

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Untersuchungen zur pH-Regulation am Blättermagenepithel  
des Schafes  
mit H<sup>+</sup>-sensitiven Mikroelektroden

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

vorgelegt von  
Kristina Strecker  
geb. Kosmis  
Tierärztin  
aus Oldenburg

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3430

---

Gefördert durch ein Stipendium nach dem  
Nachwuchsförderungsgesetz (NaFöG) des Landes Berlin

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Holger Martens  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink  
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Gotthold Gäbel

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

sheep; omasum; pH; regulation; sodium; hydrogen; ion exchange;  
ion transport

Tag der Promotion: 04.02.2011

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: 978-3-86664-913-2

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

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.

Coverbild vorne © Lee Torrens - Fotolia.com

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

Meinen ELTERN und meinem MANN

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>11</b>
2.1	<b>Anatomie und Histologie des ovinen Blättermagens .....</b>	<b>11</b>
2.2	<b>Funktionen des ovinen Blättermagens (inklusive Stofftransport).....</b>	<b>12</b>
2.2.1	Resorption und Pufferkapazität.....	13
2.2.2	Sekretion.....	17
2.2.3	Motorik und Regulation des Digestaflusses (Homöostasekontrolle) .....	18
2.2.4	Mikroorganismen .....	19
2.3	<b>Elektrolyt-Transport.....</b>	<b>19</b>
2.3.1	Möglichkeiten des transepithelialen Transportes .....	19
2.3.2	Elektrolyt-Transportprozesse und Bezug zum Blättermagenepithel .....	20
2.4	<b>Intrazelluläre pH-Wert und seine Regulation.....</b>	<b>34</b>
2.5	<b>pH-sensing .....</b>	<b>37</b>
2.6	<b>Zielsetzung dieser Arbeit .....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>40</b>
3.1	<b>Versuchstiere .....</b>	<b>40</b>
3.2	<b>Gewinnung und Präparation des Psalterepithels .....</b>	<b>40</b>
3.3	<b>Ussing-Kammer-Methode .....</b>	<b>40</b>
3.3.1	Aufbau und Inkubation.....	40
3.3.2	Elektrophysiologisches Messprinzip .....	42
3.4	<b>Methoden zur Messung des intrazellulären pH-Wertes.....</b>	<b>43</b>
3.4.1	Einleitung und Übersichtung der verschiedenen Methoden.....	43
3.4.2	Vergleich der pH <sub>i</sub> -Messung mit Fluoreszenzindikatoren und Ionen-sensitiven-Mikroelektroden .....	45
3.4.3	Entscheidungskriterien für die in dieser Arbeit verwendete Methode .....	46
3.5	<b>Mikroelektrodentchnik.....</b>	<b>48</b>
3.5.1	Allgemein.....	48
3.5.2	Herstellung der Mikroelektroden .....	49
3.5.3	Eichung der Elektroden .....	53
3.6	<b>Versuchsablauf .....</b>	<b>57</b>
3.7	<b>Versuchsansätze und Pharmaka .....</b>	<b>57</b>
3.7.1	Elektrophysiologische Messungen ohne Einsatz der Mikroelektrode .....	58
3.7.2	Messungen bei Einsatz der H <sup>+</sup> -sensitiven Mikroelektrode .....	58
3.8	<b>Auswertung und Statistik.....</b>	<b>62</b>

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>63</b>
<b>4.1</b>	<b>Elektrophysiologische Messungen ohne Einsatz der Mikroelektrode ....</b>	<b>63</b>
4.1.1	Natriumreduzierung .....	63
4.1.2	Kaliumerhöhung bei gleichzeitiger Natriumreduzierung.....	66
4.1.3	Kombinierter Einsatz der Natriumreduzierung und der Kaliumerhöhung	69
<b>4.2</b>	<b>pH-Messungen mit H<sup>+</sup>-sensitiven Mikroelektroden inklusive elektrophysiologischer Messungen.....</b>	<b>71</b>
4.2.1	Messungen bei Inkubation mit Standardlösung (Kontrollbedingungen) ..	71
4.2.2	Messungen bei Inkubation mit kurzkettigen Fettsäuren.....	75
4.2.3	Messungen während des Einsatzes von Hemmstoffen .....	88
4.2.4	Messungen bei serosaler Chloridreduzierung.....	114
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>121</b>
<b>5.1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>121</b>
<b>5.2</b>	<b>Methodenkritik .....</b>	<b>121</b>
<b>5.3</b>	<b>Einfluss von Natrium und Kalium auf die elektrophysiologischen Parameter des Psalterepithels .....</b>	<b>122</b>
5.3.1	Natriumreduzierung .....	123
5.3.2	Kaliumerhöhung bei gleichzeitiger Natriumreduzierung.....	124
<b>5.4</b>	<b>Messungen unter Standardbedingungen .....</b>	<b>125</b>
5.4.1	Etablierung der pH-Messung mit H <sup>+</sup> -sensitiven Mikroelektroden .....	125
5.4.2	Supraapikales Mikroklima.....	125
5.4.3	Intrazelluläre pH-Messungen (subapikal) .....	126
<b>5.5</b>	<b>Einfluss der kurzkettigen Fettsäuren.....</b>	<b>126</b>
5.5.1	Einsatz des 60 mmolaren SCFA-Puffer bei einem pH-Wert von 7,4.....	127
5.5.2	Vergleich des 60 mmolaren Fettsäurepuffer bei pH 7,4 und 6,4.....	128
5.5.3	Ansteigende Fettsäurekonzentrationen .....	128
<b>5.6</b>	<b>Auswirkungen durch den Einsatz von Hemmstoffen .....</b>	<b>130</b>
5.6.1	Amilorid.....	130
5.6.2	S3226 .....	131
5.6.3	DIDS .....	132
5.6.4	DIDS und S3226.....	133
5.6.5	Ethoxzolamid .....	133
5.6.6	Ethoxzolamid und S3226 .....	134
5.6.7	Concanamycin .....	134
<b>5.7</b>	<b>Einfluss von Chlorid .....</b>	<b>134</b>
<b>5.8</b>	<b>Zusammenfassung der Erkenntnisse über die pH-Regulation der Psalterepithelzelle und Diskussion eines Transportmodells .....</b>	<b>135</b>
5.8.1	pH-Regulation.....	135
5.8.2	Transportmodell.....	137

<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG – SUMMARY</b> .....	<b>141</b>
6.1	Zusammenfassung .....	141
6.2	Summary .....	143
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>145</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>172</b>
8.1	Pufferrezepte.....	172
8.2	Danksagung .....	177
8.3	Selbstständigkeitserklärung.....	178

## Abkürzungen

AE2	Anionen-Exchanger 2 = ein Chlorid-Bikarbonat-Austauscher
Amilorid	3,5-Diamino-N-carbamimidoyl-6-chlorpyrazin-2-carbamid = unspezifischer Hemmstoff des NHE
ASIC	acid-sensing ion channels = Säure-sensitive Ionenkanäle
ATP	Adenosintriphosphat
BCECF	2',7'-bis(carboxyethyl)-5(und 6)-carboxyfluoreszein = pH-sensitiver Fluoreszenzfarbstoff
CA	Carboanhydrase
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
Cl <sup>-</sup>	Chlorid-Ion
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
dG <sub>t</sub> /min	Differenzwert der transepithelialen Leitfähigkeit pro Minute
dI <sub>t</sub> /min	Differenzwert des transepithelialen Stromes pro Minute
DIDS	4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulphonic acid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
dpH/min	Differenzwert des gemessenen pH-Wertes pro Minute
DRA	down-regulated in Adoma = ein Chlorid-Bikarbonat-Austauscher
dV <sub>t</sub> /min	Differenzwert des transepithelialen Potentials pro Minute
ENaC	epithelialer Natrium Kanal
Ethoxy	Ethox(y)zolamid = 6-ethoxy-1,3-benzothiazol-2-sulfonamid = hemmt die Aktivität des Enzyms Carbonanhydrase
GI	Gastrointestinaltrakt
G <sub>s</sub>	parazelluläre Leitfähigkeit (mS/cm <sup>2</sup> )
G <sub>t</sub>	transepitheliale Leitfähigkeit (mS/cm <sup>2</sup> )
H <sup>+</sup>	Proton
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bikarbonat-Ion
in vitro	Versuche außerhalb des lebenden Organismus, lateinisch = im Glas
in vivo	Versuche am lebenden Organismus, lateinisch = im Leben
I <sub>sc</sub>	Kurzschlussstrom (μeq/cm <sup>2</sup> ·h)
I <sub>t</sub>	transepithelialer Strom (μA/cm <sup>2</sup> ·h)
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
KCl	Kalium-Chlorid
K <sub>i</sub> -Wert	Inhibitionskonstante oder auch Dissoziationskonstante: 50 % (z.B. des Blockers) liegen in einem Komplex vor (in diesem Beispiel mit dem Kanal)

m	mukosal = apikal = luminal
ME	Mikroelektrode
mRNA	messenger ribonucleic acid = Arbeitskopie der DANN
N	Anzahl der Schafe (Individuen)
n	Anzahl der Epithelien
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
NHE	Na-H-Exchanger = Natrium-Protonen-Austauscher
Na-K-ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NMDG	N-Methyl-D-glucamin = ein Natriumersatzstoff
PD <sub>t</sub>	transepitheliale Potentialdifferenz (mV) = V <sub>t</sub>
PD <sub>a</sub>	apikale Potentialdifferenz (mV)
PDZ-Domäne	der Teil eines Proteins, der mit anderen Proteinen interagieren kann
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionen-Konzentration
pH <sub>i</sub>	intrazellulärer pH-Wert
pK-Wert	negativer Logarithmus der Dissoziationskonstante
R <sub>a</sub>	resistance apical = Widerstand der apikalen Membran
R <sub>b</sub>	resistance basolateral = Widerstand der basolateralen Membran
R <sub>c</sub>	resistance cellular = zellulärer Widerstand
R <sub>s</sub>	resistance shunt = parazellulärer Widerstand
R <sub>t</sub>	resistance tissue = transepithelialer Widerstand bzw. Gewebewiderstand
s	serosal = basolateral = interstitiell
S3226	3-[2-(3-guanidino-2-methyl-3-oxo-propenyl)-5-methyl-phenyl]-N-isopropyliden-2-methyl-acrylamid dihydrochlorid = spezifischer Blocker für den NHE3
SEM	standard error of mean = Standardfehler des Mittelwertes
SCFA <sup>-</sup>	short chain fatty acids anion = dissoziierte kurzkettige Fettsäuren (Anion)
SITS	4-acetamido-4'-isothiocyanostilbene-2,2'-disulphonic acid
V <sub>max</sub>	die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bis zur Substratsättigung

## 1 EINLEITUNG

Der Blättermagen (Omasum, Psalter) ist der dritte Magen in der Reihe der Vormägen der Wiederkäuer und besitzt wie die beiden vorausgehenden (Pansen und Haube) ebenfalls ein verhorntes und nicht glanduläres Epithel. Der Psalter dient im Gegensatz zum Pansen (als große Fermentationskammer verstanden) der Weiterleitung und Zwischenspeicherung des Nahrungsbreies im Sinne einer Saug-/Druckpumpe (Smith, 1984; Stevens *et al.*, 1960) und absorbiert insbesondere Bikarbonat, kurzkettige Fettsäuren (short chain fatty acids – SCFA), Natrium, und Chlorid (Prins *et al.*, 1972; von Engelhardt und Hauffe, 1975). Die große physiologische Bedeutung der Absorptionsvorgänge im Psalter wird bereits durch seine anatomische Struktur - lange, parallele Blätter - erkennbar (Prins *et al.*, 1972) und besteht darin, dass einerseits Na,  $\text{HCO}_3^-$  und Wasser des Speichels re-absorbiert und andererseits Fermentationsprodukte wie Ammoniak und SCFA absorbiert werden.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass der Wiederkäuer riesige Speichelmengen produziert, die bei laktierenden Kühen einen Umfang von über 300 l/Tag annehmen (Bowman *et al.*, 2003; Cassida und Stokes, 1986; Erdmann, 1988; Silanikove, 1994) und somit ein Vielfaches des Plasmavolumens des Tieres betragen (Reynolds, 1953; Woodford *et al.*, 1985). Gleichfalls riesig ist die tägliche Fettsäureproduktion des Rindes, die bis zu 100 Mol/Tag betragen und einen Wert von über 100 mmol/l annehmen kann (Allen, 1997; Gäbel *et al.*, 2002). Auf diese Weise gelangt eine große Menge Fettsäuren in den Blättermagen, die vor dem Eintritt in den Labmagen resorbiert werden (Barcroft *et al.*, 1944; Ekman und Sperber, 1953; Gray *et al.*, 1954; Phillipson und McAnally, 1942; von Engelhardt und Hauffe, 1975). Parallel dazu wird Bikarbonat resorbiert, ersichtlich an dem Abfall der Bikarbonatkonzentration von ca. 50 mmol/l im Pansen auf weniger als 10 mmol/l in den hinteren Abschnitten des Psalters (Wert bei Kühen) (Ekman und Sperber, 1953), während die Chloridkonzentration ansteigt (Edrison *et al.*, 1986; Ekman und Sperber, 1953).

Die (Netto)Absorption von  $\text{HCO}_3^-$  und von SCFA hat den Effekt, dass die starken Puffersubstanzen SCFA (pK 4,8) und  $\text{HCO}_3^-$  (effektiver pK 7,74 (Kohn und Dunlap, 1998)) aus den Ingesta entfernt werden, die nachfolgend im Labmagen leichter angesäuert werden können und verringert somit die Sekretion von HCl. Außerdem würde ein vermehrter Durchfluss von Bikarbonat in den Labmagen zu einer starken Gasentwicklung in Form von  $\text{CO}_2$  führen. Eine Gasentwicklung wird als eine der Ursachen der Labmagenverlagerung diskutiert. Darüber hinaus ist bekannt, dass Fettsäuren die Labmagenschleimhaut schädigen können (Bödeker *et al.*, 1994).

Die dem Transport von Na, Cl,  $\text{HCO}_3^-$  und SCFA zugrunde liegenden Mechanismen wurden größtenteils *in vitro* charakterisiert (Ali *et al.*, 2006; Beisele, 2008; Dölle, 2008; Martens und Gäbel, 1988; Niebuhr, 2003; Schultheiss und Martens, 1999; Tiling, 1997; Wegeler, 2007). Diese Untersuchungen haben zu der Erkenntnis geführt, dass die protonierten kurzkettigen Fettsäuren (HSCFA) (Ali, 2005) und Bikarbonat gleichzeitig transportiert werden. Dieser bemerkenswerte und parallele Transport einer Base ( $\text{HCO}_3^-$ ) und einer Säure (HSCFA) erfordert eine effektive Regulation des intrazellulären pH-Wertes ( $\text{pH}_i$ ), da nach der Aufnahme von HSCFA durch die luminale Membran die Freisetzung von  $\text{H}^+$  erfolgt und eine Absenkung des  $\text{pH}_i$  verursacht wird. Deswegen muss das durch die HSCFA intrazellulär abgegebene Proton wieder aus der Zelle entfernt werden. Diese Aufgabe wird hauptsächlich

vom Natrium-Protonen-Austauscher ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Exchanger – NHE) übernommen. Die Protonen-Aufnahme via HSCFA und -abgabe via NHE erfolgt jedoch nicht im klassischen Verhältnis 1:1. Die luminale Aufnahme von  $\text{H}^+$  ist geringer als die hervorgerufene starke Stimulation des NHE (Ali *et al.*, 2006). Denkbar ist ein *pH-sensing* Mechanismus, der durch den erniedrigten  $\text{pH}_i$  ausgelöst, zu einer überschießenden Aktivitätssteigerung des NHE führt. Zusätzlich wird die Umsetzung des luminal aufgenommenen  $\text{HCO}_3^-$  zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  (mit Hilfe des Enzyms Carboanhydrase) begünstigt und anknüpfend der transepitheliale Transport von  $\text{HCO}_3^-$  erheblich beeinträchtigt.

In dieser Studie sollte die  $\text{pH}_i$ -Regulation in Relation zu den transepithelialen Transportvorgängen und unter Berücksichtigung eines *Acid-sensing* Mechanismus charakterisiert werden. Dazu sollte eine neue Methode zur pH-Messung etabliert werden. Bei dieser Methode wird ein Epithel in einer modifizierten Ussing-Kammer eingespannt und von oben (apikal) eine Glas-Mikroelektrode an das Epithel herangeführt. Die Mikroelektrode wird so gefertigt, dass sie in der Lage ist, den pH-Wert und das apikale Potential zu messen. Mit der so genannten double-barreled Mikroelektrode (eine  $\text{H}^+$ -sensitive Mikroelektrode) ist es möglich den pH-Wert sowohl unmittelbar oberhalb der apikalen Epithelmembran (*supraapikal*) als auch *subapikal* (intrazellulär) zu bestimmen. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die polaren Eigenschaften des Epithels erhalten bleiben und somit im Unterschied zu Messungen an isolierten Epithelzellen die apikalen und basolateralen pH-Regulationsmechanismen getrennt zu beeinflussen sind. Zusätzlich können zeitgleich die elektrophysiologischen Parameter bestimmt werden. Durchgeführt wurden Versuche mit unterschiedlichen Pufferlösungen und Inhibitoren von Transportmechanismen bzw. Enzymen (Carboanhydrase) mit dem Ziel, den  $\text{pH}_i$  zu beeinflussen und die möglichen Kompensationsmechanismen zu offenbaren.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Anatomie und Histologie des ovinen Blättermagens

Der im intrathorakalem Abschnitt der Bauchhöhle gelegene dritte Magen der Wiederkäuer besteht aus einem Psalterkörper und einem ventralen, von zwei Schleimhautfalten gebildeten Psalterkanal (Psalterteil der Magenrinne) (Ellenberger, 1881; Nickel *et al.*, 1999). Die Ingesta gelangen proximal durch die mit Hilfe eines Sphinkters komplett verschließbare Hauben-Psalter-Öffnung (Ellenberger, 1881; Sellers und Stevens, 1966; Stevens *et al.*, 1960) in den Blättermagen und verlassen diesen distal durch die Psalter-Labmagen-Öffnung, die infolge des Fehlens eines Sphinkters überwiegend offen bleibt (Sellers und Stevens, 1966; Stevens *et al.*, 1960). Diese beiden Öffnungen, durch den Psalterkanal verbunden, liegen dicht nebeneinander, so dass der restliche Teil des Blättermagens einer Sackgasse gleicht (Magee, 1932). Entlang der großen Krümmung ragen von dorsal unterschiedlich große, parallel angeordnete Schleimhautfalten in das Lumen des Blättermagens, deren Anzahl beim Schaf entsprechend des Autors variieren: zwischen 33 und 53 (McSweeney, 1988), 72 bis 80 (Nickel *et al.*, 1999) und im Mittel 74 (Towne und Nagaraja, 1990). Diese Blätter sind in vier Größen ausgebildet (McSweeney, 1988; Nickel *et al.*, 1999; Prins *et al.*, 1972; Yamamoto *et al.*, 1994), wobei die größten vom Dach bis zum Psalterkanal reichen und die kleinsten, am zahlreichsten ausgebildet, nur wenige Millimeter hoch sind (McSweeney, 1988). Die strukturelle Anordnung der Blätter zueinander, nämlich das Vorliegen von kleinen und mittleren Blättern (2. bis 4. Ordnung) zwischen zwei großen Blättern (1. Ordnung) (Nickel *et al.*, 1999), bewirkt einen bestmöglichen Kontakt des Nahrungsbreies mit der Schleimhautoberfläche (Favilli, 1937).

Auf den Blättern befinden sich warzenförmige Papillen, die in ihrer Form stark variieren und von proximal (am Übergang zum Retikulum) nach distal in ihrer Erhabenheit abnehmen (Brownlee und Elliot, 1960; Ellenberger, 1881; Yamamoto *et al.*, 1994). Yamamoto *et al.* (1994) sehen darin eine Adaptation des Epithels an die veränderte Futterpartikelgröße in Richtung Labmagen.

Das im Vergleich zum Pansen eher dünne Schleimhautepithel (Epithelium mucosa der Tunica mucosa) des Psalters ist ein mehrschichtiges, verhornendes und drüsenloses Plattenepithel (Brownlee und Elliot, 1960; Favilli, 1937; Harrison, F. A., 1971; Liebich, 2004; Yamamoto *et al.*, 1994; Yamamoto *et al.*, 1991a). Das ovine Psalterepithel ist im Bereich der Blätter zwischen 42 und 54  $\mu\text{m}$  dick und hat 5 bis 7 Zellreihen (Favilli, 1937). Direkt auf den Papillen des proximalen Zehntels der größeren Blätter ist das Epithel dicker, mit mehreren Reihen von Spinosazellen versehen und auf den Papillenspitzen sitzt eine verhornte, gekrümmte und spitz zulaufende Kappe (Brownlee und Elliot, 1960; Yamamoto *et al.*, 1994). Das Epithel der restlichen kleineren und ungedeckelten Papillen ist viel dünner und besteht lediglich aus einer basalen Schicht von Zylinderzellen und ein paar darüber liegenden, abflachenden und keratinisierenden Zellreihen (Brownlee und Elliot, 1960). Im papillenfreien Abschnitt ist das subepitheliale Bindegewebe (Lamina propria mucosae) schlaff, verdichtet sich aber unterhalb der Papillen (Favilli, 1937). An der Basis der großen Papillen sind muköse Einlagerungen zu finden (Brownlee und Elliot, 1960), der so genannte Schleimknorpel (Weyrauch und Schmollich, 1998). Dem Bindegewebe folgt die Schleimhautmuskulatur (La-

mina muscularis mucosae) (Favilli, 1937; Nickel *et al.*, 1999; Weyrauch und Schmollich, 1998; Yamamoto *et al.*, 1991a).

Eine sehr dünne Unterschleimhaut (Tela submucosa) (Yamamoto *et al.*, 1991b) trennt die Schleimhautmuskelschicht von der eigentlichen Muskulatur (Tunica muscularis), die aus einem Stratum circulare und einem Stratum longitudinale besteht (Weyrauch und Schmollich, 1998), wobei ersteres als mittlere Schicht in die größeren Blätter (Ordnung 1 bis 3) hineinzieht (Ellenberger, 1881; Favilli, 1937; Krölling und Grau, 1960; Liebich, 2004; Nickel *et al.*, 1999; Schummer und Nickel, 1960; Weyrauch und Schmollich, 1998; Yamamoto *et al.*, 1991a). Das Stratum circulare hat laut Yamamoto *et al.* (1991a) nicht immer eine Verbindung zur Tunica muscularis der Psalterwand, viel eher scheint es eine sehr komplexe Zugehörigkeit zu geben. Durch diese Muskelanordnung bestehen die Blätter aus zwei lateralen Muskelschichten (Lamina muscularis mucosae) und bei den Blättern erster bis dritter Ordnung aus einer laut Favilli (1937) beim Schaf 1,7 µm dicken intermediären Schicht aus glatter Muskulatur (Lamina interna der Tunica muscularis). An den freien Enden der Blätter fließt die Schleimhautmuskulatur zusammen und verdickt sich (Favilli, 1937). Entgegen der Feststellung von Krölling und Grau (1960) fanden Yamamoto *et al.* (1991a) in den freien Enden auch Muskelzüge der intermediären Schicht. Sie unterteilten die freien Enden in drei Typen: Typ 1 enthält Muskelbündel der lateralen und der intermediären Muskelschicht (bei Blättern jeder Ordnung), Typ 2 wird nur von der Tunica muscularis gebildet (Blätter 1. oder 2. Ordnung) und Typ 3 setzt sich aus den lateralen Schichten und wenigen Fasern der intermediären Schicht zusammen (Blätter 3. oder 4. Ordnung). Nach außen wird der Blättermagen von der Tunica serosa bedeckt (Weyrauch und Schmollich, 1998).

Das Blutgefäßsystem in den Blättern zeigt einen Gefäßplexus in der intermediären Muskelschicht und ein ausgeprägtes subepitheliales Kapillarnetzwerk, das in den Papillen, insbesondere im proximalem Abschnitt des Psalters, viel höher entwickelt ist und auch im interpapillären Bereich des distalen Teiles eine vergleichsweise höhere Entwicklung erkennen lässt (Yamamoto *et al.*, 1991b). Dieses subepitheliale Gefäßnetz entdeckte bereits Favilli (1937) unter Beschreibung einer horizontal orientierten Anordnung.

## 2.2 Funktionen des ovinen Blättermagens (inklusive Stofftransport)

Ursprünglich herrschte die Meinung, dass der Blättermagen als Feile bzw. Reibe diene und so die Digestastrukturen zerkleinere (Becker, 1937; Ellenberger, 1881; Magee, 1932; Trautmann und Schmitt, 1935). Unter Annahme einer Autonomie der Blätter folgerten Magee (1932) und Trautmann und Schmitt (1935) eine dreifache Funktion des Psalters: Filterung, Zermahlung und Resorption. Auch Favilli (1937) vermutete aufgrund der Struktur und der Anordnung der Blätter, dass eine gewisse Reibung durch die Kontraktionswellen möglich sei, aber er konnte in seinen Versuchen keine derartige Bewegungsautonomie der Blätter finden, die der Funktion einer Feile entsprächen; vielmehr sah er den Blättermagen als Presse und Schwamm. Bereits Magee (1932) beschrieb den Psalter in der heute noch gängigen Definition als Saug-Druck-Pumpe.

Argumente gegen die zermahlende Funktion sind laut Brownlee und Elliot (1960) die sehr dünne äußere Wand des Psalters, das dünne Epithel über den Blättern und die nur

dünne Schicht von Kollagenfasern unter dem Epithel. Auch Die Erklärung von Becker (1937), der das alleinige Auffinden von feineren Futterbestandteilen im distalen Teil des Blättermagens als Beweis für die Funktion als Reibe sah, wurden von Brownlee und Elliot (1960) widerlegt. Ihrer Meinung nach würden gröbere Bestandteile durch die spitzen Papillen an den proximalen Blattseiten festgehalten und könnten auf diese Weise nicht in den distalen Bereich vordringen. Prins *et al.* (1972) sehen in der Funktion des Psalters ebenfalls einen Rückhalte Mechanismus von groben Futterpartikeln, die anschließend einer weiteren Fermentation unterliegen.

### **2.2.1 Resorption und Pufferkapazität**

Die anatomische Struktur des Psalters, nämlich die einem Buch gleichende Anordnung der Schleimhautfalten, lässt bereits eine absorptive Funktion vermuten (Prins *et al.*, 1972). Auch Favilli (1937) erwähnt die von den Blättern gebildete sehr große Oberfläche, die seiner Ansicht nach eine umfassende Resorption gewährleistete. Die Größe der Schleimhautoberfläche des Psalters beim Schaf ist von Hauffe und Engelhardt (1975) mit ca. 2450 cm<sup>2</sup> angegeben worden. Einen eindeutigen Hinweis auf die absorptive Funktion sahen auch von Engelhardt und Hales (1977), indem sie feststellten, dass sich 95 % des Blutflusses der Vormägen in der Mucosa befanden. In diesem Zusammenhang steht ihrer Meinung nach auch die im Vergleich zum Pansen viel geringer ausgebildete Muscularis des Psalters.

Wie einleitend erwähnt, scheint eine Hauptfunktion des Blättermagens die Verringerung der Pufferkapazität zu sein (von Engelhardt und Hauffe, 1975), und zwar durch die Absorption von Bikarbonat und kurzkettigen Fettsäuren, bei gleichzeitiger Sekretion von Chlorid (Moir, 1984).

#### **2.2.1.1 Wasser**

Der Anteil des Psalters an der Flüssigkeitsresorption aus den Vormägen wurde ursprünglich überschätzt. Aggazzotti (1910) beschrieb diesen mit 40-50 % als größten Anteil der gesamten Flüssigkeitsaufnahme in den Vormägen. Auch Masson und Phillipson (1952) berichteten von einer Wasserresorption im Blättermagen. *Post mortem* Experimente von Gray *et al.* (1954) mit Lignin als Markersubstanz zeigten, dass die Flüssigkeit nicht wie vermutet mechanisch ausgepresst wird, sondern das Wasser vom Blättermagen zu 33 bis 64 % absorbiert wird und nur eine sehr kleine Menge von Bestandteilen direkt durch die Psalterrinne in den Labmagen fließt. Die Wasserabsorption als eine wichtige Funktion des Psalters beschrieben auch Badawy *et al.* (1958) und Brownlee und Elliot (1960). Letztere vermuteten, dass sich das muköse Bindegewebe (insbesondere im Innern der Papillen) auf die Unterstützung dieser Funktion adaptiert hat.

Um die Wasserresorptionsmenge zu erhalten, wurde auch die Trockenmasse im Psalter bestimmt. Moir (1984) beschrieb, dass in erster Linie nur in Flüssigkeit gelöste kleine Partikel mit einem geringen Trockenmassegehalt vom Psalter akzeptiert werden. Bei *in vivo* Versuchen an Schafen erkannten Hauffe und Engelhardt (1975) erstmals, dass der im Vergleich zur Haube um ein 1/3 geringere Gehalt an Trockensubstanz im Psalterausfluss nicht allein durch die Wasserabsorption bedingt sei, sondern viel eher durch das längere Festhalten von faserigen Bestandteilen an den papillenbesetzten Blättern hervorgerufen wurde, währenddessen scheinbar auch eine mikrobielle Zerkleinerung stattfindet. Diese Ansammlung von Digesta in Form einer kompakten Masse zwischen den Blättern sahen Prins *et al.*

(1972) als Ursache für den im Vergleich zum Pansen höheren Trockengehalt im Psalter und der dadurch zu hoch berechneten Wasserabsorption. Ekman und Sperber (1953) erhielten bei ihren Versuchen einen doppelt so hohen Trockengehalt im Psalter des Schafes (etwa 20 %) als im Pansen. Annähernd gleiche Werte für die Trockensubstanz fanden Holtenius und Bjornhag (1989) mit 18 % (entspricht 0,6 % des Körpergewichtes), Towne und Nagaraja (1990) mit etwa 23,3 % und Badawy *et al.* (1958) mit 24,5 %. Giesecke und von Engelhardt (1975) ermittelten als Wert für die Gesamttrockenmasse des Psalters im Mittel 71 g.

Die mittlere Wasserresorption des ovinen Blättermagens wurde mit  $29,5 \pm 22,6$  ml/h ermittelt, welches  $13,3 \pm 6,8$  % des Zuflusses entspricht (Hauffe und von Engelhardt, 1975; von Engelhardt und Hauffe, 1975). Diese Werte decken sich auch mit neueren Werten von Holtenius und Bjornhag (1989), die eine Wasserabsorption von 15 % des Zuflusses angaben. Einen viel geringeren Wert von nur 15 ml/h beschrieb Moir (1984) als scheinbar absorbierte Flüssigkeitsmenge.

Bezogen auf die Schleimhautoberfläche scheint die Wasserresorption im Psalter so groß wie im Pansen zu sein (Hauffe und Engelhardt, 1975). Eine große Flüssigkeitsmenge läuft aber auch direkt von der Haube durch den Psalterkanal in den Labmagen (Oyaert und Bouckaert, 1961). Von diesem höheren Flüssigkeitsbypass durch die Psalterrinne beim Schaf im Vergleich zum Rind berichteten auch Holtenius und Bjornhag (1989).

Nach Oyaert und Bouckaert (1961) ist die Wasserresorption abhängig von der Molalität der Flüssigkeit im Psalter, und tatsächlich wird sie größer bei steigender Natrium-, Kalium- und Fettsäure-Konzentration (Hauffe und Engelhardt, 1975). Die Osmolarität des Psalterinhalts lag im Mittel bei 230 mosmol/l (Hauffe und Engelhardt, 1975; von Engelhardt und Hauffe, 1975) und war gegenüber dem Blut stets etwas stärker hypoton (Hauffe und von Engelhardt, 1975).

### 2.2.1.2 Kurzkettige Fettsäuren (SCFA - short chain fatty acids) und pH-Wert

Die kurzkettigen Fettsäuren (Acetat, Propionat und Butyrat – ursprünglich in dem Begriff volatile fatty acids – flüchtige Fettsäuren - zusammengefasst) entstehen beim mikrobiellen Abbau der komplexen Kohlenhydrate im Vormagensystem der Wiederkäuer. Die SCFA-Produktionsrate liegt ungefähr bei  $0,65 \text{ mol/kg}^{0,75}$  und deckt ~ 75% der gesamten metabolisierbaren Energie des Wiederkäuers (Bergman, 1990; Siciliano-Jones und Murphy, 1989). Hauptsächlich wird Acetat produziert, wobei das Verhältnis der drei Fettsäuren zueinander von der Art der Fütterung abhängig ist (Bergman, 1990).

Von einer Fettsäureabsorption im Blättermagen konnten sich einst Barcroft *et al.* (1944) überzeugen, in dem sie *in vivo* Blut aus der Vene am Psalter entnahmen und den Fettsäuregehalt bestimmten, der 2- bis 10-fach höher war als im entnommenen Blut des Labmagens. Auch Masson und Phillipson (1952) fanden Hinweise für eine Aufnahme der Fettsäuren über das Psalterepithel mit Hilfe von Untersuchungen des Labmagenausflusses, in dem die Konzentration von flüchtigen Fettsäuren 7-20-mal geringer war als im Pansen. Bei ihren *post mortem* Experimenten bekamen Gray *et al.* (1954) heraus, dass 40 bis 69 % der in den Blättermagen gelangten SCFA dort auch absorbiert werden. Laut von Engelhardt und Hauffe (1975) hat der Blättermagen einen Anteil von 10 % an der Gesamtabsorption der kurzkettigen Fettsäuren.

Es findet jedoch zusätzlich eine Fettsäureproduktion im Psalter statt, und zwar im Umfang von etwa 12 mmol/100 g Trockenmasse und h, die sich bei Bakterienwachstum um

etwa 2 mmol/100 g TM und h (Prins *et al.*, 1972) erhöht. Bezug nehmend auf die Gesamttrockenmasse im Psalter ermittelten Giesecke und von Engelhardt (1975) eine Tagesproduktion an SCFA von 200 mmol (8 mmol/h). Dieser Wert macht nur einen Anteil von ca. 4 % der Fettsäureproduktion im Pansen und in der Haube aus.

Auf eine mittlere Fettsäurekonzentration im Omasum von 4,66 mmol/100g kamen Badawy *et al.* (1958). Sie vermuteten eine Fettsäureabsorption von 18 g pro Tag (entspricht 77 % des Zuflusses). Bei Vergleich mit den von von Engelhardt und Hauffe (1975) ermittelten Werten scheint es jedoch, dass sie nur die Menge an Acetat bestimmt haben. Aber ebenso wie im Pansen finden sich im Psalter auch Propionat und Butyrat. Von Engelhardt und Hauffe (1975) nannten eine mittlere Konzentration der SCFA im Psalter von 61 mmol/l (davon 46 mmol/l Acetat). Als Wert für die Resorption der kurzkettigen Fettsäuren kamen sie im Mittel auf 10,6 mmol/h und unter Einbeziehung der im Psalter selbst produzierten Fettsäuren erhöht sich dieser Wert auf 18,75 mmol/h, was ca. 50% des Zuflusses der Fettsäuren entspricht. Bei der Unterteilung der Fettsäuren in ihre Fraktionen gaben sie folgende Zahlen für die Resorption an: Acetat mit 6,6 mmol/h (75 % der Gesamtmenge und 43 % des Zuflusses), Propionat mit 1,6 mmol/h (15 % der Gesamtmenge und 49 % des Zuflusses) und Butyrat mit 1,9 mmol/h (8 % der Gesamtmenge und 61 % des Zuflusses). Nach McSweeney (1986) betrug die Konzentration an flüchtigen Fettsäuren im Psalterausfluss etwa 16 mmol/l (ungefähr die Hälfte der Konzentration des Pansens). Mit zunehmendem Psalterausfluss stiegen die absolute Resorption von SCFA und auch die von Natrium (von Engelhardt und Hauffe, 1975), wobei 2,5-mal so viele Fettsäuren wie Natrium resorbiert wurden (Hauffe und von Engelhardt, 1975).

Da das Vormagensystem einen hohen Energieverbrauch hat, wird demnach auch eine intraepitheliale Metabolisierung der SCFA notwendig (Britton und Krehbiel, 1993; Bugaut, 1987; Kristensen *et al.*, 2000; Remond *et al.*, 1995). In der Pansenepithelzelle zeigen die drei Fettsäuren eine im Umfang unterschiedliche Metabolisierungsrate, die je nach Autor zusätzlich variiert: Acetat zu 0-30%, Propionat zu 5-70% und Butyrat zu 74-90% (Bergman, 1990; Britton und Krehbiel, 1993; Bugaut, 1987; Kristensen *et al.*, 2000; Remond *et al.*, 1995; Kristensen und Harmon, 2005), wobei die Metabolisierungsrate und auch die Produktion der Fettsäuren in Abhängigkeit von der Futterzusammenstellung erfolgt (Siciliano-Jones und Murphy, 1989). Klassische Studien sehen als Endprodukt der Metabolisierung bei Acetat vornehmlich das CO<sub>2</sub>, während Butyrat vorwiegend zu Acetat und den Ketonkörpern Acetoacetat und β-Hydroxybutyrat umgewandelt wird und Propionat in der Epithelzelle hauptsächlich zu Laktat und CO<sub>2</sub> abgebaut wird (Britton und Krehbiel, 1993; Bugaut, 1987; Remond *et al.*, 1995). Zusätzlich entsteht bei dem Abbau der SCFA aber auch sofort nutzbare Energie in Form von ATP (Britton und Krehbiel, 1993).

Als Grund für die hohe Variabilität wird die Tatsache diskutiert, dass in der Vergangenheit die Untersuchungen meist am ungewaschenen Pansen durchgeführt wurden, so dass nicht ausreichend zwischen dem intraepithelialen und dem bakteriellen Stoffwechsel differenziert werden konnte (Kristensen und Harmon, 2005). Nach Entfernung der mikrobiellen Flora scheint Acetat ohne Verluste ins Portalblut resorbiert zu werden (kein First-Pass Effekt), während die Metabolisierungsrate von Propionat lediglich bei 5-10 % der aufgenommenen Menge zu liegen scheint (Kristensen und Harmon, 2005). In dieser Studie konnte auch gezeigt werden, dass Butyrat – wie in älteren Untersuchungen – in großem Umfang verstoffwechselt wird (> 80 %). Loncke *et al.* (2009) kamen bei ihren Experimenten zu dem

Ergebnis, dass mindestens 80 % der aufgenommenen Fettsäuren basolateral wieder ausgeschleust werden, ohne in der Zelle metabolisiert zu werden. Diese Mengen sind auch aus Sicht des Gesamtorganismus essentiell, da nach dem Fermentationsprozess im Pansen lediglich Fettsäuren als Energielieferant zur Verfügung stehen und daher nicht im Vormagensystem verstoffwechselt werden dürfen.

Ein passiver basolateraler Efflux der Fettsäuren und ihrer Stoffwechselprodukte wie beispielsweise die Monokarboxylsäuren (Laktat, Acetoacetat,  $\beta$ -Hydroxybutyrat) durch die Lipidmembran der Zelle scheint aus verschiedenen Überlegungen heraus sehr unwahrscheinlich zu sein und erfordert spezifische Effluxmechanismen (Kirat *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2002; Stumpff *et al.*, 2009), auf die später eingegangen wird.

Bei Bestimmungen der pH-Werte im Psalter eruierten Oyaert und Bouckaert (1961) einen mittleren Wert von 6,9, wobei er immer etwas höher war als im Pansen. Den gleichen Wert ermittelten auch Prins *et al.* (1972) und erwähnten, dass die Absorption der produzierten Säuren einem Fallen des pH-Wertes im Blättermagen entgegenwirke. Einen geringeren Wert von etwa 6,6 maßen von Engelhardt und Hauffe (1975), wobei sie am Ansatz der Blätter eine Reduzierung des Wertes um etwa 0,1 fanden. Mit 6,37 war der von Towne und Nagaraja (1990) gemessene pH-Wert noch geringer.

### **2.2.1.3 Bikarbonat**

Die Bikarbonatkonzentration im Blättermagen von Schafen bestimmten Ekman und Sperber (1953) an fünf verschiedenen Stellen und erhielten Werte zwischen 25,7 und 8,5 mmol/l, die jeweils sehr viel geringer waren als im Pansen (49,7 mmol/kg). Sie konnten einen kontinuierlichen Abfall der Bikarbonatkonzentration von der Hauben-Psalter-Öffnung in Richtung Labmagen beobachten. Dieser Bikarbonatabfall konnte ihrer Meinung nach nicht alleine durch den unterschiedlichen Gehalt an Trockenmasse erklärt werden. Für Ekman und Sperber (1953) war die Bikarbonatresorption unerlässlich zur Vermeidung einer ansonsten entstehenden Neutralisation der im Labmagen produzierten Säuren. Oyaert und Bouckaert (1961) ermittelten experimentell eine mittlere  $\text{HCO}_3^-$ -konzentration im Blättermagen von 24 mmol/l, das entspricht ungefähr der Hälfte der Konzentration im Pansen. Sie sahen eine schnelle  $\text{CO}_2$ -Absorption. Wenn sie bei ihren Experimenten die initiale  $\text{CO}_2$ -Konzentration unter 50 ml/100 ml (12,5 mmol/l) ließen, stieg die Konzentration im Psalter etwas an, es fand also eine geringe Sekretion statt. Von Engelhardt und Hauffe (1975) erhielten für die Resorption des Gesamt- $\text{CO}_2$  einen Wert von 3,9 mmol/h (entspricht 34% des Zuflusses).

### **2.2.1.4 Restliche Elektrolyte**

Die von Oyaert und Bouckaert (1961) gemessene Natriumkonzentration im Blättermagen von Schafen lag zwischen 33 und 69 mmol/l (im Mittel 52,9 mmol/l) und war immer geringer als diejenige im Pansen. Außerdem konnte eine schnelle Absorption beobachtet werden. Im Gegensatz dazu erfassten sie ein Ansteigen des Natriumgehaltes im Psalter (einer Natriumsekretion entsprechend), wenn die initiale Natriumkonzentration unter 100 mg/100ml (25 mmol/l) lag. Der von von Engelhardt und Hauffe (1975) ermittelte Wert für die Natriumkonzentration von 57 mmol/l deckt sich mit dem oben erwähnten. Sie konnten eine Natriumresorption von 4,3 mmol/h messen (entspricht 25,8% des Zuflusses). Mit zunehmendem Psalterausfluss stiegen wie bereits erwähnt die absolute Resorption von SCFA und Natrium (von Engelhardt und Hauffe, 1975).

Eine Kaliumkonzentration zwischen 27 und 84 mmol/l (im Mittel 53,7 mmol/l) konnten Oyaert und Bouckaert (1961) messen und auch diese war jeweils im Vergleich zum Pansen niedriger, wobei die Resorption von Kalium viel geringer und langsamer als die von Natrium war (Oyaert und Bouckaert, 1961). Eine etwas geringere Kaliumkonzentration von 42 mmol/l und eine Resorption von etwa 0,8 mmol/h (entspricht 9% des Zuflusses) ermittelten von Engelhardt und Hauffe (1975). Bedingt durch diese viel geringe Kaliumabsorption verdoppelt sich das K:Na Verhältnis im Blättermagen (Smith, 1984).

Badawy *et al.* (1958) postulierten eine Stickstoffresorption im Blättermagen. Auch Oyaert und Bouckaert (1961) erwähnten, dass die Ammoniakkonzentration immer geringer war als im Pansen (etwa 40 %) und zwischen 4 und 15 mmol/l (im Mittel 8,3 mmol/l) lag. Ein ähnliche Konzentration maß auch McSweeney (1986) mit etwa 12 mmol/l, die bei seinen Experimenten jedoch der Konzentration im Pansen annähernd glich.

### 2.2.2 Sekretion

Erste Hinweise auf eine Chloridsekretion entdeckten bereits Masson und Phillipson (1952), die ein stetiges Ansteigen der Chloridkonzentration vom Pansen über den Psalter zum Labmagen hin beschrieben. Bei der experimentellen Bestimmung der Chloridkonzentration an verschiedenen Orten im Psalter konnten Ekman und Sperber (1953) im ersten Abschnitt des Magens nur eine geringgradige Erhöhung der Konzentration (23,3 mmol/l) im Verhältnis zum Pansen (im Mittel 18 mmol/l) feststellen, aber am Übergang zum Labmagen stieg die Konzentration auf 49 mmol/l an. Auch andere Autoren beobachteten eine beträchtliche Chloridsekretion im Psalter (Edriss und Smith, 1986; Hauffe und von Engelhardt, 1975). Eine entsprechende mittlere Konzentration von Chlorid im Psalter maßen Oyaert und Bouckaert (1961) mit 46,8 mmol/l, die bei ihren Messungen 2- bis 4-mal höher war als die im Pansen gemessene. Wenn die initiale Chloridkonzentration im Psalter 140 mg/100 ml (40 mmol/l) übertraf, zeigte das Epithel hingegen eine Resorption von Chlorid (Oyaert und Bouckaert, 1961). Offenbar hängt die Transportrichtung für Chlorid von den vorhandenen Gradienten ab.

Diese Hypothese wurde von *in vitro* Versuchen bestätigt. So findet man unter konventionellen Ussing-Kammer-Bedingungen mit unphysiologisch hoher Chloridkonzentration eine Nettoabsorption von Chlorid (Harrison, F. A., 1971; Martens und Gäbel, 1988). Eine Umkehrung der Transportrichtung zeigte Tiling (1997) bei *in vitro* Untersuchungen, indem sie durch Einstellung der physiologischen Gradienten ( $\text{Cl}^-$  serosal > mukosal,  $\text{HCO}_3^-$  mukosal > serosal) in den Pufferlösungen eine Nettosekretion von Chlorid herbeiführen und messen konnte. Die durchschnittlichen Mengen an Chlorid im Pansen bezifferten von Engelhardt und Hauffe (1975) mit 43 mmol/l, wobei sie am Blätteransatz eine um fast 18% höhere Konzentration maßen verglichen mit den übrigen Bereichen. Pro Stunde sezernierte der Blättermagen 3,8 mmol Chlorid (von Engelhardt und Hauffe, 1975). Durch entsprechende Versuche konnte ausgeschlossen werden, dass die Chloriderhöhung im distalen Psalterabschnitt durch ein Zurückfließen des Labmagensaftes zustande gekommen war (von Engelhardt und Hauffe, 1975).

Moir (1984) sieht in der Chloridsekretion des Blättermagens eine Reduzierung des Gesamtenergieverbrauches des Tieres, und zwar durch die nachfolgende Verringerung der energieverbrauchende HCl-Sekretion im Labmagen.

### 2.2.3 Motorik und Regulation des Digestaflusses (Homöostasekontrolle)

Bei röntgenologischen Untersuchungen konnte Phillipson (1939) feststellen, dass „Kleckse“ von Digesta nach der Haubenkontraktion vom Psalter in den Labmagen gelangten und dass kontinuierlich ein Rinnsal von Digesta in den Labmagen übertritt. Seiner Meinung nach kontrahiert der Blättermagen in unregelmäßigen Zeitabständen und die im Organ befindliche Flüssigkeit würde durch den Druck der Kontraktion des Rumens ausgepresst werden. Balch *et al.* (1951) stellten fest, dass die Hauben-Psalter-Öffnung nach einem konstantem Muster arbeitet, unabhängig davon, ob die Kuh frisst, trinkt, ruminert, gemolken wird oder ruht. Sie bemerkten während der Psalterkontraktion einen starken Druckabfall, der zeitlich auf die letzte Haubenkontraktion fiel, und dem ein Druckanstieg folgte, begleitet vom Schließen der Hauben-Psalter-Öffnung. Der Psalter scheint also als Saug-Druck-Pumpe mit wellenförmigen Arbeitsprofil zu funktionieren und sorgt folglich für einen kontinuierlichen Digestatransport (Balch *et al.*, 1951). Entgegen der Meinungen von Phillipson (1939) und Oyaert und Bouckaert (1961), die die Haube als Kontrollorgan für den Digestafluss in den Labmagen wahrnahmen, diente der Blättermagen laut Balch *et al.* (1951) als Schrittmacher für die Hauben-Pansen-Kontraktion. Auch Harrison (1971) gab dem Psalter partielle Zuständigkeit für die Kontrolle des Digestaflusses in den Labmagen. Einen charakteristischen Ablauf der Bewegungen der Retikulo-omasalen Öffnung und des Psalterkörpers sahen auch Ohga *et al.* (1965).

Stevens *et al.* (1960) beschrieben den Blättermagen als eine Zwei-Stufen-Pumpe, d. h. der Netzmageninhalt wird in die Psalterrinne aspiriert, von dort mit Hilfe einer Psalterinnenkontraktion weiter in den Körper transportiert und schließlich durch die Psalterkörperkontraktion in den Labmagen ausgepresst, wobei die Blätter die Funktion eines Gitters einnehmen, um große Futterpartikel festzuhalten. Der Schrittmacher für die Kontraktion ist ihrer Meinung nach die Ansammlung von Ingesta zwischen den Blättern. Die Kontraktionsrate wiederum wird von der Pansenkontraktionsrate bestimmt und die Stärke der Kontraktion von der Labmagenfüllung (Stevens *et al.*, 1960). Entstehendes Gas im Psalter strömt in den Netzmagen und selten fließt auch Ingesta, meist begleitet von einer Psalterkontraktion, zurück (Stevens *et al.*, 1960). Ihrer Meinung nach scheint es der Reinigung der Psalterrinne von großen Futterpartikeln zu dienen, die von den Blättern zurückgehalten wurden. Dahingegen sah Moir (1984) keinen ersichtlichen Mechanismus zur Selektion und für einen Rückstoss von Partikeln im Psalter, diese Funktion erfülle nach seiner Ansicht der Netzmagen.

Den durchschnittlichen Psalterausfluss (dünnbreiig mit massenhaft Protozoen) beim Schaf bestimmten Hauffe und von Engelhardt (1975) mit  $382 \pm 236$  ml/h und konnten durch Atropin eine signifikante Reduzierung erzeugen. Sie glaubten, dass der Blättermagen für einen homogenen und in seiner Zusammensetzung möglichst gleichmäßigen Nahrungsfluss in den Labmagen sorgt. Von einer zentralen Rolle des Blättermagens bei dem konstanten Digestafluss und bei der konstanten Magensekretion, und zwar durch die Absorption von kurzkettigen Fettsäuren, ist auch Moir (1984) überzeugt.

Eine interessante Feststellung machten Bueno und Ruckebusch (1974), indem sie durch eine Infusion einer Fettsäurelösung (pH-Wert 5,9) im Blättermagen ein Ansteigen der Blätterbewegung von 40-50 % für 10-15 min hervorriefen. Auch Gregory (1987) fand bei seinen Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen der Konzentration der HSCFA und der retikulo-ruminalen Kontraktion. Scheinbar befinden sich säure-sensible Rezeptoren in der Wand des Pansens (Crichlow und Leek, 1986). Dieser Zusammenhang wird bei der Panse-

nazidose mit stark eingeschränkter Motorik deutlich (Crichlow, 1989). Eine direkte Wirkung der Fettsäure auf die unter dem Pansen befindliche Muskulatur sollte allerdings nicht ausgeschlossen werden.

#### **2.2.4 Mikroorganismen**

Im frischen Psalterinhalt waren mikroskopisch Ciliaten und Bakterien in hoher Dichte und voller Beweglichkeit zu sehen (Giesecke und von Engelhardt, 1975), die in ihrer Zusammensetzung im Großen und Ganzen der des Pansens entsprachen (Oyaert und Bouckaert, 1961). Aber Messungen der Substratfermentation wiesen auf eine gewisse Inaktivierung der Mikroorganismen hin (Giesecke und von Engelhardt, 1975). Eine Zersetzung konnte Moir (1984) jedoch nicht nachweisen, da sich zwar die Anzahl der Protozoen auf 20 % derjenigen des Pansens reduzierte, aber der Gehalt an löslichen Protein im Psalter nicht anstieg. Ähnliche Mengenangaben ermittelten auch andere Autoren: 85 % weniger Protozoen im Psalter als im Pansen fand McSweeney (1986) und Towne und Nagaraja (1990) gaben an, dass die Gesamtzahl an Protozoen nur 1/6 des Pansens entsprachen. Dementsprechend fanden Giesecke und von Engelhardt (1975) nur eine halb so große Fermentationsrate im Psalter im Vergleich zur Haube.

### **2.3 Elektrolyt-Transport**

#### **2.3.1 Möglichkeiten des transepithelialen Transportes**

Wasser und Elektrolyte müssen den als Barriere funktionierenden Epithelzellenverband überwinden, um mittels des Kapillarnetzwerkes in den Körperkreislauf zu gelangen. Fluxe von der mukosalen (apikalen, luminalen) zur serosalen (basolateralen, interstitiellen) Seite werden als „ $J_{ms}$ “ bezeichnet. Der umgekehrte Passageweg wird folglich mit „ $J_{sm}$ “ benannt. Hierbei können Substanzen entweder die Epithelzellen (bzw. den Epithelzellenverband = Synzytium) durchqueren, was dem transzellulären Transport entspricht, oder den parazellulären Weg (Shunt) nutzen. Der Letztere befindet sich zwischen den einzelnen Zellen (Interzellularspalt) und wird apikal durch die tight junctions (Schlussleisten) begrenzt, die entsprechend ihrer Dichtigkeit den Durchtritt von Substanzen bestimmter Molekülgröße erlauben. Aufgrund der Durchlässigkeit der Schlussleisten erfolgt die Einteilung in dichte („tight“) oder lecke („leaky“) Epithelien, wobei das Psalterepithel nach Schultheiss und Martens (1999) in moderat dicht („moderately tight“) eingeteilt wurde.

Den Transport von Substanzen kann man in unterschiedliche Mechanismen unterteilen: Diffusion, Kanäle und membranprotein-vermittelter Transport (Carrier) (Schröder und Diener, 2000). Die Diffusion erfolgt passiv entlang eines Konzentrationsgradienten ohne Beteiligung von Membranproteinen und ist nicht sättigbar. Bei dem Transport durch Kanäle (integrale Membranproteine) ist ebenfalls keine Energie notwendig und es ist eine chemische Selektivität gegeben und zu der sich bei geladenen Teilchen ein elektrischer Gradient gesellt. Werden bei dem dritten Mechanismus (Carrier) mehrere Substanzen gemeinsam in eine Richtung transportiert, bezeichnet man dies als Symport oder auch Cotransport. Wenn die Stoffe gegeneinander ausgetauscht werden, spricht man von einem Antiport oder auch Exchange. Eine typische Charakteristik dieses Transportprozesses ist ein Sättigungsphäno-

men, das beim 1:1 Austausch einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Außerdem sind Symport und Antiport gegenüber Temperaturabsenkungen sehr empfindlich. Ein Carrier-Transport kann sowohl passiv als auch aktiv erfolgen. Ersterer wird auch als erleichterte Diffusion bezeichnet. Beim aktiven Carrier-Transport können die Substanzen auch gegen ein Konzentrations-/Potentialgefälle bewegt werden. Hier wird zwischen dem primär aktiven und dem sekundär aktiven Transport unterschieden. Der primär aktive Transport ist direkt an die ATP-Hydrolyse gekoppelt und wird auch als Ionenpumpe bezeichnet. Die treibende Kraft für den sekundär aktiven Transport kommt durch die Kopplung an einen Ionengradienten zustande. Eine zusätzliche Unterteilung des Carrier-Transportes ergibt sich aus der Ladung der Ionen. Bleibt das Ladungsverhältnis nach dem Transport auf beiden Seiten gleich, spricht man von elektroneutralem Transport. Fehlt diese Kompensierung der transportierten Ladungen, wird also durch den Transport ein Potential erzeugt, handelt es sich um elektrogenen (rheogenen) Transport.

Ein für den epithelialen Transport charakteristisches Phänomen ist die Tatsache, dass die Epithelien polarisiert sind, d.h. die beiden gegenüberliegenden Membranen sind in ihrer Verteilung der einzelnen Transportmechanismen nicht identisch.

## **2.3.2 Elektrolyt-Transportprozesse und Bezug zum Blättermagenepithel**

### **2.3.2.1 Kanäle**

#### Natriumkanäle

Die apikale Natriumaufnahme erfolgt durch den mit Hilfe der basolateralen Natrium-Kalium-ATPase erzeugten elektrochemischen Gradienten (Kellenberger und Schild, 2002). Auf diese Weise passieren Natrium-Ionen über Elektrodifusion Kanäle, die unterschiedlicher Natur sein können. Man kann die Natriumkanäle in spannungs-aktivierte und konstitutiv aktive Kanäle unterteilen. Spannungsaktivierte Natriumkanäle werden erst oberhalb eines definierten Schwellenpotentials aktiviert und finden sich vorrangig in neuronalem Gewebe. Epithelien exprimieren in der Regel konstitutiv aktivierte Kanäle, deren Offenwahrscheinlichkeit jedoch auch regulierbar ist. Eine große Anzahl verschiedener Kanaltypen vermitteln den Natriumtransport an Epithelien (Garty und Palmer, 1997):

- ◇ ENaC-Typ (siehe unten):
  - hochselektiv für Natrium
  - in dichten Epithelien zu finden
  - nur durch mikromolare Amiloridkonzentrationen geblockt
  - Leitfähigkeit > 5 pS
- ◇ andere Amilorid-sensitive Kanäle:
  - moderat selektive Kationenkanäle: Leitfähigkeit zwischen 9 und 21 pS
  - nicht selektive Kationenkanäle (NSCC = non selective cationchannel): Leitfähigkeit > 23 pS, Amilorid bindet viel fester und sie sind stärker spannungsabhängig
- ◇ Amilorid-insensitive Kanäle:
  - Atypischer ENaC (A-ENaC)
  - durch cyclisches Nukleotid-gesteuerte Natriumkanal (CNG)
  - nicht-selektiven Natriumkanal (NSC)
  - TRP Familie

## ENaC

Dieser aus drei Untereinheiten bestehender Kanal liegt in der apikalen Membran von polarisierten, dichten Epithelzellverbänden und dient dem transzellulärem, elektrogeneren Natriumtransport (Garty und Palmer, 1997; Kellenberger und Schild, 2002; Van Driessche und Zeiske, 1985). Die Natrium-Ionen durchqueren diesen Kanal über Elektrodifusion. Aber auch andere kleine einfach geladene Ionen wie  $\text{Li}^+$  und  $\text{H}^+$  können den ENaC passieren, die Durchlässigkeit für  $\text{K}^+$  ist jedoch 100 bis 1000-fach geringer im Vergleich zu Natrium (Garty und Palmer, 1997; Kellenberger und Schild, 2002). Der Kanal zeigt eine Sättigungskinetik in Abhängigkeit von der luminalen Natriumkonzentration (Van Driessche und Zeiske, 1985), die durch die Natrium-Bindung und ihrer Dissoziationsrate in der Pore limitiert ist (Garty und Palmer, 1997). Die Sättigung der Single-channel Leitfähigkeit tritt bei Überschreiten der Natriumkonzentration von 100 mmol/l ein, die Halbmaximale Leitfähigkeit (d.h. 50 % der Kanäle sind mit Natrium „gefüllt“ oder auch „gesättigt“, es wird der  $K_m$ -Wert erreicht) liegt bei einer extrazellulären Natriumkonzentration von 20-50 mmol/l (Kellenberger und Schild, 2002). Der ENaC besitzt eine sehr hohe Sensitivität gegenüber Amilorid und dementsprechend wird der  $K_i$ -Wert (= Inhibitionskonstante oder auch Dissoziationskonstante: 50 % des Blockers liegen in einem Komplex mit dem Kanal vor) bereits bei einer Amilorid-Konzentration von 0,1 bis 1  $\mu\text{M}$  erreicht (Kellenberger und Schild, 2002). Die Blockierung vollzieht sich sehr schnell und zwar nach Zugabe zur Lösung auf der apikalen Seite, was eine extrazelluläre Bindungsstelle vermuten lässt. Die Affinität für Amilorid wird durch das Membranpotential, durch den extrazellulären pH-Wert und durch die extrazelluläre Natriumkonzentration beeinflusst: eine Hyperpolarisation erhöht die Affinität und die verminderte Blockadewirkung bei erhöhter Natriumkonzentration scheint in der kompetitiven Verdrängung durch Natrium begründet zu sein (Kellenberger und Schild, 2002). Eine Erhöhung der apikalen Natriumpermeabilität wird durch Aldosteron hervorgerufen. Dieses Hormon bindet intrazellulär an seinen Rezeptor und sorgt unter anderem für den Einbau von zusätzlichen Natriumkanälen (aus einem intrazellulären Pool) in die apikale Membran (Kellenberger und Schild, 2002). Die weiteren Eigenschaften und Regulationen des epithelialen Natriumkanals sind in dem Review von Garty und Kellenberger ausführlich beschrieben und nachzulesen.

## ASIC – acid-sensing Ion channels

Die ebenfalls zur Familie der ENaCs gehörige Natriumkanäle werden durch extrazelluläre Protonen aktiviert, d.h. durch einen Abfall des pH-Wertes und befinden sich hauptsächlich im zentralen und peripheren Nervensystem (Kellenberger und Schild, 2002). Diese auch als Liganden-gesteuerte Ionenkanäle bezeichnete Natriumkanäle leisten im peripheren Nervengewebe einen Beitrag bei der sensorischen Übertragung, inklusive der von Schmerz und Nozizeption (Wu *et al.*, 2004). Sie können durch Amilorid mit einer geringen Affinität blockiert werden (Kellenberger und Schild, 2002). ASICs sind auch für Calcium durchlässig, ferner kann dieses Ion den Kanal auch blockieren (Kellenberger und Schild, 2002). Diese Blockierung sollte mit Hilfe von Laktat unterbrochen werden, indem es mit den Calcium-Ionen eine Verbindung eingeht. Bei der Aktivierung der ASICs durch die extrazelluläre pH-Absenkung erscheint für etwa 100 msec ein Strompeak (säure-induziertes Aktionspotential), der dann im Zuge der Desensitivierung (= Abschwächung der Ligandenwirkung bzw. abgeschwächte Antwort auf erneute Stimulierung) von einem minimal größeren Strom als derjenige vor der Aktivierung abgelöst wird (Kellenberger und Schild, 2002).

### Amilorid-insensitive Kanäle

Ein ausführliche Untersuchung über Natriumkanäle, die nicht durch Amilorid hemmbar sind, wurden von O'Brodovich *et al.* (2008) am Lungenepithel durchgeführt. Ihrer Meinung nach scheint es am wahrscheinlichsten, dass dieser Kanal durch einen atypischen ENaC (A-ENaC) repräsentiert wird, dessen Untereinheiten in einer anderen Stöchiometrie zusammengesetzt sind als beim normalen ENaC. Ein weiterer Kandidat könnte der durch cyclisches Nukleotid-gesteuerte Natriumkanal (CNG) sein, der an der  $\beta$ -adrenergen Aktivierung beteiligt ist. Als dritten Kandidaten beschrieben O'Brodovich *et al.* (2008) einen nicht-selektiven Natriumkanal (NSC). Seine Aktivierung ist abhängig von einer sehr hohen Calciumkonzentration. Für den ersten Kandidaten sprechen auch die Untersuchungen von Randrianarison *et al.* (2008) am Lungenepithel von Mäusen, die einen Gendefekt hatten, der sich in einer sehr geringen Expression von  $\beta$ -ENaC mRNA ( $< 10\%$  verglichen mit dem Wildtypen) äußerte. Zeitgleich stieg die Anzahl der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -ENaC Proteine an (Formation eines A-ENaC). Die Hemmung des Kanals durch 1 mM Amilorid lag beim Wildtypen bei 75 % und bei der Mutante nur noch bei 32 %. Eine höhere Konzentration verursachte jedoch bei beiden eine Hemmung von 75 %.

Beide Arbeiten wurden von Folkesson (2008) in einem Paper zusammengefasst. Dort berichtet er auch über eine eigene Untersuchung (Li, T. und Folkesson, 2006), bei der eine verminderte Expression der  $\alpha$ -ENaC Untereinheit ebenfalls zu einer abgeschwächten Hemmung durch Amilorid führte. Daher scheint die Anwesenheit alle drei Untereinheiten des ENaCs unabdingbar zu sein, für eine normale Sensitivität gegenüber der Hemmung durch Amilorid.

### TRP

Eine weitere wichtige Gruppe amilorid-insensitiver, Natriumleitender Kanäle stellen die Kanäle der TRP Familie dar (Owsianik *et al.*, 2006a; Owsianik *et al.*, 2006b). Diese Kanäle leiten neben Natrium auch weitere monovalente und divalente Kationen, wobei es zu negativen Interaktionen zwischen verschiedenen Ionenspezies kommt. So kann der TRPV6  $\text{Ca}^{2+}$  leiten; je nach der Konzentration intrazellulärer und extrazellulärer divalenter Kationen weist dieser Kanal jedoch auch eine erhebliche Leitfähigkeit für Natrium auf (Voets *et al.*, 2003). Die Natriumleitfähigkeit wird dabei von der intrazellulären  $\text{Mg}^{2+}$  Konzentration in spannungsabhängiger Weise moduliert.

### Bezug zum ovinen Psalter

Am Blättermagenepithel ist der Kurzschlussstrom hauptsächlich von Natrium abhängig (Schultheiss und Martens, 1999). Dies zeigte sich bereits bei den Natriumreduktionsversuchen von Tiling (1997), bei denen der  $I_{sc}$  proportional zu der Natriumreduktion sank und bei kompletter Natriumfreiheit der Inkubationslösung annähernd bei 0  $\mu\text{A}$  lag.

Da sich der  $I_{sc}$  nicht signifikant nach der Zugabe von Amilorid (in den Konzentrationen 1, 10 und 100  $\mu\text{mol}$ ) veränderte (Martens und Gäbel, 1988; Schultheiss, 1995; Schultheiss und Martens, 1999), vermuteten Schultheiss und Martens (1999), dass entweder die Natriumpermeabilität im Blättermagen des Schafes nicht sensitiv gegenüber diesem Blocker ist oder die Bindungseigenschaften verloren gegangen sind, beispielsweise durch die Anwesenheit eines atypischen ENaC. Auch hatte eine serosale Gabe von Aldosteron keinen Einfluss auf den Kurzschlussstrom (Schultheiss, 1995; Schultheiss und Martens, 1999), wie dies

bei einer Expression des ENaC zu erwarten gewesen wäre. Nach Ansicht von Schultheiss repräsentiert der apikale Natriumkanal einen nicht-selektiven Kationenkanal (NSCC), der Amilorid-insensitiv ist. Dieser Kanal ist aktiv, wenn divalente Kationen anwesend sind, jedoch steigt der elektrogene Natriumtransport bei Entfernung der divalenten Kationen an (Schultheiss, 1995; Schultheiss und Martens, 1999). Einen solchen Kationenkanal entdeckten auch Leonhard-Marek (2002) und Leonhard-Marek *et al.* (2005) bei ihren Experimenten am Epithel des Pansens.

Hinweise für einen nicht-selektiven Kationenkanal in der apikalen Membran des ovinen Pansenepithel fanden bereits Lang und Martens (1999). Die apikale Membran wurde durch eine hohe Kaliumkonzentration depolarisiert, woraufhin sich die apikale Natriumaufnahme verstärkte. Dieses unterstützt die Osmoregulation des Pansens bei gleichzeitiger Erhaltung der Kaliumhomöostase des Gesamtorganismus (Stumpff, 2007). Ausführlichere Darstellungen dieses Kanals sind in den Arbeiten von Leonhard-Marek zu finden (Leonhard-Marek *et al.*, 2005) (Leonhard-Marek *et al.*, 2006), Hier konnte gezeigt werden, dass die Spannungsabhängigkeit durch Magnesium vermittelt wurde. Erste Untersuchungen mit diesem Bezug wurden am Psalterepithel bereits von Schultheiss (1995) durchgeführt.

Es konnten weder am Pansen (Martens *et al.*, 1990) noch am Psalter (Schultheiss, 1995) Amilorid-sensitive Natriumkanäle (eingesetzte Amilorid-Konzentration bis 100  $\mu\text{mol}$ ) festgestellt werden.

### Chloridkanäle

Epithelien exprimieren eine Vielzahl verschiedenster Chloridkanäle (Jentsch *et al.*, 2002; Nilius und Droogmans, 2003; Sabirov und Okada, 2009), deren molekularbiologische Struktur bisher nur in Einzelfällen bekannt ist. Grob kann man folgende Gruppen unterteilen:

- ◇ CIC Chloridkanäle
- ◇ CFTR Chloridkanäle
- ◇ Durch Schwellung-aktivierte Chloridkanäle
- ◇ Calcium-aktivierte Chloridkanäle
- ◇ Liganden-gesteuerte Chloridkanäle
- ◇ Hochleitende Chloridkanäle (Maxi-Anionen Kanäle)

Die zweite und die letzte Gruppe der Chloridkanäle (CFTR und hochleitende Anionenkanäle) werden weitgehender erläutert. Für erstere besteht ein molekularbiologischer Nachweis der zugehörigen mRNA im Psalterepithel (Wegeler, 2007), deren funktionelle Bedeutung bisher nicht geklärt werden konnte. Letzterer wurde mittels der Patch clamp Technik am Pansenepithel direkt nachgewiesen und kommt als Transportprotein für den Efflux von Anionen der kurzkettigen Fettsäuren an Pansen und Psalter in Frage (Georgi *et al.*, 2010b; Leonhard-Marek *et al.*, 2009; Stumpff *et al.*, 2009a; Stumpff *et al.*, 2009b; Stumpff *et al.*, 2009c).

### CFTR – cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

Hierbei handelt es sich um einen Chloridkanal der apikalen Membran von absorptiven und sekretorischen Epithelien, der durch cAMP und der Proteinkinase A (PKA) reguliert wird und selbst als Regulator für andere Ionenkanäle, insbesondere für den ENaC, fungiert (Kunzelmann, 2001). CFTR hat einen negativen Einfluss auf die Natriumpermeabilität (Bachhuber *et al.*, 2005; Kunzelmann, 2003; Kunzelmann *et al.*, 2001). Eine Blockierung des Natriumkanals konnte durch lokale Chloridkonzentrationsänderungen gezeigt werden, die

möglicherweise über eine direkte Kopplung der Chloridaufnahme mit der Natriumaufnahme mit Hilfe von PDZ Domänen (= der Teil eines Proteins, der mit anderen Proteinen interagieren kann) zustande kam (Kunzelmann, 2001). Außerdem hemmt der CFTR den Natrium-Protonen-Austauscher (NHE) und aktiviert den Chlorid-Bikarbonat-Austauscher (Kunzelmann, 2001). Choi *et al.* (2001) räumten in ihrem Paper ein, dass CFTR zusätzlich auch als Chlorid-Bikarbonat-Austauscher fungieren kann. Bei Experimenten mit Calu-3 Zellen (Zelllinie von serösen Atemwegsepithelien) fanden Hug *et al.* (2003) heraus, dass die Bikarbonat-Sekretion über den CFTR-Kanal läuft, d.h. auch Bikarbonat kann diesen Kanal passieren. Ebenso konnten Moser *et al.* (2007) am Gallenblasenepithel des Präriehundes eine Bikarbonatsekretion über den apikalen CFTR nachweisen. Interessanterweise bindet der NHE-Regulationsfaktor (NHERF) am CFTR und erhöht dadurch seine Öffnungswahrscheinlichkeit (Raghuram *et al.*, 2003). Diese Einwirkung auf den CFTR zeigen auch bestimmte Chlorid-Bikarbonat-Austauscher (siehe unter 2.3.2.3) (Ko *et al.*, 2004).

Ein Transportprotein (SLC26A7), das in vielen Veröffentlichungen als Chlorid-Bikarbonat-Austauscher fungiert, wird von Kim *et al.* (2005) als ein pH-sensitiver Chlorid-Kanal beschrieben. Auch das genetisch nahe verwandte SLC26A9 ist laut Dorwart *et al.* (2007) ein pH-sensitiver Chloridkanal.

#### Hochleitende Chlorid-Kanäle (Maxi-Anionen Kanal)

Kanäle dieser Gruppe sind weit verbreitet und öffnen sich in Folge von osmotischen (Zellschwellung), ischämischen und hypoxischen Stress (Sabirow und Okada, 2009). Die Leitfähigkeit beträgt 300-400 pS und wird durch eine ansteigende Chloridkonzentration gesättigt. Es handelt sich jedoch, wie der Name bereits vermuten lässt, um einen sehr großen Kanal mit einem Durchmesser von etwa 1,3 nm (Sabirow und Okada, 2004). Daher können auch einige große Anionen die Zelle durch diesen Kanal verlassen (beispielsweise Glutamat und auch ATP). Dieser Kanal ist somit höchstwahrscheinlich an der Regulation des Zellmembranpotentials, des Flüssigkeitshaushaltes und des Zellvolumens beteiligt. Die Aktivität des Maxi-Anionen Kanals wird durch DIDS vermindert (Sabirow und Okada, 2009) und der Kanal kann sehr gut zwischen Natrium und Chlorid unterscheiden (Schlichter *et al.*, 1990).

Am Pansen wurde eine Leitfähigkeit für Chlorid (als Ladungsausgleich für Kalium (Abdoun *et al.*, 2005)) in Patchclamp Experimenten nachgewiesen (Leonhard-Marek *et al.*, 2005). Durch Versuche mit Mikroelektroden konnte diese basolateral lokalisiert werden (Leonhard-Marek *et al.*, 2006). Dieser Anionenkanal ist nicht nur durchgängig für Chlorid (~350 pS), sondern auch für Acetat (~140 pS) (Stumpff *et al.*, 2009c). In aktuellen Untersuchungen mit der Patchclamp Technik konnte am Pansen auch eine Permeabilität für Propionat an diesem Kanal belegt werden (Georgi *et al.*, 2010b) und er wird auch im Psalter exprimiert. Dieser Kanal scheint einen Beitrag bei der Absorption der Fettsäuren zu leisten (Stumpff *et al.*, 2009c; Stumpff *et al.*, 2010).

#### Bezug zum Psalter

Tiling (1997) zeigte durch Ionenersatzversuche, dass eine unilaterale Chloridreduktion (mukosal oder serosal) die Transportraten für Chlorid in beide Richtungen verminderte. Ein beträchtlicher Teil des epithelialen Chloridtransports könnte am Psalter daher über bilaterale Anionen-Austauscher erfolgen. Allerdings ist der Natrium Transport des Psalterepithels stets erheblich größer als der Kurzschlussstrom. Da die basolaterale Ausschleusung von Natrium

über die Pumpe elektrogen erfolgt, ist diese nur dann erklärbar, wenn eine dem elektroneutralen Natriumtransport entsprechende Menge von Anionen ebenfalls elektrogen – z. B. über einen basolateralen Kanal – ausgeschleust wird. Bei diesen Anionen könnte es sich neben Chlorid auch um Birkarbonat oder Fettsäureanionen handeln.

Wie bereits erwähnt wies Wegeler (2007) am Psalterepithel des Schafes die mRNA von dem CFTR molekularbiologisch nach und auch am Pansen erfolgte der CFTR Nachweis (Bilk, 2007; Bilk, 2008). An den meisten bisher beschriebenen Epithelien wird der CFTR apikal exprimiert und vermittelt wegen des negativen apikalen Potentials eine elektrogene Chloridsekretion. Hierfür fehlt sowohl am Pansen als auch am Psalter ein Hinweis. Hinzu kommt, dass am Pansen die für den CFTR typische Stimulation des Chloridtransportes durch cAMP nicht erreicht werden konnte (Gäbel *et al.*, 1999; Wolfram *et al.*, 1989). Daher wird eher eine regulative Funktion des CFTR im Vormagensystem vermutet, eventuell in Form einer Beteiligung am NHERF Komplex (Kunzelmann und Schreiber, 1999; Seidler *et al.*, 2009). Weitere Untersuchungen sind notwendig.

### Kalium-Kanäle

Kalium diffundiert entlang seines chemischen Gradienten durch die Kanäle in der serosalen Membran wieder aus der Zelle hinaus, nachdem es über die Natrium-Kalium-ATPase in die Zelle gepumpt wurde. Dadurch baut die Zelle ein negatives Potential gegenüber der serosalen Seite auf, welches den mukosalen Natrium-Influx unterstützt, auch bei geringer luminaler Natriumkonzentration (Van Driessche und Zeiske, 1985).

Es gibt vier große Gruppen von Kaliumkanälen:

- ◇ Calcium-aktivierte Kaliumkanäle (öffnen sich in Anwesenheit von Calcium-Ionen)
  - BK-Kanal (große Leitfähigkeit, auch Maxi-Kaliumkanäle genannt)
  - SK-Kanal (kleine Leitfähigkeit)
- ◇ Einwärts-gleichrichtende Kaliumkanäle (für die Kaliumrezirkulation in der Zelle)
  - ROMK (liegen im äußeren Mark der Niere)
  - G-Protein-gekoppelt (durch die G-Protein-Kaskade aktiviert)
  - ATP-sensitive (schließen bei hoher ATP-Konzentration)
- ◇ Zwei-Poren-Kaliumkanäle (Mitverantwortlich für das Ruhemembranpotential; werden u.a. durch den pH-Wert reguliert)
  - KCNK 1 bis 18
- ◇ Spannungs-aktivierte Kaliumkanäle (reagieren auf Membranpotentialänderungen und spielen eine wichtige Rolle beim Aktionspotential)
  - Sehr umfangreiche Familie mit 12 Klassen

Daneben gibt es zusätzlich eine große Vielfalt verschiedener nicht-selektiver Kationenkanäle, die neben Natrium auch Kalium leiten, aber nicht als Kaliumkanäle im engeren Sinne diskutiert werden.

Die Information über Kaliumkanäle am Blättermagenepithel ist eher spärlich. Beim Vorschlag eines Transportmodelles für Natrium am Psalter des Schafes beschrieb Schultheiss (1995) in Analogie zum klassischen Transportmodell an absorbierenden Epithelien einen basolateralen Kaliumkanal für die Kaliumrezirkulation des mit der Kalium-Natrium-Pumpe in die Zelle gelangten Kaliums. Außerdem fand er Hinweise auf einen apikalen Kaliumkanal, dessen Strömungsrichtung von der mukosalen Kaliumkonzentration abhän-

gig ist. Für die apikale Aufnahme kommt der nicht-selektive Kationenkanal in Frage, der die elektrogene Aufnahme von Natrium ins Psalterepithel vermittelt. Daneben könnte es aber auch weitere für Kalium spezifische Kanäle geben.

### 2.3.2.2 Natrium-Protonen-Austauscher

Natrium-Protonen-Austauscher (NHE) sind Membranproteine, die Natrium elektroneutral in die Zelle transportieren und im Austausch Protonen aus der Zelle hinaus schleusen (Malo und Fliegel, 2006; Yun *et al.*, 1995a). Dieser Transportprozess bezieht seine Energie aus dem durch die basolaterale Natrium-Kalium-Pumpe produzierten einwärts gerichteten chemischen Gradient für Natrium (Wakabayashi *et al.*, 1997b). Die entscheidende Funktion dieser Transportproteine liegt in der Regulation des intrazellulären pH-Wertes, was u. a. die allosterische Aktivierung des Austauschers durch Protonen zeigt (Wakabayashi *et al.*, 1997b); sie sind aber auch ausschlaggebend an der Volumenregulation beteiligt (Zachos *et al.*, 2005). Aufgebaut wird der NHE aus 10-12 transmembranösen Segmenten, die in zwei strukturell und funktionell unterschiedliche Domänen geteilt werden, wobei der eine Teil allein die Amilorid-Bindungsstelle und die *Protonen-Modifizierungs-Stelle* (siehe unten) aufweist (Wakabayashi *et al.*, 1997b; Yun *et al.*, 1995b).

Die NHE Gen-Familie besteht aus neun Isoformen, wobei NHE1-NHE3 und NHE7 im kompletten Gastrointestinaltrakt (GI), NHE4 im Magen und der Leber, NHE6 im Pankreas und der Leber und NHE9 im Darm und in der Leber gefunden wurden (Malo und Fliegel, 2006; Zachos *et al.*, 2005).

- ◇ NHE1: Der zuerst geklonte Austauscher befindet sich in der basolateralen Plasmamembran annähernd jeder Zelle und ist für die pH-Homöostase, die Volumenregulation (Ritter *et al.*, 2001) und für die Zellproliferation zuständig (Wakabayashi *et al.*, 1997b; Yun *et al.*, 1995b). Der  $K_i$ -Wert für Amilorid liegt bei 1-3  $\mu\text{M}$  (Yun *et al.*, 1995b).
- ◇ NHE2: Diese Isoform liegt in der apikalen Membran, ist vermutlich an der Volumenregulation beteiligt (Ritter *et al.*, 2001) und hat den gleichen  $K_i$ -Wert für Amilorid wie der NHE1 (Yun *et al.*, 1995b). Auch eine Beteiligung an der intestinalen Natriumabsorption ist hochwahrscheinlich, wobei Gewebe- und Speziesabhängigkeiten eine große Rolle spielen (Zachos *et al.*, 2005). Dieser Transporter hat eine schnelle (lysosomale) Abbaurate (Cavet *et al.*, 2001).
- ◇ NHE3: Verantwortlich für die transepitheliale Natriumabsorption und für die intrazelluläre pH-Wert Regulation ist dieser in der apikalen Membran integrierte Austauscher. Er hat einen  $K_i$ -Wert für Amilorid von 39  $\mu\text{M}$  und ist damit 39-fach resistenter gegenüber diesem Blocker als der NHE1 (Tse *et al.*, 1993; Yun *et al.*, 1995b). Eine Aktivierung des NHE3 durch Glukokortikoide und eine Hemmung durch die Stimulation der Proteinkinase C beschreibt die Arbeitsgruppe um Tse (1993). Eine aktive Form des NHE3s befindet sich auch in den Endosomen im Zytoplasma und kann bei Bedarf in die apikale Membran eingebaut (so genanntes *Trafficking*) bzw. durch endosomales Recycling abgebaut werden (D'Souza *et al.*, 1998; Zachos *et al.*, 2005). Dieser Prozess wird von der Phosphatidylinositol 3-Kinase (Kurashima *et al.*, 1998) und mit Hilfe des NHERF reguliert (Shenolikar und Weinman, 2001; Weinman *et al.*, 2005). Zusätzlich wird dieser Transporter durch cAMP gehemmt (Yun *et al.*, 1997).

- ◇ NHE4: Diese in der basolateralen Membran liegende Form zeigt unter basalen Bedingungen keinen Amilorid-sensitiven Natriumtransport, wird aber bei hyperosmotischen Bedingungen aktiviert (Yun *et al.*, 1995b).
- ◇ NHE5: Eine Expression findet hauptsächlich im Gehirn und im Hoden statt (Baird *et al.*, 1999). Diese Isoform befindet sich in der Plasmamembran, in synaptischen Vesikeln und wird durch Endosomen recycelt (Zachos *et al.*, 2005).
- ◇ NHE6: Der Austauscher befindet sich in den Endosomen, wurde aber auch temporär in der Plasmamembran gefunden (Brett *et al.*, 2002).
- ◇ NHE7: Die Charakterisierung dieser Isoform gelang aus dem trans-Golgi Apparat im GI (Numata und Orłowski, 2001).
- ◇ NHE8: In der apikalen Membran von Zellen der Rattenniere und der Mausleber wird dieser Austauscher exprimiert, wobei auch eine ubiquitäre Anwesenheit im GI gezeigt wurde (Goyal *et al.*, 2003). Kang'ethe *et al.* (2007) vermuteten, dass die Aktivität des Amilorid-sensitiven NHE8 in den malpighischen Gefäßen der Mücke an den durch die vakuoläre-ATPase kreierten Protonengradienten gekoppelt ist.
- ◇ NHE9: Eine in zellulären Organellen beherbergte Isoform mit transientem Erscheinen in der Plasmamembran, die auch als Kalium-Protonen-Austauscher fungieren kann (Hill *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zu den in der Plasmamembran liegenden NHEs, wird der Transport der zellorganellen NHEs durch den  $H^+$ -Gradienten angetrieben, der durch die  $vH^+$ -ATPase erzeugt wird (Donowitz und Li, 2007).

Ein möglicher Austauscher mit direkter Abhängigkeit von Chlorid (Rajendran *et al.*, 1999) ist vermutlich ein Cloning-Artefakt (Donowitz und Li, 2007; Schultheiss *et al.*, 1998; Zachos *et al.*, 2005). Anstelle einer direkten Kopplung mit Chlorid ist dagegen eine funktionelle Kopplung mit dem Chlorid-Bikarbonat-Austauscher festgestellt worden (Donowitz und Li, 2007; Gawenis *et al.*, 2002; Knickelbein *et al.*, 1985; Lamprecht *et al.*, 2002; Musch *et al.*, 2009), wobei dieser Prozess von dem intrazellulären Enzym Carboanhydrase abhängig ist (Donowitz und Li, 2007). Ferner ist eine Modulation der Aktivität des NHEs durch intrazelluläres Chlorid experimentell nachgewiesen worden (Aharonovitz *et al.*, 2001). Bei dem Austauscher mit Charakteristika des NHE2 an den Kryptenzellen des Mauskolons konnte keine Chlorid-Abhängigkeit ermittelt werden, dafür aber eine Aktivierung dieses Austauschers durch luminales Natrium und durch kurzkettige Fettsäuren (SCFA) (Chu, J. *et al.*, 2002). Die stimulierte Bikarbonatsekretion, die nach einer Hemmung des NHE3 folgt, scheint an sekretorischen Epithelien durch CFTR vermittelt zu werden (Furukawa *et al.*, 2004).

Zusätzlich konnte im Kolon eine Verbindung des NHE3/NHE2 mit einem SCFA-Anionen-Austauschers in der apikalen Membran aufgezeigt werden (Donowitz und Li, 2007; Gonda *et al.*, 1999; Krishnan *et al.*, 2003; Vidyasagar *et al.*, 2005). Reguliert wird dieser Transport durch die hohe luminal Konzentration von kurzkettigen Fettsäuren und zusätzlich durch den Natriumgradienten (Donowitz und Li, 2007). Krishnan *et al.* (2003) fanden am distalen Kolon der Ratte heraus, dass die durch Butyrat stimulierte Natriumabsorption entweder durch den NHE2 oder den NHE3 vermittelt wird, während die durch Bikarbonat stimulierte Natriumabsorption nur über den NHE3 läuft. Der Grund für diese Unterschiede ist unklar; es darf aber vermutet werden, dass einströmendes  $CO_2$  weniger Auswirkung auf den pH-Wert der Zelle hat als vielmehr zu einer Zunahme des Zellvolumens führt mit Auswirkung auf den NHE3, nicht aber auf den NHE2.

Bei ihren Experimenten am dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife konnten Good *et al.* (1995) zeigen, dass der aktivierte basolaterale NHE durch einen so genannten *cross-talk* sekundär die Aktivität des apikalen NHEs erhöht, was eine funktionelle Kopplung der beiden Austauschpartner miteinander darstellt. In einem späteren Experiment konnten Good *et al.* (2004) ihre These festigen, nämlich dass der basolaterale NHE1 die Aktivität des apikalen NHE3 kontrolliert und somit auch die Bikarbonatabsorption. Diese These bestätigten auch Watts *et al.* (2005) in ihren Versuchen und konkretisierten den Regulationsprozess. Sie beschrieben, dass der NHE1 den NHE3 und auch den apikalen Bikarbonattransport durch eine kontrollierte (Re-)Organisation des Aktin-Cytoskelettes reguliert und vermuteten, dass dadurch auch andere Transportprozesse beeinflusst werden könnten.

Die NHEs zeigen eine Michaelis-Menten-Kinetik mit unterschiedlicher Affinität bezogen auf die extrazelluläre Natriumkonzentration, was eine einfache Bindungsstelle für Natrium vermuten lässt (Levine *et al.*, 1993; Orłowski, 1993; Wakabayashi *et al.*, 1997b). Durch die Beobachtung einer abweichenden Kinetik mit Bezug auf die intrazelluläre Protonenkonzentration sprachen Aronson *et al.* (1982) von einer *H<sup>+</sup>-modifier-site*, die zusätzlich zu der Bindungsstelle für den Transport der Protonen vorhanden ist und für eine allosterische Aktivierung des NHEs sorgt. Diese *H<sup>+</sup>-modifier-site* wird auch pH-Sensor genannt (Wakabayashi *et al.*, 2003a) und der entsprechende Mechanismus – *pH-sensing* – im Kapitel 2.5 ausführlich erläutert.

Die Regulationsprozesse des NHEs werden in kurzfristige (innerhalb von Minuten bis zu ein paar Stunden) und langfristige (einige Stunden bis mehrere Tage) Mechanismen unterteilt. Zu den erstgenannten gehört beispielsweise die Hemmung des NHE3 durch die second-messenger cAMP, cGMP und durch eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration (Donowitz und Li, 2007; Voyno-Yasenetskaya, 1998; Yun *et al.*, 1997; Zachos *et al.*, 2005; Zizak *et al.*, 1999). Die Hemmung besteht in einer veränderten *turnover* Anzahl (Umsatzrate) und einem Wechsel im *trafficking* (zusätzlicher Einbau von lysosomalen NHEs in die apikale Membran bzw. eine Internalisierung in Vesikel, sprich Endo- bzw. Exozytose) (Donowitz und Li, 2007; D'Souza *et al.*, 1998; Zachos *et al.*, 2005). Durch den Fibroblast Growth Factor (FGF) wird der NHE1 über eine ansteigende Affinität für intrazelluläre Protonen aktiviert, im Gegensatz dazu läuft die Aktivierung des NHE2 und auch des NHE3 über eine Erhöhung der jeweiligen  $V_{\max}$  (die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bis zur Substratsättigung) (Levine *et al.*, 1993). Interessanterweise wird durch die Anwesenheit von cAMP die Aktivität des NHE3 gehemmt, die des NHE2 wiederum gesteigert (Krishnan *et al.*, 2003). Die langfristigen Regulationsmechanismen werden durch Gentranskription und Proteinexpression vermittelt, beispielsweise als Folge einer länger andauernden Glukokortikoidtherapie (Cho *et al.*, 1994). Eine experimentell verursachte metabolische Azidose bei Ratten ließ die Aktivität, die Proteinexpression und die Gentranskription des NHE2 und NHE3 in der apikalen Membran des Ileums und des Kolons ansteigen, hatte aber keinen Einfluss auf den NHE1 (Lucioni *et al.*, 2002). Musch *et al.* (2001) hatten zu menschlichen Colonmonolayers (C2/bbe) kurzkettige Fettsäuren zugegeben und konnten eine zeit- und konzentrationsabhängige Erhöhung der NHE3-Aktivität, der NHE3 Proteine und der mRNA beobachten. Sie sahen jedoch keine Veränderungen bei dem NHE2.

Mit unterschiedlichen Regulationsproteinen bilden die NHEs Komplexe. An dem NHE1 sind beispielsweise Calmodulin (Wakabayashi *et al.*, 1997a) und die Carboanhydrase II (Li, X. *et al.*, 2002; Li, X. *et al.*, 2006) gebunden. Der NHE3 bildet Komplexe u. a. ebenfalls

mit Calmodulin (Bertrand *et al.*, 1994) und mit den NHE-Regulator-Factor (NHERF) 1 und 2 (Donowitz *et al.*, 2005; Shenolikar und Weinman, 2001; Weinman *et al.*, 2005). Außerdem konnte auch eine direkte und indirekte Bindung der ERM Proteine (Ezrin, Radixin, Moesin) an den NHE3 aufgezeigt werden, die wiederum eine Verbindung zum Aktin-Cytoskelett haben (Cha und Donowitz, 2008; Donowitz und Li, 2007). Die direkte Bindung der ERM ist notwendig für das *trafficking* (Cha und Donowitz, 2008; Cha *et al.*, 2006). Die vier miteinander verwandten NHERF1 bis 4 bestehen jeweils aus ein bis vier PDZ Domänen, befinden sich alle in oder nahe bei der apikalen Membran und sind an der NHE3-Hemmung durch cAMP, cGMP und durch Calcium beteiligt (Donowitz *et al.*, 2005; Donowitz und Li, 2007; Weinman *et al.*, 2005; Weinman *et al.*, 2000). Weitere Bindungspartner – und somit Transporter, die durch NHERF reguliert werden - sind beispielsweise aber auch der CFTR, die Na-K-ATPase, die H<sup>+</sup>-ATPase (nur NHERF1) und der DRA (down-regulated in adenoma, siehe unten) (nur NHERF2) (Donowitz und Li, 2007).

Da Martens und Gäbel (1988) am Blättermagenepithel einen Netto-Natriumflux messen konnten, der 4,2-mal größer war als der Kurzschlussstrom, konnten sie zeigen, dass der Großteil an Natrium elektroneutral transportiert wird. Nach der Zugabe von 1 mmol/l Amilorid auf der luminalen Seite des Epithels reduzierte sich der Natriumstrom sowohl von mukosal nach serosal als auch von serosal nach mukosal. Diese Ergebnisse sprechen für den NHE als elektroneutralen Natriumtransporter am Psalter. Auch Ali (2005) konnte signifikant reduzierte Natriumfluxe nach der Zugaben von 1 mmol/l Amilorid messen, wobei weiterhin ein geringer elektroneutraler Natriumflux bestehen blieb. Er vermutete aufgrund seiner Versuchsergebnisse einen NHE sowohl auf der mukosalen als auch auf der serosalen Seite. Auf der apikalen Seite konnte Dölle (2008) die Existenz des NHE3 bekräftigen, indem sie einen für diese Isoform spezifischen Blocker einsetzte. Der Einsatz eines NHE1-spezifischen Blockers auf der apikalen Seite zeigte wiederum keine Wirksamkeit.

Shen *et al.* (2008) erbrachten den molekularbiologischen Nachweis der mRNA des NHE1 und des NHE3 am Psalter von Ziegen.

### 2.3.2.3 Chlorid- Bikarbonat-Austauscher

Die Bikarbonat-Transporter gliedern sich in zwei große Genfamilien: SLC4 und SLC26 (Alper *et al.*, 2002), wobei SLC für solute carrier (Transportproteine in der Membran) steht. Die SLC4-Familie setzt sich wie folgt zusammen (Alper *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2004):

- ◇ Drei elektroneutrale Natrium-unabhängige Chlorid-Bikarbonat-Austauscher (AE1-3 – SLC4A1-3), weitere Erläuterungen unten
- ◇ Zwei elektrogene Natrium-gekoppelte Bikarbonat-Transporter (NBCe1 – SLC4A4, NBCe2 – SLC4A5): bei diesen in der basolateralen Zellmembran liegenden Transportern werden jeweils 2 bis 3 Bikarbonat-Ionen mit einem Natrium-Ion gemeinsam transportiert (Romero *et al.*, 2004)
- ◇ Drei elektroneutrale Natrium-gekoppelte Bikarbonat-Transporter (NBCn1 – SLC4A7, NDCBE – SLC4A8, NCBE – SLC4A10), weitere Erläuterungen unten;
- ◇ Zwei weitere, die noch nicht gänzlich zu einer Gruppe zugeordnet werden konnten: AE4 (SLC4A9) ist genetisch näher mit dem NBC verwandt, aber verhält sich wie ein Natrium-unabhängiger Chlorid-Bikarbonat-Transporter (Ko *et al.*, 2002; Parker *et al.*, 2001; Tsuganezawa *et al.*, 2001). BTR1 (SLC4A11) ist ein mit dem Bikarbonat-Transporter verwandtes Protein (Parker *et al.*, 2001).

Zu der SLC26-Genfamilie gehören elf Mitglieder, die sich in drei große Gruppen unterteilen lassen (Dorwart *et al.*, 2008):

- ◇ Gruppe 1: Sulfat-Transporter, im Austausch mit Bikarbonat oder Chlorid
- ◇ Gruppe 2: Chlorid-Bikarbonat-Transporter mit dem SLC26A3, dem SLC26A4 und dem SLC26A6, weitere Erläuterungen unten
- ◇ Gruppe 3: Ionenkanäle. Das Transportprotein SLC26A7, welches in vielen Veröffentlichungen als Chlorid-Bikarbonat-Austauscher beschrieben wird, wurde von Kim *et al.* (2005) als ein pH-sensitiver Chlorid-Kanal bezeichnet. Auch das zu dieser Gruppe gehörige SLC26A9 wurde von Dorwart *et al.* (2007) als ein pH-sensitiver Chloridkanal beschrieben, wobei dieses Protein ebenfalls als Chlorid-Bikarbonat-Austauscher fungiert (Xu *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2008).

#### SLC4A1-3 – AE1-3 (Anionen-Exchanger)

Bei diesem Transporter wird die Richtung des Austausches von einem Chlorid-Ion gegen einem Bikarbonat-Ion durch den chemischen Gradienten der Ionen bestimmt (Alper *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2004). In den meisten Zellen bestimmt der einwärts gerichtete Chloridgradient die Transportrichtung. Vaughan-Jones (1979) beschrieb als einer der ersten diesen Transporter und stellte erstmals eine Beteiligung dieses Austauschers an der pH-Regulation der Zelle zur Debatte. Alle drei Transporter werden durch DIDS bzw. SITS blockiert. AE1 wird in Erythrozyten und an der basolateralen Membran der Schaltzellen Typ A im Sammelrohr der Niere exprimiert, während AE2 bei annähernd allen Epithelzellen in der basolateralen und auch in der apikalen Membran sitzt und AE3 am häufigsten im Gehirn, am Herzen, in der Retina, in der glatten Muskulatur und in Epithelzellen zu finden ist (Alper *et al.*, 2002). Der vom AE1 mit der Carboanhydrase II (CA II) gebildete Komplex wird auch als „Metabolon“ bezeichnet (Sterling *et al.*, 2001), bei dem die CA II als allosterischer Regulator dient (Alper *et al.*, 2002). Ein Metabolon ist ein Komplex eines Transporters mit einem Enzym, welches den Substratflux maximiert und reguliert (Sterling *et al.*, 2001). Bei dem Transporter AE2 wurde eine hohe Sensitivität gegenüber pH-Wertveränderungen festgestellt, die auf einen durch eine *modifier-site* beeinflussbaren pH-Sensor beruht (Mugharbil *et al.*, 1990; Stewart *et al.*, 2001; Stewart *et al.*, 2007b; Zhang *et al.*, 1996), vergleichbar mit dem NHE. Nach Stewart *et al.* (2007a) betreibt der Transporter sowohl intrazelluläres als auch extrazelluläres *pH-sensing*. Die auf die pH-Änderung folgende Regulation des AE2 zeigte ein sigmoidales Muster (Alper *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu sind AE1 und AE3 annähernd insensitiv gegenüber pH-Veränderungen (Sterling und Casey, 1999). Alle drei Transporter sind wichtig bei der Regulation des intrazellulären pH-Wertes und des Volumens der Zelle.

#### SLC4A8 – NDCBE (Na-driven Chloride-Bicarbonate-Exchanger)

Der hauptsächlich im Nervengewebe exprimierte Natrium-getriebene Chlorid-Bikarbonat-Austauscher transportiert normalerweise ein Natrium-Ion gemeinsam mit zwei Bikarbonat-Ionen in die Zelle hinein und zugleich ein Chlorid-Ion aus der Zelle heraus und wird durch DIDS blockiert (Grichtchenko *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2000). Er kann aber auch bei extrazellulärer Anwesenheit von Chlorid in entgegengesetzter Richtung transportieren (Grichtchenko *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2000). Dieser Transporter ist entscheidend an der intrazellulären pH-Regulation beteiligt und sorgt für eine Alkalisierung der Zelle.

**SLC4A10 – NCBE (Na-Cl-Bic-Exchanger)**

Dieses ursprünglich auch für einen Natrium-getriebenen Chlorid-Bikarbonat-Austauscher gehaltene Transportprotein (Romero *et al.*, 2004) wird in neueren Untersuchungen für einen zweiten elektroneutralen Natrium-Bikarbonat-Transporter (NBCn2) gehalten (Parker *et al.*, 2008).

**SLC26A3 – DRA (Down-Regulated in Adenoma)**

Dieser in der apikalen Zellmembran beherbergte Transporter wird auch DRA (Down-Regulated in Adenoma (Schweinfest *et al.*, 1993)) genannt und seine Mutation führt zu der kongenitalen Chlorid-Diarrhoe (CLD) (Hoglund *et al.*, 1996). Er transportiert elektroneutral, DIDS-sensitiv Chlorid im Austausch gegen Bikarbonat entsprechend des Gradienten und unabhängig von Natrium. Die extrazelluläre Anionenbindungstelle - im Gegensatz zur hochspezifischen intrazellulären Substratbindungsstelle – weist eine breit gefächerte Spezifität auf und kann so auch in geringerem Maße andere Anionen (Sulfat, Oxalat, Nitrat) im Austausch gegen Bikarbonat transportieren (Melvin *et al.*, 1999; Sterling *et al.*, 2002). Der Austauscher arbeitet gemeinsam mit dem NHE3, wird in einem viel größeren Umfang im Colon und Ileum exprimiert als der AE2 und scheint dort demnach das Haupttransportprotein für Chlorid und Bikarbonat zu sein (Melvin *et al.*, 1999). Im Gegensatz zum AE verfügt DRA über keine direkte Bindung mit der CAII, aber da er die Anwesenheit der Carboanhydrase für seine Aktivität benötigt, wird infolgedessen von einer funktionellen Kopplung gesprochen (Sterling *et al.*, 2002). Eine Verbindung von beiden ist über den CFTR möglich, der sowohl die Expression von DRA als auch dessen Transportaktivität erhöht (Greeley *et al.*, 2001). (Hayashi *et al.*, 2009) vermuteten eine indirekte Regulation des DRA durch den NHE3, die über eine intrazelluläre pH-sensitive *modifier-site* am Chlorid-Bikarbonat-Austauscher vermittelt wird.

**SLC26A4 – Pendrin**

Pendrin befindet sich in der apikalen Membran im Gewebe der Speicheldrüse, der Niere, der Schilddrüse und des Innenohrs (Cochlea) (Dorwart *et al.*, 2008; Soleimani *et al.*, 2001). Eine Mutation dieses Transporters führt zu dem Pendred Syndrom (Dorwart *et al.*, 2008; Kopp, 1999; Soleimani *et al.*, 2001). Der Transportmodus ist nicht gänzlich geklärt. Soleimani *et al.* (2001) bezeichneten Pendrin in der Niere als Chlorid-Basen-Austauscher inklusive Bikarbonat als Base, aber es gibt auch Hinweise, dass dieser Transporter als Chlorid- und Iodid-Kanal fungiert (Dorwart *et al.*, 2008).

**SLC26A6 – PAT-1**

Der ubiquitär vorkommende Austauscher transportiert elektrogen ein Chlorid-Ion gegen zwei Bikarbonat-Ionen (oder Oxalat bzw. Formiat) (Dorwart *et al.*, 2008). Dieser Transporter zeigt ebenfalls eine Interaktion mit dem CFTR. Ko *et al.* (2004) sprachen von einer reziproken regulatorischen Interaktion, bei der PAT-1 und auch DRA die Öffnungswahrscheinlichkeit von CFTR erhöhen. Auch Stewart *et al.* (2009) berichteten von einer funktionellen Kopplung des CFTR mit dem SLC26A6. Beide Autoren diskutieren die Möglichkeit eines Chlorid-Recycling durch den CFTR, um die Bikarbonat-Sekretion aufrecht zu halten.

Bezug zum ovinen Psalter

Am Blättermagenepithel sind hohe unidirektionale Cl Fluxe ( $6-15 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ) *in vitro* bestimmt worden, die nicht über eine einfache parazelluläre Diffusion erklärt werden können, sondern sehr wahrscheinlich über elektroneutrale Anionenaustauscher in der apikalen und basolateralen Membran erfolgen (Niebuhr, 2003; Tiling, 1997). Ferner wurden *in vivo* Wechselwirkungen zwischen der Chloridsekretion und der Bikarbonatabsorption aufgezeigt (von Engelhardt und Hauffe, 1975). Bei einer zunehmenden Chloridsekretion konnten letztere ein Ansteigen der Gesamt- $\text{CO}_2$ -Resorption ( $r=0,49$ ) zeigen. Da die Chloridsekretion im Mittel ebenso groß war wie die Resorption von  $\text{HCO}_3^-$ , liegt die Vermutung nahe, dass im Psalter ein Chlorid-Bikarbonat-Austauschermechanismus in umgekehrter Richtung als im Pansen vorhanden sei (von Engelhardt und Hauffe, 1975). Eine gegenseitige Beeinflussung vermuteten auch Ekman und Sperber (1953), da sie sowohl eine kontinuierlich abfallende Bikarbonatkonzentration von der Hauben-Psalter-Öffnung in Richtung Labmagen als auch eine ansteigende Chloridkonzentration in derselben Richtung beobachteten.

Durch entsprechende Versuche mit dem Blocker DIDS postulierte Tiling (1997) einen apikal und basolateral lokalisierten Anionenaustauscher, der eine Substratspezifität für Chlorid und Bikarbonat aufweist und dessen Transportrichtung von den jeweiligen Ionengradienten abhängt. Diese Aussage konnten auch Niebuhr (2003) und Wegeler (2007) bei ihren Untersuchungen zum Bikarbonattransport bestätigen.

Basolateral findet sich am Psalter ein in der üblichen Weise arbeitender Anionenaustauscher, der Chlorid aus dem Plasma in die Zelle transportiert und im Gegenzug Bikarbonat herausbefördert (Tiling 1997; Ali, 2006). Hierdurch wird die intrazelluläre Bikarbonatkonzentration abgesenkt und die Zelle angesäuert; gleichzeitig wird dadurch die Triebkraft für die apikale Bikarbonataufnahme erhöht. Ein Teil des basolateral aufgenommenen Chlorids wird vermutlich über den Anionenkanal basolateral sofort rezirkuliert (Ali, 2006; Georgi 2010), wodurch die Triebkraft für die basolaterale Bikarbonatausschleusung stets beträchtlich sein dürfte. Durch die Mehrschichtigkeit des Epithels wird dabei die apikale Chloridkonzentration nur wenig beeinflusst.

Ein molekularbiologischen Nachweis des DRA, des AE2 und der CAII im Blättermagenepithel des Schafes wurde erbracht (Wegeler, 2007). Die Transporter DRA, AE2 und PAT1 konnte Bilk *et al.* (2005) auch am Pansen nachweisen.

#### **2.3.2.4 Natrium-Chlorid-Cotransporter und Natrium-Kalium-2Chlorid-Cotransporter**

Aufgrund der Tatsache, dass nach der luminalen Hemmung des NHEs am ovinen Psalter eine restliche elektroneutrale Natriumabsorption verbleibt und dass bei mukosalem Chloridersatz die Natriumtransportraten erheblich verringert werden, vermutete Ali (2005) eine direkte Kopplung zwischen dem Natrium- und dem Chloridtransport. Durch Versuche mit dem Hemmstoff des Natrium-Chlorid-Cotransporters Hydrochlorothiazid (HCTZ) konnte er diese Hypothese bestätigen. Diesen Effekt konnte Dölle (2008) reproduzieren. So scheint dieser Transporter als zweiter elektroneutraler Natriumtransporter in der apikalen Membran existent zu sein, der gleichzeitig einer Chloridabsorption dient. Es wird vermutet, dass auf diese Weise der Chloridgradient für die nachfolgende Chloridsekretion über den Anionen-Austauscher aufrechterhalten wird (Beisele, 2008).

Tiling (1997) konnte durch den serosalen Einsatz des Blockers Furosemid (Schleifendiuretikum) die Chloridfluxe reduzieren. Dieser Hemmstoff blockiert den Natrium-Kalium-

2Chlorid-Cotransporter. Daher postulierte Tiling die Beteiligung dieses Symports in der basolateralen Membran an dem Chloridtransport, wobei Ali (2005) diesen Transporter bei seinen Untersuchungen nicht nachweisen konnte. Er vermutete, dass er keine entscheidende Beteiligung am Natriumtransport hat.

### 2.3.2.5 Transport von kurzkettigen Fettsäuren (SCFA)

Aufgrund eines hohen Konzentrationsgradienten für die SCFA von mukosal nach serosal liegt die Vermutung eines passiven apikalen Transportes nahe, der durch die gute Lipidlöslichkeit der undissoziierten SCFA (HSCFA) ermöglicht wird (Gäbel *et al.*, 2002; Walter *et al.*, 1982). Des Weiteren wird die Möglichkeit eines (sekundär) aktiven Transporters für SCFA mittels eines Anionen-Austauschers mit Cl oder HCO<sub>3</sub> als Anionen diskutiert (Aschenbach *et al.*, 2009; Gäbel *et al.*, 2002; Kramer *et al.*, 1996; Krishnan *et al.*, 2003). Das Anion scheint im Pansen Bikarbonat zu sein, da Gäbel *et al.* (1991) in ihren Experimenten eine von den kurzkettigen Fettsäuren abhängige Bikarbonatsekretion aufzeigten. Auch Kramer *et al.* (1996) beschrieben einen SCFA/HCO<sub>3</sub>-Austauscher am Pansen. Vidyasagar *et al.* (2005) untersuchten ebenfalls die Beteiligung der Fettsäuren an der Bikarbonatsekretion im Kolon der Ratte und beschrieben einen apikalen SCFA/HCO<sub>3</sub>-Austauscher, der unabhängig von Chlorid, DIDS insensitiv und auch NPPB (ein nicht spezifischer Blocker von Anionenkanälen) insensitiv ist. Im Gegensatz dazu zeigten Sehested *et al.* (1999) am Pansenepithel beim bilateralen Einsatz von DIDS Effekte auf den SCFA-Transport. Dieses Ergebnis könnte für die Beteiligung eines Chlorid-Bikarbonat-Austauschers oder eines Anionenkanals am SCFA-Transport am Pansen sprechen.

Bei Ussing-Kammer Versuchen am Blinddarm der Maus beschrieben Kawamata *et al.* (2007) zwei verschiedene Wege für die Aufnahme von SCFA, wobei der eine unabhängig von Bikarbonat ist und der andere höchstwahrscheinlich über einen elektroneutralen, Carboanhydrase-abhängigen SCFA/HCO<sub>3</sub>-Austauscher läuft.

Einen Transport der kurzkettigen Fettsäuren vornehmlich in ihrer nichtionischen Form durch Diffusion konnten Charney *et al.* (1998) am Kolon der Ratte nachweisen. Eine luminale Entfernung von Natrium hatte dabei keinen Effekt auf den SCFA-Transport. Diese Form der Aufnahme postulierten auch Gäbel *et al.* (1991) am Pansenepithel. Sie konnten zeigen, dass der durch die kurzkettigen Fettsäuren stimulierte Natriumtransport unabhängig von Chlorid ist und durch die Zugabe von Amilorid (1 mmol/l) fast komplett gehemmt werden konnte. Bei einer Erhöhung des mukosalen pCO<sub>2</sub> sah die Arbeitsgruppe um Gäbel sowohl ein Ansteigen des stimulierten Natriumfluxes als auch einen vermehrten Chloridtransport. Sie kamen daraufhin zu dem Schluss, dass undissoziierte Fettsäuren (HSCFA) und/oder CO<sub>2</sub> über die apikale Membran des Pansens diffundieren und auf diese Weise für eine Stimulation des apikalen NHEs sorgen würden (Gäbel und Sehested, 1997). Diese Stimulation erwähnten auch Kramer *et al.* (1996), die ebenfalls Untersuchungen an ruminalen Epithelien durchführte. Die von Gäbel *et al.* (1991) postulierte untergeordnete Rolle des SCFA/HCO<sub>3</sub>-Austauschers wurde inzwischen jedoch relativiert (Aschenbach, 2009).

Wenn die HSCFA nur über Diffusion über die apikale Membran transportiert werden, müsste die Absorptionsrate proportional zur Konzentration ansteigen (Gäbel *et al.*, 2002). Da die Protonierung pH-abhängig ist, ergibt sich nach der Henderson-Hasselbalch Gleichung ein fast zehnfacher Konzentrationsanstieg der HSCFA bei einem pH-Abfall um eine Einheit (Gäbel *et al.*, 2002). Ein Ansteigen des SCFA-Fluxes bei einem erniedrigten pH-Wert ist cha-

rakteristisch für den Fettsäuretransport über die Epithelien der Vormägen (Ali *et al.*, 2006; Gäbel *et al.*, 2002; Sehested *et al.*, 1999). Einen solchen Anstieg zeigten auch Charney *et al.* (1998) am Kolon der Ratte. Eine Quelle für die Protonen von HSCFA sehen Martens *et al.* (1991) und Sehested *et al.* (1996) in dem apikalen NHE.

Der Transport von Acetat über das isolierte Psalterepithel wurde von Ali (2005) eingehend untersucht. Bei diesen Untersuchungen (kein elektrischer oder chemischer Gradient) wurde kein Nettotransport beobachtet ( $J_{ms} \sim J_{sm}$ ). Ein niedriger mukosaler pH-Wert von 6,4 dagegen erhöhte signifikant den Acetatflux von mukosal nach serosal ( $J_{ms}$  Acetat). Der Acetattransport nahm linear mit der luminalen Acetatkonzentration zu; Sättigungseffekte, wie sie bei einer Kopplung über einen Anionenaustauscher zu erwarten gewesen wären, konnten nicht beobachtet werden. Weder der luminaler Zusatz von 1 mmol/l DIDS noch das Entfernen von Bikarbonat verursachten eine signifikante Änderung von  $J_{ms}$  Acetat. Aufgrund dieser Ergebnisse kamen (Ali *et al.*, 2006) zu dem Schluss, dass die Acetatabsorption über eine einfache Diffusion - überwiegend in der protonierten Form (HSCFA) – erfolge.

Interessant ist die Tatsache, dass sich die Transportrate bei mukosaler pH-Absenkung um weniger als die Hälfte erhöht, obwohl die Menge der protonierten Acetat-Ionen um das 10-fache angestiegen ist. Als mögliche Ursache für diese Diskrepanz ist die Existenz eines pH-Mikroklimas mit einem pH Wert, der von dem des Lumens abweicht. Ein solches Mikroklima konnte am Pansenepithel nachgewiesen werden (Abdoun *et al.*, 2010; Leonhard-Marek *et al.*, 2006) und entspricht histologisch vermutlich dem stratum corneum. Am Psalter ist ein solches Mikroklima bis dato noch nicht nachgewiesen worden.

Die Mechanismen der SCFA-Absorption sind aber noch nicht endgültig charakterisiert worden, insbesondere beim basolateralen Transport sind noch viele offene Fragen zu klären. In mehreren Studien am Gastrointestinaltrakt von Wiederkäuern wurde über den Einfluss eines basolateralen Monocarboxylat-Transporters 1 (MCT1) (Kirat *et al.*, 2005; Kirat *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2002) und eines MCT4 (Kirat *et al.*, 2007) diskutiert. Die mRNA dieser Transporter wurde sowohl im Pansen als auch im Psalter nachgewiesen (Kirat *et al.*, 2006; Kirat *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2002). In aktuellen Untersuchungen wird die Möglichkeit der basolateralen Ausschleusung der Fettsäuren über einen Kanal diskutiert. Stumpff *et al.* (2009c) konnten diesen Kanal am Pansenepithel nachweisen. Diese Prozesse benötigen effektive  $pH_i$ -Regulationsmechanismen.

## 2.4 Intrazelluläre pH-Wert und seine Regulation

Die Regulierung des pH-Wertes ist für die Zelle von entscheidender Bedeutung, da bei pH-Änderungen die Ionisierung aller schwachen Säuren und Basen verändert wird und dementsprechend eine Änderung in der Struktur und/oder der Aktivität von Proteinen bzw. Enzymen erfolgt. Daher ist eine Vielzahl von biologischen Prozessen pH-abhängig. Eine permanente Säurebelastung erfährt die Zelle durch die beim endogenen Metabolismus gebildeten Protonen. Daneben können insbesondere das leicht permeable  $CO_2$  und auch kurzkettige Fettsäuren von außen in die Zelle gelangen. Die Neutralisation von intrazellulären Säuren steht an erster Stelle. Als „Sofortmaßnahme“ greifen die kurzfristigen Regulationsprozesse, die schnell und reversibel sind und hauptsächlich durch die intrazellulären Puffersysteme ermöglicht werden (Roos und Boron, 1981). Zu den langfristigen spezifischen Mechanismen der

pH<sub>i</sub>-Regulation gehören Transportsysteme, die in erster Linie für die Ausschleusung (*acid extruders*) aber auch für die Aufnahme (*acid loaders*) von Säuren zuständig sind (Boron, 2004; Roos und Boron, 1981).

Roos und Boron (1981) unterteilten die kurzfristigen Regulationsmechanismen in die physikochemische Pufferung (Puffersysteme in der Zelle), die biochemische Pufferung (zellulärer Verbrauch der flüchtigen Fettsäuren) und die organellare Pufferung (Transfer von Säuren und Basen zwischen dem Zytosol und den Zellorganellen). Bei der physikochemischen Pufferung reagieren schwache Säuren und Basen mit exogenen Protonen. Nach BRÖNSTEDT werden die Säuren als Protonendonatoren (Protonenspender) bezeichnet, da sie ein Wasserstoff-Atom mit positiver Partialladung enthalten. Die korrespondierende Base benennt er als Protonenakzeptoren (Protonenempfänger), denn die Basen besitzen ein freies Elektronenpaar, das die Protonen binden kann. Beide gemeinsam ergeben ein Pufferpaar. In der Zelle ergibt sich die gesamte Pufferkapazität aus der Summe der individuellen Pufferkapazitäten der einzelnen Pufferpaare, die sich in intrinsische und extrinsische Puffer unterteilen (Boron, 2004). Die erstgenannten arbeiten in einem geschlossenen System, d. h. es kann weder ein Mitglied des Pufferpaares entfernt oder zugeführt werden, noch kommt es zu einer Equilibrierung mit der Atmosphäre oder zu Transportprozessen. Die maximale Pufferkapazität dieser Puffer wird erreicht, wenn der pH-Wert dem pK-Wert entspricht. Als extrinsische Puffer werden diejenigen bezeichnet, die sich in einem offenen System befinden. In diesem Fall können einzelne Substanzen des Pufferpaares die Zellmembran schnell überqueren. Hierzu gehört der Bikarbonat-Kohlendioxid-Puffer, dessen Pufferkapazität 50 bis 66 % der gesamten Pufferkapazität der Zelle im ruhenden pH-Bereich ausmacht. Einen entscheidenden Einfluss auf dieses Pufferpaar hat das Enzym Carboanhydrase, welches die reversible Hydratation von Kohlendioxid katalysiert:  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^-$  (Lindskog, 1997). Bei diesem ubiquitärem Enzym befinden sich vier der insgesamt sieben Isoformen intrazellulär (CA I, II, III und VII) und ein molekularbiologischer Nachweis der CA II im Psalterepithel ist von Wegeler (2007) erbracht worden. Die Pufferkapazität in offenen Systemen erhöht sich exponentiell mit dem ansteigenden pH-Wert. In diese Puffergruppe fallen ebenfalls der Butyrat-Buttersäure-Puffer und der  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ -Puffer.

Ein weiterer kurzfristiger pH-Regulationsmechanismus ist der intrazelluläre Metabolismus der schwachen Säuren. Dabei werden sie entweder zu neutralen Stoffwechselprodukten wie Glucose umgebaut oder in Substanzen umgewandelt, die die Zelle einfach und schnell verlassen können wie beispielsweise  $\text{CO}_2$ , welches aus der Zelle herausdiffundieren kann. Dieser Metabolismus mündet in eine Verringerung der Protonen. Weitere intrazelluläre Stoffwechselprozesse können jedoch auch den pH-Wert erniedrigen, indem Wasserstoffionen freiwerden (z.B. bei der Hydrolyse von ATP). Interessanterweise verlassen die Säuren die Epithelzellen der Vormägen und des Enddarms weitestgehend unmetabolisiert.

Die dritte Möglichkeit, nämlich die organelle Pufferung, besteht aus dem Verschieben der Säuren und Basen in die Zellorganellen oder aus diesen in das Zytosol (Roos und Boron, 1981). Ein fortwährender Prozess, der in diesen Bereich fällt, ist beispielsweise die Atmungskette in den Mitochondrien. Auf diese Weise werden durch Oxidations- und Reduktionsvorgänge Protonen aus dem Innern der Organellen über die innere Membran in das Zytoplasma transportiert.

Die oben genannten Prozesse können den intrazellulären pH-Abfall aber nur minimieren und die Hauptrolle bei der Aufrechterhaltung des pH<sub>i</sub> kommt den Mechanismen zu, die

die Säuren aus der Zelle heraus transportieren. Mit Hilfe der *acid extruders* werden energieabhängig (gegen ein Konzentrationsgradienten) sowohl  $H^+$  aus der Zelle ausgeschleust als auch  $HCO_3^-$  in die Zelle aufgenommen, um so den  $pH_i$  zu erhöhen (Boron, 2004; Roos und Boron, 1981). Die Transportrichtungen werden von den Ionengradienten festgelegt. Natrium hat durch die Energie verbrauchende Na/K-ATPase einen nach intrazellulär gerichteten Gradienten, der als Energiequelle für die Ausschleusung der Protonen genutzt wird (sekundär-aktiver Transport). Der wichtigste *acid extruder* ist der Natrium-Protonen-Austauscher (siehe 2.3.2.2). Aber auch der Natrium-getriebene Chlorid-Bikarbonat-Austauscher (NDCBE) ist entscheidend an der pH-Regulation der Zelle beteiligt. Er befördert ein Natrium-Ion gemeinsam mit zwei Bikarbonat-Ionen in die Zelle und schleust ein Chlorid-Ion hinaus. Ebenfalls zu den *acid extruder* gehört der Natrium-Bikarbonat-Cotransporter, wenn er ein Natrium-Ion gemeinsam mit zwei Bikarbonat-Ionen in die Zelle bringt. Da durch diese Stöchiometrie eine Ladung verschoben wird, arbeitet er elektrogen. Zusätzlich kann ferner noch der elektroneutrale Natrium-gekoppelte Bikarbonat-Transporter (NBCn1) zum Einsatz kommen. Unabhängig vom Natriumgradienten pumpt die vakuoläre  $H^+$ -ATPase unter ATP-Verbrauch als weiterer Mechanismus Protonen aus der Zelle heraus.

Um den  $pH_i$  regulatorisch zu senken, kommen die *acid loader* zum Einsatz. Prinzipiell können einige der oben genannten Transporter als solche fungieren, wenn ihre Transportrichtung bedingt durch eine Änderung der jeweiligen Konzentrationsgradienten umgekehrt wird. Als chronische *acid loader* werden auch die folgenden passiven Mechanismen diskutiert (Boron, 2004): bei einem intrazellulären pH-Wert von 7,2 und einem extrazellulär pH-Wert von 7,4 erfolgt eine Aufnahme von  $H^+$  und eine Abgabe von  $OH^-$  und  $HCO_3^-$ . Wenn das Membranpotential -60 mV beträgt, besteht ein nach innen gerichteter elektrochemischer Gradient für die Protonen, da das Gleichgewichtspotential beim angegebenen pH-Gradienten für  $H^+$  nur -12 mV beträgt. Unter der Annahme, dass die Zellmembran für die Protonen permeabel ist ( $H^+$ -Kanal) würde dies zu einer chronischen Ansäuerung der Zelle führen. Hinzu kommt, dass das Gleichgewichtspotential von  $OH^-$  und  $HCO_3^-$  (die Konzentration von  $CO_2$  ist auf beiden Seiten der Zelle gleich) identisch ist mit dem von  $H^+$  und durch den passiven Efflux der beiden Substanzen entsteht ebenfalls eine chronische Ansäuerung der Zelle. Die durch diese Mechanismen entstandene intrazelluläre Azidose wird umso größer, je geringer der extrazelluläre pH-Wert ist.

Als Transporter in diesem Kontext ist der Chlorid-Bikarbonat-Austauscher zu nennen, der unter physiologischen Bedingungen in der Regel einen nach intrazellulär gerichteten Cl-Transport verursacht. Im Blättermagen findet sich jedoch durch die extrem hohe Konzentration an Bikarbonat im Lumen bei niedriger luminaler Chloridkonzentration ein andersherum ablaufender Transport, der  $HCO_3^-$  im Austausch gegen ein Chlorid-Ion in die Zelle befördert. Eine Beteiligung dieses Transporters an der  $pH_i$ -Regulation beschrieb erstmalig (Vaughan-Jones, 1979).

Auch der oben beschriebene elektrogene Natrium-Bikarbonat-Cotransporter kann in einer  $Na^+ : HCO_3^-$  Stöchiometrie von 1:3 und einer nach extrazellulär orientierten Transportrichtung als *acid loader* tätig sein. Im Vormagensystem der Wiederkäuer besteht zusätzlich die Möglichkeit eines SCFA-Bikarbonat-Austauscher, der Bikarbonat aus der Zelle heraus transportiert und dementsprechend als *acid loader* arbeitet. Dieser Mechanismus spielt jedoch am Psalter eine untergeordnete Rolle.

Jeder Zelltyp hat indes seine individuelle Anordnung von *acid extruders* und *loaders*, die von den jeweiligen intra- und extrazellulären Begebenheiten abhängen. Zusätzlich werden diese Prozesse in einem nicht unerheblichen Umfang von verschiedenen Signalen mit unterschiedlichen Übertragungswegen beeinflusst. Um Herauszufinden, welche Mechanismen in dem zu untersuchenden Zelltyp vorherrschen, müssen die einzelnen Effekte separiert nach einer Säureexposition betrachtet werden. Dies kann am ehesten gelingen indem spezifische Blocker für die jeweiligen Transportprozesse eingesetzt werden.

Eine ausschlaggebende Entdeckung im Zusammenhang mit der intrazellulären pH-Regulation wurde von einer Vielzahl von Autoren an unterschiedlichen Epithelien gemacht (Bugaut, 1987; Busche und von Engelhardt, 2007; Charney *et al.*, 1998; Chu, S. und Montrose, 1999; Gäbel *et al.*, 2002; Genz *et al.*, 1999; Kawamata *et al.*, 2006; Leonhard-Marek *et al.*, 2006; Lucas *et al.*, 1975; Shiau *et al.*, 1985). Sie zeigten das Vorhandensein eines pH-Mikroklimas an der apikalen (luminalen) Oberfläche der Epithelien. So unterscheidet sich der pH-Wert direkt an der *supraapikalen* Oberfläche von demjenigen in der jeweiligen *bulksolution* (der Pufferlösung, die das Epithel umspült). Es wird vermutet, dass dieses Mikroklima durch die Transportaktivitäten in der Membran entsteht, insbesondere diejenigen die den pH regulieren und auf diese Weise wiederum selbst den Transport beeinflusst. Wie bereits erwähnt konnte ein solches Mikroklima am Pansen nachgewiesen werden (Abdoun *et al.*, 2010; Leonhard-Marek *et al.*, 2006).

## 2.5 pH-sensing

Das *pH-sensing* (auch *Acid-sensing* oder *Protonen-sensing* genannt) hat in der Zelle die Funktion eines Schutzmechanismus gegenüber einem Abfall des intrazellulären pH-Wertes, der unter anderem zur Zellnekrose führen würde. Zu diesem Mechanismus gehören die frühzeitige Detektion eines erniedrigten pH-Wertes in der Zelle über den so genannten pH-Sensor und das Einleiten von gegenregulatorischen Maßnahmen (hauptsächlich die Ausschleusung von Protonen aus der Zelle). In den meisten Untersuchungen wurde diese Gegenregulation vom NHE übernommen. Als pH-Sensoren können verschiedene Proteine fungieren. Bei einigen ist die Aktivität bzw. die Affinität der Ligandenbindung sensitiv gegenüber sehr kleinen pH-Veränderungen und bei anderen reagieren die titrierbaren Gruppen bestimmter Aminosäuren (in Abhängigkeit vom pK-Wert) (Fitch *et al.*, 2006; Srivastava *et al.*, 2007). Es folgen pH-sensitive reversible Änderungen der Proteinstruktur. Als Beispiel seien hier die allosterische Konformationsänderung des NHEs durch intrazelluläre Protonen genannt und der durch pH-Änderungen angetriebene Wechsel in der Affinität des Hämoglobinmoleküls für Sauerstoff (Bohr-Effekt). Bei den letzteren fungiert die Aminosäure Histidin als pH-Sensor (Lukin und Ho, 2004) und ebendiese löst auch bei dem Prionenprotein die auf Protonen reagierende Konformationsänderung aus (Zahn, 2003). Ludwig *et al.* (2003) demonstrierten, dass der ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 (OGR1) pH-abhängig die Inositol-Phosphat Bildung aktiviert. Der Rezeptor hat seine höchste Aktivität bei pH 6,8 und wird bei pH 7,8 inaktiviert. Über Mutationsversuche konnten sie nachweisen, dass Histidin an der extrazellulären Oberfläche am *pH-sensing* beteiligt ist. Der GPR4 (G-protein-coupled receptor 4) ist sehr nah mit dem OGR1 verwandt und zeigt ebenfalls ein Histidin

vermitteltes *Protonen-sensing*, aber dieser Rezeptor stimuliert indes die cAMP Bildung (Ludwig *et al.*, 2003; Tomura *et al.*, 2005).

Entsprechend seines großen Einflusses auf die intrazelluläre pH-Regulation zeigt auch der NHE, wie bereits erwähnt, eine Abhängigkeit von eben diesem. Wenn der  $\text{pH}_i$  über einem bestimmten Aktivitätsgrenzwert bzw. -schwellenwert liegt, dem so genannten *Set Point*, ist der Transporter inaktiv, wird aber schnell aktiviert bei einem Abfall des pH-Wertes unter den Wert des *Set Points* (Cha *et al.*, 2002). Am *Set Point* selber, der dem physiologischen pH-Wert der Zelle entspricht, ist der NHE aktiv und transportiert langsam (Cha *et al.*, 2002), bzw. ist bei einem intrazellulären pH-Wert von etwa 7,2 inaktiv (Wakabayashi *et al.*, 2003a). Beim *pH-sensing* des NHEs sorgen nachfolgend verschiedene second-messenger, zum Beispiel c-SRC und ERK (Tsuganezawa *et al.*, 2002) für eine Aktivierung des Transporters, bzw. einen zusätzlichen Einbau in die apikale Membran durch Exozytose (Yang *et al.*, 2000). Beim NHE1 geschieht dies beispielsweise durch eine Veränderung des *Set points* in Richtung alkalisch oder sauer, indem die  $\text{H}^+$ -Affinität an der *modifier-site* verschoben wird und auf diese Weise der NHE de- bzw. aktiviert wird (Ikeda *et al.*, 1997; Wakabayashi *et al.*, 2003b), vergleichbar mit der Sollwertverschiebung der Körpertemperatur bei Fieber. Die Funktion des pH-Sensors wird nach Cha *et al.* (2002) bei dem NHE3 zwei Histidin-Resten zugeschrieben, bei dem NHE1 wiederum sehen Wakabayashi *et al.* (2003b) die Aminosäuren Arginin und Glycin in dem transmembranösen Segment 11 als Protonen-Sensor. Laut Wakabayashi *et al.* (1997a) kontrolliert die Calmodulin-bindende Domain das *pH-sensing* des NHE1, wobei in einer neueren Untersuchung dem Calcineurin B homologen Protein (CHP) diese Funktion zugeschrieben wird (Ammar *et al.*, 2006). Die Aktivierung des NHE1 und des NHE3 nach einer Zellansäuerung folgt erst nach 3-5 min, was durch eine Konformationsänderung des Transporters verursacht sein könnte (Wakabayashi *et al.*, 2003a). Da auch durch intrazelluläres Natrium eine Aktivierung ermöglicht wurde, wird vermutet, dass auch Natrium an die  $\text{H}^+$ -*modifier-site* binden kann (Green *et al.*, 1988).

Bei Experimenten an einer humanen Nierenzelllinie konnten Lang *et al.* (2003) zeigen, dass die in der Plasmamembran existenten NHE3 und die  $\text{H}^+$ -ATPase bei einem intrazellulären pH-Wert von 7,4 inaktiv sind, aber eine Absenkung des  $\text{pH}_i$  auf 6,5 eine zeitabhängige Aktivierung von beiden Protonenausschleussern verursachte.

Ein weiteres *acid-sensing* hat Gluck (2004) in Nierenepithelien gefunden. In diesem Fall scheint die intrazelluläre Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) als Sensor aufzutreten und über mehrere Signalwege eine vermehrte Expression des apikalen NHE3 zu vermitteln. Eine Funktion der Pyk2 als pH-Sensor für den NHE3 beschrieben auch Li *et al.* (2004).

Mugharbil *et al.* (1990) sahen in ihren Experimenten einen Beweis für eine interne pH-sensitive *modifier-site* am  $\text{Cl}/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher. Wie oben bereits beschrieben, scheinen die Chlorid-Bikarbonat-Austauscher SLC26A7 und SLC26A9 auch als pH-sensitive Chloridkanäle zu funktionieren (Dorwart *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2005).

Interessanterweise öffnet der ROMK (Kaliumkanal) auch in Abhängigkeit vom intrazellulären pH-Wert, wobei hier die Aminosäure Lysin als pH-Sensor diskutiert wird (Rapedius *et al.*, 2006; Rapedius *et al.*, 2007). Der ENaC wird von einem verminderten extrazellulären pH-Wert stimuliert und zwar durch eine Erhöhung der totalen Kanaldurchlässigkeit (Awayda *et al.*, 2000).

Roos und Boron (1981) beschrieben ferner die Möglichkeit eines  $\text{CO}_2$ -Sensing.

## 2.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Diese Arbeit wurde vorrangig durchgeführt, um die Mechanismen der intrazellulären und auch supraapikalen pH-Regulation im / am Blättermagenepithel des Schafes näher zu charakterisieren. In diesem Zusammenhang sollen folgende Ziele erreicht und nachstehende Fragestellungen / Hypothesen geklärt werden:

- ◇ Die pH-Messung mittels einer H<sup>+</sup>-sensitiven double-barreled Mikroelektrode soll etabliert werden. Mit dieser Methode sollte es möglich sein, den pH-Wert sowohl an der Oberfläche des Psalterepithels als auch in der Epithelzelle selbst zu bestimmen.
- ◇ Die Existenz eines *supraapikalen* pH-Mikroklimas am Blättermagenepithel soll bestätigt werden. Zusätzlich soll geklärt werden, ob es sich hierbei um ein saures Mikroklima handelt, welches die luminalen pH-Änderungen abpuffert. Dementsprechend müsste dieses alkalischer sein bei einem niedrigen pH-Wert in der *bulk-solution*.
- ◇ Der pH-Wert in der Zelle des Psalterepithels soll bestimmt werden.
- ◇ Der Einfluss der luminalen kurzkettigen Fettsäuren auf den *supra-* und *subapikalen* pH-Wert und auf seine Regulation soll eingehend untersucht werden.
- ◇ Durch Einsatz bestimmter Hemmstoffe soll eine Beteiligung der einzelnen Transportmechanismen an der pH-Regulation und deren Einfluss auf die elektrophysiologischen Parameter bestimmt werden.

Zusätzlich soll der Einfluss von Natrium, Kalium und Chlorid auf die elektrophysiologischen Parameter bestimmt werden.

Abschließend soll das bereits vorhandene Transportmodell am Blättermagen des Schafes aktualisiert und diskutiert werden.

## **3 MATERIAL UND METHODEN**

### **3.1 Versuchstiere**

Die verwendeten Psalterepithelien stammten von institutseigenen Schafen, die zum größten Teil eigens für Versuche mit Vormagenepithelien gekauft wurden.

Die Schafe wurden im Institut für Veterinär Anatomie der Freien Universität Berlin eingestallt und vor Ort getötet.

Die Tiere kamen aus unterschiedlichen Haltungen und wurden entsprechend auch unterschiedlich gefüttert. Auch in den Variablen Alter und Geschlecht herrschte keine Gleichheit.

### **3.2 Gewinnung und Präparation des Psalterepithels**

Die einzelnen Schafe wurden am Morgen des Versuchstages mittels Bolzenschuß betäubt und darauf folgend durch Blutentzug getötet. Unmittelbar im Anschluss wurde die Leibeshöhle eröffnet und Vormagentrakt entnommen. Der separierte Blättermagen wurde nach Eröffnung entlang der großen Krümmung, sprich von der Hauben-Psalteröffnung zur Psalter-Labmagenöffnung, durch mehrere Waschungen mit dem Transportpuffer (38° C, mit Carbogen begast – 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>, Zusammensetzung s. ANHANG) von Ingestaresten befreit. Nun konnten die einzelnen Blätter an ihrer Basis mittels einer stumpfen Präparierschere (nach Metzenbaum) herausgeschnitten werden. Die beiden miteinander verbundenen Epithelschichten wurden manuell, von der Schnittkante ausgehend, auseinandergetrennt. Die so präparierten Epithelblätter wurden sofort in ein mit 38° C warmen Transportpuffer gefüllten Deware-Gefäß gelegt, das permanent mit Carbogen begast wurde. In diesem Behältnis wurden die Epithelblätter ins Labor transportiert.

Die Zeitspanne von der Tötung der Tiere bis zum Einbau der Epithelstücke in die Versuchsapparatur betrug in der Regel 30 bis 50 Minuten.

Da für die Versuche mit der Mikroelektrode nur kleine Epithelstücke (ca. 1 cm<sup>2</sup>) benötigt wurden, waren die Versuchstage so organisiert, dass parallel weitere Versuche mit Blättermagen- und/oder Pansenepithelien innerhalb der Arbeitsgruppe Transportphysiologie ablaufen.

### **3.3 Ussing-Kammer-Methode**

#### **3.3.1 Aufbau und Inkubation**

Die elektrophysiologischen Messungen erfolgten mit der von Ussing und Zerahn (1951) entwickelte Apparatur – Ussing-Kammer. Das Herzstück dieser Apparatur ist eine Kammer aus Plexiglas, deren zwei Hälften separat perfundiert werden können.

Die kombinierte Versuchsanordnung mit der Mikroelektrode bedingte eine Modifizierung der herkömmlichen Ussing-Kammer (nachfolgend Mikro-Ussing-Kammer genannt).

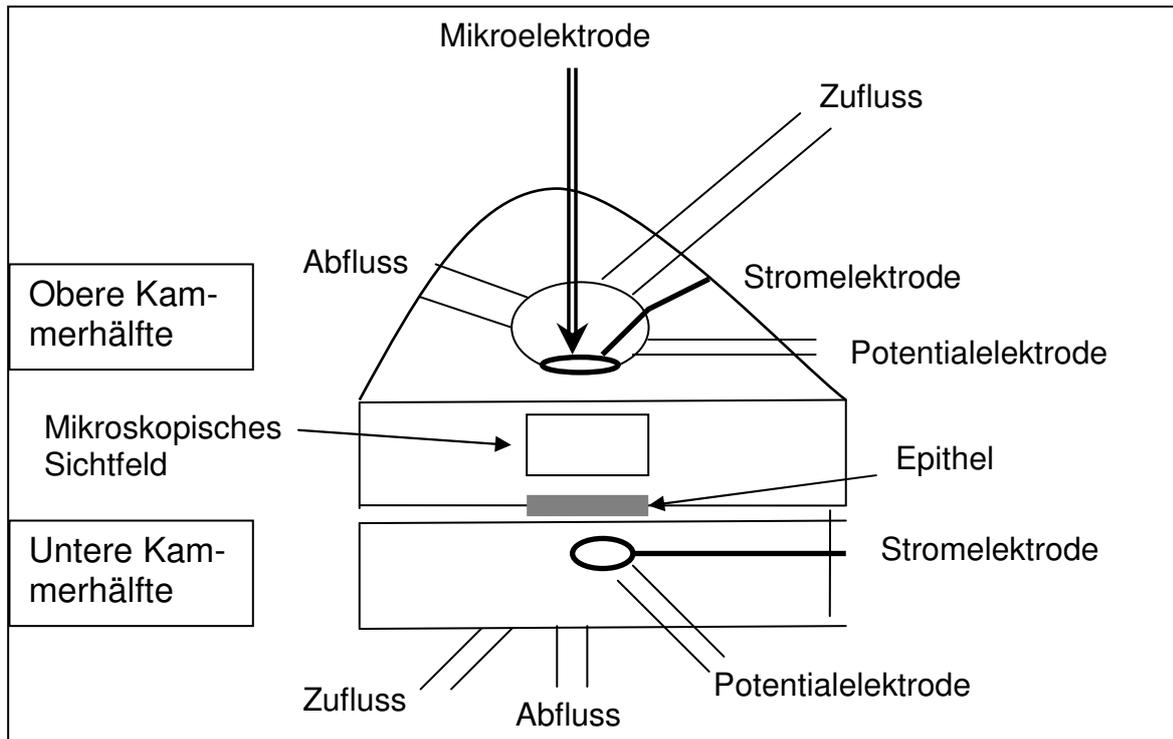


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Mikro-Ussing-Kammer, Erläuterung s. Text.

In diesem Fall war die Kammer wesentlich kleiner und das Epithel wurde entgegen der gewohnten Methode waagrecht zwischen die beiden Kammerhälften eingespannt, und zwar mit der serosalen (= Blutseite = basolaterale) Seite des Epithels nach unten zeigend und mit Hilfe eines darunter liegenden Drahtnetzes stabilisiert. Die mukosale (= luminale = apikale) Kammerhälfte war nach oben hin offen, so dass die Mikroelektrode von dort an das Epithel herangeführt werden konnte. Die Fläche des umspülten Epithels betrug  $0,5 \text{ cm}^2$ . In der oberen Kammerhälfte befand sich ein aus Glas befindliches Sichtfeld, durch das mit dem davor positionierten Mikroskop das Epithel und die Mikroelektrode vergrößert betrachtet werden konnten. Damit die elektrischen Störfaktoren von außen so gering wie möglich blieben, wurde die gesamte Apparatur von einem Faraday-Käfig umgeben. Zusätzlich stand die Versuchsausstattung auf einem speziellen pneumatischen Tisch, der jede Erschütterung abpufferte und so stabile Zellpunktionen ermöglichte.

Die Kammerhälften wurden, jeweils von einer Pumpe (4-Kanal-Stativ-Pumpe, Ismatec SA) angetrieben, getrennt im Durchflussverfahren mit einer Durchflussgeschwindigkeit von  $2,4 \text{ ml/min}$  perfundiert. Es konnte zwischen insgesamt acht Lösungsbehältnissen durch Betätigung eines Dreiwegehahnes gewechselt werden. Die zimmerwarmen Lösungen wurden in ihren jeweiligen Behältnissen ständig mit Carbogen begast. Die gesamte Perfusionsapparatur befand sich auf einem zweiten Tisch, dadurch gab es keine Störungen der Punktion durch Erschütterungen in Folge des Pumpbetriebes bzw. der Betätigung der Dreiwegehähne. Die dünnen Perfusionsschläuche liefen durch dickere mit erwärmtem, zirkulierendem Wasser gefüllte Schläuche, so dass eine Inkubation des Epithels bei einer Temperatur von ca.  $38^\circ \text{C}$  garantiert werden konnte. Die in den Kamm erhaltene befindliche Flüssigkeit wurde auf beiden Seiten permanent durch eine Absaugeinrichtung, die mit einer Pumpe verbun-

den war (Masterflex R/S, Cole Parmer Instrument Company), entfernt und verworfen. Dadurch war ein kontinuierlicher und annähernd vollständiger Austausch der jeweiligen Inkubationslösung möglich. Dieser Austausch wurde auch durch das spezielle Perfusionssystem der Kammer unterstützt, das für einen epithelnahen Flüssigkeitszustrom und einer epithelfernen Absaugung (an der Oberfläche der Flüssigkeit) sorgte. Zur Beleuchtung kam eine Kaltlichtquelle (KL 1500, Schott) mit zwei beweglichen Lampen zum Einsatz.

### 3.3.2 Elektrophysiologisches Messprinzip

In jeder der beiden Hälften der Mikroelektrodenkammer befanden sich möglichst nahe am Epithel 3%ige KCl-Agarbrücken, die mit Ag/AgCl-Elektroden verbunden waren, um die transepitheliale Potentialdifferenz ( $PD_t$ ) zwischen der mukosalen und der serosalen Gewebeseite zu bestimmen. Zusätzlich existierten in jeder Hälfte ringförmige Ag/AgCl-Elektroden, um einen transepithelialen Strom ( $I_t$ ) zu applizieren. Die Strom- und Potentialelektroden beider Kammerhälften wurden mit einer mikroelektronischen Mess- und Klemmapparatur (Biomedical Instruments, München) verbunden, von der mit Hilfe des Datenerfassungsgerätes „PowerLab“ (ADInstruments) die Daten an den angeschlossenen Computer weitergeleitet wurden. Mit dem PC-Programm „Chart5 für Windows“ (ADInstruments) konnten auf diese Weise die folgenden elektrophysiologischen Parameter kontinuierlich angezeigt und aufgezeichnet werden:

- Transepitheliale Potentialdifferenz,  $PD_t$  [mV]
- Gewebeleitfähigkeit,  $G_t$  [ $mS \cdot cm^{-2}$ ] = reziproker Wert des Gewebewiderstandes

$$G_t = \frac{1}{R_t}$$

- Transepithelialer Strom,  $I_t$  [ $\mu A \cdot cm^{-2}$ ].

Die zu Grunde liegenden Theorien und Berechnungen, die mit Strom- und Spannungsklemmgeräten gemacht werden können und des Weiteren eine detaillierte Beschreibung der Messtechnik gehen aus der Dissertation von Scheffler (1984) hervor.

Die Mess- und Klemmapparatur kann zwischen verschiedenen Betriebsarten hin- und hergeschaltet werden. Im *open-circuit* wird die  $PD_t$  nicht beeinflusst und somit ist eine direkte Messung der elektrogenen Transportprozesse (Nettoladungstransport) möglich. Die  $G_t$  und der  $I_t$  können mit Hilfe zugeführter definierter Strompulse ( $\Delta I$ ), die eine kurzfristige Änderung der  $PD_t$  ( $\Delta PD_t$ ) bewirken, nach dem Ohm'schen Gesetz berechnet werden.

Im *voltage-clamp*-Modus wird das Potential ( $PD_t$ ) durch externe Stromeinspeisung über die Stromelektroden auf einen bestimmten Wert geklemmt. Wird die Spannung auf 0 mV geklemmt (*short-circuit*), also vollständig kompensiert, entspricht der von extern gelieferte Gegenstrom, dem Strom durch das Epithel und wird als Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$  mit sc für short-circuit) bezeichnet. Der elektrische Gradient wird ausgeschaltet (keine passiven Ionenbewegungen). Wenn auch kein chemischer Gradient vorliegt (= identische Ionenkonzentration auf beiden Seiten) entspricht der Kurzschlussstrom dem aktiven Netto-Ladungstransport. Ist dieser positiv, liegt ein aktiver Netto-Kationentransport (Absorption) durch das Epithel von der mukosalen zur serosalen Seite vor bzw. ein Netto-Anionentransport (Sekretion) in umgekehrter Richtung. Der Strom wurde in  $\mu A \cdot cm^{-2}$  gemessen. Aufgrund der Tatsache, dass der Kurzschlussstrom ein Maß für den Ionentransport ist, wird er oftmals umgerechnet in die Einheit  $\mu eq \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$  (= Transport eines einwertigen Teilchens pro Zeit und Fläche). Findet

ein Nettotransport von 1  $\mu\text{mol}$  eines einwertigen Ions innerhalb einer Stunde über eine Gewebefläche von 1  $\text{cm}^2$  statt, entspricht dies einem Kurzschlussstrom von 26,9  $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Die Berechnung der  $G_t$  erfolgte analog.

In der nachfolgenden Tabelle ist eine Übersicht der bereits am Psalterepithel gemessenen elektrophysiologischen Parameter zu sehen.

Autor	Isc in [ $\mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ] und [ $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ]	PD <sub>t</sub> [mV]	G <sub>t</sub> [ $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]
Harrison, R. A. <i>et al.</i> (1970)	0,37 – 1,41 10 – 37,9	5 – 25	–
Martens und Gäbel (1988)	1,5 ± 0,15 40,35 ± 4,04	19 – 26	1,8 ± 0,24
Schultheiss (1995)	1,74 ± 0,24 46,81 ± 6,46	13,8 ± 0,9	5,03 ± 0,67
Tiling (1997)	1,3 – 2,4 34,97 – 64,56	10 – 16	2 – 4
Ali (2005)	1,43 – 1,98 38,5 – 53,26	–	2,3 – 3,9
Beisele (2008)	~ 1,4 ~ 37, 66	~ 22	~ 1,5

Tab. 1 Eine Übersicht der zuvor am Psalterepithel gemessenen elektrophysiologischen Parameter.

### 3.4 Methoden zur Messung des intrazellulären pH-Wertes

#### 3.4.1 Einleitung und Übersichtung der verschiedenen Methoden

Um die pH-Regulation der Zelle zu erforschen wurden unterschiedliche Methoden zur Messung des intrazellulären pH-Wertes entwickelt. Ursprünglich war es nur möglich den pH-Wert der Zelle in Zelllysaten oder Homogenaten zu messen, wobei der pH-Wert beispielsweise mit Hilfe von der Chloridverteilung bestimmt wurde. Diese Methode ist jedoch allerhöchstens noch zur Bestimmung des pH<sub>i</sub> von nicht kernhaltigen Erythrozyten nutzbar, da sich der pH-Wert auch nach der Zellzerstörung verändert, unter anderem auf Grund von weiterlaufender CO<sub>2</sub>- und Milchsäureproduktion.

Eine neuere Variante ist die so genannte Verteilung der schwachen Säuren oder Basen. Bei dieser Methode geht man davon aus, dass nur die ungeladene Form der Säure bzw. Base die Zellmembran durchdringen kann und dass sich eine gleichwertige Konzentration intra- und extrazellulär einstellt, wenn die Zelle über einen gewissen Zeitraum mit diesen exponiert wird. In dieser steady-state Verteilung der Indikatoren (Säuren oder Basen, beispielsweise NH<sub>3</sub>, DMO – 5,5-dimethyl-2,4-oxazolidine-dione-2-<sup>14</sup>C - oder Methylamin) kann der pH-Wert mit entsprechenden Formeln berechnet werden. Weitere Details sind in dem Review von Roos und Boron (1981) zu finden. Der Vorteil dieser Methode ist die einfache und leichte Handhabung. Die Nachteile überwiegen jedoch: a) die relativ langsame Verteilung

lung der Indikatoren, b) durch die notwendige Zerstörung der Zellen kann nur eine Messung erfolgen und entsprechend können pH-Veränderungen nicht detektiert werden, c) Fehlerquellen ergeben sich durch das Eingehen von Bindung oder durch die metabolische Transformation der Indikatoren, d) Probleme bei der Bestimmung des extrazellulären Volumens, in dem die Indikatoren ebenfalls vorhanden sind, e) eine eventuell abweichende Dissoziationskonstante des Indikators in der Zelle, f) die Impermeabilität für die geladene Form kann nicht hundertprozentig gewährleistet werden und g) die schwachen Säuren und Basen können den intrazellulären pH-Wert direkt beeinflussen.

Die pH-Messung mit Hilfe der Colorimetrie und der Fluorometrie ist eine weitere Möglichkeit. Diese pH-sensitiven Farbindikatoren zeigten jedoch metachromatische, Protein- und Salz-Fehler und können zusätzlich durch ihre Anwesenheit den pH-Wert beeinflussen. In den frühen 1980ern wurden die „einfachen“ Farbindikatoren von den Fluoreszenz-Farbstoffen abgelöst. Es gibt einige unterschiedliche Klassen innerhalb der sich Farbstoffe mit verschiedenen Eigenschaften finden. Der am häufigsten verwendete Indikator ist das BCECF (2',7'-bis(carboxyethyl)-5(and 6)-carboxyfluoreszein). Ihre direkte Reaktionszeit ermöglicht die Messung von schnellen pH-Änderungen und Abweichungen im Bereich von 0,01 Einheiten können erfasst werden.

In der Mikroelektrodenteknik findet sich eine weitere Handhabe zur Messung des  $pH_i$ . Voraussetzung ist die Punktion der Zelle mit zwei Mikroelektroden (ME) oder einer double-barreled Mikroelektrode, wobei eine (bzw. ein Kanal) sensitiv ist für  $H^+$ -Ionen und die andere (bzw. der andere Kanal) als Referenz dient. Die resultierende Spannungsdifferenz zwischen beiden ergibt eine lineare Funktion des  $pH_i$ . Die Elektroden können in drei Typen unterteilt werden: metallische Elektroden, Elektroden aus pH-sensitivem Glas und Elektroden mit flüssigen Membranen. Bei den erstgenannten war die Miniaturisierung schwierig, da sie einen sehr hohen elektrischen Widerstand hatten. Diese Untergruppe gliedert sich in Platin-Hydrogen Elektroden, Antimony Elektroden und Tungsten-Elektroden auf. Die metallischen Elektroden wurden in den 1950ern von den pH-sensitiven Glaselektroden weitgehend ersetzt, da diese relativ geringe Widerstände haben, nicht sensitiv gegenüber oxidierende oder reduzierende Agenzien sind und relativ schnell und stabil reagieren können. Die hauptsächlich verwendeten Formen bei diesem Typ von Elektroden sind die kombinierte Elektrode von Caldwell (1954) und die recessed-Tip-Elektrode von Thomas (1974). Bei der kombinierten Elektrode ist die Referenzelektrode an der pH-sensitiven Elektrode befestigt. Sie wird als auch exposed-Tip Elektrode bezeichnet, da eine etwa 500  $\mu m$  lange Spitze des  $H^+$ -sensitiven Glases aus dem isolierten Glas hervorragt und komplett in die Zelle eingeführt werden muss. Hinke (1967) hat diese Form modifiziert, so dass nur noch 100  $\mu m$  in die Zelle gelangen mussten, was die Anwendung jedoch immer noch auf sehr große Zellen beschränkte. Bei der „Thomas-Mikroelektrode“ mit dem recessed-Tip Design liegt das pH-sensitive Glas innerhalb des isolierten Glases und nur die Spitze mit einer Länge von 1-2  $\mu m$  muss in der Zelle platziert werden. Obgleich der sehr aufwendigen und schwierigen Fertigung selbst als single-Elektroden (nur ein Kanal, ohne Referenz) schaffte es de Hemptinne (1980) diese auch als double-barreled Mikroelektrode zu konstruieren. Dennoch wies diese Elektrode eine relativ noch zu langsame Reaktion, zu lange Spitzen und eine aufwendige Fertigung auf. Sie wurden weitgehend von den Liquid Ion-exchange (LIX) Mikroelektroden abgelöst, bei denen sich in der Spitze ein kleine Menge des in organischem Lösungsmittel

gelösten Ionen-Austauschers befindet und so eine flüssige Membran gebildet wird. Die erste LIX Elektrode wurde von Khuri *et al.* (1974) entwickelt und zwar mit einem Bikarbonat-sensitivem Austauscher. Sie hatten Spitzen mit einer Größe unter einem  $\mu\text{m}$  und einer schnellen Reaktionszeit. Bei der Weiterentwicklung dieser Ionenaustauscher und der Elektroden war die Arbeitsgruppe um Ammann (1981) Vorreiter. Die von Amman entwickelte pH-sensitiven Mikroelektrode wurde in den Experimenten dieser Arbeit verwendet und in folgenden Abschnitten findet eine ausführliche Erläuterung statt.

Eine letzte Variante für die pH-Messung besteht in der nuklearen Magnetresonanz (NMR) Spektroskopie. Die Vorteile dieser Methode sind die nicht invasive und nicht destruktive Technik, die hohe Geschwindigkeit und die hohe Sensitivität. Dem gegenüber stehen die aufwendige Gerätschaft und die Anordnung unter unphysiologischen Bedingungen.

### 3.4.2 Vergleich der pH<sub>i</sub>-Messung mit Fluoreszenzindikatoren und Ionen-sensitiven Mikroelektroden

Die beiden in der aktuellen Forschung hauptsächlich verwendeten Techniken zur Messung des intrazellulären pH-Wertes sind die Fluoreszenzindikatoren und die Ionen-sensitiven Mikroelektroden (ISE) in der LIX-Variante. Beide Methoden haben Vor- und Nachteile, die nachfolgend erläutert werden (in Anlehnung an Voipio *et al.* (1994) und Schwiening (1999)).

#### Die Vorteile der Fluoreszenzindikatoren:

- ◇ Sie haben eine Reaktionszeit von Millisekunden
- ◇ Eine kontinuierliche Messung wird ermöglicht, ist jedoch zeitlich begrenzt auf Grund des Bleichvorgangs der Indikatoren, der die Emission vermindert
- ◇ Sie zeigen eine gute Genauigkeit, die aber durch Interferenzen und durch Autofluoreszenz (produziert von einigen Pharmakons) nicht immer gewährleistet ist
- ◇ Es ist eine nicht-invasive Methode
- ◇ Sie können auch bei sehr kleinen Präparaten bzw. Zellen verwendet werden
- ◇ Es ist wenig manipulatives Geschick im Umgang mit diesen Indikatoren notwendig

#### Die Nachteile sind folgende:

- ◇ Die zeitgleiche Messung der Zellgesundheit ist nicht möglich, wobei diskutiert wird, ob der Farbverlust der Indikatoren auch durch einen Verlust der Zellintegrität hervorgerufen wird
- ◇ Eine Hemmung von Transportern erfolgt durch die Bindung mit diesen; beispielsweise bindet BCECF an der Calcium-ATPase, einem wichtigen *acid-loading* Mechanismus
- ◇ Kontamination mit exogenen Transportern sind möglich, die in den Eichlösungen enthalten sind und in der Apparatur verbleiben und nachfolgend das Gewebe kontaminieren
- ◇ Es besteht die Gefahr, dass der Indikator in den Zellorganellen „gefangen“ wird, so ist die pH-Messung nur von dem Zytosol nicht mehr garantiert
- ◇ Die Eichung kann unzureichend und schwierig sein, insbesondere da der Farbstoff auf Grund seiner hohen Ladung an zelluläre Proteine bindet und dadurch eine Veränderung der Emission erfolgt
- ◇ Der Indikator ändert möglicherweise die intrazelluläre Pufferkapazität für entsprechende Ionen

- ◇ Der hohe Verbrauch von Fluoreszenzindikatoren führt zu relativ hohen laufenden Kosten.
  - ◇ Die Indikatoren sind phototoxisch
  - ◇ Sie zeigen eine Licht-Interferenz, d.h. es muss im Dunklen gearbeitet werden
  - ◇ Im Versuchsablauf bleichen die Indikatoren mehr oder weniger stark und zeigen dementsprechend eine schwächere Emission als erforderlich
  - ◇ Für einige wichtige Ionen sind keine guten Indikatoren erhältlich
  - ◇ Die Methode eignet sich nicht für optisch dichte Gewebe, wie es das Psalterepithel ist
- Bei den H<sup>+</sup>-sensitiven Mikroelektrode sind die Vorteile:
- ◇ Eine gleichzeitige Messung von elektrophysiologischen Parametern ist möglich
  - ◇ Eine Beeinflussung der Zellorganellen durch die pH-Messung kann ausgeschlossen werden
  - ◇ Die pH-Messung erfolgt lokal an einem Punkt, d.h. die pH<sub>i</sub>-Regulationsmechanismen an diesem bestimmten Ort können beobachtet werden
  - ◇ Eine kontinuierliche Messung über einen gewissen Zeitraum ist möglich
  - ◇ Es können mit entsprechenden ME zwei oder mehr Ionen gleichzeitig gemessen werden
  - ◇ Nach Anschaffung entsprechender Geräte sind die laufenden Kosten gering
  - ◇ Die Eichung ist in der Regel einfach
- Die Nachteile:
- ◇ Es sind relativ große Zellen notwendig (mind. 50x10 µm), um eine gleichzeitige Punktion beider Elektroden in einer Zelle zu garantieren. Obwohl die Größe der Zelle bei Verwendung von double-barreled ME etwas vermindert werden kann, muss sie dennoch größer als 15 µm sein (Nett und Deitmer, 1996)
  - ◇ Die Genauigkeit ist bei der pH-Messung sehr gut, bei anderen Ionen z. T. unzureichend
  - ◇ Die MEs sind sehr empfindlich gegenüber elektrischer Beeinträchtigung und benötigen infolgedessen eine gute Abschirmung
  - ◇ Ein hohes Maß an manipulativem Geschick ist für den Umgang mit den ME erforderlich
  - ◇ Die Elektroden zeigen eine Reaktionszeit im Sekundenbereich

Abschließend sei hier noch die Arbeit von Nett und Deitmer (1996) zusammengefasst, die zeitgleiche pH-Messungen mit dem pH-sensitiven Fluoreszenzindikator BCECF und double-barreled pH-sensitiven Mikroelektroden durchgeführt hatten. Sie beobachteten während der Messung mit BCECF eine irreversible Depolarisation des Zellmembranpotentials, die anscheinend durch die Toxizität der bleichenden Produkte des Indikators hervorgerufen wurde, insbesondere bei großen Mengen des Indikators, die das Überleben der Zelle verminderten. Mit der Mikroelektrode wurden pH-Werte gemessen, die bis zu 0,15 pH-Einheiten geringer waren als mit dem geeichten BCECF-Signal. Nett und Deitmer (1996) entdeckten durch zeitgleiche pH-Messung mit der Mikroelektrode während des Eichvorganges des Fluoreszenzindikators, dass dieser Fehler in einer unzureichenden Kalibrierung des BCECF begründet liegt.

### **3.4.3 Entscheidungskriterien für die in dieser Arbeit verwendete Methode**

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die H<sup>+</sup>-sensitive Mikroelektrode verwendet und zwar in der Ausführung einer double-barreled (doppelläufige) ME. Der bedeutendste Vorteil liegt in

der Kombination mit der Ussing-Kammer-Technik, da auf diese Weise zeitgleich transepitheliale und intraepitheliale elektrophysiologische Parameter erfasst werden konnten.

Ausschlaggebend für die Wahl der Technik war, dass das intakte Psalterepithel als mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel optisch dicht und für fluoreszenzmikroskopische Verfahren daher ungeeignet ist. Eine Methode zur Isolierung und Kultivierung isolierter Psalterepithelzellen stand nicht zur Verfügung und hätte zu Ergebnissen geführt, die nur unter Einschränkungen auf das Gesamtepithel zu übertragen gewesen wären.

Die Messung des apikalen Membranpotentials gibt Rückschlüsse auf die „Gesundheit“ der Zelle. Durch die Fluoreszenzindikatoren kann die Integrität der Zellmembran gestört werden, aber dies kann nicht direkt gemessen werden. Wird durch die Punktion oder auch später die Zellmembran geschädigt, wird dies bei Messung mit Mikroelektroden durch ein verändertes apikales Membranpotential angezeigt. Ein weiteres Argument für die Kombination beider Techniken ist die Lagerung des Epithels, durch die die polarisierten Eigenschaften erhalten bleiben und dadurch die Transportprozesse den jeweiligen Membranen (apikal oder basolateral) zugeordnet werden können. Die Reaktionszeit im Sekundenbereich war für die Fragestellungen ausreichend. Auch die Interferenzen mit Zellproteinen und Pharmaka und die Puffereigenschaften der Fluoreszenzindikatoren und nicht zuletzt die aufwendigerer Eichung sprachen gegen den Einsatz der Fluoreszenzmethode.

Die metallischen pH-sensitiven Mikroelektroden werden heutzutage so gut wie nicht mehr verwendet, da ihrer Anwendung mit nicht unerheblichen Schwierigkeiten behaftet ist. Die Mikroelektroden aus pH-sensitivem Glas sind nicht so gut geeignet für die Messung des pH-Wertes sowie für den Einsatz zur Natrium-Ionen-Messung. Der hauptsächliche Nachteil dieses Typs wird bestimmt durch die Probleme bei der Herstellung, insbesondere bei der Einbettung der Spitze aus pH-sensitivem Glas in die herkömmliche Mikroelektrode. Auch das Fertigen von genügend feinen Spitzen ist noch schwieriger als bei double-barreled Mikroelektroden. Diese Elektroden zeigen auch problematisch hohe elektrische Widerstände. Zusätzlich müssen die Elektroden beispielsweise bei Thomas (1974) drei Wochen nach dem Füllen stehen bleiben (für das so genannte *soaking*), damit sie die gewünschte Reaktion von 55 mV / pH Einheit zeigen, die direkt nach dem Füllen höchstens etwa 40 mV betrug. Hinzu kommt noch die relativ langsame Reaktionszeit.

Da die Zellen des Psalterepithels relativ klein sind, würden sich Schwierigkeiten beim Punktieren ein und derselben Zelle mit zwei einzelnen Mikroelektroden ergeben. Obwohl vermutet wird, dass es sich bei diesem Epithel um einen miteinander kommunizierenden Zellverband handelt. Dies ist jedoch noch nicht nachgewiesen worden. In dieser Arbeit sind daher die LIX Mikroelektroden in der doppelläufigen Form zum Einsatz gekommen. Mit den double-barreled Mikroelektroden werden zum einen die Schäden an der Zellmembran minimiert und zum anderen wird sichergestellt, dass die Spitzen beider Kanäle in einer Zelle lokalisiert sind.

## 3.5 Mikroelektrodentchnik

### 3.5.1 Allgemein

Zusätzlich zu der oben beschriebenen Mikro-Ussing-Kammer wurde bei dieser Messmethode eine Mikroelektrode eingesetzt. Wie bereits erwähnt kamen die LIX Elektroden zur Anwendung. Diese Glaselektroden sind mit einem speziellen flüssigen Ionenaustauscher gefüllt über dem die *backfill-solution* (Pufferlösung oberhalb des Ionenaustauschers in der Glaselektrode) gegeben wird. Diese ionen-selektive Komponente, die meistens aus einem neutralen Liganden (dem so genannten Ionophor) besteht, ist in einem organischen Lösungsmittel gelöst, das nicht polar (hydrophob) ist. Entscheidend ist ein sehr enger Kontakt des hydrophoben Ionenaustauschers mit der Glaswand der Elektrode, da ansonsten die wässrige *backfill-solution* zwischen die Membran und die Glaswand gelangt und für einen Kurzschluss der Ionen-sensitiven Signale sorgt. Um diesen Kontakt zu ermöglichen, muss die Glaswand durch den Silanisierungsprozess hydrophobisch beschichtet werden.

Das Ionophor ist selektiv für ein bestimmtes Ion (hier  $H^+$ -Ionen) und transportiert dieses über die Membran. Die dadurch entstehende Potentialabweichung ist proportional zur Konzentration dieses Ions. Bei Verwendung eines  $H^+$ -sensitiven Ionophores wird folglich eine vom pH-Wert abhängige Potentialänderung generiert. Zur Messung des intrazellulären pH-Wertes (= Potentialmessung) musste die Potentialänderung der  $H^+$ -sensitiven Mikroelektrode um das Membranpotential korrigiert werden. Aus diesem Grunde ist es erforderlich, gleichzeitig mit einer konventionellen, mit KCl Lösung gefüllte Mikroelektrode (Referenzelektrode) das Membranpotential der zu messenden Zelle abzuleiten. Dies wurde ermöglicht durch den Einsatz von Theta-Gläsern, die doppelläufig (double-barreled) sind und dadurch zeitgleich die  $H^+$ -Ionenkonzentration und das Membranpotentials messen. Der Nachteil dieser Elektroden besteht in der im Vergleich zu den einfachen (single) Elektroden weitaus komplizierteren Fertigung.

Die Mikroelektrode wurde aus Borosilikatglaskapillaren hergestellt (siehe unten) und mit Hilfe eines frisch chlorierten Silberdrahtes über die Sonde (Probe) mit dem hoch-ohmigen Mikroelektrodenverstärker (F-223 A Dual Electrometer, WPI) verbunden, mit Hilfe dessen das Potential gemessen wurde, welches über den jeweiligen Kanal der Mikroelektrode abfiel. Bei Einsatz der double-barreled Mikroelektrode wurden entsprechend zwei Silberdrähte und zwei Sonden verwendet. Zusätzlich zu den drei oben genannten elektrophysiologischen Parametern des gesamten Epithels wurden also die Potentiale der beiden Kanäle der double-barreled Mikroelektrode gemessen, angezeigt und aufgezeichnet, aus deren Differenz dann der pH-Wert ermittelt werden konnte.

Die Halterung der Mikroelektrode wurde an einem Mikromanipulator (MF 500) angeschlossen, mit dem diese in  $\mu\text{m}$ -Schritten bewegt werden konnte. Für die Erdung der Mikroelektrode wurde ein Erdkabel mit einem chlorierten Silberdraht verbunden, der über eine KCl-Agar-Brücke in die obere Kammerflüssigkeit getaucht wurde. Besonders wichtig für die Arbeiten mit den Mikroelektroden war das direkt vor der Kammer fest positionierte Mikroskop und das Sichtfeld aus Glas in der oberen Hälfte der Mikro-Ussing-Kammer. Damit eine ausreichende Sicht gewährleistet werden konnte, kam zusätzlich eine Kaltlichtquelle (KL 1500, Schott) mit zwei beweglichen Lampen zum Einsatz, die den Kammerbereich stark erleuchtete.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Methode der pH-Messung mit double-barreled Mikroelektrode erstmals am Institut etabliert.

### 3.5.2 Herstellung der Mikroelektroden

Es wurden sowohl einfache Mikroelektroden (single) mit einem Kanal als auch die doppelläufigen Mikroelektroden (zwei gefüllte Kanäle) gefertigt. Für die ersten wurden Borosilikatglaskapillaren (GC 150F-15, Harvard Apparatus) und für letztere Thetagläser (TGC 150-7.5, borosilicate, Harvard Apparatus) verwendet, wie sie auch von anderen Autoren benutzt wurden (Günzel und Schlue, 1996; Nett und Deitmer, 1996; Semb *et al.*, 1997). Der Vorteil der Thetagläser liegt in der im Vorfeld bereits fabrizierten Trennung der beiden Kanäle durch ein durchgehendes Septum. Außerdem sind sie laut Henderson *et al.* (1986) auch robuster als die „Twin“-Gläser, bei denen zwei einzelne Glaskapillaren zuvor zusammengefügt werden.

Damit die Glaskapillaren eine feine, lang ausgezogene Spitze erhalten, die eine Punktion der Zelle erlaubte ohne diese zu schädigen und ohne abzubrechen, kam ein computerisiertes, horizontales Elektrodenziehgerät (DMZ-Universal Puller, Zeitz) zum Einsatz, mit denen laut Hersteller auch Mikroelektroden gezogen werden können. Beispielsweise zogen Semb *et al.* (1997) mit diesem Puller erfolgreich Thetagläser mit einem Widerstand von 10-15 M $\Omega$ . Auch die Aussage von Voipio *et al.* (1994), nach dem nahezu jeder Puller für Ionen-sensitive Mikroelektroden einsetzbar ist, unterstützte die anfängliche Auswahl des Elektrodenziehgerätes. Der DMZ-Universal Puller ist vielseitig programmierbar und so gelang es größtenteils, Elektroden mit einem Widerstand von 60 bis 80 M $\Omega$  zu ziehen. Allerdings kam es bei der Reproduzierbarkeit immer wieder zu Problemen (siehe weiter unten und Diskussionsteil).

Die auf diese Weise gezogenen einfachen Mikroelektroden wurden mit 0,5 M KCl-Lösung gefüllt. Es wurde nicht wie in anderen Quellen eine 2-3 molare KCl-Lösung genommen, da die Gefahr eines Kalium-Lecks aus der Elektrode besteht, das mit der Verwendung der 0,5 molaren KCl-Lösung fünffach reduziert werden kann und dadurch vernachlässigbar ist (Fromm und Schultz, 1981). Auch für die Thetagläser (zunächst mit 0,5 M KCl gefüllt) wurde durch Ausprobieren diverser Einstellungen der einzelnen Parameter an dem Elektrodenpuller ein entsprechendes Programm gefunden, das die Einsatzfähigkeit dieser Elektroden durch erfolgreiche Epithelpunktionen bestätigte. Die mit 0,5 M KCl gefüllten double-barreled Mikroelektroden besaßen Widerstände, die im Idealfall zwischen 50 und 100 M $\Omega$  lagen; oftmals lagen die Werte jedoch auch darunter.

Die vorausgehende Reinigung der Glaskapillaren mit Säuren und anschließendem Spülen mit destilliertem Wasser wird in der Literatur widersprüchlich gehandhabt. In Anlehnung an Borrelli *et al.* (1985) und Thomas (1978) wurde diese Prozedur nicht durchgeführt und ist nach unseren Erfahrungen auch nicht notwendig. Die Glaskapillaren wurden direkt aus der Verpackung genommen und sofort in das Elektrodenziehgerät gelegt.

Das Hauptproblem bei der Herstellung von double-barreled pH-sensitiven Mikroelektroden liegt in der Verhinderung der Silanisierung beider Kanäle des Thetaglases. Auf Grund der Tatsachen, dass in diesem Institut noch keine pH-Messungen mit einer (double-barreled) Mikroelektrode durchgeführt worden sind, musste diese Methode neu etabliert werden. Durch Ausprobieren der in der Literatur beschriebenen Möglichkeiten, dem Bau einer geeig-

neten Apparatur und mehrerer Optimierungsschritte (in Bezug auf Zeitdauer und Temperatur) hat sich ein bestimmter Ablauf herauskristallisiert.

### 3.5.2.1 Silanisieren

In den Anfängen wurde die Methode von Walker (1971) benutzt, der mit flüssigem Silan arbeitete. Wenn die Glaselektroden jedoch mit flüssigem Silan, das in organischem Lösungsmittel gelöst ist, behandelt werden, kommt es sehr häufig zu Problemen mit festen Pfropfen von polymerisiertem Silan, welches die Spitze verstopft (Borrelli *et al.*, 1985; Khuri *et al.*, 1974). Daher wurde in dieser Arbeit beim Silanisieren mit dampfförmigen Silan gearbeitet, wie auch von anderen Autoren angewandt (Coles und Tsacopoulos, 1977; Edelman *et al.*, 1986; Günzel und Schlue, 1996; Munoz *et al.*, 1983; Planelles *et al.*, 1984; Rönnau, 1984; Saito *et al.*, 1990; Semb *et al.*, 1997; Willumsen und Boucher, 1992). Der nicht zu silanisierende Kanal wurde bei den Pionieren der „Dampfmethode“ (Coles und Tsacopoulos, 1977) mit N<sub>2</sub> begast. In Rahmen dieser Dissertation wurde jedoch Raumluft über einen Kompressor in den Kanal geleitet, was auch bei anderen Autoren als funktionierende Möglichkeit erwähnt wurde. Ausführliche Informationen über das Silanisieren sind in der Arbeit von Munoz *et al.* (1983) zu finden.

Der in einigen Quellen zu findende „Vorbackprozess“ (starkes Erhitzen der Elektroden vor der Silanisierung) (Deveau *et al.*, 2005; Semb *et al.*, 1997), erbrachte keine Vorteile, wobei zu berücksichtigen ist, dass das hier verwendete Silan bereits ab einer Temperatur von ca. 70 °C, teilweise auch bei Zimmertemperatur (unter Druck), gasförmig ist. Darin unterscheidet sich das im Rahmen dieser Dissertation eingesetzte Silan von den früher verwendeten, welches Temperaturen von zum Teil über 200 °C benötigte, um in den dampfförmigen Zustand überzugehen.

Die Zeitdauer der Silanisierung ist zum Beispiel bei Deveau *et al.* (2005) mit einer Stunde angegeben, jedoch fand hier ein zeitgleiches Backen statt. Günzel und Schlue (1996) silanisierten bei 40 °C für eine Zeitdauer von 45-60 Minuten. Als optimal erwies sich in dieser Arbeit eine Silanisationszeit von 45 Minuten auf einer Herdplatte, die eine Temperatur von etwa 80 °C hatte.

Mit der erbauten Silanisationsapparatur (siehe Abbildung 2) konnten acht Elektroden zeitgleich silanisiert werden. Sie bestand aus einem Glas mit einem Plastikdeckel, dessen mittlerer Teil durch ein entsprechend großes Stück Hartgummi ersetzt wurde. Durch das Gummi wurden von innen acht dünne Nadeln (Sterican, 40 x 0.4 mm) gestochen, an dessen herausragenden Teil mit Hilfe eines englumigen Gummischlauches eine weitere Kanüle befestigt wurde. Diese zweite Kanüle wurde jeweils über Gummischläuche mit einer Druckluftpumpe verbunden, deren Anschaltung als erster Schritt im Silanisierungsprozess erfolgte. Daraufhin wurden 500 µl des bei Zimmertemperatur flüssigen Dichlordimethylsilan (Fluka) in den Glasbehälter gegeben und der Deckel fest zugeschraubt. Die direkt zuvor gezogenen Thetaglaser wurden auf die Kanülenpaare geschoben, so dass sich in jedem der beiden Kanäle der Glaskapillare eine Nadel befand und die fein ausgezogene Spitze nach oben ragte. Das untere Ende der Glaskapillare wurde mit wieder abnehmbarem Knetkitt (Pritt Multi-Fix Haftpunkte) abgedichtet. Dadurch sollte die Möglichkeit eines „Rüberwandern“ des Silans in den mit Druckluft durchgepusteten Kanal verhindert werden. Der zu silanisierende Kanal wurde mit einem permanenten Stift gekennzeichnet. Das Glas wurde vorsichtig auf eine

Herdplatte (auf etwa 80 °C temperiert) gestellt und verblieb dort für 45 Minuten. Dadurch wurde der Siedepunkt des Silans erreicht und der Silandampf konnte so in den einen Kanal der Glaselektrode gelangen, während der andere mit Druckluft durchströmt wurde.



Abbildung 2: Auf dieser Abbildung ist die selbstgebaute Apparatur zur Silanisierung der Elektroden zu sehen. Das mit Silan gefüllte Glasbehältnis steht auf einer Wärmeplatte. Die Druckluft gelangte über Schläuche und Kanülen in den nicht zu silanisierenden Kanal der Glaselektrode. Von innen durch das Gummi des Deckels gestochene Kanülen lagen mit der Spitze im zweiten Kanal, durch die das gasförmige Silan in eben diesen eindringen konnte. Die Apparatur stand unter einem Abzug.

### 3.5.2.2 Backen

Ein anschließendes „Backen“ der silanisierten Elektroden war notwendig, damit das Silan mit den Hydroxyl-Gruppen des Glasrandes reagieren konnte und der Kanal auf diese Weise hydrophob gemacht wurde. Bei der Einstellung der Temperatur des Ofens und der gesamten Zeitdauer des Verbleibs der Elektroden im Ofen gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Beispielsweise: 1 Stunde bei 120-140 °C (Rön nau, 1984), 1,5 Stunden bei 100 °C (Jensen *et al.*, 1997), 2 Stunden bei 120 °C (Planelles *et al.*, 1992), 3 Stunden bei 180 °C (Wangemann *et al.*, 2007), 2 Stunden bei 130 °C (Edelman *et al.*, 1986) und 2 Stunden bei 200 °C (Günzel und Schlue, 1996). Durch Ausprobieren verschiedener Kombinationen wurden als günstigste Kombination eine Temperatur des Ofens von 180 °C (vorgeheizt) und eine Backzeit von 2 Stunden ermittelt.

### 3.5.2.3 Befüllen

Auch bei der Reihenfolge und der Art der Befüllung sind mannigfache Angaben in der Literatur zu finden. Rönna (1984) füllte beispielsweise zuerst den Referenzkanal mit KCl, Willumsen und Boucher (1992) und Jensen *et al.* (1997) füllten als erstes das Ionophor von hinten hinein (*Backfill*-Methode) und gaben darauf eine bei pH 7 gepufferte KCl-Lösung. Auch Edelman *et al.* (1986) und Wangemann *et al.* (2007) nutzten den *Backfill*-Vorgang, wobei letzterer ebenfalls gepufferte KCl-Lösung (0,5 M mit 20 mM HEPES, bei pH 7,34) verwendete.

Vielfach wurde auch zuerst die Elektrolytlösung von hinten in die Glaselektroden gegeben und daraufhin die Spitze in den Ionenaustauscher getaucht, woraufhin dieser über Kapillarkräfte in die Spitze gesaugt wurde (Deveau *et al.*, 2005). Mit dieser Methode konnten in dieser Arbeit keine ausreichend guten Elektroden hergestellt werden. Diese scheint auch für die Thetaglaser eher ungeeignet zu sein. Saito *et al.* (1990) füllten ihre Thetaglaser mit dem Ionenaustauscher von hinten und darüber einen Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,0 in Anlehnung an Ammann *et al.* (1981). In dieser Arbeit wurden die Elektroden ebenfalls von hinten gefüllt, allerdings kam als Puffer HEPES zum Einsatz.

Im Zeitpunkt gibt es ebenfalls unterschiedliche Vorgehensweisen: Deveau *et al.* (2005) füllten die Elektroden 24 Stunden vor dem Gebrauch. Der Vorteil ist, dass sich einmal vorhandene Luftblasen lösen können und außerdem der Ionenaustauscher bis in die Spitze absinken kann. Auch in dieser Arbeit wurden die Elektroden ca. 16-20 Stunden vor dem Experiment gefüllt. Bei Ausprobieren der Elektroden direkt nach dem Füllen kamen instabile und zu niedrige Reaktionswerte zustande. Es wurde versucht, eventuell vorhandene Luftblasen zuvor mit einem vorsichtigen Schnippen des Fingernagels gegen das Glas zum Aufsteigen zu bringen.

Bei der Menge des Ionophores ist zu beachten, dass eine kleinere Menge, eine schnellere Reaktion der Elektroden unterstützt. Eine gewisse Menge darf jedoch nicht unterschritten werden. Auch hier wurde durch Ausprobieren der Weg mit den besten Ergebnissen gewählt.

Direkt nach dem Backvorgang bzw. nach einer ca. 10 Sekunden andauernden Abkühlungsphase wurde der silanisierte Kanal unter Zuhilfenahme einer 1 µl Hamiltonspritze mit ca. 0,3 µl Wasserstoff-Ionophor-I Cocktail A (Fluka) befüllt, während die noch nicht befüllten Glaselektroden jeweils im geschlossenen Ofen verblieben. Die bereits gefüllten Mikroelektroden wurden mit der Spitze nach unten zeigend in eine Kittknetmasse gedrückt (am oberen Rand eines weitleumigen Glases) und dadurch senkrecht stabilisiert, damit das Ionophor bis in die Spitze „wandern“ konnte. In den nicht-silanisierten Kanal jeder Elektrode wurde anschließend mit einer sehr feinen Kanüle 0,5 M KCl-Lösung injiziert. Mit ebenso einer feinen Kanüle wurde daraufhin das Ionophor vorsichtig mit der *Backfill-solution* (eine 0,1 M KCl-Lösung, mit 20 mM HEPES gepuffert und bei einem pH-Wert von 7,0 eingestellt) unter Vermeidung von Luftblasen überschichtet. In dem silanisierten Kanal befand sich somit das Ionophor nur unmittelbar an der Spitze der Mikroelektrode. Alle so vorbereiteten Mikroelektroden verblieben bis zum Versuchsmorgen am darauf folgenden Tag - mit Hilfe der Knetmasse fixiert - in einem lichtgeschütztem Glas bei Zimmertemperatur.

Es musste also im Vorfeld jedes Versuches unter erheblichem Zeitaufwand eine große Anzahl von Mikroelektroden (8) hergestellt werden, die wegen der schlechten Lagerfähig-

keit am Morgen des Versuchstages selbst gemessen, geeicht und auf Verwendbarkeit geprüft werden mussten (Zeitkosten von etwa 2 Stunden) und in der Regel auch nur für die Dauer eines Versuchstages genutzt werden konnten.

#### 3.5.2.4 Probleme bei der Herstellung

Die pH-Messungen waren zwar sowohl *supra-* als auch *subapikal* möglich, aber es kam immer wieder zu Problemen bei der Herstellung der H<sup>+</sup>-sensitiven Mikroelektroden. Zum einen war die Reproduzierbarkeit der Widerstände über die Mikroelektroden spitze nicht immer gewährleistet. Es schien, als ob der verwendete Puller - obgleich derselben Einstellung - unterschiedliche Spitzen zog. Hauptursache für diese Probleme mag der Umstand sein, dass der DMZ-Universal Puller hauptsächlich für die Herstellung von Patch Clamp Pipetten dimensioniert ist. Zwar existieren vom Hersteller eingerichtete Programme, die es erlauben, hochohmige Pipetten bei hoher Heiztemperatur zu ziehen; jedoch deuten unsere Erfahrungen darauf hin, dass ein Arbeiten bei dieser hohen Belastung den Heizdraht beschädigt. Dieses führt dann zu Problemen bei der Reproduzierbarkeit des Widerstandswertes.

Im letzten Stadium dieser Arbeit wurde daher ein programmierbares Elektrodenziehgerät (PMP-107, Microdata Instrument Inc, South Plainfield, NJ, USA) angeschafft, mit dem es möglich war zuvor verbundenen Kapillaren (mit Filament), als so genannte piggy-back double-barreled Mikroelektroden während des Ziehvorganges gegeneinander zu verdrillen. Solch einen Puller verwendeten auch andere Autoren (Dawson und Djamgoz, 1988; de Hemptinne, 1980; Rönnau, 1984). Diese gezogenen Mikroelektroden hatten gut reproduzierbare Widerstände von etwa 50 MΩ. Die auf diese Weise gefertigten Elektroden ließen sich zudem leichter silanisieren als die Theta-Gläser. Nachteilig wirkte sich die Tatsache aus, dass das feine Lumen häufig vom Silan verstopft wurde.

Aufgrund des bereits weit vorangeschrittenen Stadiums der Arbeit bei Anschaffung des Gerätes und der schon großen gewonnenen Datenmenge und auch aus zeitlichen Gründen sind die Ergebnisse mit dieser verbesserten Methode nicht mit in die Arbeit aufgenommen worden. Die Vorversuche ergaben, dass verdrillte Elektroden mit Filament insgesamt leichter zu füllen sind als Thetaglaser. Bei zukünftigen Messungen sollte auf jeden Fall der inzwischen angeschaffte Beveller (BV-10, Sutter Instrument Company, Novato, Ca., USA) zum Einsatz kommen, mit dem es möglich ist, gefüllte, hochohmige Mikroelektroden auf den gewünschten Widerstandswert anzuschleifen und dabei gleichzeitig den Referenzkanal von verstopfendem Silan zu befreien (Voipio *et al.*, 1994), wodurch sich die Ausbeute verwendbarer Mikroelektroden erheblich steigern lässt.

#### 3.5.3 Eichung der Elektroden

Am Morgen des jeweiligen Versuchstages wurden die Elektroden auf ihre Funktionalität geprüft und bei einem positiven Ergebnis geeicht. Zur Eichung der Elektroden kamen entsprechende Eichlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten zum Einsatz. Dazu ist der Standardpuffer (s. Anhang unter Versuchsansätze) mit 20 mM HEPES gepuffert worden. Die Eichlösungen wurden mit Hilfe von TRIS bzw. HCl auf folgende pH-Werte eingestellt: 6,4, 7,4 und 7,9. Unmittelbar vor der Eichung wurde der pH-Wert der jeweiligen Lösung überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Jede Elektrode wurde in eine geerdete Kammer getaucht, bei der durch Absaugung und Nachfüllung entsprechender Eichlösung ein zügiger und vollständiger

Austausch der jeweiligen Flüssigkeit durchgeführt werden konnte. Die Reihenfolge der Wechsel zwischen den drei Eichlösungen lief immer nach folgendem Schema ab: 7,4 – 6,4 – 7,4 – 7,9 – 7,4 – 7,9 – 6,4 – 7,4.

Für eine bessere Differenzierung und für eine vereinfachte Darstellung bekamen die beiden Kanäle der Mikroelektrode Großbuchstaben zur Bezeichnung. Der Kanal, der als Referenzelektrode (nicht silanisiert) diente, wurde mit dem Buchstaben „A“ versehen und der Kanal, der als  $H^+$ -sensitive Elektrode fungierte, mit „B“ (siehe Abbildung 3).

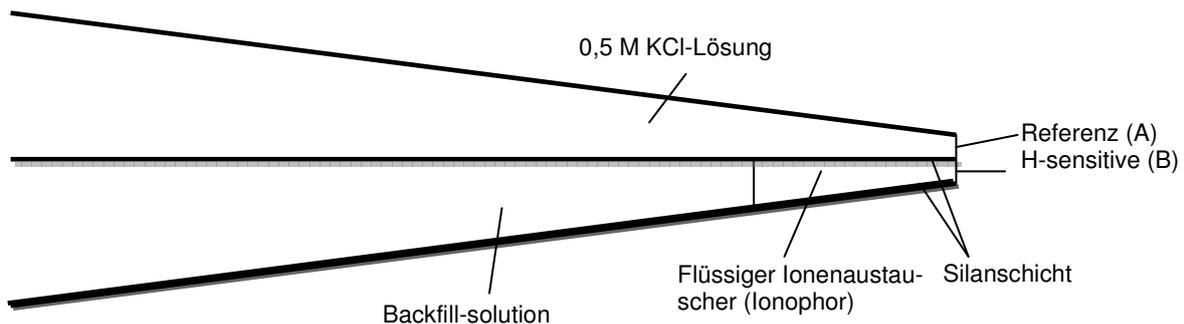


Abbildung 3: Auf dieser Abbildung ist die gezogene und gefüllte pH-sensitive Mikroelektrode zu sehen. Der untere Kanal des Thetaglases ist silanisiert und in der Spitze mit dem Ionophor gefüllt. Er fungiert als  $H^+$ -sensitive Elektrode und wird mit B bezeichnet. Der obere Kanal wird als Referenzelektrode verwendet und hat die Bezeichnung A.

Um die Spannungsabweichung von B, die durch die  $H^+$ -Ionenkonzentrationsänderung entstand, von einem durch andere Ursachen begründeten Spannungsabfall, der jeweils mit A gemessen wurde, zu unterscheiden, wurde die Differenz gebildet. Dieser dritte Parameter wurde entsprechend „A minus B“ benannt und für die pH-Messung verwendet. Beide Kanäle (A und B) wurden zuerst in der Eichlösung mit dem pH-Wert 7,4 auf Null abgeglichen. Daraufhin folgten die Wechsel der Lösungen in der oben beschriebenen Reihenfolge.

In der folgenden Abbildung ist beispielhaft die Eichung einer Elektrode zu sehen.

### Eichung E4 14.02.2008

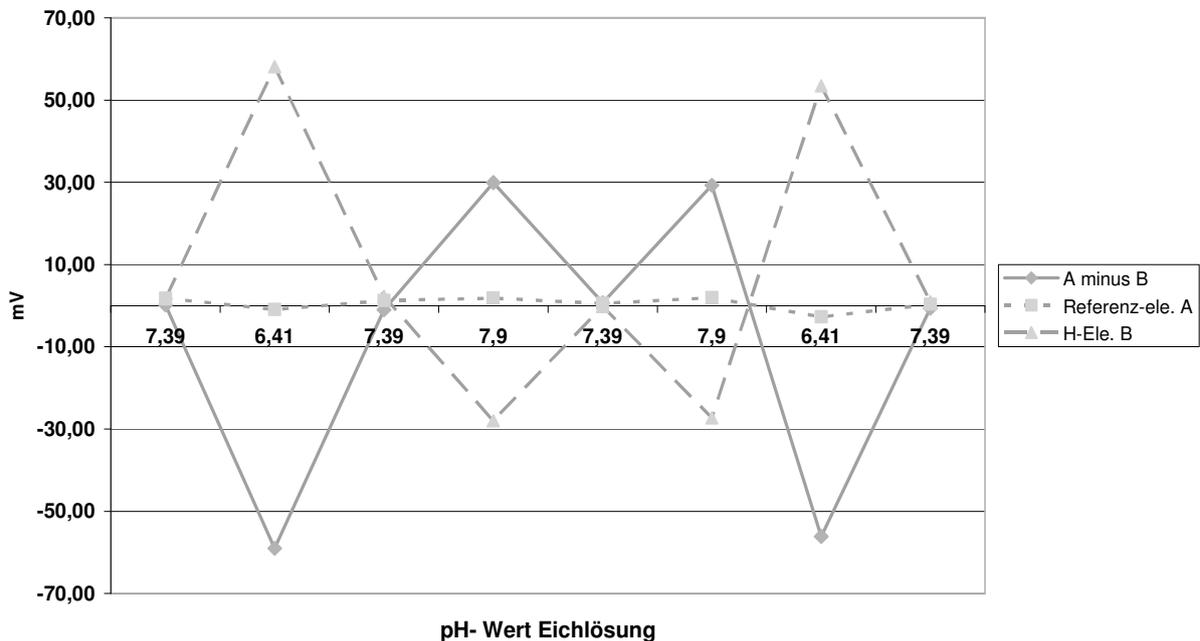


Abbildung 4: In dieser Abbildung wurden die Potentiale einer double-barrelled Mikroelektrode über den pH Wert der Eichlösung aufgetragen. Zu sehen ist das gleichbleibende Potential des Referenzkanals (A; gepunktete Linie), sowie die Änderung des Potentials über dem  $H^+$  sensitiven Kanal (B; gestrichelte Linie). Die Spannungswerte der  $H^+$ -sensitiven Elektrode (B) wurden von den Werten der Referenzelektrode (A) subtrahiert, um den pH-sensitiven Teil der Potentialantwort zu ermitteln (A minus B; durchgezogene Linie).

Durch die Eichung konnten für jede Elektrode pro pH-Wert der Eichlösung 3 (7,4) bzw. 2 (6,4 und 7,9) Werte der Spannung an der Ausgabe „A minus B“ gemessen werden. Dementsprechend wurde aus den sieben gemessenen Potentialen für den jeweiligen pH-Schritt ein Mittelwert berechnet. Dieser zeigte die mV-Auslenkung pro pH-Einheit für die jeweilige Elektrode. Wenn dieser Wert unter 51 mV bzw. über 63 mV lag, wurde die Elektrode nicht verwendet. Aus den insgesamt 58 Elektroden ergab sich ein Mittelwert von  $57,91 \text{ mV} \pm 2,65$ , was bedeutet, dass eine pH-Abweichung um 0,1 Einheit eine Spannungsänderung von etwa 5,8 mV verursacht. Dieser Wert entspricht fast genau dem sich aus dem  $H^+$ -Gradienten ergebenden Nernstpotentials. Des Weiteren zeigt eine pH-Sensitivität im Bereich des Nernstpotentials, dass weder Natrium- noch Kalium-Ionen signifikant mit dem Ionophor interferieren (Willumsen und Boucher, 1992). Der jeweilige Kanal für die Referenzelektrode der Glaselektroden blieb mit einer Standard-Abweichung von 3 mV während des Wechsels der pH-Eichlösungen recht stabil.

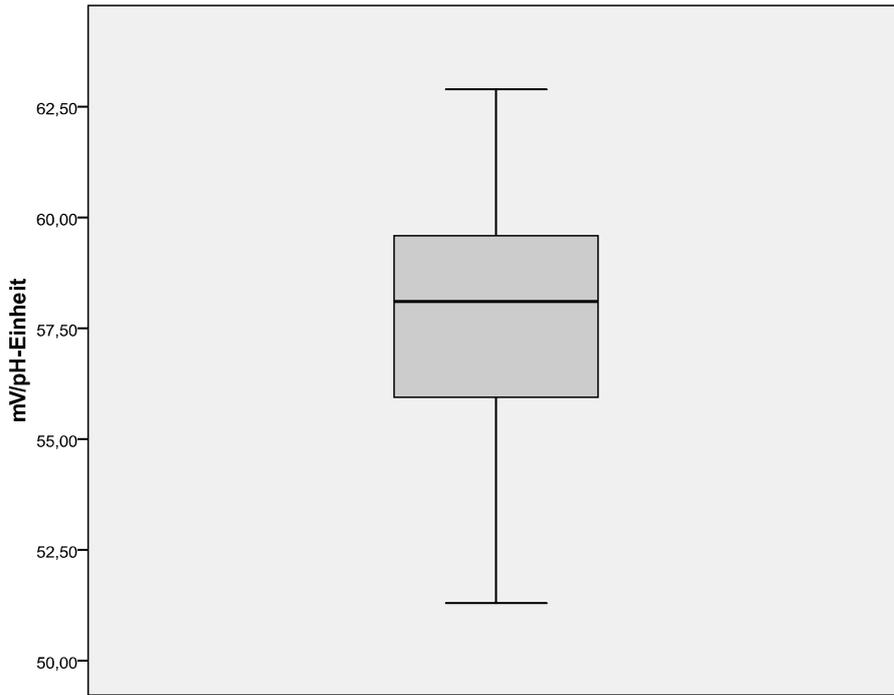


Abbildung 5: Auf der Abbildung ist die jeweilige mV-Abweichung (A minus B) pro pH-Einheit zu sehen (N = 58).

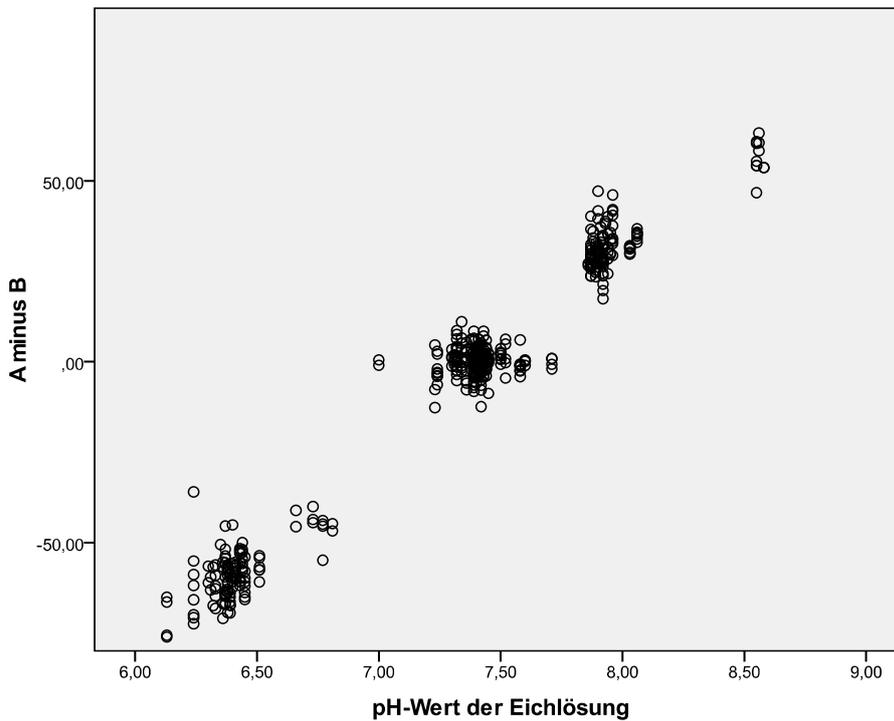


Abbildung 6: Hier sind die einzelnen Messpunkte an der Ausgabe „A minus B“ bei Eichlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten zu sehen.

Die Abbildung zeigt sehr deutlich die Linearität der Elektroden in der pH-Messung. Eine Messung im sauren Bereich lässt das Potential in den negativen Bereich abfallen.

### 3.6 Versuchsablauf

Zuerst wurde die leere Kammer perfundiert und das aktuell gemessene Potential (Elektrodeneigenpotential) auf Null mV abgeglichen. Daraufhin wurde ein frisch gewonnenes Psalterepithelstück waagrecht in die Mikro-Ussing-Kammer eingespannt und zunächst mit dem Standardpuffer (Zusammensetzung siehe Anhang) perfundiert. Damit sich das Epithel vom Transport und dem Einsetzen in die Kammer erholen und äquilibrieren konnte, wurden keine Manipulationen an der Kammer vorgenommen und die Klemmapparatur für ca. 10 Minuten im *open-circuit*-Modus betrieben. Danach wurde in den *voltage-clamp*-Modus umgeschaltet, d.h. das Potential wurde auf Null geklemmt und der Kurzschlussstrom konnte gemessen werden. Im weiteren Verlauf wurden je nach Versuchsprotokoll die Lösungen auf der apikalen / serosalen Seite bzw. auf beiden Seiten gewechselt und die elektrophysiologischen Parameter gemessen und aufgezeichnet.

Die Mikroelektrode wurde in die Lösung der oben offenen apikalen Kammerhälfte eingetaucht. Zunächst wurde die Potentialdifferenz über der Spitze des Kanals / der beiden Kanäle der Elektrode auf Null abgeglichen und die Elektrode mit Hilfe des Mikromanipulators unter mikroskopischer Kontrolle möglichst nah an das Epithel herangeführt, um dort den *supraapikalen* pH-Wert zu ermitteln. Dieser dürfte im Allgemeinen dem pH Wert des Mikroklimas entsprechen. Anschließend wurde die Mikroelektrode geringfügig weiter abgesenkt, bis ein Abfall der Spannung über dem Referenzkanal eine erfolgreiche Punktion anzeigte (im Folgenden als *subapikal* (intrazellulär) bezeichnet). Mittels des zweiten Kanals konnte der pH-Wert des intrazellulären Raums ermittelt werden. Das Eintauchen und der Nullabgleich wurden immer in dem Standardpuffer vollzogen. Ein Wechsel der Lösungen lief entsprechend dem jeweiligen Versuchsprotokoll für den Versuchsansatz ab. Vor dem Wechsel zur jeweiligen neuen Lösung, wurde bei dieser der aktuelle pH-Wert mit dem pH-Meter (InoLab pH 720, WTW) gemessen und gegebenenfalls korrigiert.

### 3.7 Versuchsansätze und Pharmaka

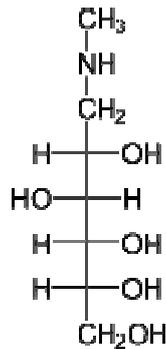
Alle Inkubationslösungen wurden entsprechend der jeweiligen Rezeptur (siehe Anhang) 1-2 Tage vor dem Versuchstag hergestellt bzw. sofort nach dem Zubereiten auf -18 °C tiefgefroren und für den Versuchstag frisch aufgetaut. Es wurden Chemikalien der Firmen Merck und Carl Roth mit analytischem Grad verwendet. Die Substanzen wurden in Messkolben eingewogen und nach ausreichender Lösung mit destilliertem Wasser auf das Sollvolumen aufgefüllt. Daraufhin wurde die Osmolarität über die Gefrierpunktmessung mit einem Osmometer (Firma Roebling Messtechnik GmbH) ermittelt. Alle Puffer besaßen eine Osmolarität von  $290 \pm 10$  mosmol/l. Kurz vor dem Versuch wurden die pH-Werte unter Carbogenbegasung mit Hilfe von HCl, Acetat oder TRIS auf 7,4 bzw. 6,4 unter Kontrolle eines pH-Meters eingestellt.

### 3.7.1 Elektrophysiologische Messungen ohne Einsatz der Mikroelektrode

#### 3.7.1.1 Natriumreduzierung

Ausgehend von einem Standardpuffer mit 141 mmol/l NaCl wurde Natrium auf 31 mmol/l reduziert und durch NMDG (**N-Methyl-D-glucamin**) ersetzt (in Folgenden als „NMDG-Puffer“ bezeichnet).

Strukturformel:



Dieses organische Kation hat die gleiche Ladung wie Natrium, aber kann die für das Natrium spezifischen Transportproteine nicht durchqueren. Die genaue Zusammensetzung der Puffer ist im Anhang aufgeführt. Der pH-Wert des Puffers wurde auf 7,4 eingestellt. Dieser Puffer wurde sowohl auf beiden Seiten des Epithels gleichzeitig (mukosal und serosal = ms) eingesetzt, als auch nur auf einer Seite (mukosal/serosal = m/s) in Kombination mit dem Kaliumpuffer (siehe unten, 3.7.1.2) bzw. dem Standardpuffer auf der gegenüberliegenden Seite des Epithels. Der nächste Pufferwechsel folgte, wenn ein Plateau-Wert erreicht wurde. Dies war in der Regel nach 1,5 bis 3 Minuten der Fall. Im Durchschnitt wurde das Epithel mit dem jeweiligen Pufferkombinationen für 2,5 Minuten umspült. Bei mehrmaligem Einsatz der gleichen Pufferkombination innerhalb eines Versuchstages an einem Epithel wurde der jeweilige Mittelwert für die Auswertung übernommen.

#### 3.7.1.2 Kaliumerhöhung bei gleichzeitiger Natriumreduzierung

Der oben beschriebene NMDG-Puffer wurde so verändert, dass die Kaliumkonzentrationen 50 bzw. 95 mmol/l betragen, und zwar indem NMDG durch die entsprechende Menge an Kalium ersetzt wurde. Daher entsprach die Konzentration der übrigen Ionen, der des oben beschriebenen Puffers, d.h. auch hier lag die Natriumkonzentration bei 31 mmol/l (genaue Zusammensetzung im Anhang). Auch der pH-Wert entsprach dem des NMDG-Puffers, 7,4. Der so genannte 50- bzw. 90-Kaliumpuffer wurde wie der NMDG-Puffer eingesetzt.

### 3.7.2 Messungen bei Einsatz der H<sup>+</sup>-sensitiven Mikroelektrode

Anfänglich wurde der pH-Wert während der Inkubation mit dem Standardpuffer (Kontrollbedingungen) sowohl *supraapikal* (extrazellulär) als auch *subapikal* (intrazellulär) gemessen. Es lag also kein chemischer Gradient über dem Epithel vor. Darauf folgten pH-Messungen mit unterschiedlichen SCFA-Konzentrationen im mukosalen Puffer, der zusätzlich auf einen pH-Wert von 6,4 eingestellt worden war. Dem schlossen sich Messungen während des Ein-

satzes von Blockern (siehe unten) an. Alle verwendeten Lösungen enthielten zum einen Bikarbonat und wurden mit Carbogen (Sauerstoff mit 5% CO<sub>2</sub>) begast.

### 3.7.2.1 Ansteigende Konzentration der SCFA

Bei diesem Versuchsansatz wurde mit drei Puffern gearbeitet, bei denen die Konzentration der kurzkettigen Fettsäuren jeweils erhöht wurde. Zum Einsatz kamen Puffer mit einer Konzentration von 20 mmol SCFA pro Liter, mit 60 mmol/l und mit 80 mmol/l (genaue Inhaltsstoffkonzentration im Anhang). Alle drei wurden bei einem pH Wert von 6,4 (eingestellt mit Acetat bzw. HCl) verwendet und nur auf der mukosalen Seite eingesetzt, während serosal weiter mit dem Standardpuffer perfundiert wurde. Die pH-Messungen bei diesem Versuchsansatz erfolgten sowohl *supraapikal*, als auch *subapikal*. Eine Auswirkung auf den pH-Wert durch eine Konzentrationsänderung der SCFA sollte überprüft werden.

### 3.7.2.2 Einsatz von Hemmstoffen

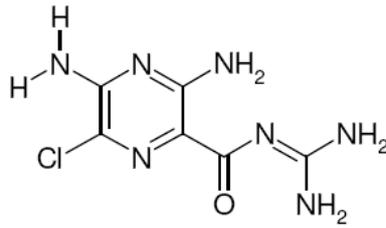
Der Einsatz von Hemmstoffen oder Blockern hatten den Zweck, Transportproteine bzw. Enzyme an ihrer Funktion zu hindern. Alle Inhibitoren wurden nur auf der mukosalen Seite des Epithels eingesetzt, und zwar mit dem 80 mmol/l SCFA-Puffer vermischt. (Basolateral ist von einer durch das subepitheliale Gewebe stark verlängerten Diffusionsstrecke auszugehen).

Um eine vollständige Verteilung der Pharmaka zu erreichen, mussten diese zuvor in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst werden. Das Lösungsmittel DMSO allein hatte keine Auswirkung auf die gemessenen Parameter. In der Regel wurde eine Stammlösung angesetzt und in passenden Portionen eingefroren. Die für das Volumen an Pufferlösung notwendige Menge wurde am Versuchstag frisch aufgetaut und mit dem Puffer vermischt. Auch hier wurde der pH-Wert auf 6,4 eingestellt (sofern nicht anders vermerkt). Die pH-Messungen mit der Mikroelektrode wurden *supra-* und *subapikal* durchgeführt. In der Regel wurde das Epithel über eine Zeitspanne von etwa acht Minuten mit den Blockern exponiert. Die Hemmstoffe wurden entweder von der Firma Sigma oder Calbiochem bezogen.

### Amilorid

Der erste Blocker für den NHE war Amilorid (3,5-Diamino-N-carbamimidoyl-6-chlorpyrazin-2-carbamid). In seinem Review berichtet Benos (1982), dass Amilorid in einer Konzentration von unter 1 µM als Blocker des Natriumkanals und bei höheren Konzentrationen als Inhibitor für den NHE fungiert. Auf Grund der Tatsache, dass laut Tse *et al.* (1993) der NHE3 gegenüber einer Blockierung durch Amilorid 39-fach stärker resistent ist als der NHE1, wurde der Blocker in einer Konzentration von 1 mmol/l eingesetzt. Dies deckt sich auch mit den Daten im Review von Masereel *et al.* (2003), der als Maß für die inhibitorische Potenz des Amilorids einen K<sub>i</sub> Wert von über 100 µM für den NHE3 angibt. Im Gegensatz dazu liegt dieser Wert für den NHE1 bei 1-1,6 µM. Der Blocker wurde nur bei *supraapikalen* Messungen eingesetzt.

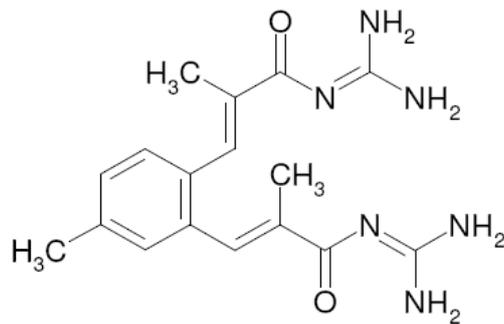
Strukturformel:



### S3226

S3226 (3-[2-(3-guanidino-2-methyl-3-oxo-propenyl)-5-methyl-phenyl]-N-isopropyliden-2-methyl-acrylamid dihydrochlorid) wurde von Schwark *et al.* (1998) als erster spezifischer und potenter Blocker des NHE3 entdeckt. Die  $IC_{50}$  variierte jedoch bei verschiedenen Zelllinien. Daher führte Dölle (2008) Dosis-Wirkungs-Versuche am Psalterepithel des Schafes durch. Bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  kam es zu einer maximalen Hemmung des elektroneutralen Natriumtransports, welche auch hier zum Einsatz kam.

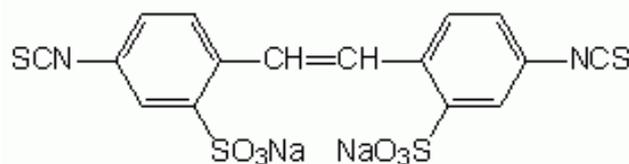
Strukturformel:



### DIDS

DIDS (4,4'-diisothiocyano stilbene-2,2'-disulfonic acid) hemmt sowohl den Chlorid-Antiport (Lepke *et al.*, 1976) als auch zahlreiche Chloridkanäle. Die Hemmung erfolgt durch eine kovalente irreversible Bindung von DIDS an der extrazellulären Chlorid-Bindungsstelle des Austauschers (Cabantchik und Greger, 1992). Bei Kanälen wird ein spannungsabhängiger Block beobachtet, der vermutlich durch Obstruktion der Porenregion zustande kommt (Droogmans *et al.*, 1998). Dieser Blocker wurde in einer Konzentration von 1  $\text{mmol/l}$  angewandt.

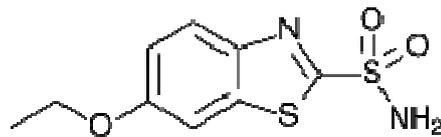
Strukturformel:



## Ethoxyzolamid

Ethox(y)zolamid (6-ethoxy-1,3-benzothiazol-2-sulfonamid) hemmt die Aktivität des Enzyms Carboanhydrase (CA). Er gilt als potentester CA-Hemmer und gelangt auf Grund seiner hohen Lipophilität schnell in die Zelle. Daher wird dieser Blocker hauptsächlich für die Aktivitätshemmung der intrazellulären Carboanhydrase verwendet. In diesen Experimenten wurde der Hemmstoff in einer Konzentration von 0,1 mmol/l eingesetzt. Mit dieser Konzentration haben bereits Ali (2005) und Wegeler (2007) am Blättermagenepithel des Schafes gearbeitet.

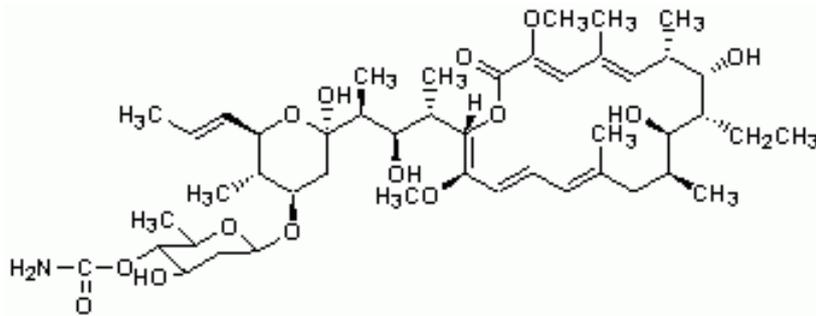
Strukturformel:



## Concanamycin

Concanamycin A ist ein spezifischer Hemmstoff der  $vH^+$ -ATPase, die ist hauptsächlich in der Membran von zellulären Organellen und Strukturen vorhanden ist, jedoch auch in der Zellmembran liegen kann. Bei polarisierten Epithelien ist sie fast immer apikal lokalisiert. Eine Beteiligung dieses Transporters an der pH-Regulation der Psalterepithelzelle soll charakterisiert werden. Dieser Blocker wurde in einer Konzentration von 1  $\mu$ mol/l eingesetzt und ebenfalls in dem 80 SCFA-Puffer gelöst, bei einem pH-Wert von 6,4.

Strukturformel:



### 3.7.2.3 Serosale Chloridreduzierung

In dieser Versuchsanordnung wurde auf der serosalen Seite ein Puffer mit einer reduzierten Chloridkonzentration von 41 mmol/l (41 Cl-Puffer) bei einem pH-Wert von 7,4 eingesetzt. Im Vergleich dazu hatte der Standardpuffer eine Chloridkonzentration von 99 mmol/l. So sollte die Bedeutung von Chlorid für die elektrophysiologischen Parameter und auch bei der pH-Regulation geklärt werden. Auf der mukosalen Seite wurde mit dem 80 mmolaren Fettsäurepuffer bei einem pH-Wert von 6,4 perfundiert. Zusätzlich wurde, während der serosalen Inkubation mit dem 41 Cl-Puffer, auf der mukosalen Seite der Fettsäurepuffer eingesetzt, in dem zuvor der NHE3-Blocker S3226 gelöst wurde. Während dieses Versuchansatzes wurde nur intrazellulär der pH-Wert gemessen.

### 3.8 Auswertung und Statistik

Die Aufteilung der Daten war vom jeweiligen Versuchsansatz abhängig. In der Regel wurde je ein Messpunkt genommen während der Standardinkubation, nach dem Wechseln auf den neuen Puffer, im weiteren Verlauf der Inkubation mit diesem Puffer und nach einem Rückwechsel auf den ersten Puffer. Bei Einsatz von Hemmstoffen wurde normalerweise der erste und der letzte Messwert bei Inkubation mit dem 80 mmolaren Fettsäurepuffer genommen. Detaillierte Beschreibungen sind jeweils zu Beginn der einzelnen Versuchsaufstellungen im Ergebnisteil zu finden. Es wurden erst die Daten der elektrophysiologischen Messungen dargestellt und daraufhin falls durchgeführt die Werte der pH-Messung. Zu den ersteren gehörten: die transepitheliale Potentialdifferenz, die transepitheliale Leitfähigkeit und der transepitheliale Strom, teilweise auch das apikale Potential. Zusätzlich zu den einfachen Messungen sind die Differenzwerte dieser Parameter pro Minute gebildet worden. So konnte das Verhalten des einzelnen Parameters pro Zeiteinheit ermittelt werden. Für den Strom und das Potential sprachen demnach negative Differenzwerte für ein Ansteigen des Parameters pro Zeiteinheit, positive Werte entsprechend für einen Abfall. Bei der Leitfähigkeit und dem pH-Wert verhielt es sich entgegengesetzt. So stieg beispielsweise die Leitfähigkeit pro Minute an, wenn der Differenzwert einen positiven Wert annahm.

Alle Daten wurden explorativ analysiert und im gepaarten T-Test (Mittelwertvergleich von verbundenen Stichproben) und mit dem Statistikprogramm SPSS Statistics 17.0 auf Signifikanz überprüft. Die einzelnen Parameter werden in der Regel tabellarisch und meist auch als Graphik dargestellt. In der Tabelle sind das arithmetische Mittel (der Mittelwert), der Standardfehler des Mittelwertes (standard error of mean – SEM), die Anzahl der Epithelien (n) und der Schafe (N) und die Ergebnisse des T-Testes (2-seitige Signifikanzen) mit jeweiliger Anzahl zu finden. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha = 0,05$  ( $p < 0,05$ ) festgelegt. In den graphischen Darstellungen zeigen die Kreise den Mittelwert des jeweiligen Parameters. Der Standardfehler des Mittelwertes wurde nach oben und nach unten in Balkenform aufgetragen, so dass die gesamte Höhe dem doppelten SEM entspricht. In der Graphik sind Fehlerbalken zu sehen, deren Mitte den Mittelwert des jeweiligen Parameters entspricht (Kreis) und die Höhe der Balken den Standardfehler zeigt. Dabei wird zu jeder Seite des Mittelwertes der volle Standardfehler aufgetragen, so dass die gesamte Höhe eines Fehlerbalkens dem doppelten Standardfehler entspricht. Die Graphiken wurden ebenfalls mit SPSS 17.0 erstellt.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Elektrophysiologische Messungen ohne Einsatz der Mikroelektrode

Diese Versuche wurden durchgeführt, um den Einfluss der Natrium- und der Kaliumkonzentration auf die elektrophysiologischen Parameter darzustellen. Diese Daten sind insbesondere von Bedeutung für die Diskussion und Erstellung eines Transportmodells. Zusätzlich sollte die Funktionalität und Handhabung der Mikro-Ussing-Kammer überprüft werden.

#### 4.1.1 Natriumreduzierung

Bei diesem Versuchsansatz wurde der NMDG-Puffer eingesetzt, d. h. Natrium wurde reduziert und durch NMDG ersetzt, so dass die neue Natriumkonzentration bei 31 mmol/l lag. Der Standardpuffer hatte zum Vergleich eine Natriumkonzentration von 141 mmol/l. Der pH-Wert beider Pufferlösungen wurde auf 7,4 eingestellt. Die Auswirkungen auf die elektrophysiologischen Parameter  $PD_t$  (transepitheliale Potentialdifferenz),  $G_t$  (transepitheliale Leitfähigkeit) und  $I_t$  (transepithelialer Strom) bei einseitigem und zweiseitigen Einsatz dieses Puffers werden im Folgenden dargestellt.

Die Signifikanzverpaarung (verbundener T-Test) der Epithelien bei mukosaler und serosaler Inkubation mit Standardlösung im Vergleich zur beidseitigen NMDG-Lösung ist bei allen Parametern signifikant ( $p < 0,05$ ), bei der  $PD_t$  und dem  $I_t$  sogar hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Ebenso sind die Werte bei nur mukosaler NMDG-Umspülung signifikant bzw. hochsignifikant verschieden zu denen bei Standardbedingungen. Signifikante Unterschiede des Potentials und des Stromes ließen sich auch beim Vergleich der beidseitigen NMDG-Inkubation mit der serosalen NMDG-Inkubation (mukosal kam die Standardlösung zum Einsatz) berechnen. Sowohl die Werte des Potentials als auch die des Stromes über das Epithel lagen bei mukosaler und beidseitiger Umspülung mit reduziertem Natriumgehalt annähernd bei Null.

	Pdt (mV)			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	NM ms	NM m + Std. s	Std. m + NM s
Standard ms	-6,11	0,85	13/13	<b>0,000*</b> n = 8	<b>0,000*</b> n = 8	0,446 n = 3
NM ms	-0,51	0,69	8/8	-	0,587 n = 3	<b>0,006*</b> n = 3
NM m + Std. s	-0,20	0,83	8/8	-	-	0,204 n = 2
Std. m + NM s	-4,78	1,31	3/3	-	-	-
	Gt (mS/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	NM ms	NM m + Std. s	Std. m + NM s
Standard ms	3,21	0,34	13/13	<b>0,013*</b> n = 8	<b>0,005*</b> n = 8	0,108 n = 3
NM ms	2,55	0,23	8/8	-	0,472 n = 3	0,105 n = 3
NM m + Std. s	2,24	0,32	8/8	-	-	0,301 n = 2
Std. m + NM s	2,97	0,24	3/3	-	-	-
	It (µA/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	NM ms	NM m + Std. s	Std. m + NM s
Standard ms	-16,53	1,33	13/13	<b>0,000*</b> n = 8	<b>0,000*</b> n = 8	0,055 n = 3
NM ms	-0,67	1,67	8/8	-	0,676 n = 3	<b>0,014*</b> n = 3
NM m + Std. s	1,33	1,54	8/8	-	-	0,139 n = 2
Std. m + NM s	-13,76	3,25	3/3	-	-	-

Tab. 2 Die elektrophysiologischen Parameter werden in dieser Tabelle gezeigt. Das Epithel wurde mit folgenden Pufferlösungen (kontinuierlicher Wechsel) inkubiert: Standard ms = Standardlösung auf der mukosalen und auf der serosalen Seite des Epithels, NM ms = NMDG-Puffer (31 mmol/l Natrium) auf beiden Seiten des Epithels, NM m + Std. s = auf der mukosalen Seite NMDG-Puffer und auf der serosalen der Standardpuffer, Std. m + NM s = Standardpuffer auf der mukosalen Seite und NMDG-Puffer auf der serosalen Seite. Alle Lösungen hatten einen pH-Wert von 7,4. Die rechte Hälfte der Tabelle stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Der Unterschied zwischen der beidseitigen Umspülung mit Standardlösung und dem Einsatz der NMDG-Lösung sowohl beidseits als auch nur mukosal war hoch signifikant.

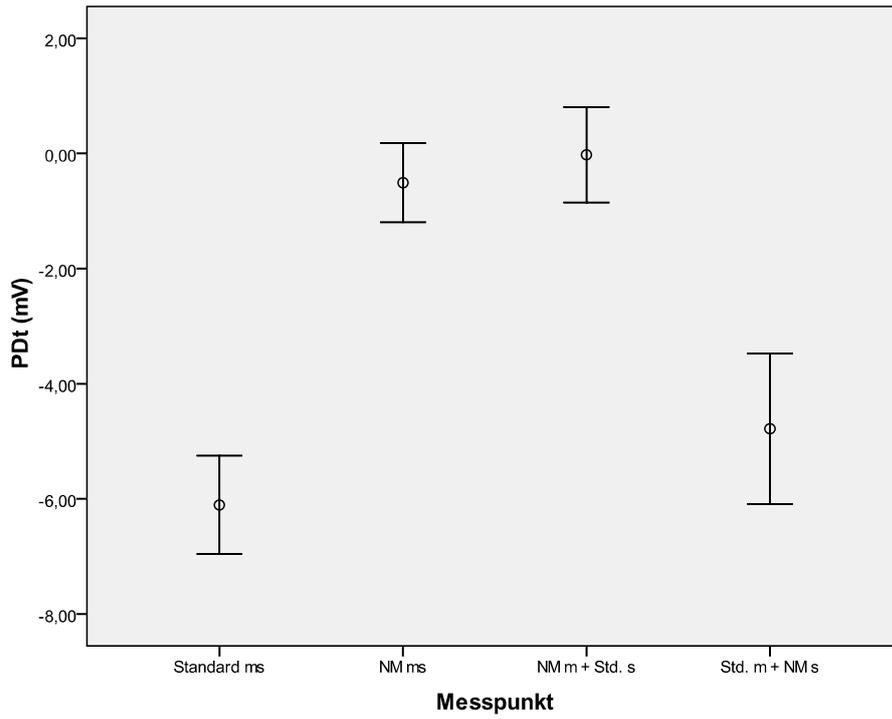


Abbildung 7: Auf dieser Graphik ist die transepitheliale Potentialdifferenz dargestellt. Die Erläuterungen der Abkürzungen sind in der oben stehenden Tabelle zu finden.

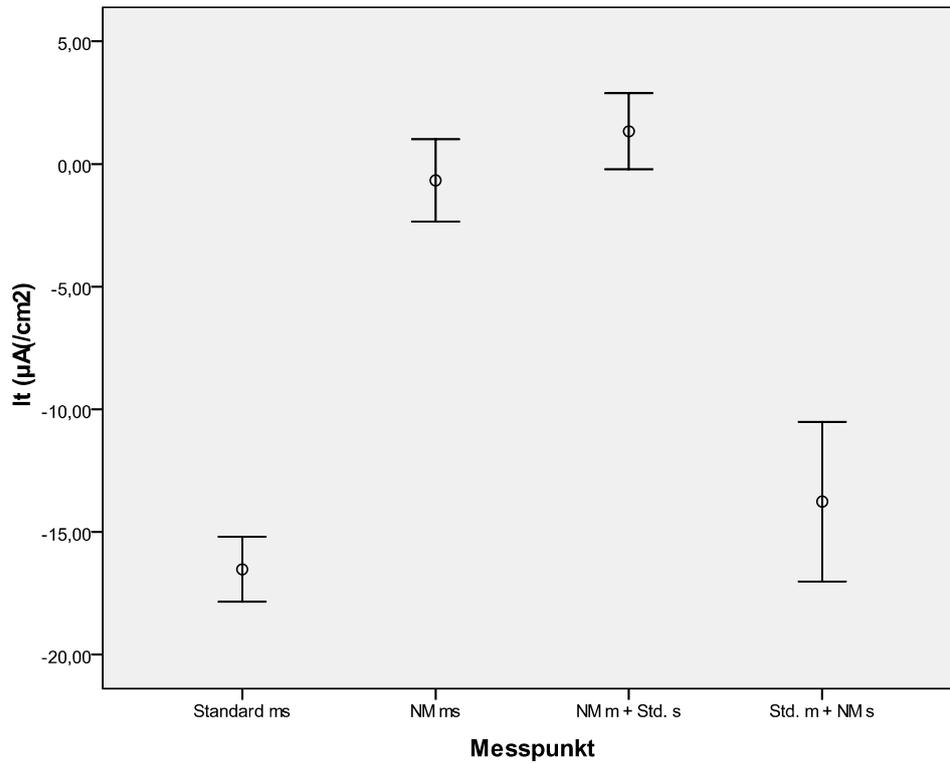


Abbildung 8: Auf dieser Graphik ist der transepitheliale Strom dargestellt. Die Erläuterungen der Abkürzungen sind in der oben stehenden Tabelle zu finden.

#### 4.1.2 Kaliumerhöhung bei gleichzeitiger Natriumreduzierung

Bei dem Puffer mit dem reduzierten Natrium (NMDG-Puffer) wurde die Kaliumkonzentration auf 50 mmol/l bzw. 95 mmol/l erhöht im Ersatz für NMDG. Auch diese Pufferlösungen hatten einen pH-Wert von 7,4. Die in den folgenden Tabellen und Graphiken verwendeten Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

- ◇ Standard ms = Standardlösung auf der mukosalen und auf der serosalen Seite des Epithels,
- ◇ 50 K ms = 50-Kaliumpuffer auf beiden Seiten des Epithels,
- ◇ 50 K m + Std. s = auf der mukosalen Seite 50-Kaliumpuffer und auf der serosalen der Standardpuffer
- ◇ Std. m + 50 K s = Standardpuffer auf der mukosalen Seite und 50-Kaliumpuffer auf der serosalen Seite
- ◇ 95 K m + Std. s = Kaliumpuffer mit 95 mmol/l Kalium auf der mukosalen Seite und Standardpuffer serosal

Die Signifikanzverpaarung (verbundener T-Test) der Epithelien bei mukosaler und serosaler Inkubation mit Standardlösung im Vergleich zum beidseitigen Einsatz des 50-Kaliumpuffers war bei der  $PD_t$  und dem  $I_t$  hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Signifikante Unterschiede des Potentials und des Stromes ließen sich auch beim Vergleich der beidseitigen 50-Kalium-Inkubation mit rein mukosaler Umspülung mit der Lösung, die 50 mmol/l Kalium enthielt, verzeichnen. Die transepitheliale Leitfähigkeit zeigte jedoch keine signifikante Unterschiede nach dem jeweiligen Lösungswechsel. Die Erhöhung der Kaliumkonzentration auf 95 mmol/l ergab keine signifikanten Veränderungen der Parameter im Vergleich zur 50-mmolaren Kaliumlösung und ebenfalls keine im Vergleich zur Standardlösung.

	PDt (mV)			2-seitige Signifikanzen			
	Mittelwert	SEM	n/N	50 K ms	50 K m + Std. s	Std. m + 50K s	95 K m + Std. s
Standard ms	-6,11	0,85	13/13	<b>0,000*</b> n = 11	0,352 n = 6	0,184 n = 3	0,274 n = 7
50 K ms	-2,87	0,55	11/11	-	<b>0,039*</b> n = 4	0,282 n = 2	-
50 K m + Std. s	-4,99	0,80	6/6	-	-	0,464 n = 2	0,185 n = 5
Std. m + 50 K s	-0,66	2,41	3/3	-	-	-	-
95 K m + Std. s	-8,41	2,44	7/7	-	-	-	-
	Gt (mS/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen			
	Mittelwert	SEM	n/N	50 K ms	50 K m + Std. s	Std. m + 50K s	95 K m + Std. s
Standard ms	3,21	0,34	13/13	0,124 n = 11	0,797 n = 6	0,833 n = 3	0,167 n = 7
50 K ms	2,98	0,26	11/11	-	0,304 n = 4	0,776 n = 2	-
50 K m + Std. s	2,94	0,42	6/6	-	-	0,717 n = 2	0,184 n = 5
Std. m + 50 K s	3,64	0,55	3/3	-	-	-	-
95 K m + Std. s	3,72	0,41	7/7	-	-	-	-
	It (µA/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen			
	Mittelwert	SEM	n/N	50 K ms	50 K m + Std. s	Std. m + 50K s	95 K m + Std. s
Standard ms	-16,53	1,33	13/13	<b>0,000*</b> n = 11	0,769 n = 6	0,218 n = 3	0,080 n = 7
50 K ms	-8,09	1,41	11/11	-	<b>0,025*</b> n = 4	0,681 n = 2	-
50 K m + Std. s	-13,31	1,87	6/6	-	-	0,467 n = 2	0,142 n = 5
Std. m + 50 K s	-5,04	8,24	3/3	-	-	-	-
95 K m + Std. s	-27,27	7,66	7/7	-	-	-	-

Tab. 3 Die elektrophysiologischen Parameter werden in dieser Tabelle gezeigt. Das Epithel wurde mit folgenden Pufferlösungen (kontinuierlicher Wechsel) bei einem pH-Wert von 7,4 inkubiert: Standard ms = Standardlösung auf mukosaler und serosaler Epithelseite, 50 K ms = 50-Kaliumpuffer auf beiden Seiten des Epithels, 50 K m + Std. s = auf der mukosalen Seite 50-Kaliumpuffer und serosal der Standardpuffer, Std. m + 50 K s = Standardpuffer mukosal und 50-Kaliumpuffer serosal, 95 K m + Std. s = Kaliumpuffer mit 95 mmol/l Kalium mukosal und Standardpuffer serosal. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Der Unterschied zwischen der beidseitigen Umspülung mit Standardlösung und beidseitig 50-Kaliumpuffer war beim Potential und beim Strom hoch signifikant. Beim Vergleich des letztgenannten mit nur mukosalem Einsatz des 50-Kaliumpuffers war bei den eben genannten Parametern ebenfalls eine Signifikanz zu verzeichnen.

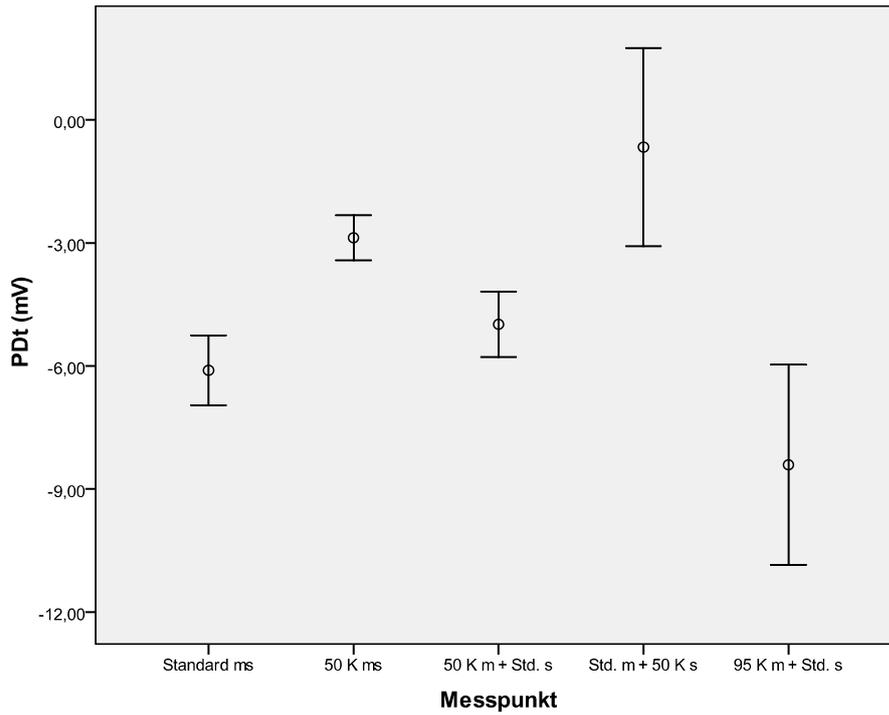


Abbildung 9: Auf dieser Graphik ist die transepitheliale Potentialdifferenz dargestellt. Erläuterung der Abkürzungen am Beginn dieses Abschnittes bzw. in der darüber befindlichen Tabelle.

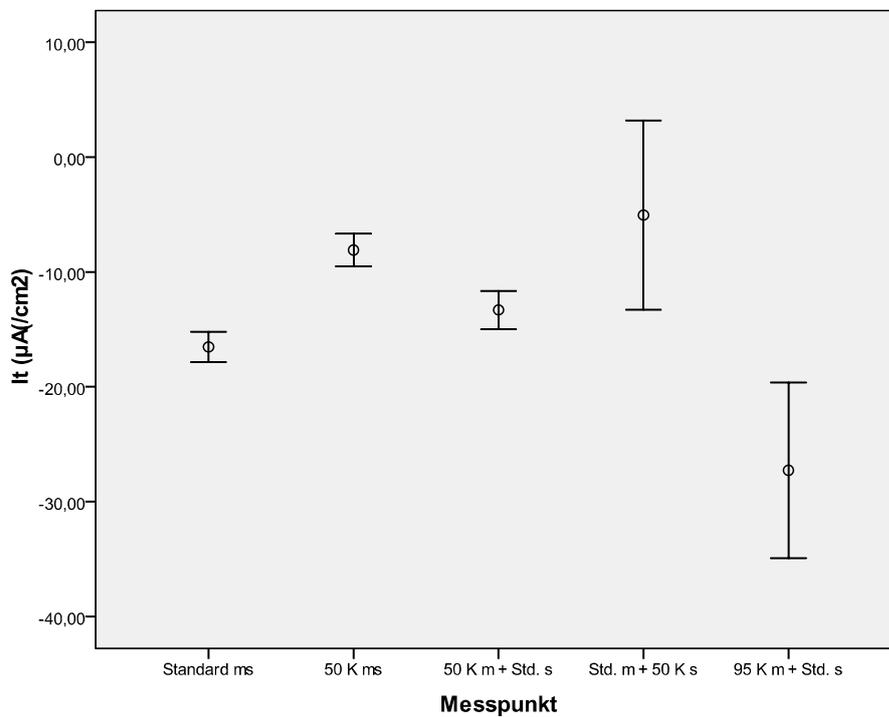


Abbildung 10: Auf dieser Graphik ist die transepitheliale Leitfähigkeit dargestellt. Erläuterung der Abkürzungen am Beginn dieses Abschnittes bzw. in der darüber befindlichen Tabelle.

### 4.1.3 Kombiniertes Einsatz der Natriumreduzierung und der Kaliumerhöhung

In dieser Versuchsaufstellung wurde auf der einen Seite des Epithels jeweils der NMDG-Puffer (31 mmol Natrium pro Liter) und auf der gegenüberliegenden Epithelseite der 50-Kaliumpuffer eingesetzt. Diese Anordnung wurde mit unterschiedlichen Anordnungen aus den vorhergehenden Versuchen im T-Test auf Signifikanz untereinander verglichen.

Die Abkürzungen in den folgenden Tabellen und Graphiken haben diese Bedeutung:

- ◇ Standard ms = Standardlösung auf der mukosalen und auf der serosalen Seite des Epithels,
- ◇ NM m + Std. s = auf der mukosalen Seite der NMDG-Puffer und auf der serosalen der Standardpuffer
- ◇ Std. m + NM s = Standardpuffer auf der mukosalen Seite und NMDG-Puffer auf der serosalen Seite
- ◇ 50 K m + Std. s = auf der mukosalen Seite 50-Kaliumpuffer und auf der serosalen der Standardpuffer
- ◇ Std. m + 50 K s = Standardpuffer auf der mukosalen Seite und 50-Kaliumpuffer auf der serosalen Seite
- ◇ NM m + 50 K s = mukosal NMDG-Puffer und serosal 50-Kaliumpuffer
- ◇ 50 K m + NM s = mukosal 50-Kaliumpuffer und serosal NMDG-Puffer

Bei den beiden letztgenannten war auf beiden Seiten des Epithels eine Natriumkonzentration von 31 mmol/l und auf der einen Seite jeweils eine um das 10-fach erhöhte Kaliumkonzentration vorhanden. So herrschte kein chemischer Gradient für Natrium, sondern nur einer für Kalium.

Einige abhängige Signifikanzverpaarungen waren auf Grund einer zu geringen Anzahl nicht möglich und sind in den nachfolgenden Tabellen mit dem Kürzel n. m. gekennzeichnet. Die unabhängige Verpaarung der Mittelwerte ergab keine Signifikanz.

Die Veränderung des Potentials zwischen der beidseitigen Umspülung mit Standardlösung und dem kombinierten Einsatz der NMDG-Lösung und des 50-Kaliumpuffers war jeweils signifikant, beim Strom war dies nur der Fall, wenn der NMDG-Puffer mukosal und der 50-Kaliumpuffer serosal das Epithel umspülten. Die Leitfähigkeit zeigte eine Signifikanz bei der Verpaarung der getauschten kombinierten Umspülung des Epithels mit dem NMDG-Puffer auf beiden Seiten und dem 50-Kaliumpuffer jeweils auf einer Seite. Außerdem waren Signifikanzen zu verzeichnen beim Vergleich der kombinierten Anordnung (auf beiden Seiten 31 mmol/l Natrium und jeweils auf der einen Seite zusätzlich 50 mmol/l Kalium) untereinander.

	PDt (mV)			2-seitige Signifikanzen					
	Mittelwert	SEM	n/N	NM m + Std. s	Std. m + NM s	50 K m + Std. s	Std. m +50 K s	NM m +50 K s	50 K m + NM s
Standard ms	-5,98	1,09	9/9	<b>0,000*</b> n = 8	0,446 n = 3	0,352 n = 6	<b>0,044*</b> n = 3	<b>0,002*</b> n = 6	<b>0,044*</b> n = 2
NM m + Std. s	-0,02	0,83	8/8	-	-	-	-	0,057 n = 6	-
Std. m + NM s	-4,78	1,31	3/3	-	-	-	-	-	n. m.
50 K m + Std. s	-4,98	0,80	6/6	-	-	-	-	-	n. m.
Std. m + 50 K s	-0,66	2,41	3/3	-	-	-	-	n. m.	-
NM m + 50 K s	3,58	1,65	6/6	-	-	-	-	-	<b>0,001*</b> n = 2
50 K m + NM s	-7,67	0,06	2/2	-	-	-	-	-	-
	Gt (mS/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen					
	Mittelwert	SEM	n/N	NM m + Std. s	Std. m + NM s	50 K m + Std. s	Std. m +50 K s	NM m +50 K s	50 K m + NM s
Standard ms	3,18	0,45	9/9	<b>0,005*</b> n = 8	0,108 n = 3	0,797 n = 6	0,065 n = 3	0,833 n = 6	0,900 n = 2
NM m + Std. s	2,24	0,32	8/8	-	-	-	-	0,548 n = 6	-
Std. m + NM s	2,97	0,24	3/3	-	-	-	-	-	n. m.
50 K m + Std. s	2,94	0,42	6/6	-	-	-	-	-	n. m.
Std. m + 50 K s	3,64	0,55	3/3	-	-	-	-	n. m.	-
NM m + 50 K s	1,94	0,35	6/6	-	-	-	-	-	<b>0,049*</b> n = 2
50 K m + NM s	2,40	0,37	2/2	-	-	-	-	-	-
	It (µA/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen					
	Mittelwert	SEM	n/N	NM m + Std. s	Std. m + NM s	50 K m + Std. s	Std. m +50 K s	NM m +50 K s	50 K m + NM s
Standard ms	-15,60	1,65	9/9	<b>0,000*</b> n = 8	0,055 n = 3	0,769 n = 6	0,069 n = 3	<b>0,000*</b> n = 6	0,825 n = 2
NM m + Std. s	1,33	1,54	8/8	-	-	-	-	<b>0,046*</b> n = 6	-
Std. m + NM s	-13,76	3,25	3/3	-	-	-	-	-	n. m.
50 K m + Std. s	-13,31	1,67	6/6	-	-	-	-	-	n. m.
Std. m + 50 K s	-5,04	8,25	3/3	-	-	-	-	n. m.	-
NM m + 50 K s	7,40	2,40	6/6	-	-	-	-	-	<b>0,012*</b> n = 2
50 K m + NM s	-18,44	3,01	2/2	-	-	-	-	-	-

Tab. 4 Die elektrophysiologischen Parameter werden in dieser Tabelle gezeigt. Das Epithel wurde unterschiedlichen Pufferlösungen (kontinuierlicher Wechsel) bei einem pH-Wert von 7,4 inkubiert. Die Erläuterung der Abkürzungen sind am Beginn dieses Abschnittes zu finden. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Der Unterschied zwischen der beidseitigen Umspülung mit Standardlösung und mit dem kombinierten Einsatz der NMDG-Lösung mukosal und des 50-Kaliumpuffers serosal war hochsignifikant. Letzterer zeigte ebenfalls einen signifikanten Unterschied beim Vergleich mit beidseitigem NMDG-Einsatz und zusätzlicher Kaliumerhöhung auf mukosaler Seite. Wobei diese Pufferanordnung auch signifikant verschieden war von der beidseitigen Standardinkubation.

## 4.2 pH-Messungen mit H<sup>+</sup>-sensitiven Mikroelektroden inklusive elektrophysiologischer Messungen

### 4.2.1 Messungen bei Inkubation mit Standardlösung (Kontrollbedingungen)

Zu Beginn eines jeden Versuchsansatzes wurde das Epithel immer auf beiden Seiten mit der Standardlösung perfundiert. So herrschte kein chemischer Gradient der einzelnen Elektrolyte vor und die Osmolarität war auf beiden Seiten gleich (etwa bei 290 mosmol/l). Auch war der pH-Wert mit 7,4 auf beiden Seiten des Epithels identisch.

#### 4.2.1.1 Elektrophysiologische Parameter

Nachfolgend sind Tabellen mit den elektrophysiologischen Parametern (transepitheliale Potentialdifferenz, transepitheliale Leitfähigkeit und transepithelialer Strom) bei Inkubation mit der Standardlösung zu sehen. So sind Kontrollwerte vorhanden, die mit den folgenden Versuchsansätzen verglichen werden können.

	Mittelwert	Standardfehler des Mittelwertes (SEM)	Anzahl der Epithelien (n)
PDt (mV)	-11,43	0,42	18
Gt (mS/cm <sup>2</sup> )	3,06	0,10	18
It (µA/cm <sup>2</sup> )	-34,07	1,14	18

Tab. 5 Die Elektrophysiologischen Parameter bei Inkubation mit der Standardlösung sind beispielhaft an 18 Epithelien mit 41 einzelnen Messwerten dargestellt.

dVt/min	dGt/min	dIt/min	n/N
0,067 ± 0,007	0,014 ± 0,003	0,14 ± 0,016	36/36

Tab. 6 In dieser Tabelle sind die Differenzen der elektrophysiologischen Parameter bei Inkubation mit der Standardlösung dargestellt. Diese Werte wurden aus dem gesamten Versuchsablauf einiger Epithelien (n = 36) genommen und dann auf eine Minute berechnet. Für das Potential und den Strom bedeuten die positiven Differenzwerte, dass diese im Verlauf des Versuches kleiner wurden. Es ist deutlich zu sehen, dass die Verminderung beim Strom im Verhältnis viel größer war. Bei der Leitfähigkeit zeigt der positive Differenzwert, dass sie im Versuchsverlauf zunahm.

#### 4.2.1.2 Punktionen ohne pH-Messung mit der single und double-barreled Mikroelektrode unter Standardbedingungen

Um die Handhabung der Mikroelektrode in Kombination mit der Mikro-Ussing-Kammer zu überprüfen wurden zunächst Punktionen mit der single Mikroelektrode (mit 0,5 molarer KCl-Lösung gefüllt) durchgeführt. Diese verfügt nur über einen Kanal. Eine Punktion ist erfolgreich, wenn sich ein abrupter Potentialabfall zeigt. In der Regel sind kurz vor der Punktion leichte bis starke Schwankungen zu sehen. Am Blättermagen sind in der Vergangenheit bereits von Schultheiss (1995) Punktionen mit einfachen Mikroelektroden gemacht worden. Er erhielt ein mittleres apikales Potential von -65 mV. Diese Werte konnten im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls erreicht werden (siehe nachfolgende Abbildung), wobei dieses im weiteren Verlaufs der Punktion mit den double-barreled Mikroelektroden häufig zusammenbrach. Der Ursache dafür ist vermutlich der größere Durchmesser dieser Elektroden (siehe Diskussion).



Abbildung 11: Diese Abbildung zeigt eine Originalaufzeichnung einer Punktion des Blättermagenepithels mit einer einfachen Mikroelektrode (gefüllt mit 0,5 molarer KCl-Lösung) bei Standardinkubation. Das Potential der Elektrode wurde kurz vor dem Epithel auf 0 mV abgeglichen. Es sind deutliche Schwankungen unmittelbar vor und ein abrupter Potentialabfall bei der Punktion zu sehen. Dieses erreichte apikale Potential pendelt sich nach kurzer Zeit auf einen stabilen Wert von -68 mV ein. Die sichtbaren Zacken ergaben sich durch die vom Verstärker zugeführten Pulse für die Messung der Leitfähigkeit (siehe auch Material und Methoden). Eine durch die direkte Verbindung mit dem Epithel erreichte Erhöhung der Pulse auf dieser Ableitung ist gut erkennbar.

Nach der Fertigung der double-barreled Mikroelektroden sind diese nur mit KCl gefüllt (nicht silanisiert) auf ihre Punktioneigenschaften überprüft worden. Beispielhaft ist nachfolgend eine Abbildung mit einer Originalaufzeichnung dargestellt.



Abbildung 12: Eine Originalaufzeichnung einer Punktion des Psalterepithels bei Standardinkubation mit einer doppelläufigen Mikroelektrode, die nicht silanisiert wurde, ist in dieser Abbildung zu sehen. Es sind die Potentialmessungen beider Kanäle der Mikroelektrode dargestellt. Unmittelbar vor dem Epithel wurden beide Kanäle auf 0 mV abgeglichen. Es sind ebenfalls (wie bei der Punktion mit der single Mikroelektrode) kurzzeitige Schwankungen vor und ein Potentialabfall bei der Punktion sichtbar. Das apikale Potential stellt sich bei etwa  $-40$  mV ein und zwar auf beiden Läufen der Mikroelektrode. Die sichtbaren Zacken sind bedingt durch die vom Verstärker gegebenen Pulsen für die Messung der Leitfähigkeit, deren Vergrößerung sich nach der Punktion auch hier zeigt.

#### 4.2.1.3 pH-Messung bei Standardinkubation

Während das Epithel mit der Standardlösung (pH-Wert von 7,4) perfundiert wurde, sind sowohl direkt an der mukosalen Oberfläche des Epithels (*supraapikal*) als auch in der Epithelzelle (*subapikal*) pH-Messungen durchgeführt worden. Zum Vergleich ist der pH-Wert mit der Elektrodenspitze oben in der Pufferlösung der apikalen Kammerhälfte (*bulksolution*) angegeben (abgekürzt mit Standard oben). Nachfolgend sind Tabellen und entsprechende Graphiken des pH-Wertes, der Referenzelektrode und der  $H^+$ -sensitiven Elektrode zu sehen. Es ist eindeutig zu erkennen, dass die *supra-* und *subapikalen* pH-Werte signifikant verschieden sind von dem in der *bulksolution*. Sowohl in der Zelle als auch an der *supraapikalen* Epitheloberfläche wurde ein saurerer pH-Wert gemessen. Der Potentialabfall der Referenzelektrode zeigte deutlich, dass sich die Elektrode bei der *subapikalen* Messung in der Zelle befand. Auch die  $H^+$ -sensitive Elektrode bekam einen negativen Wert bei intrazellulärer Positionierung der Elektrodenspitze. Auch bei den nachfolgenden Messungen mit unterschiedlichen Fettsäuren hatte die  $H^+$ -Elektrode einen negativen Wert, wenn eine Zelle punktiert wurde.

	pH-Wert			2-seitige Signifikanzen	
	Mittelwert	SEM	n/N	Std. supraapikal	Std. subapikal
Standard oben	7,40	0,05	17/17	<b>0,000*</b> n = 17	<b>0,009*</b> n = 6
Std. supraapikal	7,23	0,02	17/17	-	0,090 n = 6
Std. subapikal	7,30	0,02	7/7	-	-

Tab. 7 Die gemessene pH-Werte bei Standardinkubation (pH 7,4) sind dargestellt. Der erste Wert wurde oben in der apikalen Pufferlösung gemessen. Der zweite Wert ist direkt an der apikalen Epitheloberfläche gemessen worden und der dritte Wert in der Epithelzelle. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Der pH-Wert an der Epitheloberfläche (*supraapikal*) war hoch signifikant verschieden von dem in der Bulksolution (oben). Auch der Unterschied zwischen dem intrazellulären pH-Wert und dem in der Pufferlösung war signifikant.

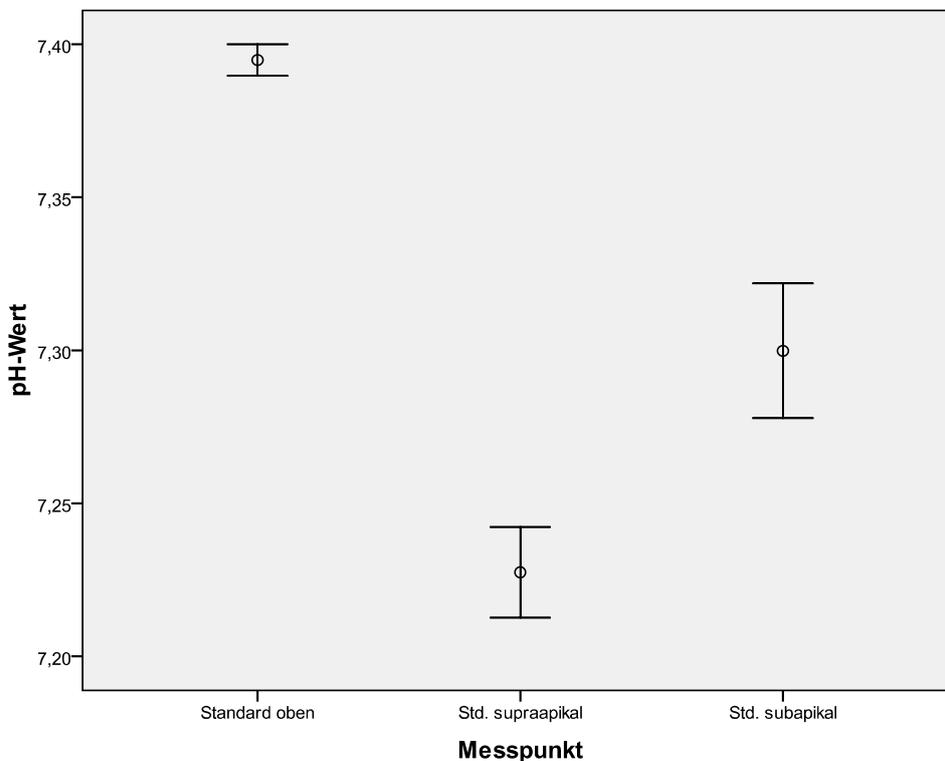


Abbildung 13: Das Diagramm zeigt die gemessenen pH-Werte bei Standardinkubation (pH 7,4). Der erste Fehlerbalken zeigt die pH-Werte bei Positionierung der Mikroelektrodenspitze in der Pufferlösung im oberen Bereich der apikalen Kammerhälfte (n = 17). Beim zweiten Fehlerbalken befand sich die Spitze der Mikroelektrode direkt an der apikalen Epitheloberfläche (n = 17). Der dritte Fehlerbalken zeigt die intrazelluläre Messung des pH-Wertes (n = 7).

	Referenzelektrode			2-seitige Signifikanzen	
	Mittelwert	SEM	n/N	Std. supraapikal	Std. subapikal
Standard oben	1,62	2,20	17/17	0,052 n = 17	<b>0,016*</b> n = 6
Std. supraapikal	-3,03	1,45	17/17	-	<b>0,011*</b> n = 6
Std. subapikal	-19,21	2,53	7/7	-	-
	H <sup>+</sup> -sensitive Elektrode			2-seitige Signifikanzen	
	Mittelwert	SEM	n/N	Std. supraapikal	Std. subapikal
Standard oben	2,07	2,30	17/17	0,084 n = 17	<b>0,027*</b> n = 6
Std. supraapikal	6,81	1,59	17/17	-	<b>0,005*</b> n = 6
Std. subapikal	-14,21	2,23	7/7	-	-

Tab. 8 Die Potentialwerte der Referenzelektrode und der H<sup>+</sup>-sensitiven Elektrode bei Standardinkubation (pH 7,4) sind dargestellt. Oben in der apikalen Pufferlösung wurde das Potential auf etwa 0 mV abgeglichen. Der zweite Wert wurde direkt an der apikalen Epitheloberfläche gemessen und der dritte Wert in der Epithelzelle. Sowohl die Referenzelektrode als auch die H<sup>+</sup>-sensitiven Elektrode zeigten einen deutlichen Potentialabfall während der Punktion. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Ein signifikanter Unterschied des Potentials war zwischen der Positionierung der Elektrodenspitze innerhalb und außerhalb der Zelle zu verzeichnen.

#### 4.2.2 Messungen bei Inkubation mit kurzkettigen Fettsäuren

Bei diesem Versuchsansatz wurde das Epithel mukosal mit Pufferlösungen umspült, in denen ansteigende Konzentration von kurzkettigen Fettsäuren (short chain fatty acids – SCFA) enthalten waren. So wurden Puffer mit einer Konzentration von 20 mmol SCFA pro Liter, mit 60 mmol/l und mit 80 mmol/l verwendet. Ihre Natriumkonzentration entsprach mit 140 mmol/l annähernd der des Standardpuffers (141 mmol/l), die Chloridkonzentration war mit 41 mmol/l deutlich geringer als die des Standardpuffers (99 mmol/l). Die nachfolgend verwendeten Abkürzungen für dieser Pufferlösungen sind die folgenden: 20 SCFA (20 mmol/l kurzkettige Fettsäuren), 60 SCFA (60 mmol/l kurzkettige Fettsäuren) und 80 SCFA (80 mmol/l kurzkettige Fettsäuren). In einem Vorversuch wurde der 60 mmolare SCFA-Puffer bei einem pH-Wert von 7,4 eingesetzt. In den darauf folgenden Versuchen hatte all drei SCFA-Puffer immer jeweils einen pH Wert von 6,4 (eingestellt mit Acetat bzw. HCl). Serosal wurde weiterhin mit dem Standardpuffer perfundiert. Bei den Vorversuchen (pH 7,4) wurden die pH-Messungen nur extrazellulär durchgeführt. Die pH-Messungen bei ansteigenden Fettsäurekonzentrationen erfolgten sowohl *supra-* als auch *subapikal*.

Die Messwerte sind zum einen direkt nach dem Wechsel der einzelnen Pufferlösungen genommen worden (abgekürzt mit „p. W.“ - post Wechsel), als auch im weiteren Verlauf („Verlauf“ hinter der entsprechenden Pufferlösung), d.h. bei weiterer Exposition mit der Lösung. Meistens folgte dem ein vierter Wert, der bei erneuter Inkubation mit der ersten Pufferlösung genommen wurde. Zusätzlich sind die Differenzen pro Minute gebildet worden (abgekürzt mit einem „d/min“). Auf diese Weise konnte der Abfall bzw. der Anstieg des jeweiligen Parameters pro Minute aufgezeigt werden.

#### 4.2.2.1 60 SCFA bei einem pH-Wert von 7,4 (Vorversuch)

In diesem Fall ist die Gruppeneinteilung bei den elektrophysiologischen Messungen anders als bei den pH-Messungen gewesen. Bei ersteren wurden die Gruppen nach den Zeitpunkten beim Lösungswechsel aufgeteilt und die Position der Mikroelektrode wurde außen vorgehalten, da hier die elektrophysiologischen Parameter entscheidend waren. Die Elektrode befand sich entweder oben in der Inkubationslösung oder unten am Epithel (*supraapikal*). Auch hier wurden Messungen direkt nach dem Lösungswechsel und im weiteren Verlauf der Exposition mit eben diesem Puffer genommen.

Im Rahmen der pH-Messungen wurde zuerst das Potential der Elektrode bei Inkubation mit dem Standardpuffer (pH-Wert 7,4) auf Null abgeglichen (gemessener pH-Wert = 7,4). Danach folgten zwei Messwerte: der erste wurde nach dem Wechsel auf den Fettsäurepuffer (pH-Wert 7,4) genommen und mit der Elektrodenspitze oben in der Lösung. Der zweite Messwert wurde erfasst, nachdem die Elektrode direkt bis an die *supraapikale* Oberfläche des Epithels herabgesenkt wurde.

Nach dem Wechsel auf den Fettsäurepuffer, und zwar direkt nach dem Wechsel und im Verlauf, waren signifikante Unterschiede beim Potential, bei der Leitfähigkeit und bei den Differenzwerten des Potentials zu verzeichnen. Ebenfalls signifikante Unterschiede beim Vergleich der Fettsäureinkubation direkt nach dem Wechsel und im Verlauf konnten beim Potential, bei der Leitfähigkeit und bei der Differenz dieser beiden gezeigt werden. Sowohl das Potential als auch der Strom stiegen durch die Fettsäureperfusion an. Deren Differenzwerte zeigten negative Werte an (sehr deutlich bei  $dl_i/min$  zu sehen), was ebenfalls einem Anstieg pro Zeiteinheit gleichkommt. Der Mittelwert des pH-Wertes nahm bei Positionierung der Elektrodenspitze im *supraapikalen* Mikroklima einen deutlich geringeren Wert an (7,28) als oben in der *bulksolution* (7,39).

## Elektrophysiologische Messungen

	Pdt (mV)			2-seitige Signifikanzen	
	Mittelwert	SEM	n/N	60 SCFA 7,4 p. W.	60 SCFA 7,4 Verlauf
Standard 7,4	-7,45	0,97	7/7	<b>0,024*</b> n = 6	<b>0,007*</b> n = 5
60 SCFA 7,4 p. W.	-8,26	1,18	6/6	-	<b>0,026*</b> n = 5
60 SCFA 7,4 Verlauf	-10,00	0,95	7/5	-	-
	Gt (mS/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen	
	Mittelwert	SEM	n/N	60 SCFA 7,4 p. W.	60 SCFA 7,4 Verlauf
Standard 7,4	4,40	0,49	7/7	<b>0,049*</b> n = 6	<b>0,011*</b> n = 5
60 SCFA 7,4 p. W.	4,45	0,40	6/6	-	<b>0,035*</b> n = 5
60 SCFA 7,4 Verlauf	4,20	0,36	7/5	-	-
	It (µA/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen	
	Mittelwert	SEM	n/N	60 SCFA 7,4 p. W.	60 SCFA 7,4 Verlauf
Standard 7,4	-31,47	3,78	7/7	0,085 n = 6	0,070 n = 5
60 SCFA 7,4 p. W.	-35,06	3,63	6/6	-	0,062 n = 5
60 SCFA 7,4 Verlauf	-40,23	1,97	7/5	-	-

Tab. 9 Die Werte der elektrophysiologischen Parameter sind in dieser Tabelle zu sehen. Der erste Wert wurde bei Standardinkubation genommen. Direkt nach dem Wechsel auf den 60 mmolaren SCFA-Puffer (pH 7,4) folgte zunächst eine Messung und daraufhin eine weitere im Verlauf der Pufferexposition. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Der Unterschied zwischen der beidseitigen Umspülung mit Standardlösung und dem mukosalem Einsatz des 60 mmolaren SCFA-Puffers war bei der Potentialdifferenz und bei der Leitfähigkeit sowohl direkt nach dem Wechsel (p. W.) als auch im Verlauf signifikant.

	dVt/min			2-seitige Signifikanzen	
	Mittelwert	SEM	n/N	60 SCFA 7,4 p. W.	60 SCFA 7,4 Verlauf
Standard 7,4	-0,21	0,07	7/7	<b>0,001*</b> n = 6	0,471 n = 5
60 SCFA 7,4 p. W.	-1,28	0,27	6/6	-	<b>0,001*</b> n = 5
60 SCFA 7,4 Verlauf	0,10	0,09	7/5	-	-
	dGt/min			2-seitige Signifikanzen	
	Mittelwert	SEM	n/N	60 SCFA 7,4 p. W.	60 SCFA 7,4 Verlauf
Standard 7,4	-0,12	0,04	7/7	0,281 n = 6	0,067 n = 5
60 SCFA 7,4 p. W.	-0,23	0,06	6/6	-	<b>0,002*</b> n = 5
60 SCFA 7,4 Verlauf	-0,01	0,02	7/5	-	-
	dIt/min			2-seitige Signifikanzen	
	Mittelwert	SEM	n/N	60 SCFA 7,4 p. W.	60 SCFA 7,4 Verlauf
Standard 7,4	-0,10	0,21	7/7	<b>0,027*</b> n = 6	0,455 n = 5
60 SCFA 7,4 p. W.	-3,48	1,51	6/6	-	<b>0,018*</b> n = 5
60 SCFA 7,4 Verlauf	0,14	0,23	7/5	-	-

Tab. 10 Zu sehen sind die Differenzwerte des transepithelialen Potentials pro Minute. Der erste Wert wurde bei Standardinkubation genommen. Nach dem Wechsel auf 60 mmolaren SCFA-Puffer (pH 7,4) folgte zunächst ein Wert direkt nach dem Wechsel und daraufhin ein weiterer im Verlauf der Pufferexposition. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Der Unterschied zwischen der beidseitigen Umspülung mit Standardlösung und dem mukosalem Einsatz des 60 mmolaren SCFA-Puffers war bei dem Differenzwert für das Potential und dem Strom signifikant verschieden. Die Mittelwerte zeigten deutliche Unterschiede.

## pH-Messungen

	pH-Wert			2-seitige Signifikanz
	Mittelwert	SEM	n/N	60 SCFA 7,4 unten
60 SCFA 7,4 oben	7,39	0,02	8/5	<b>0,038*</b> n = 4
60 SCFA 7,4 supra-apikal	7,28	0,06	5/4	-

Tab. 11 Die gemessenen Mittelwerte des pH-Wertes sind in dieser Tabelle zu sehen. Das Potential der Elektrode wurde zunächst bei Standardinkubation (pH 7,4) auf Null abgeglichen, was einem pH-Wert von 7,4 entspricht. Nach dem Wechsel auf den 60 mmolaren SCFA-Puffer (pH 7,4) wurde oben in der Pufferlösung der erste pH-Wert gemessen. Daraufhin wurde die Elektrode bei weiterer Exposition mit dem Fettsäurepuffer zum Epithel abgesenkt (*supraapikal*) und der zweite Wert erfasst. Die rechte Hälfte stellt den Wert der Signifikanzverpaarung da. Der Unterschied der gemessenen pH-Werte bei Inkubation mit dem SCFA-Puffer oben in der Lösung (*bulksolution*) und *supraapikal* am Epithel war signifikant und der pH-Wert wies auf ein saureres pH-Mikroklima hin.

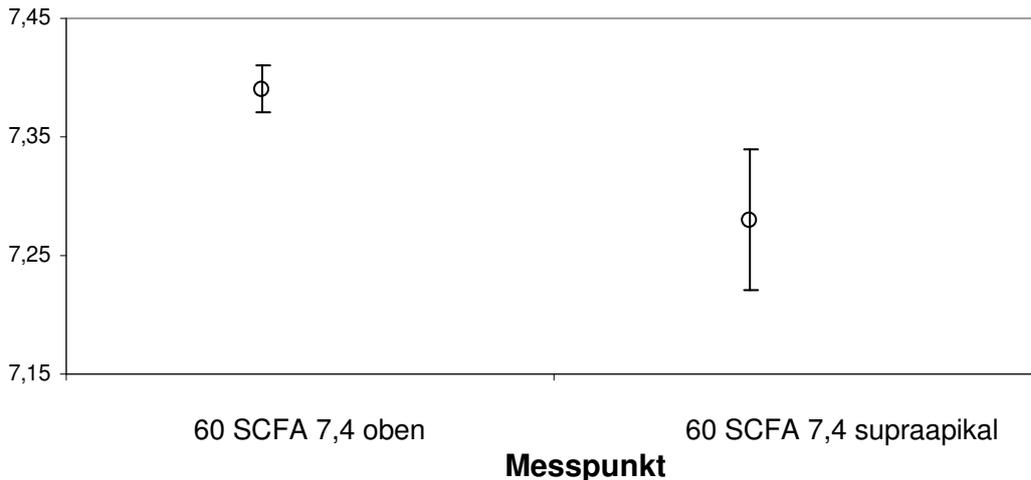


Abbildung 14: Die Graphik zeigt die gemessenen pH-Werte. Beim ersten Fehlerbalken wurde mit dem 60 mmolaren SCFA-Puffer (pH 7,4) perfundiert und die Elektroden spitze befand sich oben in der Lösung. Daraufhin folgte ein weiterer Messwert nach Absenkung der Spitze an die luminale Oberfläche des Epithels (supraapikal).

#### 4.2.2.2 60 SCFA mit einem pH-Wert von 7,4 und 6,4 (Vorversuch)

Dieser Versuchsansatz wurde durchgeführt, um die Auswirkung der pH-Absenkung bei gleich bleibender Fettsäurekonzentration zu charakterisieren. Zuerst wurde der pH-Wert des 60 mmolaren SCFA-Puffers auf einen neutralen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Ein weiterer 60 mmolarer Fettsäurepuffer wurde auf den sauren pH-Wert 6,4 titriert. Es kamen nur *supraapikale* Messungen zum Einsatz, d. h. die Mikroelektroden spitze befand sich während des gesamten Versuches direkt an der mukosalen Epitheloberfläche. Das Epithel wurde auf der mukosalen Seite zunächst mit dem Fettsäurepuffer bei neutralem pH-Wert inkubiert und daraufhin mit dem SCFA-Puffer bei einem pH-Wert von 6,4. Das Potential der Elektrode wurde im ersten Puffer auf Null abgeglichen (entspricht dem pH-Wert von 7,4). Diese Messreihe erfolgte nur an einem Epithel. Es wurden insgesamt vier Messwerte genommen: bei Inkubation mit dem SCFA-Puffer bei pH 7,4, direkt nach dem Wechsel auf den SCFA-Puffer mit 6,4 im weiteren Verlauf der Inkubation mit dem sauren Fettsäurepuffer und nach dem Rückwechsel auf den neutralen Fettsäurepuffer.

Der transepithelialer Strom stieg nach dem Wechsel von dem neutralen auf den sauren Fettsäurepuffer zunächst an und fiel darauf deutlich ab. Das transepitheliale Potential wurde kontinuierlich vermindert. Die transepitheliale Leitfähigkeit stieg indes stetig an, um nach dem Rückwechsel wieder kleiner zu werden. Die Differenzwerte des Potentials und des Stromes nahmen bei Inkubation mit dem neutralen Fettsäurepuffer deutlich negativere Werte an und im Gegensatz dazu bei Inkubation mit dem sauren Puffer positive Werte.

Der *supraapikal* gemessene pH-Wert bei Inkubation mit dem neutralen Fettsäurepuffer zeigte – wie bei dem Versuch zuvor – einen saureren pH-Wert, der im Verlauf der Inkubation mit dem sauren Fettsäurepuffer auf einen Wert von 6,26 abfiel. Dieser Wert war damit ebenfalls saurer als derjenige in der *bulksolution* (6,4). Die Differenzwerte des pH-Wertes zeigten zu Beginn dieses Versuchsansatzes einen positiven Wert, der direkt nach dem Wechsel deutlich negativ wurde, um dann im weiteren Verlauf wieder einen positiven Wert

anzunehmen, der auch nach dem Rückwechsel positiv blieb. Es erfolgte also ein starker Abfall des pH-Wertes pro Minute nach dem Wechsel auf den sauren Puffer, der sich jedoch bei weiterer Exposition in einen leichten Anstieg umwandelte.

Eine Signifikanzverpaarung entfiel aufgrund der zu geringen Anzahl ( $n = 1$ ).

	PDt (mV)	Gt (mS/cm <sup>2</sup> )	It (µA/cm <sup>2</sup> *h)	dVt/min	dGt/min	dIt/min
60 SCFA 7,4 supraapikal	-6,88	4,50	-30,48	-0,08	0,13	-1,34
60 SCFA 6,4 supra p.W.	-6,35	5,16	-32,56	0,54	0,21	1,55
60 SCFA 6,4 supra Verlauf	-5,34	5,58	-29,70	0,16	-0,11	1,47
60 SCFA 7,4 supra p.W.	-5,45	4,79	-26,12	-0,23	-0,05	-1,33

Tab. 12 Die Werte der elektrophysiologischen Parameter und ihre Differenzwerte sind in dieser Tabelle zu sehen. Der erste Wert wurde bei Inkubation mit dem 60 mmolaren SCFA-Puffer bei einem pH-Wert von 7,4 genommen. Direkt nach dem Wechsel auf den 60 SCFA mit saurem pH-Wert (6,4) folgte die nächste Messung und daraufhin eine weitere im Verlauf der Pufferexposition. Ein letzter Wert wurde nach dem Rückwechsel auf den ersten Puffer erfasst. Diese Werte wurden an einem Epithel genommen.

	pH-Wert	dpH/min
60 SCFA 7,4 supraapikal	7,22	0,05
60 SCFA 6,4 supra p.W.	7,19	-0,28
60 SCFA 6,4 supra Verlauf	6,26	0,33
60 SCFA 7,4 supra p.W.	6,48	0,65

Tab. 13 Die gemessenen Werte des pH-Wertes und seine Differenzwerte sind in dieser Tabelle dargestellt. Das Potential der Elektrode wurde zunächst bei Inkubation mit dem 60 SCFA bei einem pH-Wert von 7,4 oben in der *bulksolution* auf Null abgeglichen, was einem pH-Wert von 7,4 entspricht. Daraufhin wurde die Elektrode bei weiterer Exposition mit dem neutralen Fettsäurepuffer an das Epithel herangeführt (*supraapikal*) und dort während des gesamten Versuches verblieben. Der erste Wert wurde bei dieser Position genommen. Direkt nach dem Wechsel auf den 60 SCFA mit saurem pH-Wert (6,4) folgte die nächste Messung und daraufhin eine weitere im Verlauf der Pufferexposition. Ein letzter Wert wurde nach dem Rückwechsel auf den ersten Puffer erfasst. Diese Werte erbrachten einen weiteren Hinweis auf ein saures pH-Mikroklima am Epithel

#### 4.2.2.3 Messungen bei ansteigenden Fettsäurekonzentrationen

Zu Beginn wurde das Epithel mit der Standardlösung (pH 7,4) auf beiden Seiten inkubiert. Daraufhin wurden nacheinander die Fettsäurepuffer in aufsteigender Konzentration (mit einem pH-Wert von 6,4) auf der mukosalen Seite eingesetzt. Die SCFA-Puffer hatten Fettsäurekonzentrationen von 20 mmol/l, 60 mmol/l und 80 mmol/l. Hier wurden jeweils zwei Werte genommen, direkt nach dem Lösungswechsel (p. W.) und im weiteren Verlauf der Inkubation mit dem jeweiligen Puffer.

Zuerst werden die Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen dargestellt. Bei diesem Versuchsansatz wurde zusätzlich das gemessene apikale Potential als Tabelle und graphisch abgebildet. Hier wurden die *supra-* und *subapikalen* Messungen in eine Mess-Gruppe zusammengefasst, da die elektrophysiologischen Parameter ausschlaggebend wa-

ren. Nachfolgend werden die gemessenen pH-Werte dargestellt. Dort ist eine Unterteilung nach der Position der Mikroelektrodenspitze erfolgt (*supra-* und *subapikal*).

Die transepitheliale Potentialdifferenz stieg direkt nach dem Wechsel auf den 20 mmolaren SCFA-Puffer zunächst gering an, um dann bei weiterer Exposition mit diesem Puffer stark anzusteigen. Beide Werte waren signifikant verschieden von dem Potentialwert bei Standardinkubation. Nach der weiteren Konzentrationserhöhung der Fettsäuren auf 60 mmol/l fiel das Potential wieder ab. Bei der Verlaufsmessung sank der Wert sogar wieder unter dem bei Perfusion mit dem Standardpuffer. Bei Inkubation mit 80 mmol SCFA pro Liter stieg der Potentialwert wieder an und blieb auch im weiteren Verlauf in etwa bei diesem Wert, der gering über dem Wert bei Standardpufferumspülung lag. Auch bei dem apikalen Potential waren deutliche und signifikante Veränderungen ersichtlich. Bei Einsatz der Fettsäurepuffer nahmen sie einen 4-5 fach höheren Wert an (negativer), wobei der höchste Wert bei dem Puffer mit der größten Fettsäurekonzentration gemessen werden konnte. Direkt nach dem Wechsel auf den ersten Fettsäurepuffer zeigte der transepitheliale Strom kaum eine Änderung, die dagegen nach weiterer Exposition mit diesem Puffer zu einer starken Erhöhung umschwenkte. Dieser Wert war auch als einziger Wert signifikant verschieden von der Standardinkubation. Daraufhin fielen sie bei weiterer Konzentrationserhöhung fast kontinuierlich ab und erreichten einen kleineren Wert als bei Perfusion mit dem Standardpuffer. Die Fettsäurelösungen untereinander direkt nach dem Wechsel und im Verlauf waren bei den Werten für das Potential und dem Strom größtenteils signifikant verschieden. Die Leitfähigkeit zeigte ein eher wellenförmiges Verhalten, wobei alle Werte während der Fettsäureexposition, außer dem Wert der Verlaufsmessung bei 20 mmol/l SCFA, unter dem Wert bei Standardinkubation lagen. Jedoch waren die Unterschiede nicht besonders groß und nur die Werte der Verlaufsmessung mit dem 20 mmolaren Fettsäurepuffer und dem 60 mmolaren Fettsäurepuffer waren signifikant voneinander verschieden. In diesem Zusammenhang erwähnenswert ist die Tatsache, dass die Leitfähigkeit unter Standardbedingungen im Verlauf eines Versuches zunahm.

Die Differenzwerte für das Potential zeigten zunächst einen leicht negativen Wert an (-0,11), der sich direkt nach dem Wechsel auf den ersten Fettsäurepuffer verstärkte (-0,76) und danach fortwährend einen positiven Wert annahm, der jedoch keine Kontinuität zeigte. Der Wert direkt nach dem ersten Wechsel war demnach auch signifikant verschieden von dem bei Standardinkubation und denen bei Exposition mit den anderen beiden Fettsäurepuffern direkt nach dem Wechsel. Bei den Differenzwerten für den Strom war das Verhalten identisch wobei der Wert bei Inkubation mit 60 mmol SCFA pro Liter viel höher war als die restlichen Werte.

Bei der Messung des pH-Wertes *supraapikal* unterschieden sich die pH-Werte bei Fettsäureinkubation deutlich und signifikant von dem bei Standardinkubation, was dadurch bedingt war, dass die Fettsäurelösungen einen um eine Einheit saureren pH-Wert hatten. Der gemessene intrazelluläre pH-Wert war jederzeit geringer als der bei Standardinkubation und zeigte beim Verlaufswert einen jeweils deutlich geringeren Wert (saurer) als direkt nach dem Wechsel.

## Elektrophysiologische Messungen

	PDt (mV)			2-seitige Signifikanzen					
	Mittelwert	SEM	n/N	20 SCFA p. W.	20 SCFA Verlauf	60 SCFA p. W.	60 SCFA Verlauf	80 SCFA p. W.	80 SCFA Verlauf
Standardpuffer 7,4	-11,57	1,25	15/9	<b>0,011*</b> n = 8	<b>0,000*</b> n = 8	<b>0,011*</b> n = 8	0,067 n = 8	0,664 N = 10	0,642 n = 9
20 SCFA 6,4 p. W.	-11,89	1,52	13/7	-	-	0,505 n = 7	-	<b>0,020*</b> N = 7	-
20 SCFA 6,4 Verlauf	-15,39	1,36	15/9	-	-	-	<b>0,021*</b> N = 10	-	<b>0,004*</b> n = 9
60 SCFA 6,4 p. W.	-12,46	1,70	10/7	-	-	-	-	0,062 N = 5	-
60 SCFA 6,4 Verlauf	-10,81	1,10	14/7	-	-	-	-	-	<b>0,027*</b> n = 9
80 SCFA 6,4 p. W.	-12,30	1,41	13/9	-	-	-	-	-	-
80 SCFA 6,4 Verlauf	-12,27	1,49	15/9	-	-	-	-	-	-
	Gt (mS/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen					
	Mittelwert	SEM	n/N	20 SCFA p. W.	20 SCFA Verlauf	60 SCFA p. W.	60 SCFA Verlauf	80 SCFA p. W.	80 SCFA Verlauf
Standardpuffer 7,4	2,77	0,18	15/9	0,551 n = 8	0,878 n = 8	0,988 n = 8	0,267 n = 8	0,127 n = 10	0,089 n = 9
20 SCFA 6,4 p. W.	2,65	0,08	13/7	-	-	0,601 n = 7	-	0,365 N = 7	-
20 SCFA 6,4 Verlauf	2,80	0,10	15/9	-	-	-	<b>0,018*</b> n = 10	-	0,064 n = 9
60 SCFA 6,4 p. W.	2,76	0,15	10/7	-	-	-	-	0,173 N = 5	-
60 SCFA 6,4 Verlauf	2,55	0,12	14/7	-	-	-	-	-	0,503 n = 9
80 SCFA 6,4 p. W.	2,46	0,15	13/9	-	-	-	-	-	-
80 SCFA 6,4 Verlauf	2,44	0,16	15/9	-	-	-	-	-	-
	It (µA/cm <sup>2</sup> ·h)			2-seitige Signifikanzen					
	Mittelwert	SEM	n/N	20 SCFA p. W.	20 SCFA Verlauf	60 SCFA p. W.	60 SCFA Verlauf	80 SCFA p. W.	80 SCFA Verlauf
Standardpuffer 7,4	-31,61	3,57	15/9	0,061 n = 8	<b>0,004*</b> n = 8	0,116 n = 8	0,774 n = 8	0,577 n = 10	0,283 n = 9
20 SCFA 6,4 p. W.	-31,57	4,15	13/7	-	-	0,768 n = 7	-	<b>0,020*</b> N = 7	-
20 SCFA 6,4 Verlauf	-41,91	3,08	15/9	-	-	-	<b>0,001*</b> n = 10	-	<b>0,001*</b> n = 9
60 SCFA 6,4 p. W.	-32,62	3,11	10/7	-	-	-	-	<b>0,025*</b> N = 5	-
60 SCFA 6,4 Verlauf	-27,28	2,70	14/7	-	-	-	-	-	<b>0,023*</b> n = 9
80 SCFA 6,4 p. W.	-29,17	3,01	13/9	-	-	-	-	-	-
80 SCFA 6,4 Verlauf	-28,38	3,11	15/9	-	-	-	-	-	-

Tab. 14 Die Tabelle zeigt die elektrophysiologischen Parameter bei mukosaler Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen von kurzkettigen Fettsäuren (20, 60 und 80 mmol/l) bei einem pH-Wert von 6,4. Hier sind jeweils Messwerte direkt nach dem Wechsel (p. W.) auf den Puffer als auch im weiteren Verlauf der jeweiligen Pufferexposition dargestellt. Die rechte Hälfte stellt den Wert der jeweiligen Signifikanzverpaarung da. Sowohl beim Vergleich mit der Standardinkubation als auch im Vergleich der Fettsäurelösungen untereinander waren signifikante Unterschiede zu verzeichnen.

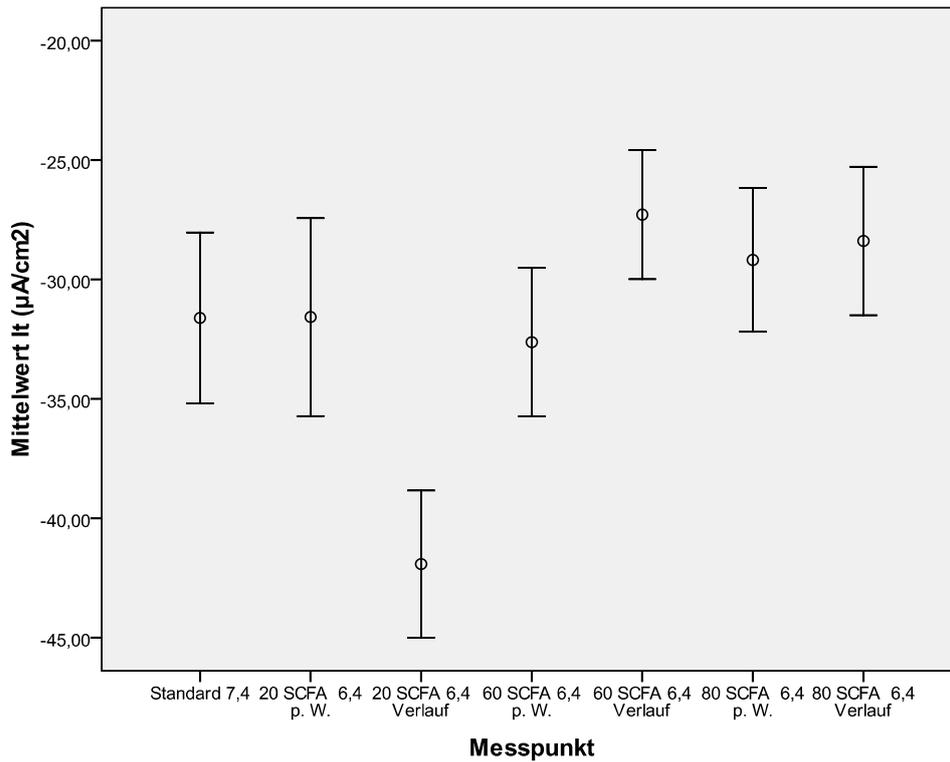


Abbildung 15: Der transepitheliale Strom ist auf dieser Graphik dargestellt und zwar bei mukosaler Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen von kurzkettigen Fettsäuren (20, 60 und 80 mmol/l) bei einem pH-Wert von 6,4. Hier sind jeweils Fehlerbalken der Messwerte direkt nach dem Wechsel (p. W.) auf den Puffer als auch im weiteren Verlauf der jeweiligen Pufferexposition zu sehen. Die Anzahl der Epithelien bei den jeweiligen Lösungsanordnungen sind der vorangestellten Tabelle zu entnehmen.

Bei der intrazellulären Position der Mikroelektrode wurde über die Referenzelektrode das apikale Potential bestimmt. Nachfolgend zu sehen.

	Apikales Potential (mV)			2-seitige Signifikanzen
	Mittelwert	SEM	n	Standard sub 7,4
Standard sub 7,4	-8,65	-3,27	7	-
20 SCFA sub 6,4	-34,80	-13,15	7	<b>0,027*</b> n = 6
60 SCFA sub 6,4	-34,86	-14,23	6	<b>0,041*</b> n = 5
80 SCFA sub 6,4	-41,92	-15,84	7	<b>0,028*</b> n = 6
Standard 7,4 p.W.	-5,28	-2,15	6	-

Tab. 15 Das über die Referenzelektrode abgefallene Potential bei subapikaler (intrazellulärer) Messung ist in dieser Tabelle dargestellt. Der gemessene Wert bei Inkubation mit den Fettsäuren wurde im weiteren Verlauf der Inkubation mit diesem Puffer genommen worden, also nach einigen Minuten. Die Werte von allen drei Fettsäuren (pH 6,4) mit ansteigenden Konzentration waren signifikant verschieden von dem bei Inkubation mit dem Standardpuffer (pH 7,4).

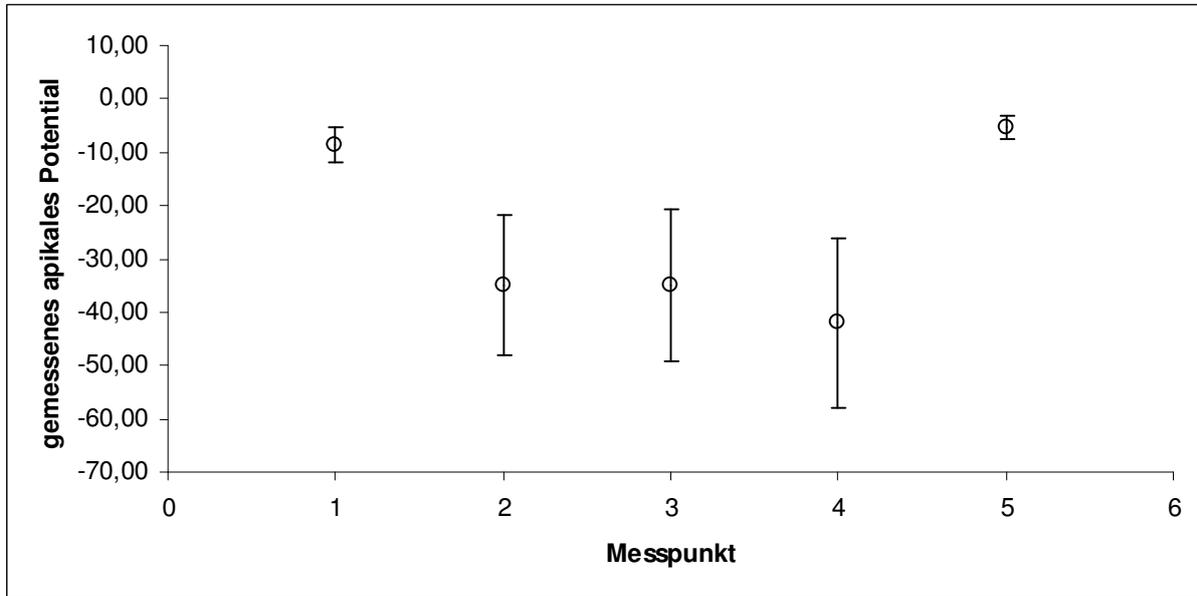


Abbildung 16: In dieser Abbildung ist das über die Referenzelektrode abgefallene Potential bei intrazellulärer Position der Mikroelektroden spitze zu sehen. Am Messpunkt 1 wurde mit dem Standardpuffer (pH 7,4) inkubiert, bei den Messpunkten 2-4 mit ansteigenden Konzentrationen an Fettsäuren (pH 6,4), wobei mit 20 mmol/l (2) angefangen wurde und über 60 mmol/l (3) bis auf 80 mmol/l (4) erhöht wurde. Zum Schluss wurde wieder der Anfangspuffer (Standardpuffer – Messpunkt 5) eingesetzt.

	dVt/min			2-seitige Signifikanzen					
	Mittelwert	SEM	n/N	20 SCFA p. W.	20 SCFA Verlauf	60 SCFA p. W.	60 SCFA Verlauf	80 SCFA p. W.	80 SCFA Verlauf
Standardpuffer 7,4	-0,11	0,13	15/9	<b>0,004*</b> n = 8	0,166 n = 8	<b>0,002*</b> n = 8	0,229 n = 8	0,646 n = 10	0,166 n = 9
20 SCFA 6,4 p. W.	-0,76	0,13	13/7	-	-	<b>0,004*</b> n = 7	-	<b>0,002*</b> N = 7	-
20 SCFA 6,4 Verlauf	0,10	0,08	15/9	-	-	-	0,472 n = 10	-	0,234 n = 9
60 SCFA 6,4 p. W.	0,51	0,12	10/7	-	-	-	-	0,276 N = 5	-
60 SCFA 6,4 Verlauf	0,24	0,11	14/7	-	-	-	-	-	0,831 n = 9
80 SCFA 6,4 p. W.	0,07	0,19	13/9	-	-	-	-	-	-
80 SCFA 6,4 Verlauf	0,34	0,10	15/9	-	-	-	-	-	-
	dGt/min			2-seitige Signifikanzen					
	Mittelwert	SEM	n/N	20 SCFA p. W.	20 SCFA Verlauf	60 SCFA p. W.	60 SCFA Verlauf	80 SCFA p. W.	80 SCFA Verlauf
Standardpuffer 7,4	0,07	0,04	15/9	<b>0,045*</b> n = 8	0,091 n = 8	0,059 n = 8	0,077 n = 8	0,486 n = 10	0,179 n = 9
20 SCFA 6,4 p. W.	-0,02	0,04	13/7	-	-	0,417 n = 7	-	0,422 N = 7	-
20 SCFA 6,4 Verlauf	-0,04	0,02	15/9	-	-	-	0,420 n = 10	-	0,690 n = 9
60 SCFA 6,4 p. W.	-0,08	0,03	10/7	-	-	-	-	<b>0,016*</b> N = 5	-
60 SCFA 6,4 Verlauf	-0,01	0,02	14/7	-	-	-	-	-	0,677 n = 9
80 SCFA 6,4 p. W.	0,02	0,02	13/9	-	-	-	-	-	-
80 SCFA 6,4 Verlauf	-0,02	0,03	15/9	-	-	-	-	-	-
	dIt/min			2-seitige Signifikanzen					
	Mittelwert	SEM	n/N	20 SCFA p. W.	20 SCFA Verlauf	60 SCFA p. W.	60 SCFA Verlauf	80 SCFA p. W.	80 SCFA Verlauf
Standardpuffer 7,4	-0,67	0,41	15/9	0,122 n = 8	<b>0,013*</b> n = 8	<b>0,005*</b> n = 8	<b>0,022*</b> n = 8	0,206 n = 10	0,085 n = 9
20 SCFA 6,4 p. W.	-1,47	0,52	13/7	-	-	<b>0,006*</b> n = 7	-	0,062 N = 7	-
20 SCFA 6,4 Verlauf	0,94	0,25	15/9	-	-	-	0,813 n = 10	-	0,561 n = 9
60 SCFA 6,4 p. W.	2,38	0,44	10/7	-	-	-	-	<b>0,024*</b> N = 5	-
60 SCFA 6,4 Verlauf	0,85	0,26	14/7	-	-	-	-	-	0,325 n = 9
80 SCFA 6,4 p. W.	0,31	0,22	13/9	-	-	-	-	-	-
80 SCFA 6,4 Verlauf	0,74	0,16	15/9	-	-	-	-	-	-

Tab. 16 Die Tabelle zeigt die Differenzwerte der elektrophysiologischen Parameter bei mukosaler Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen von kurzkettigen Fettsäuren (20, 60 und 80 mmol/l) bei einem pH-Wert von 6,4. Hier sind jeweils Messwerte direkt nach dem Wechsel (p. W.) auf den Puffer als auch im weiteren Verlauf der jeweiligen Pufferexposition dargestellt. Die rechte Hälfte stellt den Wert der jeweiligen Signifikanzverpaarung da. Sowohl beim Vergleich mit der Standardinkubation als auch im Vergleich der Fettsäurelösungen untereinander waren signifikante Unterschiede zu verzeichnen.

**pH-Messungen**Supraapikal

	pH-Wert			2-seitige Signifikanzen					
	Mittelwert	SEM	n/N	20 SCFA p. W.	20 SCFA Verlauf	60 SCFA p. W.	60 SCFA Verlauf	80 SCFA p. W.	80 SCFA Verlauf
Standardpuffer 7,4	7,33	0,02	8/7	0,051 n = 4	<b>0,001*</b> n = 5	<b>0,001*</b> n = 4	<b>0,004*</b> n = 4	<b>0,000*</b> N = 6	<b>0,000*</b> n = 7
20 SCFA 6,4 p. W.	6,53	0,24	6/4	-	-	0,322 n = 3	-	0,385 N = 3	-
20 SCFA 6,4 Verlauf	6,50	0,06	8/5	-	-	-	0,525 n = 4	-	0,734 n = 4
60 SCFA 6,4 p. W.	6,39	0,05	5/5	-	-	-	-	0,126 N = 3	-
60 SCFA 6,4 Verlauf	6,44	0,09	6/5	-	-	-	-	-	0,801 n = 4
80 SCFA 6,4 p. W.	6,50	0,07	7/6	-	-	-	-	-	-
80 SCFA 6,4 Verlauf	6,49	0,03	8/8	-	-	-	-	-	-

Tab. 17 Die Tabelle zeigt den *supraapikal* gemessenen pH-Wert zunächst bei Standardinkubation (pH 7,4) und dann bei mukosaler Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen von kurzkettigen Fettsäuren (20, 60 und 80 mmol/l) bei einem pH-Wert von 6,4. Hier sind jeweils Messwerte direkt nach dem Wechsel (p. W.) auf den Puffer als auch im weiteren Verlauf der jeweiligen Pufferexposition dargestellt. Zuvor wurde das Potential der Mikroelektrode wie immer oben in der *bulksolution* (Standardpuffer, pH 7,4) auf Null abgeglichen (entspricht einem gemessenen pH-Wert von 7,4). Die rechte Hälfte stellt den Wert der jeweiligen Signifikanzverpaarung da. Beim Vergleich mit der Standardinkubation mit der Fettsäureinkubation kamen die zu erwartenden Signifikanzen heraus.

Die Differenzwerte des *supraapikal* gemessenen pH-Wertes zeigten keine Signifikanzen und sind daher nicht dargestellt worden. Die deutlichste und nicht unerhebliche Veränderung dieses Wertes war beim Vergleich bei Standardinkubation (-0,03) mit dem direkt nach dem Wechsel auf den ersten Fettsäurepuffer zu sehen, die einen negativen Wert (-0,13) annahm. Die darauf folgenden Werte waren wieder positiv und wurden beim letzten Puffer wieder leicht negativ und entsprachen in etwa dem Wert unter Standardbedingungen.

Subapikal

	pH-Wert			2-seitige Signifikanzen					
	Mittelwert	SEM	n/N	20 SCFA p. W.	20 SCFA Verlauf	60 SCFA p. W.	60 SCFA Verlauf	80 SCFA p. W.	80 SCFA Verlauf
Standardpuffer 7,4	7,29	0,07	10/7	0,504 n = 6	0,953 n = 6	0,754 n = 6	0,448 n = 6	0,650 N = 5	0,136 n = 5
20 SCFA 6,4 p. W.	7,30	0,06	8/6	-	-	0,216 n = 8	-	0,298 N = 6	-
20 SCFA 6,4 Verlauf	7,22	0,04	11/6	-	-	-	0,618 n = 7	-	0,392 n = 5
60 SCFA 6,4 p. W.	7,28	0,06	6/4	-	-	-	-	0,114 N = 6	-
60 SCFA 6,4 Verlauf	7,18	0,07	10/7	-	-	-	-	-	0,592 n = 7
80 SCFA 6,4 p. W.	7,24	0,10	8/7	-	-	-	-	-	-
80 SCFA 6,4 Verlauf	7,20	0,08	10/9	-	-	-	-	-	-

Tab. 18 Die Tabelle zeigt den *subapikal* gemessenen pH-Wert zunächst bei Standardinkubation (pH 7,4) und dann bei mukosaler Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen von kurzkettigen Fettsäuren (20, 60 und 80 mmol/l) bei einem pH-Wert von 6,4. Hier sind jeweils Messwerte direkt nach dem Wechsel (p. W.) auf den Puffer als auch im weiteren Verlauf der jeweiligen Pufferexposition dargestellt. Die rechte Hälfte stellt den Wert der jeweiligen Signifikanzverpaarung da. Es waren keine Signifikanzen zu verzeichnen.

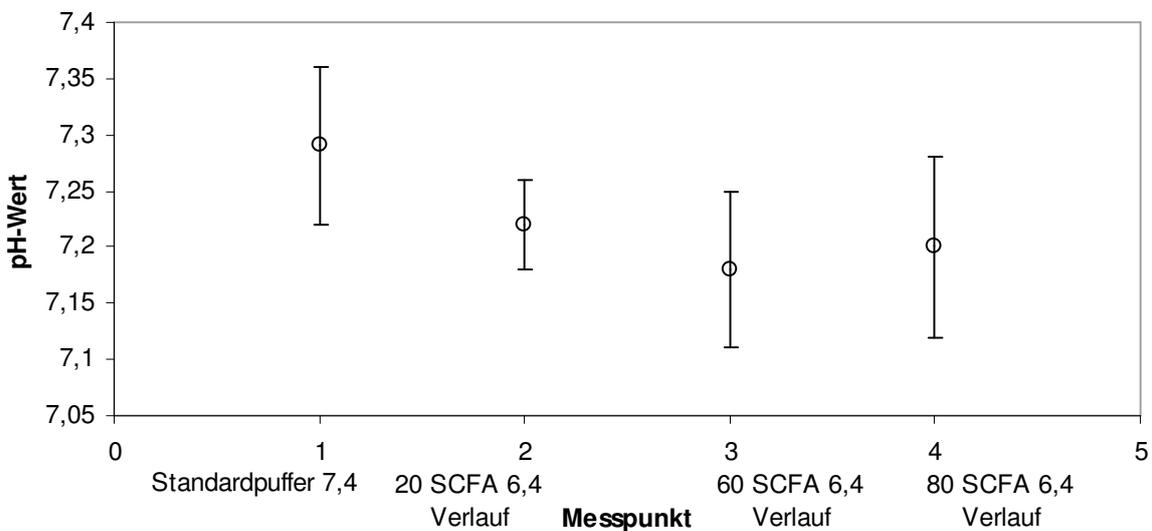


Abbildung 17: Der *subapikal* gemessene pH-Wert ist auf dieser Graphik dargestellt und zwar bei mukosaler Inkubation mit dem Standardpuffer (7,4) und darauf folgend mit ansteigenden Konzentrationen von kurzkettigen Fettsäuren (20, 60 und 80 mmol/l) bei einem pH-Wert von 6,4. Hier sind jeweils Fehlerbalken der Messwerte im weiteren Verlauf der jeweiligen Pufferexposition zu sehen. Die Anzahl der Epithelien bei den jeweiligen Lösungsanordnungen sind der vorangestellten Tabelle zu entnehmen.

Die Differenzwerte des *subapikal* gemessenen pH-Wertes zeigten ebenfalls keine Signifikanzen und sind daher nicht dargestellt worden. Auch hier war die deutlichste, aber weniger starke Veränderung dieses Wertes beim Vergleich bei Standardinkubation (+0,006) mit dem direkt nach dem Wechsel auf den ersten Fettsäurepuffer zu sehen, die ebenfalls einen nega-

tiven Wert annahm (-0,06). Die darauf folgenden Werte waren positiv und wurden beim Wechsel auf den Puffer mit 80 mmol Fettsäuren pro Liter wieder leicht negativ.

#### 4.2.3 Messungen während des Einsatzes von Hemmstoffen

Mit Hilfe der Blocker sollten Transportproteine bzw. Enzyme an ihrer Funktion gehindert werden. Auf diese Weise sollte die Beteiligung bzw. Bedeutung der jeweiligen Transporter an der pH-Regulation geklärt werden. Die Hemmstoffe kamen nur auf der *apikalen* Seite zum Einsatz und zwar gelöst im 80 mmol/l SCFA-Puffer bei einem pH-Wert von 6,4, abgesehen von den Amilorid-Messungen. Die Messungen mit der Mikroelektrode wurden mit Ausnahme von den Amilorid-Messungen *supra-* und *subapikal* durchgeführt. In der Regel wurde das Epithel über eine Zeitspanne von etwa acht Minuten mit den Blockern exponiert. Es wurde jeweils ein Messpunkt direkt nach der Blockergabe genommen und ein zweiter im weiteren Verlauf der Blockerexposition (nach ca. 7-8 Minuten), sozusagen ein Verlaufswert. Der Ausgangspuffer (wenn nicht anders vermerkt der 80 SCFA-Puffer) kam nach Blockergabe wieder zum Einsatz, um den Hemmstoff auszuspülen. Nach diesem Rückwechsel wurde der vierte Messwert genommen.

Aus den Differenzwerten während der Fettsäureinkubation vor der jeweiligen Blockergabe wurde ein Mittelwert gebildet und mit den Werten bei Standardinkubation verglichen. Hier ist deutlich zu sehen, dass der Strom während der Inkubation mit dem sauren Fettsäurepuffer über die Zeit viel stärker abnimmt, als bei Standardinkubation. Die Leitfähigkeit vermindert sich ebenfalls ein wenig bei Perfusion mit dem Fettsäurepuffer.

Pufferlösung	dVt/min	dGt/min	dIt/min	n/N
Standard 7,4	0,067 ± 0,007	0,014 ± 0,003	0,14 ± 0,016	36/36
80 SCFA 6,4	0,27 ± 0,03	- 0,006 ± 0,007	0,62 ± 0,054	7/7

Tab. 19 In dieser Tabelle sind die Differenzwerte der elektrophysiologischen Parameter bei Inkubation mit der Standardlösung und dem 80 mmolaren Fettsäurepuffer dargestellt ( $\pm$  SEM). Der Standardpuffer hatte einen pH-Wert von 7,4 und der Fettsäurepuffer 6,4. Für das Potential und den Strom bedeuten die positiven Differenzwerte, dass diese im Verlauf des Versuches kleiner wurden. Bei der Leitfähigkeit zeigt der positive Differenzwert, dass sie im Versuchsverlauf zunahm.

##### 4.2.3.1 Einsatz von Amilorid (im Rahmen der Vorversuche)

Amilorid blockiert den Natrium-Protonenaustauscher (NHE). Bei diesem Versuchseinsatz wurde der Hemmstoff im Gegensatz zu den nachfolgenden Versuchsandordnungen in den 60 mmolaren SCFA-Puffer gelöst und die Lösung bei einem pH-Wert von 7,4 eingestellt, da die Amiloridgabe im Rahmen der Vorversuche ablief. Das Epithel wurde mit dem 60 SCFA-Puffer bei pH 7,4 (nachfolgend „60 SCFA 7,4“ genannt) umspült und die Mikroelektroden spitze direkt an der mukosalen Epitheloberfläche positioniert (*supraapikal*). Daraufhin wurde der Puffer mit dem zugesetzten Amilorid (nachfolgend als „Amilorid 7,4“ bezeichnet) mukosal eingesetzt und danach wieder auf den Fettsäurepuffer ohne Blocker (nachfolgend „60 SCFA 7,4 p. Amilo“ benannt) gewechselt. So wurden drei Messwerte genommen.

Sowohl das transepitheliale Potential als auch der Strom über dem Epithel fielen im Verlauf des Versuches leicht ab. Dagegen stieg die transepitheliale Leitfähigkeit etwas an. Der Differenzwert des transepithelialen Potentials pro Minute zeigte zu Beginn einen positi-

ven Wert (+0,25), der dann im weiteren Verlauf des Versuchsansatzes kontinuierlich abfiel, so dass der letzte Wert leicht negativ war. Genauso verhielt es sich mit den Differenzwerten des transepithelialen Stromes.

Der *supraapikal* gemessene pH-Wert war nach Blockerzugabe signifikant höher als zuvor. Er nahm dementsprechend einen basischeren Wert an. Nach dem Rückwechsel wurde er wieder etwas saurer, war jedoch noch geringfügig größer als der erste Wert.

### Elektrophysiologische Messungen

	PDt (mV)			2-seitige Signifikanzen	
	Mittelwert	SEM	n/N	Amilorid 7,4	60 SCFA 7,4 p. Amilo
60 SCFA 7,4	-8,28	0,87	7/7	0,057 n = 7	0,074 n = 7
Amilorid 7,4	-7,86	0,74	7/7	-	0,324 n = 7
60 SCFA 7,4 p. Amilo	-7,63	0,68	7/7	-	-
	Gt (mS/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen	
	Mittelwert	SEM	n/N	Amilorid 7,4	60 SCFA 7,4 p. Amilo
60 SCFA 7,4	4,76	0,44	7/7	0,271 n = 7	0,371 n = 7
Amilorid 7,4	4,88	0,43	7/7	-	0,403 n = 7
60 SCFA 7,4 p. Amilo	5,11	0,53	7/7	-	-
	It (µA/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen	
	Mittelwert	SEM	n/N	Amilorid 7,4	60 SCFA 7,4 p. Amilo
60 SCFA 7,4	-38,19	3,49	7/7	0,308 n = 7	0,271 n = 7
Amilorid 7,4	-37,31	3,25	7/7	-	0,709 n = 7
60 SCFA 7,4 p. Amilo	-37,67	3,35	7/7	-	-

Tab. 20 Dargestellt sind die elektrophysiologischen Parameter bei Inkubation zunächst mit 60 mmolaren Fettsäurepuffer (pH 7,4), dem dann der NHE-Blocker Amilorid zugegeben wurde. Der dritte Wert wurde nach dem Rückwechsel auf den Puffer ohne Blocker genommen. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Es waren keine Signifikanzen zu verzeichnen.

## pH-Messungen

	pH-Wert			2-seitige Signifikanzen	
	Mittelwert	SEM	n/N	Amilorid 7,4 supra	60 SCFA 7,4 supra p. Amilo
60 SCFA 7,4 supra	7,09	0,09	7/7	<b>0,045*</b> n = 7	0,172 n = 7
Amilorid 7,4 supra	7,23	0,09	7/7	-	0,095 n = 7
60 SCFA 7,4 supra p. Amilo	7,13	0,07	7/7	-	-

Tab. 21 Dargestellt ist der gemessene pH-Wert bei Inkubation zunächst mit 60 mmolaren Fettsäurepuffer (pH 7,4), dem dann der NHE-Blocker Amilorid zugegeben wurde. Der dritte Wert wurde nach dem Rückwechsel auf den Puffer ohne Blocker genommen. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Beim Vergleich der Inkubation ohne Hemmstoffe mit dem mit Blocker versetzten Puffer kam ein signifikanter Unterschied heraus. Der „oben“ in der mukosalen Kammerhälfte gemessene pH-Wert der Pufferlösung mit dem Amilorid lag bei  $7,41 \pm 0,07$ .

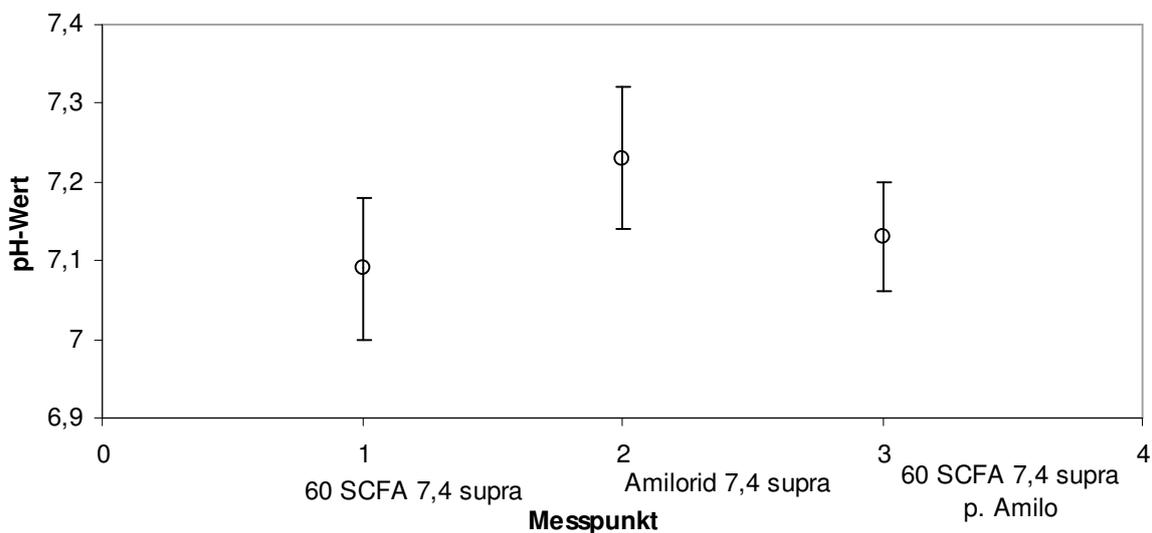


Abbildung 18: Dargestellt ist der *supraapikal* gemessene pH-Wert bei Inkubation mit dem 60 mmolaren Fettsäurepuffer (pH 7,4), dem dann der NHE-Blocker Amilorid zugegeben wurde. Der dritte Wert wurde nach dem Rückwechsel auf den Puffer ohne Blocker genommen. Zuerst wurde das Potential der Elektrode oben in dem Fettsäurepuffer (60 mmol/l, pH-Wert 7,4) auf Null abgeglichen, was einem gemessenen pH-Wert von 7,4 entspricht. Der „oben“ in der mukosalen Kammerhälfte gemessene pH-Wert der Pufferlösung mit dem Amilorid lag bei  $7,41 \pm 0,07$ .

#### 4.2.3.2 Einsatz von S3226

Dieser spezifische Blocker des NHE3 wurde mit dem 80 mmolaren SCFA-Puffer vermischt und mukosal eingesetzt. Alle hier verwendeten Lösungen hatten einen pH-Wert von 6,4. Nach Umspülung des Epithels mit dem 80 SCFA-Puffer (nachfolgend „SCFA 6,4“ bezeichnet) folgte ein Wechsel auf den Puffer mit zugefügtem S3226. Bei der Inkubation mit dem Hemmstoff wurden zwei Messwerte genommen: direkt nach dem Wechsel (abgekürzt „S3226 6,4 p. W.“) und im weiteren Verlauf der Pufferexposition („S3226 6,4 Verlauf“). Daraufhin ist zurück auf den ersten Puffer gewechselt und der vierte Messwert („SCFA 6,4 p. S3226“) genommen worden. Bei der Darstellung der elektrophysiologischen Parameter sind alle Messungen (n=14) in einer Gruppe zusammengefasst worden, d.h. die Mikroelektroden spitze lag entweder *supra-* oder *subapikal*. Bei den pH-Messungen sind die Messwerte in zwei Gruppen (jeweils n=7) unterteilt worden. Bei der ersten Gruppe war die Mikroelektroden spitze direkt an der apikalen Epitheloberfläche (*supraapikal*) positioniert und bei der zweiten Gruppe lag sie in der Epithelzelle (*subapikal*).

Sowohl der transepitheliale Strom als auch die Potentialdifferenz fielen direkt nach dem Wechsel auf die Hemmstofflösung erst nur leicht ab, daraufhin (während weiterer Exposition mit dieser Lösung) zeigte sich jedoch ein drastischer Abfall. Nach dem Rückwechsel auf die erste Lösung war beim Potential nur noch ein leichter Abfall zu verzeichnen und der Strom stieg sogar wieder gering an. Die Werte waren bei beiden Parametern untereinander fast ausschließlich signifikant. Die transepitheliale Leitfähigkeit stieg im Verlaufe des Versuchs an, wobei dieser Anstieg nicht besonders steil war. Die Differenzwerte des Potentials und des Stromes lagen insgesamt im positiven Bereich. Bei der Differenz des Stromes pro Minute war ein deutlicher Anstieg direkt nach dem Wechsel auf den blockerhaltigen Puffer ersichtlich. Dieser Wert fiel während der weiteren Blockerexposition wieder und zeigte eine leichte Erhöhung nach dem Rückwechsel. Bei den Differenzwerten des Potentials waren nur unbedeutende Unterschiede zu sehen.

Bei den *supraapikalen* pH-Messungen während des Einsatzes von S3226 fiel der pH-Wert leicht, sprich er wurde ein wenig saurer. Bei Betrachtung der einzelnen Epithelien zeigte sich nach Blockereinsatz zunächst ein intrazellulärer pH-Abfall, dem ein sigmoidales Verhalten folgte.

## Elektrophysiologische Messungen

	Pdt (mV)			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	S3226 6,4 p. W.	S3226 6,4 Verlauf	SCFA 6,4 p. S3226
SCFA 6,4	-12,41	1,39	14/13	<b>0,013*</b> n = 13	<b>0,000*</b> n = 14	<b>0,000*</b> n = 14
S3226 6,4 p. W.	-11,87	1,48	13/12	-	<b>0,002*</b> n = 13	-
S3226 6,4 Verlauf	-9,37	0,93	14/13	-	-	<b>0,046*</b> n = 14
SCFA 6,4 p. S3226	-9,04	0,86	14/13	-	-	-
	Gt (mS/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	S3226 6,4 p. W.	S3226 6,4 Verlauf	SCFA 6,4 p. S3226
SCFA 6,4	2,67	0,36	14/13	0,550 n = 13	0,563 n = 14	<b>0,026*</b> n = 14
S3226 6,4 p. W.	2,65	0,39	13/12	-	0,114 n = 13	-
S3226 6,4 Verlauf	2,72	0,39	14/13	-	-	0,080 n = 14
SCFA 6,4 p. S3226	2,87	0,41	14/13	-	-	-
	It (µA/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	S3226 6,4 p. W.	S3226 6,4 Verlauf	SCFA 6,4 p. S3226
SCFA 6,4	-29,60	2,95	14/13	<b>0,005*</b> n = 13	<b>0,001*</b> n = 14	<b>0,002*</b> n = 14
S3226 6,4 p. W.	-27,86	2,90	13/12	-	<b>0,017*</b> n = 13	-
S3226 6,4 Verlauf	-22,83	2,19	14/13	-	-	0,767 n = 14
SCFA 6,4 p. S3226	-23,03	2,11	14/13	-	-	-

Tab. 22 Dargestellt sind die elektrophysiologischen Parameter bei Inkubation zunächst mit dem 80 mmolaren Fettsäurepuffer (pH 6,4). Daraufhin folgte der Fettsäurepuffer, dem der NHE3-Blocker S3226 zugegeben wurde (pH 6,4). Ein Wert wurde direkt nach dem Wechsel (p. W.) genommen und ein zweiter im weiteren Verlauf der Hemmstoffexposition. Der vierte Wert wurde nach dem Rückwechsel auf den Puffer ohne Blocker genommen. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. In diesem Fall waren alle Werte signifikant verschieden von einander.

Die Differenzwerte des Potentials pro Minute waren durchweg im positiven Bereich und zeigten nur minimale Unterschiede untereinander, die nicht signifikant waren.

Eine Umkehrung in den negativen Bereich direkt nach Blockergabe zeigten die Differenzwerte der Leitfähigkeit pro Minute (von +0,005 auf -0,03). Daraufhin (Verlaufsmessung) wurde er wieder positiv (+0,06) und war signifikant verschieden von dem Wert direkt nach dem Wechsel auf den mit Blocker versetzten Fettsäurepuffer ( $p = 0,045$ ). Der letzte Wert hatte wieder ein negatives Vorzeichen (-0,01).

Auch im positiven Bereich waren die Differenzwerte des Stromes pro Minute. Hier konnte ein deutlicher Anstieg direkt nach dem Wechsel auf den blockerhaltigen Puffer gesehen werden (von +0,69 auf +1,15). Dieser Wert fiel während der weiteren Blockerexposition wieder und zwar unter den ersten Wert (+0,23). Diese Differenzwerte bei Inkubation mit dem Hemmstoff waren untereinander signifikant verschieden ( $p = 0,04$ ). Nach dem Rückwechsel war der Differenzwert des Stromes wieder größer (+0,44), aber er erreichte nicht den Ausgangswert.

## pH-Messungen

### Supraapikal

	pH-Wert			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	S3226 supra p. W..	S3226 supra Verlauf	SCFA supra p. 3226
SCFA supra 6,4	6,50	0,05	7/7	0,428 N = 7	0,232 n = 7	0,373 n = 7
S3226 supra p. W.	6,46	0,05	7/7	-	0,501 n = 7	-
S3226 supra Verlauf	6,45	0,06	7/7	-	-	0,992 n = 7
SCFA supra p. S3226	6,45	0,06	7/7	-	-	-

Tab. 23 Dargestellt ist der *supraapikal* gemessene pH-Wert bei Inkubation zunächst mit dem 80 mmolaren Fettsäurepuffer (pH 6,4). Daraufhin folgte der Fettsäurepuffer, dem der NHE3-Blocker S3226 zugegeben wurde (pH 6,4). Ein Wert wurde direkt nach dem Wechsel (p. W.) genommen und ein zweiter im weiteren Verlauf der Hemmstoffexposition. Der vierte Wert wurde nach dem Rückwechsel auf den Puffer ohne Blocker genommen. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Es waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.

Bei der *supraapikalen* pH-Messung zeigten die Differenzwerte bei der Inkubation mit dem Fettsäurepuffer ohne Blockerzusatz einen negativen Wert (-0,02 und -0,01) und während der Perfusion mit dem mit Blocker versetzten Puffer einen positiven Wert (0,01 und 0,02). Diese Werte waren jedoch nicht signifikant von einander verschieden. Ein negativer Wert bedeutet, dass der pH-Wert pro Zeiteinheit fällt, ein positiver entspricht dem Gegenteil.

Subapikal

	pH-Wert			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	S3226 sub p. W..	S3226 sub Verlauf	SCFA sub p. 3226
SCFA 6,4 sub	7,04	0,10	7/7	0,296 n = 6	0,387 n = 7	0,400 n = 7
S3226 sub p. W.	7,11	0,12	6/6	-	0,643 n = 6	-
S3226 sub Verlauf	7,11	0,10	7/7	-	-	0,620 n = 7
SCFA sub p. S3226	7,09	0,11	7/7	-	-	-

Tab. 24 Dargestellt ist der *subapikal* gemessene pH-Wert bei Inkubation zunächst mit dem 80 mmolaren Fettsäurepuffer (pH 6,4). Daraufhin folgte der Fettsäurepuffer, dem der NHE3-Blocker S3226 zugegeben wurde (pH 6,4). Ein Wert wurde direkt nach dem Wechsel (p. W.) genommen und ein zweiter im weiteren Verlauf der Hemmstoffexposition. Der vierte Wert wurde nach dem Rückwechsel auf den Puffer ohne Blocker genommen worden. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Es waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. Der pH-Wert stieg jedoch während der Blockerexposition leicht an.

Die Differenzwerte des pH-Wertes verhielten sich bei der *subapikalen* Messung anders als bei der *supraapikalen*. Der erste Wert war positiv (+0,05) und wurde direkt nach der Blockergabe negativ (-0,02). Im weiteren Verlauf konnte wieder ein positiver Wert berechnet werden (+0,004), der nach dem Rückwechsel von einem Wert mit negativen Vorzeichen abgelöst wurde (-0,004). Es waren keine Signifikanzen zu verzeichnen.

#### 4.2.3.3 Einsatz von DIDS

DIDS hemmt den Chlorid-Antiport, der am Blättermagen höchstwahrscheinlich von einem Chlorid-Bikarbonat-Austauscher dargestellt wird. Auch dieser Hemmstoff wurde in den 80 mmolaren kurzkettigen Fettsäurepuffer gelöst und bei einem pH-Wert von 6,4 eingestellt. Zuerst wurde mit dem 80 SCFA-Puffer (abgekürzt als „SCFA 6,4“) perfundiert; daraufhin folgte der mit Hemmstoff versetzte Puffer. Eine Messung erfolgte direkt nach dem Wechsel („DIDS 6,4 p. W.“) und eine weitere im Verlauf der Inkubation mit diesem Puffer („DIDS 6,4 Verlauf“). Nach dem Rückwechsel auf die Lösung ohne Blocker wurde ein vierter Messpunkt genommen („SCFA. 6,4 p. DIDS“). Auch hier war die Gruppenaufteilung bei der Darstellung der Daten unterschiedlich. Im ersten Abschnitt sind die Werte der elektrophysiologischen Parameter dargestellt und alle Messungen sind zu einer Gruppe zusammengefasst worden, unabhängig von der Position der Mikroelektroden spitze. Im zweiten Abschnitt (pH-Messungen) ist zwischen der *supra-* und *subapikalen* Messung unterschieden worden.

Sowohl der transepitheliale Strom als auch das Potential fielen kontinuierlich im Laufe des Versuchs ab. Den bei dem Einsatz von S3226 gesehenen großen Sprung zwischen der Messung direkt nach Blockergabe und der Verlaufsmessung war hier nicht vorhanden. Die Werte nach Hemmstoffgabe waren bei beiden Parametern signifikant verschieden von denen ohne Blocker. Die Veränderungen bei der Leitfähigkeit waren nur geringfügig. Sehr deutlich und signifikant konnte ein Unterschied des apikalen Potentials nach einer kurzen Einwirkzeit des Blockers gesehen werden. Es nahm einen negativeren Wert an.

Bei den Differenzwerten für den Strom und für das Potential war ein kontinuierlicher Abfall zu sehen (beim Strom etwas stärker ausgeprägt), was wiederum ein Ansteigen dieser absoluten Werte pro Zeiteinheit gleich kommt. Der Verlaufswert (während der Blockerexposition) des Stroms in dieser Kategorie war signifikant verschieden von dem Ausgangswert. Die Differenzwerte der Leitfähigkeit verhielten sich entgegengesetzt.

Der pH-Wert zeigte sowohl bei *supra-* als auch bei *subapikaler* Messung nach der Blockergabe einen minimal saureren Wert.

## Elektrophysiologische Messungen

	PDt (mV)			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	DIDS 6,4 p. W.	DIDS 6,4 Verlauf	SCFA 6,4 p. DIDS
SCFA 6,4	-10,84	1,31	16/13	<b>0,011*</b> n = 16	<b>0,002*</b> n = 16	<b>0,001*</b> n = 16
DIDS 6,4 p. W.	-10,34	1,23	16/13	-	0,057 n = 16	-
DIDS 6,4 Verlauf	-9,81	1,15	16/13	-	-	0,067 n = 16
SCFA 6,4 p. DIDS	-8,90	1,08	16/13	-	-	-
	Gt (mS/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	DIDS 6,4 p. W.	DIDS 6,4 Verlauf	SCFA 6,4 p. DIDS
SCFA 6,4	2,31	0,19	16/13	0,336 n = 16	0,941 n = 16	0,795 n = 16
DIDS 6,4 p. W.	2,26	0,19	16/13	-	0,199 n = 16	-
DIDS 6,4 Verlauf	2,30	0,18	16/13	-	-	0,739 n = 16
SCFA 6,4 p. DIDS	2,23	0,20	16/13	-	-	-
	It (µA/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	DIDS 6,4 p. W.	DIDS 6,4 Verlauf	SCFA 6,4 p. DIDS
SCFA 6,4	-22,53	1,57	16/13	0,459 n = 16	<b>0,001*</b> n = 16	<b>0,000*</b> n = 16
DIDS 6,4 p. W.	-22,05	1,45	16/13	-	<b>0,001*</b> n = 16	-
DIDS 6,4 Verlauf	-20,28	1,24	16/13	-	-	<b>0,032*</b> n = 16
SCFA 6,4 p. DIDS	-18,72	1,33	16/13	-	-	-

Tab. 25 Dargestellt sind die elektrophysiologischen Parameter bei Inkubation zunächst mit dem 80 mmolaren Fettsäurepuffer (pH 6,4). Daraufhin folgte der Fettsäurepuffer dem der Blocker DIDS zugegeben wurde. Ein Wert wurde direkt nach dem Wechsel (p. W.) genommen und ein zweiter im weiteren Verlauf der Hemmstoffexposition. Der vierte Wert wurde nach dem Rückwechsel auf den Puffer ohne Blocker genommen. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Verglichen mit dem ersten Puffer waren die anderen Werte signifikant verschieden (exklusive der Leitfähigkeit).

Bei der intrazellulären Position der Mikroelektrode wurde über die Referenzelektrode das apikale Potential bestimmt. Nachfolgend sind die Werte in einer Tabelle und in einer Graphik zu sehen.

	Apikales Potential (mV)			2-seitige Signifikanzen
	Mittelwert	SEM	n	80 SCFA 6,4 sub
80 SCFA 6,4 sub	-23,17	-8,76	7	-
DIDS sub 6,4 p.W.	-27,11	-10,24	7	0,126 n = 7
DIDS sub 6,4 Verlauf	-40,44	-15,28	7	<b>0,014*</b> n = 7
80 SCFA 6,4 sub p. Blocker	-27,12	-11,07	6	0,075 n = 6

Tab. 26 Das über die Referenzelektrode abgefallene Potential bei subapikaler (intrazellulärer) Messung ist in dieser Tabelle dargestellt. Zunächst wurde ein Wert bei Inkubation mit dem 80 mmolarem Fettsäurepuffer (pH 6,4) genommen. Der zweite und dritte Wert wurde bei mukosalem Einsatz des Blockers DIDS genommen. Zum Schluss wurde wieder mit dem ersten Puffer inkubiert. Der Wert im weiteren Verlauf der Inkubation mit dem Blocker war signifikant verschieden von dem bei Inkubation mit dem Fettsäurepuffer ohne Blockerzusatz. Das Potential wurde deutlich negativer.

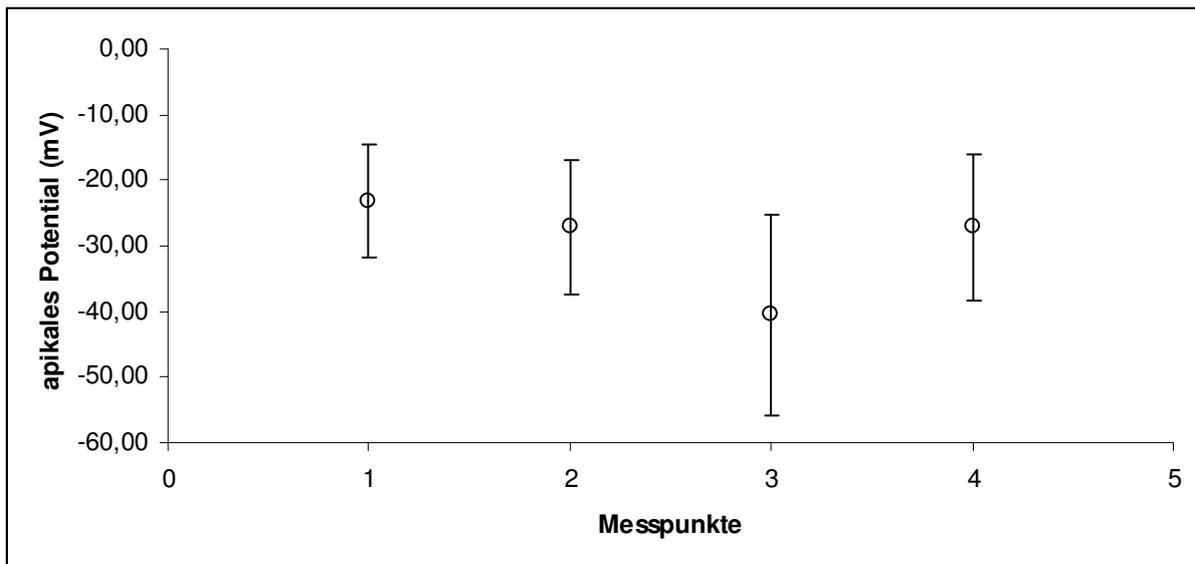


Abbildung 19: In dieser Abbildung ist das über die Referenzelektrode abgefallene Potential bei intrazellulärer Position der Mikroelektroden spitze zu sehen. Am Messpunkt 1 wurde mit dem 80 mmolarem Fettsäurepuffer (pH 6,4) inkubiert, bei den Messpunkten 2 und 3 mit dem Fettsäurepuffer, dem zuvor der Blocker DIDS zugesetzt wurde (pH 6,4) und zwar direkt nach dem Wechsel (2) und im weiteren Verlauf (3). Zum Schluss wurde wieder der erste Puffer (Fettsäurepuffer – Messpunkt 4) eingesetzt.

Die Differenzwerte des transepithelialen Potentials fielen kontinuierlich im Verlauf des Versuchs ab (von +0,28 auf +0,004), wobei der Unterschied zwischen dem letzten und dem vorletzten Wert nur noch minimal war. Sie hatten durchweg ein positives Vorzeichen. Signifikante Unterschiede waren nicht zu verzeichnen.

Keinen Unterschied gab es zwischen dem ersten und dem zweiten Wert bei den Differenzen der Leitfähigkeit (beide -0,008) und zwischen dem dritten und vierten Wert (beide +0,02). Auch waren keine Signifikanzen vorhanden.

Ein kontinuierlicher Abfall der Werte war ebenfalls bei den Differenzwerten des Stromes pro Minute zu sehen (von +0,64 auf -0,10). Auch hier war der Abfall zwischen den ersten drei Werten viel deutlicher. Nur die letzten beiden Werte befanden sich im negativen Bereich. Signifikante Unterschiede konnten zwischen dem Ausgangswert und dem Verlaufswert bei Blockergabe ( $p = 0,019$ ) und zwischen dem Ausgangs- und Endwert ( $p = 0,021$ ) berechnet werden.

## pH-Messungen

### Supraapikal

	pH-Wert			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	DIDS supra p. W.	DIDS supra Verlauf	SCFA supra p. DIDS
SCFA 6,4 supraapikal	6,54	0,05	8/8	0,564 n = 8	0,367 n = 8	0,527 n = 8
DIDS supra p. W.	6,52	0,04	8/8	-	0,773 n = 8	-
DIDS supra Verlauf	6,51	0,03	8/8	-	-	0,626 n = 8
SCFA supra p. DIDS	6,52	0,04	8/8	-	-	-

Tab. 27 Dargestellt ist *supraapikal* gemessen pH-Wert bei Inkubation zunächst mit dem 80 mmolaren Fettsäurepuffer (pH 6,4). Daraufhin folgte der Fettsäurepuffer dem der Blocker DIDS zugegeben wurde. Ein Wert wurde direkt nach dem Wechsel (p. W.) genommen und ein zweiter im weiteren Verlauf der Hemmstoffexposition. Der vierte Wert ist nach dem Rückwechsel auf den Puffer ohne Blocker genommen worden. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Es kamen keine signifikanten Unterschiede heraus.

Bei der *supraapikalen* pH-Messung zeigten die Differenzwerte bei der Inkubation mit dem Fettsäurepuffer ohne Blockerzusatz einen negativen Wert (jeweils -0,01) und während der Perfusion mit dem mit Blocker versetzten Puffer einen positiven Wert (0,00 und 0,02). Ein signifikanter Unterschied war zwischen den Werten bei der Verlaufsmessung (Blockereinsatz) und dem bei erneuter Perfusion mit dem ersten Puffer ( $p = 0,010^*$ ).

Subapikal

	pH-Wert			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	DIDS sub p. W.	DIDS sub Verlauf	SCFA sub pa. DIDS
SCFA 6,4 subapikal	7,13	0,06	8/8	0,411 n = 8	0,533 n = 8	0,488 n = 8
DIDS sub p. W.	7,09	0,09	8/8	-	0,797 n = 8	-
DIDS sub Verlauf	7,10	0,08	8/8	-	-	0,984 n = 8
SCFA sub p. DIDS	7,10	0,07	8/8	-	-	-

Tab. 28 Dargestellt ist der *subapikal* gemessene pH-Wert bei Inkubation zunächst mit dem 80 mmolaren Fettsäurepuffer (pH 6,4). Daraufhin folgte der Fettsäurepuffer dem der Blocker DIDS zugegeben wurde. Ein Wert wurde direkt nach dem Wechsel (p. W.) genommen und ein zweiter im weiteren Verlauf der Hemmstoffexposition. Der vierte Wert wurde nach dem Rückwechsel auf den Puffer ohne Blocker genommen. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Signifikante Unterschiede waren nicht zu verzeichnen. Jedoch war ein leichter pH-Abfall nach Hemmstoffgabe zu erkennen.

Auch die Differenzwerte des pH-Wertes bei der *subapikalen* Messung verhielten sich wie bei der Exposition mit dem Blocker S3226. Der erste Wert war positiv (+0,003) und wurde direkt nach der Blockergabe negativ (-0,009). Im weiteren Verlauf der Hemmstoffexposition konnte wieder ein positiver Wert berechnet werden (+0,01), der nach dem Rückwechsel von einem Wert mit negativen Vorzeichen abgelöst wurde (-0,09). Es waren keine Signifikanzen zu verzeichnen.

#### 4.2.3.4 Kombiniertes Einsatz von DIDS und S3226

Bei diesem Versuchsansatz wurden die Hemmstoffe S3226 und DIDS gemeinsam eingesetzt. So wurden der NHE und der Chlorid-Bikarbonat-Austauscher gleichzeitig blockiert. Wie bei den vorausgegangenen Ansätzen wurde auch hier zuerst mit dem 80 SCFA-Puffer bei einem pH-Wert von 6,4 („SCFA 6,4“) inkubiert. Darauf folgte ein Wechsel auf den 80 mmolaren Fettsäurepuffer, in dem zuvor beide Hemmstoffe gelöst wurden. Beide Lösungen hatten wie bei allen Hemmstoffversuchen einen pH-Wert von 6,4. Die entsprechenden Messpunkte wurden wie folgt abgekürzt: direkt nach dem Wechsel als „DIDS+S3 6,4 p. W.“ und bei weiterer Inkubation mit dem Hemmstoffpuffer als „DIDS+S3 6,4 Verlauf“. Auch hier erfolgte eine vierte Messung nach dem Rückwechsel auf die hemmstofffreie Lösung („SCFA 6,4 p. DIDS+S3“). Bei der Darstellung der elektrophysiologischen Parameter wurden alle Messungen zu einer Gruppe zusammengefasst, unabhängig von der Position der Mikroelektroden spitze. Eine Unterteilung der Messwerte in *supra*- und *subapikalen* wurde wiederum bei den Daten der pH-Messungen vorgenommen.

Der transepitheliale Strom und die Potentialdifferenz fielen kontinuierlich ab. Dieser Abfall war jedoch verglichen mit den vorherigen Versuchsansätzen dezenter und der größte Abfall war direkt nach der Blockergabe zu verzeichnen. Die Werte bei Blockergabe waren signifikant verschieden von denen bei reiner Fettsäureinkubation. Auch die beiden Werte während der Hemmstoffexposition waren beim Potential untereinander signifikant verschieden. Wie bereits zuvor waren die Änderungen der Leitfähigkeit lediglich geringfügig. Ein kleiner Abfall nach Blockergabe wurde von einem Anstieg im weiteren Verlauf abgelöst. Sowohl die Differenzwerte des Potentials als auch des Stromes wurden im Verlauf des Versuches geringer. Verglichen mit den alleinigen Blockereinsätzen waren die Unterschiede jedoch geringer.

Der intrazellulär gemessene pH-Wert stieg nach Gabe der beiden Blocker an und fiel nach dem Rückwechsel wieder ab. Die Zelle wurde demnach während der Blockerexposition leicht alkalischer als zuvor.

## Elektrophysiologische Messungen

	PDt (mV)			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	DIDS + S3 6,4 p. W.	DIDS + S3 6,4 Verlauf	SCFA 6,4 p. DIDS+S3
SCFA 6,4	-9,40	1,21	15/12	<b>0,021*</b> n = 15	<b>0,004*</b> n = 15	<b>0,004*</b> n = 15
DIDS + S3 6,4 p. W.	-8,50	1,04	15/12	-	<b>0,005*</b> n = 15	-
DIDS + S3 6,4 Verlauf	-8,02	0,94	15/12	-	-	0,179 n = 15
SCFA 6,4 p. DIDS + S3	-7,36	0,91	15/12	-	-	-
	Gt (mS/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	DIDS + S3 6,4 p. W.	DIDS + S3 6,4 Verlauf	SCFA 6,4 p. DIDS+S3
SCFA 6,4	2,62	0,27	15/12	0,429 n = 15	0,276 n = 15	0,583 n = 15
DIDS + S3 6,4 p. W.	2,59	0,25	15/12	-	0,126 n = 15	-
DIDS + S3 6,4 Verlauf	2,67	0,26	15/12	-	-	0,564 n = 15
SCFA 6,4 p. DIDS + S3	2,64	0,26	15/12	-	-	-
	It (µA/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	DIDS + S3 6,4 p. W.	DIDS + S3 6,4 Verlauf	SCFA 6,4 p. DIDS+S3
SCFA 6,4	-22,43	2,50	15/12	<b>0,003*</b> n = 15	<b>0,002*</b> n = 15	<b>0,000*</b> n = 15
DIDS + S3 6,4 p. W.	-20,38	2,44	15/12	-	0,381 n = 15	-
DIDS + S3 6,4 Verlauf	-19,81	2,23	15/12	-	-	0,057 n = 15
SCFA 6,4 p. DIDS + S3	-18,73	2,06	15/12	-	-	-

Tab. 29 Dargestellt sind die elektrophysiologischen Parameter zunächst bei Inkubation mit dem 80 mmolaren Fettsäurepuffer (pH 6,4). Daraufhin folgte der Fettsäurepuffer dem die Blocker DIDS und S3226 zugegeben wurden. Ein Wert wurde direkt nach dem Wechsel (p. W.) genommen und ein zweiter im weiteren Verlauf der Hemmstoffexposition. Der vierte Wert wurde nach dem Rückwechsel auf den Puffer ohne Blocker genommen. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Verglichen mit dem ersten Puffer waren die anderen Werte signifikant verschieden. Auch beim Vergleich der beiden Hemmstofflösungen untereinander kam ein signifikanter Unterschied heraus, jeweils exklusive der Leitfähigkeit.

Die Differenzwerte des transepithelialen Potentials fielen, wie bereits bei alleinigem Einsatz der Blocker, kontinuierlich im Verlauf des Versuchs ab (von +0,33 auf -0,01), wobei im Gegensatz zu den vorherigen der Unterschied zwischen dem letzten und dem vorletzten Wert am größten war. Signifikante Unterschiede waren nicht zu verzeichnen.

Wie zuvor beim alleinigen Einsatz von DIDS war zwischen dem ersten und dem zweiten Differenzwert der Leitfähigkeit kein Unterschied vorhanden (beide +0,02). Beide waren jedoch im positiven Bereich, d. h. die Leitfähigkeit stieg an. Wiederum entgegengesetzt zur alleinigen DIDS-Gabe waren die beiden letzten Differenzwerte negativ (-0,01 und -0,002).

Die Veränderungen der Differenzwerte des Stromes pro Minute waren vergleichsweise gering. Der erste und zweite Wert war sogar identisch (+0,47). Auch hier war der Abfall zwischen den letzten beiden Werten am größten (von +0,43 auf +0,11). Alle Werte waren wie bei alleinigem Einsatz von S3226 im positiven Bereich und zeigten wie beim alleinigen Einsatz von DIDS einen kontinuierlichen Abfall. Signifikante Unterschiede konnten lediglich zwischen dem Ausgangs- und Endwert ( $p = 0,048^*$ ) berechnet werden.

Das apikale Potential veränderte sich von  $-23 \pm 10$  mV (80 SCFA 6.4) nach  $-37 \pm 16$  mV (DIDS + S3, Verlauf) mit Rückkehr auf  $-24 \pm 10$  mV (80 SCFA 6.4) nach dem Auswaschen des Blockers. Die Veränderungen waren statistisch nicht signifikant, bestätigen aber die zuvor gemachten Beobachtungen.

## pH-Messungen

### Supraapikal

	pH-Wert			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	DIDS + S3 supra p. W.	DIDS + S3 supra Verlauf	SCFA supra p. DIDS + S3
SCFA 6,4 supraapikal	6,48	0,06	7/7	0,687 n = 7	0,454 n = 7	0,258 n = 7
DIDS + S3 supra p. W.	6,49	0,05	7/7	-	0,486 n = 7	-
DIDS + S3 supra Verlauf	6,51	0,04	7/7	-	-	0,646 n = 7
SCFA supra p. DIDS + S3	6,52	0,06	7/7	-	-	-

Tab. 30 Dargestellt ist der *supraapikal* gemessene pH-Wert bei Inkubation zunächst mit dem 80 mmolaren Fettsäurepuffer (pH 6,4). Daraufhin folgte der Fettsäurepuffer dem die Blocker DIDS und S3226 zugegeben wurden. Der vierte Wert wurde nach dem Rückwechsel auf den Puffer ohne Blocker genommen. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Signifikante Unterschiede waren nicht vorhanden. Ein dezenter kontinuierlicher Anstieg des pH-Wertes war ersichtlich.

Die Differenzwerte des *supraapikal* gemessenen pH-Wertes verhielten sich anders als die bei alleinigem Einsatz der einzelnen Blocker. So waren die ersten beiden Werte positiv (+0,01 und +0,02) und die beiden letzten negativ (-0,02 und -0,01). Zwischen den einzelnen Werten war kein signifikanter Unterschied vorhanden.

Subapikal

	pH-Wert			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	DIDS + S3 sub p. W.	DIDS + S3 sub Verlauf	SCFA sub p. DIDS + S3
SCFA 6,4 subapikal	6,99	0,08	7/7	0,505 n = 8	0,164 n = 8	0,248 n = 8
DIDS + S3 sub p. W.	7,01	0,09	7/7	-	0,204 n = 8	-
DIDS + S3 sub Verlauf	7,11	0,09	7/7	-	-	0,555 n = 8
SCFA sub p. DIDS + S3	7,03	0,09	7/7	-	-	-

Tab. 31 Dargestellt ist der *subapikal* gemessene pH-Wert bei Inkubation zunächst mit dem 80 mmolaren Fettsäurepuffer (pH 6,4). Daraufhin folgte der Fettsäurepuffer dem die Blocker DIDS und S3226 zugegeben wurden. Der vierte Wert ist nach dem Rückwechsel auf den Puffer ohne Blocker genommen worden. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Signifikante Unterschiede waren nicht vorhanden. Bei Blockerexposition stieg der pH-Wert an.

Auch die Differenzwerte des pH-Wertes bei der *subapikalen* Messung verhielten sich anders als die bei den vorherigen Versuchen. Die Werte wurden bis auf dem letzten (-0,006) stetig kleiner (von +0,05 auf -0,03). Der Differenzwert während der Inkubation mit der Ausgangslösung war signifikant verschieden von dem Verlaufswert während der Blockerexposition ( $p = 0,010^*$ ).

#### 4.2.3.5 Einsatz von Ethox(y)zolid

Dieser hoch lipophile Hemmstoff blockiert das Enzym Carboanhydrase, welches die folgende Reaktion katalysiert:  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ . Der Blocker ist sehr potent und soll eine Blockierung der intrazellulären Carboanhydrase hervorrufen.

Zunächst wurde dieser Blocker allein und zwar bei intrazellulärer Position der Mikroelektrodenpitze eingesetzt. Die Messreihe begann mit Inkubation durch den 80 SCFA-Puffer („SCFA 6,4 subapikal“). Es folgte der Einsatz des zuvor im Fettsäurepuffer gelösten Hemmstoffes mit zwei Messpunkten: direkt nach dem Wechsel („Ethoxy sub p. W.“) und bei weiterer Hemmstoffexposition („Ethoxy sub Verlauf“). Auch hier wurde nach dem Blocker wieder der erste Puffer eingesetzt („SCFA sub p. Ethoxy“). Alle Lösungen hatten einen pH-Wert von 6,4.

Im Gesamtverlauf fielen sowohl die Werte für das Potential als auch für den Strom kontinuierlich ab. Bei der Signifikanzverpaarung der Werte des transepithelialen Stromes bei Fettsäureinkubation mit derjenigen nach Blockerzugabe (Verlaufswert) kam ein signifikanter Unterschied heraus. Der Mittelwert des Stromes zeigte einen rapiden Abfall direkt nach der Zugabe von Ethoxyzolid, wobei die Werte für das Potential nur leicht fielen. Solch einen starken Abfall gleich zu Beginn der Blockerexposition war ebenfalls bei der gleichzeitigen Gabe von DIDS und S3226 zu sehen. Die transepitheliale Leitfähigkeit fiel nach der Hemmstoffzugabe zunächst leicht ab und stieg im weiteren Versuchsablauf kontinuierlich an. Der Mittelwert der Differenz des Potentials pro Minute stieg direkt nach der Blockergabe an und fiel im weiteren Verlauf wieder ab. Entgegengesetzt verhielt sich der Mittelwert der Differenz des Stromes pro Minute, der erst abfiel und im weiteren Verlauf der Hemmstoffexposition wieder anstieg. Der letzte Wert war bei beiden der geringste und als einziger mit einem negativen Vorzeichen versehen. Die Differenzwerte der Leitfähigkeit zeigten nur geringfügige Veränderungen.

Der gemessene pH-Wert in der Zelle wies keine starken Veränderungen auf.

## Elektrophysiologische Messungen

	PDt (mV)			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	Ethoxy sub p. W.	Ethoxy sub Verlauf	SCFA sub p. Ethoxy
SCFA 6,4 subapikal	-11,80	1,53	4/4	0,201 n = 4	0,299 n = 4	0,219 n = 4
Ethoxy sub p. W.	-11,23	1,37	4/4	-	0,396 n = 4	-
Ethoxy sub Verlauf	-10,76	1,20	4/4	-	-	0,160 n = 4
SCFA sub p. Ethoxy	-10,15	0,97	4/4	-	-	-
	Gt (mS/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	Ethoxy sub p. W.	Ethoxy sub Verlauf	SCFA sub p. Ethoxy
SCFA 6,4 subapikal	3,43	0,23	4/4	0,355 n = 4	0,740 n = 4	0,546 n = 4
Ethoxy sub p. W.	3,27	0,21	4/4	-	0,334 n = 4	-
Ethoxy sub Verlauf	3,36	0,29	4/4	-	-	0,360 n = 4
SCFA sub p. Ethoxy	3,58	0,45	4/4	-	-	-
	It (µA/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	Ethoxy sub p. W.	Ethoxy sub Verlauf	SCFA sub p. Ethoxy
SCFA 6,4 subapikal	-40,00	5,08	4/4	0,053 n = 4	<b>0,035*</b> n = 4	0,138 n = 4
Ethoxy sub p. W.	-36,73	5,46	4/4	-	0,409 n = 4	-
Ethoxy sub Verlauf	-35,83	4,58	4/4	-	-	0,0878 n = 4
SCFA sub p. Ethoxy	-35,44	3,60	4/4	-	-	-

Tab. 32 Dargestellt sind die elektrophysiologischen Parameter bei Inkubation zunächst mit dem 80 mmolaren Fettsäurepuffer (pH 6,4). Daraufhin folgte der Fettsäurepuffer dem der Enzyblocker Ethoxazolamid zugegeben wurde (pH 6,4). Ein Wert wurde direkt nach dem Wechsel (p. W.) genommen und ein zweiter im weiteren Verlauf der Hemmstoffexposition. Der vierte Wert wurde nach dem Rückwechsel auf den Puffer ohne Blocker genommen. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Es war lediglich beim transepithelialen Strom ein signifikanter Unterschied zwischen der Inkubation mit Ethoxy und ohne zu verzeichnen.

Der Differenzwert des Potentials pro Minute war direkt nach der Blockergabe größer (von +0,13 auf +0,25), wurde aber im weiteren Verlauf wieder etwas kleiner (+0,20) und zeigte beim Rückwechsel einen noch geringeren Wert (-0,07). Dieses Verhalten war ebenfalls bei alleiniger Gabe von S3226 zu sehen. Untereinander waren die Werte nicht signifikant verschieden.

Die Differenzwerte der Leitfähigkeit bewegten sich alle - bis auf eine Ausnahme - annähernd bei Null. Nur der Wert direkt nach der Blockergabe war mit +0,04 deutlich größer, aber nicht signifikant.

Die Differenzwerte des Stromes pro Minute zeigten ein wellenförmiges Verhalten. Nach der Blockergabe wurde der Wert zunächst kleiner (von +0,43 auf +0,36). Er verdoppelte sich jedoch annähernd im weiteren Verlauf der Blockerexposition (+0,67). Nach dem Rückwechsel war ein deutlich geringerer Wert zu sehen (-0,17). Aber auch hier waren keine signifikanten Unterschiede vorhanden.

Das apikale Potential lag bei diesen Messungen bei  $-50 \pm 20$  mV und betrug am Ende noch  $-46 \pm 19$  mV. Leichte Schwankungen um diese Werte waren nicht signifikant.

## pH-Messungen

	pH-Wert			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	Ethoxy sub p. W.	Ethoxy sub Verlauf	SCFA sub p. Ethoxy
SCFA 6,4 subapikal	6,98	0,04	4/4	0,882 n = 4	0,901 n = 4	0,804 n = 4
Ethoxy sub p. W.	7,00	0,05	4/4	-	0,984 n = 4	-
Ethoxy sub Verlauf	6,99	0,06	4/4	-	-	0,342 n = 4
SCFA sub p. Ethoxy	7,03	0,06	4/4	-	-	-

Tab. 33 Dargestellt ist der *subapikal* gemessene pH-Wert bei Inkubation zunächst mit dem 80 mmolaren Fettsäurepuffer (pH 6,4). Daraufhin folgte der Fettsäurepuffer dem der Enzyblocker Ethoxzolamid zugegeben wurde (pH 6,4). Ein Wert wurde direkt nach dem Wechsel (p. W.) genommen und ein zweiter im weiteren Verlauf der Hemmstoffexposition. Der vierte Wert wurde nach dem Rückwechsel auf den Puffer ohne Blocker genommen. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Es waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen.

Die ersten drei Differenzwerte des *subapikal* gemessenen pH-Wertes hatten einen Wert nahe Null (-0,002, -0,005, +0,003). Nach dem Rückwechsel auf den blockerfreien Fettsäurepuffer nahm er einen negativen Wert an (-0,02). Keiner der Werte war untereinander signifikant verschieden.

#### 4.2.3.6 Kombiniertes Einsatz von Ethoxzolamid und S3226

In diesem Versuchsansatz wurden der Blocker der Carboanhydrase und der des NHE3 gleichzeitig eingesetzt. Wie zuvor wurde zunächst mit dem 80 SCFA-Puffer („SCFA 6,4“) bei einem pH-Wert von 6,4 inkubiert. Darauf folgte ein Wechsel auf den 80 mmolaren Fettsäurepuffer, in dem zuvor beide Hemmstoffe gelöst wurden (pH-Wert von 6,4). Es wurden während die Blockerexposition ebenfalls zwei Messwerte genommen: direkt nach dem Wechsel („Ethoxy + S3 6,4 p. W.“) und bei weiteren Inkubation („Ethoxy+S3 6,4 Verlauf“). Nach dem Rückwechsel auf die hemmstofffreie Lösung („SCFA 6,4 p. Ethoxy+S3“) erfolgte der vierte Messwert. Bei der Darstellung der elektrophysiologischen Parameter wurden alle Messungen zu einer Gruppe zusammengefasst, unabhängig von der Position der Mikroelektroden spitze. Eine Unterteilung der Gruppe in *supra*- und *subapikalen* Messungen ist wiederum bei den Daten der pH-Messungen vorgenommen worden.

Auch beim kombinierten Einsatz fand nur ein vergleichsweise geringer Abfall statt. Und der Strom zeigte entgegen der vorherigen Versuchsansätze nach Blockerzugabe ebenfalls nur einen sehr kleinen Abfall, der sich im weiteren Verlauf sogar in einen leichten Anstieg verwandelte. Die Leitfähigkeit stieg kontinuierlich an. Die Mittelwerte der Differenz des Potentials pro Minute wurden bei kombinierter Blockergabe sowohl direkt nach der Zugabe und als auch im weiteren Verlauf (entgegen der alleinigen Gabe von Ethoxzolamid) größer. Ebenso verhielten sich die Differenzwerte des Stromes. Der der Leitfähigkeit war direkt nach der Blockergabe etwas größer, wurde aber daraufhin wieder kleiner.

Der gemessene *supraapikale* pH-Wert fiel im Laufe des Versuchs minimal ab. Bei der pH-Messung in der Zelle konnte nach Blockergabe ein kontinuierlicher Anstieg verzeichnet werden.

## Elektrophysiologische Messungen

	PDt (mV)			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	Ethoxy + S3 6,4 p. W.	Ethoxy + S3 6,4 Verlauf	SCFA 6,4 p. Ethoxy + S3
SCFA 6,4	-9,03	1,10	15/10	0,515 n = 15	0,238 n = 15	0,730 n = 15
Ethoxy + S3 6,4 p. W.	-8,93	1,16	15/10	-	0,478 n = 15	-
Ethoxy + S3 6,4 Verlauf	-8,71	1,01	15/10	-	-	0,756 n = 15
SCFA 6,4 p. Ethoxy+S3	-8,83	0,94	15/10	-	-	-
	Gt (mS/ cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	Ethoxy + S3 6,4 p. W.	Ethoxy + S3 6,4 Verlauf	SCFA 6,4 p. Ethoxy + S3
SCFA 6,4	3,12	0,40	15/10	0,731 n = 15	0,434 n = 15	0,528 n = 15
Ethoxy + S3 6,4 p. W.	3,14	0,41	15/10	-	0,614 n = 15	-
Ethoxy + S3 6,4 Verlauf	3,21	0,37	15/10	-	-	0,990 n = 15
SCFA 6,4 p. Ethoxy+S3	3,21	0,39	15/10	-	-	-
	It (µA/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	Ethoxy + S3 6,4 p. W.	Ethoxy + S3 6,4 Verlauf	SCFA 6,4 p. Ethoxy + S3
SCFA 6,4	-24,71	2,39	15/10	0,315 n = 15	0,882 n = 15	0,696 n = 15
Ethoxy + S3 6,4 p. W.	-24,25	2,29	15/10	-	0,600 n = 15	-
Ethoxy + S3 6,4 Verlauf	-24,89	2,51	15/10	-	-	0,750 n = 15
SCFA 6,4 p. Ethoxy+S3	-25,39	2,71	15/10	-	-	-

Tab. 34 Dargestellt die elektrophysiologischen Parameter bei Inkubation zunächst mit dem 80 mmolaren Fettsäurepuffer (pH 6,4). Daraufhin folgte der Fettsäurepuffer dem die Blocker Ethoxylolamid und S3226 zugegeben wurden (pH 6,4). Ein Wert wurde direkt nach dem Wechsel (p. W.) genommen und ein zweiter im weiteren Verlauf der Hemmstoffexposition. Der vierte Wert wurde nach dem Rückwechsel auf den Puffer ohne Blocker genommen. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Es waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. Der transepitheliale Strom fiel entgegen der anderen Versuche fast gar nicht ab.

Der ursprünglich negative Differenzwert des Potentials (-0,07) wurde während der Inkubation mit dem Blocker größer (+0,10 und +0,33) und nach dem Rückwechsel wieder minimal kleiner (+0,28). Der zweite Wert nach der Blockergabe war signifikant verschieden von dem Ausgangswert ( $p = 0,024$ ). Ebenso war der Vergleich vom Ausgangs- und Endwert signifikant unterschiedlich.

Der Differenzwert der Leitfähigkeit zeigte ebenfalls direkt nach der Blockerzugabe einen größeren Wert (von -0,01 auf +0,02), wobei dieser bei der weiteren Blockerexposition wieder etwas kleiner wurde (+0,01) und nach dem Rückwechsel einen negativen Wert annahm (-0,02). Diese Werte waren nicht signifikant verschieden.

Einen kontinuierlichen Anstieg der Differenzwerte des Stromes war ersichtlich. Er wurde von -0,04 über -0,002 und +0,52 auf +0,55 vergrößert. Auch in diesem Fall waren keine Signifikanzen vorhanden.

Das apikale Potential lag anfangs bei  $-20 \pm 8$  mV und fiel nach Gabe beider Blocker leicht, aber nicht signifikant auf  $-27 \pm 11$  mV ab. Die Veränderung war nach dem Auswaschen teilweise reversibel ( $-24 \pm 9$  mV).

## pH-Messungen

### Supraapikal

	pH-Wert			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	Ethoxy + S3 supra p. W.	Ethoxy + S3 supra Verlauf	SCFA supra p. Ethoxy + S3
SCFA 6,4 supraapikal	6,61	0,04	7/7	0,750 n = 7	0,367 n = 7	0,624 n = 7
Ethoxy + S3 supra p. W.	6,60	0,05	7/7	-	0,095 n = 7	-
Ethoxy + S3 supra Verlauf	6,58	0,06	7/7	-	-	0,582 n = 7
SCFA supra p. Ethoxy+S3	6,59	0,07	7/7	-	-	-

Tab. 35 Dargestellt ist der *supraapikal* gemessene pH-Wert bei Inkubation zunächst mit dem 80 mmolaren Fettsäurepuffer (pH 6,4). Daraufhin folgte der Fettsäurepuffer dem die Blocker Ethoxyzolamid und S3226 zugegeben wurden (pH 6,4). Der vierte Wert wurde nach dem Rückwechsel auf den Puffer ohne Blocker genommen. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Es waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen.

Die Differenzwerte für den *supraapikal* gemessenen pH-Wert waren nicht weit von Null entfernt. Die ersten beiden Werte hatten ein negatives Vorzeichen, das bei den letzten beiden von einem positiven abgelöst wurde.

Subapikal

	pH-Wert			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	Ethoxy + S3 sub p. W.	Ethoxy + S3 sub Verlauf	SCFA sub p. Ethoxy + S3
SCFA 6,4 subapikal	7,07	0,04	8/8	0,421 n = 8	0,171 n = 8	0,164 n = 8
Ethoxy + S3 sub p. W.	7,09	0,03	8/8	-	0,087 n = 8	-
Ethoxy + S3 sub Verlauf	7,12	0,02	8/8	-	-	0,291 n = 8
SCFA sub p. Ethoxy + S3	7,13	0,02	8/8	-	-	-

Tab. 36 Dargestellt ist der *subapikal* gemessene pH-Wert bei Inkubation zunächst mit dem 80 mmolaren Fettsäurepuffer (pH 6,4). Daraufhin folgte der Fettsäurepuffer dem die Blocker Ethoxyzolamid und S3226 zugegeben wurden (pH 6,4). Der vierte Wert wurde nach dem Rückwechsel auf den Puffer ohne Blocker genommen. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Es waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. Der pH-Wert stieg nach Blockerzugabe kontinuierlich an.

Im Vergleich zur *supraapikalen* Messung waren die Differenzwerte des *subapikal* gemessenen pH-Wertes größer. Die ersten beiden Werte waren identisch (+0,02). Im weiteren Verlauf der Blockerinkubation folgte ein etwas kleinerer Wert (+0,008), der nach dem Rückwechsel noch kleiner wurde (-0,02). Untereinander waren die Werte nicht signifikant verschieden.

#### 4.2.3.7 Einsatz von Concanamycin

Dieser Blocker hemmt die membrangebundene  $vH^+$ -ATPase. Der Hemmstoff wurde in dem 80 mmolaren Fettsäurepuffer gelöst (pH-Wert 6,4) und ebenfalls auf der mukosalen Seite eingesetzt. Alle Messungen fanden bei einer intrazellulären Position der Mikroelektrodenpitze (*subapikal*) statt. Zunächst wurde auch in diesem Versuchsansatz das Epithel mit dem 80 SCFA-Puffer auf der mukosalen Seite und dem Standardpuffer auf der serosalen Seite perfundiert („SCFA 6,4 subapikal“). Darauf folgte der mukosale Wechsel auf den mit dem Hemmstoff versetzten Fettsäurepuffer („Conca 6,4 sub p. W.“ direkt nach dem Wechsel bzw. „Conca 6,4 sub Verlauf“ bei weiterer Hemmstoffinkubation). Nach dem Rückwechsel zur ersten Konstellation folgte der vierte Messwert („SCFA 6,4 sub p. Conca“). Da in diesem Versuchsansatz nur intrazelluläre Messungen vorgenommen wurden, ist die Gruppeneinteilung bei den elektrophysiologischen Parametern und den pH-Messungen gleich geblieben.

Beim transepithelialen Potential ergab der Vergleich der Fettsäureinkubation mit der Blockerinkubation direkt nach dem Wechsel einen signifikanten Unterschied. Interessanterweise verhielten sich die Mittelwerte sowohl des Potentials als auch des Stromes anders als bei allen vorherigen Versuchsansätzen. Sie fielen direkt nach der Blockergabe zunächst ein wenig ab, um im weiteren Verlauf wieder gering anzusteigen und nach dem Rückwechsel wieder abzufallen. Die transepitheliale Leitfähigkeit stieg stetig an. Die Mittelwerte der Differenz des Potentials pro Minute fielen direkt nach Blockergabe, stiegen im weiteren Verlauf wieder an und fielen nach dem Rückwechsel wieder auf den Ausgangswert, der im positiven Bereich lag. Ebenso verhielt es sich bei den Differenzwerten für den Strom, wobei der Endwert etwas höher war als der Ausgangswert, aber auch dieser befand sich im positiven Bereich. Die Mittelwerte der Differenzen der Leitfähigkeit waren allesamt im negativen Bereich und wurden im Versuchsablauf größer.

Der gemessene *subapikale* pH-Wert blieb direkt nach der Blockergabe annähernd gleich und stieg im weiteren Verlauf etwas an. Bei den Differenzwerten für den pH-Wert wich der Endwert stark von den übrigen Werten ab (negativer Wert).

## Elektrophysiologische Messungen

	PDt (mV)			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	Conca 6,4 sub p. W.	Conca 6,4 sub Verlauf	SCFA 6,4 sub p. Conca
SCFA 6,4 subapikal	-9,00	1,39	5/5	<b>0,044*</b> n = 5	0,246 n = 5	0,838 N = 5
Conca 6,4 sub p. W.	-8,40	1,53	5/5	-	0,747 n = 5	-
Conca 6,4 sub Verlauf	-9,11	1,10	5/5	-	-	0,729 N = 5
SCFA 6,4 sub p. Conca	-8,80	0,63	5/5	-	-	-
	Gt (mS/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	Conca 6,4 sub p. W.	Conca 6,4 sub Verlauf	SCFA 6,4 sub p. Conca
SCFA 6,4 subapikal	2,72	0,70	5/5	0,934 n = 5	0,859 n = 5	0,784 N = 5
Conca 6,4 sub p. W.	2,73	0,61	5/5	-	0,818 n = 5	-
Conca 6,4 sub Verlauf	2,77	0,54	5/5	-	-	0,640 N = 5
SCFA 6,4 sub p. Conca	2,83	0,50	5/5	-	-	-
	It (µA/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	Conca 6,4 sub p. W.	Conca 6,4 sub Verlauf	SCFA 6,4 sub p. Conca
SCFA 6,4 subapikal	-25,92	8,40	5/5	0,157 n = 5	0,501 n = 5	0,826 N = 5
Conca 6,4 sub p. W.	-24,36	7,83	5/5	-	0,862 n = 5	-
Conca 6,4 sub Verlauf	-25,98	6,13	5/5	-	-	0,805 N = 5
SCFA 6,4 sub p. Conca	-24,33	4,58	5/5	-	-	-

Tab. 37 Dargestellt sind die elektrophysiologischen Parameter bei Inkubation zunächst mit dem 80 mmolaren Fettsäurepuffer (pH 6,4). Daraufhin folgte der Fettsäurepuffer dem der Blocker Concanamycin zugegeben wurden (pH 6,4). Ein Wert wurde direkt nach dem Wechsel (p. W.) genommen und ein zweiter im weiteren Verlauf der Hemmstoffexposition. Der vierte Wert wurde nach dem Rückwechsel auf den Puffer ohne Blocker genommen. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Der Unterschied zwischen der Inkubation ohne Blocker und derjenigen direkt nach dem Zusatz von Concanamycin war beim Potential signifikant. Die Mittelwerte zeigen einen leicht wellenförmigen Verlauf. Auch hier ist zu sehen, dass der Strom entgegen fast aller übrigen Versuchsansätze keinen Abfall aufweist.

Der ursprünglich positive Differenzwert des Potentials (+0,23) wandelte sich direkt nach der Blockergabe in einen negativen Wert (-0,23) um. Daraufhin wurde dieser Wert wieder stark positiv (+0,31) und übertraf so den Ausgangswert. Die beiden Werte während der Inkubation mit dem Blocker waren signifikant verschieden voneinander ( $p = 0,044^*$ ). Der Wert nach dem Rückwechsel war identisch mit dem Ausgangswert.

Der Differenzwert der Leitfähigkeit zeigte ebenfalls direkt nach der Blockerzugabe einen negativeren Wert (von -0,03 auf -0,05), wobei dieser bei der weiteren Blockerexposition wieder minimal kleiner wurde (-0,04), um nach dem Rückwechsel wieder größer zu werden (-0,06). Diese Werte waren nicht signifikant verschieden.

Ein wellenförmiger Verlauf war bei den Differenzwerten des Stromes ersichtlich. Der zweite Wert war signifikant kleiner als der erste (von +0,72 auf -0,09,  $p = 0,017^*$ ). Daraufhin stieg er aber wieder an auf +1,08 und übertraf wie bereits bei den Differenzwerten des Potentials den Ausgangswert. Die beiden Werte während der Blockerexposition waren untereinander signifikant verschieden ( $p = 0,036^*$ ). Der letzte Wert war wieder ein wenig kleiner (+0,98).

### pH-Messungen

	pH-Wert			2-seitige Signifikanzen		
	Mittelwert	SEM	n/N	Conca 6,4 sub p. W.	Conca 6,4 sub Verlauf	SCFA 6,4 sub p. Conca
SCFA 6,4 subapikal	6,97	0,11	5/5	0,824 n = 5	0,956 n = 5	0,466 n = 5
Conca 6,4 sub p. W.	6,96	0,10	5/5	-	0,602 n = 5	-
Conca 6,4 sub Verlauf	6,98	0,11	5/5	-	-	0,654 n = 5
SCFA 6,4 sub p. Conca	7,00	0,11	5/5	-	-	-

Tab. 38 Dargestellt ist der *subapikal* gemessene pH-Wert bei Inkubation zunächst mit dem 80 mmolaren Fettsäurepuffer (pH 6,4). Daraufhin folgte der Fettsäurepuffer dem der Blocker Concana-mycin zugegeben wurden (pH 6,4). Ein Wert wurde direkt nach dem Wechsel (p. W.) genommen und ein zweiter im weiteren Verlauf der Hemmstoffexposition. Der vierte Wert wurde nach dem Rückwechsel auf den Puffer ohne Blocker genommen. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Es waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. Nach Blockerzugabe fiel der Mittelwert minimal ab und stieg im weiteren Verlauf an.

Bei den Differenzwerten des *subapikal* gemessenen pH-Wertes waren die ersten beiden Werte identisch und annähernd Null (+0,001). Im weiteren Verlauf der Blockerinkubation folgte ein negativer Wert (-0,01), der nach dem Rückwechsel noch negativer wurde (-0,04). Untereinander waren die Werte nicht signifikant verschieden.

#### 4.2.4 Messungen bei serosaler Chloridreduzierung

In dieser Versuchsanordnung wurde auf der serosalen Seite die Chloridkonzentration auf 41 mmol/l reduziert (41 Cl-Puffer). Im Vergleich dazu hatte der Standardpuffer eine Chloridkonzentration von 99 mmol/l und der mukosal verwendete 80 SCFA-Puffer ebenfalls eine Chloridkonzentration von 41 mmol/l. Die Versuchsreihe begann mit einer mukosalen Fettsäureinkubation (80 mmol/l) und serosaler Standardpufferinkubation. Daraufhin wurde serosal auf den Chloridreduzierten Puffer gewechselt. Es herrschte also kein chemischer Gradient für Chlorid. Es folgte der mukosale Zusatz des Blockers S3226 im 80 SCFA-Puffer bei weiterer serosaler Perfusion mit dem 41 Cl-Puffer. Mukosal wurde auf den Fettsäurepuffer ohne Zusatz zurückgewechselt und danach auch serosal wieder mit dem Standardpuffer inkubiert. Hier kurz in der Übersicht:

- ◇ SCFA m + Std. s = 80 mmol/l Fettsäuren mukosal und Standardlösung serosal
- ◇ SCFA m + 41 Cl s p.W. = 80 SCFA mukosal und 41 Cl serosal direkt nach dem Wechsel
- ◇ SCFA m + 41 Cl s Verlauf = 80 SCFA mukosal und 41 Cl serosal bei weiterer Inkubation
- ◇ S3226 m + 41 Cl s p.W. = mukosalen der mit dem Blocker S3226 versehene 80 SCFA-Puffer und serosal weiter mit dem 41 Cl Puffer direkt nach dem Wechsel
- ◇ S3226 m + 41 Cl s Verlauf = S3226 mukosal und 41 Cl serosal im weiteren Verlauf
- ◇ SCFA m + 41 Cl s = Rückwechsel auf 80 SCFA mukosal und serosal weiter mit 41 Cl
- ◇ SCFA m + Std. s p.W. = weiterhin 80 SCFA mukosal und serosal Standardlösung direkt nach dem Wechsel
- ◇ SCFA m + Std. s Verlauf = 80 SCFA mukosal und Standardlösung serosal im weiteren Verlauf

Alle mukosal eingesetzten Lösungen hatten einen pH-Wert von 6,4. Dahingegen hatten die Lösungen auf der serosalen Seite – wie bei allen Versuchen – einen pH-Wert von 7,4. Die Spitze der Mikroelektrode befand sich während der gesamten Versuchsreihe in der Zelle (*subapikal*). Nach jedem Wechsel eines Puffers wurde erst ein Wert direkt nach dem Wechsel (p. W.) genommen und ein weiterer während der Inkubation mit dieser Pufferanordnung (Verlauf).

Verglichen mit der Ausgangskonstellation waren die Werte bei serosaler Chloridreduzierung beim Strom und beim Potential fast durchweg signifikant verschieden. Sowohl der transepitheliale Strom als auch das Potential verminderten sich sehr stark bei serosaler Chloridreduzierung. Dies war aber reversibel. Auch die Leitfähigkeit verminderte sich reversibel während des serosalem Einsatzes des 41 Cl-Puffers.

Auf den *subapikal* gemessenen pH-Wert schien die Chloridreduzierung keinen Einfluss zu nehmen, jedoch fiel er nach mukosaler Zugabe von S3226 signifikant ab. Der intrazelluläre pH-Wert wurde demnach saurer. Auch dieser Vorgang war reversibel.

## Elektrophysiologische Messungen

	PDt (mV)			2-seitige Signifikanzen					
	Mittelwert	SEM	n/N	SCFA m + 41Cl s p.W.	SCFA m + 41Cl s Verl.	S3226 m + 41Cl s p.W.	S3226 m + 41Cl s Verl.	SCFA m + 41Cl s	SCFA m + 140Cl s
SCFA m + 140 Cl s	-7,49	1,20	4/4	0,071 n = 4	<b>0,030*</b> N = 4	-	-	-	-
SCFA m + 41 Cl s p. W.	-6,41	1,23	4/4	-	<b>0,024*</b> N = 4	-	-	-	-
SCFA m + 41 Cl s Verlauf	-5,26	1,16	4/4	-	-	<b>0,001*</b> n = 4	<b>0,003*</b> n = 4	<b>0,001*</b> n = 4	-
S3226 m + 41 Cl s p. W.	-4,37	1,17	4/4	-	-	-	-	-	-
S3226 m + 41 Cl s Verlauf	-3,10	1,21	4/4	-	-	-	-	<b>0,034*</b> n = 4	-
SCFA m + 41 Cl s	-2,47	1,17	4/4	-	-	-	-	-	-
SCFA m + 140 Cl s p. W.	-2,81	1,23	4/4	-	-	-	-	0,605 n = 4	-
SCFA m + 140 Cl s Verlauf	-4,56	0,87	4/4	-	-	-	-	-	<b>0,031*</b> n = 4
	Gt (mS/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen					
	Mittelwert	SEM	n/N	SCFA m + 41Cl s p.W.	SCFA m + 41Cl s Verl.	S3226 m + 41Cl s p.W.	S3226 m + 41Cl s Verl.	SCFA m + 41Cl s	SCFA m + 140Cl s
SCFA m + 140 Cl s	4,37	0,72	4/4	0,579 n = 4	0,942 N = 4	-	-	-	-
SCFA m + 41 Cl s p. W.	4,41	0,74	4/4	-	0,719 N = 4	-	-	-	-
SCFA m + 41 Cl s Verlauf	4,38	0,74	4/4	-	-	0,091 n = 4	0,110 n = 4	0,360 n = 4	-
S3226 m + 41 Cl s p. W.	4,10	0,71	4/4	-	-	-	-	-	-
S3226 m + 41 Cl s Verlauf	4,07	0,68	4/4	-	-	-	-	0,883 n = 4	-
SCFA m + 41 Cl s	4,11	0,70	4/4	-	-	-	-	-	-
SCFA m + 140 Cl s p. W.	4,19	0,90	4/4	-	-	-	-	0,773 n = 4	-
SCFA m + 140 Cl s Verlauf	4,26	0,70	4/4	-	-	-	-	-	0,784 n = 4
	It (µA/cm <sup>2</sup> )			2-seitige Signifikanzen					
	Mittelwert	SEM	n/N	SCFA m + 41Cl s p. W.	SCFA m + 41Cl s Verl.	S3226 m + 41Cl s p.W.	S3226 m + 41Cl s Verl.	SCFA m + 41Cl s	SCFA m + 140Cl s
SCFA m + 140 Cl s	-30,51	3,55	4/4	0,126 n = 4	0,091 N = 4	-	-	-	-
SCFA m + 41 Cl s p. W.	-25,67	1,50	4/4	-	0,074 N = 4	-	-	-	-
SCFA m + 41 Cl s Verlauf	-20,47	0,97	4/4	-	-	<b>0,005*</b> n = 4	<b>0,019*</b> n = 4	<b>0,014*</b> n = 4	-
S3226 m + 41 Cl s p. W.	-15,51	0,91	4/4	-	-	-	-	-	-
S3226 m + 41 Cl s Verlauf	-10,13	1,61	4/4	-	-	-	-	<b>0,024*</b> n = 4	-
SCFA m + 41 Cl s	-7,83	1,70	4/4	-	-	-	-	-	-
SCFA m + 140 Cl s p. W.	-10,07	3,92	4/4	-	-	-	-	0,595 n = 4	-
SCFA m + 140 Cl s Verlauf	-18,24	3,03	4/4	-	-	-	-	-	<b>0,010*</b> n = 4

Tab. 39 Die Tabelle zeigt die elektrophysiologischen Parameter bei Inkubation mit unterschiedlichen Pufferlösungen, wobei die mukosal eingesetzten Lösungen immer einen pH-Wert von 6,4 hatten und die serosalen 7,4: SCFA m + 140 Cl s = 80 mmol/l Fettsäurepuffer auf der mukosalen Seite und Standardlösung (140 mmol/l Cl) auf der serosalen Seite, SCFA m + 41 Cl s p. W. = mukosal 80 SCFA-Puffer und serosal der 41 mmol/l Cl beinhaltender Puffer direkt nach dem Wechsel, SCFA m + 41 Cl s Verlauf = 80 SCFA mukosal und 41 Cl serosal bei weiteren Inkubation, S3226 m + 41 Cl s p. W. = auf der mukosalen Seite der mit dem Blocker S3226 versehene 80 SCFA-Puffer und serosal weiter mit dem 41 Cl Puffer direkt nach dem Wechsel, S3226 m + 41 Cl s Verlauf = 80 SCFA versetzt mit S3226 mukosal und 41 Cl serosal im weiteren Verlauf, SCFA m + 41 Cl s = Rückwechsel auf 80 SCFA mukosal und serosal weiter mit 41 Cl, SCFA m + 140 Cl s p. W. = weiter mit 80 SCFA mukosal und serosal Wechsel auf die Standardlösung direkt nach dem Wechsel, SCFA m + 140 Cl s Verlauf = 80 SCFA

mukosal und Standardlösung serosal im weiteren Verlauf. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Im Vergleich der serosalen Inkubation mit Standardlösung und 41 Cl im Verlauf kamen beim Potential und beim Strom signifikante Unterschiede heraus. Auch der Unterschied bei dieser Konstellation zwischen der Verlaufsmessung und der Messung direkt nach dem Wechsel waren signifikant. Der mukosale Einsatz von S3226 zeigte im Vergleich mit reiner Fettsäurepufferinkubation ebenfalls signifikante Unterschiede. Signifikant waren ferner die Unterschiede beim Rückwechsel auf das erste Pufferarrangement direkt nach dem Wechsel mit dem weiteren Verlauf. Die Mittelwerte zeigten bei serosaler 41 Cl Exposition einen kontinuierlichen und deutlichen Abfall, der sich nach dem serosalen Rückwechsel auf die Standardlösung zu einem Anstieg umkehrte. Bei der Leitfähigkeit war nur eine geringe Veränderung messbar, die nicht signifikant war.

Ergebnisse

	dVt/min			2-seitige Signifikanzen					
	Mittelwert	SEM	n/N	SCFA m + 41Cl s p.W.	SCFA m + 41Cl s Verl.	S3226 m + 41Cl s p.W.	S3226 m + 41Cl s Verl.	SCFA m + 41Cl s	SCFA m + 140Cl s
SCFA m + 140 Cl s	-0,04	0,14	4/4	<b>0,041*</b> n = 4	<b>0,008*</b> n = 4	-	-	-	-
SCFA m + 41 Cl s p. W.	0,50	0,13	4/4	-	0,509 n = 4	-	-	-	-
SCFA m + 41 Cl s Verlauf	0,39	0,38	4/4	-	-	0,530 n = 4	0,070 n = 4	0,134 n = 4	-
S3226 m + 41 Cl s p. W.	0,30	0,07	4/4	-	-	-	-	-	-
S3226 m + 41 Cl s Verlauf	0,19	0,01	4/4	-	-	-	-	0,332 n = 4	-
SCFA m + 41 Cl s	0,26	0,06	4/4	-	-	-	-	-	-
SCFA m + 140 Cl s p. W.	-1,00	0,33	4/4	-	-	-	-	<b>0,035*</b> n = 4	-
SCFA m + 140 Cl s Verlauf	0,20	0,10	4/4	-	-	-	-	-	0,519 n = 4
	dGt/min			2-seitige Signifikanzen					
	Mittelwert	SEM	n/N	SCFA m + 41Cl s p.W.	SCFA m + 41Cl s Verl.	S3226 m + 41Cl s p.W.	S3226 m + 41Cl s Verl.	SCFA m + 41Cl s	SCFA m + 140Cl s
SCFA m + 140 Cl s	-0,10	0,07	4/4	0,669 n = 4	0,355 n = 4	-	-	-	-
SCFA m + 41 Cl s p. W.	-0,04	0,08	4/4	-	0,616 n = 4	-	-	-	-
SCFA m + 41 Cl s Verlauf	0,00	0,03	4/4	-	-	0,954 n = 4	0,297 n = 4	<b>0,007*</b> n = 4	-
S3226 m + 41 Cl s p. W.	0,00	0,06	4/4	-	-	-	-	-	-
S3226 m + 41 Cl s Verlauf	-0,11	0,08	4/4	-	-	-	-	0,146 n = 4	-
SCFA m + 41 Cl s	0,07	0,03	4/4	-	-	-	-	-	-
SCFA m + 140 Cl s p. W.	0,00	0,16	4/4	-	-	-	-	0,727 n = 4	-
SCFA m + 140 Cl s Verlauf	0,02	0,03	4/4	-	-	-	-	-	0,221 n = 4
	dlt/min			2-seitige Signifikanzen					
	Mittelwert	SEM	n/N	SCFA m + 41Cl s p.W.	SCFA m + 41Cl s Verl.	S3226 m + 41Cl s p. W.	S3226 m + 41Cl s Verl.	SCFA m + 41Cl s	SCFA m + 140Cl s
SCFA m + 140 Cl s	0,22	0,36	4/4	0,075 n = 4	<b>0,049*</b> n = 4	-	-	-	-
SCFA m + 41 Cl s p. W.	2,42	1,05	4/4	-	0,462 n = 4	-	-	-	-
SCFA m + 41 Cl s Verlauf	1,56	0,19	4/4	-	-	0,592 n = 4	0,116 n = 4	0,067 n = 4	-
S3226 m + 41 Cl s p. W.	1,39	0,37	4/4	-	-	-	-	-	-
S3226 m + 41 Cl s Verlauf	0,94	0,15	4/4	-	-	-	-	0,205 n = 4	-
SCFA m + 41 Cl s	0,81	0,18	4/4	-	-	-	-	-	-
SCFA m + 140 Cl s p. W.	-5,50	1,40	4/4	-	-	-	-	<b>0,043*</b> n = 4	-
SCFA m + 140 Cl s Verlauf	0,64	0,44	4/4	-	-	-	-	-	0,663 n = 4

Tab. 40 Die Tabelle zeigt die Differenzwerte der elektrophysiologischen Parameter bei Inkubation mit unterschiedlichen Pufferlösungen, wobei die mukosal eingesetzten Lösungen immer einen pH-Wert von 6,4 hatten und die serosalen 7,4: SCFA m + 140 Cl s = 80 mmol/l Fettsäurepuffer auf der mukosalen Seite und Standardlösung (140 mmol/l Cl) auf der serosalen Seite, SCFA m + 41 Cl s p. W. = mukosal 80 SCFA-Puffer und serosal der 41 mmol/l Cl beinhaltender Puffer direkt nach dem Wechsel, SCFA m + 41 Cl s Verlauf = 80 SCFA mukosal und 41 Cl serosal bei weiteren Inkubation, S3226 m + 41 Cl s p. W. = auf der mukosalen Seite der mit dem Blocker S3226 versehene 80 SCFA-Puffer und serosal weiter mit dem 41 Cl Puffer direkt nach dem Wechsel, S3226 m + 41 Cl s Verlauf = 80 SCFA versetzt mit S3226 mukosal und 41 Cl serosal im weiteren Verlauf, SCFA m + 41 Cl s = Rückwechsel auf 80 SCFA mukosal und serosal weiter mit 41 Cl, SCFA m + 140 Cl s p. W. = weiter mit 80 SCFA mukosal und serosal Wechsel auf die Standardlösung direkt nach dem Wechsel, SCFA m + 140 Cl s Verlauf = 80 SCFA mukosal und Standardlösung serosal im weiteren Verlauf. Die rechte

Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Im Vergleich der serosalen Inkubation mit 140 Cl und 41 Cl direkt nach dem Wechsel und im Verlauf kamen signifikante Unterschiede heraus (außer bei der Leitfähigkeit). Signifikant war ebenfalls der Unterschied beim Rückwechsel auf das erste Pufferarrangement direkt nach dem Wechsel (exklusive Leitfähigkeit). Die Mittelwerte stiegen zunächst an, um daraufhin abzufallen, insbesondere beim Rückwechsel.

Auch bei dieser Messung kam es zu signifikanten Veränderungen des apikalen Potentials. Nachfolgend sind die Werte in einer Tabelle zu sehen.

	Apikales Potential (mV)			2-seitige Signifikanzen
	Mittelwert	SEM	n	SCFA m 141 Cl s
SCFA m 141 Cl s	-46,89	23,45	4	-
SCFA m 41 Cl s	23,49	11,75	4	0,055 n=4
S 3226 m 41 Cl s	48,83	24,42	4	<b>0,031*</b> n=4
SCFA m 41 Cl s p.W.	54,07	27,04	4	<b>0,014*</b> n=4

Tab. 41 Das über die Referenzelektrode abgefallene Potential bei subapikaler (intrazellulärer) Messung ist in dieser Tabelle dargestellt. Messpunkt 1 = 80 mmol/l Fettsäurepuffer auf der mukosalen Seite und Standardlösung (140 mmol/l Chlorid) auf der serosalen Seite, Messpunkt 2 = 80 SCFA mukosal und 41 Cl (41 mmol/l Chlorid) serosal (Verlaufsmessung), Messpunkt 3 = auf der mukosalen Seite der mit dem Blocker S3226 versehene 80 SCFA-Puffer und serosal weiter mit dem 41 Cl Puffer (Verlaufsmessung) und Messpunkt 4 = mukosal wieder der 80 SCFA Puffer ohne Blocker und serosal der 140 mmol/l Cl enthaltende Standardpuffer (nach dem Wechsel). Trotz einer insgesamt hohen Schwankungsbreite der absoluten Werte kommt es nach serosalem Chloridentzug zu einer signifikanten Depolarisation der apikalen Membran.

## pH-Messungen

## Supapikal

	pH-Wert			2-seitige Signifikanzen					
	Mittelwert	SEM	n/N	SCFA m + 41 Cl s p. W.	SCFA m + 41 Cl s Verlauf	S3226 m + 41 Cl s p. W.	S3226 m + 41 Cl s Verlauf	SCFA m + 41 Cl s	SCFA m + 140 Cl s p.W.
SCFA m + 140 Cl s	7,23	0,11	4/4	0,579 n = 4	0,945 n = 4	-	-	-	-
SCFA m + 41 Cl s p. W.	7,24	0,12	4/4	-	0,671 n = 4	-	-	-	-
SCFA m + 41 Cl s Verlauf	7,23	0,11	4/4	-	-	0,423 n = 4	<b>0,031*</b> n = 4	0,233 n = 4	-
S3226 m + 41 Cl s p. W.	7,25	0,12	4/4	-	-	-	-	-	-
S3226 m + 41 Cl s Verlauf	7,16	0,11	4/4	-	-	-	-	0,279 n = 4	-
SCFA m + 41 Cl s	7,17	0,15	4/4	-	-	-	-	-	-
SCFA m + 140 Cl s p. W.	7,19	0,15	4/4	-	-	-	-	0,397 n = 4	-
SCFA m + 140 Cl s Ver- lauf	7,21	0,13	4/4	-	-	-	-	-	0,092 n = 4

Tab. 42 Die Tabelle zeigt den *subapikal* (intrazellulär) gemessenen pH-Wert bei Inkubation mit unterschiedlichen Pufferlösungen, wobei die mukosal eingesetzten Lösungen immer einen pH-Wert von 6,4 hatten und die serosalen 7,4: SCFA m + 140 Cl s = 80 mmol/l Fettsäurepuffer auf der mukosalen Seite und Standardlösung (140 mmol/l Cl) auf der serosalen Seite, SCFA m + 41 Cl s p. W. = mukosal 80 SCFA-Puffer und serosal der 41 mmol/l Cl beinhaltender Puffer direkt nach dem Wechsel, SCFA m + 41 Cl s Verlauf = 80 SCFA mukosal und 41 Cl serosal bei weiteren Inkubation, S3226 m + 41 Cl s p. W. = auf der mukosalen Seite der mit dem Blocker S3226 versehene 80 SCFA-Puffer und serosal weiter mit dem 41 Cl Puffer direkt nach dem Wechsel, S3226 m + 41 Cl s Verlauf = 80 SCFA versetzt mit S3226 mukosal und 41 Cl serosal im weiteren Verlauf, SCFA m + 41 Cl s = Rückwechsel auf 80 SCFA mukosal und serosal weiter mit 41 Cl, SCFA m + 140 Cl s p. W. = weiter mit 80 SCFA mukosal und serosal Wechsel auf die Standardlösung direkt nach dem Wechsel, SCFA m + 140 Cl s Verlauf = 80 SCFA mukosal und Standardlösung serosal im weiteren Verlauf. Die rechte Hälfte stellt die Werte der jeweiligen Signifikanzverpaarungen da. Ein signifikanter Unterschied ergab sich im Vergleich mit der Inkubation mit kurzkettigen Fettsäuren und serosal 41 Cl und der mukosalen Blockerzugabe. Der Mittelwert war nach Hemmstoffzugabe im Verlauf deutlich geringer und stieg nach dem Rückwechsel wieder an.

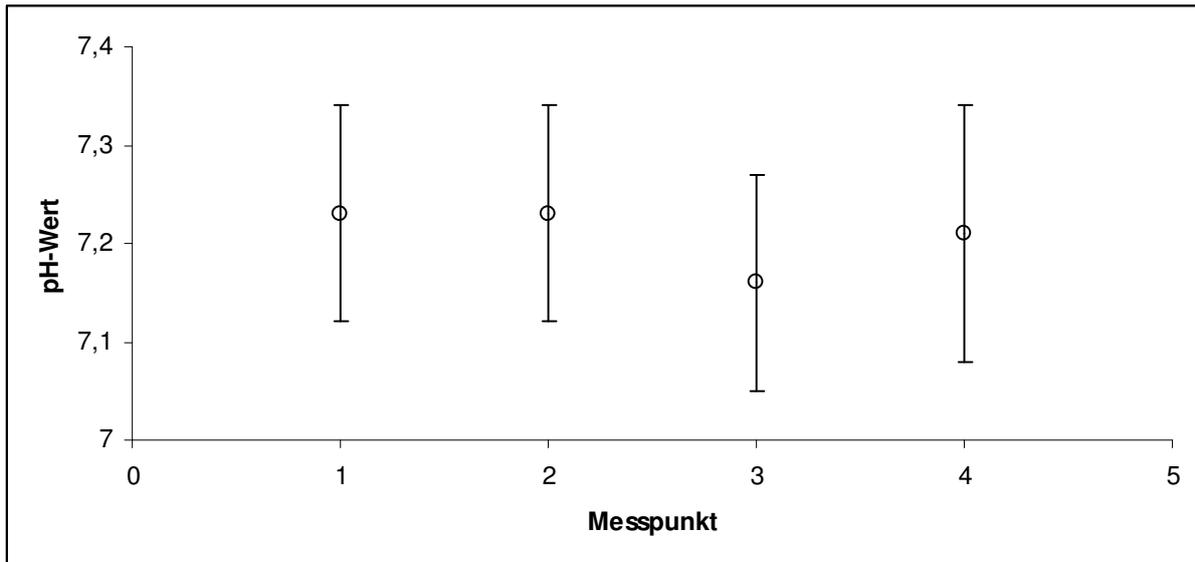


Abbildung 20: Die Graphik zeigt den *subapikal* gemessenen pH-Wert bei wechselnder Inkubation: Messpunkt 1 = 80 mmol/l Fettsäurepuffer auf der mukosalen Seite und Standardlösung (140 mmol/l Chlorid) auf der serosalen Seite, Messpunkt 2 = 80 SCFA mukosal und 41 Cl (41 mmol/l Chlorid) serosal (Verlaufsmessung), Messpunkt 3 = auf der mukosalen Seite der mit dem Blocker S3226 versehene 80 SCFA-Puffer und serosal weiter mit dem 41 Cl Puffer (Verlaufsmessung) und Messpunkt 4 = mukosal wieder der 80 SCFA Puffer ohne Blocker und serosal der 140 mmol/l Cl enthaltende Standardpuffer (Verlaufsmessung). Der Unterschied zwischen der Inkubation mit und ohne dem Blocker S3226 und zeitgleicher serosaler Inkubation mit reduziertem Chloridgehalt war signifikant verschieden ( $p = 0,31$ ). Die mukosal eingesetzten Lösungen hatten immer einen pH-Wert von 6,4 und die serosalen einen von 7,4. Die Anzahl der Epithelien und auch der Schafe betrug bei allen Pufferkonstellationen 4.

Die Differenzwerte des *subapikal* gemessenen pH-Wertes bei Inkubation mit den oben beschriebenen Pufferlösungen waren untereinander nicht signifikant. Sie bewegten sich annähernd um den Nullpunkt. Nur der Wert nach dem mukosalem Zusatz von S3226 zeigte einen geringfügig negativen Wert (-0,04) an, war jedoch im Vergleich mit dem Wert der direkt vorausgegangenen Pufferlösung (SCFA m + 41 Cl s) nicht signifikant.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Einleitung

Es gibt mittlerweile einige Untersuchungen über die Transportmechanismen der Epithelzellen des Blättermagens von Schafen, jedoch wurden noch keine pH-Messungen am und im Psalterepithel durchgeführt. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde eine Methode zur *supra-* und *subapikalen* pH-Messung mit einer double-barreled  $H^+$ -sensitiven Mikroelektrode etabliert. Zu Beginn der Untersuchungen wurde der Einfluss von Natrium und Kalium auf die elektrophysiologischen Parameter überprüft. Im Hauptteil der Arbeit wurde die Beteiligung der einzelnen Ionentransportprozesse an der Regulation des *supra-* und *subapikalen* pH-Wertes untersucht, hierbei kamen unterschiedliche Hemmstoffe zum Einsatz. Änderungen der elektrophysiologischen Parameter wurden fortlaufend aufgezeichnet. Im letzten Teil wurde der Einfluss von Chlorid erforscht.

Das Epithel erwies sich allgemein als sehr widerstandsfähig. Auch nach wiederholten Lösungswechseln erreichte das Epithel bei erneuter Umspülung mit der Standardlösung nach kurzer Zeit in etwa die Werte, die vor dem Lösungswechsel angezeigt wurden. Alle Messungen fanden im *voltage clamp* Modus statt und das transepitheliale Potential wurde auf 0 mV geklemmt („short-circuit“-Bedingungen), so dass kein elektrischer Gradient vorherrschte und der gemessene Strom durch elektrogene Ionentransportprozesse erzeugt worden ist.

### 5.2 Methodenkritik

Bei den Messungen der elektrophysiologischen Parameter und auch bei den pH-Messungen fiel eine gewisse Schwankungsbreite auf. Dies war vermutlich durch die doch individuellen Unterschiede der einzelnen Schafe in Bezug auf Haltung, Fütterung und Alter bedingt. Zusätzlichen Einfluss könnten auch die von Yamamoto *et al.* (1991b) erwähnten regional vorherrschenden Unterschiede im subepithelialen Kapillarnetzwerk des Psalters haben, die ihrer Meinung nach eine regionale Spezialisierung widerspiegeln. Bei der Auswertung ist dies berücksichtigt worden, indem in aller Regel nur gepaarte Daten, vom gleichen Epithelstück ermittelt, miteinander statistisch verglichen wurden.

Bei der Herstellung der double-barreled  $H^+$ -sensitiven Mikroelektroden musste ein Kompromiss geschlossen werden zwischen einer entsprechend dünnen, zur Punktion geeigneten Spitze und der gleichzeitigen Gewährleistung einer ausreichenden Silanisierung und blasenfreien Befüllbarkeit, die bei einer zu geringen Öffnung der Spitze nicht ausreichend war.

Die zuvor mit single-barreled Mikroelektroden (nur mit KCl gefüllt) durchgeführten Punktionen erbrachten annähernd gleiche Potentialabfälle wie bei den von Schultheiss (1995) gemachten Punktionen am Blättermagenepithel. Die Messungen ergaben Werte im Bereich von -50 mV bis etwa -70 mV. Die double-barreled Mikroelektroden wurden vorab ebenfalls nur mit KCl gefüllt und zur Punktion hergenommen. Beide Kanäle zeigten jeweils einen Potentialabfall -30 mV bis -45 mV. Um ein Vordringen des Silans bis in die Spitze zu erreichen, musste die Öffnung der Elektrodenspitze vergrößert werden und dementspre-

chend verkleinerte sich der Widerstand der Mikroelektrode. Bei den Punctionen mit der H<sup>+</sup>-sensitiven double-barreled Mikroelektrode wurden dadurch bedingt Potentialabfälle von nur etwa -20 mV erreicht, oftmals auch nur noch von -10 mV. Zumeist wurden zu Beginn höhere Werte erzielt, die nach kurzer Zeit wieder abfielen. Als Ursache für den unzureichenden Potentialabfall bzw. für den nachträglichen Anstieg des Potentials kommt ein Leckstrom an der Verbindungsstelle zwischen der Elektrodenspitze und der apikalen Epithelmembran in Frage, da durch die im Durchmesser relativ große Mikroelektrode an der Punctionsstelle eine Läsion in der Zellmembran verursacht wurde. Entsprechende Probleme sind auch aus der Literatur bekannt (de Hemptinne, 1980; Reuss und Finn, 1975; Schultz *et al.*, 1981). Jedoch stellte Thomas (1974) klar, dass dadurch nicht unbedingt ein Problem für die Messung des intrazellulären pH-Wertes entstehe. Bei den Versuchen mit dem Fettsäurepuffer konnten zum Ende des Versuchszeitraums recht stabile Punctionen mit Potentialwerten um -30 mV erzielt werden.

Bereits im Material- und Methodenteil wurde über die Verbesserung der Methode berichtet. Durch den neuen Puller (Elektrodenziehgerät) konnten Elektroden gezogen werden, die bei einem relativ hohen Widerstand trotzdem gut silanisierbar waren und sich gut befüllen ließen. So hatten diese Elektrodenspitzen einen kleineren Durchmesser und waren demnach besser zur Punction geeignet. Bei der Punction konnten mit diesen Elektroden höhere Potentialabfälle erreicht werden, da durch die spitzere Mikroelektrode die Läsionen eingedämmt wurden. Mit diesen Elektroden sollten auch die apikalen Widerstände und fraktionellen Widerstände berechnet werden können. Zukünftig sollte zur weiteren Verbesserung der Elektroden ein „Beveller“ verwendet werden. Mit diesem Gerät werden die Spitzen bei zeitgleicher Widerstandsmessung abgeschliffen. Auf diese Weise wird es möglich, die Spitze der Mikroelektrode wie eine Kanüle schräg anzuschleifen, um somit die Punctionseigenschaften zu verbessern. Außerdem könnten auf diese Weise die bei einigen Elektroden teilweise entstandenen „Silanklumpchen“ aus der Spitze entfernt und so die Ausbeute der brauchbaren Elektroden erhöht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden lediglich orientierende Versuche mit dem neuen Elektrodenziehgerät in einem vorangeschrittenen Stadium durchgeführt, deren Ergebnisse nicht mit aufgenommen wurden.

### **5.3 Einfluss von Natrium und Kalium auf die elektrophysiologischen Parameter des Psalterepithels**

Um herauszufinden welchen Einfluss und welche Bedeutung die Natrium- und Kaliumkonzentration auf / für die elektrophysiologischen Parameter haben, ist dieser Versuchsansatz vorab durchgeführt worden. Insbesondere sollte auch die Funktionalität und Handhabung der Mikro-Ussing-Kammer überprüft werden, die nach einer Phase der Stilllegung erneut aufgebaut werden musste. Diese Daten sind entscheidend für die Diskussion und Erstellung bzw. Aktualisierung eines Transportmodells für das Psalterepithel. In der Vergangenheit sind bereits Versuche mit unterschiedlichen Natrium- und Kaliumkonzentrationen am Blättermagenepithel des Schafes durchgeführt worden. Jedoch hatte die hier verwendete Versuchsausrüstung den entscheidenden Vorteil, dass an demselben Epithel schnelle, vollständige und insbesondere störungsfreie Lösungswechsel vollzogen werden konnten. Alle Lösungen hatten einen pH-Wert von 7,4.

### 5.3.1 Natriumreduzierung

Durch Ersatz mit NMDG wurde der Standardpuffer (141 mmol/l Natrium) so verändert, dass sich in dem neuen Puffer nur noch 31 mmol Natrium pro Liter befanden (im Folgenden als NMDG-Puffer bezeichnet). Die Natriumkonzentration in der Zelle wurde von Schultheiss (1995) auf Werte zwischen 8 und 9 mmol berechnet, so dass bei Einsatz dieses Puffer noch eine gewisse Triebkraft für die Aufrechterhaltung des NHEs bestehen sollte.

Bei der beidseitigen Umspülung des Epithels mit dem NMDG-Puffer verschwand der Strom über dem Epithel fast vollständig (hochsignifikant). Ähnlich verhielt es sich bei alleiniger Gabe des NMDG-Puffers auf der apikalen Seite des Epithels (serosal Standardpuffer). Wurde der Natriumgehalt jedoch lediglich auf der serosalen Seite reduziert (mukosal Standardpuffer), gab es nur einen geringen Abfall des Stromes. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Strom über dem Epithel hauptsächlich durch den Natriumtransport von mukosal nach serosal erzeugt wird und bestätigen vorausgehende Untersuchungen am Psalter (Ali, 2005; Schultheiss, 1995; Tiling, 1997). Im apikalen elektrogenen Natriumkanal sieht Schultheiss einen nicht-selektiven Kationenkanal, der durch mikromolare Calciumkonzentrationen blockiert wird.

Bei Natriumersatz fiel die Leitfähigkeit stark ab (größtenteils signifikant), wobei sie bei rein apikalem Einsatz des NMDG-Puffers am geringsten war. Die Leitfähigkeit (als Kehrwert des Widerstandes) wird allgemein als Maß für die parazelluläre Passage von Ionen gesehen. Da die Mobilität von NMDG nur halb so groß ist wie die von Natrium, ist ein solcher Abfall zu erwarten. Überraschend war jedoch die Beobachtung, dass die rein serosale Natriumreduzierung keinen signifikanten Einfluss auf die Leitfähigkeit hatte. Offenbar wurde der natriumabhängige Anteil der Leitfähigkeit überwiegend vom transzellulären Weg bestimmt. Die Leitfähigkeit (ausgedrückt in  $\text{mS}/\text{cm}^2$ ) entspricht dem unidirektionalen Flux (ausgedrückt in  $\mu\text{Eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ ) (Hodgkin *et al.*, 1952; Linderholm, 1952; Schultz *et al.*, 1964). Demnach dürfte bei einem  $I_{\text{sc}}$  von  $16 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (Standardpuffer-Inkubation)  $\approx 0,61 \mu\text{Eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$  mindestens  $0,6 \text{ mS}/\text{cm}^2$  der Gesamtleitfähigkeit auf der transzellulären Leitfähigkeit basieren.

Der Strom war – wie bereits erwähnt - bei der rein serosalen Natriumreduzierung zwar geringer als bei Standardinkubation (gerade eben nicht signifikant), jedoch war diese Verminderung des Stroms im Vergleich zur mukosalen Natriumreduzierung (signifikant) nur sehr klein. Die basolateral lokalisierte, elektrogene Natrium-Kalium-ATPase arbeitet unabhängig von der serosalen Natriumkonzentration und produziert daher trotzdem einen transepithelialen Natriumstrom. Entscheidend ist der in der apikalen Membran liegende Natriumkanal.

Bei rein mukosaler Natriumreduzierung wurde der Strom sogar leicht positiv, was einem negativen Equivalentstrom entspricht ( $-0,05 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ ). Vermutlich kann dieser Strom dadurch erklärt werden, dass die Mobilität von Natrium doppelt so hoch ist, wie die von NMDG. Der parazelluläre Natriumersatz dürfte also ca.  $0,1 \mu\text{Eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$  betragen, und der Beitrag des unidirektionalen parazellulären Fluxes von Natrium zur Gesamtleitfähigkeit (etwa 3 mS) dementsprechend nur 0,1 mS. Der parazelluläre Weg für Natrium trägt also nur unwesentlich zur Gesamtleitfähigkeit bei. Es kann aus diesen Ergebnissen auch gefolgert werden, dass auf apikaler Seite kein nennenswerter Efflux von Kalium stattfindet; sonst hätte bei mukosalem Natriumersatz weiterhin ein negativer Strom verzeichnet werden müssen. Kalium wird also am Psalter wie am Pansen (Leonhard-Marek und Martens, 1996) ganz überwiegend basolateral rezirkuliert und entspricht in dieser Hinsicht also dem klassischen epithelia-

len Transportmodell (Ussing und Zerahn, 1951). Gegen eine apikale Kaliumleitfähigkeit spricht dieses Ergebnis jedoch nicht: bei einem negativen apikalen Potential kann der Kaliumefflux trotz hoher Kaliumleitfähigkeit gering sein.

Eine weitere Begründung könnte in der verminderten apikalen Chloridaufnahme bestehen, da diese normalerweise durch den Natriumgradienten getragen wird, der nun fehlt. Entsprechend gelangen weniger Chlorid-Ionen durch den serosalen Kanal ins Interstitium.

### 5.3.2 Kaliumerhöhung bei gleichzeitiger Natriumreduzierung

In dem zuvor verwendeten NMDG-Puffer wurde NMDG durch Kalium ersetzt, so dass die beiden neuen Puffer jeweils eine Natriumkonzentration von 31 mmol/l und eine Kaliumkonzentration von 50 und 95 mmol/l hatten. In dem Standardpuffer betrug die Kaliumkonzentration 5 mmol/l.

Bei rein mukosalen Einsatz des Kaliumpuffers verdoppelte sich der Strom bei annähernder Verdopplung der luminalen Kaliumkonzentration (von 50 mmol/l auf 95 mmol/l). In dieser Konstellation fällt Natrium als Ladungsträger nicht in Betracht. Die von Schultheiss (1995) postulierte apikale Kaliumleitfähigkeit, die vermutlich zumindest teilweise dem gleichen, an den Vormägen für die Natriumleitfähigkeit verantwortlichen nicht-selektiven Kationenkanal zuzuschreiben ist (Leonhard-Marek, 2002; Leonhard-Marek *et al.*, 2005; Schultheiss und Martens, 1999), dürfte für diesen Kaliumstrom verantwortlich sein. Zusätzlich werden weitere apikale Kaliumkanäle vermutet; wie bereits oben diskutiert kommt es apikal jedoch zu keinem nennenswerten Kaliumefflux. In Analogie zum Pansenepithel (Abdoun *et al.*, 2005; Leonhard-Marek und Martens, 1996) scheint auch das Psalterepithel basolaterale Kaliumkanäle zu haben, die für die Rezirkulation des mit der Natrium-Kalium-ATPase aufgenommenen Kaliums verantwortlich sind.

Bezüglich der intrazellulären Kaliumkonzentration sind in der Psalterepithelzelle bis dato noch keine Untersuchungen / Berechnungen vorgenommen worden, aber es werden etwa 130 mmol vermutet. Durch die starke Erhöhung von Kalium auf der mukosalen Seite müsste es also zu einer Reduktion des Kaliumeffluxes und somit zu einer Depolarisation der apikalen Zellmembran kommen.

Die beidseitige Inkubation mit 50 mmol/l Kalium und 31 mmol/l Natrium reduzierte den Strom etwa um die Hälfte des bei beidseitiger Standardinkubation gemessenen. Im Gegensatz dazu verschwand der Strom bei beidseitiger Inkubation mit 31 mmol/l Natrium und 5 mmol/l Kalium fast vollständig (siehe oben). In dieser Konfiguration besteht kein Gradient für Kalium oder Natrium; ein passiver Efflux von Kalium durch den parazellulären oder transzellulären Weg scheidet also ursächlich aus. Der beobachtete Strom muss also auf eine Zunahme des aktiven Natriumtransportes zurückzuführen sein. Dieses Ergebnis bekräftigt die Hypothese von Schultheiss, der vermutete, dass durch eine Depolarisation (verursacht durch eine erhöhte luminale Kaliumkonzentration) die hemmende Wirkung von Calcium und/oder Magnesium auf den apikalen Natriumkanal (ein nicht-selektiver Kationenkanal) reduziert oder sogar aufgehoben wird. Die auf diese Weise erhöhte apikale Natriumleitfähigkeit führt nachfolgend zu einer verstärkten Natriumresorption, die den in diesem Versuch gesehenen höheren transepithelialen Strom bei symmetrisch erhöhter Kaliumkonzentration und gleichzeitig reduzierte Natriumkonzentration erklären würde. Ähnliche Beobachtungen wurden auch am Pansenepithel des Schafes gemacht (Lang, I. und Martens, 1999; Leonhard-Marek *et al.*, 2005; Martens und Hammer, 1981; Stumpff *et al.*, 2007). Dieser Mechanismus dürfte

eine große Rolle bei der Osmoregulation des Vormageninhalts der Wiederkäuer spielen (Stumpff und Martens, 2007).

## 5.4 Messungen unter Standardbedingungen

Die Werte für die elektrophysiologischen Parameter unter Standardbedingungen entsprachen weitgehend denen vorheriger Untersuchungen am Psalterepithel. Der Mittelwert des transepithelialen Stromes belief sich auf  $-34,07 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , was einem Kurzschlussstrom von  $1,27 \mu\text{eq}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$  entspricht. Als Mittelwert für die transepitheliale Leitfähigkeit wurde folgender Wert erhalten:  $3,06 \text{ mS}/\text{cm}^2$  (entspricht einem transepitheliale Widerstand von etwa  $327 \Omega\cdot\text{cm}^2$ ). Der daraus berechnete Mittelwert für das transepitheliale Potential lag bei  $-11,43 \text{ mV}$ . Bei der Punktion des Psalterepithels mit single-barreled Mikroelektroden konnten Werte für das apikale Membranpotential ermittelt werden, die mit etwa  $-40 \text{ mV}$  bis  $-70 \text{ mV}$  annähernd mit denen von Schultheiss (1995) gemessenen Werten übereinstimmten (siehe auch unter Methodenkritik).

### 5.4.1 Etablierung der pH-Messung mit $\text{H}^+$ -sensitiven Mikroelektroden

Die Messung des pH-Wertes mit einer double-barreled  $\text{H}^+$ -sensitiven Mikroelektrode ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert worden. Bei der Eichung zeigten die Elektroden Spannungsabweichungen pro pH-Einheit, die annähernd dem wünschenswerten Nernst-Potential entsprachen ( $57,91 \text{ mV} \pm 2,65$ ,  $n = 58$ ). Mit den Elektroden konnten sowohl *supra-* als auch *subapikale* (intrazelluläre) Messungen erfolgreich vorgenommen werden.

### 5.4.2 Supraapikales Mikroklima

Bei den pH-Messungen direkt an der apikalen Oberfläche des Epithels (*supraapikal*) konnte mit einem Mittelwert von 7,23 ein signifikant geringerer pH-Wert gemessen werden, als derjenige in der mukosalen Perfusionslösung (*bulksolution*) (7,4). Mit diesen Messungen konnte bewiesen werden, dass sich auch an der direkten Oberfläche des Psalterepithels ein saures pH-Mikroklima befindet. Von solch einem Mikroklima berichteten bereits diverse Autoren (Aschenbach und Gabel, 2000; Bugaut, 1987; Charney *et al.*, 1998; Chu, S. und Montrose, 1999; de Hemptinne, 1980; Gäbel *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 1997; Leonhard-Marek *et al.*, 2006; McEwan *et al.*, 1988; Shiau, 1990), die Versuche an unterschiedlichen Epithelien durchführten. Erste Hinweise auf ein saures Mikroklima an der Epitheloberfläche des Blättermagens waren bereits von von Engelhardt und Hauffe (1975) erbracht worden, die am Ansatz der Blätter einen pH-Wert gemessen hatte, der um 0,1 Einheit geringer war als im Lumen des Psalters.

Untersuchungen bezüglich eines *supraapikalen* Mikroklimas mit Hilfe der Mikroelektrodenteknik machte die Arbeitsgruppe um Lucas (Lucas und Blair, 1978; Lucas *et al.*, 1975). Sie konnten ein saures Mikroklima an der Oberfläche des Jejunums feststellen. Zusätzlich machten sie die Beobachtung, dass die Aufrechterhaltung des pH-Wertes an der Oberfläche sensitiv gegenüber der Natriumkonzentration in der Pufferlösung war und vermuteten daher die Anwesenheit eines Natrium-Protonen-Austauschers. Ein solcher Austauscher ist ebenfalls in der Epithelzellmembran des Psalters vorhanden. Außerdem fanden sie Anhaltspunkte für eine Beteiligung der mukosalen Kaliumkonzentration an der Ansäuerung des Oberflächen-pH-Wertes. Sie sahen die Hauptaufgabe dieses Mikroklimas in der Um-

wandlung von ionisierten schwachen Säuren in die nicht-ionisierte Form, die auf diese Weise über Diffusion in die Epithelzelle gelangen könnten.

Bei Untersuchungen über die Aufnahme von Fettsäuren im Gastrointestinaltrakt konnte auch Bugaut (1987) Beweise für ein saures Mikroklima an der Epitheloberfläche finden. Er vermutete, dass dieses Milieu durch die Sezernierung von Protonen entstehe und zum einen das Epithel vor den unterschiedlichen pH-Werten der luminalen Inhaltstoffe schütze und zum anderen der Protonierung der SCFA diene. Kawamata *et al.* (2006) fanden heraus, dass der pH-Wert am Epithel des Dickdarms dagegen alkalischer war als derjenige von der Faeces, was sie mit einer mukosalen Bikarbonatsekretion erklärten. Auch Busche und von Engelhardt (2007) berichteten von einem pH-Mikroklima im Dickdarm, dass sich jedoch nur in Anwesenheit von Bikarbonat ausbildete. Bei Untersuchungen des Mikroklimas am Pansen entdeckten Leonhard-Marek *et al.* (2006), dass luminales Chlorid den pH-Wert an der Epitheloberfläche erhöhte und zwar durch eine Stimulation des apikalen Chlorid-Bikarbonat-Austauschers.

Das saure Milieu *supraapikal* am Psalterepithel wird sehr wahrscheinlich vom Natrium-Protonen-Austauscher (wie beim Pansen) produziert und dient der Protonierung der kurzkettigen Fettsäuren, um eine Diffusion dieser zu ermöglichen. Dabei bewirkt im Gegensatz zum Pansen am Psalter auch der Cl/HCO<sub>3</sub> Austauscher eine Ansäuerung des Mikroklimas, da dieser Austauscher aufgrund der im Psalter vorherrschenden Gradienten Bikarbonat resorbiert (siehe Literaturteil).

Das *supraapikale* Mikroklima könne sich jedoch laut Busche und von Engelhardt (2007) bei den *in vitro* Versuchen nicht so ausgeprägt entwickeln wie vergleichsweise *in vivo*, da aufgrund der durch die Perfusionsapparatur entstehenden Strömung eine zu heftige Durchmischung vorhanden sei. Dies könnte eine Erklärung für den *in vivo* gemessenen geringeren pH-Wert von von Engelhardt und Hauffe (1975) sein, verglichen mit den im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* gemessenen pH-Werten.

#### 5.4.3 Intrazelluläre pH-Messungen (subapikal)

Der bei Standardinkubation gemessene pH-Wert in der Psalterepithelzelle war mit einem Mittelwert von 7,30 signifikant verschieden von dem der apikalen Pufferlösung (7,4) und auch von dem *supraapikal* gemessenen pH-Wert. Dieses Ergebnis bestätigt die Messungen von anderen Autoren, die in der Regel ebenfalls ein (leicht) saureres Milieu in der Zelle feststellten (Review von Roos und Boron, 1981).

An der Spannungsausgabe der Referenzelektrode war nach erfolgreicher Punktion ein deutlicher Potentialabfall zu erkennen. So lag der Mittelwert des Potentials der Referenzelektrode bei Positionierung in der Zelle bei -19,21 mV und war signifikant verschieden von dem bei extrazellulärer Position der Elektrode.

### 5.5 Einfluss der kurzkettigen Fettsäuren

Eine Hauptaufgabe des Blättermagens liegt in der Absorption der im Retikulumen und im Psalter produzierten kurzkettigen Fettsäuren. Vorausgegangene Untersuchungen am Psalterepithel (Ali, 2005) bestätigten die Hypothese, dass die Fettsäuren in ihrer protonierten Form durch Diffusion in die Epithelzelle gelangen. Eine zwingende Voraussetzung für diesen Prozess ist die *supraapikale* Bereitstellung von Protonen. Außerdem wird die Epithelzelle

durch die Aufnahme der SCFA erheblich mit Säuren belastet, denn ihr niedriger pK-Wert bedingt eine über 99%ige Dissoziation zum Anion in der Zelle. Beide Punkte erfordern eine effektive Regulation des intrazellulären und auch des *supraapikalen* pH-Wertes. Um den Einfluss der Fettsäuren (in ansteigenden Konzentrationen) auf die elektrophysiologischen Parameter und auf den pH-Wert sowohl *supra-* als auch *subapikal* zu beurteilen, wurde ein Versuchsansatz mit ansteigenden Fettsäurekonzentrationen durchgeführt.

Das Epithel wurde nur auf der mukosalen Seite mit den kurzkettigen Fettsäuren inkubiert. Es wurden Puffer mit einer Konzentration von 20 mmol SCFA pro Liter, mit 60 mmol/l und mit 80 mmol/l verwendet. Ihre Natriumkonzentration entsprach mit 140 mmol/l annähernd der des Standardpuffers (141 mmol/l), die Chloridkonzentration war mit 41 mmol/l deutlich geringer als die des Standardpuffers (99 mmol/l). Um eine Protonierung der Fettsäuren zu unterstützen, wurde der jeweilige pH-Wert der SCFA-Pufferlösung auf 6,4 eingestellt. Ein erster Versuch mit 60 mmol Fettsäuren pro Liter bei einem pH-Wert von 7,4 wurde eingesetzt, um die reine Auswirkung der Fettsäuren zu bestimmen. Eine Konzentration von 60 mmol/l entspricht in etwa der Fettsäurekonzentration *in vivo* im Blättermagen.

### 5.5.1 Einsatz des 60 mmolaren SCFA-Puffer bei einem pH-Wert von 7,4

Der transepitheliale Strom erhöhte sich - entgegen dem Verlauf bei Standardbedingungen - kontinuierlich nach dem Wechsel auf den 60 mmolaren SCFA-Puffer (pH 7,4). Dieses Ergebnis deckt sich mit dem von Ali *et al.* (2006), die als Ursache die Aktivierung des NHEs sehen. Alternativ kommt eine Stimulierung des nicht-selektiven Kationenkanals in Frage. Solch eine konnte an isolierten Zellen des Pansens und des Psalters beobachtet werden (Georgi *et al.*, 2010a; Stumpff *et al.*, 2009c).

Die transepitheliale Leitfähigkeit stieg zunächst leicht an und fiel dann deutlich und signifikant unter den ursprünglichen Wert. Der Anstieg entspricht vermutlich dem erhöhten  $I_{sc}$ . Als Grund für den nachfolgenden Abfall könnte eine verminderte parazelluläre Leitfähigkeit in Frage kommen. Durch Einstrom von SCFA müsste es zu einer Erhöhung der intrazellulären Osmolarität mit nachfolgender Zellschwellung kommen. Hierdurch könnten die Interzellularräume verkleinert und somit die parazelluläre Leitfähigkeit verringert werden (Diener *et al.*, 1993; Diener und Scharrer, 1997).

Der Differenzwert des transepithelialen Stromes zeigte direkt nach dem Wechsel auf den Fettsäurepuffer mit einem Wert von -3,48 sehr deutlich, dass der Stromanstieg pro Minute steil und schnell verlief. Dieser Wert nahm im weiteren Verlauf der Fettsäureinkubation einen leicht positiven Wert an, das heißt der Strom nahm pro Zeiteinheit wieder ab. Vermutlich waren die Zellen mit Fettsäuren gesättigt, wodurch der chemische Gradient für diese wegfiel. Demnach kam auch keine weitere Aktivierung des NHEs zu Stande. Hinzu kommt die Aktivitätshemmung der basolateralen ATPase durch die intrazelluläre Ansäuerung (siehe unten).

Während der Inkubation mit dem 60 mmolaren Fettsäurepuffer (pH-Wert 7,39) lag der *supraapikale* pH-Wert bei 7,28 ( $p = 0,038$ ). Es zeigte sich somit wieder deutlich die Ausbildung eines gegenüber der *bulksolution* saurem Mikroklimas.

### 5.5.2 Vergleich des 60 mmolaren Fettsäurepuffer bei pH 7,4 und 6,4

Dieser Versuchsansatz ist durchgeführt worden, um die Auswirkung einer Absenkung des apikalen pH Wertes von 7,4 auf 6,4 bei konstanter Fettsäurekonzentration (60 mmol/l) zu untersuchen.

Beim Vergleich zeigte sich, dass der transepitheliale Strom nach dem Wechsel von dem Fettsäurepuffer mit einem neutralen pH-Wert auf den sauren Fettsäurepuffer kontinuierlich abfiel, obgleich nur dezent. Nach dem Rückwechsel auf den neutralen Fettsäurepuffer war ebenfalls ein weiterer Stromabfall zu verzeichnen. Ähnlich verhielt es sich mit der Potentialdifferenz über dem Epithel, wobei nach dem Rückwechsel nur ein sehr leichter Abfall zu sehen war. Dies könnte damit zusammenhängen, dass durch die vermehrte Aufnahme von Protonen der intrazelluläre pH-Wert abfiel und nachfolgend die Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase vermindert wurde. Solch eine Aktivitätshemmung der ATPase beschrieben Orlando *et al.* (1984) bei experimenteller Ansäuerung von Ösophaguszellen. Die transepitheliale Leitfähigkeit wurde bei der Inkubation mit dem sauren Fettsäurepuffer deutlich größer und ihr Wert sank nach dem Rückwechsel auf den neutralen Fettsäurepuffer wieder ab. Dies spricht unter Berücksichtigung der Daten des Stromes für eine vermehrte Aktivität elektroneutraler Transportprozesse. Vermutlich wird der NHE über seine *H<sup>+</sup>-modifier site* aktiviert, aufgrund der vermehrt angefallenen Protonen. Da aber zeitgleich die basolaterale Natriumausschlebung vermutlich reduziert ist, würde sich Natrium in der Zelle sammeln und sich sekundär eine Zellschwellung ergeben.

Der *suprapikal* gemessene pH-Wert war während der Inkubation mit dem sauren Fettsäurepuffer mit 6,26 ebenfalls saurer als derjenige in der Bulksolution (6,4). Ein saures Mikroklima konnte also weiterhin gezeigt werden.

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass diese Werte lediglich von einem Epithel stammen und daher nicht so aussagekräftig sind.

### 5.5.3 Ansteigende Fettsäurekonzentrationen

Nach einer Äquilibrierungsphase mit Standardinkubation beidseits wurde das Epithel auf der mukosalen Seite bei pH 6,4 kontinuierlich mit ansteigenden Konzentrationen von kurzkettigen Fettsäuren (20 mmol/l, 60 mmol/l und 80 mmol/l) perfundiert.

Bei sämtlichen untersuchten Epithelien war nach dem Wechsel auf den 20 mmolaren Fettsäurepuffer zunächst ein transients Anstieg des transepithelialen Stromes zu beobachten, der von einem Anstieg der transepithelialen Leitfähigkeit gefolgt wurde. Nach dem Wechsel auf den 60 mmolaren bzw. 80 mmolaren Fettsäurepuffer kam es zu einem fortschreitenden Abfall sowohl des Stromes als auch der Leitfähigkeit. Beide Effekte erwiesen sich nach Auswaschen des Fettsäurepuffers als nicht reversibel, und könnten somit auf eine Schädigung des Epithels hindeuten. Bei Betrachtung der einzelnen Epithelien konnte direkt an der Oberfläche des Epithels immer ein geringerer pH-Wert als in der *bulksolution* gemessen werden, wobei sich bei den Absolutwerten eine erhebliche Streubreite zeigte, die einen ersten Hinweis auf eine unterschiedliche Belastbarkeit der Epithelien darstellen dürfte. Die pH-Messwerte in der Zelle bei Fettsäureinkubation waren immer etwas saurer als bei Umspülung mit dem Standardpuffer, und nahmen mit andauernder Fettsäureexposition zu, vermutlich bedingt durch einen zunehmenden Zusammenbruch pH-regulierender Mechanismen.

Ursächlich kommt eine durch die pH-Absenkung *verstärkte* Fettsäureabsorption in Frage. Den SCFA<sup>-</sup> stehen mehr Protonen zur Verfügung. Die protonierten Fettsäuren gelangen über Diffusion in die Zelle und dissoziieren dort aufgrund ihres geringen pK-Wertes (Ali, 2005). Dadurch wird die Epithelzelle vermehrt mit Protonen belastet, die den NHE aktivieren und zum vermehrten Einstrom von Natrium führen (Ali, 2005; Dölle, 2008; Gonda *et al.*, 1999; Martens und Gäbel, 1988). Die steigende intrazelluläre Natriumkonzentration verringert die apikale Ausschleusung von Protonen und es kommt zu einer zunehmenden Übersäuerung des Epithels, dem eine Aktivitätsminderung der Natrium-Kalium-ATPase folgt. Durch die nun folgende Osmolaritätserhöhung schwellen die Zellen an und die parazelluläre Leitfähigkeit sinkt und der Kurzschlussstrom nimmt ab. Ein ähnlicher Verlauf wurde auch von anderen Autoren an anderen Epithelien des Gastrointestinaltrakts beobachtet (Bödeker *et al.*, 1994; Diener *et al.*, 1993; Diener und Scharrer, 1997). So beobachteten Diener *et al.* (1993) ein Anschwellen von Kolonzellen und zwar in Abhängigkeit von Natrium und sahen eine komplette Unterdrückung bei Einsatz von Amilorid. Außerdem konnten sie zeigen, dass die intrazelluläre Gegenregulation effektiver war bei Anwesenheit von Bikarbonat. Sie postulierten, dass volumen-sensitive Kalium- und Chloridkanäle durch die SCFA-induzierte Zellschwellung aktiviert wurden. Durch die Zellschwellung werden laut Schultheiss und Diener (1998) basolaterale Chloridkanäle stimuliert und Kaliumkanäle (apikal und basolateral) sekundär über eine Hyperpolarisation aktiviert, die durch eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration vermittelt wurde. Bödeker *et al.* (1994) beobachteten ebenfalls eine Reduzierung der transepithelialen Leitfähigkeit mit einer zeitgleichen Erniedrigung der parazellulären Leitfähigkeit (innerhalb der ersten Stunde), die verursacht wurde durch eine Verkleinerung der interzellulären Räume aufgrund der Zellschwellung. Sie konnten auch einen Anstieg des Stromes und des Potentials messen und sahen dies begründet in einer Induzierung von elektrogenen Transportprozessen durch die Fettsäureabsorption.

Abschließend sei jedoch bemerkt, dass die Ansäuerung der Zellen trotz hoher Fettsäurekonzentrationen in diesen Messungen nicht so stark ausgeprägt war, wie ursprünglich erwartet. So wurden am Pansen bei niedrigerer Fettsäurekonzentration weitaus deutlichere Effekte sowohl auf den intrazellulären pH-Wert, als auch auf den Kurzschlussstrom beobachtet (Abdoun *et al.*, 2010). Die Versuche am Pansen wurden allerdings in Abwesenheit von CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> beobachtet, während die hier beschriebenen Versuche am Psalter in Gegenwart dieses starken Puffersystems durchgeführt wurden. Beim Psalterepithel ist von einer Umkehr der Transportrichtung des Chlorid-Bikarbonat-Austauschers auszugehen, da die benutzten Lösungen nur 40 mmol/l Chlorid enthielten. Der apikale Anionenaustauscher stand somit für die Aufnahme von Bikarbonat ins Epithel zur Verfügung und spielt die Rolle eines weiteren wichtigen Mechanismus zur Neutralisation von Säuren.

Aus den Potentialwerten der Referenzelektrode geht interessanterweise hervor, dass die apikale Membran nach dem Wechsel auf den Fettsäurepuffer (unabhängig von der Konzentration) hyperpolarisiert wurde. Eine Hyperpolarisation nach Butyrat-Gabe konnten auch Hamodeh *et al.* (2004) feststellen. Dies konnten sie durch den Einsatz eines spezifischen Blockers von Calcium-abhängigen Kaliumkanälen verhindern. Er deklarierte eine direkte intrazelluläre Calciumfreisetzung durch Butyrat ohne die Zwischenschaltung von second-messenger. Wie bereits erwähnt, exprimiert der Psalter einen apikalen, nicht-selektiven Kationenkanal, welcher durch Fettsäureexposition an isolierten Zellen aktiviert werden kann (Georgi *et al.*, 2010a). Allerdings dürfte in diesem Falle auch ein vermehrter Natriumeinstrom

zu beobachten sein, und ob diese Kanäle somit als Ursache für die Hyperpolarisation in Frage kommen, bleibt zu klären. Auch ein anderer Effekt könnte involviert sein.

Am Pansen konnte eine ähnliche Hyperpolarisation nach Ersatz von Chlorid durch Gluconat beobachtet werden (Leonhard-Marek *et al.*, 2006). An der basolateralen Membran von Pansen und Psalter wird seit langem ein Chloridkanal postuliert (Ali, 2005; Diernaes *et al.*, 1994; Sehested *et al.*, 1999), der wahrscheinlich für ein Chloridrecycling zuständig ist, da über den basolateralen Chlorid-Bikarbonat-Austauscher Chlorid in die Zelle gelangt. Aktuelle Untersuchungen an Pansenepithelzellen (Georgi *et al.*, 2010b; Stumpff *et al.*, 2009c) haben ergeben, dass der basolaterale Chloridkanal auch für größere Moleküle wie Bikarbonat und Acetat durchlässig ist, allerdings nimmt die Leitfähigkeit mit der Größe des Moleküls ab. Ein solcher Kanal konnte auch am Psalter nachgewiesen werden (Georgi *et al.*, 2010a). Durch Einsatz der Fettsäurepuffer wurde die apikale Konzentration von Chlorid auf 40 mmol/l herabgesetzt und es kam daher zu einem verminderten elektroneutralen apikalem Chlorideinstrom durch den Anionenaustauscher. Demnach sollte der Gradient für den basolateralen elektrogenen Einstrom von Chlorid durch den Kanal steigen. Nachfolgend steigt die intrazelluläre Konzentration von Chlorid an und infolge einer Vermehrung der intrazellulären Anionen könnte eine Hyperpolarisation entstehen.

## 5.6 Auswirkungen durch den Einsatz von Hemmstoffen

Um herauszufinden welchen Einfluss bzw. welche Bedeutung die einzelnen Transportmechanismen auf bzw. für die intrazelluläre pH-Regulation und somit auch auf das *supraapikale* Mikroklima haben, wurden mukosal unterschiedliche Blocker eingesetzt. Die Hemmstoffe wurden jeweils in dem Fettsäurepuffer bei einem pH-Wert von 6,4 gelöst. Das Epithel wurde vor Applikation der Blocker mit den Fettsäuren (pH 6,4) umspült, um auf diese Weise bereits eine Stimulierung der einzelnen Transportprozesse hervorzurufen. Serosal wurde mit dem Standardpuffer (pH 7,4) perfundiert.

### 5.6.1 Amilorid

Amilorid fungiert in der eingesetzten Konzentration (1 mmol/l) als nicht-selektiver Blocker des Natrium-Protonenaustauschers (NHE) mit breiter Wirkung auf die verschiedenen Subtypen. Im Unterschied zu den nachfolgend erläuterten Versuchsansätzen wurde diese Substanz im Rahmen der Vorversuche in dem 60 mmolaren SCFA-Puffer gelöst. Die Fettsäurepuffer (mit und ohne Blocker) hatten einen pH-Wert von 7,4. Die pH-Messungen wurden nur direkt an der Epitheloberfläche (*supraapikal*) vorgenommen.

Während des Versuchsablaufes fielen der Strom und das Potential geringfügig ab. In den Versuchen mit dem neutralen Fettsäurepuffer ohne Blockerzusatz konnte man hingegen einen Anstieg sehen. Auch die Leitfähigkeit verhielt sich entgegengesetzt und stieg an. Die Differenzwerte bestätigen dies. Sie wurden sowohl bei dem Potential als auch bei dem Strom während der Inkubation mit der 60 mmolaren Fettsäurelösung stetig größer und zeigten nach Zugabe von Amilorid einen Abfall. Der *supraapikal* gemessene pH-Wert stieg während der Exposition mit Amilorid signifikant an. Nach Entfernung von Amilorid wurde er wieder etwas saurer, blieb jedoch alkalischer als beim ersten Messwert.

Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass ein apikaler NHE Protonen aus der Zelle herausschleust und dadurch ein saures *supraapikales* Mikroklima erschafft bzw. aufrechterhält. Dieses saure Mikroklima hat am Psalter vermutlich eine stimulatorische Wirkung

auf die Fettsäureresorption, welche durch die Applikation von Amilorid am Psalter gehemmt werden kann (Ali *et al.*, 2006). Aufgrund der Transportrichtung des Chlorid-Bikarbonat-Austauschers unter den betrachteten Versuchsbedingungen am Psalter kommt es dabei zu keiner kompensatorischen Ausschleusung von Bikarbonat durch den apikalen Anionenaustauscher; dieser dürfte im Gegenteil das Mikroklima weiter ansäuern. Hierdurch wird erklärbar, warum am Pansen keine Wirkung von Amilorid auf den Fettsäuretransport beobachtet werden konnte (Gäbel *et al.*, 1999). Die apikale Chloridkonzentration war bei den Versuchen am Pansen höher, eine Ausschleusung von Bikarbonat mit kompensatorischer Alkalinisierung des Mikroklimas durch den Austauscher kann somit als gesichert gelten und dürfte dort den Effekt von Amilorid auf das Mikroklima verhindert haben. Hinzu kommt, dass der Pansen im Gegensatz zum Psalter keinen apikalen Natrium-Chlorid-Cotransporter exprimiert.

Ein molekularbiologischer Nachweis eines NHE3 am Psalterepithel ist von Shen *et al.* (2008) erbracht worden und Dölle (2008) konnte diesen durch Einsatz eines spezifischen Blockers der apikalen Membran zuordnen. Es ist bekannt, dass Amilorid den NHE hemmt (Benos, 1982).

Bei Betrachtung der einzelnen Epithelien konnte gesehen werden, dass der *supraapikal* gemessene pH-Wert am Ende der Amiloridexposition bereits wieder einen Abfall zeigte. Dies kann zum einen durch eine Aktivitätssteigerung ruhender NHEs bedingt gewesen sein oder durch das *Trafficking* von vorgefertigten NHE Proteinen in die apikale Membran verursacht worden sein (Dölle, 2008). Zusätzlich könnte aber auch ein weiterer Prozess zur Protonenausschleusung aktiviert worden sein, beispielsweise die  $vH^+$ -ATPase. Diese Pumpe kann primär-aktiv Protonen aus dem Epithel pumpen und dient vielfach als „Notbremse“ bei pH Entgleisungen. Ein zusätzlich aktivierter Transportprozess würde auch die Erhöhung der Leitfähigkeit erklären. Ursächlich könnte jedoch auch eine verminderte SCFA-Aufnahme (weniger Protonen verfügbar für die Protonierung) in Frage kommen, in deren Folge die Osmolarität in der Zelle sinkt und die Zellschwellung wieder geringer werden würde. Daraufhin sollte die parazelluläre Leitfähigkeit und somit die Gesamtleitfähigkeit zunehmen.

### 5.6.2 S3226

Als spezifischer Blocker des NHE3 wurde S3226 gelöst im 80 mmolaren SCFA-Puffer bei einem pH-Wert von 6,4 auf der mukosalen Seite des mit Fettsäuren präinkubierten Epithels eingesetzt. Es wurden sowohl *supra-* als auch *subapikale* Messungen vorgenommen.

Durch den Einsatz des Blockers wurden der Strom und das Potential signifikant und drastisch vermindert. Beim Strom konnte nach Ende der Blockerexposition wieder ein leichter Anstieg verzeichnet werden. Bei der transepithelialen Leitfähigkeit waren Veränderungen in Form eines dezenten Anstiegs nach der Blockergabe und eines großen Anstiegs nach dem Rückwechsel zu verzeichnen.

Hingegen war die Auswirkung auf den pH-Wert *supraapikal* und *subapikal* nicht signifikant. Bei Betrachtung der einzelnen Epithelien war nach jeder S3226-Gabe ein wellenförmiger Verlauf zu sehen. So waren bei der *supraapikalen* Messung meist erst ein Anstieg des pH-Wertes und dann wieder ein Abfall zu sehen, der teilweise wieder in einem Anstieg mündete. Bei den *subapikalen* Messungen waren zunächst deutliche pH-Abfälle sichtbar, bei denen nach mehrfachen Auf- und Absteigen dann der Anstieg überwiegte. Wellenförmige Schwankungen bestanden zum Teil auch nach der Entfernung des Blockers weiter.

Die Deutung dieser Ergebnisse ist nicht trivial. Der starke Stromabfall während der Verlaufsmessung wurde als Folge einer Ansäuerung des Epithels mit Hemmung der Na-K-ATPase nach Hemmung des NHEs erwartet. Überraschend war die Stärke der Hemmung des Kurzschlussstromes, die in dieser Ausprägung bei keinem anderen applizierten Blocker beobachtet werden konnte. Die zeitgleiche Erhöhung der Gewebeleitfähigkeit spricht ebenfalls für eine Hemmung des NHEs durch S3226, die zu einer verminderten Fettsäure- und Natriumaufnahme mit nachfolgend verringerter Zellschwellung führt. Der deutliche Anstieg der Leitfähigkeit nach dem Ende der Blockerexposition könnte vermutlich durch den nun wieder agierenden NHE3 und die nachfolgende Fettsäureaufnahme zustande gekommen sein. Wieder kommt jedoch alternativ eine Aktivierung der H<sup>+</sup>-ATPase nach starker Ansäuerung des Epithels in Frage.

Die gemessenen pH-Werte stützen diese Theorie hingegen nicht. Denkbar wäre eine vollständige Wiederherstellung des pHs infolge einer Aktivierung der H<sup>+</sup>-ATPase, mit zum Teil überschießender Funktion. Es muss allerdings auch an die Beteiligung des apikalen Anionenaustauschers an der pH Regulation gedacht werden, da dieser bei den hier vorherrschenden Gradienten Bikarbonat in das Psalterepithel einschleust.

### 5.6.3 DIDS

Durch den Einsatz von DIDS sollte der apikale Chlorid-Bikarbonat-Austauscher gehemmt werden. Auch dieser Hemmstoff wurde gelöst im 80 SCFA-Puffer bei einem pH-Wert von 6,4 mukosal eingesetzt.

Nach Blockerzugabe fielen der Strom und das Potential über das Epithel signifikant ab. Der größte Abfall des Stromes war im ersten Drittel der Messung während Blockerexposition zu verzeichnen, wobei dieser weniger als die Hälfte von dem bei S3226-Gabe ausmachte. Nach dem Rückwechsel bestand ein weiter anhaltender Abfall der Parameter. Die Veränderungen bei der Leitfähigkeit waren nur geringfügig und zeigten einen sigmoidalen Verlauf. Wieder konnte kein signifikanter Effekt auf den pH-Wert bei *supra*- als auch bei *subapikaler* Messung beobachtet werden, obgleich bei *subapikaler* Messung ein „Trend“ zur Ansäuerung zu sehen war.

Am Psalter gelangt Chlorid apikal über den Natrium-Chlorid-Cotransporter in die Zelle, der durch den chemischen Natriumgradienten getragen wird. Dieses Chlorid wird daraufhin über den Chlorid-Bikarbonat-Austauscher wieder in das Lumen transportiert (Ali *et al.*, 2006). Die Versuchsbedingungen in dieser Arbeit sollten weitgehend der *in vivo* Situation mit luminal viel SCFA und wenig Chlorid entsprechen, die für eine Beteiligung dieses Transporters an der Säureeliminierung sorgten. Eine Hemmung sollte zur kompensatorischen Steigerung der Aktivität des NHEs führen – mit einer Vergrößerung der elektroneutralen Transportkomponente. Dies könnte die ausgebliebene starke Ansäuerung des Epithels bzw. des Mikroklimas erklären.

Durch die Blockierung mit DIDS waren zusätzlich mehr Anionen in der Zelle, die möglicherweise basolateralen nur erschwert ausgeschleust werden konnten aufgrund einer Blockierung des serosalen Chloridkanals durch die Fettsäureanionen. Dies könnte die gesehene starke Hyperpolarisation der apikalen Zellmembran erklären. Außerdem bewirkt eine Hemmung des Austauschers, dass weniger Bikarbonat in der Zelle zur Pufferung der Protonen zur Verfügung steht. Dies zeigt der etwas saurer gewordene intrazelluläre pH-Wert.

Nachfolgend würde wieder die Na-K-ATPase gehemmt und erklärt so den geringeren Strom während des Blockereinsatzes.

#### 5.6.4 DIDS und S3226

Durch diesen Versuchsansatz mit der kombinierten Anwendung beider Blocker wurden sowohl der NHE3 als auch der apikale Chlorid-Bikarbonat-Austauscher zeitgleich gehemmt. Auch hier war ein kontinuierlicher und signifikanter Abfall des Stromes und des Potentials zu sehen. Im Vergleich mit dem alleinigen Einsatz der Blocker war dieser aber geringer. Dies spricht gegen eine direkte Wirkung von S3226 auf den elektrogenen Natriumtransport des Psalters. Es ist unklar, warum die Wirkung beider Blocker in Kombination geringer ausfiel als jeweils die alleinige Gabe eines der beiden Blocker.

Auch hier war nur eine geringe Veränderung der Leitfähigkeit zu sehen, die wie bereits zuvor nach Blockergabe erst kurz abfiel und daraufhin anstieg. Signifikante Effekte auf den pH-Wert konnten nicht beobachtet werden.

Bei Betrachtung der einzelnen Epithelien waren wieder permanente Schwankungen des pH-Wertes nach der Blockergabe zu sehen. So fiel der intrazelluläre pH zunächst ab, um kurz darauf wieder anzusteigen und erneut abzufallen. Der erste Abfall könnte durch das zeitgleiche Fehlen einer Protonenkompensation über den NHE3 und der Pufferung über das Bikarbonat entstanden sein. Daraufhin scheint die Zelle über einen anderen Mechanismus diese Ansäuerung auszugleichen. An dieser Stelle kann wiederum die  $vH^+$ -ATPase in Betracht gezogen werden (Etschmann *et al.*, 2006; Schweigel und Martens, 2003). Bei einer Aktivierung sollten Strom und Spannung über das Epithel abfallen. Auch eine gleichzeitige, ansäuerungsbedingte Öffnung des nicht-selektiven Kationenkanals mit Anstieg des elektrogenen Natriumtransportes erscheint denkbar und dürfte eine abschwächende Wirkung auf den Abfall von Strom und Spannung haben. Möglicherweise arbeitete der basolaterale Chlorid-Bikarbonat-Austauscher in einem „reverse mode“ und sorgte so für Bikarbonat zur intrazellulären Protonenpufferung. Die Interpretation dieser Ergebnisse bleibt jedoch spekulativ. Es zeigt sich jedoch, dass die Zelle anscheinend ihren pH-Wert auch bei erschwerten Bedingungen aufrechtzuerhalten vermag.

#### 5.6.5 Ethoxzolamid

Um die an der intrazellulären pH-Regulation beteiligten Carboanhydrase zu hemmen, wurde der Hemmstoff Ethoxzolamid eingesetzt.

Auch hier fielen der Strom und das Potential im Verlauf des Versuchs ab. Der erste „Sprung“ des Stromes war am größten, auch im Vergleich mit dem Einsatz der anderen Blocker. Danach fielen die Werte nur noch gering. Die transepitheliale Leitfähigkeit verminderte sich wie bei den übrigen Versuchen direkt nach der Blockergabe und zeigte bereits im weiteren Verlauf ein Ansteigen des Wertes, so dass nach dem Rückwechsel ein deutlich höherer Wert gemessen werden konnte, als vor dem Hemmstoffeinsatz.

Der gemessene intrazelluläre pH-Wert der einzelnen Epithelien wies jeweils direkt nach Zugabe des Blockers einen Abfall auf, der jedoch nicht signifikant war. Daraufhin war auch hier meist ein sigmoidales Verhalten sichtbar. So schienen zunächst die nicht mehr von der Carboanhydrase gepufferten Protonen Probleme zu bereiten, die zunächst auch die Natrium-Kalium-ATPase hemmten, was an dem starken Rückgang des Stromes zu erkennen

war. Daraufhin wurde die Protonen über andere Mechanismen vermehrt aus der Zelle ausgeschleust und der Strom zeigte fast keinen Rückgang mehr.

### 5.6.6 Ethoxazolamid und S3226

Auch der Carboanhydraseblocker wurde mit dem NHE3-Blocker kombiniert eingesetzt. Dadurch sollte die Zelle noch stärker mit Protonen belastet werden, die so weder über den apikalen NHE ausgeschleust und auch nicht intrazellulär über die Carboanhydrase gepuffert werden konnten. Bei den elektrophysiologischen Parametern zeigten sich nur geringfügige Abweichungen. Beim Strom war bereits im weiteren Verlauf ein leichter Anstieg zu sehen. Veränderungen des pH-Wertes konnten fast gar nicht beobachtet werden.

Scheinbar lief beim alleinigen Einsatz von S3226 die Protonenabpufferung vermehrt über die Carboanhydrase-Reaktion ab, die jetzt ebenfalls gehemmt wurde. Wieder ist an die zusätzliche Aktivierung der apikalen  $H^+$ -ATPase zu denken. Der deutliche Stromanstieg nach Blockergabe widerspricht jedoch dieser Hypothese.

### 5.6.7 Concanamycin

Um die Bedeutung der  $vH^+$ -ATPase an der pH-Regulation zu eruieren, wurde der Blocker Concanamycin eingesetzt.

Bei diesen Versuchen fiel besonders auf, dass es anders als sonst zu keinem nennenswerten Abfall des Kurzschlussstroms kam. Diese Beobachtung stellt einen deutlichen Hinweis auf eine Beteiligung der  $H^+$ -ATPase an der Regulation des intrazellulären pH-Wertes am Psalter dar. Effekte auf den subapikalen pH waren nicht nachweisbar, da vermutlich wieder der NHE und der Chlorid-Bikarbonat-Austauscher ihre kompensatorische Wirkung entfaltet haben.

## 5.7 Einfluss von Chlorid

Die Beeinflussung der elektrophysiologischen Parameter und auch des intrazellulären pH-Wertes durch die extrazelluläre (serosale) Chloridkonzentration sollte mit diesem Versuchsansatz erforscht werden. Hierzu wurde auch basolateralen der Chloridgehalt durch Einsatz von Glukonat auf 41 mmol/l (wie apikal) eingestellt (pH-Wert 7,4). Apikal kam zunächst der 80 mmolare SCFA-Puffer (pH 6,4) zum Einsatz, dem zeitweise der NHE3-Blocker S3226 zugefügt wurde.

Der Strom und das Potential wurden nach dem serosalen Wechsel auf den reduzierten Chloridpuffer kontinuierlich und signifikant kleiner und stiegen erst wieder nach dem serosalen Rückwechsel auf den Standardpuffer. Die Reversibilität war bei allen Epithelien deutlich zu erkennen. Auch die Leitfähigkeit verminderte sich reversibel während des serosalen Einsatzes des 41 Cl-Puffers. Dieser Abfall wurde während der Exposition mit S3226 noch verstärkt, war jedoch bei weitem nicht so deutlich wie beim Strom und dem Potential. Durch die Reversibilität konnte gezeigt werden, dass das Epithel keinen Schaden genommen hat.

Auf den *subapikal* gemessenen pH-Wert schien die Chloridreduzierung keinen Einfluss zu nehmen, jedoch fiel er nach mukosaler Zugabe von S3226 signifikant ab. Der intrazelluläre pH-Wert wurde demnach saurer. Auch dieser Vorgang war reversibel. Man würde erwarten, dass durch den Chlorid-Bikarbonat-Austauscher bei unterschiedlichen Chloridkonzentrationen auch der intrazelluläre pH-Wert beeinflusst wird. Dies wurde in diesem Experiment nicht bestätigt. Auf der apikalen Seite ist der Chlorid-Bikarbonat-Transporter nicht so

stark unabhängig von der luminalen Chloridkonzentration, da er hauptsächlich durch den Natrium-Chlorid-Cotransport (vom Natriumgradienten gespeist) aufrechterhalten wird (Beisele, 2008). Bei dem basolateralen Chlorid-Bikarbonat-Austauscher handelt es sich vermutlich um einen AE2 (mRNA ist nachgewiesen worden), der zwar konzentrationsabhängig ist, aber seine Aktivität wird auch vom intrazellulären pH-Wert bestimmt und er kann als Chlorid-Chlorid-Austauscher fungieren (Eladari *et al.*, 1998). Deutliche und signifikante pH-Veränderungen waren jedoch erst nach Zugabe des NHE3-Blockers sichtbar. Die fehlende Alkalinisierung des Anionenaustauschers wurde zunächst also von dem NHE aufgefangen. Erst nach der Hemmung dieses Transporters durch S3226 wurde die Zelle deutlich saurer.

Die unterstützende Arbeit einer apikalen  $H^+$ -ATPase liegt auch hier nahe, da die Ansäuerung ansonsten vermutlich stärker gewesen wäre. Dagegen spricht allerdings die deutliche Depolarisation des apikalen Potentials. Diese wird vermutlich durch die basolaterale Anionenleitfähigkeit des Epithels vermittelt und spiegelt die veränderten Gradienten für Anionen über der basolateralen Membran wieder.

## 5.8 Zusammenfassung der Erkenntnisse über die pH-Regulation der Psalterepithelzelle und Diskussion eines Transportmodells

### 5.8.1 pH-Regulation

Mit Hilfe der neu etablierten Methode zur pH-Messung mittels  $H^+$ -sensitiven Mikroelektroden war es möglich, am Psalterepithel sowohl direkt an der apikalen Oberfläche (*supraapikal*) als auch in der Zelle selbst (*subapikal*) den pH-Wert zu bestimmen.

Das von vielen Autoren bereits an anderen Epithelien entdeckte *supraapikale* pH-Mikroklima fand sich auch am Blättermagen. Dieses Mikroklima hatte immer einen saureren pH-Wert als die sich in der mukosalen Kammerhälfte befindliche Pufferlösung. Auch der gemessene pH-Wert in der Zelle deckt sich mit den Literaturbefunden insofern, dass auch die Psalterepithelzelle einen saureren pH-Wert hat als die extrazelluläre Lösung. Auffällig waren die guten Kompensationsmöglichkeiten der Zelle für eine von außen zugefügte Belastung mit Protonen. Es konnte zwar ein zeitweiliges Absinken des pH-Wertes beobachtet werden, der aber stets deutlich über dem Wert des apikalen Puffers blieb.

Durch den Einsatz verschiedener Hemmstoffe war jeweils nur eine leichte Veränderung des pH-Wertes zu sehen. Die Zelle verfügt über mehrere Mechanismen zur pH-Regulation, so dass bei Ausfall eines Mechanismus die anderen kompensatorisch wirken und insgesamt die pH-Homöostase der Zelle aufrechterhalten werden kann. Es gibt demnach ein sehr feines und enges Zusammenspiel der einzelnen Transportmechanismen. Eine entscheidende Rolle dürfte dabei die intrazelluläre Bikarbonatkonzentration haben, die durch verschiedenen Transportproteine und durch das Enzym Carboanhydrase reguliert wird.

Die Psalterepithelzelle ist permanent einer Protonenbelastung ausgesetzt. Die vorliegende Untersuchung bestätigt bestehende Modelvorstellungen, wonach es durch Aufnahme von Fettsäuren zu einer intrazellulären Ansäuerung kommt. Dabei führt eine Erniedrigung des mukosalen pH-Wertes zu einer erhöhten Aufnahme von Fettsäuren in das Epithel. Die protonierte Säure diffundiert vermutlich durch die Lipidmembran in die Epithelzelle, wobei auch andere Transportmöglichkeiten nicht ausgeschlossen werden können. Durch die Dissoziation der Fettsäureanionen befinden sich mehr Protonen in der Zelle, die apikal durch

den Natrium-Protonen-Austauscher wieder aus der Zelle heraustransportiert werden. Der verstärkte Natriumflux von mukosal nach serosal wurde in Experimenten bestätigt (Ali *et al.*, 2006). Der Natriumflux war jedoch im Vergleich zum Acetatflux viel größer. Hier kommt sehr wahrscheinlich der bereits beschriebene (siehe Kapitel 2.5) pH-sensing Mechanismus zum Tragen. So wird der NHE durch den erniedrigten intrazellulären pH-Wert aktiviert und sekundär steigt der Natriumflux.

Eine Erklärung für die unterschiedlich hohen Transportraten von Acetat und Natrium wurde an anderen Epithelien in dem apikalen Fettsäure-Recycling (im Austausch mit Chlorid) gefunden. Am Psalter konnten jedoch keine Wechselwirkungen zwischen dem Chloridflux und dem SCFA Transport nachgewiesen werden (Tiling, 1997) und zusätzlich wurde eine absorptive Funktion des Psalters für die Fettsäuren belegt, dem ein Recyclingvorgang widerspricht. Als Ursache für die differierenden Transportraten könnte auch die zusätzliche intrazelluläre Produktion von Protonen herangezogen werden. Das supraapikal angesäuerte Mikroklima würde vermutlich die Bildung von CO<sub>2</sub> verstärken, welches in die Zelle diffundieren kann und dort dissoziiert. Dadurch erhöht sich ebenfalls die intrazelluläre Konzentration an Protonen, die durch den NHE ausgeschleust werden.

Beim Einsatz des unspezifischen Hemmstoffs für den Natrium-Protonen-Austauscher Amilorid konnte *supraapikal* ein signifikant basischer pH-Wert gemessen werden. Dies deutet darauf hin, dass durch die Blockierung des NHE weniger Protonen zum *supraapikalen* Mikroklima beitragen. Nach der Gabe des spezifischen Blockers für den NHE3 wurden bei Betrachtung der einzelnen Epithelien intrazellulär zunächst saurere pH-Werte gemessen, die daraufhin wieder anstiegen (sigmoidales Verhalten). Diese Veränderungen waren jedoch nicht signifikant. Offenbar existieren mehrere Mechanismen, die den intrazellulären pH-Wert weitestgehend konstant halten und den Ausfall eines Mechanismus durch andere kompensieren. Hierzu zählt gewiss auch der basolaterale NHE1. Eine Kopplung und somit auch eine Kommunikation zwischen dem apikalen und dem basolateralen NHE beschreibt Good *et al.* (1995). Diese Kopplung könnte beispielsweise bei Hemmung des NHE3 eine Aktivierung des NHE1 hervorgerufen haben.

Neben Transportern der NHE-Gruppe wird eine entscheidende Funktion bei der pH-Regulation auch von den Chlorid-Bikarbonat-Austauschern und dem Enzym Carboanhydrase übernommen.

Ein erster Versuch, den apikalen Anionenaustauscher durch die Gabe von DIDS zu hemmen, zeigte keine messbaren Auswirkungen auf den intrazellulären pH-Wert. Möglicherweise war nur eine unvollständige Hemmung erzielt worden. Auch der serosale Entzug von Chlorid führte zu keiner Veränderung des *subapikalen* pH-Wertes. Eine Ansäuerung konnte jedoch durch die gleichzeitige Hemmung des NHE3 durch S3226 gemessen werden. Zuvor konnte der Chlorid-Bikarbonat-Austauscher trotz serosaler Chloridreduzierung einer Ansäuerung entgegenwirken, da er von einem durch den apikalen Natrium-Chlorid-Cotransporter entstandenen Chloridgradienten gespeist wurde. Zusätzlich alkalinierte der NHE die Zelle.

Bei dem apikalen Chlorid-Bikarbonat-Austauscher in der apikalen Membran handelt es sich sehr wahrscheinlich um einen DRA (molekularbiologischer Nachweis von Wegeler (2007)). Dieser Austauscher besitzt eine funktionelle Kopplung mit der Carboanhydrase (Sterling *et al.*, 2002). Außerdem wird er laut Hayashi *et al.* (2009) indirekt durch den apikalen NHE reguliert und zwar über eine intrazelluläre *pH-modifier-site* an diesem Austauscher.

Diese Kopplung bestätigten auch Musch *et al.* (2009). Nach Stewart *et al.* (2007b) besitzt jedoch der AE2 eine höhere Sensitivität gegenüber pH-Veränderungen in der Zelle. Der Transporter stellt vermutlich den Chlorid-Bikarbonat-Austauscher in der basolateralen Membran des Psalters dar und wurde molekularbiologisch nachgewiesen. Auch er verfügt über einen pH-Sensor. Dieses Zusammenspiel zeigte sich auch bei den Untersuchungen von Beisele *et al.* (2007), die während der NHE-Hemmung durch Amilorid einen verminderten Bikarbonattransport feststellen konnten, denn dieses Ion wurde zur Pufferung der Protonen benötigt. Dies spricht also für eine Inaktivierung bzw. Aktivitätsminderung des AE2 bei Unterschreiten des  $pH_i$  unter einem bestimmten Schwellenwert, damit das Bikarbonat zur Pufferung in der Zelle bleibt.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass apikal  $vH^+$ -ATPasen zur Protonenausschleusung einspringen. Hierfür spricht der bereits erwähnte Stromabfall nach längerer Fettsäureexposition, der durch die Hemmung des NHE und des Anionenaustauschers nochmals gesteigert werden konnte. Bei Gabe von Concanamycin, einem Blocker der  $vH^+$ -ATPase, kommt es hingegen zu keinem Stromabfall. Diese funktionellen Daten lassen eine Beteiligung einer  $H^+$ -ATPase an der Regulation des intraepithelialen pH-Wertes, insbesondere bei starker Belastung, als wahrscheinlich erscheinen. Ein molekularbiologischer Nachweis dieses Transporters ist am Psalterepithel noch nicht erbracht worden, jedoch am Pansenepithel sowohl funktionell als auch molekularbiologisch (Etschmann *et al.*, 2006; Schweigel *et al.*, 2007; Schweigel und Martens, 2003).

Am Psalter deuten die vorliegenden Daten daraufhin, dass immer zuerst der NHE und die Anionenaustauscher zur pH-Regulation herangezogen werden und die  $vH^+$ -ATPase erst einspringt, wenn diese Mechanismen nicht ausreichen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein signifikanter Einfluss auf die intrazelluläre Konzentration von Protonen nur zu sehen war, wenn mehrere Transportmechanismen gleichzeitig gehemmt wurden. Es scheint ein sehr komplexes Zusammenspiel zu bestehen, bei denen sich die einzelnen Transporter auch gegenseitig beeinflussen.

Das von Boron (2004) ausführlich erläuterte Grundgesetz der pH-Regulation in der Zelle zeigt diesen Zusammenhang:

$$\frac{dpH_i}{dt} = \frac{J_E - J_L}{\beta}$$

$J_E$  = Gesamtfluss der Säureausschleusung,  $J_L$  = Gesamtfluss der Säureaufnahme,  $\beta$  = Pufferkapazität.

Nicht zu vernachlässigen ist auch die Tatsache, dass alle verwendeten Lösungen Bikarbonat enthielten und mit Carbogen (Sauerstoff mit 5%  $CO_2$ ) begast wurden. Laut Roos und Boron (1981) ist die intrazelluläre Pufferkapazität viel größer, wenn die Zellen in einem Medium liegen, das mit  $CO_2$  begast wird.

### 5.8.2 Transportmodell

Auf der Grundlage der bereits vorliegenden Literaturbefunde und der im Rahmen dieser Arbeit erlangten Kenntnisse ist ein Transportmodell für die Psalterepithelzelle erstellt worden.

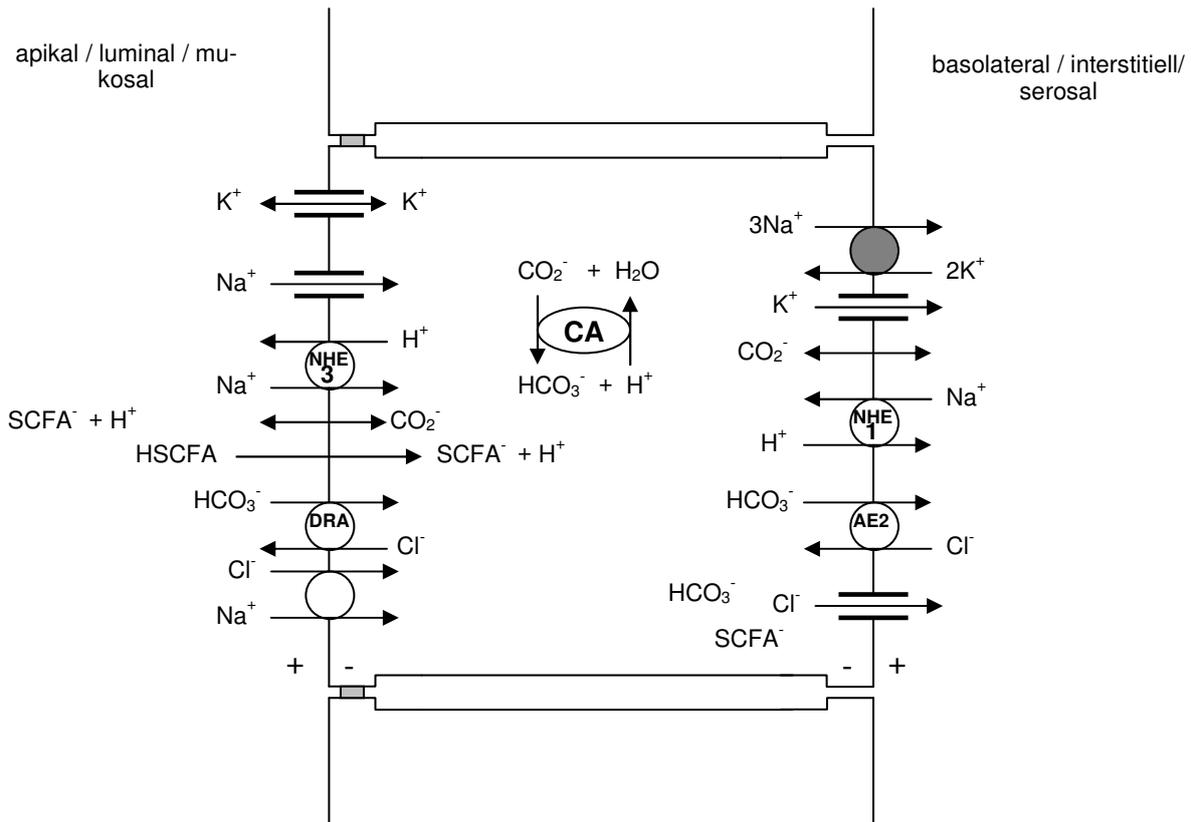


Abbildung 21: Dieses Schema zeigt ein Transportmodell für das Blättermagenepithel des Schafes auf Grundlage bisheriger Untersuchungen und der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse. Die nicht ausgefüllten Kreise stellen Transporter da, die nicht direkt auf Energie in Form von ATP angewiesen sind. Dagegen ist der durch einen grau ausgefüllten Kreis dargestellte Transporter eine ATPase. Zwei parallelen Linien senkrecht zur Membran stehen für einen Ionenkanal. Die Abkürzungen in den Kreisen haben folgende Bedeutungen: NHE3 = der Natrium-Protonen-Austauscher 3, DRA = ein Chlorid-Bikarbonat-Austauscher (down regulated in Adoma), CA = das Enzym Carboanhydrase, NHE1 = der Natrium-Protonen-Austauscher 1, AE2 = ein Chlorid-Bikarbonat-Austauscher (Anionen Exchanger 2). Weitere Erläuterungen finden sich im folgenden Text.

Die apikale Natriumaufnahme erfolgt sowohl elektroneutral als auch elektrogen und wird durch den chemischen nach intrazellulär gerichteten Gradienten für Natrium getrieben. Auf Grund von Untersuchungen von Martens und Gäbel (1988) ist bekannt, dass die apikale Natriumaufnahme hauptsächlich über den elektroneutralen NHE läuft. Dieser Austauscher wurde durch Versuche mit spezifischen Hemmstoffen als ein NHE3 deklariert (Dölle, 2008). Es befindet sich jedoch ein weiterer elektroneutraler Transporter für Natrium in der apikalen Membran, bei dem es sich um einen Natrium-Chlorid-Cotransporter handelt (Ali, 2005). Dieses Ergebnis wurde auch von Dölle (2008) bestätigt.

Auf der serosalen Seite befindet sich ebenfalls ein NHE, der vermutlich durch einen NHE1 repräsentiert wird. Der von Tiling (1997) und Niebuhr (2003) beschriebene Natrium-Chlorid-Kalium-Cotransporter hat laut Ali (2005) keine entscheidende Bedeutung bzw. ist eventuell überhaupt nicht vorhanden und daher nicht mit in das Transportmodell aufgenommen worden.

Die Natrium-Kalium-ATPase ist als wichtigster Transporter für die elektrophysiologischen Zusammenhänge in der serosalen Membran verankert. Sie transportiert elektrogen drei Natrium-Ionen aus der Zelle hinaus im Austausch gegen zwei Kalium-Ionen und ver-

braucht dabei den Energieträger ATP. Kalium wird dabei über basolaterale Kanäle rezirkuliert. So entsteht zum einen ein transepithelialer Strom und zum anderen wird der wichtige Natriumkonzentrationsgradient aufrechterhalten.

Durch die Natriumreduktionsversuche konnte bestätigt werden, dass der Kurzschlussstrom von Natrium getragen wird. Die Arbeiten von Schultheiss (1995) am Psalter weisen darauf hin, dass der elektrogene Einstrom von Natrium ins Epithel durch einen nicht-selektiven Kationenkanal erfolgt, der durch die divalenten Kationen Calcium und Magnesium moduliert wird. Entsprechende Kanäle konnten auch am Pansen nachgewiesen werden (Leonhard-Marek *et al.*, 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Hypothese, dass der Psalter ebenfalls eine apikale Leitfähigkeit exprimiert, die durch Depolarisation geöffnet wird. Auch die Eventualität einer Aktivierung durch Ansäuerung schien bei diesen Experimenten möglich. Daher sollte nicht ausgeschlossen werden, dass der apikale Natriumkanal auch ein ASIC sein kann. Diese werden ebenfalls laut Kellenberger und Schild (2002) von der Calciumkonzentration moduliert. Allerdings werden diese Kanäle vornehmlich an neuronalem Gewebe exprimiert, wo sie eine Rolle in der Schmerzwahrnehmung spielen.

Über die prozentuale Beteiligung der NHEs an der pH-Regulation in der Zelle kann nur gemutmaßt werden, sie dürfte stark von den Versuchsbedingungen abhängen. Es zeigte sich ein sigmoidales Verhalten der einzelnen  $\text{pH}_i$  Werte nach Einsatz des NHE3-Blockers, wobei ein deutlicher und signifikanter Effekt nur bei zeitgleichem Ausschalten des Chloridgradienten zu verzeichnen war.

Eine weitere Rolle bei der pH-Regulation des Psalters spielt sehr wahrscheinlich die  $\text{vH}^+$ -ATPase. Dieser Transporter scheint jedoch nur einzuspringen, wenn die Protonenausschleusung über den NHE nicht ausreichend gewährleistet werden kann. Wie bereits erwähnt, konnte ein funktioneller und molekularbiologischer Nachweis dieses Transporters am Pansenepithel erbracht werden (Etschmann *et al.*, 2006; Schweigel *et al.*, 2007; Schweigel und Martens, 2003).

Nicht unerwähnt bleiben soll auch ein von Höller *et al.* (1988) und Schultheiss (1995) beschriebener basolateraler Natrium-Calcium-Cotransporter, der jedoch nicht Gegenstand dieser Untersuchung war.

Der Bikarbonattransport wird am Blättermagenepithel hauptsächlich vom Chlorid-Bikarbonat-Austauscher übernommen, der sich sowohl in der apikalen als auch in der serosalen Membran befindet. Molekularbiologisch wurden am Psalterepithel der DRA und der AE2 von Wegeler (2007) nachgewiesen, wobei der DRA nur in der apikalen Zellmembran vorkommt (Sterling *et al.*, 2002). Die Triebkraft für den apikalen DRA ist der durch den Natrium-Chlorid-Cotransport aufrechterhaltene Konzentrationsgradient für Chlorid (Beisele, 2008). So wird unter Rezirkulation von Chlorid Natrium und Bikarbonat in die Zelle aufgenommen und somit trägt der Austauscher zur Regulation des intraepithelialen pH-Wertes bei. Eine entscheidende Rolle bei seiner Regulation wird dem *subapikalen* pH-Wert zugeschrieben. Hier ist die intrazelluläre pH-sensitive *modifier-site* am Chlorid-Bikarbonat-Austauscher beteiligt.

Basolateral wird Chlorid über den AE2 im Austausch mit Bikarbonat wieder aus der Zelle ausgeschleust. Dieser Transporter kann zusätzlich einerseits entgegengesetzt transportieren (Bikarbonat in die Zelle) und andererseits Chlorid gegeneinander austauschen (Eladari *et al.*, 1998). Roos und Boron (1981) beschrieben bereits einen Chlorid-Chlorid-Austausch bei steady-state Bedingungen. Einen entscheidenden Einfluss hat der intrazellulä-

re pH-Wert auf diesen Transporter (vermittelt über einen pH-Sensor). So kann der Transporter durch eine erhöhte intrazelluläre Protonenkonzentration in den „reverse mode“ übergehen. Das passt auch zu den Ergebnissen von Beisele *et al.* (2007), die bei einer Hemmung des NHEs durch Amilorid eine verminderte Bikarbonatsekretion beobachten konnten. Zusätzlich darf aber die wichtige Beteiligung des Enzyms Carboanhydrase nicht vergessen werden.

Der *in vivo* bestehende Chloridgradient am Psalter (von mukosal nach serosal) und die im Vergleich zum Zytosol hohe apikale Bikarbonatkonzentration unterstützen eine Resorption von Bikarbonat. Diese Transportrichtung ist für das Tier auch entscheidend, damit möglichst wenig Bikarbonat in den Labmagen gelangt. Dort würde aufgrund des geringen pH-Wertes ansonsten vermehrt CO<sub>2</sub> entstehen und eine Aufgasung begünstigen.

Sowohl am Pansen (Sehested *et al.*, 1999) als auch am Psalter (Ali, 2005) wurde ein basolaterale Anionenkanal postuliert, der mittlerweile an beiden Geweben nachgewiesen werden konnte (Georgi *et al.*, 2010a; Stumpff *et al.*, 2009c). Durch diesen Kanal können neben Chlorid und Bikarbonat auch die Anionen der Fettsäuren gelangen, getrieben vom basolateral über die Natrium-Kalium-ATPase aufgebauten Potential und funktionell an den Transport von Natrium gekoppelt, während apikal Protonen ausgeschleust werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen dieses Modell.

Der basolaterale Efflux der Fettsäuren ist hingegen nur unzureichend geklärt. Eine Lipiddiffusion scheidet aufgrund der geringen zytosolischen Protonenkonzentration aus. Der am Pansen funktionell nachgewiesene Monocarboxylat-Transporters (MCT) transportiert die Fettsäuren gemeinsam mit einem Proton aus der Zelle heraus (Müller *et al.*, 2002) und ist daher am Psalter unwahrscheinlich für große Mengen. Die mRNA dieses Transporters (MCT1) wurde im Psalterepithel nachgewiesen (Kirat *et al.*, 2006).

Es ist nicht auszuschließen, dass weitere Transporter im Psalterepithel vorhanden sind, die Protonen transportieren können. So wäre beispielsweise ein Peptid-Protonen-Cotransport möglich, der unter anderen von Thwaites *et al.* (2002) beschrieben wurde. Auch Pan *et al.* (1997) konnten an Oozyten, denen poly(A)<sup>+</sup> RNA vom Blättermagen des Schafes injiziert wurden, zeigen, dass eine Erhöhung des pH-Wertes des Puffers bzw. ein erniedrigter Protonengradienten den Peptidtransport verminderte.

Weitere Versuche sind notwendig, um die Transportmechanismen und ihre Bedeutung endgültig zuordnen zu können.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG – SUMMARY

### 6.1 Zusammenfassung

*Untersuchungen zur pH-Regulation am Blättermagenepithel des Schafes mit H<sup>+</sup>-sensitiven Mikroelektroden*

Eine Hauptfunktion des Blättermagens liegt in der Absorption von kurzkettigen Fettsäuren und Bikarbonat. Diese Aufnahme bedingt effektive Mechanismen zur Regulation des intrazellulären pH-Wertes. Zur Charakterisierung der beteiligten Mechanismen ist im Rahmen dieser Arbeit eine neue Methode etabliert worden, mit der es möglich ist, den pH-Wert sowohl *supraapikal* (direkt an der apikalen Oberfläche des Epithels) als auch *subapikal* (in der Epithelzelle) zu messen. Diese double-barreled H<sup>+</sup>-sensitiven Mikroelektroden wurden in Kombination mit einer modifizierten Ussing-Kammer eingesetzt. Auf diese Weise konnten die Auswirkungen von veränderten Ionenkonzentrationen und von Hemmstoffen verschiedener Transportmechanismen auf den *supra-* und *subapikal* pH-Wert und auf die elektrophysiologischen Parameter aufgezeichnet werden.

Mit Hilfe der Natriumreduktionsversuche, die zum Teil mit einer erhöhten Kaliumkonzentration kombiniert wurden, konnte bekräftigt werden, dass der transepitheliale Strom hauptsächlich von Natrium getragen wird. Außerdem wurde damit die Hypothese von Schultheiss (1995) bestätigt, der in dem apikalen Natriumkanal einen nicht-selektiven Kationenkanal sieht. Die hemmende Wirkung auf diesen Kanal wird von Calcium bzw. Magnesium durch eine Depolarisation (in diesem Fall bedingt durch eine luminale Kaliumerhöhung) aufgehoben. Auch die von Schultheiss postulierte Anwesenheit eines apikalen Kaliumkanals konnte mit diesen Versuchen bestätigt werden. Der parazelluläre Fluss von Natrium und Chlorid scheint hingegen gering zu sein.

Die double-barreled H<sup>+</sup>-sensitiven Mikroelektrode wurde zur Messung des pH-Wertes etabliert. Die Elektroden hatten pro pH-Einheit eine Spannungsabweichung von  $57,91 \text{ mV} \pm 2,65$  ( $n = 58$ ), die nahezu mit dem wünschenswerten Nernst-Potential übereinstimmten. Die routinemäßige Herstellung von Elektroden mit diesen idealen Eigenschaften erwies sich jedoch als zeitaufwendig und schwierig.

Die Hypothese eines *supraapikalen* Mikroklimas konnte mittels dieser Mikroelektroden bestätigt werden. Der während der Standardinkubation gemessene pH-Wert direkt an der apikalen Oberfläche des Epithels war mit einem Wert von  $7,23 \pm 0,02$  signifikant geringer als der pH-Wert (7,4) in der mukosalen Perfusionslösung (*bulksolution*).

Die Messung des pH-Wertes in der Psalterepithelzelle ergab mit  $7,30 \pm 0,02$  ebenfalls einen signifikant saureren pH-Wert im Vergleich zu dem in der *bulksolution* (Standardpuffer, pH-Wert 7,4). Wurde das Epithel mukosal mit einem fettsäurehaltigen Puffer (pH 7,4) inkubiert, fiel der pH-Wert in der Zelle unter dem des apikalen Puffers. Hatte der Fettsäurepuffer einen pH-Wert von 6,4, so konnte intrazellulär stets ein weitaus höherer Wert als im apikalen Medium gemessen werden.

Durch den Einsatz von Hemmstoffen bestimmter Transportmechanismen konnte gezeigt werden, dass die pH-Regulation der Psalterepithelzelle aus einem komplexen Zusammenspiel mehrerer Transportmechanismen besteht. So wird der Ausfall eines Mechanismus durch verstärkte Aktivität der Übrigen kompensiert. Zu diesen Transportern gehören in erster Linie die Natrium-Protonen-Austauscher, insbesondere der apikale NHE3. Dieser Transporter sorgt für die Ausschleusung der Protonen, die hauptsächlich über die Diffusion der protonierten kurzkettigen Fettsäuren in die Zelle gelangen.

Zusätzlich zu dem NHE sind die Chlorid-Bikarbonat-Austauscher an der pH-Regulation beteiligt. Der apikale Transporter (DRA) befördert Bikarbonat in die Zelle und Chlorid hinaus. Dies wird ermöglicht durch den transepithelialen Chloridgradienten und durch die Aktivität eines apikalen Natrium-Chlorid-Cotransporters, der für eine hohe (lokale) intrazelluläre Chloridkonzentration sorgt. Durch die Aufnahme von Bikarbonat können die Protonen in der Zelle neutralisiert werden. Zusätzlich wird Natrium aufgenommen und Chlorid recirculiert. Serosal schleust der AE2 Transporter ein Bikarbonat-Ion im Austausch gegen ein Chlorid-Ion aus der Zelle heraus. Der Transporter arbeitet entsprechend des Chloridgradienten.

Es finden sich auch funktionelle Hinweise auf die Aktivität einer apikalen  $\text{vH}^+$ -ATPase, die ebenfalls Protonen aus der Zelle herausschleust. Sie scheint jedoch im Wesentlichen nach dem Ausfall anderer regulatorischer Mechanismen als „Notbremse“ zum Einsatz zu kommen. Eine zu starke Hyperpolarisation der apikalen Membran dürfte dabei durch einen verstärkten Einstrom von Natrium über den apikalen nicht-selektiven Kationenkanal verhindert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sprechen somit für eine rigorose Regulation der intrazellulären Protonenkonzentration des Psalterepithels. Fettsäuren gelangen apikal mit Protonen in das Epithel und werden serosal über verschiedene Mechanismen wieder ausgeschleust. Das im Austausch für Protonen aufgenommene Natrium wird basolateral über die Natrium-Kalium-ATPase aus der Zelle heraustransportiert. Der serosale Efflux der Fettsäureanionen wird vermutlich über den am Pansenepithel beschriebenen hochleitenden Anionenkanal erfolgen. Dieser Transport wird vom basolateralen Potential getrieben und ist somit funktionell an den Transport von Natrium gekoppelt.

## 6.2 Summary

### *Investigations on the pH regulation in the omasum epithelium of the sheep with H<sup>+</sup>-sensitive microelectrodes*

A major function of the omasum is the absorption of short chain fatty acids and bicarbonate. This admission requires effective mechanisms for regulation of the intracellular pH. For the characterisation of the involved mechanisms a new method has been established within the framework of this research. With such method it is possible to measure the *supraapical* (directly on the apical surface of the epithelium) as well as the *subapical* (in the epithelium cell) pH value. These double barreled H<sup>+</sup>-sensitive microelectrodes were used in combination with a modified Ussing chamber. Thus the effects of changed ion concentrations and of inhibitors of different transport mechanisms could be noted on the *supra-* and *subapical* pH value and on the electrophysiological parameters.

By means of the sodium reduction experiments, which were partly combined with a raised potassium concentration, it could be affirmed that the transepithelial current is mainly carried by sodium. Furthermore, the hypothesis of Schultheiss (1995) was confirmed in whose opinion the apical sodium channel as a non-selective cation channel. The restraining effect on this channel is abolished by calcium or magnesium caused through a depolarisation (in this case due to a luminal potassium increase). The presence of an apical potassium channel, which Schultheiss postulated, could be also confirmed with these trials. However, the paracellular flux of sodium and chloride seems to be low.

The double-barreled H<sup>+</sup>-sensitive microelectrode was established to measure the pH value. The electrodes had a voltage deviation of  $57.91 \pm 2.65$  mV ( $n = 58$ ) per pH unit, which almost agreed with the desirable Nernst-potential. The routinely manufacturing of electrodes with these ideal characteristics, however, proved to be time-consuming and difficult.

The hypothesis of a *supraapical* microclimate could be confirmed by the application of these microelectrodes. Directly at the apical surface of the epithelium, during the standardincubation, the measured pH value was significantly lower ( $7,23 \pm 0.02$ ) than the pH value (7,4) in the mucosal perfusion solution (*bulksolution*).

The results of the measurement of the pH value in the epithelium cell of the omasum were with  $7.30 \pm 0.02$  also more acidic in comparison to the pH of the *bulksolution* (standard buffer, pH 7.4). If the mucosal epithelium was incubated with a fatty-acid buffer (pH 7,4), the pH value in the cell dropped under that of the apical buffer. If the fatty acid buffer had a pH value of 6,4, it was always possible to measure a much higher value in the cell than in the apical buffer.

By using inhibitors of specific transport mechanisms it could be shown that the pH regulation of the psalter epithelium cell is represented by a complex interaction of several transport mechanisms. Thus the failure of one mechanism is compensated by reinforced activities of the remaining. These transporters are primarily the sodium-proton-exchanger, in particular the apical NHE3. Such transporter provides for the ejection of protons, which reach the cell mainly by the diffusion of the protonated short chain fatty acids.

In addition to the NHE, the chloride bicarbonate exchangers are involved in the pH-regulation. The apical transporter (DRA) carries bicarbonate into the cell and chloride out of

the cell. This is enabled by the transepithelial chloride gradient and by the activity of an apical sodium-chloride-cotransporter, which ensures a high (local) intracellular chloride concentration. The protons in the cell can be neutralized by the admission of bicarbonate. Furthermore sodium is taken up, whereby chloride is recirculated. On the serosal side the AE2 transporter channels one bicarbonate ion in the exchange against one chloride ion out of the cell. The transporter works corresponded to the chloride gradient.

There are also functional references to the activity of an apical  $vH^+$ -ATPase, which also channels protons out of the cell. It seems to be used, however, basically after the failure of other regulatory mechanisms as an "emergency brake". An excessive hyperpolarization of the apical membrane might be prevented thereby by an increased influx of sodium across the apical non-selective cation channel.

Therefore results gained within the scope of this thesis argue for a rigorous regulation of the intracellular proton concentration of the omasal epithelium. Fatty acids reach the epithelium apically together with protons and were discharged serosal again through different mechanisms. The sodium taken up in the exchange for protons is transported out of the cell basolateral over the sodium-potassium ATPase. The serosal efflux of the fatty acid anion probably occurs by the highly conductive anion channel described in the rumen. This transport is driven by the basolateral potential and is thus functionally linked to the transport of sodium.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- ABDOUN, K.; STUMPF, F.; RABBANI, I. und MARTENS, H. (2010)  
Modulation of urea transport across sheep rumen epithelium in vitro by SCFA and CO<sub>2</sub>.  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **298**(2): S. G190-202
- ABDOUN, K.; STUMPF, F.; WOLF, K. und MARTENS, H. (2005)  
Modulation of electroneutral Na transport in sheep rumen epithelium by luminal ammonia.  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **289**(3): S. G508-20
- AGGAZZOTTI, A. (1910)  
Esperienze sulla funzione assorbente degli stomaci nei ruminanti.  
La Clinica Veterinaria **33**: S. 54-75
- AHARONOVITZ, O.; KAPUS, A.; SZASZI, K.; COADY-OSBERG, N.; JANCALEWICZ, T.;  
ORLOWSKI, J. und GRINSTEIN, S. (2001)  
Modulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity by Cl.  
Am J Physiol Cell Physiol **281**(1): S. C133-41
- ALI, O. (2005)  
*In vitro* Studies of Ion Transport in Sheep Omasum: Interaction between Na, Cl and Short  
Chain Fatty Acids  
Diss., Berlin, Freie Universität,
- ALI, O.; SHEN, Z.; TIETJEN, U. und MARTENS, H. (2006)  
Transport of acetate and sodium in sheep omasum: mutual, but asymmetric interactions.  
J Comp Physiol [B] **176**(5): S. 477-87
- ALLEN, M. S. (1997)  
Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for  
physically effective fiber.  
J Dairy Sci **80**(7): S. 1447-62
- ALPER, S. L.; CHERNOVA, M. N. und STEWART, A. K. (2001)  
Regulation of Na<sup>+</sup>-independent Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchangers by pH.  
Jop **2**(4 Suppl): S. 171-5
- ALPER, S. L.; DARMAN, R. B.; CHERNOVA, M. N. und DAHL, N. K. (2002)  
The AE gene family of Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchangers.  
J Nephrol **15** Suppl **5**: S. S41-53
- AMMANN, D.; LANTER, F.; STEINER, R. A.; SCHULTHESS, P.; SHIJO, Y. und SIMON, W.  
(1981)  
Neutral carrier based hydrogen ion selective microelectrode for extra- and intracellular  
studies.  
Anal Chem **53**(14): S. 2267-9
- AMMAR, Y. B.; TAKEDA, S.; HISAMITSU, T.; MORI, H. und WAKABAYASHI, S. (2006)  
Crystal structure of CHP2 complexed with NHE1-cytosolic region and an implication for  
pH regulation.  
Embo J **25**(11): S. 2315-25

- ARONSON, P. S.; NEE, J. und SUHM, M. A. (1982)  
 Modifier role of internal H<sup>+</sup> in activating the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger in renal microvillus membrane vesicles.  
 Nature **299**(5879): S. 161-3
- ASCHENBACH, J. R.; BILK, S.; TADESSE, G.; STUMPF, F. und GABEL, G. (2009)  
 Bicarbonate-dependent and bicarbonate-independent mechanisms contribute to nondiffusive uptake of acetate in the ruminal epithelium of sheep.  
 Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **296**(5): S. G1098-107
- ASCHENBACH, J. R. und GABEL, G. (2000)  
 Effect and absorption of histamine in sheep rumen: significance of acidotic epithelial damage.  
 J Anim Sci **78**(2): S. 464-70
- AWAYDA, M. S.; BOUDREAUX, M. J.; REGER, R. L. und HAMM, L. L. (2000)  
 Regulation of the epithelial Na<sup>(+)</sup> channel by extracellular acidification.  
 Am J Physiol Cell Physiol **279**(6): S. C1896-905
- BACHHUBER, T.; KONIG, J.; VOELCKER, T.; MURLE, B.; SCHREIBER, R. und KUNZELMANN, K. (2005)  
 Cl<sup>-</sup> interference with the epithelial Na<sup>+</sup> channel ENaC.  
 J Biol Chem **280**(36): S. 31587-94
- BADAWY, A. M.; CAMPBELL, R. M.; CUTHBERTSON, D. P. und MACKIE, W. S. (1958)  
 Further studies on the changing composition of the digesta along the alimentary tract of the sheep. 3. Changes in the omasum.  
 Br J Nutr **12**(4): S. 391-403
- BAIRD, N. R.; ORLOWSKI, J.; SZABO, E. Z.; ZAUN, H. C.; SCHULTHEIS, P. J.; MENON, A. G. und SHULL, G. E. (1999)  
 Molecular cloning, genomic organization, and functional expression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 5 (NHE5) from human brain.  
 J Biol Chem **274**(7): S. 4377-82
- BALCH, C. C.; KELLY, A. und HEIM, G. (1951)  
 Factors affecting the utilization of food by dairy cows. 4. The action of the reticulo-omasal orifice.  
 Br J Nutr **5**(2): S. 207-16
- BARCROFT, J.; MCANALLY, R. A. und PHILLIPSON, A. T. (1944)  
 Absorption of volatile acids from the alimentary tract of the sheep and other animals.  
 J Exp Biol **20**: S. 120-129
- BECKER, R. B. (1937)  
 Certain points in the physiological processes of the cow.  
 J Dairy Sci **20**: S. 408
- BEISELE, M. (2008)  
 Charakterisierung des HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Transportes des isolierten Psalterepithels des Schafes  
 Diss., Berlin, Freie Universität,
- BEISELE, M.; MARTENS, H. und SIEGLING-VLITAKIS, C. (2007)  
 Bicarbonate absorption in sheep omasum is indirectly linked to Na transport.  
 Poster, GfE Kongress, Göttingen

- 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**(2): S. 567-90
- BERTRAND, B.; WAKABAYASHI, S.; IKEDA, T.; POUYSSEGUR, J. und SHIGEKAWA, M. (1994)  
The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 (NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding proteins. Identification and characterization of calmodulin-binding sites.  
*J Biol Chem* **269**(18): S. 13703-9
- BILK, S. (2007)  
Acetate absorption in the ruminal epithelium of sheep. A bicarbonate-independent mechanism is involved.  
*J Physiol Biochem* **63**(1): S. 15-16
- BILK, S. (2008)  
Mechanismen der anionischen SCFA-Resorption im Pansen des Schafes.  
Diss., Leipzig, Germany, Universität Leipzig,
- BILK, S.; HUHNS, 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
- BÖDEKER, D.; LAMY, S.; MAHLER, M. und HOLLER, H. (1994)  
Effects of short-chain fatty acids on electrophysiological properties and permeability characteristics of sheep (*Ovis aries*) abomasal mucosa.  
*Comp Biochem Physiol A* **107**(1): S. 73-79
- BORON, W. F. (2004)  
Regulation of intracellular pH.  
*Adv Physiol Educ* **28**(1-4): S. 160-79
- BORRELLI, M. J.; CARLINI, W. G.; DEWEY, W. C. und RANSOM, B. R. (1985)  
A simple method for making ion-selective microelectrodes suitable for intracellular recording in vertebrate cells.  
*J Neurosci Methods* **15**(2): S. 141-54
- BOWMAN, G. R.; BEAUCHEMIN, K. A. und SHELFORD, J. A. (2003)  
Fibrolitic enzymes and parity effects on feeding behavior, salivation, and ruminal pH of lactating dairy cows.  
*J Dairy Sci* **86**: S. 565-575
- BRETT, C. L.; WEI, Y.; DONOWITZ, M. und RAO, R. (2002)  
Human Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 6 is found in recycling endosomes of cells, not in mitochondria.  
*Am J Physiol Cell Physiol* **282**(5): S. C1031-41
- BRITTON, R. und KREHBIEL, C. (1993)  
Nutrient metabolism by gut tissues.  
*J Dairy Sci* **76**(7): S. 2125-31

- BROWNLEE, A. und ELLLIOT, J. (1960)  
 Studies on the normal and abnormal structure and function of the omasum of domestic cattle.  
 Br Vet J **116**: S. 467-473
- BUENO, L. und RUCKEBUSCH, Y. (1974)  
 The cyclic motility of the omasum and its control in sheep.  
 J Physiol **238**(2): S. 295-312
- BUGAUT, M. (1987)  
 Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals.  
 Comp Biochem Physiol B **86**(3): S. 439-72
- BUSCHE, R. und VON ENGELHARDT, W. (2007)  
 pH gradients and a micro-pore filter at the luminal surface affect fluxes of propionic acid across guinea pig large intestine.  
 J Comp Physiol [B] **177**(7): S. 821-31
- CABANTCHIK, Z. I. und GREGER, R. (1992)  
 Chemical probes for anion transporters of mammalian cell membranes.  
 Am J Physiol **262**(4 Pt 1): S. C803-27
- CALDWELL, P. C. (1954)  
 An investigation of the intracellular pH of crab muscle fibres by means of micro-glass and micro-tungsten electrodes.  
 J Physiol **126**(1): S. 169-80
- CASSIDA, K. A. und STOKES, M. R. (1986)  
 Eating and resting salivation in early lactation dairy cows.  
 J Dairy Sci **69**: S. 1282-1292
- CAVET, M. E.; AKHTER, S.; MURTAZINA, R.; SANCHEZ DE MEDINA, F.; TSE, C. M. und DONOWITZ, M. (2001)  
 Half-lives of plasma membrane Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchangers NHE1-3: plasma membrane NHE2 has a rapid rate of degradation.  
 Am J Physiol Cell Physiol **281**(6): S. C2039-48
- CHA, B. und DONOWITZ, M. (2008)  
 The epithelial brush border Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3 associates with the actin cytoskeleton by binding to ezrin directly and via PDZ domain-containing Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor (NHERF) proteins.  
 Clin Exp Pharmacol Physiol **35**(8): S. 863-71
- CHA, B.; OH, S.; SHANMUGARATNAM, J.; DONOWITZ, M. und YUN, C. C. (2002)  
 Two histidine residues in the juxta-membrane cytoplasmic domain of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 3 (NHE3) determine the set point.  
 J Membr Biol **191**(1): S. 49-58
- CHA, B.; TSE, M.; YUN, C.; KOVBASNJUK, O.; MOHAN, S.; HUBBARD, A.; ARPIN, M. und DONOWITZ, M. (2006)  
 The NHE3 juxtamembrane cytoplasmic domain directly binds ezrin: dual role in NHE3 trafficking and mobility in the brush border.  
 Mol Biol Cell **17**(6): S. 2661-73

- CHARNEY, A. N.; MICIC, L. und EGNOR, R. W. (1998)  
Nonionic diffusion of short-chain fatty acids across rat colon.  
*Am J Physiol* **274**(3 Pt 1): S. G518-24
- CHO, J. H.; MUSCH, M. W.; DEPAOLI, A. M.; BOOKSTEIN, C. M.; XIE, Y.; BURANT, C. F.;  
RAO, M. C. und CHANG, E. B. (1994)  
Glucocorticoids regulate Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange expression and activity in region- and tissue-  
specific manner.  
*Am J Physiol* **267**(3 Pt 1): S. C796-803
- CHOI, J. Y.; MUALLEM, D.; KISELYOV, K.; LEE, M. G.; THOMAS, P. J. und MUALLEM, S.  
(2001)  
Aberrant CFTR-dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in mutations associated with cystic fibrosis.  
*Nature* **410**(6824): S. 94-7
- CHU, J.; CHU, S. und MONTROSE, M. H. (2002)  
Apical Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange near the base of mouse colonic crypts.  
*Am J Physiol Cell Physiol* **283**(1): S. C358-72
- CHU, S. und MONTROSE, M. H. (1999)  
The glow of the colonic pH microclimate kindled by short-chain fatty acids, chloride and  
bicarbonate.  
*J Physiol* **517** ( Pt 2): S. 315
- COLES, J. A. und TSACOPOULOS, M. (1977)  
A method of making fine double-barrelled potassium-sensitive micro-electrodes for intra-  
cellular recording [proceedings].  
*J Physiol* **270**(1): S. 12P-14P
- CRICHLLOW, E. C. (1989)  
Loss of forestomach motility in sheep experiencing ruminal lactic acidosis is not depen-  
dent on duodenal acidification by lactic acid.  
*Zentralbl Veterinarmed A* **36**(1): S. 39-45
- CRICHLLOW, E. C. und LEEK, B. F. (1986)  
Forestomach epithelial receptor activation by rumen fluids from sheep given intraruminal  
infusions of volatile fatty acids.  
*Am J Vet Res* **47**(5): S. 1015-8
- DAWSON, J. und DJAMGOZ, M. B. (1988)  
Quantitative analysis of resting membrane electrogenesis in insect (diptera) skeletal  
muscle. I. Intracellular K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> activities, measured using liquid ion-exchanger  
and neutral ion-carrier microelectrodes.  
*J Exp Biol* **136**: S. 417-32
- DE HEMPTINNE, A. (1980)  
Intracellular pH and surface pH in skeletal and cardiac muscle measured with a double-  
barrelled pH microelectrode.  
*Pflugers Arch* **386**(2): S. 121-6
- DEVEAU, J. S.; LINDINGER, M. I. und GRODZINSKI, B. (2005)  
An improved method for constructing and selectively silanizing double-barreled, neutral  
liquid-carrier, ion-selective microelectrodes.  
*Biol Proced Online* **7**: S. 31-40

- DIENER, M.; HELMLE-KOLB, C.; MURER, H. und SCHARRER, E. (1993)  
 Effect of short-chain fatty acids on cell volume and intracellular pH in rat distal colon.  
*Pflugers Arch* **424**(3-4): S. 216-23
- DIENER, M. und SCHARRER, E. (1997)  
 Effects of short-chain fatty acids on cell volume regulation and chloride transport in the rat distal colon.  
*Comp Biochem Physiol A Physiol* **118**(2): S. 375-9
- DIERNAES, L.; SEHESTED, J.; MOLLER, P. D. und SKADHAUGE, E. (1994)  
 Sodium and chloride transport across the rumen epithelium of cattle in vitro: effect of short-chain fatty acids and amiloride.  
*Exp Physiol* **79**(5): S. 755-62
- DÖLLE, M. (2008)  
 Charakterisierung des Na<sup>+</sup>-Transportes am isolierten Psalterepithel des Schafes  
 Diss., Berlin, Freie Universität,
- DONOWITZ, M.; CHA, B.; ZACHOS, N. C.; BRETT, C. L.; SHARMA, A.; TSE, C. M. und LI, X. (2005)  
 NHERF family and NHE3 regulation.  
*J Physiol* **567**(Pt 1): S. 3-11
- DONOWITZ, M. und LI, X. (2007)  
 Regulatory binding partners and complexes of NHE3.  
*Physiol Rev* **87**(3): S. 825-72
- DORWART, M. R.; SHCHEYNIKOV, N.; WANG, Y.; STIPPEC, S. und MUALLEM, S. (2007)  
 SLC26A9 is a Cl(-) channel regulated by the WNK kinases.  
*J Physiol* **584**(Pt 1): S. 333-45
- DORWART, M. R.; SHCHEYNIKOV, N.; YANG, D. und MUALLEM, S. (2008)  
 The solute carrier 26 family of proteins in epithelial ion transport.  
*Physiology (Bethesda)* **23**: S. 104-14
- DROOGMANS, G.; PRENEN, J.; EGGERMONT, J.; VOETS, T. und NILIUS, B. (1998)  
 Voltage-dependent block of endothelial volume-regulated anion channels by calix[4]arenes.  
*Am J Physiol* **275**(3 Pt 1): S. C646-52
- 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<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 3 accumulates and is functional in recycling endosomes.  
*J Biol Chem* **273**(4): S. 2035-43
- EDELMAN, A.; FRITSCH, J. und BALSAN, S. (1986)  
 Short-term effects of PTH on cultured rat osteoblasts: changes in membrane potential.  
*Am J Physiol* **251**(4 Pt 1): S. C483-90
- EDRISE, B. M. und SMITH, R. H. (1986)  
 Exchanges of magnesium and phosphorus at different sites in the ruminant stomach.  
*Arch Tierernahr* **36**(11): S. 1019-27

- 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 concentration of bicarbonate (including carbon dioxide) and chloride 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<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 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 des Wiederkäuers.  
 Arch wiss prakt Tierheilkunde **7**: S. 17-58
- ERDMANN, R. A. (1988)  
 Dietary Buffering Requirements of the Lactating Dairy Cow: A Review.  
 J Dairy Sci **71**: S. 3246-3266
- ETSCHMANN, B.; HEIPERTZ, K. S.; VON DER SCHULENBURG, A. und SCHWEIGEL, M. (2006)  
 A vH<sup>+</sup>-ATPase is present in cultured sheep ruminal epithelial cells.  
 Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **291**(6): S. G1171-9
- FAVILLI, N. (1937)  
 Struktur und Tätigkeit des dritten Magens (Blättermagen oder Psalter) bei den Hauswiederkäuern.  
 Dtsch tierärztl Wschr **45**: S. 592-594
- FITCH, C. A.; WHITTEN, S. T.; HILSER, V. J. und GARCIA-MORENO, E. B. (2006)  
 Molecular mechanisms of pH-driven conformational transitions of proteins: insights from continuum electrostatics calculations of acid unfolding.  
 Proteins **63**(1): S. 113-26
- FOLKESSON, H. G. (2008)  
 Variations in ENaC subunit composition may determine amiloride sensitivity and beta-adrenergic stimulation of lung fluid absorption.  
 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **294**(3): S. L399-400
- FROMM, M. und SCHULTZ, S. G. (1981)  
 Some properties of KCl-filled microelectrodes: correlation of potassium "leakage" with tip resistance.  
 J Membr Biol **62**(3): S. 239-44
- FURUKAWA, O.; BI, L. C.; GUTH, P. H.; ENGEL, E.; HIROKAWA, M. und KAUNITZ, J. D. (2004)  
 NHE3 inhibition activates duodenal bicarbonate secretion in the rat.  
 Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **286**(1): S. G102-9

- GÄBEL, G.; ASCHENBACH, J. R. und MÜLLER, F. (2002)  
Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: implications and limitations.  
*Anim Health Res Rev* **3**(1): S. 15-30
- GÄBEL, G.; BUTTER, H. und MARTENS, H. (1999)  
Regulatory role of cAMP in transport of Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> and short-chain fatty acids across sheep ruminal epithelium.  
*Exp Physiol* **84**(2): S. 333-45
- 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 CO<sub>2</sub> as regulators of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> absorption in isolated sheep rumen mucosa.  
*J Comp Physiol [B]* **161**(4): S. 419-26
- GARTY, H. und PALMER, L. G. (1997)  
Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation.  
*Physiol Rev* **77**(2): S. 359-96
- GAWENIS, L. R.; STIEN, X.; SHULL, G. E.; SCHULTHEIS, P. J.; WOO, A. L.; WALKER, N. M. und CLARKE, L. L. (2002)  
Intestinal NaCl transport in NHE2 and NHE3 knockout mice.  
*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**(5): S. G776-84
- GENZ, A. K.; V ENGELHARDT, W. und BUSCHE, R. (1999)  
Maintenance and regulation of the pH microclimate at the luminal surface of the distal colon of guinea-pig.  
*J Physiol* **517** ( Pt 2): S. 507-19
- GEORGI, M. I.; MARTENS, H. und STUMPF, F. (2010a)  
Cells of the rumen and the omasum express a conductance permeable to the anions of SCFA.  
in: 19. Symposium der Fachgruppe Physiologie und Biochemie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft,  
Gießen Proc. Fachgruppe Physiologie und Biochemie der DVG  
S. 107
- GEORGI, M. I.; STUMPF, F. und MARTENS, H. (2010b)  
Isolated Ruminal Epithelial Cells of the Sheep Express a Channel Permeable to the Anions of SCFA.  
*Proc Soc Nutr Physiol* **19**: S. 125
- GIESECKE, D. und ENGELHARDT, W. V. (1975)  
[Functions of the omasum in small domestic ruminants. II. Fermentation rate and DNA content].  
*Zentralbl Veterinarmed A* **22**(3): S. 177-86
- GLUCK, S. L. (2004)  
Acid sensing in renal epithelial cells.  
*J Clin Invest* **114**(12): S. 1696-9

- GONDA, T.; MAOUYO, D.; REES, S. E. und MONTROSE, M. H. (1999)  
Regulation of intracellular pH gradients by identified Na/H exchanger isoforms and a short-chain fatty acid.  
Am J Physiol **276**(1 Pt 1): S. G259-70
- GOOD, D. W.; GEORGE, T. und WATTS, B. A., 3RD (1995)  
Basolateral membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange enhances HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> absorption in rat medullary thick ascending limb: evidence for functional coupling between basolateral and apical membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers.  
Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): S. 12525-9
- GOOD, D. W.; WATTS, B. A., 3RD; GEORGE, T.; MEYER, J. W. und SHULL, G. E. (2004)  
Transepithelial HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> absorption is defective in renal thick ascending limbs from Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1 null mutant mice.  
Am J Physiol Renal Physiol **287**(6): S. F1244-9
- GOYAL, S.; VANDEN HEUVEL, G. und ARONSON, P. S. (2003)  
Renal expression of novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform NHE8.  
Am J Physiol Renal Physiol **284**(3): S. F467-73
- GRAY, F. V.; PILGRIM, A. F. und WELLER, R. A. (1954)  
Functions of the omasum in the stomach of the sheep.  
J Exp Biol **31**: S. 49-55
- GREELEY, T.; SHUMAKER, H.; WANG, Z.; SCHWEINFEST, C. W. und SOLEIMANI, M. (2001)  
Downregulated in adenoma and putative anion transporter are regulated by CFTR in cultured pancreatic duct cells.  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **281**(5): S. G1301-8
- GREEN, J.; YAMAGUCHI, D. T.; KLEEMAN, C. R. und MUALLEM, S. (1988)  
Cytosolic pH regulation in osteoblasts. Interaction of Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> with the extracellular and intracellular faces of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger.  
J Gen Physiol **92**(2): S. 239-61
- GREGORY, P. C. (1987)  
Inhibition of reticulo-ruminal motility by volatile fatty acids and lactic acid in sheep.  
J Physiol **382**: S. 355-71
- GRICHTCHENKO, II; CHOI, I.; ZHONG, X.; BRAY-WARD, P.; RUSSELL, J. M. und BORON, W. F. (2001)  
Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a human electroneutral Na(+)-driven Cl-HCO<sub>3</sub> exchanger.  
J Biol Chem **276**(11): S. 8358-63
- GÜNZEL, D. und SCHLUE, W. R. (1996)  
Sodium-magnesium antiport in Retzius neurones of the leech *Hirudo medicinalis*.  
J Physiol **491** ( Pt 3): S. 595-608
- HAMODEH, S. A.; REHN, M.; HASCHKE, G. und DIENER, M. (2004)  
Mechanism of butyrate-induced hyperpolarization of cultured rat myenteric neurones.  
Neurogastroenterol Motil **16**(5): S. 597-604
- 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, R. A.; HEYNES, R. D. und ZURICH, L. (1970)  
Ion transport across isolated omasal epithelium of the sheep.  
J Physiol **207**(1): S. 24P-25P
- HAUFFE, R. und ENGELHARDT, W. (1975)  
[Functions of the omasum of small ruminants. III. Absorption of water].  
Zentralbl Veterinarmed A **22**(4): S. 283-95
- HAUFFE, R. und VON ENGELHARDT, W. (1975)  
[Function of omasum in small domestic ruminants. I. Flow and retention time of solid particles and fluid].  
Zentralbl Veterinarmed A **22**(2): S. 149-63
- HAYASHI, H.; SURUGA, K. und YAMASHITA, Y. (2009)  
Regulation of intestinal Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>- exchanger SLC26A3 by intracellular pH.  
Am J Physiol Cell Physiol
- HENDERSON, R. M.; BELL, P. B.; COHEN, R. D.; BROWNING, C. und ILES, R. A. (1986)  
Measurement of intracellular pH with microelectrodes in rat kidney in vivo.  
Am J Physiol **250**(2 Pt 2): S. F203-9
- HILL, J. K.; BRETT, C. L.; CHYOU, A.; KALLAY, L. M.; SAKAGUCHI, M.; RAO, R. und GILLESPIE, P. G. (2006)  
Vestibular hair bundles control pH with (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> exchangers NHE6 and NHE9.  
J Neurosci **26**(39): S. 9944-55
- HINKE, J. A. M. (1967)  
Cation selective microelectrodes for intracellular use.  
Glass electrodes for hydrogen and other cations. Principles and practice. G. Eisenmann.  
New York: Marcell Dekker: 464
- HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. und KATZ, B. (1952)  
Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo.  
J Physiol **116**(4): S. 424-48
- HOGLUND, P.; HAILA, S.; SOCHA, J.; TOMASZEWSKI, L.; SAARIALHO-KERE, U.; KARJALAINEN-LINDSBERG, M. L.; AIROLA, K.; HOLMBERG, C.; DE LA CHAPELLE, A. und KERE, J. (1996)  
Mutations of the Down-regulated in adenoma (DRA) gene cause congenital chloride diarrhoea.  
Nat Genet **14**(3): S. 316-9
- HÖLLER, 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
- HOLTENIUS, K. und BJORNHAG, G. (1989)  
The significance of water absorption and fibre digestion in the omasum of sheep, goats and cattle.  
Comp Biochem Physiol A **94**(1): S. 105-9
- HUG, M. J.; TAMADA, T. und BRIDGES, R. J. (2003)  
CFTR and bicarbonate secretion by [correction of to] epithelial cells.  
News Physiol Sci **18**: S. 38-42

- IKEDA, T.; SCHMITT, B.; POUYSSEGUR, J.; WAKABAYASHI, S. und SHIGEKAWA, M. (1997)  
Identification of cytoplasmic subdomains that control pH-sensing of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE1): pH-maintenance, ATP-sensitive, and flexible loop domains.  
J Biochem (Tokyo) **121**(2): S. 295-303
- JENSEN, L. J.; SORENSEN, J. N.; LARSEN, E. H. und WILLUMSEN, N. J. (1997)  
Proton pump activity of mitochondria-rich cells. The interpretation of external proton-concentration gradients.  
J Gen Physiol **109**(1): S. 73-91
- JENTSCH, T. J.; STEIN, V.; WEINREICH, F. und ZDEBIK, A. A. (2002)  
Molecular structure and physiological function of chloride channels.  
Physiol Rev **82**(2): S. 503-68
- KANG'ETHE, W.; AIMANOVA, K. G.; PULLIKUTH, A. K. und GILL, S. S. (2007)  
NHE8 mediates amiloride-sensitive Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange across mosquito Malpighian tubules and catalyzes Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport in reconstituted proteoliposomes.  
Am J Physiol Renal Physiol **292**(5): S. F1501-12
- KAWAMATA, K.; HAYASHI, H. und SUZUKI, Y. (2006)  
Chloride-dependent bicarbonate secretion in the mouse large intestine.  
Biomed Res **27**(1): S. 15-21
- KAWAMATA, K.; HAYASHI, H. und SUZUKI, Y. (2007)  
Propionate absorption associated with bicarbonate secretion in vitro in the mouse cecum.  
Pflugers Arch **454**(2): S. 253-62
- KELLENBERGER, S. und SCHILD, L. (2002)  
Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure.  
Physiol Rev **82**(3): S. 735-67
- KHURI, R. N.; BOGHARIAN, K. K. und AGULIAN, S. K. (1974)  
Intracellular bicarbonate in single skeletal muscle fibers.  
Pflugers Arch **349**(4): S. 285-94
- KIM, K. H.; SHCHEYNIKOV, N.; WANG, Y. und MUALLEM, S. (2005)  
SLC26A7 is a Cl<sup>-</sup> channel regulated by intracellular pH.  
J Biol Chem **280**(8): S. 6463-70
- KIRAT, D.; INOUE, H.; IWANO, H.; HIRAYAMA, K.; YOKOTA, H.; TANIYAMA, H. und KATO, S. (2005)  
Expression and distribution of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) in the gastrointestinal tract of calves.  
Res Vet Sci **79**(1): S. 45-50
- KIRAT, D.; MASUOKA, J.; HAYASHI, H.; IWANO, H.; YOKOTA, H.; TANIYAMA, H. und KATO, S. (2006)  
Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) plays a direct role in short-chain fatty acids absorption in caprine rumen.  
J Physiol **576**(Pt 2): S. 635-47

- KIRAT, D.; MATSUDA, Y.; YAMASHIKI, N.; HAYASHI, H. und KATO, S. (2007)  
Expression, cellular localization, and functional role of monocarboxylate transporter 4 (MCT4) in the gastrointestinal tract of ruminants.  
Gene **391**(1-2): S. 140-9
- KNICKELBEIN, R.; ARONSON, P. S.; SCHRON, C. M.; SEIFTER, J. und DOBBINS, J. W. (1985)  
Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. II. Evidence for Cl-HCO<sub>3</sub> exchange and mechanism of coupling.  
Am J Physiol **249**(2 Pt 1): S. G236-45
- KO, S. B.; LUO, X.; HAGER, H.; ROJEK, A.; CHOI, J. Y.; LICHT, C.; SUZUKI, M.; MUALLEM, S.; NIELSEN, S. und ISHIBASHI, K. (2002)  
AE4 is a DIDS-sensitive Cl(-)/HCO(-)(3) exchanger in the basolateral membrane of the renal CCD and the SMG duct.  
Am J Physiol Cell Physiol **283**(4): S. C1206-18
- KO, S. B.; ZENG, W.; DORWART, M. R.; LUO, X.; KIM, K. H.; MILLEN, L.; GOTO, H.; NARUSE, S.; SOYOMBO, A.; THOMAS, P. J. und MUALLEM, S. (2004)  
Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters.  
Nat Cell Biol **6**(4): S. 343-50
- KOHN, R. A. und DUNLAP, T. F. (1998)  
Calculation of the buffering capacity of bicarbonate in the rumen and in vitro.  
J Anim Sci **76**(6): S. 1702-9
- KOPP, P. (1999)  
Pendred's syndrome: identification of the genetic defect a century after its recognition.  
Thyroid **9**(1): S. 65-9
- KRAMER, T.; MICHELBERGER, T.; GURTLER, H. und GABEL, G. (1996)  
Absorption of short-chain fatty acids across ruminal epithelium of sheep.  
J Comp Physiol [B] **166**(4): S. 262-9
- KRISHNAN, S.; RAJENDRAN, V. M. und BINDER, H. J. (2003)  
Apical NHE isoforms differentially regulate butyrate-stimulated Na absorption in rat distal colon.  
Am J Physiol Cell Physiol **285**(5): S. C1246-54
- KRISTENSEN, N. B. und HARMON, D. L. (2005)  
Effects of adding valerate, caproate, and heptanoate to ruminal buffers on splanchnic metabolism in steers under washed-rumen conditions.  
J Anim Sci **83**(8): S. 1899-907
- KRISTENSEN, N. B.; PIERZYNOWSKI, S. G. und DANFAER, A. (2000)  
Net portal appearance of volatile fatty acids in sheep intraruminally infused with mixtures of acetate, propionate, isobutyrate, butyrate, and valerate.  
J Anim Sci **78**(5): S. 1372-9
- KRÖLLING, O. und GRAU, H. (1960)  
Lehrbuch der Histologie und Vergleichenden Mikroskopischen Anatomie der Haustiere  
Berlin, Hamburg: Paul Parey
- KUNZELMANN, K. (2001)  
CFTR: interacting with everything?  
News Physiol Sci **16**: S. 167-70

- KUNZELMANN, K. (2003)  
ENaC is inhibited by an increase in the intracellular Cl(-) concentration mediated through activation of Cl(-) channels.  
Pflugers Arch **445**(4): S. 504-12
- KUNZELMANN, K. und SCHREIBER, R. (1999)  
CFTR, a regulator of channels.  
J Membr Biol **168**(1): S. 1-8
- KUNZELMANN, K.; SCHREIBER, R. und BOUCHEROT, A. (2001)  
Mechanisms of the inhibition of epithelial Na(+) channels by CFTR and purinergic stimulation.  
Kidney Int **60**(2): S. 455-61
- KURASHIMA, K.; SZABO, E. Z.; LUKACS, G.; ORLOWSKI, J. und GRINSTEIN, S. (1998)  
Endosomal recycling of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3 isoform is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway.  
J Biol Chem **273**(33): S. 20828-36
- LAMPRECHT, G.; HEIL, A.; BAISCH, S.; LIN-WU, E.; YUN, C. C.; KALBACHER, H.; GREGOR, M. und SEIDLER, U. (2002)  
The down regulated in adenoma (dra) gene product binds to the second PDZ domain of the NHE3 kinase A regulatory protein (E3KARP), potentially linking intestinal Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange to Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange.  
Biochemistry **41**(41): S. 12336-42
- LANG, I. und MARTENS, H. (1999)  
Na transport in sheep rumen is modulated by voltage-dependent cation conductance in apical membrane.  
Am J Physiol **277**(3 Pt 1): S. G609-18
- LANG, K.; WAGNER, C.; HADDAD, G.; BURNEKOVA, O. und GEIBEL, J. (2003)  
Intracellular pH activates membrane-bound Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger and vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase in human embryonic kidney (HEK) cells.  
Cell Physiol Biochem **13**(5): S. 257-62
- LEONHARD-MAREK, S. (2002)  
Divalent cations reduce the electrogenic transport of monovalent cations across rumen epithelium.  
J Comp Physiol [B] **172**(7): S. 635-41
- LEONHARD-MAREK, S.; BREVES, G. und BUSCHE, R. (2006)  
Effect of chloride on pH microclimate and electrogenic Na<sup>+</sup> absorption across the rumen epithelium of goat and sheep.  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **291**(2): S. G246-52
- LEONHARD-MAREK, S. und MARTENS, H. (1996)  
Effects of potassium on magnesium transport across rumen epithelium.  
Am J Physiol **271**(6 Pt 1): S. G1034-8
- LEONHARD-MAREK, S.; STUMPF, F.; BRINKMANN, I.; BREVES, G. und MARTENS, H. (2005)  
Basolateral Mg<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> exchange regulates apical nonselective cation channel in sheep rumen epithelium via cytosolic Mg<sup>2+</sup>.  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **288**(4): S. G630-45

- LEONHARD-MAREK, S.; STUMPF, F. und MARTENS, H. (2009)  
 Transport of Cations and Anions across forestomach epithelia.  
 Ruminant Physiology: Digestion, metabolism, and effects of nutrition on reproduction and welfare. F. G. Y. C, Faulconnier Y, Bocquier F, Veissier I and Doreau M. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers: 50 ff
- LEPKE, S.; FASOLD, H.; PRING, M. und PASSOW, H. (1976)  
 A study of the relationship between inhibition of anion exchange and binding to the red blood cell membrane of 4,4'-diisothiocyano stilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) and its dihydro derivative (H2DIDS).  
 J Membr Biol **29**(1-2): S. 147-77
- LEVINE, S. A.; MONTROSE, M. H.; TSE, C. M. und DONOWITZ, M. (1993)  
 Kinetics and regulation of three cloned mammalian Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers stably expressed in a fibroblast cell line.  
 J Biol Chem **268**(34): S. 25527-35
- LI, S.; SATO, S.; YANG, X.; PREISIG, P. A. und ALPERN, R. J. (2004)  
 Pyk2 activation is integral to acid stimulation of sodium/hydrogen exchanger 3.  
 J Clin Invest **114**(12): S. 1782-9
- LI, T. und FOLKESSON, H. G. (2006)  
 RNA interference for alpha-ENaC inhibits rat lung fluid absorption in vivo.  
 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **290**(4): S. L649-L660
- 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<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger.  
 J Biol Chem **277**(39): S. 36085-91
- LI, X.; LIU, Y.; ALVAREZ, B. V.; CASEY, J. R. und FLIEGEL, L. (2006)  
 A novel carbonic anhydrase II binding site regulates NHE1 activity.  
 Biochemistry **45**(7): S. 2414-24
- LIEBICH, H.-G. (2004)  
 Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Schattauer Verlag
- LINDERHOLM, H. (1952)  
 Active transport of ions through frog skin with special reference to the action of certain diuretics; a study of the relation between electrical properties, the flux of labelled ions, and respiration.  
 Acta Physiol Scand Suppl **27**(97): S. 1-144
- LINDSKOG, S. (1997)  
 Structure and mechanism of carbonic anhydrase.  
 Pharmacol Ther **74**(1): S. 1-20
- LONCKE, C.; ORTIGUES-MARTY, I.; VERNET, J.; LAPIERRE, H.; SAUVANT, D. und NOZIERE, P. (2009)  
 Empirical prediction of net portal appearance of volatile fatty acids, glucose, and their secondary metabolites (beta-hydroxybutyrate, lactate) from dietary characteristics in ruminants: A meta-analysis approach.  
 J Anim Sci **87**(1): S. 253-68

- LUCAS, M. L. und BLAIR, J. A. (1978)  
 The magnitude and distribution of the acid microclimate in proximal jejunum and its relation to luminal acidification.  
 Proc R Soc Lond B Biol Sci **200**(1138): S. 27-41
- LUCAS, M. L.; SCHNEIDER, W.; HABERICH, F. J. und BLAIR, J. A. (1975)  
 Direct measurement by pH-microelectrode of the pH microclimate in rat proximal jejunum.  
 Proc R Soc Lond B Biol Sci **192**(1106): S. 39-48
- LUCIONI, A.; WOMACK, C.; MUSCH, M. W.; ROCHA, F. L.; BOOKSTEIN, C. und CHANG, E. B. (2002)  
 Metabolic acidosis in rats increases intestinal NHE2 and NHE3 expression and function.  
 Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **283**(1): S. G51-6
- LUDWIG, M. G.; VANEK, M.; GUERINI, D.; GASSER, J. A.; JONES, C. E.; JUNKER, U.; HOFSTETTER, H.; WOLF, R. M. und SEUWEN, K. (2003)  
 Proton-sensing G-protein-coupled receptors.  
 Nature **425**(6953): S. 93-8
- LUKIN, J. A. und HO, C. (2004)  
 The structure--function relationship of hemoglobin in solution at atomic resolution.  
 Chem Rev **104**(3): S. 1219-30
- MAGEE, H. E. (1932)  
 Observations on Digestion in the Ruminant.  
 J Exp Biol **9**: S. 409-426
- MALO, M. E. und FLIEGEL, L. (2006)  
 Physiological role and regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 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. A review.  
 Comp Biochem Physiol A **90**(4): S. 569-75
- MARTENS, H.; GABEL, G. und STROZYK, B. (1991)  
 Mechanism of electrically silent Na and Cl transport across the rumen epithelium of sheep.  
 Exp Physiol **76**(1): S. 103-14
- MARTENS, H. und HAMMER, U. (1981)  
 [Magnesium and sodium absorption from the isolated sheep rumen during intravenous aldosterone infusion (author's transl)].  
 Dtsch Tierarztl Wochenschr **88**(10): S. 404-7
- MARTENS, H.; RÜBBELKE, M. und GÄBEL, G. (1990)  
 Evidence for a divalent cation sensitive short circuit current across the isolated rumen of sheep.  
 Pflugers Arch **415**(Suppl. Nr.1): S. R28
- MASEREEL, B.; POCHET, L. und LAECKMANN, D. (2003)  
 An overview of inhibitors of Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger.  
 Eur J Med Chem **38**(6): S. 547-54

- MASSON, M. J. und PHILLIPSON, A. T. (1952)  
The composition of the digesta leaving the abomasum of sheep.  
J Physiol **116**(1): S. 98-111
- MCEWAN, G. T.; DANIEL, H.; FETT, C.; BURGESS, M. N. und LUCAS, M. L. (1988)  
The effect of Escherichia coli STa enterotoxin and other secretagogues on mucosal surface pH of rat small intestine in vivo.  
Proc R Soc Lond B Biol Sci **234**(1275): S. 219-37
- MCSWEENEY, C. S. (1986)  
An omaso-abomasal cannula used to assess efflux from the omasum of sheep.  
Aust Vet J **63**(10): S. 332-4
- MCSWEENEY, C. S. (1988)  
A comparative study of the anatomy of the omasum in domesticated ruminants.  
Aust Vet J **65**(7): S. 205-207
- MELVIN, J. E.; PARK, K.; RICHARDSON, L.; SCHULTHEIS, P. J. und SHULL, G. E. (1999)  
Mouse down-regulated in adenoma (DRA) is an intestinal Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger and is up-regulated in colon of mice lacking the NHE3 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger.  
J Biol Chem **274**(32): S. 22855-61
- MOIR, R. J. (1984)  
Why an omasum?  
Ruminant Physiology: concepts and consequences. S. K. Baker, J. M. Gawthorne, J. B. Mackintosh und D. B. Purser. Perth: University of Western Australia: 85-92
- MOSER, A. J.; GANGOPADHYAY, A.; BRADBURY, N. A.; PETERS, K. W.; FRIZZELL, R. A. und BRIDGES, R. J. (2007)  
Electrogenic bicarbonate secretion by prairie dog gallbladder.  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **292**(6): S. G1683-94
- MUGHARBIL, A.; KNICKELBEIN, R. G.; ARONSON, P. S. und DOBBINS, J. W. (1990)  
Rabbit ileal brush-border membrane Cl-HCO<sub>3</sub> exchanger is activated by an internal pH-sensitive modifier site.  
Am J Physiol **259**(4 Pt 1): S. G666-70
- MÜLLER, F.; HUBER, K.; PFANNKUCHE, H.; ASCHENBACH, J. R.; BREVES, G. und GÄBEL, G. (2002)  
Transport of ketone bodies and lactate in the sheep ruminal epithelium by monocarboxylate transporter 1.  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **283**(5): S. G1139-46
- MUNOZ, J. L.; DEYHIMI, F. und COLES, J. A. (1983)  
Silanization of glass in the making of ion-sensitive microelectrodes.  
J Neurosci Methods **8**(3): S. 231-47
- MUSCH, M. W.; ARVANS, D. L.; WU, G. D. und CHANG, E. B. (2009)  
Functional coupling of the downregulated in adenoma Cl<sup>-</sup>/base exchanger DRA and the apical Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers NHE2 and NHE3.  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **296**(2): S. G202-10
- 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

- NETT, W. und DEITMER, J. W. (1996)  
 Simultaneous measurements of intracellular pH in the leech giant glial cell using 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein and ion-sensitive microelectrodes.  
*Biophys J* **71**(1): S. 394-402
- NICKEL, R.; SCHUMMER, A. und SEIFERLE, E. (1999)  
 Lehrbuch der Anatomie der Haustiere  
 Berlin, Hamburg: Paul Parey Verlag
- NIEBUHR, V. (2003)  
 In vitro Untersuchungen zum Bicarbonattransport des Blättermagenepithels von Schafen  
 Diss., Berlin, Freie Universität.,
- NILIUS, B. und DROOGMANS, G. (2003)  
 Amazing chloride channels: an overview.  
*Acta Physiol Scand* **177**(2): S. 119-47
- NUMATA, M. und ORLOWSKI, J. (2001)  
 Molecular cloning and characterization of a novel (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> exchanger localized to the trans-Golgi network.  
*J Biol Chem* **276**(20): S. 17387-94
- O'BRODOVICH, H.; YANG, P.; GANDHI, S. und OTULAKOWSKI, G. (2008)  
 Amiloride-insensitive Na<sup>+</sup> and fluid absorption in the mammalian distal lung.  
*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **294**(3): S. L401-8
- OHGA, A.; OTA, Y. und NAKAZATO, Y. (1965)  
 The movement of the stomach of sheep with special reference to the omasal movement.  
*Jap J Vet Sci* **27**(3): S. 151-60
- ORLANDO, R. C.; BRYSON, J. C. und POWELL, D. W. (1984)  
 Mechanisms of H<sup>+</sup> injury in rabbit esophageal epithelium.  
*Am J Physiol* **246**(6 Pt 1): S. G718-24
- ORLOWSKI, J. (1993)  
 Heterologous expression and functional properties of amiloride high affinity (NHE-1) and low affinity (NHE-3) isoforms of the rat Na/H exchanger.  
*J Biol Chem* **268**(22): S. 16369-77
- OWSIANIK, G.; D'HOEDT, D.; VOETS, T. und NILIUS, B. (2006a)  
 Structure-function relationship of the TRP channel superfamily.  
*Rev Physiol Biochem Pharmacol* **156**: S. 61-90
- OWSIANIK, G.; TALAVERA, K.; VOETS, T. und NILIUS, B. (2006b)  
 Permeation and selectivity of TRP channels.  
*Annu Rev Physiol* **68**: S. 685-717
- OYAERT, W. und BOUCKAERT, J. H. (1961)  
 A study of the passage of fluid through the sheep's omasum.  
*Res Vet Sci* **2**: S. 41-52
- PAN, Y. X.; WONG, E. A.; BLOOMQUIST, J. R. und WEBB, K. E., JR. (1997)  
 Poly(A)<sup>+</sup> RNA from sheep omasal epithelium induces expression of a peptide transport protein(s) in *Xenopus laevis* oocytes.  
*J Anim Sci* **75**(12): S. 3323-30

- PARKER, M. D.; BOUYER, P.; DALY, C. M. und BORON, W. F. (2008)  
Cloning and characterization of novel human SLC4A8 gene products encoding Na<sup>+</sup>-driven Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger variants NDCBE-A, -C, and -D.  
*Physiol Genomics* **34**(3): S. 265-76
- PARKER, M. D.; OURMOZDI, E. P. und TANNER, M. J. (2001)  
Human BTR1, a new bicarbonate transporter superfamily member and human AE4 from kidney.  
*Biochem Biophys Res Commun* **282**(5): S. 1103-9
- PHILLIPSON, A. T. (1939)  
The movements of the pouches of the stomach of sheep.  
*Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* **29**: S. 395-415
- PHILLIPSON, A. T. und MCANALLY, R. A. (1942)  
Studies on the fate of Carbohydrates in the Rumen of Sheep.  
*J Exp Biol* **19**: S. 199
- PLANELLES, G.; DISCALA, F. und ANAGNOSTOPOULOS, T. (1992)  
Luminal pH in the amphibian distal tubule: effects of carbonic anhydrase and carbonic anhydrase inhibitors.  
*Am J Physiol* **263**(6 Pt 2): S. R1254-9
- PLANELLES, G.; KURKDJIAN, A. und ANAGNOSTOPOULOS, T. (1984)  
Cell and luminal pH in the proximal tubule of Necturus kidney.  
*Am J Physiol* **247**(6 Pt 2): S. F932-8
- PRINS, R. A.; HUNGATE, R. E. und PRAST, E. R. (1972)  
Function of the omasum in several ruminant species.  
*Comp Biochem Physiol A* **43**(1): S. 155-63
- RAGHURAM, V.; HORMUTH, H. und FOSKETT, J. K. (2003)  
A kinase-regulated mechanism controls CFTR channel gating by disrupting bivalent PDZ domain interactions.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(16): S. 9620-5
- RAJENDRAN, V. M.; GEIBEL, J. und BINDER, H. J. (1999)  
Role of Cl channels in Cl-dependent Na/H exchange.  
*Am J Physiol* **276**(1 Pt 1): S. G73-8
- RANDRIANARISON, N.; CLERICI, C.; FERREIRA, C.; FONTAYNE, A.; PRADERVAND, S.; FOWLER-JAEGER, N.; HUMMLER, E.; ROSSIER, B. C. und PLANES, C. (2008)  
Low expression of the beta-ENaC subunit impairs lung fluid clearance in the mouse.  
*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **294**(3): S. L409-16
- RAPEDIUS, M.; HAIDER, S.; BROWNE, K. F.; SHANG, L.; SANSOM, M. S.; BAUKROWITZ, T. und TUCKER, S. J. (2006)  
Structural and functional analysis of the putative pH sensor in the Kir1.1 (ROMK) potassium channel.  
*EMBO Rep* **7**(6): S. 611-6
- RAPEDIUS, M.; PAYNTER, J. J.; FOWLER, P. W.; SHANG, L.; SANSOM, M. S.; TUCKER, S. J. und BAUKROWITZ, T. (2007)  
Control of pH and PIP<sub>2</sub> gating in heteromeric Kir4.1/Kir5.1 channels by H-Bonding at the helix-bundle crossing.  
*Channels (Austin)* **1**(5): S. 327-30

- REMOND, D.; ORTIGUES, I. und JOUANY, J. P. (1995)  
 Energy substrates for the rumen epithelium.  
 Proc Nutr Soc **54**(1): S. 95-105
- REUSS, L. und FINN, A. L. (1975)  
 Electrical properties of the cellular transepithelial pathway in Necturus gallbladder. II. Ionic permeability of the apical cell membrane.  
 J Membr Biol **25**(1-2): S. 141-161
- REYNOLDS, M. (1953)  
 Measurement of bovine plasma and blood volume during pregnancy and lactation.  
 Am J Physiol **175**: S. 118-122
- RITTER, M.; FUERST, J.; WOLL, E.; CHWATAL, S.; GSCHWENTNER, M.; LANG, F.; DEETJEN, P. und PAULMICHL, M. (2001)  
 Na(+)/H(+)exchangers: linking osmotic dysequilibrium to modified cell function.  
 Cell Physiol Biochem **11**(1): S. 1-18
- ROMERO, M. F.; FULTON, C. M. und BORON, W. F. (2004)  
 The SLC4 family of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporters.  
 Pflugers Arch **447**(5): S. 495-509
- RÖNNAU, K. (1984)  
 A simplified method for silanization of doublebarrelled ion-sensitive microelectrodes.  
 Experientia, Birkhäuser Verlag **40**: S. 1019-1020
- ROOS, A. und BORON, W. F. (1981)  
 Intracellular pH.  
 Physiol Rev **61**(2): S. 296-434
- SABIROV, R. Z. und OKADA, Y. (2004)  
 Wide nanoscopic pore of maxi-anion channel suits its function as an ATP-conductive pathway.  
 Biophys J **87**(3): S. 1672-85
- SABIROV, R. Z. und OKADA, Y. (2009)  
 The maxi-anion channel: a classical channel playing novel roles through an unidentified molecular entity.  
 J Physiol Sci **59**(1): S. 3-21
- SAITO, Y.; OZAWA, T. und NISHIYAMA, A. (1990)  
 Effects of intra- and extracellular H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> concentrations on Na(+)-H<sup>+</sup> antiport activity in the lacrimal gland acinar cells.  
 Pflugers Arch **417**(4): S. 382-90
- SCHEFFLER, A. (1984)  
 Charakterisierung der Wirkung von Pharmaka auf die Elektrophysiologischen Parameter Gastrointestinaler Epithelgewebe mit einer Mikrocomputer-gesteuerten Strom- und Spannungsklemmeinrichtung  
 Diss., Medizinische Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen,
- SCHLICHTER, L. C.; GRYGORCZYK, R.; PAHAPILL, P. A. und GRYGORCZYK, C. (1990)  
 A large, multiple-conductance chloride channel in normal human T lymphocytes.  
 Pflugers Arch **416**(4): S. 413-21

- SCHRÖDER, B. und DIENER, M. (2000)  
 Grundlagen der Zellphysiologie.  
 Physiologie der Haustiere. W. von Engelhardt und G. Breves. Stuttgart: Enke: 5-22
- 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<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger.  
 Nat Genet **19**(3): S. 282-5
- SCHULTHEISS, G. (1995)  
 Calcium-sensitiver, elektrogener Natriumtransport des Psalterepithels von Schafen  
 Diss., Berlin, Freie Universität,
- SCHULTHEISS, G. und DIENER, M. (1998)  
 Inhibition of a K<sup>+</sup> conductance by the phosphatase inhibitor calyculin A in rat distal colon.  
 Eur J Pharmacol **349**(1): S. 89-95
- SCHULTHEISS, G. und MARTENS, H. (1999)  
 Ca-sensitive Na transport in sheep omasum.  
 Am J Physiol **276**(6 Pt 1): S. G1331-44
- SCHULTZ, S. G.; THOMPSON, S. M. und SUZUKI, Y. (1981)  
 Equivalent electrical circuit models and the study of Na transport across epithelia: nonsteady-state current-voltage relations.  
 Fed Proc **40**(10): S. 2443-9
- SCHULTZ, S. G.; ZALUSKY, R. und GASS, A. E., JR. (1964)  
 Ion Transport in Isolated Rabbit Ileum. 3. Chloride Fluxes.  
 J Gen Physiol **48**: S. 375-8
- SCHUMMER, A. und NICKEL, R. (1960)  
 Lehrbuch der Anatomie der Haustiere  
 Berlin, Hamburg: Paul Parey
- SCHWARK, J. R.; JANSEN, H. W.; LANG, H. J.; KRICK, W.; BURCKHARDT, G. und HROPOT, M. (1998)  
 S3226, a novel inhibitor of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger subtype 3 in various cell types.  
 Pflugers Arch **436**(5): S. 797-800
- SCHWEIGEL, M.; HEIPERTZ, K. S.; KOLISEK, M. und ZITNAN, R. (2007)  
 Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in rumen epithelium of sheep and cattle: molecular identification, immunolocalization and functional activity.  
 J Physiol Biochem **63**: S. 14-19
- SCHWEIGEL, M. und MARTENS, H. (2003)  
 Anion-dependent Mg<sup>2+</sup> influx and a role for a vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in sheep ruminal epithelial cells.  
 Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **285**(1): S. G45-53
- SCHWEINFEST, C. W.; HENDERSON, K. W.; SUSTER, S.; KONDOH, N. und PAPAS, T. S. (1993)  
 Identification of a colon mucosa gene that is down-regulated in colon adenomas and adenocarcinomas.  
 Proc Natl Acad Sci U S A **90**(9): S. 4166-70

- SCHWIENING, C. J. (1999)  
 Measurement of intracellular pH: a comparison between ion-sensitive microelectrodes and fluorescent dyes.  
 Regulation of Tissue pH in Plants and Animals: A Reappraisal of Current Techniques. S. Egginton, E. W. Taylor und J. A. Raven. Cambridge: Cambridge University Press: Society for Experimental Biology Seminar Series. 68: 1-17
- SEHESTED, J.; DIERNAES, L.; MOLLER, P. D. und SKADHAUGE, E. (1996)  
 Transport of sodium across the isolated bovine rumen epithelium: interaction with short-chain fatty acids, chloride and bicarbonate.  
 Exp Physiol **81**(1): S. 79-94
- 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
- SEIDLER, U.; SINGH, A. K.; CINAR, A.; CHEN, M.; HILLESHEIM, J.; HOGEMA, B. M. und RIEDERER, B. (2009)  
 The role of the NHERF family of PDZ scaffolding proteins in the regulation of salt and water transport.  
 Ann N Y Acad Sci **1165**: S. 249-260
- SELLERS, A. F. und STEVENS, C. E. (1966)  
 Motor functions of the ruminant forestomach.  
 Physiol Rev **46**(4): S. 634-61
- SEMB, S. O.; AMUNDSEN, B. und SEJERSTED, O. M. (1997)  
 A new improved way of making double-barrelled ion-selective micro-electrodes.  
 Acta Physiol Scand **161**(1): S. 1-5
- SHEN, Z.; YANG, W. und MARTENS, H. (2008)  
 Detection of NHE1 and NHE3 mRNA in omasal epithelium in 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
- SHIAU, Y. F. (1990)  
 Mechanism of intestinal fatty acid uptake in the rat: the role of an acidic microclimate.  
 J Physiol **421**: S. 463-74
- SHIAU, Y. F.; FERNANDEZ, P.; JACKSON, M. J. und MCMONAGLE, S. (1985)  
 Mechanisms maintaining a low-pH microclimate in the intestine.  
 Am J Physiol **248**(6 Pt 1): S. G608-17
- SICILIANO-JONES, J. und MURPHY, M. R. (1989)  
 Production of volatile fatty acids in the rumen and cecum-colon of steers as affected by forage:concentrate and forage physical form.  
 J Dairy Sci **72**(2): S. 485-92
- SILANIKOVE, N. (1994)  
 The struggle to maintain hydration and osmoregulation in animals experiencing severe dehydration and rapid rehydration: the story of ruminants.  
 Exp Physiol **74**: S. 281-300

- SMITH, R. H. (1984)  
Microbial activity in the omasum.  
Proc Nutr Soc **43**(1): S. 63-8
- SOLEIMANI, M.; GREELEY, T.; PETROVIC, S.; WANG, Z.; AMLAL, H.; KOPP, P. und BURNHAM, C. E. (2001)  
Pendrin: an apical Cl<sup>-</sup>/OH<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger in the kidney cortex.  
Am J Physiol Renal Physiol **280**(2): S. F356-64
- SRIVASTAVA, J.; BARBER, D. L. und JACOBSON, M. P. (2007)  
Intracellular pH Sensors: Design Principles and Functional Significance.  
Physiology (Bethesda) **22**(1): S. 30-9
- STERLING, D.; BROWN, N. J.; SUPURAN, C. T. und CASEY, J. R. (2002)  
The functional and physical relationship between the DRA bicarbonate transporter and carbonic anhydrase II.  
Am J Physiol Cell Physiol **283**(5): S. C1522-9
- STERLING, D. und CASEY, J. R. (1999)  
Transport activity of AE3 chloride/bicarbonate anion-exchange proteins and their regulation by intracellular pH.  
Biochem J **344 Pt 1**: S. 221-9
- STERLING, D.; REITHMEIER, R. A. und CASEY, J. R. (2001)  
A transport metabolon. Functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bicarbonate exchangers.  
J Biol Chem **276**(51): S. 47886-94
- STEVENS, C. E.; SELLERS, A. F. und SPURRELL, F. A. (1960)  
Function of the bovine omasum in ingesta transfer.  
Am J Physiol **198**(2): S. 449-455
- STEWART, A. K.; CHERNOVA, M. N.; KUNES, Y. Z. und ALPER, S. L. (2001)  
Regulation of AE2 anion exchanger by intracellular pH: critical regions of the NH<sub>2</sub>-terminal cytoplasmic domain.  
Am J Physiol Cell Physiol **281**(4): S. C1344-54
- STEWART, A. K.; KURSCHAT, C. E. und ALPER, S. L. (2007a)  
Role of nonconserved charged residues of the AE2 transmembrane domain in regulation of anion exchange by pH.  
Pflugers Arch **454**(3): S. 373-84
- STEWART, A. K.; KURSCHAT, C. E.; BURNS, D.; BANGER, N.; VAUGHAN-JONES, R. D. und ALPER, S. L. (2007b)  
Transmembrane domain histidines contribute to regulation of AE2-mediated anion exchange by pH.  
Am J Physiol Cell Physiol **292**(2): S. C909-18
- STEWART, A. K.; YAMAMOTO, A.; NAKAKUKI, M.; KONDO, T.; ALPER, S. L. und ISHIGURO, H. (2009)  
Functional coupling of apical Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange with CFTR in stimulated HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion by guinea pig interlobular pancreatic duct.  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol

- STUMPF, F.; BONDZIO, A.; EINSPIANIER, R. und MARTENS, H. (2007)  
Effects of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab on membrane currents of isolated cells of the ruminal epithelium.  
*J Membr Biol* **219**(1-3): S. 37-47
- STUMPF, F.; GEORGIE, M. I. und MARTENS, H. (2009a)  
The ruminal Anionen Channel: A pathway for the efflux of SCFA.  
*Ruminant Physiology: Digestion, metabolism, and effects of nutrition on reproduction and welfare*. F. G. Y. C, Faulconnier Y, Bocquier F, Veissier I and Doreau M. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers: 366-367
- STUMPF, F.; GEORGIE, M. I.; MARTENS, H. und GÄBEL, G. (2009b)  
Ruminal epithelial cells express a conductance for Propionate.  
Giessen
- STUMPF, F. und MARTENS, H. (2007)  
The rumen and potassium homeostasis: a model.  
*J Anim and Feed Sci* **16**(2): S. 436-441
- STUMPF, F.; MARTENS, H.; BILK, S.; ASCHENBACH, J. R. und GABEL, G. (2009c)  
Cultured ruminal epithelial cells express a large-conductance channel permeable to chloride, bicarbonate, and acetate.  
*Pflugers Arch* **457**(5): S. 1003-22
- STUMPF, F.; MARTENS, H. und GÄBEL, G. (2010)  
Ruminal transport of SCFA.  
*Proc. Fachgruppe Physiol und Biochem der DVG*. Hannover: Verlag der DVG: 36-41
- THOMAS, R. C. (1974)  
Intracellular pH of snail neurones measured with a new pH-sensitive glass micro-electrode.  
*J Physiol* **238**(1): S. 159-80
- THOMAS, R. C. (1978)  
Construction and testing of recessed-tip pH-sensitive micro-electrodes [proceedings].  
*J Physiol* **277**: S. 14P-15P
- 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.  
*Gastroenterology* **122**(5): S. 1322-33
- TILING, C. (1997)  
In vitro Untersuchungen zum Chloridionentransport des Blättermagenepithels von Schafen: Diss., Berlin, Freie Universität
- TOMURA, H.; MOGI, C.; SATO, K. und OKAJIMA, F. (2005)  
Proton-sensing and lysolipid-sensitive G-protein-coupled receptors: a novel type of multi-functional receptors.  
*Cell Signal* **17**(12): S. 1466-76
- TOWNE, G. und NAGARAJA, T. G. (1990)  
Omasal ciliated protozoa in cattle, bison, and sheep.  
*Appl Environ Microbiol* **56**(2): S. 409-12

- TRAUTMANN, A. und SCHMITT, I. (1935)  
Experimentelle Untersuchung zur Frage der Psalterfunktion.  
Dtsch tierärztl Wschr **43**: S. 177-179
- TSE, C. M.; LEVINE, S. A.; YUN, C. H.; BRANT, S. R.; POUYSSEGUR, J.; MONTROSE, M. H. und DONOWITZ, M. (1993)  
Functional characteristics of a cloned epithelial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE3): resistance to amiloride and inhibition by protein kinase C.  
Proc Natl Acad Sci U S A **90**(19): S. 9110-4
- TSUGANEZAWA, H.; KOBAYASHI, K.; IYORI, M.; ARAKI, T.; KOIZUMI, A.; WATANABE, S.; KANEKO, A.; FUKAO, T.; MONKAWA, T.; YOSHIDA, T.; KIM, D. K.; KANAI, Y.; ENDOU, H.; HAYASHI, M. und SARUTA, T. (2001)  
A new member of the HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporter superfamily is an apical anion exchanger of beta-intercalated cells in the kidney.  
J Biol Chem **276**(11): S. 8180-9
- TSUGANEZAWA, H.; SATO, S.; YAMAJI, Y.; PREISIG, P. A.; MOE, O. W. und ALPERN, R. J. (2002)  
Role of c-SRC and ERK in acid-induced activation of NHE3.  
Kidney Int **62**(1): S. 41-50
- 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
- VAN DRIESSCHE, W. und ZEISKE, W. (1985)  
Ionic channels in epithelial cell membranes.  
Physiol Rev **65**(4): S. 833-903
- VAUGHAN-JONES, R. D. (1979)  
Regulation of chloride in quiescent sheep-heart Purkinje fibres studied using intracellular chloride and pH-sensitive micro-electrodes.  
J Physiol **295**: S. 111-37
- VIDYASAGAR, S.; BARMEYER, C.; GEIBEL, J.; BINDER, H. J. und RAJENDRAN, V. M. (2005)  
Role of short-chain fatty acids in colonic HCO<sub>3</sub> secretion.  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **288**(6): S. G1217-26
- VOETS, T.; JANSSENS, A.; PRENEN, J.; DROOGMANS, G. und NILIUS, B. (2003)  
Mg<sup>2+</sup>-dependent gating and strong inward rectification of the cation channel TRPV6.  
J Gen Physiol **121**(3): S. 245-60
- VOIPIO, J.; PASTERNAK, M. und MACLEOD, K. (1994)  
Ion-sensitive microelectrodes.  
Microelectrode Techniques: The Plymouth Workshop Handbook. N. B. Standen, P. T. A. Gray und M. J. Whitaker. Cambridge: The Company of Biologist: 275-316
- VON ENGELHARDT, W. und HALES, J. R. (1977)  
Partition of capillary blood flow in rumen, reticulum, and omasum of sheep.  
Am J Physiol **232**(1): S. E53-6

- VON ENGELHARDT, W. und HAUFFE, R. (1975)  
[Functions of the omasum in small domestic ruminants. IV. Resorption and secretion of electrolytes].  
Zentralbl Veterinarmed A **22**(5): S. 363-75
- VOYNO-YASENETSKAYA, T. A. (1998)  
G proteins and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange.  
Biol Signals Recept **7**(2): S. 118-24
- WAKABAYASHI, S.; HISAMITSU, T.; PANG, T. und SHIGEKAWA, M. (2003a)  
Kinetic dissection of two distinct proton binding sites in Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1.  
J Biol Chem **278**(14): S. 11828-35
- WAKABAYASHI, S.; IKEDA, T.; IWAMOTO, T.; POUYSSEGUR, J. und SHIGEKAWA, M. (1997a)  
Calmodulin-binding autoinhibitory domain controls "pH-sensing" in the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1 through sequence-specific interaction.  
Biochemistry **36**(42): S. 12854-61
- WAKABAYASHI, S.; SHIGEKAWA, M. und POUYSSEGUR, J. (1997b)  
Molecular physiology of vertebrate Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers.  
Physiol Rev **77**(1): S. 51-74
- WALKER, J. L. (1971)  
Ion specific liquid ion exchanger microelectrodes.  
Anal Chem **43**(3): S. 89A-93A
- WALTER, A.; HASTINGS, D. und GUTKNECHT, J. (1982)  
Weak acid permeability through lipid bilayer membranes. Role of chemical reactions in the unstirred layer.  
J Gen Physiol **79**(5): S. 917-33
- WANG, C. Z.; YANO, H.; NAGASHIMA, K. und SEINO, S. (2000)  
The Na<sup>+</sup>-driven Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger. Cloning, tissue distribution, and functional characterization.  
J Biol Chem **275**(45): S. 35486-90
- WANGEMANN, P.; NAKAYA, K.; WU, T.; MAGANTI, R. J.; ITZA, E. M.; SANNEMAN, J. D.; HARBIDGE, D. G.; BILLINGS, S. und MARCUS, D. C. (2007)  
Loss of cochlear HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion causes deafness via endolymphatic acidification and inhibition of Ca<sup>2+</sup> reabsorption in a Pendred syndrome mouse model.  
Am J Physiol Renal Physiol **292**(5): S. F1345-53
- WATTS, B. A., 3RD; GEORGE, T. und GOOD, D. W. (2005)  
The basolateral NHE1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulates transepithelial HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> absorption through actin cytoskeleton remodeling in renal thick ascending limb.  
J Biol Chem **280**(12): S. 11439-47

- WEGELER, C. (2007)  
Transport von  $\text{HCO}_3^-$  am isolierten Psalterepithel des Schafes  
Diss., Berlin, Freie Universität,
- WEINMAN, E. J.; CUNNINGHAM, R. und SHENOLIKAR, S. (2005)  
NHERF and regulation of the renal sodium-hydrogen exchanger NHE3.  
Pflugers Arch **450**(3): S. 137-44
- WEINMAN, E. J.; MINKOFF, C. und SHENOLIKAR, S. (2000)  
Signal complex regulation of renal transport proteins: NHERF and regulation of NHE3 by PKA.  
Am J Physiol Renal Physiol **279**(3): S. F393-9
- WEYRAUCH, K. D. und SCHMOLLICH, A. (1998)  
Histologie-Kurs für Veterinärmediziner  
Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag
- WILLUMSEN, N. J. und BOUCHER, R. C. (1992)  
Intracellular pH and its relationship to regulation of ion transport in normal and cystic fibrosis human nasal epithelia.  
J Physiol **455**: S. 247-69
- WOLFFRAM, S.; FRISCHKNECHT, R. und SCHARRER, E. (1989)  
Influence of theophylline on the electrical potential difference and ion fluxes (Na, Cl, K) across the isolated rumen epithelium of sheep.  
Zentralbl Veterinarmed A **36**(10): S. 755-62
- WOODFORD, S. T.; MURPHY, M. R. und DAVIS, C. L. (1985)  
Water dynamics of dairy cattle as affected by initiation of lactation and feed intake.  
J Dairy Sci **67**: S. 2336-2343
- WU, L. J.; DUAN, B.; MEI, Y. D.; GAO, J.; CHEN, J. G.; ZHUO, M.; XU, L.; WU, M. und XU, T. L. (2004)  
Characterization of acid-sensing ion channels in dorsal horn neurons of rat spinal cord.  
J Biol Chem **279**(42): S. 43716-24
- XU, J.; HENRIKSNAS, J.; BARONE, S.; WITTE, D.; SHULL, G. E.; FORTE, J. G.; HOLM, L. und SOLEIMANI, M. (2005)  
SLC26A9 is expressed in gastric surface epithelial cells, mediates  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchange, and is inhibited by  $\text{NH}_4^+$ .  
Am J Physiol Cell Physiol **289**(2): S. C493-505
- XU, J.; SONG, P.; MILLER, M. L.; BORGESSE, F.; BARONE, S.; RIEDERER, B.; WANG, Z.; ALPER, S. L.; FORTE, J. G.; SHULL, G. E.; EHRENFELD, J.; SEIDLER, U. und SOLEIMANI, M. (2008)  
Deletion of the chloride transporter Slc26a9 causes loss of tubulovesicles in parietal cells and impairs acid secretion in the stomach.  
Proc Natl Acad Sci U S A **105**(46): S. 17955-60
- YAMAMOTO, Y.; KITAMURA, N.; YAMADA, J.; ANDREN, A. und YAMASHITA, T. (1994)  
Morphological study of the surface structure of the omasal laminae in cattle, sheep and goats.  
Anat Histol Embryol **23**(2): S. 166-76

- YAMAMOTO, Y.; KITAMURA, N.; YAMADA, J. und YAMASHITA, T. (1991a)  
Muscular architecture in the omasal laminae of cattle and sheep.  
*Vet Res Commun* **15**(4): S. 249-56
- YAMAMOTO, Y.; KITAMURA, N.; YAMADA, J. und YAMASHITA, T. (1991b)  
Scanning electron microscopy of vascular architecture in the mucosa of sheep omasal laminae.  
*J Vet Med Sci* **53**(5): S. 833-8
- YANG, X.; AMEMIYA, M.; PENG, Y.; MOE, O. W.; PREISIG, P. A. und ALPERN, R. J. (2000)  
Acid incubation causes exocytic insertion of NHE3 in OKP cells.  
*Am J Physiol Cell Physiol* **279**(2): S. C410-9
- 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<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7): S. 3010-5
- YUN, C. H.; TSE, C. M.; NATH, S.; LEVINE, S. L. und DONOWITZ, M. (1995a)  
Structure/function studies of mammalian Na-H exchangers--an update.  
*J Physiol* **482**: S. 1S-6S
- YUN, C. H.; TSE, C. M.; NATH, S. K.; LEVINE, S. A.; BRANT, S. R. und DONOWITZ, M. (1995b)  
Mammalian Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger gene family: structure and function studies.  
*Am J Physiol* **269**(1 Pt 1): S. G1-11
- ZACHOS, N. C.; TSE, M. und DONOWITZ, M. (2005)  
Molecular physiology of intestinal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange.  
*Annu Rev Physiol* **67**: S. 411-43
- ZAHN, R. (2003)  
The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site.  
*J Mol Biol* **334**(3): S. 477-88
- ZHANG, Y.; CHERNOVA, M. N.; STUART-TILLEY, A. K.; JIANG, L. und ALPER, S. L. (1996)  
The cytoplasmic and transmembrane domains of AE2 both contribute to regulation of anion exchange by pH.  
*J Biol Chem* **271**(10): S. 5741-9
- ZIZAK, M.; LAMPRECHT, G.; STEPLOCK, D.; TARIQ, N.; SHENOLIKAR, S.; DONOWITZ, M.; YUN, C. H. und WEINMAN, E. J. (1999)  
cAMP-induced phosphorylation and inhibition of Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger 3 (NHE3) are dependent on the presence but not the phosphorylation of NHE regulatory factor.  
*J Biol Chem* **274**(35): S. 24753-8

## 8 Anhang

### 8.1 Pufferrezepte

Alle Puffer wurden mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>) begast und bei einer Temperatur von 37 °C eingesetzt.

#### Transportpuffer

Name	Summenformel	Konzentration (mmol/l)
Natriumchlorid	NaCl	115,00
Natriumbikarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	25,00
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,40
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,40
Kaliumchlorid	KCl	5,00
Glucose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> · H <sub>2</sub> O	5,00
Calciumdichlorid-Dihydrat	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1,20
Magnesiumdichlorid-Hexahydrat	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,20
Summen:	∑ Na <sup>+</sup> :	145,20 mmol/l
	∑ Cl <sup>-</sup> :	124,80 mmol/l
	∑ HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> :	25,00 mmol/l

Tab. 43 In dieser Tabelle ist die Zusammensetzung des Transportpuffers zu sehen. Das Epithel wurde während des Transportes in diesem inkubiert.

#### Standardpuffer

Name	Summenformel	Konzentration (mmol/l)
Natriumchlorid	NaCl	91,00
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	25,00
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1,00
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,00
Kaliumchlorid	KCl	5,00
Glucose-Monohydrat	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> · H <sub>2</sub> O	10,00
Natriumglukonat	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub> Na	20,00
Calciumdichlorid-Dihydrat	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,00
Magnesiumdichlorid-Hexahydrat	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,00
Summen:	∑ Na <sup>+</sup> :	141,00 mmol/l
	∑ Cl <sup>-</sup> :	102,00 mmol/l
	∑ HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> :	25,00 mmol/l
	∑ K <sup>+</sup> :	5,00 mmol/l
	∑ SCFA <sup>-</sup> :	0,00 mmol/l

Tab. 44 In dieser Tabelle ist die Zusammensetzung des Standardpuffers zu sehen. Nach dem Einsetzen in die Mikro-Ussing-Kammer wurde immer zuerst dieser Puffer eingesetzt.

**Puffer mit reduziertem Natriumgehalt**

Name	Summenformel	Konzentration (mmol/l)
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	25,00
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1,00
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,00
Natriumbutyrat	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NaO <sub>2</sub>	1,00
Kaliumchlorid	KCl	5,00
Glucose-Monohydrat	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> · H <sub>2</sub> O	10,00
NMDG-Glukonat	C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub> · C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	20,00
NMDG-Chlorid	C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub> · Cl	90,00
Calciumdichlorid-Dihydrat	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,00
Magnesiumdichlorid-Hexahydrat	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,00
Summen:	∑ Na <sup>+</sup> :	31,00 mmol/l
	∑ Cl <sup>-</sup> :	102,00 mmol/l
	∑ HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> :	25,00 mmol/l
	∑ K <sup>+</sup> :	5,00 mmol/l
	∑ SCFA <sup>-</sup>	1,00 mmol/l

Tab. 45 In dieser Tabelle ist die Zusammensetzung des 31 mmolaren Natrium (NMDG)-Puffers zu sehen.

**Puffer mit reduziertem Natriumgehalt und erhöhtem Kaliumgehalt (50 mmol/l)**

Name	Summenformel	Konzentration (mmol/l)
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	25,00
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1,00
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,00
Natriumbutyrat	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NaO <sub>2</sub>	1,00
Kaliumchlorid	KCl	50,00
Glucose-Monohydrat	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> · H <sub>2</sub> O	10,00
NMDG-Glukonat	C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub> · C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	20,00
NMDG-Chlorid	C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub> · Cl	45,00
Calciumdichlorid-Dihydrat	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,00
Magnesiumdichlorid-Hexahydrat	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,00
Summen:	∑ Na <sup>+</sup> :	31,00 mmol/l
	∑ Cl <sup>-</sup> :	102,00 mmol/l
	∑ HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> :	25,00 mmol/l
	∑ K <sup>+</sup> :	50,00 mmol/l
	∑ SCFA <sup>-</sup>	1,00 mmol/l

Tab. 46 In dieser Tabelle ist die Zusammensetzung des 50 mmolaren Kalium-Puffers zu sehen.

**Puffer mit reduziertem Natriumgehalt und erhöhtem Kaliumgehalt (95 mmol/l)**

Name	Summenformel	Konzentration (mmol/l)
Natriumchlorid	NaCl	0,00
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	25,00
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1,00
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,00
Natriumbutyrat	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NaO <sub>2</sub>	1,00
Kaliumchlorid	KCl	95,00
Glucose-Monohydrat	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> · H <sub>2</sub> O	10,00
NMDG-Glukonat	C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub> · C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	20,00
NMDG-Chlorid	C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub> · Cl	0,00
Calciumdichlorid-Dihydrat	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,00
Magnesiumdichlorid-Hexahydrat	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,00
Summen:	∑ Na <sup>+</sup> :	31,00 mmol/l
	∑ Cl <sup>-</sup> :	102,00 mmol/l
	∑ HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> :	25,00 mmol/l
	∑ K <sup>+</sup> :	95,00 mmol/l
	∑ SCFA <sup>-</sup> :	1,00 mmol/l

Tab. 47 In dieser Tabelle ist die Zusammensetzung des 95 mmolaren Kalium-Puffers zu sehen.

**Fettsäurepuffer für die Vorversuche (60 mmol/l)**

Name	Summenformel	Konzentration (mmol/l)
Natriumchlorid	NaCl	30,00
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	25,00
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1,00
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,00
Kaliumchlorid	KCl	5,00
Glucose-Monohydrat	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> · H <sub>2</sub> O	10,00
Natriumglukonat	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub> Na	21,00
Natriumacetat	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	46,00
Natriumpropionat	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NaO <sub>2</sub>	9,00
Natriumbutyrat	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NaO <sub>2</sub>	5,00
Calciumdichlorid-Dihydrat	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,00
Magnesiumdichlorid-Hexahydrat	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,00
Summen:	∑ Na <sup>+</sup> :	141,00 mmol/l
	∑ Cl <sup>-</sup> :	41,00 mmol/l
	∑ HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> :	25,00 mmol/l
	∑ K <sup>+</sup> :	5,00 mmol/l
	∑ SCFA <sup>-</sup> :	60,00 mmol/l

Tab. 48 In dieser Tabelle ist die Zusammensetzung des 60 mmolaren Fettsäurepuffer zu sehen, der während der Vorversuche eingesetzt wurde.

**Fettsäurepuffer mit 20 mmol Fettsäuren pro Liter**

Name	Summenformel	Konzentration (mmol/l)
Natriumchlorid	NaCl	30,00
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	25,00
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1,00
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,00
Kaliumchlorid	KCl	5,00
Glucose-Monohydrat	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> · H <sub>2</sub> O	10,00
Natriumglukonat	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub> Na	61,00
Natriumacetat	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	20,00
Calciumdichlorid-Dihydrat	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,00
Magnesiumdichlorid-Hexahydrat	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,00
Summen:	$\sum \text{Na}^+$	141,00 mmol/l
	$\sum \text{Cl}^-$	41,00 mmol/l
	$\sum \text{HCO}_3^-$	25,00 mmol/l
	$\sum \text{K}^+$	5,00 mmol/l
	$\sum \text{SCFA}^-$	20,00 mmol/l

Tab. 49 In dieser Tabelle ist die Zusammensetzung des 20 mmolaren Fettsäurepuffers zu sehen.

**Fettsäurepuffer mit 60 mmol Fettsäuren pro Liter**

Name	Summenformel	Konzentration (mmol/l)
Natriumchlorid	NaCl	30,00
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	25,00
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1,00
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,00
Kaliumchlorid	KCl	5,00
Glucose-Monohydrat	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> · H <sub>2</sub> O	10,00
Natriumglukonat	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub> Na	21,00
Natriumacetat	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	60,00
Calciumdichlorid-Dihydrat	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,00
Magnesiumdichlorid-Hexahydrat	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,00
Summen:	$\sum \text{Na}^+$	141,00 mmol/l
	$\sum \text{Cl}^-$	41,00 mmol/l
	$\sum \text{HCO}_3^-$	25,00 mmol/l
	$\sum \text{K}^+$	5,00 mmol/l
	$\sum \text{SCFA}^-$	60,00 mmol/l

Tab. 50 In dieser Tabelle ist die Zusammensetzung des 60 mmolaren Fettsäurepuffer zu sehen.

**Fettsäurepuffer mit 80 mmol Fettsäuren pro Liter**

Name	Summenformel	Konzentration (mmol/l)
Natriumchlorid	NaCl	30,00
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	25,00
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1,00
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,00
Kaliumchlorid	KCl	5,00
Glucose-Monohydrat	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> · H <sub>2</sub> O	10,00
Natriumacetat	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	80,00
Calciumdichlorid-Dihydrat	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,00
Magnesiumdichlorid-Hexahydrat	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,00
Summen:	$\sum \text{Na}^+$ :	140,00 mmol/l
	$\sum \text{Cl}^-$ :	41,00 mmol/l
	$\sum \text{HCO}_3^-$ :	25,00 mmol/l
	$\sum \text{K}^+$ :	5,00 mmol/l
	$\sum \text{SCFA}^-$	80,00 mmol/l

Tab. 51 In dieser Tabelle ist die Zusammensetzung des 80 mmolaren Fettsäurepuffer zu sehen. In diesen Puffer sind, wenn nicht anders vermerkt, die Hemmstoffe gelöst worden.

## 8.2 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Holger Martens danke ich für die Überlassung des Themas und seine freundliche Betreuung.

Ein großes Dankeschön geht an Friederike Stumpff für die engagierte Betreuung, ihre Hilfe und ihre Ratschläge sowohl beim praktischen als auch beim schriftlichen Teil der Dissertation.

Für die technischen Hilfestellungen und Ideen danke ich Alexandra Otte und Bernd Anders, der trauriger Weise verstorben ist (RIP).

Gaby Kieselowsky danke ich herzlich für den Transport des Epithels und die netten Gespräche.

Auch an Carola Behm geht mein Dank für Ihre Hilfe und an alle Mitarbeiter des Instituts für das nette Arbeitsklima und die Unterstützung in jeder Hinsicht.

Für die Unterstützung und nette Hilfe bei der statistischen Auswertung danke ich Anja Lüddeke.

Dem Land Berlin danke ich für die Bereitstellung eines Stipendiums.

Ein sehr großes Dankeschön geht an meine Eltern für die immerwährende Unterstützung, Motivation und Anerkennung und an meine Schwester für Ihr immer offenes Ohr und die aufmunternden Gespräche.

Mein größter Dank geht an meinen geliebten Ehemann für sein unendliches Verständnis, seine Liebe und die Unterstützung bei allen Problemen und Sorgen, die während der Erstellung meiner Promotion aufgekommen sind.

Dankeschön an alle nicht genannten Personen für jedwede Hilfe und Unterstützung.

### **8.3 Selbstständigkeitserklärung**

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

München, den 17.07.2010