu eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1})$$

3.7 Pufferlösungen

Die Pufferlösungen wurden 1-2 Tage vor dem Versuchstag hergestellt. Alle Chemikalien waren von analytischem Grad. Die verschiedenen Rezepturen für die einzelnen Versuchsansätze sind im Anhang dargestellt. Alle Puffer besaßen eine Osmolarität von 300 \pm 10 mosmol/l. Der pH-Wert wurde mithilfe von TRIS oder HCl (1mol/l) auf Werte von 7,4 \pm 0,1 oder 6,4 \pm 0,1 eingestellt. Alle Puffer, die kein HCO₃⁻ enthielten, wurden mit reinem O₂, Pufferlösungen mit HCO₃⁻ wurden mit einer Mischung aus 95% O₂ und 5% CO₂ begast.

3.8 Pharmaka

Alle verwendeten Pharmaka wurden in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Der Wirkungseintritt der Pharmaka nach der Zugabe erfolgt in kürzerer Zeit als 30 min. Dementsprechend wurde immer erst 30 min nach der Applikation eines Pharmakons (neues "steady state") eine neue Fluxperiode bestimmt.

3.8.1 Amilorid

Amilorid, ein Pyrazin-Derivat, war das erste Pharmakon, für welches eine Hemmung des Na⁺/H⁺-Austauschers (NHE) nachgewiesen wurde (Benos, 1982). Es übt seine reversible inhibitorische Wirkung auf der externen (oder luminalen) Seite des Na⁺/H⁺-Austauschers aus (Warnock *et al.*, 1988). In allen Versuchen, in denen Amilorid angewendet wurde, wurde der

Hemmstoff in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Diese Dosierung führt sowohl zu einer Hemmung der Isoform NHE 1 als auch der Isoform NHE 3 (Schwark *et al.*, 1998).

Strukturformel:



Amilorid liegt bei den üblichen physiologischen pH Werte in der protonierten Form vor (pK = 8,7).

3.8.2 HOE 642

HOE 642 ist ein Cariporid, welches für eine spezifische Hemmung der NHE1-Isoform bekannt ist (Dhein *et al.*, 1998). Hierfür ist eine sehr geringe Dosierung ausreichend, die halbmaximale inhibitorische Wirkung (IC50) liegt speziesabhängig zwischen 0,03 und 0,34 μ M (Masereel *et al.*, 2003). In den Versuchen in Kapitel 4.2.3 wurde der Hemmstoff in einer Dosierung von 30 μ M eingesetzt.

Strukturformel:



3.8.3 S3226

S3226 {3-[2-(3-guanidino-2-methyl-3-oxo-propenyl)-5-methyl-phenyl]-N-isopropylidene-2methyl-acrylamide dihydrochloride} ist ein spezifischer Blocker der NHE3-Isoform. Die wirkungsvolle Dosis ist jedoch sehr speziesspezifisch (Schwark *et al.*, 1998). Deshalb wurden im Vorfeld Dosis-Wirkungs-Versuche gemacht (Kapitel 4.2.3), bei denen eine totale Hemmung des elektroneutralen Na⁺-Transportes am Blättermagenepithel des Schafes ab einer Dosis von 1 μ M festgestellt wurden. Diese Dosierung wurde dann in weiteren Versuchen angewendet.

Strukturformel:



3.8.4 Hydrochlorothiazid

Hydrochlorothiazid hemmt den NaCl-Cotransporter (Mertz und Schettler, 1959; Stokes, 1988). Dieser Hemmstoff wurde in den Versuchen (Kapitel 4.2.2) in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt.

Strukturformel:



3.8.5 Wortmannin

Wortmannin, ein Pilz-Metabolit, ist ein potenter und selektiver Inhibitor der Phosphatidylinositol 3 – Kinase (PI3-Kinase) (Powis *et al.*, 1994). Die PI3-Kinase ist unter anderem ein wichtiger Faktor für das mögliche Einbauen von NHE3-Vesikeln in die luminale Membran epithelialen Gewebes (Zachos *et al.*, 2005), eine mögliche Variante der Steigerung der Transportkapazität des NHE3. Wortmannin wurde in den Versuchen in Kapitel 4.3 in einer wirksamen Konzentration von 100 nmol angewendet (Charney *et al.*, 2002).

Strukturformel:



3.9 Statistik

3.9.1 Ermittlung der Ionen-Transportraten

Die gemessenen Ionen-Transportraten während der einzelnen Fluxperioden einer jeden Kammer (während einer Behandlungsmethode) wurden zu einem arithmetischen Mittelwert zusammengefasst $(\bar{x}_{\kappa i})$, z. Bsp. für J_{ms} (siehe Abbildung 7). Zu einem "Epithel" gehören immer zwei Kammern (J_{ms} und J_{sm}). Die Mittelwerte der Kammern $(\bar{x}_{\kappa i})$ der Epithelien aus einer Behandlungsgruppe wurden wiederum zu einem Mittelwert der Behandlungsgruppe (\bar{x}_{BGi}) zusammengefasst und dazu dessen Standardabweichung angegeben $(\bar{x} \pm s)$.



Abbildung 7: Schematische Darstellung der Ermittlung der Ionen-Transportraten (Erläuterungen siehe Text)

Für jede Behandlungsgruppe wurde die Anzahl der untersuchten Tiere mit ,N' angegeben und die Anzahl der insgesamt einbezogenen Epithelien mit ,n'. Wenn in grafischen Darstellungen ,n' mit einem Bereich angegeben wird (z. Bsp. n = 6 - 9), bedeutet das, dass entsprechend viele Epithelien in den Behandlungsgruppen innerhalb eines Versuches eingeflossen sind.

3.9.2 Elektrophysiologische Parameter

Die elektrophysiologischen Parametern I_{sc} und G_t wurden während eines Versuches alle 6 Sekunden ermittelt. Die Mittelwerte einer jeden Fluxperiode wurden mit der zugehörigen Standardabweichung einbezogen. Die Daten der einzelnen Fluxperioden einer jeden Kammer wurden gemittelt (\bar{x}_{Ki}) (siehe Abbildung 8). Die Mittelwerte zweier Kammern, welche ein Epithel bilden, wurden wiederum zu einem Mittelwert des jeweiligen Epithels zusammengefasst (\bar{x}_{Ei}) . Die Mittelwerte der Epithelien einer Behandlungsgruppe wurden dann zu einem Mittelwert der Behandlungsgruppe (\bar{x}_{BGi}) zusammengefasst. Bei der Berechnung wurde stets die anfangs einbezogene Standardabweichung unter Berücksichtigung der Fehlerfortpflanzung berechnet und angegeben $(\bar{x} \pm s)$.



Abbildung 8: Schematische Darstellung der Ermittlung der Werte der elektrophysiologischen Parameter

3.9.3 Signifikanzen

Die Untersuchung auf signifikante Unterschiede zwischen zwei unterschiedlichen Behandlungsgruppen wurde bei gleicher Standardabweichung mithilfe des T-Tests nach Student oder bei ungleichen Standardabweichungen mit dem T-Test nach Welch durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde einheitlich auf $\alpha = 0,05$ festgelegt (* für p < 0,05).

4 Ergebnisse

4.1 Kinetik des elektroneutralen Na⁺-Transportes

4.1.1 Einleitung

Um den Na⁺-Transport am Blättermagenepithel des Schafes im Hinblick auf den wichtigen Zusammenhang mit dem HCO₃⁻-Transport weitergehend charakterisieren zu können, wurden im folgenden Versuchsansatz die kinetischen Eigenschaften des elektroneutralen Na⁺-Transportes untersucht. Ziel der Untersuchung war es unter anderem herauszufinden, ab welchen (unteren) Na⁺-Konzentrationen ein Na⁺-Transport erfolgt und ab welchen Konzentrationen er gegebenenfalls gesättigt ist. Bei Vorliegen einer Michaelis-Menten-Kinetik können kinetische Daten (Km und Vmax) berechnet werden. In dem Versuchsansatz wurden auf der mukosalen und serosalen Seite gleiche Puffer verwendet, sodass im shortcircuit Modus der gemessene Na⁺-Transport auf einen aktiven Transportprozess zurückgeführt werden kann (genaueres siehe Kapitel 3.4.2). Es wurden vier Inkubationslösungen mit unterschiedlicher Konzentration an Na⁺ (12, 25, 55 und 125 mM Na⁺) verwendet (genaue Pufferzusammensetzung siehe Anhang, Tafel 1). Als Na⁺-Ersatz diente NMDG (N-Methyl-D-Glucamin). Ein Versuchsansatz wurde bei einem pH-Wert von 7,4 auf mukosaler Seite durchgeführt, ein weiterer bei einem pH-Wert von 6,4. Der pH-Wert auf der serosalen Seite betrug immer 7,4. Pro Tier bzw. pro Versuchstag wurden 4 Gruppen à 3 Epithelien gebildet. In jeder Gruppe wurde jeweils eine der oben angegeben Na⁺-Konzentrationen eingesetzt.

Um die beiden nachgewiesenen elektroneutralen Na⁺-Transporter in der apikalen Membran des Blättermagens, den NHE und den Na⁺-Cl⁻-Cotransporter, differenzieren zu können, wurde zusätzlich in den Versuchen nach drei Fluxperioden Amilorid, ein NHE-Blocker, appliziert. Anschließend wurden drei weitere Fluxperioden bestimmt.

Im Anhang befinden sich Tabellen zu den folgenden Abbildungen 9 bis 12 (Tabelle 1 bis 4 im Anhang) mit den genauen Werten und ermittelten Signifikanzen.

4.1.2 Sättigungskinetik bei pH 7,4

Mit zunehmender Na⁺-Konzentration in den verschiedenen Inkubationslösungen erhöhten sich die Na⁺-Fluxraten (J_{net} , J_{ms} , J_{sm}) (siehe Abbildung 9). Die Werte beschrieben eine Sättigungskurve gemäß einer Michaelis-Menten-Kinetik. Der Beginn einer Sättigung des Na⁺-Transportes war ab ca. 40 mM Na⁺ zu erkennen. Ein vom Kurzschlussstrom (I_{sc}) signifikant

verschiedener Netto-Na⁺-Transport (J_{net}) konnte ab einer Konzentration von 25 mM Na⁺ verzeichnet werden [p = 0,027]. Ab dieser Konzentration stieg der Netto-Transport nicht mehr signifikant an. Der Na⁺-Transport von mukosaler zu serosaler Seite (J_{ms}) war bereits ab 12 mM Na⁺ signifikant größer als der I_{sc} [p = 0,032], und stieg bis 25 mM Na⁺ signifikant an [p = 0,022]. Der I_{sc} erfuhr mit steigender Konzentration einen leichten, aber nicht signifikanten Anstieg. Die Leitfähigkeit (G_t) zeigte keinerlei Abhängigkeit von der Na⁺-Konzentration in der Inkubationslösung.



Abbildung 9: Na⁺-Transportraten (J_{net} , J_{ms} , J_{sm}) und Kurzschlussstrom (I_{sc}) bei pH 7,4 (Jeder Punkt entspricht: N = 3; n = 6 - 9; $\overline{x} \pm SEM$)

Nach der Applikation von 1 mM Amilorid auf der mukosalen Seite sank der gemessene Na⁺-Transport deutlich. J_{net} Na⁺ war sowohl bei einer Na⁺-Konzentration von 12 mM [p = 0,006] als auch bei 25 mM [p = 0,020] signifikant kleiner als der I_{sc} (siehe Abbildung 10). Bei 125 mM Na⁺ waren auch nach der Zugabe von Amilorid sowohl J_{ms} [p = 0,025] als auch J_{net} Na⁺ [p = 0,044] signifikant größer als der I_{sc}. Der elektroneutrale Na⁺-Transport, errechnet aus J_{net} – I_{sc}, betrug bei 125 mM Na⁺ 1,09 μ eq · cm⁻² · h⁻¹. Hierbei dürfte es sich um den NaCl-Cotransport handeln, der durch Amilorid nicht direkt gehemmt wird.



Abbildung 10: Na+-Transport bei pH 7,4 nach der Applikation von 1 mM Amilorid auf der mukosalen Seite (N = 3; n = 6-9; $\overline{x} \pm SEM$)

4.1.3 Sättigungskinetik bei pH 6,4

Die gemessenen Na⁺-Transportraten (J_{ms} [p = 0,022], J_{sm} [p = 0,050] und J_{net} [p = 0,026]) waren bei pH 6,4 ab 55 mM Na⁺ signifikant größer als bei pH 7,4 (siehe Abbildung 11). Die Werte beschrieben eine Sättigungskurve gemäß einer Michaelis-Menten-Kinetik. Der Beginn einer Sättigung des Na⁺-Transportes war ab ca. 40 mM Na⁺ zu erkennen. Entsprechend den Ergebnissen bei pH 7,4 war J_{net} Na⁺ bis zu 12 mM Na⁺ nicht signifikant größer als der I_{sc} [p = 0,103]. Der Netto-Na⁺-Transport stieg bis 55 mM Na⁺ signifikant an [p < 0,05] und lief dann in eine Sättigung hinein. J_{ms} stieg bis 125 mM Na⁺ signifikant an [p < 0,05].



Abbildung 11: Na⁺-Transport bei pH 6,4 (N = 3; n = 6-8; $\overline{x} \pm SEM$)

Nach der Applikation von 1 mM Amilorid auf der mukosalen Seite sank der gemessene Na⁺-Transport deutlich ab (siehe Abbildung 12). J_{net} Na⁺ war im Gegensatz zum Versuchsansatz bei pH 7,4 mit Amilorid bei einer Na⁺-Konzentration von 12 mM [p = 0,096] und 25 mM [p = 0,165] nicht signifikant kleiner als der I_{sc}. Bei 125 mM Na⁺ war J_{net} Na⁺ mit einer Differenz von 0,83 μ eq · cm⁻² · h⁻¹ gegenüber dem I_{sc} zu verzeichnen, ähnlich dem Versuchsansatz bei pH 7,4 nach Amilorid. Die Na⁺-Transportraten waren nach der Zugabe von Amilorid bei pH 7,4 und pH 6,4 vergleichbar groß.



Abbildung 12: Na⁺-Transport bei pH 6,4 nach der Applikation von 1 mM Amilorid auf der mukosalen Seite (N = 3; n = 6 - 8; $\overline{x} \pm SEM$)

4.1.4 Kinetische Berechnungen

Aus den zuvor genannten Ergebnissen wurden im Folgenden unter Zuhilfenahme des Grafikprogramms SigmaPlot 8.0 genaue kinetische Daten für den elektroneutralen Na⁺- Transport errechnet. Der elektroneutrale Na⁺-Transport kann durch Subtraktion des Kurzschlussstromes (I_{sc}) vom Nettotransport (J_{net}) errechnet werden. In Abbildung 13 ist der elektroneutrale Na⁺-Transport bei pH 7,4 und pH 6,4 dargestellt. Hierfür wurde von jedem einzelnen Epithel der elektroneutrale Transport berechnet und der entsprechende Wert in die Grafik eingezeichnet. Anschließend wurde durch eine Datenanalyse in Sigma Plot 8.0 eine Kurve gemäß einer Hyperbel berechnet und eingefügt.



Abbildung 13:Elektroneutraler Na⁺-Transport $(J_{net} - I_{sc})$ bei pH 7,4 und 6,4.Die Kurven sind mathematisch generiert in SigmaPlot 8.0.Jeder Punkt entspricht einem Epithel (N = 3; n = 6-9)

Aus diesen mathematisch generierten Kurven aus Abbildung 13 ließen sich mithilfe eines Linearisierungs-Verfahrens (in diesem Fall nach Hanes-Woolf) die kinetischen Daten für die Affinität (K_m) und die maximale Geschwindigkeit (V_{max}) errechnen (siehe Abbildung 13 und 14 und Tab. 5). Der elektroneutrale Na⁺-Transport bei pH 6,4 war durch einen deutlich höheren V_{max} -Wert gegenüber pH 7,4 gekennzeichnet, was einer höheren Transportkapazität entspricht. Der Km-Wert war bei pH 6,4 niedriger als bei pH 7,4, was definitionsgemäß auf eine niedrigere Affinität der jeweiligen Transporter hinweist.



Abbildung 14: Hanes-Woolf-Linearisierung des elektroneutralen Na⁺-Transportes bei pH 6,4 und pH 7,4

Tab. 5Kinetische Daten zum eletroneutralen Na⁺-Transport

	$V_{max} [cm \cdot h^{-1}]$	$K_m [\mu mol ml^{-1}]$	r ²
pH 7,4	1,97	58,26	0,99
рН 6,4	5,56	75,22	0,99

4.2 Differenzierung des elektroneutralen Na⁺-Transportes

4.2.1 Einleitung

In den Versuchen des folgenden Kapitels sollte die Zusammensetzung des elektroneutralen Na⁺-Transportes näher untersucht werden. Aufgrund der Vorarbeiten an unserem Institut (siehe Literaturteil) kommen folgende Transportvarianten für den elektroneutralen Transport von Na⁺ auf der apikalen Seite des Blättermagenepithels in Betracht: der NaCl-Cotransporter und der Na⁺-H⁺-Austauscher (NHE). In anderen epithelialen Geweben wurden bisher 9

verschiedene Isoformen des NHE gefunden, von denen der NHE1, NHE2 und NHE3 als mögliche Transporter im Blättermagenepithel in Betracht gezogen werden müssen.

Spezifische Hemmstoffe für einzelne NHE-Isoformen und die Kombination von Hemmstoffen sollten nachfolgend Aufschluss geben über das Vorkommen und die Bedeutung einzelner Transporter, vor allem derer in der apikalen Membran des Blättermagenepithels. Darüber hinaus sollten diese Hemmstoffe gegebenenfalls Aufschluss geben über die Herkunft des in Kapitel 4.1 beschriebenen restlichen elektroneutralen Na⁺-Transportes bei 125 mM Na⁺ nach der Zugabe von Amilorid, sowohl bei pH 6,4 als auch bei pH 7,4.

Alle Versuche in Kapitel 4.2 wurden mit der gleichen Inkubationslösung durchgeführt. Sie entspricht der in Kapitel 4.1 beschriebenen Lösung mit 125 mM Na⁺ (siehe Anhang, Tafel 1). Sie wurde auf mukosaler und serosaler Seite eingesetzt und besaß einen pH-Wert von 7,4.

4.2.2 Amilorid und Hydrochlorothiazid

Zuerst wurden Amilorid und Hydrochlorothiazid kombiniert, da angenommen wurde, dass der restliche elektroneutrale Na⁺-Transport bei 125 mM Na⁺ nach der Zugabe von Amilorid (siehe Kapitel 4.1) auf den Cotransport von Na⁺ und Cl⁻ zurückzuführen sei. Hydrochlorothiazid (HCTZ) ist ein spezifischer Hemmstoff für den NaCl-Cotransporter.

Der Versuchsansatz stellte sich wie folgt dar: Die 12 Gewebepaare wurden in zwei Gruppen à 6 Epithelien eingeteilt: Die ersten drei Fluxperioden beider Gruppen dienten der Kontrolle, danach wurde in der einen Gruppe 1 mM Amilorid und in der anderen 1 mM Hydrochlorothiazid appliziert. Es wurden drei weitere Fluxperioden bestimmt. Danach folgte die Applikation des jeweils anderen Blockers: in der ersten Gruppe 1 mM Hydrochlorothiazid, in der zweiten Gruppe 1 mM Amilorid. Erneute Bestimmung von drei Fluxperioden.

Die Ergebnisse der ersten Gruppe, in der zuerst Amilorid und dann HCTZ angewandt wurden, sind in Abbildung 15 dargestellt (siehe auch Tab. 5 im Anhang). Der Netto - Na⁺-Transport wurde durch Amilorid um ca. 2 μ eq \cdot cm⁻² \cdot h⁻¹ signifikant reduziert auf 1,65 μ eq \cdot cm⁻² \cdot h⁻¹ [p = 0,013]. Es blieb eine Differenz von ca. 0,5 μ eq \cdot cm⁻² \cdot h⁻¹ zum Strom (Isc), die dem verbliebenen elektroneutralem, amilorid-insensitiven Na⁺-Transport entspricht. Die folgende Applikation von HCTZ brachte keinen weiteren signifikanten Abfall von J_{net} Na⁺ [p = 0,122]. Der leichte Abfall von I_{sc} im gesamten Versuch war zeitlich bedingt: J_{net} Na⁺ mit 1,46±0,48 μ eq \cdot cm⁻² \cdot h⁻¹ und I_{sc} mit 0,77 ± 0,18 μ eq \cdot cm⁻² \cdot h⁻¹ waren nach der Zugabe beider Blocker signifikant verschieden [p = 0,030]. Die Differenz nach der Applikation beider Hemmstoffe, also der elektroneutrale Na⁺-Transport, betrug 0,69 μ eq \cdot cm⁻² \cdot h⁻¹.



Abbildung 15: Effekt von 1mM Amilorid und anschließender Zugabe von 1mM HCTZ bei 125mM Na⁺, bei pH 7,4 (N = 3; n = 8 - 10; \bar{x} ± SEM)

In der zweiten Gruppe erfolgte die Zugabe beider Hemmstoffe in umgekehrter Reihenfolge (Abbildung 16 und Tab. 6 im Anhang): zuerst 1 mM HCTZ, dann 1 mM Amilorid. HCTZ reduzierte J_{net} Na⁺ signifikant um 0,78 μ eq \cdot cm⁻² \cdot h⁻ [p = 0,032]. Die folgende Zugabe von 1mM Amilorid reduzierte J_{net} Na⁺ um weitere 1,70 μ eq \cdot cm⁻² \cdot h⁻ signifikant [p = 0,014]. Der verbleibende Strom (I_{sc}) von 0,72±0,15 μ eq \cdot cm⁻² \cdot h⁻ war signifikant verschieden zu J_{net} Na⁺ [p = 0,029]. Die Differenz von J_{net} und I_{sc} nach der Applikation beider Hemmstoffe betrug 0,74 μ eq \cdot cm⁻² \cdot h⁻ und entspricht wiederum einem elektroneutralen Na⁺-Transport.



Abbildung 16: Effekt von 1mM HCTZ und anschließender Zugabe von 1mM Amilorid bei 125mM Na⁺, bei pH 7,4 (N = 3; n = 12-13; $\overline{x} \pm SEM$)

4.2.3 S 3226 und HOE642

Nach Applikation von Amilorid und HCTZ in Kombination blieb J_{net} Na⁺ signifikant größer als der I_{sc} [p = 0,030] (siehe Kapitel 4.2.2). Die Differenz, welche als elektroneutraler Transport von Na⁺ definiert werden kann, betrug unabhängig der Reihenfolge der Zugabe der Blocker im Mittel 0,72 µeq · cm⁻² · h⁻¹. Es bleibt die Frage offen, durch welchen Transportvorgang dieser elektroneutrale Transport realisiert wurde.

In den Versuchen in Kapitel 4.1 wurde Amilorid verwendet, ein NHE-Blocker, welcher nicht spezifisch für verschiedene NHE-Isoformen ist. Aus diesem Grund wurden nachfolgend spezifischere Hemmstoffe für spezielle Isoformen des NHE eingesetzt.

Alle Versuche in diesem Kapitel wurden wie folgt durchgeführt: Es erfolgte die Einteilung der Epithelien in je eine Kontrollgruppe und eine weitere Gruppe pro Hemmstoff und ggf. verschieden angewandter Dosierungen des Hemmstoffes. Jede Gruppe enthielt mindestens 3 Epithelien (Paare). Nach der Äquilibrierungsperiode wurden die Hemmstoffe in der jeweiligen Dosis appliziert. Im Anschluss wurden drei Fluxperioden gemessen.

Als erstes erfolgte die Anwendung von HOE 642, einem spezifischen NHE1-Isoform-Hemmstoff, auf der mukosalen Seite um ausschließen zu können, dass der restliche Transport durch einen NHE1 erfolgt. HOE zeigte keinerlei Wirkung auf den Na⁺-Transport oder die elektrophysiologischen Parameter (siehe Tab. 6).

Tab. 6	Effekt von 30µM HOE 642 (NHE1-Blocker) auf der mukosalen Seite
	$[x \pm SEM; * (p \le 0.05)]$ signifikant verschieden im Vergleich zur Kontrollgruppe]

	J _{ms} ^{Na}	J _{sm} ^{Na}	J _{net} ^{Na}	I _{sc}	Gt	N . 7 (
		µeq ⁻ cm ⁻² ·h	-1		mS ⁻ cm ⁻²	N/n
Kontrolle	5,30±1,20	2,00±0,48	3,30±0,95	1,17±0,24	2,17±0,49	3/11
HOE 642 (30 µM)	6,03±1,14	2,10±0,54	3,93±1,04	1,43±0,45	2,24±1,08	3/12

Desweiteren erfolgte die Applikation von S3226, einem spezifischen Hemmstoff für die NHE3-Isoform.

Aufgrund der Tatsache, dass die notwendige Dosis speziesspezifisch sehr variiert und in der Literatur keine Angaben zur notwendigen Dosis für die Hemmung der NHE3-Isoform am Blättermagenepithel des Schafes existieren, wurden zuerst 3 verschiedene Dosierungen des Hemmstoffes angewandt: $0,5 \mu$ M, 1μ M und 2μ M (siehe Tab. 7).

S3226 zeigte einen deutlichen Effekt: Der Netto-Na⁺-Transport konnte im Vergleich zur Kontrolle bei einer Dosierung des Hemmstoffes von 1 μ M um 1,45 μ eq · cm⁻² · h⁻¹ signifikant reduziert werden [p = 0,029]. Der Netto-Na⁺-Transport war nach der Zugabe von 1 μ M bzw. 2 μ M S3226 nicht mehr signifikant verschieden zum I_{sc} [p = 0,408]. Hieraus folgt, dass der elektroneutrale Na⁺-Transport (J_{net} Na⁺ - I_{sc}) einer vollständigen Hemmung unterlag (Abbildung 17).

Tab. 7	Effekt von 0,5 , 1,0 und 2,0 µM S3226 (NHE3-Blocker) auf der mukosalen
	Seite auf den Na ⁺ -Transport des Psalterepithels [x \pm SEM; * (p \leq 0,05)
	signifikant verschieden im Vergleich zur Kontrolle; # ($p \le 0.05$) signifikant verschieden beim
	Vergleich von J _{net} und I _{sc} in einer Behandlungsgruppe]

	J _{ms} ^{Na}	a J _{sm} ^{Na}	J _{net} ^{Na}	I _{sc}	Gt	
		mS ⁻ cm ⁻²	m ⁻² N/n			
Kontrolle pH 7.4	$4,58 \pm 0,82$	1,98±0,42	2,61±0,83 [#]	1,06±0,22	2,33±0,60	3/8
S3226 0,5 μM	3,45 ±0,91*	1,28±0,41*	2,17±0,92 [#]	1,16±0,35	1,91±1,10	3/8
S3226 1 µM	2,15 ±0,61*	0,99±0,17*	1,16±0,71*	1,08±0,18	1,79±0,64	3/7
S3226 2 µM	2,06±0,45*	0,81±0,12*	1,25±0,44*	1,01±0,22	1,61±0,60*	3/8



Um einen NHE3 auf der serosalen Seite ausschließen zu können, wurde S3226 in der wirksamen Konzentration von 1 μ M auf der serosalen Seite angewandt. 1 μ M S3226 hatte auf der serosalen Seite keinen Effekt auf den Na⁺-Transport (siehe Tab. 8).

Tab. 8	Effekt von 1 µM S3226 auf der serosalen Seite auf den Na ⁺ - Transport [x
	\pm SEM; * (p \leq 0,05) signifikant verschieden im Vergleich zur Kontrollgruppe]

	J_{ms}^{Na}	J _{sm} ^{Na}	J _{net} ^{Na}	I _{sc}	Gt	
		µeq ⁻ cı	$m^{-2}h^{-1}$		mS ⁻ cm ⁻²	N/n
Kontrolle	5,94±1,45	2,07±0,41	3,87±1,26	1,30±0,49	2,39±1,14	3/11
S3226 1 µM	5,24±1,33	1,84±0,25	3,40±1,23	1,23±0,30	2,31±0,68	3/11

4.2.4 Amilorid und S 3226

Aus den Ergebnissen in Kapitel 4.2.2 ist ersichtlich, dass die Kombination von Amilorid und HCTZ nicht die erwünschte Reduktion des restlichen Netto-Na⁺-Transport nach Amilorid (aus Kapitel 4.1) bewirken konnte. Der spezifische Hemmstoff der NHE3-Isoform, S3226, konnte hingegen unter den gleichen Bedingungen den Netto-Na⁺-Transport soweit reduzieren, dass keinerlei signifikanter Unterschied zum Strom (I_{sc}) bestehen blieb. Aufgrund dieses Effektes lässt sich vermuten, dass Amilorid nicht spezifisch genug war, um den ganzen Na⁺-Transport, welcher durch den NHE auf der mukosalen Seite realisiert wurde, zu blocken. Diese Annahme sollte durch einen eventuellen additiven Effekt mittels der Kombination von 1 mM Amilorid und 1 μ M S3226 bestätigt werden.

Die Gewebe wurden hierzu in 2 Gruppen à 4 Epithelien eingeteilt. Eine Gruppe diente der Kontrolle während des gesamten Versuches. In der anderen Gruppe wurde zunächst nach der Äquilibrierungsperiode 1mM Amilorid zugegeben. Es folgte die Bestimmung von 2 Fluxperioden, anschließend die Applikation von 1 μ M S3226 und die erneute Bestimmung von drei Fluxperioden. Die Kontrollgruppe I entspricht dem zeitlichen Abschnitt der ersten drei Fluxperioden bis zur Applikation von S3226, die Kontrollgruppe II den letzten drei Fluxperioden.

Es zeigte sich, dass der nach der Amilorid-Applikation übrig bleibende Rest des Netto-Na⁺-Transportes durch S3226 eliminiert werden konnte, sodass der J_{net} Na⁺ nicht mehr signifikant verschieden zum I_{sc} war [p = 0,155] (siehe Tab. 9).

Tab. 9 Effekt von 1 mM Amilorid und 1 µM S3226 auf der mukosalen Seite

 $[x \pm \text{SEM}; * (p \le 0.05) \text{ signifikant verschieden beim Vergleich von Amilorid und Amilorid + S3226}]$

	J _{ms} ^{Na}	J _{sm} ^{Na}	J _{net} ^{Na}	I _{sc}	Gt	
Treatment		mS ⁻ cm ⁻²	N/n			
Kontrolle1 (P0-P2)	5,55±1,15	1,83±0,48	3,72±1,05	1,32±0,12	1,89±0,44	3/11
Kontrolle2 (P3-P6)	5,25±1,29	1,94±0,53	3,31±0,99	1,09±0,25	2,19±0,49	3/11
		1				
Amilorid (P0-P2)	3,32 ±0,70	1,18±0,36	2,05±0,42	1,16±0,15	2,24±0,97	3/11
Amilorid + S3226 (P3-P6)	2,26±0,73*	1,51±0,30	0,76±0,37*	0,88±0,27*	3,81±1,48*	3/10

S3226 zeigte zudem deutliche Effekte auf die elektrophysiologischen Parameter I_{sc} und G_t . Der I_{sc} wurde mit zunehmender Hemmstoffkonzentration vermindert, allerdings ist ein zeitlicher Abfall des I_{sc} mit enthalten (siehe Vergleich zur Kontrollgruppe in Tab. 9). Die Leitfähigkeit (G_t) stieg nach der Zugabe von Amilorid geringfügig an, stabilisierte sich aber auf einem höheren Niveau (siehe Abbildung 18). Nach Applikation von S3226 stieg der G_t -Wert deutlich an und hielt diese Tendenz bis zum Ende des Versuches (siehe Abbildung 19).



Abbildung 18:Gt-Werte nach Applikation von 1 mM Amilorid im Vergleich
zur Kontrollgruppe 1 im zeitlichen Verlauf ("0" entspricht
dem Moment der Applikation von Amilorid)



Abbildung 19:Gt-Werte nach Applikation von 1 μM S3226 in der zuvor mit
Amilorid behandelten Gruppe im Vergleich zur
Kontrollgruppe 2 im zeitlichen Verlauf (,,0" entspricht dem
Moment der Applikation von 1 μM S3226)

4.3 "Trafficking"

4.3.1 Einleitung

Aus den Ergebnissen in Kapitel 4.1 ist ersichtlich, dass der Na⁺-Transport bei einem pH-Wert von 6,4 vor allem von der mukosalen zur serosalen Seite deutlich größer war, als bei einem pH-Wert von 7,4.

Die Zunahme des Na⁺-Transportes infolge pH-Absenkung scheint durch eine höhere Transportrate eines NHE begründet, da nach der Zugabe von Amilorid sowohl bei pH 7,4 als auch bei pH 6,4 gleich große Transportraten zu verzeichnen waren.

Die Ergebnisse aus Kapitel 4.2 sprechen dafür, dass es sich hierbei um die Isoform NHE3 handeln könnte.

Aus den Daten in Kapitel 4.1.4 ist ersichtlich, dass es sich allen voran um eine Erhöhung der Transportkapazität handelte und nicht um eine Zunahme der Affinität der Transporter. Die Frage ist, *wie* die Transportkapazität des NHE3 erhöht wurde? Folgende Möglichkeiten kommen hierfür bei der akuten Regulation des NHE 3 in Betracht:

a) Einbau von bereits vorhandenen NHE-Transportern durch Trafficking (Vesikeleinbau)

b) Aktivierung bereits vorhandener ruhender NHE3-Transporter.

In nahezu allen anderen Zellen und Geweben, in denen die NHE3-Isoform studiert wurde, wie z. Bsp. GIT und Niere, ist die Stimulierung und Hemmung des NHE3 zumindest immer partiell abhängig vom Trafficking. Dieses wird i.d.R. über die Aktivierung einer PI-3-Kinase realisiert. In allen Geweben (mit Ausnahme des Ileum-Epithels beim Kaninchen), welche auf Trafficking untersucht wurden, konnte durch den Einsatz von Wortmannin, eines PI-3-Kinase-Hemmstoffes, die basale NaCl-Absorption reduziert werden (Donowitz und Li, 2007).

Um der Annahme des Trafficking am Blättermagenepithel des Schafes auf den Grund zu gehen, ist im folgenden Versuchsansatz der Effekt von Wortmannin untersucht worden. Zur Stimulierung des NHE-Transportes wurde eine Absenkung des luminalen pH-Wertes durchgeführt.

Der Versuchsablauf stellte sich wie folgt dar: Die 12 Epithelien wurden 4 Gruppen à 3 Epithelien zugeordnet: Kontrollgruppe bei pH 7,4 und Kontrollgruppe bei pH 6,4, sowie Anwendung von Wortmannin bei pH 7,4 und pH 6,4. Die Inkubationslösung ist der Tafel 2 im Anhang zu entnehmen. Wortmannin wurde vor der Absenkung des pH-Wertes auf 6,4 appliziert, sodass eine Stimulierung des Na⁺/H⁺-Austausches ggf. hätte verhindert werden können.

4.3.2 Wortmannin

Wortmannin zeigte weder bei pH 7,4 noch bei pH 6,4 einen Effekt (siehe Tab. 10). Weder bei den Na⁺-Transportraten noch in der Elektrophysiologie (siehe Abbildung 20 und 21) ist eine Veränderung erkennbar gewesen.

Tab. 10Effekt von 1 nmol Wortmannin (mukosal) auf den Na⁺-Transport bei pH7,4 und pH 6,4 $[x \pm SEM; *(p \le 0.05) \text{ im Vergleich zur Kontrollgruppe bei gleichem pH}]$

	J _{ms} ^{Na}	J _{sm} ^{Na}	J_{net}^{Na}	I _{sc}	Gt				
		μeq	rcm ⁻² ·h ⁻¹		mS ⁻ cm ⁻²	N/n			
Kontrolle pH 7.4	4,17 ± 1,05	1,64±0,57	2,53 ± 1,03	1,16±0,17	2,18 ± 0,22	4/12			
Wortmannin pH 7.4	$4,00 \pm 1,77$	1,77 ±0,42	$2,23 \pm 1,13$	0,96 ± 0,20*	$2,09 \pm 0,22$	4/12			
Kontrolle pH 6.4	10,19±3,88	3,61 ±1,23	6,59 ± 3,08	$1,27 \pm 0,14$	$1,85 \pm 0,24$	4/12			
Wortmannin pH 6.4	10,07±3,52	3,84 ±1,30	$6,24 \pm 2,63$	1,07 ± 0,16*	$1,90 \pm 0,30$	4/12			



Abbildung 20:Effekt von 1 nmol Wortmannin auf den Kurzschlussstrom
(Isc). 0 = Zugabe von Wortmannin



Abbildung 21:Effekt von 1 nmol Wortmannin auf die Leitfähigkeit (Gt). 0 =Zugabe von Wortmannin

4.4 Korrelation von J_{ms} und J_{sm} Na⁺

4.4.1 Einleitung

Im Literaturteil wurde ausführlich das auf zahlreichen Untersuchungsergebnissen basierende hypothetische Model für den Na⁺-Transport am Blättermagenepithel des Schafes erläutert (siehe Kapitel 2.5). Es wird unter anderem ein Na⁺/Na⁺-Austausch auf mukosaler und serosaler Seite postuliert, welcher auf der mukosalen Seite durch einen Na⁺/H⁺-Austausch ergänzt wird. Ob es sich beim Na⁺/Na⁺- und Na⁺/H⁺-Austausch auf mukosaler Seite um unterschiedliche Transporter oder um ein und dieselbe Transporteinheit handelt, die beide Funktionen entsprechend den Ausgangsbedingungen erfüllen kann, ist bisher offen. Um eine Abhängigkeit bzw. ein "Umschalten" oder abhängiges "An/Ausschalten" dieser beiden Transportarten auf der mukosalen Seite zu beweisen, wurde folgender Versuchsansatz gewählt: Ziel der Untersuchung war es, durch steigende mukosale Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) und somit erhöhten Influx von undissoziierten SCFA (HSCFA) bei einem mukosalen pH-Wert von 6,4 einen niedrigen intrazellulären pH-Wert zu erzeugen, sodass die Aktivität des Na⁺/H⁺-Austausches erhöht wird. Bisher wurden bei Na⁺-

Transportmessungen nur SCFA-Konzentrationen bis zu 40 mM angewandt, wobei die Stimulierung des J_{ms} Na⁺ immer mit einer Erhöhung von J_{sm} Na⁺ mit einem sehr konstanten Quotienten von etwa 2 (Anstieg J_{ms} /Anstieg J_{sm}) einherging (siehe Abbildung 26). Hypothese des vorliegenden Versuchsansatzes war daher, dass bei einem erhöhten Influx von HSCFA die Belastung des Epithels mit H⁺ zunimmt und die notwendige Kompensation zur Regulation des pH_i zumindest teilweise durch Aktivierung des NHE3 in der apikalen Membran und durch "Umschaltung" des Na⁺/Na⁺- Austauschers in einen Na⁺/H⁺ Austauscher erfolgt. Wenn es sich in diesem Sinne um einen Wechsel von Na⁺/Na⁺- zu einem Na⁺/H⁺-Austausch handelt, müsste ab einer bestimmten Konzentration eine Entkopplung von J_{ms} und J_{sm} Na⁺ stattfinden, da dann nach der aufgestellten Hypothese der Na⁺/Na⁺-Austausch auf der mukosalen Seite durch einen Na⁺/H⁺-Austausch ersetzt werden müsste.

Es wurden 6 Tiere untersucht. Pro Versuchstag wurden die 12 Epithelien in 3 Gruppen eingeteilt, welche sich jeweils nur in der Acetat-Konzentration der Inkubationslösungen auf der mukosalen Seite unterschieden: 25 mM, 50 mM und 100 mM Acetat bei pH 6,4. Andere kurzkettige Fettsäuren befanden sich nicht in den Inkubationslösungen. Auf der serosalen Seite waren stets 25 mM Acetat enthalten bei einem pH-Wert von 7,4 (siehe Anhang, Tafel 3). Es wurden gleichzeitig Acetat-und Na⁺-Fluxe gemessen. Nach drei Fluxperioden wurde in allen Gruppen auf der mukosalen Seite 1 μ M S3226 appliziert, ein NHE3-Blocker. Die Stimulation des Na⁺-Transportes sollte so genauer charakterisiert werden können bzw. eine eventuelle Entkopplung von J_{ms} und J_{sm} Na⁺ auf einen steigenden Na⁺/H⁺-Austausch auf der mukosalen Seite zurückgeführt werden können. Nach Zugabe des Hemmstoffes wurden drei weitere Fluxperioden gemessen. Die genauen Tabellen zu den Abbildung 22 und 23 können dem Anhang entnommen werden (Tab. 7 bis Tab. 10).

4.4.2 Transport von Acetat bei steigenden Acetatkonzentrationen auf der mukosalen Seite

Acetat diffundiert in der undissoziierten Form durch das Epithel. In der Zelle findet die Dissoziation eines Protons statt und somit eine Absenkung des intrazellulären pH-Wertes. Die Acetatfluxe stiegen erwartungsgemäß mit zunehmender Acetatkonzentration auf der mukosalen Seite linear an (siehe Abbildung 22). Nach der Applikation von 1 μ M S3226 verringerten sich die Transportraten von Acetat in serosaler Richtung (J_{ms}) bei allen angewandten Konzentrationen signifikant [p \leq 0,05]. Der Nettotransport verringerte sich nur bei 100mM Acetat signifikant [p = 0,024].



Abbildung 22: Acetat-Fluxe vor und nach der Applikation von 1 μ M S3226 (N = 6; n = 9-12; $\overline{x} \pm$ SEM)

4.4.3 Transport von Natrium bei steigenden Acetatkonzentrationen auf der mukosalen Seite

Die Na⁺-Transportraten nahmen bis zu einer mukosalen Acetatkonzentration von 50 mM nicht signifikant zu [$p \le 0.05$]. J_{ms} zeigte ab 50 mM Acetat eine starke lineare (signifikante) Zunahme bis hin zu einer Konzentration von 100 mM Acetat [p = 0.032].

Der Na⁺-Transport von serosal nach mukosal hingegen blieb weiterhin konstant (siehe Abbildung 23). Nach der Zugabe von 1 μ M S3226 fielen alle Na⁺-Transportraten signifikant [$p \le 0.05$]. Bei J_{ms} Na⁺ war kein signifikanter Anstieg ab 50 mM Acetat mehr zu verzeichnen [p = 0.07]. Der spezifische Hemmstoff für die NHE3-Isoform konnte also die aufgezeigte Differenz von J_{ms} Na⁺ zwischen 50 und 100 mM Acetat vollständig hemmen.



Abbildung 23: Na⁺-Fluxe vor und nach der Applikation von 1 μ M S3226 (N = 6; n = 8-14; $\overline{x} \pm$ SEM)

4.4.4 Transport von Acetat und Natrium bei steigenden Acetatkonzentrationen auf der serosalen Seite

Um die eben aufgezeigten Ergebnisse zu stützen und zu belegen, dass die Erhöhung von J_{ms} Na⁺ auf die erhöhte Acetatkonzentration auf der mukosalen Seite zurückzuführen ist, wurde der gleiche Versuchsansatz mit steigender Acetatkonzentration (25, 50 und 100 mM) auf serosaler Seite durchgeführt. Auf der mukosalen Seite betrug die Acetatkonzentration 25 mM. Die Acetatfluxe fielen erwartungsgemäß kleiner aus als im vorherigen Versuchsansatz (siehe Abbildung 24). J_{sm} Acetat ist größer als J_{ms} Acetat, was auf dem SCFA-Transport per Diffusion basiert. Dadurch wird der Nettotransport von Acetat negativ bzw. er verläuft in mukosaler Richtung. Aus Abbildung 25 ist zu entnehmen, dass J_{ms} Na⁺ bei 100 mM Acetat auf der serosalen Seite keine Steigerung erfährt und somit im Gegensatz zum Versuchsansatz in Kapitel 4.4.3 keine Entkopplung von J_{sm} Na⁺ erfährt. Die genauen Daten können der Tab. 11 und Tab. 12 im Anhang entnommen werden.



Abbildung 24: Acetat-Fluxe bei steigender Acetatkonzentration auf der serosalen Seite (N = 2; n = 7-8; $\overline{x} \pm SEM$)



Abbildung 25: Na⁺-Fluxe bei steigender Acetatkonzentration auf der serosalen Seite (N = 2; n = 6-7; $\overline{x} \pm SEM$)

4.4.5 Grafische Darstellung der Korrelation von J_{ms} Na⁺ und J_{sm} Na⁺

Die nachfolgenden Grafiken sollen die Abhängigkeit von J_{ms} Na⁺ und J_{sm} Na⁺ deutlich machen. In Abbildung 26 ist die Korrelation zwischen J_{ms} Na⁺ – I_{sc} und J_{sm} Na⁺ infolge aller durchgeführten Behandlungen auf der mukosalen Seite (aus der vorliegenden Studie) dargestellt. Abbildung 27 zeigt die Korrelation zwischen J_{ms} Na⁺ – I_{sc} und J_{sm} Na⁺ der in Kapitel 4.4 des Ergebnisteils ermittelten Daten, infolge Erhöhung der mukosalen Acetatkonzentration. Es ist zu erkennen, dass hier eine "Entkopplung" von J_{ms} Na⁺ und J_{sm} Na⁺ eingetreten ist.



Abbildung 26: Korrelation zwischen J_{ms} Na⁺ und J_{sm} Na⁺ infolge diverser Behandlungen auf der mukosalen Seite (r² = 0.88, die Steigung der Geraden beträgt a = 0,36; jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert verschiedener Epithelien von mindestens 3 Tieren)



Abbildung 27: Korrelation zwischen $J_{ms} Na^+$ und $J_{sm} Na^+$ infolge Steigerung der Acetatkonzentration auf der mukosalen Seite ($r^2 = 0.92$, die Steigung der Geraden beträgt a = 0,15; jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert von mindestens 10 Epithelien von 6 Tieren)

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

- 1. Kinetik des elektroneutralen Na⁺-Transportes
 - a. Der elektroneutrale Na⁺-Transport beschrieb sowohl bei einem pH-Wert von 7,4 als auch bei 6,4 auf mukosaler Seite eine Sättigungskinetik gemäß einer Michaelis-Menten-Kinetik, wobei ab ca. 40 mM Na⁺ eine Sättigung eintrat.
 - b. Die maximale Transportgeschwindigkeit (V_{max}) war bei pH 6,4 mit 5,56 cm · h⁻¹ deutlich größer als bei pH 7,4 mit 1,97 cm · h⁻¹. Die Affinität der jeweiligen Transporter schien bei pH 7,4 mit einem K_m-Wert von 58,26 μmol·ml⁻¹ höher als bei pH 6,4 mit einem K_m-Wert von 75,22 μmol·ml⁻¹.
 - c. Nach der Zugabe des NHE-Blockers Amilorid waren die gemessenen Na⁺-Transportraten bei pH 7,4 und pH 6,4 nahezu gleich groß, d. h. die pH

abhängige Stimulierung des elektroneutralen Na⁺-Transportes erfolgt durch einen NHE. Bei einer Na⁺-Konzentration von 125 mM blieb nach der Amilorid-Zugabe ein elektroneutraler Na⁺-Transport von 0,89 μ eq · cm⁻² · h⁻¹ bei pH 7,4 und 1,09 μ eq · cm⁻² · h⁻¹ bei pH 6,4.

- 2. Differenzierung des elektroneutralen Na⁺-Transportes
 - a. Der NHE-Blocker Amilorid und der Na⁺Cl⁻-Cotransporter-Hemmstoff Hydrochlorothiazid (HCTZ) zeigten in der angewandten Dosierung von jeweils 1 mM keinen additiven Effekt auf den Na⁺-Transport.
 - b. S3226 war am Blättermagenepithel wirksam in einer Dosierung von 1 μ M.
 - c. Der Netto-Na⁺-Transport wurde durch S3226 auf die Größe des jeweiligen Kurzschlussstromes reduziert. Dementsprechend fand nach der Zugabe von 1µM S3226 auf der mukosalen Seite kein elektroneutraler Na⁺-Transport mehr statt.
 - d. S3226 zeigte in der wirksamen Dosierung von 1 μ M auf der serosalen Seite keinerlei Effekte.
 - e. HOE 642, ein NHE1-Isoform-Blocker, zeigte keine Wirksamkeit auf der mukosalen Seite.
 - f. 1 mM Amilorid und 1µM S3226 zeigten einen additiven Effekt.
- 3. Trafficking
 - a. Die Zugabe von 1 nmol Wortmannin auf der mukosalen Seite hatte keinen Effekt auf den Na⁺-Transport. Die Stimulierung des Na⁺/H⁺-Austausches durch Absenkung des mukosalen pH-Wertes wurde nicht beeinflusst.
- 4. Korrelation von J_{ms} und $J_{sm} Na^+$
 - a. J_{ms} und J_{sm} Na⁺ konnten ab einer Konzentration von über 50 mM Acetat bei einem pH von 6,4 auf der mukosalen Seite "entkoppelt" werden.
 - b. Die wachsende Differenz zwischen J_{ms} und $J_{sm} \, Na^+$ konnte durch 1 $\mu M \, S3226$ eliminiert werden.

5 Diskussion

5.1 Einleitung

Eine wichtige Funktion des Blättermagens der Wiederkäuer ist die Absorption von großen Mengen HCO_3^- im Austausch mit Cl⁻, um eine übermäßige Gasbildung in Form von CO_2 im Labmagen zu verhindern und um eine ausreichende Ansäuerung der Ingesta im Labmagen gewährleisten zu können. Für den effektiven transepithelialen Transport (Absorption) von HCO_3^- müssen (mindestens) zwei Voraussetzungen gegeben sein: a) Wirksame Regulation des pH_i und b) Energetisierung des apikalen Cl⁻/ HCO_3^- Austauschers.

a) Die Absorption von HCO₃⁻ erfordert effektive Mechanismen der Regulation des intrazellulären pH-Wertes, insbesondere aufgrund der gleichzeitigen Absorption von protonierten SCFA (HSCFA; Ali et al., 2006). Die pH-Regulation im Blättermagenepithel erfolgt subapikal zur Kompensation der HSCFA Aufnahme wahrscheinlich zunächst primär über die Aktivität des Na⁺/H⁺-Austauschers (NHE).

b) Die Energetisierung des HCO_3^- Transportes ergibt sich indirekt durch die Koppelung mit dem Transport von Natrium. Die passive Aufnahme von HCO_3^- im Austausch mit Chlorid (Anionen-Austauscher) erfordert subapikal Chlorid und als Voraussetzung für den passiven Austausch einen entsprechenden Chloridgradienten. Dieser wird primär durch den NaCl-Cotransporter in der apikalen Membran sichergestellt (Ali, 2005b; Beisele *et al.*, 2007), so dass die Aktivität des NaCl-Cotransporters als wichtige Voraussetzung für die Energetisierung des Bikarbonattransports anzusehen ist. Subapikales Chlorid ist zudem Voraussetzung für die Aktivität des NHE und somit für die pH-Regulation (Aharonovitz *et al.*, 2001).

Aufgrund der beschriebenen Abhängigkeit des HCO₃⁻ Transportes vom Na⁺-Transport (NHE und NaCl-Cotransport) sollten in der vorliegenden Studie nähere Erkenntnisse über

- die kinetischen Eigenschaften des elektroneutralen Na⁺-Transportes (via NHE und NaCl-Cotransporter) in der apikalen Membran des Blättermagens,
- die Art und Weise der Stimulierung des NHE (NHE3 Trafficking; Kinetik: V_{max} und/oder K_m) in der apikalen Membran infolge luminaler pH-Absenkung, und
- die hohen unidirektionalen Na⁺-Fluxraten im Hinblick auf eine mögliche Kopplung des postulierten Na⁺/Na⁺-Austausches und des Na⁺/H⁺-Austausches in der apikalen Membran gewonnen werden.
5.2 Kinetik des elektroneutralen Na⁺-Transportes

Um die postulierte Abhängigkeit des HCO₃⁻ Transportes von den elektroneutralen Na⁺-Transportmechanismen zu charakterisieren, wurden mit steigenden Na⁺-Konzentrationen die Mindestkonzentrationen für Natrium für die Aktivität des NHE und des NaCl-Cotransporters ermittelt sowie die kinetischen Eigenschaften dieser Transportmechanismen untersucht werden. Es sei darauf hingewiesen, dass in allen Versuchen dieser Studie kein HCO₃⁻ in den Inkubationslösungen vorhanden war. Der Grund dafür ist, dass es aufgrund der Pufferkapazität des HCO₃⁻ nur schwer möglich ist, eine kontrollierte pH-Absenkung auf der luminalen Seite durchzuführen. Die Abwesenheit von HCO₃⁻ hat keine signifikanten Auswirkungen auf den Netto-Transport von Natrium oder auf elektrophysiologische Parameter (Ali, 2005a; Martens und Gäbel 1988).

Aus den Ergebnissen in Kapitel 4.1 geht hervor, dass ein elektroneutraler Na⁺-Transport sowohl bei pH 7,4 als auch bei pH 6,4 erst ab einer luminalen Na⁺-Konzentration von 12 mM stattfindet ($J_{net} > I_{sc}$). Eine Sättigung des Transportes tritt in beiden Fällen ab ca. 40 mM Na⁺ ein. Die Na⁺-Fluxraten sind bei pH 6,4 ab etwa 30 mM Na⁺ signifikant größer als bei pH 7,4. Nach der Applikation von Amilorid sind die Na⁺-Fluxraten J_{ms} und J_{net} bei beiden pH-Werten (7,4 und 6,4) bei allen angewandten Konzentrationen (12, 25, 55 und 125 mM Na⁺) nicht mehr signifikant verschieden. Die erhöhten Na⁺-Fluxraten bei pH 6,4 gegenüber pH 7,4 lassen sich dementsprechend auf eine Aktivitätsteigerung des NHE in der apikalen Membran zurückführen. Der zugrunde liegende Mechanismus der Auswirkung der luminalen pH-Absenkung ist bereits durch Martens und Gäbel (1988) und Ali (2005a) beschrieben worden: SCFA gelangen in der protonierten Form (HSCFA) per Diffusion in die Zelle. Aufgrund des pK-Wertes der SCFA von 4,8 unterliegen die HSCFA in der Zelle einer Dissoziation des Protons. Die resultierende Absenkung des intrazellulären pH-Wertes führt dann zur Aktivierung des NHE.

Die im Ergebnisteil in Kapitel 4.1.4 errechneten kinetischen Parameter K_m und V_{max} weisen darauf hin, dass die Steigerung der NHE-Aktivität durch eine Erhöhung der Transportkapazität erfolgt und nicht über eine Steigerung der Affinität des Transportes. Im Gegenteil: den K_m -Werten zufolge scheint es sich um eine – wenn auch geringfügige – Abnahme der Affinität zu handeln. Dies ist aber vermutlich ein mathematisches Artefakt, weil bei der Generierung der Hyperbel durch den Nullpunkt für die Berechnung der K_m -Werte nicht berücksichtigt wird, dass J_{net} Na⁺ und somit die NHE-Aktivität erst ab einer Konzentration von 12 mM einsetzt und erst ab 55 mM Na⁺ zwischen pH 7,4 und 6,4 signifikant verschieden ist. Die Größenordnung der errechneten K_m -Werte entspricht den in der Literatur beschriebenen Werten für die NHE3-Isoform (siehe Literaturteil – Kapitel 2.4.5). Der mit 5,56 μ eq·cm⁻²·h⁻¹ (pH 6,4) gegenüber 1,97 μ eq·cm⁻²·h⁻¹ (pH 7,4) deutlich höhere V_{max}-Wert bei pH 6,4 bedeutet eine Steigerung der Transportkapazität des NHE infolge luminaler pH-Absenkung, die auf den Einbau von bereits vorhandenen NHE-Transportern durch Trafficking (Vesikeleinbau) oder aber auf die Aktivierung bereits vorhandener ruhender NHE3-Transporter zurückzuführen sein kann. Hierzu sollten die Versuchsergebnisse aus Kapitel 4.3 näheren Aufschluss geben (siehe Diskussion in Kapitel 5.4).

Nach der Amilorid-Applikation blieb sowohl bei pH 7,4 als auch bei pH 6,4 bei Konzentrationen von 125 mM Na⁺ ein (restlicher) elektroneutraler Na⁺-Transport (J_{net} - I_{sc}) von über 1 µeq · cm⁻² · h⁻¹ bestehen. Dieser Amilorid-insensitive Na⁺-Transport wurde zunächst auf die Aktivität des parallel zum NHE existierenden NaCl-Cotransporters in der apikalen Membran zurückgeführt. Der entsprechende Nachweis sollte im Kapitel 4.2 unter Zuhilfenahme spezifischer Hemmstoffe erbracht werden.

Nach der Zugabe von Amilorid (NHE-Blocker) war bei einem luminalen pH-Wert von 7,4 ein elektroneutraler Na⁺ -Transport erst ab etwa 40 mM Na⁺ nachweisbar. Demzufolge scheint der NaCl-Cotransporter ab dieser Konzentration seine Aktivität aufzunehmen. Eine Aktivität des NHE ließ sich hingegen bereits ab 12 mM Natrium nachweisen.

Bemerkenswert ist bei den Ergebnissen zur Sättigungskinetik bei pH 7,4, dass bei niedrigeren luminalen Na⁺ -Konzentrationen als 55 mM der Kurzschlussstrom nach der Applikation von Amilorid signifikant größer war als der Netto- Na⁺ -Transport. Dies bedeutet, dass entweder ein anderes Kation als Natrium elektrogen absorbiert wird oder aber ein Anion sezerniert wird. Die bisherigen Erkenntnisse über den elektrogenen Transport von Ionen am Blättermagenepithel lassen hierzu keine endgültige Erklärung zu, so dass keine befriedigende Erklärung für den im Vergleich zu J_{net} Na⁺ höheren I_{sc} bei pH 7,4 gegeben werden kann.

Eine mögliche Erklärung wäre die Aktivierung einer vH⁺-ATPase, die intrazelluläre Protonenlast infolge der Hemmung des NHE nach Applikation von Amilorid kompensieren könnte. Diese elektrogene Protonenpumpe ist am Pansenepithel nachgewiesen worden (Etschmann *et al.*, 2006). Es muss jedoch betont werden, dass die vorliegende Differenz von $0,5 \ \mu eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ gering ist und bei den relativ hohen Fluxraten für Na⁺ (Ali, 2005a) oder Cl⁻ (Tiling, 1997) methodisch schwer zu objektiveren ist.

Bei pH 6,4 ist nach der Amilorid-Applikation ab 40 mM Natrium ein elektroneutraler Na⁺-Transport zu verzeichnen. Der I_{sc} ist bei kleineren Na⁺-Konzentrationen als 40 mM nicht signifikant größer als J_{net} . Dieser Befund überrascht, weil der diskutierte Protonentransport unter diesen Versuchsbedingungen größer ausfallen müsste.

Versuchsbedingungen und in vivo Verhältnisse: Wie auch für den Pansen in der Literatur beschrieben, gewährleistet im Blättermagen die parallele Existenz des elektrogenen Na⁺ - Transportes via Kanal und des elektroneutralen Transportes via NHE eine stetige Absorption von Natrium durch das Blättermagenepithel, auch bei sehr geringer luminaler Na⁺-Konzentration. Die physiologische Konzentration an Natrium in den Vormägen der Wiederkäuer schwankt sehr stark. Sie wird hauptsächlich über die Konzentration des Ions im Speichel bestimmt und kann bis zu 100 mmol·1⁻¹ oder mehr betragen. Es treten jedoch große Schwankungen auf. Die Konzentration von Natrium und Kalium, die wichtigsten Kationen, beträgt in der Summe etwa 130-150 mmol/l und ist weitgehend konstant. Ohne Veränderung der Summenkonzentration treten aber große reziproke Schwankungen beider Ionen auf (Scott, 1967). Eine starke Abnahme der Na⁺-Konzentration findet beispielsweise bei hohem Kaliumgehalt im Futter statt.

Der pH-Wert in den Vormägen beträgt je nach Fütterung zwischen 5,5 und 7,0. Die Bedingungen (Na⁺-Konzentrationen von 12 bis 125 mM und pH Werte von 6,4 bis 7,4) in den durchgeführten Versuchen entsprechen also durchaus physiologischen Verhältnissen.

Die eigenen Untersuchungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass bei einem pH-Wert von 7,4 bzw. 6,4 der NHE bei Na⁺-Konzentrationen von weniger als 12 mM nicht mehr fungieren kann, weil die den NHE treibenden passiven Kräfte offensichtlich nicht mehr gegeben sind. Da der NaCl-Cotransport und somit ein Cl⁻-Absorption erst ab 40 mM unter den gewählten Versuchsbedingungen nachzuweisen war ist anzunehmen, dass der HCO_3^- - Transport aufgrund der Wechselwirkungen mit den NHE und den NaCl-Cotransport ab einer luminalen Na Konzentration < 40 mM beeinträchtigt werden kann, d. h. dass bei hohen K⁺-Aufnahmen und somit geringen Na⁺-Konzentration die HCO_3^- - Absorption gefährdet ist. Entsprechende Versuche werden zurzeit durchgeführt, um diese mögliche Konsequenz zu prüfen.

5.3 Differenzierung des elektroneutralen Na⁺-Transportes

Entsprechend den Ergebnissen zur Sättigungskinetik sollte der elektroneutrale Na⁺-Transport mithilfe spezifischer Hemmstoffe näher charakterisiert werden. Der in Kapitel 4.1 nach der Amilorid-Zugabe übrig bleibende Rest von über 1 μ eq · cm⁻² · h⁻¹ bei 125 mM Na⁺ wurde zunächst auf die Aktivität des NaCl-Cotransporters zurückgeführt. Dies sollte unter Anwendung des Hemmstoffes Hydrochlorothiazid (HCTZ) bei einer luminalen Na⁺-

Konzentration von 125 mM bewiesen werden. HCTZ reduzierte den elektroneutralen Na⁺-Transport um etwa 0,8 μ eq \cdot cm⁻² \cdot h⁻¹. Die anschließende Applikation von Amilorid reduzierte den elektroneutralen Na⁺-Transport um weitere 1,70 μ eq \cdot cm⁻² \cdot h⁻¹. Bei der Applikation beider Hemmstoffe in umgekehrter Reihenfolge - erst Amilorid, dann HCTZ zeigte sich, dass Amilorid etwa 2 μ eq \cdot cm⁻² \cdot h⁻¹ blockiert und die anschließende Zugabe von HCTZ keinen Effekt hat. Unabhängig von der Reihenfolge der Applikation der Hemmstoffe verblieb in beiden Fällen ein restlicher elektroneutraler Transport von ca. 0,7 μ eq · cm⁻² · h⁻¹. Die Wirksamkeit von HCTZ auf den NaCl-Cotransport wurde bereits in mehreren Studien beschrieben (Mertz und Schettler, 1959; Stokes, 1988). Auch Ali (2005a) und Tiling (1997) konnten einen Effekt am Blättermagenepithel aufzeigen. Die Versuchsergebnisse von Ali (2005a) entsprechen dabei von der Größenordnung her den oben genannten Effekten. Es stellt sich also die Frage nach der Sensitivität von Amilorid. Auch Ali (2005a) beschrieb einen stets übrig bleiben Rest an elektroneutralem Na⁺-Transport nach der Zugabe von Amilorid. Da Amilorid ein - bezüglich der NHE-Isoformen - unspezifischer NHE-Hemmstoff ist, wurde ein spezifischer NHE3-Hemmstoff eingesetzt: S3226. Aus den Ergebnissen in Kapitel 4.2.3 (Ergebnisteil) geht hervor, dass die effektive Dosierung von S3226 am Blättermagenepithel zur Hemmung des NHE3 bei 1 µM liegt. Bei dieser Konzentration konnte bemerkenswerterweise der gesamte elektroneutrale Na⁺-Transport eliminiert werden. Die effektive Dosierung von 1 µM wurde dann im Anschluss an eine Applikation von Amilorid eingesetzt (Kapitel 4.2.4). Der zuvor stets übrigbleibende Rest an elektroneutralem Na⁺-Transport nach der Applikation von Amilorid wurde durch S3226 vollständig eliminiert.

Die bisherigen Ergebnisse lassen folgende Interpretation zu: Der NaCl-Cotransport beträgt bei 125 mM Na⁺ etwa 0,8 μ eq · cm⁻² · h⁻¹, entsprechend der durch den Einsatz von HCTZ reduzierten Größe an elektroneutralem Na⁺-Transport. Amilorid und S3226 scheinen den NaCl-Cotransport ebenfalls zu blockieren. Der Grund liegt vermutlich in dem starken Abfall des intrazellulären pH-Wertes infolge Minderung der NHE-Aktivität und dem daraus resultierenden Erliegen anderer – für das Überleben der Zelle vorerst weniger wichtiger – Transportvorgänge. Eine Minderung des NaCl-Cotransportes und somit der subluminalen Cl⁻Konzentration, könnte aufgrund der beschriebenen Cl⁻Abhängigkeit des NHE (Aharonovitz *et al.*, 2001), evtl. eine Potenzierung des hemmenden Effektes auf den NHE bewirken. Hierzu passen die Ergebnisse von Ali (2005a), welche bei Cl⁻Entzug aus der Inkubationslösung und gleichzeitigem Einsatz von Amilorid eine vollständige Hemmung des elektroneutralen Transportes zeigen.

Amilorid scheint im Gegensatz zu S3226 weniger sensitiv zu sein, d.h. nicht die gesamte Aktivität des NHE zu blockieren. Dies spiegelt sich auch in den elektrophysiologischen Daten wider: die G_t -Werte (Leitfähigkeit der Zelle) erreichen nach Amilorid im Gegensatz zu S3226 ein Plateau, d.h. die Zelle scheint nur nach der Zugabe von Amilorid ihre pH-Regulation aufrechterhalten zu können.

Folgende Aspekte sind mögliche Gründe für die niedrigere Sensitivität von Amilorid: Zum einen könnte aufgrund der pH-abhängigen Struktur von Amilorid ein Wirkungsverlust eingetreten sein (Benos, 1982; Vigne *et al.*, 1984). Der pK-Wert von Amilorid liegt bei 8,75 (Masereel *et al.*, 2003). Viele Ergebnisse bisheriger Versuche (näheres siehe unter Kapitel 5.5) lassen vermuten, dass eine Art Mikrokompartiment an der luminalen Membran herrscht, d.h. in unmittelbarer Nähe der Membran herrscht ein konstanterer pH-Wert als im Lumen des Blättermagens. Unter Umständen ist der pH-Wert in unmittelbarer Nähe der apikalen Membran nicht ausreichend niedrig, um entsprechend viele Amiloridmoleküle in die protonierte und somit wirksame Form zu überführen. Für S3226 ist nach Auskunft des Herstellers kein pK-Wert bekannt.

Zum anderen könnten die Unterschiede in der Struktur von Amilorid und S3226 ein Grund für die unterschiedliche Wirksamkeit sein (siehe Kapitel 3.8 in Material und Methoden): S3226 besitzt deutlich mehr funktionelle Gruppen im Hinblick auf die Hemmung des NHE, dies spricht u.a. für die insgesamt höhere Spezifität und Effektivität gegenüber der NHE3-Isoform im Gegensatz zu Amilorid.

In Kapitel 4.2.3 sollten der Einsatz von HOE642 auf der mukosalen Seite und der Einsatz von S3226 auf der serosalen Seite weitere Beweise für die Existenz bestimmter NHE-Isoformen im Blättermagenepithel liefern. Die Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass sich auf der apikalen Seite keine NHE1-Isoform befindet, sowie auf der serosalen Seite keine NHE3-Isoform. Ali setzte bereits den Hemmstoff HOE642 auf der serosalen Seite ohne Erfolg ein (Ali, 2005a).

Molekularbiologie der möglichen Transportproteine: Die am Blättermagenepithel vorkommenden Transporter sind molekularbiologisch bereits in vielen anderen Geweben nachgewiesen: Die NHE3-Isoform beispielsweise in der apikalen Membran der Nierentubuli und des GIT (siehe Kapitel 2.4.2); der NaCl-Cotransporter wurde ebenfalls in Nierentubuli, sowie in Jejunum und Ileum der Ratte nachgewiesen (Bazzini *et al.*, 2005). Der Cl/HCO₃⁻ Anionen-Austauscher kann unter anderem in den Na⁺-unabhängigen Cl⁻/HCO₃⁻ Austauscher (ncbe) unterteilt werden (Boron et al., 1997), welche in Niere und GIT vorkommen.

Am Blättermagenepithel konnte bisher lediglich anhand der qualitativen PCR die Existenz zweier Anionen-Austauscher nachgewiesen werden (Wegeler, 2008): mRNA von DRA (Down Regulated in Adenoma – Anionenaustauscher) und AE2 (Natrium unabhängiger Anionen-Austauscher) wurden identifiziert, von PAT (Protonenassoziierter Aminosäure Transporter) hingegen nicht. Der AE2-Transporter gehört zur Familie der SLC4A2-Familie. Er ist sensibel auf den intrazellulären pH-Wert: im sauren Bereich aktiv, im basischen Bereich gehemmt. Er wurde unter anderem bei der Ratte in der apikalen Membran des Sammelrohrs der Niere nachgewiesen (Eladari *et al.*, 1998). DRA gehört phylogenetisch in die Familie der Sulfattransporter (SLC26). Dessen Expression wurde bereits in der apikalen Membran des GIT beim Kaninchen und Menschen nachgewiesen (Jacob *et al.*, 2002) sowie im Pansen des Schafes (Bilk *et al.*, 2005). Überträgt man die an anderen Epithelien ermittelte Lokalisation von DRA und AE auf das Psalterepithel, müsste DRA apikal und AE basolateral positioniert sein. Dieser Nachweis ist bisher nicht erbracht worden.

Über den NaCl-Cotransporter gibt es für das Blättermagenepithel bisher keine molekularbiologischen Erkenntnisse. Die mRNA von NHE3 und NHE 1 ist im Psalterepithel von Ziegen (Shen et al., 2008) nachgewiesen worden. Auf die Existenz dieser beiden Transporter kann bisher primär nur aufgrund des Einsatzes von spezifischen Hemmstoffen, wie HCTZ und S3226, bei der Messung von Transportraten geschlossen werden.

5.4 "Trafficking"

Aus den Ergebnissen der Kapitel 4.1 und 4.2 des Ergebnisteils geht hervor, dass die Zunahme des elektroneutralen Na⁺-Transportes infolge luminaler pH-Absenkung wahrscheinlich auf die Steigerung der Transportkapazität der NHE3-Isoform in der apikalen Membran des Blättermagenepithels zurückzuführen ist.

Es stellte sich die Frage nach dem zugrundeliegenden Mechanismus der Erhöhung der Transportkapazität des NHE3. Aufgrund der Tatsache, dass in nahezu allen anderen Zellen und Geweben die Stimulierung und Hemmung des NHE3 zumindest partiell abhängig ist vom Trafficking, welches i.d.R. über die Aktivierung einer PI-3-Kinase realisiert wird, sollte der Einsatz von Wortmannin – eines PI3-Kinase-Hemmstoffes – mögliche Hinweise auf ein vorliegendes Trafficking in der apikalen Membran des Blättermagenepithels liefern.

Aus den Ergebnissen in Kapitel 4.3 des Ergebnisteils ist ersichtlich, dass der Einsatz von Wortmannin die Stimulierung des NHE-Transportes infolge Absenkung des luminalen pH-Wertes nicht verringerte. Dieses Ergebnis hat überrascht, da bisher in allen Geweben (mit Ausnahme des Ileum-Epithels beim Kaninchen), welche auf Trafficking untersucht wurden,

der Einsatz von Wortmannin stets die basale Na-Absorption via NHE (und von Cl via Cl-/HCO₃⁻) reduzieren konnte (Donowitz und Li, 2007). Schlussfolgernd muss davon ausgegangen werden, dass die NHE-Transporter sehr wahrscheinlich in der apikalen Membran des Blättermagenepithels in einem großen Pool vorliegen, und die Erhöhung der Transportkapazität auf die Aktivierung bereits vorhandener ruhender NHE3-Transporter zurückzuführen ist. Der Nachweis der Existenz verschiedener NHE-Pools gelang Alexander und Grinstein (Alexander *et al.*, 2005) mittels einer detaillierten kinetischen Analyse von NHE3 in distalen Nierentubuli-Zellen (MDCK): Sie identifizierten 4 Pools von NHE3: 1) einen mobilen apikalen Membran-Pool, 2) einen immobilen apikalen Membran-Pool, welcher an das Zytoskelett gebunden ist, 3) und 4) zwei intrazelluläre Pools, die keinem schnellen Austausch mit der apikalen Membran unterliegen. Die Relevanz dieser am Tubulusepithel nachgewiesen Pools für die Physiologie in vivo ist nicht bekannt. Ebenso ist das Vorhandensein solcher NHE3-Pools am Blättermagenepithel bisher nicht bewiesen.

5.5 Korrelation von J_{ms} und J_{sm} Na⁺

Wie in Kapitel 4.4.5 des Ergebnisteils grafisch dargestellt und erläutert wurde, ging die Stimulierung des J_{ms} Na⁺ bisher immer mit einer Erhöhung von J_{sm} Na⁺ - mit einem sehr konstanten Quotienten von etwa 2 (Anstieg J_{ms} /Anstieg J_{sm}) - einher. Diese Beobachtung bestätigt entsprechende Versuchsergebnisse von Ali (2005a). In den Versuchen aus Kapitel 4.4 des Ergebnisteils sollte diese Wechselwirkung von J_{ms} and J_{sm} näher untersucht werden. Es sollte eine "Entkopplung" von J_{ms} und J_{sm} Na⁺ durch eine erhöhte Protonenlast, mittels Absenkung des luminalen pH-Wertes und gleichzeitiger Erhöhung der SCFA-Konzentration in der Inkubationslösung, provoziert werden. Die Kompensierung der Protonenlast – primär durch Aktivierung des NHE in der apikalen Membran - könnte zumindest teilweise durch "Umschaltung" eines postulierten Na⁺/Na⁺- Austauschers in den Na⁺/H⁺ Austauscher erfolgen.

Die Ergebnisse in Kapitel 4.4.3 zeigen, dass tatsächlich eine Entkopplung von J_{ms} und J_{sm} Na⁺ ab einer mukosalen Acetatkonzentration größer als 50 mM beobachtet werden kann. Diese Steigerung von J_{ms} Na⁺ konnte unter Anwendung von S3226 vollständig unterbunden werden, d.h. es scheint sich bei der Differenz um eine Aktivitätszunahme des NHE3 zu handeln.

Die hohen Fluxraten von J_{sm} Na⁺ am Blättermagenepithel stellen ein Phänomen dar, für welches es bislang noch keine Erklärung gibt. Es handelt sich überwiegend um einen transzellulären Na⁺-Transport, wie Ali aufgrund der Abschätzung der partiellen Leitfähigkeit für J_{sm} Na⁺ gezeigt hat, die zu gering ist, um J_{sm} als parazellulären Transport zu erklären.

Diese Schlussfolgerung ergibt sich auch infolge der fehlenden Beziehung zwischen J_{sm} Na⁺ und der Leitfähigkeit der Gewebe (Ali, 2005a; Harrison, 1971; Martens und Gäbel, 1988), wie es bei reinem parazellulären Transport der Fall sein müsste. Der serosale Einsatz von NHE-Hemmstoffen wie Amilorid oder HOE 642 (NHE1-Hemmstoff) sowie eines Na/K/Cl-Blockers (Bumetanid) beeinflussten J_{sm} Na⁺ nicht (Ali, 2005a). Die Reduktion der Na⁺-Konzentration in der serosalen Inkubationslösung verursachte jedoch eine signifikante Reduktion sowohl von J_{sm} Na⁺ als auch von J_{ms} Na⁺ in gleicher Größenordnung (Ali, 2005a). Diese Beobachtungen führten zu der im Literaturteil beschriebenen Hypothese der Existenz eines Na⁺/Na⁺-Austauschers für die basolaterale Na-Aufnahme. Na⁺/Na⁺-Austauscher sind in Erythrozyten beim Kaninchen nachgewiesen worden und sensitiv gegenüber Phloretin und Nethylmaleimide (NEM) (Duhm und Becker, 1979). Dieser Austauscher ist unabhängig von ATP und tauscht extrazelluläres gegen intrazelluläres Natrium in einem Verhältnis von 1:1 aus. Aufgrund dieser Tatsache ist es zunächst auch schwierig, diesem Austausch eine physiologische Bedeutung zuzuschreiben. Es wird die Möglichkeit diskutiert, dass der Na⁺/Na⁺-Austauscher ggf. in sekundär aktive Transportmechanismen verwickelt sein könnte (Canessa, 1994; Canessa, 1986; Haas et al., 1975). Aronson et al. (1982) haben gezeigt, dass der renale NHE als Na⁺/Na⁺-Austauscher fungieren kann, der durch Amilorid gehemmt werden kann.

Im Blättermagen könnte die Annahme eines transzellulären Na⁺-Transports via Na⁺/Na⁺-Austausch in der apikalen und basolateralen Membran zumindest teilweise die Versuchsergebnisse erklären. Dies ist ungewöhnlich und bisher in keinem Epithel beschrieben worden. Die Ergebnisse in Kapitel 4.4 des Ergebnisteils unterstützen die vorgestellte Hypothese, dass ein "Crosstalk" zwischen dem angenommenen basolateralen Na⁺/Na⁺-Austauscher und dem apikalen NHE existiert, der z. T. auch als Na⁺/Na⁺-Austauscher fungieren und somit die hohen transzellulären Fluxraten (Jms und Jsm) erklären könnte. Über die basolaterale Membran eintretende Na⁺-Ionen könnten die Zelle über die apikale Membran via NHE - im Austausch für Na⁺ - verlassen. Der NHE in der apikalen Membran könnte dabei eine Art "Servo"-Mechanismus für die pH-Regulation der Zelle darstellen, indem der NHE von dem Modus Na⁺/Na⁺ Austauscher in den üblichen Na⁺/H⁺ Austauscher überführt wird, wenn der pH_i abfällt. Wenn das der Fall ist, müsste es zu einer Entkoppelung von J_{ms} and J_{sm} kommen, was in den Ergebnissen aus Kapitel 4.4 des Ergebnisteils gezeigt werden konnte. In den entsprechenden Versuchen (Kapitel 4.4) verringerten sich die J_{sm} Na⁺ -Transportraten nach der Entkopplung von J_{ms} Na⁺ nicht. Gemäß der Hypothese dürfte das Na⁺ die Zelle nicht mehr auf der apikalen Seite verlassen können, wenn der Na⁺/Na⁺-Austausch in einen Na⁺/H⁺-

Austausch übergeht. Die J_{sm} Na⁺ -Transportraten veränderten sich jedoch auch nach Anstieg bzw. Entkopplung der J_{ms} Na⁺ -Transportraten nicht. Der Anstieg von J_{sm} Na⁺ infolge einer Erhöhung der luminalen Acetatkonzentration unterstützt zwar die Annahme der Aktivierung des NHE in der luminalen Membran, bestätigt aber nicht eindeutig die angenommene Arbeitshypothese des Wechsels vom Na⁺/Na⁺ zum Na⁺/H⁺ Austausch und der damit Entkoppelung von J_{sm} Na. Damit verbleibt weiterhin eine Unsicherheit über die physiologischen Bedeutung der hohen J_{sm} Fluxraten von Na.

Nicht zu erklären ist ebenfalls die Tatsache, dass die Acetatfluxe infolge verdoppelter Konzentration nur linear – nicht exponentiell, gemäß der Henderson-Hasselbach-Gleichung – ansteigen. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Untersuchung des Transportes von SCFA am Pansenepithel gemacht (Gäbel *et al.*, 2002; Sehested *et al.*, 1999). Auch Ali (2005a) stellte dies am Blättermagenepithel fest. Eine endgültige Erklärung für dieses Phänomen gibt es bisher nicht. Möglicherweise speilen zwei Dinge eine Rolle: Zum einen könnte es ein, dass sich unmittelbar an der apikalen Membran ein anderer pH einstellt bzw. konstant hält als in der Inkubationslösung der Ussing Kammer. Dies ist am Pansenepithel durch Leonhardt-Marek (2004) beobachtet worden. Interessant ist an dieser Stelle die Beobachtung, dass NHE-Hemmstoffe wie S3226 auch eine Wirkung auf die Acetattransportraten haben (siehe Kapitel 4.4.2). Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass die Verfügbarkeit von Protonen limitierend für die Acetataufnahme ist, zumindest bei hohen Acetatkonzentrationen. Die Interaktion zwischen NHE, SCFA-Aufnahme und pH ist in der Mukosa des distalen Colons bei Mäusen (Montrose und Chu, 1997) beschrieben worden.

5.6 Bestätigung des Modells/Ausblick/Hypothesen

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass die beiden für den passiven HCO_3^- Transport wichtigen Na⁺-Transportsysteme erst ab folgenden luminalen Na⁺-Konzentrationen funktionieren: Der NHE ab 12 mM und der NaCl-Cotransporter ab 25 mM Natrium. Dementsprechend ist die Funktion des HCO_3^- Transportes bei geringeren Na⁺-Konzentrationen als 25 mM gegebenenfalls gefährdet. Es muss aber betont werden, dass diese niedrigen Konzentration von Natrium selten beobachtet werden, so dass unter den üblichen *in vivo* Verhältnissen der HCO_3^- - Transport durch niedrige luminale Na⁺-Konzentrationen kaum beeinträchtigt werden dürfte.

Die Ergebnisse des Einsatzes der verwendeten Hemmstoffe weisen auf die Existenz einer NHE3-Isoform in der apikalen Membran des Blättermagenepithels hin. Eine NHE1-Isoform

ist bisher nicht nachzuweisen. Desweiteren lässt sich die Aktivitätssteigerung des NHE in der apikalen Membran infolge luminaler pH-Absenkung aufgrund der durchgeführten Untersuchungen wahrscheinlich nicht auf den Einbau von NHE3-Vesikeln zurückführen, sondern eher auf die Aktivierung bereits in der Membran vorhandener inaktiver Transporter. Die beschriebene Abhängigkeit von J_{ms} und J_{sm} Na⁺ im Sinne eines konstanten Quotienten von etwa 2 (Anstieg J_{ms} /Anstieg J_{sm}) konnte durch Erhöhung der SCFA-Konzentration auf 100 mM und Absenkung des pH-Wertes auf 6,4 aufgehoben werden ("Entkopplung" von J_{ms} und J_{sm}). Dies bestätigt das vorgestellte Modell des Vorliegens von Na⁺/Na⁺-Austauschern in der apikalen und basolateralen Membran bzw. weitergehend der Existenz eines gewissen "Servo"-Mechanismus in Form eines Umschaltens des postulierten Na⁺/Na⁺-Austausches zu einem Na/H-Austausch in der apikalen Membran. Nicht zu erklären und somit nicht zu dem Modell passend ist, dass bei der Entkopplung J_{sm} Na⁺ konstant geblieben ist und nicht abgesunken ist. Eine mögliche Erklärung wäre die Aktivierung von in der apikalen Membran vorhandenen, aber nicht funktionell aktiven (auch nicht als Na⁺/Na⁺ Austauscher) NHE3 Carriern in der apikalen Membran.

6 Zusammenfassung

Charakterisierung des Na⁺-Transportes am isolierten Psalterepithel des Schafes

Eine wichtige Funktion des Blättermagens der Wiederkäuer ist die Absorption von großen Mengen HCO₃⁻ im Austausch mit Cl⁻, um eine übermäßige Gasbildung in Form von CO₂ im Labmagen zu verhindern und um eine ausreichende Ansäuerung der Ingesta im Labmagen gewährleisten zu können. Für den effektiven transepithelialen Transport (Absorption) von HCO3⁻ müssen mindestens zwei Voraussetzungen gegeben sein: a) Wirksame Regulation des pH_i und b) Energetisierung des apikalen Cl7/ HCO3⁻ Austauschers. Die pH-Regulation im Blättermagenepithel erfolgt subapikal zur Kompensation der HSCFA Aufnahme wahrscheinlich zunächst primär über die Aktivität des Na⁺/H⁺-Austauschers (NHE). Die passive Aufnahme von HCO3⁻ im Austausch mit Chlorid (Anionen-Austauscher) erfordert subapikal Chlorid und als Voraussetzung für den passiven Austausch einen entsprechenden Chloridgradienten. Dieser wird primär durch den NaCl-Cotransporter in der apikalen Membran sichergestellt, so dass die Aktivität des NaCl-Cotransporters als wichtige Voraussetzung für die Energetisierung des Bikarbonattransports anzusehen ist. Subapikales Chlorid ist zudem Voraussetzung für die Aktivität des NHE und somit für die pH-Regulation. Der HCO₃⁻ - Transport zeigt also eine eindeutige indirekte Abhängigkeit vom elektroneutralen Na⁺-Transport (NHE und NaCl-Cotransporter).

Die vorliegende Studie bringt nähere Erkenntnisse über den elektroneutralen Na⁺-Transport am Blättermagenepithel des Schafes im Hinblick auf dessen Charakteristika, kinetische Eigenschaften und Regulationsmechanismen.

- 1. Kinetik des elektroneutralen Na⁺-Transportes
 - a. Der elektroneutrale Na⁺-Transport beschrieb sowohl bei einem pH-Wert von 7,4 als auch bei 6,4 auf mukosaler Seite eine Sättigungskinetik gemäß einer Michaelis-Menten-Kinetik. Eine Sättigung tritt ab ca. 40 mM Na⁺ ein.
 - b. Die pH-abhängige Stimulierung des elektroneutralen Na⁺-Transportes wurde durch den Einsatz von Amilorid gehemmt werden, d.h. er wird über die Aktivitätssteigerung eines NHE realisiert. Die maximale Transportgeschwindigkeit (V_{max}) war bei pH 6,4 signifikant größer als bei pH 7,4.
 - c. Eine Aktivität des NHE3 war ab einer luminalen Na⁺-Konzentration von 12 mM nachzuweisen. Der NaCl-Cotransporter nimmt seine Aktivität erst ab etwa

25 mM Natrium auf. Bis diesen genannten Na⁺-Konzentrationen könnte es zu einer Einschränkung für den HCO₃⁻-Transport kommen, welcher auf einen Cl-Gradienten angewiesen ist.

- 2. Differenzierung des elektroneutralen Na⁺-Transportes
 - a. Der NHE-Blocker Amilorid und der NaCl-Cotransporter-Hemmstoff Hydrochlorothiazid (HCTZ) zeigten in der angewandten Dosierung von jeweils 1 mM keinen additiven Effekt auf den Na⁺-Transport.
 - b. S3226, ein NHE3-Isoform-Blocker, war am Blättermagenepithel wirksam in einer Dosierung von 1 μ M. Der Netto-Na⁺-Transport wurde durch S3226 auf die Größe des jeweiligen Kurzschlussstromes reduziert. Dementsprechend fand nach der Zugabe von 1 μ M S3226 auf der mukosalen Seite kein elektroneutraler Na⁺-Transport mehr statt. Dies ist ein Hinweis auf die Existenz einer NHE3-Isoform an der apikalen Membran.
 - c. 1 mM Amilorid und 1 μM S3226 zeigten einen additiven Effekt. Amilorid scheint eine geringere Sensitivität als S3226 zu haben.
 - d. S3226 zeigte in der wirksamen Dosierung von 1 µM auf der serosalen Seite keinerlei Effekte.
 - e. HOE 642, ein NHE1-Isoform-Blocker, zeigte keine Wirksamkeit auf der mukosalen Seite.
- 3. Trafficking
 - a. Die Zugabe von 1 nmol Wortmannin auf der mukosalen Seite hatte keinen Effekt auf den Na⁺-Transport. Die Stimulierung des Na⁺/H⁺-Austausches durch Absenkung des mukosalen pH-Wertes wurde nicht beeinflusst. Es gibt keinen Hinweis für Trafficking an der apikalen Membran des Blättermagenepithels als ein möglicher Mechanismus der Aktivitätssteigerung des NHE3.
- 4. Korrelation von J_{ms} und $J_{sm} Na^+$
 - a. J_{ms} und J_{sm} Na⁺ konnten ab einer Konzentration von über 50 mM Acetat bei einem pH von 6,4 auf der mukosalen Seite "entkoppelt" werden. Dies bestätigt die mögliche Theorie der Existenz von zwei in Serie geschalteten Na⁺/Na⁺-Austauschern in der apikalen und basolateralen Membran, wobei der apikale Transporter in einen Na⁺/H⁺-Austauscher wechseln könnte. Dies könnte eine Art Servomechanismus für die pH-Regulation der Zelle darstellen.
 - b. Die wachsende Differenz zwischen J_{ms} und J_{sm} Na⁺ bei der "Entkopplung" konnte durch 1 μ M S3226 eliminiert werden, die Zunahme von J_{ms} Na⁺ ist also

auf die Aktivitätssteigerung einer NHE3-Isoform zurückzuführen. Art und Weise der Aktivierung bedarf weiterer Untersuchungen.

6 Summary

Characterisation of Na⁺ transport in the isolated omasal epithelium of sheep

One crucial function of the ruminant's omasum is the absorption of huge amounts of HCO_3^- in exchange with chloride in order to prevent an excessive formation of gas in the abomasum. Moreover, it guarantees a sufficient drop of the pH in the abomasum. Concerning the effective transepithelial transport of HCO_3^- two requirements must be met: a) effective regulation of the internal pH and b) provision of the apical anion exchanger. The regulation of subapical pH_i depends very likely primarily on the activity of Na⁺/H⁺ exchange, which is required for the compensation of H⁺ uptake via HSCFA. The absorption of HCO_3^- in exchange with chloride requires subapical chloride and an according chloride-gradient for the passive anion exchange. This gradient is primarily achieved through NaCl-Cotransport. Thus the activity of NaCl-Cotransport is an important condition for the provision of HCO_3^- . Transport. Moreover subapical chloride is needed for the activity of the NHE and therefore also for pH-regulation. HCO_3^- -Transport thus shows an indirect dependence to the electroneutral Na⁺ transport (NHE and NaCl-Cotransport).

The underlying study provides detailed conclusions to the electroneutral Na⁺ transport investigating its characteristics, kinetics and regulatory mechanisms.

- 1. Kinetics of the electroneutral Na⁺ transport
 - a. Electroneutral Na⁺ transport showed with a pH of 7.4 as well as with a pH of 6.4 a saturation kinetic on the mukosal site, according to a Michaelis-Menten type kinetic. Saturation is noticed at a luminal Na⁺ concentration of about 40mM.
 - b. pH-dependent stimulation of electroneutral Na⁺ transport could be inhibited by amiloride. This means the stimulation is realized through a rise in activity of the NHE. Maximum transport (V_{max}) was higher at pH-value of 6.4 than 7.4.
 - c. The NHE seems to start its activity at a luminal concentration of 12 mM Na⁺. NaCl-Cotransporter starts its activity at 25 mM Na⁺. Below these Na⁺ concentrations, a limitation of the HCO₃⁻-Transport – which depends on a gradient of chloride - could occur.

- 2. Differentiation of electroneutral Na⁺ transport
 - a. 1 mM of NHE-inhibitor amiloride and 1 mM of the NaCl-Cotransport-inhibitor hydrochlorothiazide (HCTZ) showed no additive effect on Na⁺ transport.
 - b. S3226, an inhibitor of the NHE3-Isoform, showed effects at the omasal epithelia with a concentration of 1 μ M. There was no significant difference between J_{net} Na⁺ and the short circuit current in the presence of this inhibitor. Therefore there was no remainig electroneutral Na⁺ transport after the addition of 1 μ M S3226 on the mucosal side. This is evidence to the existence of the NHE3-Isoform on the apical membrane of the omasum.
 - c. 1 mM amiloride and 1 μ M S3226 showed an additive effect. Amiloride seemed to have a lower sensitivity than S3226.
 - d. In its effective dosage of 1 μ M, S3226 showed no effect on the serosal side.
 - e. The NHE1-Isoform-Inhibitor, HOE 642, showed no effect on the mukosal side.
- 3. Trafficking
 - a. The addition of 1 nmol wortmannin on the mucosal side showed no effect on the Na⁺ transport. There was no influence on the stimulation of Na⁺/H⁺exchange through lowering the pH on the mucosal side. There is no evidence for trafficking on the luminal side of the omasum as a possible mechanism for rising of NHE-activity.
- 4. Correlation of J_{ms} und $J_{sm} Na^+$
 - a. J_{ms} and J_{sm} Na⁺ could be 'decoupled' using a concentration of more than 50 mM Acetat at a pH of 6.4. This supports the assumption of the possible existence of two parallel working Na⁺/Na⁺ exchangers on the apical and serosal membrane. According to this the apical Na⁺/Na⁺ exchanger could substitute in a Na⁺/H⁺ exchanger. This could be a possible kind of 'servomechanism' for the pH-regulation of the cell.
 - b. The increasing difference between J_{ms} und J_{sm} Na⁺ while the 'decoupling' could be eliminated through 1 μ M S3226. Thus the increase of J_{ms} Na⁺ is due to a rise of activity of a NHE3-Isoform. The specific way of activation needs further investigation.

7 Literaturverzeichnis

AHARONOVITZ, O., KAPUS, A., SZASZI, K., COADY-OSBERG, N., JANCELEWICZ, T., ORLOWSKI, J., und GRINSTEIN, S. (2001) Modulation of Na+/H+ exchange activity by Cl. Am J Physiol Cell Physiol 281(1): S. C133-41 AHARONOVITZ, O., ZAUN, H. C., BALLA, T., YORK, J. D., ORLOWSKI, J., und GRINSTEIN, S. (2000) Intracellular pH regulation by Na(+)/H(+) exchange requires phosphatidylinositol 4,5bisphosphate. J Cell Biol 150(1): S. 213-24 AKHTER, S., KOVBASNJUK, O., LI, X., CAVET, M., NOEL, J., ARPIN, M., HUBBARD, A. L., und DONOWITZ, M. (2002) Na(+)/H(+) exchanger 3 is in large complexes in the center of the apical surface of proximal tubule-derived OK cells. Am J Physiol Cell Physiol 283(3): S. C927-40 ALEXANDER, R. T., FURUYA, W., SZASZI, K., ORLOWSKI, J., und GRINSTEIN, S. (2005)Rho GTPases dictate the mobility of the Na/H exchanger NHE3 in epithelia: role in apical retention and targeting. Proc Natl Acad Sci U S A 102(34): S. 12253-8 ALI, O. H. A. (2005a) In vitro studies of ion transport in sheep omasum: interaction between Na, Cl and short chain fatty acids Freie Universität Berlin, Diss., 138 S. ALI, O. H. A. (2005b) Na transport across the isolated omasal epithelium of sheep by two independent electroneutral transport mechanism. Proc. Soc. Nutr. Physiol. 14 (98) ARONSON, P. S. (2006) Ion exchangers mediating Na+, HCO3 - and Cl- transport in the renal proximal tubule. J Nephrol 19 Suppl 9: S. S3-S10 ARONSON, P. S., NEE, J., und SUHM, M. A. (1982) Modifier role of internal H+ in activating the Na+-H+ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. Nature 299(5879): S. 161-3 ARONSON, P. S., SUHM, M. A., und NEE, J. (1983) Interaction of external H+ with the Na+-H+ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. J Biol Chem 258(11): S. 6767-71

BAZZINI, C., VEZZOLI, V., SIRONI, C., DOSSENA, S., RAVASIO, A., DE BIASI, S., GARAVAGLIA, M., RODIGHIERO, S., MEYER, G., FASCIO, U., FURST, J., RITTER, M., BOTTA, G., und PAULMICHL, M. (2005)
Thiazide-sensitive NaCl-cotransporter in the intestine: possible role of hydrochlorothiazide in the intestinal Ca2+ uptake. J Biol Chem 280(20): S. 19902-10

BEISELE, M., MARTENS, H., und SIEGLING-VLITAKIS, C. (2007)
 Bicarbonate absorption in sheep omasum is indirectly linked to Na-transport.
 Proc Soc Nutr Physiol 16(55)

BENOS, D. J. (1982)

Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells. Am J Physiol **242**(3): S. C131-45

BERGMAN, E. N. (1990)

Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species.

Physiol Rev **70**: S. 567-590

BILK, S., HUHN, K., HONSCHA, K. U., PFANNKUCHE, H., und GABEL, G. (2005)
 Bicarbonate exporting transporters in the ovine ruminal epithelium.
 J Comp Physiol [B] 175(5): S. 365-74

BINDER, H. J. und MEHTA, P. (1989)

Short-chain fatty acids stimulate active sodium and chloride absorption in vitro in the rat distal colon. Gastroenterology **96**(4): S. 989-96

- BINDER, H. J., STANGE, G., MURER, H., STIEGER, B., und HAURI, H. P. (1986)
 Sodium-proton exchange in colon brush-border membranes.
 Am J Physiol 251(3 Pt 1): S. G382-90
- BOOKSTEIN, C., MUSCH, M. W., DEPAOLI, A., XIE, Y., RABENAU, K., VILLEREAL, M.; RAO, M. C., und CHANG, E. B. (1996)
 Characterization of the rat Na+/H+ exchanger isoform NHE4 and localization in rat hippocampus.
 Am J Physiol 271(5 Pt 1): S. C1629-38
- BRETT, C. L., DONOWITZ, M., und RAO, R. (2005)Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers.Am J Physiol Cell Physiol 288(2): S. C223-39

BREVES, G. (1991)

Physiologische Grundlagen des gastrointestinalen P-Umsatzes und Bedeutung einer nicht bedarfsgerechten P-Versorgung beikleinen Wiederkäuern. Übers Tierernährung **19**: S. 23-44

BUENO, L., und RUCKEBUSCH, Y. (1974)

The cyclic motility of the omasum and its control in sheep. J Physiol **238**(2): S. 295-312

CABADO, A. G., YU, F. H., KAPUS, A., LUKACS, G., GRINSTEIN, S., und ORLOWSKI, J. (1996)

Distinct structural domains confer cAMP sensitivity and ATP dependence to the Na+/H+ exchanger NHE3 isoform. J Biol Chem **271**(7): S. 3590-9

CANESSA, M. (1994)

Erythrocyte sodium-lithium countertransport: another link between essential hypertension and diabetes. Curr Opin Nephrol Hypertens 3(5): S. 511-7

CANESSA, M. L. (1986)

Pathophysiology of the Na exchange and Na-K-Cl cotransport in essential hypertension: new findings and hypotheses. Ann N Y Acad Sci **488**: S. 276-80

CASSEL, D., KATZ, M., und ROTMAN, M. (1986) Depletion of cellular ATP inhibits Na+/H+ antiport in cultured human cells. Modulation of the regulatory effect of intracellular protons on the antiporter activity.

J Biol Chem **261**(12): S. 5460-6

CHA, B., OH, S., SHANMUGARATNAM, J., DONOWITZ, M., und YUN, C. C. (2003) Two histidine residues in the juxta-membrane cytoplasmic domain of Na+/H+ exchanger isoform 3 (NHE3) determine the set point. J Membr Biol **191**(1): S. 49-58

CHARNEY, A. N., EGNOR, R. W., CASSAI, N., und SIDHU, G. S. (2002) Carbon dioxide affects rat colonic Na+ absorption by modulating vesicular traffic. Gastroenterology **122**(2): S. 318-30

CHOW, C. W., KHURANA, S., WOODSIDE, M., GRINSTEIN, S., und ORLOWSKI, J. (1999)
The epithelial Na(+)/H(+) exchanger, NHE3, is internalized through a clathrin-mediated pathway.
J Biol Chem 274(53): S. 37551-8

COLLAZO, R., FAN, L., HU, M. C., ZHAO, H., WIEDERKEHR, M. R., und MOE, O. W. (2000)
 Acute regulation of Na+/H+ exchanger NHE3 by parathyroid hormone via NHE3 phosphorylation and dynamin-dependent endocytosis.
 J Biol Chem 275(41): S. 31601-8

DEMAUREX, N., ROMANEK, R. R., ORLOWSKI, J., und GRINSTEIN, S. (1997)
 ATP dependence of Na+/H+ exchange. Nucleotide specificity and assessment of the role of phospholipids.
 J Gen Physiol 109(2): S. 117-28

DENKER, S. P., HUANG, D. C., ORLOWSKI, J., FURTHMAYR, H., und BARBER, D. L. (2000)
Direct binding of the Na--H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H(+) translocation. Mol Cell 6(6): S. 1425-36

DHEIN, S., KRUSEMANN, K., ENGELMANN, F., und GOTTWALD, M. (1998)
Effects of the type-1 Na+/H+-exchange inhibitor cariporide (Hoe 642) on cardiac tissue.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 357(6): S. 662-70

DONOWITZ, M., JANECKI, A., AKHTER, S., CAVET, M. E., SANCHEZ, F.; LAMPRECHT, G., ZIZAK, M., KWON, W. L., KHURANA, S., YUN, C. H., und TSE, C. M. (2000)
Short-term regulation of NHE3 by EGF and protein kinase C but not protein kinase A involves vesicle trafficking in epithelial cells and fibroblasts. Ann N Y Acad Sci **915**: S. 30-42

DONOWITZ, M., und LI, X. (2007)

Regulatory binding partners and complexes of NHE3. Physiol Rev **87**(3): S. 825-72

DONOWITZ, M., und TSE, C. M. (2001)

Molecular physiology of mammalian epithelial Na/H exchangers NHE2 and NHE3. Curr Topics Membr **50**: S. 437-498

D'SOUZA, S., GARCIA-CABADO, A., YU, F., TETER, K., LUKACS, G., SKORECKI, K., MOORE, H. P., ORLOWSKI, J., und GRINSTEIN, S. (1998)
The epithelial sodium-hydrogen antiporter Na+/H+ exchanger 3 accumulates and is functional in recycling endosomes. J Biol Chem 273(4): S. 2035-43

DUBBERKE, M. (1988)

Studies on the flux of inorganic phosphate and of calcium across the isolated mucosa of the sheep omasum Freie Universität Berlin, Diss., 137 S.

DUHM, J., und BECKER, B. F. (1979)

Studies on lithium transport across the red cell membrane. V. On the nature of the Na+-dependent Li+ countertransport system of mammalian erythrocytes. J Membr Biol **51**(3-4): S. 263-86

EDRISE, B. M., SMITH, R. H., und HEWITT, D. (1986)

Exchanges of water and certain water-soluble minerals during passage of digesta through the stomach compartments of young ruminating bovines. Br J Nutr **55**(1): S. 157-68

EKMAN, J., und SPERBER, I. (1953)

The distribution of concentrations of bicarbonate (including carbon dioxide) and cloride in the omasum of cows. Lantbr Högsk Ann **19**: S. 227-231

ELADARI, D., BLANCHARD, A., LEVIEL, F., PAILLARD, M., STUART-TILLEY, A. K., ALPER, S. L., und PODEVIN, R. A. (1998) Functional and molecular characterization of luminal and basolateral Cl-/HCO-3 exchangers of rat thick limbs. Am J Physiol **275**(3 Pt 2): S. F334-42

ELLENBERGER, W. (1881) Zur Anatomie und Physiologie des dritten Magens der Wiederkäuer. Archiv f wissenschaft u prakt Tierheilk **VII. 1 u. 2**

ESCOBALES, N., und FIGUEROA, J. (1991)

Na+/Na+ exchange and Na+/H+ antiport in rabbit erythrocytes: two distinct transport systems.

J Membr Biol 120(1): S. 41-9

ETSCHMANN, B., HEIPERTZ, K. S., VON DER SCHULENBURG, A. und SCHWEIGEL, M. (2006)

A vH+-ATPase is present in cultured sheep ruminal epithelial cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **291**(6): S. G1171-9

FAVILLI, P. D. N. (1937)

Struktur und Tätigkeit des dritten Magens (Blättermagen oder Psalter) bei den Hauswiederkäuern. Dtsch. Tierärztl. Wschr. **45**: 592-594

GÄBEL, G., und MARTENS H. (1991)

Transport of Na+ and Cl- across the forestomach epithelium: mechanism and interactions with short-chain fatty acids. Physiology aspects and metabolism in ruminants.

Academic press, Orlando, Florida: S. 129-151

GÄBEL, G., ASCHENBACH, J. R., und MULLER, F. (2002) Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: implications and limitations. Anim Health Res Rev 3(1): S. 15-30

GÄBEL, G., und SEHESTED, J. (1997)

SCFA transport in the forestomach of ruminants. Comp Biochem Physiol A Physiol **118**(2): S. 367-74

GÄBEL, G., VOGLER, S., und MARTENS, H. (1991)

Short-chain fatty acids and CO2 as regulators of Na+ and Cl- absorption in isolated sheep rumen mucosa. J Comp Physiol [B] **161**(4): S. 419-26

83

GIESECKE, D., und VON ENGELHARDT, W. (1975)
Functions of Omasum in Small Ruminants
2. Fermentation Rate and DNA Content.
Zentralbl Veterinärmed - Reihe A 22(3): S. 177-186

GISLER, S. M., PRIBANIC, S., BACIC, D., FORRER, P., GANTENBEIN, A., SABOURIN, L. A., TSUJI, A., ZHAO, Z. S., MANSER, E., BIBER, J., und MURER, H. (2003)
PDZK1: I. a major scaffolder in brush borders of proximal tubular cells. Kidney Int 64(5): S. 1733-45

- GRABE, M., und OSTER, G. (2001) Regulation of organelle acidity. J Gen Physiol **117**(4): S. 329-44
- GRINSTEIN, S., GOETZ, J. D., und ROTHSTEIN, A. (1984)
 22Na+ fluxes in thymic lymphocytes. II. Amiloride-sensitive Na+/H+ exchange pathway; reversibility of transport and asymmetry of the modifier site.
 J Gen Physiol 84(4): S. 585-600
- HAAS, M., SCHOOLER, J., und TOSTESON, D. C. (1975) Coupling of lithium to sodium transport in human red cells. Nature **258**(5534): S. 425-7
- HARRISON, F. A. (1971) Ion transport across rumen and omasum epithelium. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **262**(842): S. 301-5
- HARRISON, F. A., KEYNES, R. D., und ZURICH, L. (1970) Ion Transport across Isolated Omasal Epithelium of Sheep. J Physiol (Lond) 207(1): S. P24-&25
- HAUFFE, R., und VON ENGELHARDT, W. (1973)
 Funktionen des Blättermagens bei kleinen Hauswiederkäuern (I.Zufluß und Verweildauer von festen Teilchen und von Flüssigkeit).
 Zentralbl Veterinarmed A 22: S. 149-163
- HAUFFE, R., und VON ENGELHARDT, W. (1975)[Functions of the omasum of small ruminants. III. Absorption of water].Zentralbl Veterinarmed A 22(4): S. 283-95

HAYASHI, H., SZASZI, K., COADY-OSBERG, N., FURUYA, W., BRETSCHER, A. P., ORLOWSKI, J., und GRINSTEIN, S. (2004)
Inhibition and redistribution of NHE3, the apical Na+/H+ exchanger, by Clostridium difficile toxin B.
J Gen Physiol **123**(5): S. 491-504

HAYASHI, H., SZASZI, K., COADY-OSBERG, N., ORLOWSKI, J., KINSELLA, J. L., und GRINSTEIN, S. (2002)
A slow pH-dependent conformational transition underlies a novel mode of activation of the epithelial Na+/H+ exchanger-3 isoform. J Biol Chem 277(13): S. 11090-6

- HISAMITSU, T., PANG, T., SHIGEKAWA, M., und WAKABAYASHI, S. (2004)
 Dimeric interaction between the cytoplasmic domains of the Na+/H+ exchanger
 NHE1 revealed by symmetrical intermolecular cross-linking and selective coimmunoprecipitation.
 Biochemistry 43(34): S. 11135-43
- HOFMANN, R. R., und SCHNORR, B. (1982) Die funktionelle Morphologie des Wiederkäuer-Magens. Enke Verlag, Stuttgart
- HOLLER, H., BREVES, G., und DUBBERKE, M. (1988)
 Flux of inorganic phosphate and calcium across the isolated mucosa of the sheep omasum.
 Zentralbl Veterinarmed A 35(9): S. 709-16

HUNTE, C., SCREPANTI, E., VENTURI, M., RIMON, A., PADAN, E., und MICHEL, H. (2005)
Structure of a Na+/H+ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH. Nature 435(7046): S. 1197-202

IVES, H. E., YEE, V. J., und WARNOCK, D. G. (1983)
Mixed type inhibition of the renal Na+/H+ antiporter by Li+ and amiloride. Evidence for a modifier site.
J Biol Chem 258(16): S. 9710-6

JACOB, P., ROSSMANN, H., LAMPRECHT, G., KRETZ, A., NEFF, C., LIN-WU, E., GREGOR, M., GRONEBERG, D. A., KERE, J., und SEIDLER, U. (2002) Down-regulated in adenoma mediates apical Cl-/HCO3- exchange in rabbit, rat, and human duodenum. Gastroenterology 122(3): S. 709-24

JANECKI, A. J., JANECKI, M., AKHTER, S., und DONOWITZ, M. (2000) Basic fibroblast growth factor stimulates surface expression and activity of Na(+)/H(+) exchanger NHE3 via mechanism involving phosphatidylinositol 3-kinase. J Biol Chem 275(11): S. 8133-42

JANECKI, A. J., MONTROSE, M. H., ZIMNIAK, P., ZWEIBAUM, A., TSE, C. M., KHURANA, S., und DONOWITZ, M. (1998)
Subcellular redistribution is involved in acute regulation of the brush border Na+/H+ exchanger isoform 3 in human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. Protein kinase C-mediated inhibition of the exchanger. J Biol Chem 273(15): S. 8790-8

KAPUS, A., GRINSTEIN, S., WASAN, S., KANDASAMY, R., und ORLOWSKI, J. (1994)
 Functional characterization of three isoforms of the Na+/H+ exchanger stably
 expressed in Chinese hamster ovary cells. ATP dependence, osmotic sensitivity, and
 role in cell proliferation.
 J Biol Chem 269(38): S. 23544-52

- KHURANA, S., NATH, S. K., LEVINE, S. A., BOWSER, J. M., TSE, C. M., COHEN, M. E., und DONOWITZ, M. (1996)
 Brush border phosphatidylinositol 3-kinase mediates epidermal growth factor stimulation of intestinal NaCl absorption and Na+/H+ exchange. J Biol Chem 271(17): S. 9919-27
- KIM, J. H., LEE-KWON, W., PARK, J. B., RYU, S. H., YUN, C. H., und DONOWITZ, M. (2002)
 Ca(2+) dependent inhibition of Na+/H+ exchanger 3 (NHE3) requires an NHE3

Ca(2+)-dependent inhibition of Na+/H+ exchanger 3 (NHE3) requires an NHE3-E3KARP-alpha-actinin-4 complex for oligomerization and endocytosis. J Biol Chem **277**(26): S. 23714-24

KURASHIMA, K., SZABO, E. Z., LUKACS, G., ORLOWSKI, J., und GRINSTEIN, S. (1998)
 Endosomal recycling of the Na+/H+ exchanger NHE3 isoform is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway.
 J Biol Chem 273(33): S. 20828-36

KURASHIMA, K., YU, F. H., CABADO, A. G., SZABO, E. Z., GRINSTEIN, S., und ORLOWSKI, J. (1997)
Identification of sites required for down-regulation of Na+/H+ exchanger NHE3 activity by cAMP-dependent protein kinase. phosphorylation-dependent and independent mechanisms.

J Biol Chem 272(45): S. 28672-9

- LACROIX, J., POET, M., MAEHREL, C., und COUNILLON, L. (2004) A mechanism for the activation of the Na/H exchanger NHE-1 by cytoplasmic acidification and mitogens. EMBO Rep **5**(1): S. 91-6
- LAMPRECHT, G., WEINMAN, E. J., und YUN, C. H. (1998) The role of NHERF and E3KARP in the cAMP-mediated inhibition of NHE3. J Biol Chem **273**(45): S. 29972-8
- LEE-KWON, W., JOHNS, D. C., CHA, B., CAVET, M., PARK, J., TSICHLIS, P., und DONOWITZ, M. (2001)
 Constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase and AKT are sufficient to stimulate the epithelial Na+/H+ exchanger 3.
 J Biol Chem 276(33): S. 31296-304
- LEE-KWON, W., KAWANO, K., CHOI, J. W., KIM, J. H., und DONOWITZ, M. (2003) Lysophosphatidic acid stimulates brush border Na+/H+ exchanger 3 (NHE3) activity by increasing its exocytosis by an NHE3 kinase A regulatory protein-dependent mechanism. J Biol Chem 278(19): S. 16494-501

LEONHARD-MAREK, S., SCHRÖDER , B., und BUSCHE R. (2004) Effects of chloride and sulphate ions on the surface pH of rumen epithelium. Proc Soc Nutr Physiol **13**: S. 58 LEVINE, S. A., NATH, S. K., YUN, C. H., YIP, J. W., MONTROSE, M., DONOWITZ, M., und TSE, C. M. (1995)
Separate C-terminal domains of the epithelial specific brush border Na+/H+ exchanger isoform NHE3 are involved in stimulation and inhibition by protein kinases/growth factors.
J Biol Chem 270(23): S. 13716-25

- LI, X.; ALVAREZ, B., CASEY, J. R., REITHMEIER, R. A., und FLIEGEL, L. (2002) Carbonic anhydrase II binds to and enhances activity of the Na+/H+ exchanger. J Biol Chem **277**(39): S. 36085-91
- LI, X., GALLI, T., LEU, S., WADE, J. B., WEINMAN, E. J., LEUNG, G., CHEONG, A., LOUVARD, D., und DONOWITZ, M. (2001) Na+-H+ exchanger 3 (NHE3) is present in lipid rafts in the rabbit ileal brush border: a role for rafts in trafficking and rapid stimulation of NHE3. J Physiol **537**(Pt 2): S. 537-52
- LI, X.; ZHANG, H., CHEONG, A., LEU, S., CHEN, Y., ELOWSKY, C. G., und DONOWITZ, M. (2004)
 Carbachol regulation of rabbit ileal brush border Na+-H+ exchanger 3 (NHE3) occurs through changes in NHE3 trafficking and complex formation and is Src dependent. J Physiol 556(Pt 3): S. 791-804
- MALO, M. E., und FLIEGEL, L. (2006) Physiological role and regulation of the Na+/H+ exchanger. Can J Physiol Pharmacol **84**(11): S. 1081-95
- MARTENS , H., und GÄBEL, G. (1988)
 Transport of Na and Cl across the epithelium of ruminant forestomachs: rumen and omasum.
 Comp Biochem Physiol A90: S. 569-575
- MARTENS, H., KRUTZFELD, T., und WOLF, K. (2004)
 Sodium transport across the isolated epithelium of sheep omasum is influenced by luminal ammonia.
 J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 51(2): S. 46-51
- MARTENS, H., KUDRITZKI J., WOLF K., und SCHWEIGEL M. (2001) No evidence for active peptide transport in forestomach epithelia of sheep. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl.) 2001 Oct; **85 (9-10)**: S. 314-24
- MASEREEL, B., POCHET, L., und LAECKMANN, D. (2003) An overview of inhibitors of Na(+)/H(+) exchanger. Eur J Med Chem **38**(6): S. 547-54
- MATTHEWS, J. C., WONG, E. A., BENDER, P. K., BLOOMQUIST, J. R., und WEBB, K. E., JR. (1996)
 Demonstration and characterization of dipeptide transport system activity in sheep omasal epithelium by expression of mRNA in Xenopus laevis oocytes. J Anim Sci 74(7): S. 1720-7

MC SWEENEY,	С.	(1988)
-------------	----	--------

A comparative study of the anatomy of the omasum in domesticated ruminants. Aust Vet J **65**: 205-207

MCCOLLUM, M. Q., und WEBB, K. E., JR. (1998)

Glycyl-L-sarcosine absorption across ovine omasal epithelium during coincubation with other peptide substrates and volatile fatty acids. J Anim Sci 76(10): S. 2706-11

MCDOUGAL, W. S., STAMPFER, D. S., KIRLEY, S., BENNETT, P. M., und LIN, C. W. (1995)

Intestinal ammonium transport by ammonium and hydrogen exchange. J Am Coll Surg **181**(3): S. 241-8

MERTZ, D. P., und SCHETTLER, G. (1959)

Comparative clinical studies on new diuretics; experiences with hydrochlorothiazide. Med Klin (Munich) **54**(16): S. 782-4

MOE, O. W. (1999)

Acute regulation of proximal tubule apical membrane Na/H exchanger NHE-3: role of phosphorylation, protein trafficking, and regulatory factors. J Am Soc Nephrol **10**(11): S. 2412-25

MOE, O. W., AMEMIYA, M., und YAMAJI, Y. (1995)

Activation of protein kinase A acutely inhibits and phosphorylates Na/H exchanger NHE-3. J Clin Invest **96**(5): S. 2187-94

MONTROSE, M. H., und CHU, S. (1997)

Transepithelial SCFA gradients regulate polarized Na/H exchangers and pH microdomains in colonic epithelia. Comp Biochem Physiol A Physiol **118**(2): S. 389-93

MORGAN, K., und CANESSA, M. (1990)

Interactions of external and internal H+ and Na+ with Na+/Na+ and Na+/H+ exchange of rabbit red cells: evidence for a common pathway. J Membr Biol **118**(3): S. 193-214

MÜLLER, F., ASCHENBACH, J. R., und GÄBEL, G. (2000) Role of Na+/H+ exchange and HCO3- transport in pHi recovery from intracellular acid load in cultured epithelial cells of sheep rumen. J Comp Physiol [B] 170(4): S. 337-43

- MURRAY, M. G., REID, R. S., und SUTHERLAND, T. M. (1962) The rate of passage of digesta from the reticulo-rumen of the sheep. J Physiol Soc **164**(Proceedings): S. 26
- MUSCH, M. W., BOOKSTEIN, C., XIE, Y., SELLIN, J. H., und CHANG, E. B. (2001) SCFA increase intestinal Na absorption by induction of NHE3 in rat colon and human intestinal C2/bbe cells.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **280**(4): S. G687-93

NICKEL, R., SCHUMMER, A., und SEIFERLE, E. (1999) Lehrbuch der Anatomie der Haustiere - Band II: Eingeweide. -8., vollst. neubearb. Aufl.

Berlin ; Hamburg: Parey- ISBN:3-8263-3179-6

NIEBUHR, V. (2003)

In vitro Untersuchungen zum Bicarbonattransport des Blättermagenepithels von Schafen

- Freie Universität Berlin, Diss., 102 S.
- OYAERT, W., und BOUCKAERT, J. H. (1961) A study of passage of fluid through the sheep's omasum. Res vet Sci **2**: S. 41 - 52
- PETERSEN, K. U., WOOD, J. R., SCHULZE, G., und HEINTZE, K. (1981) Stimulation of gallbladder fluid and electrolyte absorption by butyrate. J Membr Biol **62**(3): S. 183-93
- PFEFFER, E., BERTZBACH, J., und LENKEIT, W. (1966)
 Untersuchungen über das Verhalten der mineralischen Mengenelemente im Verdauungskanal von Schafen bei Zufütterung von NaCl oder KCl.
 Z Tierphysiol Tierernahr Futtermittelkd 22: S. 115-24

PFEFFER, E., THOMPSON, A., und ARMSTRON.D. (1970)
Studies on Intestinal Digestion in Sheep.3. Net Movement of Certain Inorganic
Elements in Digestive Tract on Rations Containing Different Proportions of Hay and
Rolled Barley.
Brit J Nutr 24: 197-204

POWIS, G., BONJOUKLIAN, R., BERGGREN, M. M., GALLEGOS, A., ABRAHAM, R., ASHENDEL, C., ZALKOW, L., MATTER, W. F., DODGE, J., GRINDEY, G., und ET AL. (1994)
Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. Cancer Res 54(9): S. 2419-23

RAJENDRAN, V. M., und BINDER, H. J. (1990)Characterization of Na-H exchange in apical membrane vesicles of rat colon.J Biol Chem 265(15): S. 8408-14

- RAJENDRAN, V. M., GEIBEL, J., und BINDER, H. J. (1995)
 Chloride-dependent Na-H exchange. A novel mechanism of sodium transport in colonic crypts.
 J Biol Chem 270(19): S. 11051-4
- RAJENDRAN, V. M., GEIBEL, J., und BINDER, H. J. (2001)
 Characterization of apical membrane Cl-dependent Na/H exchange in crypt cells of rat distal colon.
 Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 280(3): S. G400-5

RAMIREZ, M., FERNANDEZ, R., und MALNIC, G. (1999) Permeation of NH3/NH4+ and cell pH in colonic crypts of the rat. Pflugers Arch **438**(4): S. 508-15

SABOLIC, I., HERAK-KRAMBERGER, C. M., LJUBOJEVIC, M., BIEMESDERFER, D., und BROWN, D. (2002)
 NHE3 and NHERF are targeted to the basolateral membrane in proximal tubules of colchicine-treated rats.
 Kidney Int 61(4): S. 1351-64

- SANGAN, P., RAJENDRAN, V. M., GEIBEL, J. P., und BINDER, H. J. (2002) Cloning and expression of a chloride-dependent Na+-H+ exchanger. J Biol Chem 277(12): S. 9668-75
- SARDET, C., COUNILLON, L., FRANCHI, A., und POUYSSEGUR, J. (1990)
 Growth factors induce phosphorylation of the Na+/H+ antiporter, glycoprotein of 110 kD.
 Science 247 (4943): S. 723-6

SAUER, F. A. (1973)

Non equilibrium thermodynamics of kidney tubule transport. Handbook of Physiology; Am Physiol Soc, Washington DC: S. 399-414

- SCHULTHEIS, P. J., CLARKE, L. L., MENETON, P., MILLER, M. L., SOLEIMANI, M., GAWENIS, L. R., RIDDLE, T. M., DUFFY, J. J., DOETSCHMAN, T., WANG, T., GIEBISCH, G., ARONSON, P. S., LORENZ, J. N., und SHULL, G. E. (1998)
 Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na+/H+ exchanger. Nat Genet 19(3): S. 282-5
- SCHWARK, J. R., JANSEN, H. W., LANG, H. J., KRICK, W., BURCKHARDT, G., und HROPOT, M. (1998)

S3226, a novel inhibitor of Na+/H+ exchanger subtype 3 in various cell types. Pflugers Arch **436**(5): S. 797-800

SCOTT, A. U. G., I.C. (1971)

The surface of the ovine omasum as seen with the scanning electron microscope (Mammalia, Bovidae). Z Morph Tiere **70**: S. 229-37

SCOTT, D. (1967)

The effects of potassium supplements upon the absorption of potassium and sodium from the sheep rumen.

Q J Exp Physiol Cogn Med Sci 52(4): S. 382-91

SEAL, C. J., und PARKER, D. S. (1996)

Effect of intraruminal propionic acid infusion on metabolism of mesenteric- and portal-drained viscera in growing steers fed a forage diet: II. Ammonia, urea, amino acids, and peptides.

J Anim Sci **74**(1): S. 245-56

SEHESTED, J., DIERNAES, L., MOLLER, P. D., und SKADHAUGE, E. (1999)
 Ruminal transport and metabolism of short-chain fatty acids (SCFA) in vitro: effect of SCFA chain length and pH.
 Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 123(4): S. 359-68

SHEN, Z., SEYFERT, H. M., LOHRKE, B., SCHNEIDER, F., ZITNAN, R., CHUDY, A., KUHLA, S., HAMMON, H. M., BLUM, J. W., MARTENS, H., HAGEMEISTER, H., und VOIGT, J. (2004)
An energy-rich diet causes rumen papillae proliferation associated with more IGF type 1 receptors and increased plasma IGF-1 concentrations in young goats. J Nutr 134(1): S. 11-17

- SHEN, Z. Z., H., YANG, W., und MARTENS, H. (2008)Detection of NHE1 and NHE3 mRNA in omasal epithelium of weanling goat.Proc Soc Nutr Physiol; Frankfurt am Main: S. 124
- SHENOLIKAR, S., und WEINMAN, E. J. (2001) NHERF: targeting and trafficking membrane proteins. Am J Physiol Renal Physiol **280**(3): S. F389-95
- SILVIANI, V., COLOMBANI, V., HEYRIES, L., GEROLAMI, A., CARTOUZOU, G., und MARTEAU, C. (1996)
 Role of the NHE3 isoform of the Na+/H+ exchanger in sodium absorption by the rabbit gallbladder.
 Pflugers Arch 432(5): S. 791-6
- SKLAN, D., und HURWITZ, S. (1985)
 Movement and absorption of major minerals and water in ovine gastrointestinal tract.
 J Dairy Sci 68(7): S. 1659-66
- SMITH, R. H. (1984) Microbial activity in the omasum. Proc Nutr Soc **43**: S. 63-68
- STEVENS, C. E. (1964)

Transport of Sodium and Chloride by the Isolated Rumen Epithelium. Am J Physiol **206**: S. 1099-105

STEVENS, C. E., SELLERS, A. F., und SPURRELL, A. (1960) Function of bovine omasum in ingesta transfer. Am. J. Physiol. **198**(2): S. 449-455

STOKES, J. B. (1988)

Passive NaCl transport in the flounder urinary bladder: predominance of a cellular pathway. Am J Physiol **255**(2 Pt 2): S. F229-36

THWAITES, D. T., KENNEDY, D. J., RALDUA, D., ANDERSON, C. M., MENDOZA, M. E., BLADEN, C. L., und SIMMONS, N. L. (2002)
H/dipeptide absorption across the human intestinal epithelium is controlled indirectly via a functional Na/H exchanger.

Gastroenterol **122**(5): S. 1322-33

TILING, C. (1997)

In vitro Untersuchungen zum Cloridtransport des Blättermgenepithels von Schafen Freie Universität Berlin, Diss., 134 S.

TRAUTMANN, A., und SCHMITT, I. (1935)

Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Psalterfunktion. Dtsch. Tierärztl. Wschr. **105** (Nr.7) S.177-79

USSING, H. H., und ZERAHN, K. (1951)

Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. Acta Physiol Scand **23**(2-3): S. 110-27

VIGNE, P., FRELIN, C., CRAGOE, E. J., JR., und LAZDUNSKI, M. (1984)
 Structure-activity relationships of amiloride and certain of its analogues in relation to the blockade of the Na+/H+ exchange system.
 Mol Pharmacol 25(1): S. 131-6

VON ENGELHARDT, W., und BREVES, G. (2000) Physiologie der Haustiere. Enke Verlag, Stuttgart, 2000

VON ENGELHARDT, W., und HAUFFE, R. (1975)
 Functions of Omasum in Small Domestic Ruminants .4. Absorption and Secretion of Electrolytes.
 Zentralbl Veterinarmed - Reihe A 22(5): S. 363-375

- WAKABAYASHI, S., BERTRAND, B., SHIGEKAWA, M., FAFOURNOUX, P., und POUYSSEGUR, J. (1994)
 Growth factor activation and "H(+)-sensing" of the Na+/H+ exchanger isoform 1 (NHE1). Evidence for an additional mechanism not requiring direct phosphorylation. J Biol Chem 269(8): S. 5583-8
- WAKABAYASHI, S., FAFOURNOUX, P., SARDET, C., und POUYSSEGUR, J. (1992) The Na+/H+ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H(+)-sensing". Proc Natl Acad Sci U S A 89(6): S. 2424-8
- WAKABAYASHI, S., HISAMITSU, T., PANG, T., und SHIGEKAWA, M. (2003a)
 Kinetic dissection of two distinct proton binding sites in Na+/H+ exchangers by
 measurement of reverse mode reaction.
 J Biol Chem 278(44): S. 43580-5
- WAKABAYASHI, S., HISAMITSU, T., PANG, T., und SHIGEKAWA, M. (2003b)
 Mutations of Arg440 and Gly455/Gly456 oppositely change pH sensing of Na+/H+ exchanger 1.
 J Biol Chem 278(14): S. 11828-35

- WAKABAYASHI, S., SHIGEKAWA, M., und POUYSSEGUR, J. (1997) Molecular physiology of vertebrate Na+/H+ exchangers. Physiol Rev **77**(1): S. 51-74
- WARNOCK, D. G., YANG, W. C., HUANG, Z. Q., und CRAGOE, E. J., JR. (1988) Interactions of chloride and amiloride with the renal Na+/H/ antiporter. J Biol Chem **263**(15): S. 7216-21
- WEBB, K. E., JR., DIRIENZO, D. B., und MATTHEWS, J. C. (1993)
 Recent developments in gastrointestinal absorption and tissue utilization of peptides: a review.
 J Dairy Sci 76(1): S. 351-61
- WEGELER, C. (2008) Transport von HCO3- am isolierten Psalterepithel des Schafes. Freie Universität Berlin, Diss., 134 S.
- WIEDERKEHR, M. R., ZHAO, H., und MOE, O. W. (1999)
 Acute regulation of Na/H exchanger NHE3 activity by protein kinase C: role of NHE3 phosphorylation.
 Am J Physiol 276(5 Pt 1): S. C1205-17
- YAMAMOTO, Y., KITAMURA, N., YAMADA, J., und YAMASHITA, T. (1991) Muscular architecture in the omasal laminae of cattle and sheep. Vet Res Commun **15**(4): S. 249-56
- YIP, J. W., KO, W. H., VIBERTI, G., HUGANIR, R. L., DONOWITZ, M., und TSE, C. M. (1997)
 Regulation of the epithelial brush border Na+/H+ exchanger isoform 3 stably expressed in fibroblasts by fibroblast growth factor and phorbol esters is not through changes in phosphorylation of the exchanger. J Biol Chem 272(29): S. 18473-80
- YUN, C. C., CHEN, Y., und LANG, F. (2002)
 Glucocorticoid activation of Na(+)/H(+) exchanger isoform 3 revisited. The roles of SGK1 and NHERF2.
 J Biol Chem 277(10): S. 7676-83
- YUN, C. H., LAMPRECHT, G., FORSTER, D. V., und SIDOR, A. (1998)
 NHE3 kinase A regulatory protein E3KARP binds the epithelial brush border Na+/H+ exchanger NHE3 and the cytoskeletal protein ezrin.
 J Biol Chem 273(40): S. 25856-63
- YUN, C. H., OH, S., ZIZAK, M., STEPLOCK, D., TSAO, S., TSE, C. M., WEINMAN, E. J., und DONOWITZ, M. (1997)
 cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na+/H+ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein.
 Proc Natl Acad Sci U S A 94(7): S. 3010-5

ZACHOS, N. C., TSE, M., und DONOWITZ, M. (2005) Molecular physiology of intestinal Na+/H+ exchange. Ann Rev Physiol **67**: S. 411-43

ZHAO, H., WIEDERKEHR, M. R., FAN, L., COLLAZO, R. L., CROWDER, L. A., und MOE, O. W. (1999)
Acute inhibition of Na/H exchanger NHE-3 by cAMP. Role of protein kinase a and NHE-3 phosphoserines 552 and 605.
J Biol Chem 274(7): S. 3978-87

8 Anhang

8.1 Tabellen zu den Ergebnissen

Tab. 1(zu Abbildung 9): Sättigungskinetik bei pH 7,4[x ± SEM; * ($p \le 0,05$)signifikant verschieden im Vergleich zur Reihe darüber; # ($p \le 0,05$) signifikant verschieden
beim Vergleich von J_{net} und I_{sc} in einer Behandlungsgruppe]

	J _{ms} ^{Na}	J _{sm} ^{Na}	J _{net} ^{Na}	I _{sc}	Gt	
		µeq c	m ^{-2.} h ⁻¹		mS ⁻ cm ⁻²	N/n
12mM Na	1,94±0,39	0,62±0,17	1,32±0,42	1,25± 0,48	1,51±0,20	3/9
25mM Na	2,79±0,34*	0,70±0,32	2,09±0,34* [#]	1,29±0,45	2,00±0,17*	3/8
55mM Na	3,54 ±0,78	1,05±0,17*	2,49±0,67 [#]	1,51±0,39*	1,46±0,15*	3/6
125mM Na	4,45±0,77	1,47±0,30*	2,98±0,61 [#]	1,68±0,36	2,36±0,19*	3/6

Tab. 2(zu Abbildung 10): Sättigungskinetik bei pH 7,4 nach Amilorid
[x ± SEM;
* (p $\leq 0,05$) signifikant verschieden im Vergleich zur Reihe darüber; # (p $\leq 0,05$) signifikant
verschieden beim Vergleich von J_{net} und I_{sc} in einer Behandlungsgruppe; a (p $\leq 0,05$)
signifikant verschieden beim Vergleich von J_{ms} und I_{sc} in einer Behandlungsgruppe]

	J _{ms} ^{Na}	J _{sm} ^{Na}	J _{net} ^{Na}	I _{sc}	Gt		
		µeq'cm ⁻² ·h ⁻¹					
12mM Na	$0,35\pm0,05^{a}$	0,15±0,05	0,20±0,04 [#]	0,62±0,12	1,90±0,10	3/9	
25mM Na	0,61±0,13*	0,22±0,07*	0,39±0,12* [#]	0,72±0,12	1,74±0,10*	3/8	
55mM Na	1,21±0,27* ^a	0,34±0,11*	0,87±0,21*	0,89±0,12*	1,60±0,12*	3/6	
125mM Na	3,09±0,93* ^a	0,90±0,23*	2,19±0,89*	1,10±0,14*	2,35±0,22*	3/6	

Tab. 3	(zu Abbildung 11): Sättigungskinetik bei pH 6,4 [x \pm SEM; * (p ≤ 0.05)
	signifikant verschieden im Vergleich zur Reihe darüber; # ($p \le 0.05$) signifikant verschieden
	beim Vergleich von J _{net} und I _{sc} in einer Behandlungsgruppe]

	J _{ms} ^{Na}	J _{sm} ^{Na}	J _{net} ^{Na}	I _{sc}	Gt	
		µeq [·] cm ⁻² ·h ⁻¹				
12mM Na	1,58±0,55	0,69±0,26	0,89±0,56	0,60± 0,09	1,59±0,13	3/6
25mM Na	3,02±0,77*	0,83±0,17	2,18±0,66* [#]	1,15±0,19*	1,49±0,71	3/6
55mM Na	5,55 ±0,60*	1,45±0,45*	4,10±0,79* [#]	1,12±0,22	1,75±0,52	3/8
125mM Na	7,29±0,63*	2,49±0,76*	4,81±0,87 [#]	1,75±0,25*	1,73±0,30	3/7

Tab. 4(zu Abbildung 12): Sättigungskinetik bei pH 6,4 nach Amilorid [x ± SEM;
* (p ≤ 0.05) signifikant verschieden im Vergleich zur Reihe darüber; # (p ≤ 0.05) signifikant
verschieden beim Vergleich von J_{net} und I_{sc} in einer Behandlungsgruppe; a (p ≤ 0.05)
signifikant verschieden beim Vergleich von J_{ms} und I_{sc} in einer Behandlungsgruppe]

	J _{ms} ^{Na}	$\mathbf{J_{sm}}^{Na}$	J _{net} ^{Na}	I _{sc}	Gt		
		$\mu eq^{-}cm^{-2}h^{-1}$					
12mM Na	0,35±0,12	0,17±0,04	0,17±0,14	0,25± 0,09	1,90±0,17	3/6	
25mM Na	0,65±0,17*	0,22±0,05	0,44±0,19*	0,50±0,11*	1,66±0,32	3/6	
55mM Na	1,57±0,55* ^a	0,47±0,08*	1,10±0,57*	0,66±0,17	1,78±0,36	3/8	
125mM Na	2,81±0,61* ^a	0,91±0,29*	1,90±0,76* [#]	1,07±0,13*	1,69±0,31	3/7	

Tab. 5(zu Abbildung 15): Effekt von 1mM Amilorid und 1mM HCTZ in
Kombination bei 125mM Na⁺, bei pH 7,4 [x \pm SEM; * (p \leq 0,05) signifikant
verschieden im Vergleich zur Reihe darüber; # (p \leq 0,05) signifikant verschieden beim
Vergleich von J_{net} und I_{sc} in einer Behandlungsgruppe]

	J _{ms} ^{Na}	$\mathbf{J_{sm}}^{Na}$	J _{net} ^{Na}	I _{sc}	Gt	
		$\mu eq^{-}cm^{-2}h^{-1}$				
pH 7,4 Kontrolle	5,86±0,97	2,21±0,64	3,65±0,65	$1,57 \pm 0,29$	1,88±0,27	3/10
1mM Amilorid	3,04±0,43*	1,39±0,29	1,65±0,39*	1,11±0,14*	1,77±0,21	3/9
1mM HCTZ	2,57 ±0,46*	1,11±0,20*	1,46±0,48 [#]	0,77±0,18*	1,81±0,20	3/8

Tab. 6(zu Abbildung 16): Effekt von 1mM HCTZ und 1mM Amilorid in
Kombination bei 125mM Na⁺, bei pH 7,4 [x ± SEM; * (p \leq 0,05) signifikant
verschieden im Vergleich zur Reihe darüber; # (p \leq 0,05) signifikant verschieden beim
Vergleich von J_{net} und I_{sc} in einer Behandlungsgruppe]

	J _{ms} ^{Na}	J _{sm} ^{Na}	J _{net} ^{Na}	I _{sc}	Gt		
		ueg [·] cm ^{-2·} h ⁻¹					
pH 7,4 Kontrolle	5,79±1,08	1,85±0,39	3,94±0,95	1,41 ± 0,61	1,62±0,31	3/13	
1mM HCTZ	4,65±0,67*	1,49±0,32*	3,16±0,87*	1,02±0,23*	1,59±0,20	3/12	
1mM Amilorid	2,51 ±0,76*	1,06±0,40*	1,46±0,67* [#]	0,72±0,15*	1,47±0,17	3/12	

Tab. 7(zu Abbildung 22): Acetatfluxe VOR der Applikation von 1µM S3226 –
bei steigender Acetatkonzentration auf der mukosalen Seite
 $[x \pm SEM; * (p \le 0.05)$ signifikant verschieden im Vergleich zur Reihe darüber]

	J _{ms} ^{Acetat}	J _{sm} ^{Acetat}	J _{net} ^{Acetat}	I _{sc}	Gt	
		µeq [·] c	m ^{-2.} h ⁻¹		mS ⁻ cm ⁻²	N/n
25mM Acetat mukosal	2,61±0,35	2,81±0,74	-0,20±0,47	1,07 ±0,39	1,88±0,62	6/12
50mM Acetat mukosal	4,79±0,87*	3,39±0,96	1,40±1,40*	1,07±0,35	1,75±0,52	6/12
100mM Acetat mukosal	9,88±1,94*	3,72±0,72	6,16±1,92*	1,04±0,36	1,73±0,73	6/10

Tab. 8(zu Abbildung 22): Acetatfluxe NACH der Applikation von 1 μ M S3226 –
bei steigender Acetatkonzentration auf der mukosalen Seite [x ± SEM; * (p
 $\leq 0,05$) signifikant verschieden im Vergleich zur Reihe darüber]

J_{sm}^{Acetat} J_{net}^{Acetat} J_{ms}^{Acetat} Isc Gt N/n $\mu eq^{-}cm^{-2}h^{-1}$ $mS^{-}cm^{-2}$ 25mM Acetat 6/9 $1,66\pm0,39$ $1,89\pm0,46$ $-0,23\pm0,51$ $0,40 \pm 0,22$ 2,23±0,43 +S3226 50mM Acetat 3,03±0,63* 0,75±0,93* 6/9 2,27±0,72 $0,38\pm0,20$ $2,10\pm0,40$ +S3226 **100mM Acetat** 5,67±1,94* 3,49±0,80* $2,18\pm2,12$ $0,34\pm0,22$ 1,80±0,33 6/10 +S3226

Tab. 9(zu Abbildung 23): Na⁺-Fluxe VOR der Applikation von 1 μ M S3226 – bei
steigender Acetatkonzentration auf der mukosalen Seite
 [x ± SEM; * (p ≤ 0,05) signifikant verschieden im Vergleich zur Reihe darüber]

	J _{ms} ^{Na}	${f J_{sm}}^{Na}$	J _{net} ^{Na}	I _{sc}	Gt	
		µeq [·] cm ⁻² ·h ⁻¹				
25mM Acetat mukosal	9,08±1,99	5,08±1,10	4,00±1,23	1,07 ±0,39	1,88±0,62	6/10
50mM Acetat mukosal	9,52±2,25	4,96±1,20	4,56±1,57	1,07±0,35	1,75±0,52	6/12
100mM Acetat mukosal	13,16 ±3,46*	5,61±1,61	7,55±3,30*	1,04±0,36	1,73±0,73	6/14

Tab. 10(zu Abbildung 23): Na⁺-Fluxe NACH der Applikation von 1µM S3226 –
bei steigender Acetatkonzentration auf der mukosalen Seite
[x ± SEM; * (p ≤ 0,05) signifikant verschieden im Vergleich zur Reihe darüber]

	J _{ms} ^{Na}	J_{sm}^{Na}	J _{net} ^{Na}	I _{sc}	G _t	N/n
		μeq [·] c	$m^{-2} h^{-1}$		mS ⁻ cm ⁻²	14/11
25mM Acetat +83226	3,41±0,66	2,29±0,87	1,12±0,85	0,40 ±0,22	2,23±0,43	6/8
50mM Acetat +S3226	3,92±1,37	2,22±0,71	1,70±1,15	0,38±0,20	2,10±0,40	6/8
100mM Acetat +S3226	4,86 ±1,19	1,68±0,46	3,18±1,21*	0,34±0,22	1,80±0,33	6/10

Tab. 11	(zu Abbildung 24): Acetat-Fluxe bei steigender Acetatkonzentration auf
	serosaler Seite [x \pm SEM; * (p \leq 0,05) signifikant verschieden im Vergleich zur Reihe
	darüber]

	J _{ms} ^{Acetat}	J _{sm} ^{Acetat}	J _{net} ^{Acetat}	I _{sc}	G _t	
		µeq [•] c	mS ⁻ cm ⁻²	N/n		
25mM Acetat serosal	1,79±0,54	1,81±0,59	-0,02±0,41	0,92±0,22	2,41±0,48	2/8
50mM Acetat serosal	2,04±0,43	2,72±1,36	-0,68±1,00	1,17±0,29	2,39±1,03	2/7
100mM Acetat serosal	1,99 ±0,51	4,17±1,06*	-2,18±1,31*	1,29±0,76	2,09±0,92	2/7

Tab. 12(zu Abbildung 25): Na⁺-Fluxe bei steigender Acetatkonzentration auf
serosaler Seite [x \pm SEM; * (p \leq 0,05) signifikant verschieden im Vergleich zur Reihe
darüber]

	J _{ms} ^{Na}	J _{sm} ^{Na}	J _{net} ^{Na}	I _{sc}	Gt	
		µeq ⁻ cn	mS ⁻ cm ⁻²	N/n		
25mM Acetat serosal	4,40±0,80	2,57±0,72	1,83±0,84	0,92±0,22	2,41±0,48	2/8
50mM Acetat serosal	4,74±0,74	2,77±1,19	1,87±0,82	1,17±0,29	2,39±1,03	2/7
100mM Acetat serosal	3,72±0,48*	2,14±0,44	1,58±0,62	1,29±0,76	2,09±0,92	2/7
8.2 Zusammensetzung der Inkubationslösungen

Tafel 1: Inkubationslösungen für die Versuche zur Kinetik des elektroneutralen Na⁺-Transportes Kontrollpuffer 125 mM Na⁺ (Kapitel 4.1)

Substanz	125 mM	55 mM Na ⁺	25 mM Na ⁺	12 mM Na ⁺
	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l
NaCl	85,00	15,00	-	-
NMDG Cl	-	70	85	85
KCl	5,00	5,00	5,00	5,00
$KH_2PO_4 \cdot H_2O$	1,00	1,00	1,00	1,00
$K_2HPO_4 \cdot H_2O$	2,00	2,00	2,00	2,00
Glucose ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$)	10,00	10,00	10,00	10,00
MOPS $(C_7H_{15}NO_4S)$	8,00	8,00	8,00	8,00
Na-Acetate ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$)	25,00	25,00	25,00	12,00
NMDG-Acetat				13,00
Na-Propionate (C ₃ H ₅ NaO ₂)	10,00	10,00		
NMDG-Propionate			10,00	10,00
Na-Butyrate ($C_4H_7NaO_2$)	5,00	5,00		
NMDG-Butyrate			5,00	5,00
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,00	1,00	1,00	1,00
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,00	1,00	1,00	1,00
Gas	O2	O2	O ₂	O ₂

Tafel 2: Inkubationslösungen für die Versuche zum Trafficking (Kapitel 4.3)

Substanz	Kontrollpuffer mmol/l
NaCl	85,00
KCl	5,00
$KH_2PO_4 \cdot H_2O$	1,00
$K_2HPO_4 \cdot H_2O$	2,00
Glucose ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$)	10,00
MOPS $(C_7H_{15}NO_4S)$	8,00
Na-Acetate ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$)	25,00
Na-Propionate (C ₃ H ₅ NaO ₂)	10,00
Na-Butyrate (C ₄ H ₇ NaO ₂)	5,00
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,00
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,00
Gas	O ₂

Substanz	25 mM	50 mM	100 mM
	Acetat	Acetat	Acetat
NaCl	12,50	12,50	12,50
KCl	5,00	5,00	5,00
Na-Glukonat ($C_6H_{11}O_7Na$)	100,00	75,00	25,00
NaH2PO4 · H2O	1,40	1,40	1,40
Na2HPO4 · 2 H2O	2,60	2,60	2,60
Glucose ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$)	8,00	8,00	8,00
Na-Acetate ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$)	25,00	50,00	100,00
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,40	2,40	2,40
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,20	1,20	1,20
Gas	O ₂	O ₂	O ₂

Tafel 3: Inkubationslösungen für die Versuche zur Korrelation von Jms und Jsm (Kapitel 4.4)

Tafel 4: Inkubationslösung für den Transport der Gewebe

Substanz	mmol/l
NaCl	115.00
KCl	5.00
NaHCO3	25.00
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0.40
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	2.40
Glucose ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$)	5.00
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.20
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.20
Gas	Carbogen (5%
	O ₂ + 95% CO ₂)

Danksagung

Mein aufrichtiger und herzlicher Dank gilt:

An erster Stelle Herrn Prof. Dr. H. Martens für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung.

Herrn Uwe Tietjen für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Frau Katharina Wolf für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten und für ihre vielen guten Ideen.

Herrn Dr. Khalid Abdoun für seine Hilfsbereitschaft und Ratschläge.

Selbständigkeitserklärung:

Hiermit bestätige ich, Maren Dölle, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 05.06.2008

Maren Dölle