

Aus dem Veterinär-Physiologischen Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Mechanismen der anionischen SCFA-Resorption im Pansen des Schafes

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Sabine Bilk
aus Dortmund

Leipzig, 2008

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Karsten Fehlhaber
Betreuer: Prof. Dr. Gotthold Gäbel

Gutachter: Prof. Dr. Gotthold Gäbel,
Veterinär-Physiologischen Institut,
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Walter Honscha,
Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Holger Martens,
Institut für Veterinär-Physiologie
Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Tag der Verteidigung: 19. Februar 2007

Meinen Eltern

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Allgemeine Bedeutung der kurzkettigen Fettsäuren und deren Resorption für den Wiederkäuer	3
2.2	Mechanismen für die Aufnahme der kurzkettigen Fettsäuren	4
2.2.1	Parazelluläre Resorption	4
2.2.2	Zelluläre Aufnahme der undissoziierten Fettsäuren	5
2.2.3	Apikale Aufnahme der dissoziierten Fettsäuren in das Pansenepithel	7
2.2.4	Apikale Aufnahme der dissoziierten Fettsäuren an anderen Epithelien des Magen-Darm-Traktes	9
2.2.5	Kandidatenproteine für eine apikale SCFA-Aufnahme in das Pansenepithel	10
2.3	Metabolismus der kurzkettigen Fettsäuren im Pansenepithel	19
2.4	Mechanismen für die Ausschleusung der kurzkettigen Fettsäuren	20
2.4.1	Ausschleusung der undissoziierten Fettsäuren	20
2.4.2	Kandidatenproteine für eine SCFA-Ausschleusung aus dem Pansenepithel	20
2.5	Bedeutung der Literatur für die Fragestellung dieser Arbeit	21
3	Material und Methoden	23
3.1	Versuchstiere	23
3.2	Ussing-Kammer Untersuchungen	23
3.2.1	Präparation des Pansenepithels	23
3.2.2	Inkubationstechnik	24
3.2.3	Elektrophysiologische Parameter	25
3.2.4	Gruppierung der Epithelien	25
3.3	Uptake-Studien	26
3.3.1	Allgemeiner Ablauf der Uptake-Studien	26
3.3.2	Bestimmung des Proteingehaltes	26
3.3.3	Szintillationszählung	27
3.3.4	Berechnung der Acetataufnahme	27
3.4	Versuchsanordnungen: Uptake-Studien	28
3.5	Kultivierung von Pansenepithelzellen	30
3.5.1	Gewinnung des Pansenepithels	30
3.5.2	Isolierung von Pansenepithelzellen	30
3.5.3	Kultivierung von Pansenepithelzellen	32
3.6	Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes	32
3.6.1	Beladung mit BCECF	32
3.6.2	Messung der Fluoreszenzintensität	32
3.6.3	Kalibrierung des intrazellulären pH-Wertes	33

3.7	Versuchsanordnungen: intrazelluläre pH-Wertmessung	34
3.8	Immunzytochemische Untersuchungen	35
3.8.1	Fixierung	35
3.8.2	Beladung mit Primärantikörper	35
3.8.3	Beladung mit Sekundärantikörper	36
3.8.4	Kernfärbung	36
3.8.5	Auswertung	37
3.9	Molekularbiologische Untersuchungen	37
3.9.1	Gewinnung von Pansengewebe	37
3.9.2	Ernten der kultivierten Pansenepithelzellen für die Molekularbiologie	37
3.9.3	Isolierung von Gesamt-RNA und anschließende Gewinnung der Poly(A) ⁺ -RNA	38
3.9.4	(Two-Step)-RT-PCR	38
3.9.5	Allgemeine molekularbiologische Methoden	42
3.10	Statistik und Darstellung der Ergebnisse	44
4	Ergebnisse	45
4.1	Untersuchung der Acetataufnahme (Uptake) in das Pansenepithel	45
4.1.1	Einfluss von mukosalem Chlorid und pH-Wert auf die apikale Acetataufnahme	45
4.1.2	Einfluss von Nitrat und Sulfat auf die apikale Acetataufnahme	48
4.1.3	Einfluss von Bikarbonat auf die apikale Acetataufnahme	49
4.1.4	Konzentrationsabhängigkeit der apikalen Acetataufnahme	55
4.1.5	Einfluss verschiedener Hemmstoffe auf die apikale Acetataufnahme	58
4.1.6	Wirkung von Phloretin und pCMBS auf die apikale Acetataufnahme	62
4.1.7	Einfluss von Acetat und Nitrat auf Kurzschlussstrom und Gewebeleitfähigkeit	63
4.2	Untersuchung bikarbonattransportierender Mechanismen an primärkultivierten Pansenepithelzellen	67
4.2.1	Validierung der Pansenepithelzellkultur	67
4.2.2	Untersuchung der Kopplung zwischen Bikarbonat- und Chloridtransport	68
4.3	Wirkung von Acetat auf den pH_i kultivierter Pansenepithelzellen	69
4.3.1	Fettsäurebedingte, intrazelluläre Ansäuerung in An- und Abwesenheit von Chlorid	69
4.3.2	Hemmbarkeit der fettsäurebedingten, intrazellulären Ansäuerung durch Nitrat und Nifluminsäure	71
4.4	Immunzytochemische Untersuchungen	73
4.5	Molekularbiologische Untersuchungen	75
4.5.1	Nachweis eines DRA	75
4.5.2	Nachweis eines PAT1	76
4.5.3	Nachweis eines CFTR	77
4.5.4	Nachweis der Cl ⁻ -Isoformen 2, 4 und 5	78
4.5.5	Nachweis eines SMCT	80
4.5.6	Semiquantitative RT-PCR	81

5	<i>Diskussion</i>	83
5.1	Diffusion von undissoziiertem Acetat	83
5.2	Bikarbonatabhängiger proteinvermittelter Transport von Acetat in das Pansenepithel	85
5.2.1	Funktionelle Eingrenzung einer bikarbonatabhängigen Acetataufnahme	87
5.2.2	Kandidatenproteine für eine bikarbonatabhängige Acetataufnahme	90
5.3	Bikarbonatunabhängiger proteinvermittelter Transport von Acetat	92
5.3.1	Funktionelle Eingrenzung der bikarbonatunabhängigen proteinvermittelten Acetataufnahme	92
5.3.2	Kandidatenproteine für eine bikarbonatunabhängige Acetataufnahme	95
5.4	Vergleichende Betrachtung der Transporterexpression auf mRNA-Ebene im intakten Pansenepithel und in kultivierten Pansenepithelzellen	97
5.5	Zusammenfassende Betrachtung der möglichen Transportproteine	99
5.6	Bedeutung der transportproteinvermittelten Acetataufnahme für den Wiederkäuer	101
6	<i>Zusammenfassung</i>	104
7	<i>Summary</i>	106
8	<i>Literaturverzeichnis</i>	108
9	<i>Anhang</i>	I
9.1	Verwendete Medien in der Zellkultur	I
9.2	Zusammensetzung der Pufferlösungen	II
9.3	Verwendete Hemmstoffe	VIII
9.4	Zusammensetzung des BCA-Reagenz zur Proteinanalyse (nach SMITH et al. 1985)	VIII
9.5	Trypanblau-Test	IX
9.6	Kollagenisierung der Coverslips	IX

Abkürzungsverzeichnis

[Acetat]	Acetatkonzentration
ABC	ATP-binding-cassette
AC	Acetat
ACAC	Acetoacetat
AE	Anionenaustauscher (anion exchanger)
ANOVA	Varianzanalyse
Aqua dest.	Aqua destillata
au	unbenannte Einheit (arbitrary unit)
BBM	Bürstensaummembran (brush border membrane)
BCA	4,4'-Dicarboxy-2,2'-Biquinolin (Bicinchoninsäure)
BCECF	2',7'-bis-(Carboxyethyl)-5(6')-Carboxyfluorescein
BCECF/AM	2',7'-bis-(Carboxyethyl)-5(6')-Carboxyfluorescein/ Azetoxymethylester
BHB	β-Hydroxybutyrat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare (base pairs)
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat (cyclic adenosine monophosphate)
Cy 2	Carbocyanin 2
Cy 3	Carbocyanin 3
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CHC	α-Cyano-4-Hydroxycimtsäure
[Cl]	Chloridkonzentration
ClC	Chloridkanal
CLD	Congenital Chloride Diarrhoea
CFEX	Cl ⁻ /Formiat Exchanger
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
cpm	counts per minute
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBDS	4,4'-Dibenzamidostilben-2,2'-Disulfonsäure
DIDS	4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-Disulfonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
DRA	Downregulated in adenoma
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIPA	5-(N-Ethyl-N-Isopropyl)-Amilorid
Eq	Equivalent (Einheit des Kurzschlussstromes); Strom, welcher dem Transport von 1 mol einfach positiv geladenen Ionen entspricht.
FFA	Flufenaminsäure
FKS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung: 9,81 m/s ²
G _t	Gewebeleitfähigkeit (tissue conductance)
HEPES	N-[Hydroxyethyl]-Piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
[HCO ₃ ⁻]	Bikarbonatkonzentration
HCO ₃ ⁻ _m	mukosales Bikarbonat
HCO ₃ ⁻ _s	serosales Bikarbonat
HSCFA	undissoziierte kurzkettige Fettsäure
I _{sc}	Kurzschlussstrom (short-circuit current)
K _m	scheinbare Halbsättigungskonstante
M-199	Medium 199
MCT	H ⁺ /Monocarboxylat-Kotransporter
MEM	Minimal Essential Medium
mRNA	messenger RNA
ms	mukoserosal (von mukosal nach serosal)

Abkürzungsverzeichnis

n	Anzahl der Stichproben
N	Anzahl der für die Stichproben verwendeten Versuchstiere (Beachte: auch als Einheit der Normalität einer Lösung verwendet)
NBC	$\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFA	Nifluminsäure
NHE	Na^+/H^+ -Austauscher
NHERF	NHE regulierender Faktor
NO_3^-	Nitrat
$[\text{NO}_3^-]$	Nitratkonzentration
NPPB	5-Nitro-2-(3-Phenylpropamino)-Benzoat
OD	optische Dichte
ORCC	auswärtsgerichteter Chloridkanal (outwardly rectifying chloride channel)
PAT1	Putativer Aniontransporter 1
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
pCMBS	p-Chloromercuribenzensulfonsäure
pCO_2	CO_2 -Partialdruck
PEZ	Pansenepithelzellen
PLP	Poly-L-Lysin-Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
ROMK	Renal Outer Medullary K^+ -Channel
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
Pd	Potentialdifferenz
pH_i	intrazellulärer pH-Wert
pH_m	mukosaler pH-Wert
pH_s	serosaler pH-Wert
ΔpH_i	pH_i -Differenz
Prot	Protein
SCFA	kurzkettige Fettsäuren (short chain fatty acids)
SCFA^-	kurzkettige Fettsäureanionen
SITS	4-Acetamido-4'-Isothiocyanatostilben-2,2'-Disulfonsäure
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of mean)
SLC	Solute Carrier
sm	seromukosal (von serosal nach mukosal)
SMCT	$\text{Na}^+/\text{Monocarboxylsäure}$ -Kotransporter
TAT	T-Typ-Aminosäuretransporter
U	Acetataufnahme (acetate uptake)
U_{max}	maximale Aufnahme (Uptake) von Acetat (allgemein: V_{max})
ZO1	Zonula-occludens-Protein 1
Zy	Zyklenzahl

1 Einleitung

Das Vormagensystem des Wiederkäuers mit dem Pansen als der größten Fermentationskammer nimmt eine zentrale Rolle beim Aufschluss schwerverdaulicher Rohfaseranteile im Futter ein. Durch den mikrobiellen Abbau der aufgenommenen Nahrung entstehen verschiedene Fermentationsprodukte. Neben den Gasen CO_2 und Methan werden dabei hauptsächlich kurzkettige Fettsäuren (SCFA = short chain fatty acids) gebildet (BREVES u. LEONHARD-MAREK 2005). Diese sind für den Wiederkäuer eine Hauptenergiequelle und decken bis zu etwa 70% - 80% des Energiebedarfs des Tieres (CARROLL u. HUNGATE 1954; BERGMAN et al. 1965; ANNISON u. ARMSTRONG 1970; BUGAUT 1987; FAHEY u. BERGER 1988; BERGMAN 1990). Der Hauben-Pansen-Raum stellt allerdings nicht nur den Syntheseort der SCFA dar, sondern hat auch einen Hauptanteil an der SCFA-Resorption (BARCROFT et al. 1944; MARSHALL u. PHILLIPSON 1945). Im Pansenepithel werden die SCFA zu unterschiedlichen Anteilen metabolisiert (BUGAUT 1987). Neben der Bedeutung der Resorption kurzkettiger Fettsäuren für die Energiebereitstellung des Wiederkäuers stellt die Resorption der SCFA auch einen wichtigen Mechanismus zur Vermeidung einer zu starken Ansäuerung des Panseninhaltes dar (DANIELLI et al. 1945).

Trotz der herausragenden Bedeutung der ruminalen Resorption kurzkettiger Fettsäuren wird der zugrunde liegende Mechanismus immer noch diskutiert. Als gesichert gilt, dass ein Teil der SCFA-Aufnahme durch Diffusion der undissoziierten Säure erfolgt. Für den Psalter wurde kürzlich sogar postuliert, dass die SCFA-Aufnahme ausschließlich mittels Diffusion der undissoziierten Säure erfolgt (ALI et al. 2006). Für den Pansen scheint neben der Diffusion der undissoziierten Säure aber auch die Aufnahme des Säureanions zur ruminalen Fettsäureresorption beizutragen (FAHEY u. BERGER 1988). Eine Bikarbonatabhängigkeit der SCFA-Aufnahme konnte nachgewiesen werden (GÄBEL et al. 1991a), die auf die mögliche Beteiligung eines SCFA/ HCO_3^- -Austauschers zurückgeführt werden kann (KRAMER et al. 1996). Für den Magen-Darm-Trakt monogastrischer Tiere wird eine derartige Kopplung von SCFA-Resorption und Bikarbonatsekretion ebenfalls angenommen. Dabei gibt es verschiedene Modelle bezüglich der beteiligten Transporter. So wurden als apikale Anionen/ HCO_3^- -Austauscher sowohl DRA (downregulated in adenoma, SLC26A3) als auch PAT1 (Putativer Anionentransporter 1, SLC26A6) nachgewiesen, wobei diese Proteine bisher hauptsächlich als $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher charakterisiert wurden (MELVIN et al. 1999; MOSELEY et al. 1999; JACOB et al. 2002; CHERNOVA et al. 2005). Beide Proteine werden entlang der Darmachse verschiedener monogastrischer Spezies in unterschiedlicher Intensität exprimiert (BYEON et al. 1996; JACOB et al. 2002; WANG et al. 2002). In jüngster Zeit wird ebenfalls die Beteiligung eines Mitglieds der Monocarboxylsäure-Kotransporter-Familie (SLC16) an der apikalen SCFA-Aufnahme im Darm von Monogastriern und auch im Pansen des Wiederkäuers diskutiert (DUDEJA u. RAMASWAMY 2006; KIRAT et al. 2007). Als weitere SCFA-transportierenden Proteine konnten in Niere und Darm zwei natriumabhängige Monocarboxylsäure-Kotransporter identifiziert werden (SLC5A8 und SLC5A12) (MIYAUCHI et al. 2004; SRINIVAS et al. 2005). Während im Darmepithel des Monogastriers bereits verschiedene, potentielle Transportproteine für eine SCFA-Aufnahme identifiziert wurden, ist bezüglich der

strukturellen Grundlage eines $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers im Pansenepithel bisher kaum etwas bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollte die SCFA-Aufnahme in das Pansenepithel des Schafes sowohl funktionell als auch strukturell eingehender untersucht werden. Hierbei sollte ermittelt werden, inwieweit die Diffusion der undissoziierten Säure einerseits und proteinvermittelte Mechanismen andererseits zur SCFA-Aufnahme beitragen. Außerdem sollte eine weitergehende Charakterisierung der Kopplung zwischen Bikarbonatsekretion und SCFA-Resorption erfolgen. Hierbei galt es Charakteristika des möglichen $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers (Substratspezifität, Hemmprofil) zu untersuchen.

2 Literaturübersicht

2.1 Allgemeine Bedeutung der kurzkettigen Fettsäuren und deren Resorption für den Wiederkäuer

Das Reticulorumen stellt eine große Gärkammer dar, in der vor allem Kohlenhydrate durch Mikroorganismen fermentiert werden. Die kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat sind hierbei Endprodukte des mikrobiellen Abbaus von Polysacchariden wie Zellulose und Hemizellulose im Pansen (COUNOTTE 1981; BUGAUT 1987; BERGMAN 1990). Anders als bei Monogastriern stellen SCFA die Hauptenergiequelle (bis zu etwa 70% - 80% des täglichen Energiebedarfs) für den Wiederkäuer dar (CARROLL u. HUNGATE 1954; BERGMAN et al. 1965 ANNISON u. ARMSTRONG 1970; BUGAUT 1987; FAHEY u. BERGER 1988; BERGMAN 1990). Der Hauptanteil der intraruminal produzierten Säuren kann vom Pansenepithel direkt resorbiert werden (PETERS et al. 1992; GÄBEL et al. 2002). Ein Teil dieser Säuren wird dabei bereits im Pansenepithel verstoffwechselt (PENNINGTON 1952; PENNINGTON 1954; PENNINGTON u. SUTHERLAND 1956a, b; ANNISON et al. 1957; GOOSEN 1976; BRITTON u. KREHBIEL 1993; REMOND et al. 1995). Es konnte gezeigt werden, dass Pansenepithelzellen SCFA gegenüber Glukose als energielieferndes Substrat bevorzugen (BALDWIN u. JESSE 1992; BRITTON u. KREHBIEL 1993).

Mengenmäßig werden nach BERGMAN et al. (1965) im Vormagen des Schafes 5,4 Mol SCFA pro Tag pro Kilogramm Trockenmasse gebildet. Dabei ist die SCFA-Konzentration im Vormagen circadianen Schwankungen unterlegen. Je nach Art, Menge und Zeitpunkt der Fütterung liegt die Konzentration zwischen 60 und 150 mM, wobei sie bei mikrobieller Entgleisung auch Maximalwerte von bis zu 200 mM erreichen kann (GÄBEL 1988; BERGMAN 1990). Abhängig von der Art der Fütterung ist auch das Verhältnis der drei SCFA zueinander. Dieses Verhältnis beträgt bei reiner Rauhfuttergabe ca. 70 : 20 : 10 (Acetat : Propionat : Butyrat), während es sich bei konzentratreicher Fütterung bis hin zu 50 : 35 : 15 verschieben kann (BERGMAN 1990; RÉMOND et al. 1995).

Insgesamt erfüllt die Resorption der SCFA aus dem Pansen neben der Energiebereitstellung für den Wiederkäuer zwei weitere wichtige Funktionen: Erstens stellt sie den Pansenepithelzellen Substrate für ihren Metabolismus zur Verfügung (Kap. 2.3). Zweitens wird durch die Resorption eine Akkumulation der SCFA im Pansenlumen vermieden, die ansonsten eine gefährliche Ansäuerung des Panseninhaltes bewirken würde (GÄBEL et al. 2002; MARTENS 2005).

Trotz der herausragenden Bedeutung der SCFA-Resorption, gibt es heute noch kein generell anerkanntes Modell für die Transportwege kurzkettiger Fettsäuren im Pansenepithel. Vielmehr werden sowohl für den Pansen als auch für andere Epithelien des Magen-Darm-Traktes (vor allem Colon) verschiedene Transportmechanismen kontrovers diskutiert. Prinzipiell wird davon ausgegangen, dass kurzkettige Fettsäuren entweder über Diffusion der undissoziierten Säure oder über Transportproteine resorbiert werden können. Der Resorption kurzkettiger Fettsäuren durch Diffusion der undissoziierten Säure wird dabei eine unterschiedliche Bedeutung beigemessen

(Kap. 2.2.2). Das teilweise Infragestellen einer überwiegend diffusiblen Resorption begründet sich unter anderem darin, dass in letzter Zeit verschiedene Transportproteine isoliert wurden, die an der gastrointestinalen Resorption kurzkettiger Fettsäuren beteiligt sein könnten (Kap. 2.2.5). Für den Pansen wurde zudem schon 1967 von STEVENS und STETTLER wegen des Fortbestehens des SCFA-Transportes trotz Ausschaltung des transepithelialen elektrochemischen Gradienten vermutet, dass ein nicht-diffusibler Mechanismus an der Resorption von SCFA beteiligt sein könnte. Seitdem konnte sowohl an Hand von *in vivo* als auch von *in vitro* Untersuchungen gezeigt werden, dass neben der Diffusion der undissoziierten Säure ein SCFA/HCO₃⁻-Austausch ein möglicher Weg für die Aufnahme der SCFA ist (GÄBEL et al. 1991a; KRAMER et al. 1996). Unklar ist aber immer noch, welche Proteine diesen Austausch vermitteln.

2.2 Mechanismen für die Aufnahme der kurzkettigen Fettsäuren

2.2.1 Parazelluläre Resorption

Prinzipiell ist zunächst zwischen trans- und parazellulärem Transport zu unterscheiden. Wenn die Diffusion der dissoziierten SCFA parazellulär von Bedeutung wäre, müsste der SCFA-Transport durch Veränderungen des elektrischen Gradienten zu variieren sein. Es konnte aber sowohl am Pansen von Kühen (STEVENS u. STETTLER 1966b), wie auch am Colon von Kaninchen und Meerschweinchen (RECHKEMMER 1994) gezeigt werden, dass die Erhöhung des elektrischen Gradienten keinen Einfluss auf die Resorption der SCFA ausübte. Solvent drag, d.h. das Mitreißen gelöster Stoffe beim parazellulären Wassertransport scheint im Pansen ebenfalls keine große Rolle zu spielen (SÜNDERMANN 1986). Folglich geht das gegenwärtige Modell (Abb. 1) davon aus, dass die Fettsäureresorption vor allem transzellulär erfolgt und der parazelluläre Weg, wenn überhaupt, eine untergeordnete Rolle spielt.

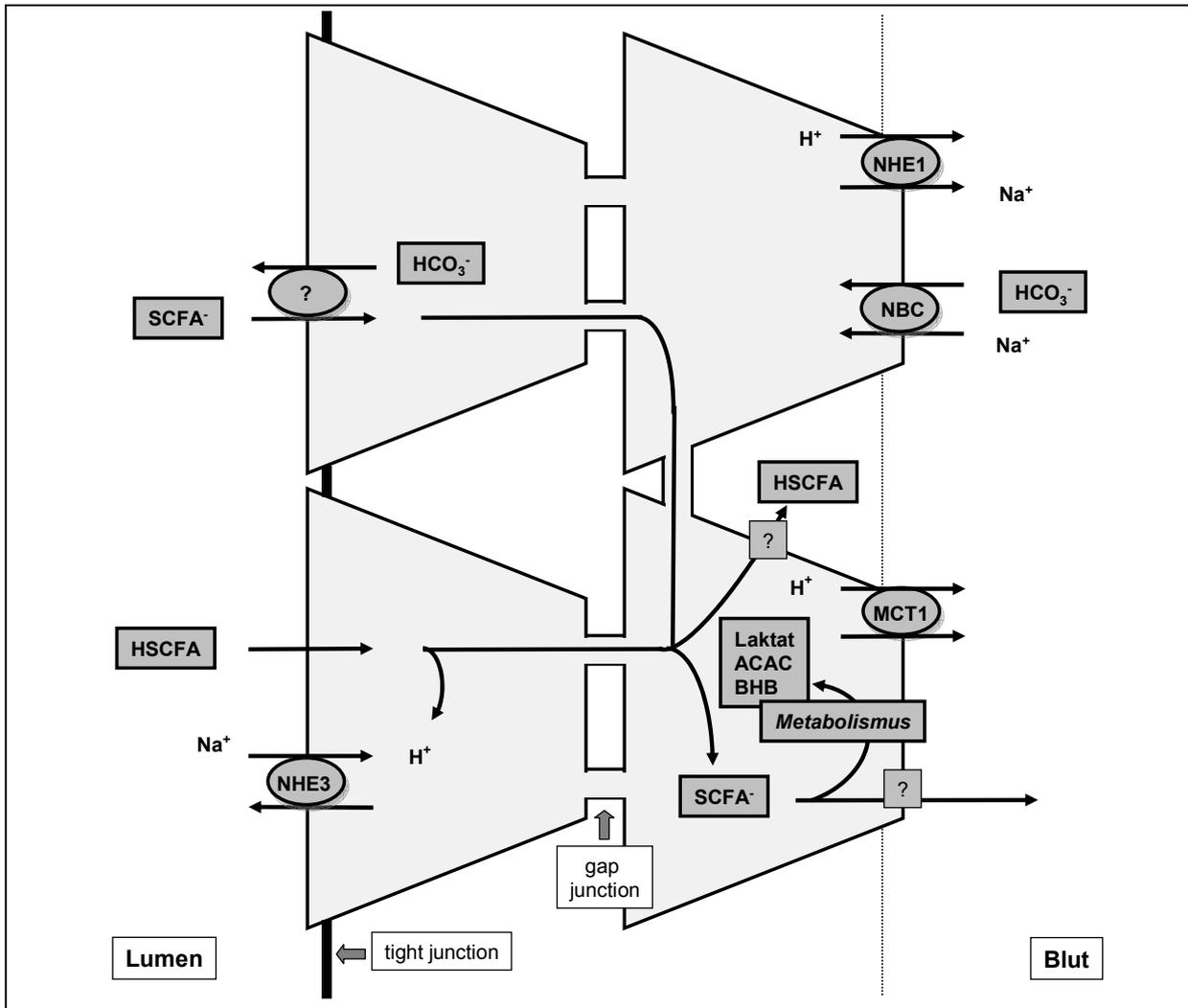


Abb. 1: *Gegenwärtiges Modell des transzellulären SCFA-Transportes am Pansenepithel (nach GÄBEL u. SEHESTED 1997, MÜLLER 2000, GÄBEL et al. 2002)*

Dieses Modell beschreibt die derzeitige Vorstellung des transzellulären SCFA-Transportes mit einer Aufnahme durch Diffusion der undissoziierten Säure einerseits und einem SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauscher andererseits. Kandidatenproteine für den SCFA-Transport werden im nachfolgenden Text eingehender erläutert. (ACAC = Acetoacetat, BHB = β -Hydroxybutyrat)

2.2.2 Zelluläre Aufnahme der undissoziierten Fettsäuren

Das in Abb. 1 dargestellte Zellmodell spiegelt den bisherigen Wissenstand bezüglich der transzellulären SCFA-Resorption am Pansen wider.

In wässriger Lösung befinden sich SCFA im Gleichgewicht zwischen ihrer undissoziierten Form (HSCFA) und ihrer dissoziierten Form (SCFA⁻) (WALTER et al. 1982; LEHNINGER et al. 1998). Dabei können im Wesentlichen nur HSCFA die Lipiddoppelschicht biologischer Membranen per Diffusion schnell überqueren (LEO et al. 1971; WALTER et al. 1982; WALTER u. GUTKNECHT 1986).

Die Triebkraft der Diffusion ist der elektrochemische Gradient zwischen Pansenlumen und Blut. Da HSCFA keine Ladung besitzen, stellt die transepitheliale Potentialdifferenz zwischen Lumen und Blut (20 – 40 mV, Blutseite positiv (DOBSON u. PHILLIPSON 1958; MARTENS 2005) keine Triebkraft für die Diffusion dar (STEVENS u. STETTLER 1966b; RECHKEMMER 1994; SEHESTED et al. 1999b). Der chemische Gradient ist somit die einzige Triebkraft. Mit einer luminalen SCFA-Konzentration von 60 – 150 mM (GÄBEL 1988; BERGMAN 1990) und einer Blutkonzentration von 1/20 – 1/100 der luminalen Konzentration (MASSON u. PHILLIPSON 1951; ANNISON et al. 1957; REYNOLDS u. HUNTINGTON 1988) ist der chemische Gradient *in vivo* in Richtung Blutseite orientiert.

Die Annahme, dass die Diffusion undissoziierter SCFA die Hauptform der transepithelialen SCFA-Resorption darstellt, erfolgte aufgrund von drei Befunden, die in verschiedenen Studien erhoben werden konnten:

a. Linearer Anstieg der SCFA-Resorption mit steigender Konzentration.

Die SCFA-Resorption aus dem Pansen steigt mit zunehmender SCFA-Konzentration an (WEIGAND et al. 1972a, b; DIJKSTRA et al. 1993; MICHELBERGER 1994). Für den Psalter konnten ALI et al. (2006) kürzlich einen linearen Zusammenhang zwischen der Acetatresorption und der Acetatkonzentration nachweisen, was für die Resorption durch Diffusion der undissoziierten Säure spricht. Diese Linearität hatten vorher bereits SELLIN et al. (1993) am distalen Colon des Kaninchens für Propionat und CHARNEY et al. (1998) am distalen Colon der Ratte für Butyrat gezeigt.

b. Anstieg der SCFA-Resorption mit Absenken des pH-Wertes.

Wie am Anfang dieses Kapitels erwähnt, besteht ein Gleichgewicht zwischen der protonierten Form der SCFA (HSCFA) und ihrer dissoziierten Form (SCFA⁻). Dieses Gleichgewicht hängt ab (1.) von dem pK-Wert der kurzkettigen Fettsäure und (2.) von dem pH-Wert der vorliegenden Lösung. Beschrieben wird es durch die Henderson-Hasselbalch Gleichung:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log (\text{SCFA}^- / \text{HSCFA}).$$

Im Pansen herrscht bei wiederkäuergerechter Fütterung ein pH-Wert von 5,5 – 7,0 (MARTENS 2005). Der pK-Wert der kurzkettigen Fettsäuren liegt bei 4,8 für Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure (LEHNINGER et al. 1998; MARTENS 2005). Entsprechend der Henderson-Hasselbalch Gleichung liegen somit bei einem pH-Wert von 6,8 nur 1% der SCFA in der protonierten Form vor, bei einem pH-Wert von 5,8 sind es 10%. Ein Anstieg der Resorption kurzkettiger Fettsäuren nach mukosalem Absenken des pH-Wertes wurde sowohl in Ussing-Kammer Untersuchungen an isolierten Epithelien des Pansens von Schaf und Rind (STEVENS u. STETTLER 1966a; MICHELBERGER 1994; KRAMER et al. 1996; SEHESTED et al. 1999a) sowie auch bezüglich der Verschwindensraten bei *in vivo* Untersuchungen am gewaschenen Pansen ermittelt (WEIGAND et al. 1972a, b; DIJKSTRA et al. 1993).

c. Anstieg der SCFA-Resorption mit steigender Kettenlänge

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Kettenlänge besitzen kurzkettige Fettsäuren eine unterschiedlich starke Lipophilie und damit einen unterschiedlichen Permeabilitätskoeffizienten. So steigt die Permeabilität von Acetat zu Propionat um das 5,1-fache, von Propionat zu Butyrat um das 2,1-fache an (WALTER u. GUTKNECHT 1986). Verschiedene *in vivo* wie auch *in vitro* Untersuchungen konnten zeigen, dass sich die Clearance bzw. die Resorption in der Reihenfolge Acetat < Propionat < Butyrat erhöhte (WEIGAND et al. 1972a; GÄBEL et al. 1991a; DIJKSTRA et al. 1993; SEHESTED et al. 1999a).

Trotz dieser Ergebnisse können die oben aufgeführten Studien eine alleinige Diffusion der undissoziierten SCFA am Pansenepithel nicht belegen. So sehen GÄBEL und SEHESTED (1997), GÄBEL et al. (2002) und GÄBEL und ASCHENBACH (2007) als entscheidende Argumente gegen eine SCFA-Resorption ausschließlich durch Diffusion der undissoziierten Säure, dass der Anstieg der SCFA-Resorption bei Absenkung des luminalen pH-Wertes nicht in dem nach Henderson-Hasselbalch zu erwartenden Rahmen ausfiel. Zusätzlich war auch der Anstieg der SCFA-Resorption mit zunehmender Kettenlänge wesentlich geringer, als aufgrund der unterschiedlichen Lipophilie zu erwarten gewesen wäre. Die Clearance von Propionat war nur 1,6 - 1,9mal so groß wie die von Acetat, und diejenige von n-Butyrat war nur 1,2mal so groß wie die von Propionat (DIJKSTRA et al. 1993).

2.2.3 Apikale Aufnahme der dissoziierten Fettsäuren in das Pansenepithel

STEVENS und STETTLER vermuteten schon 1967, dass ein nicht-diffusibler Mechanismus an der apikalen Aufnahme von SCFA ins Pansenepithel des Rindes beteiligt sein könnte. In *in vitro* Studien wiesen die Autoren einen SCFA-Transport trotz Ausschaltung des transepithelialen elektrochemischen Gradienten nach. MICHELBERGER (1994) konnte zeigen, dass zwischen dem Propionattransport und der Konzentration der Säure kein linearer Zusammenhang besteht. SEHESTED et al. (1999b) zeigten mit Hilfe von Fluxmessungen am Pansen des Rindes, dass der Butyratnettoflux bis zu einer Butyratkonzentration von 20 mM einer Michaelis-Menten-Kinetik mit einer K_m von 7,2 mM und einem J_{max} von $0,8 \mu\text{M} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ folgte. Dies sind alles Hinweise für die Aufnahme der SCFA mit Hilfe eines nicht-diffusiblen Mechanismus.

Mit Bezug auf die Identität einer nicht-diffusiblen SCFA-Resorption wurde für das Pansenepithel die These formuliert, dass ein $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher möglicherweise auch SCFA transportiert (KRAMER et al. 1996). Ein nicht-diffusibler Chloridtransport am Epithel des Reticulorum wurde schon in den 60er Jahren nachgewiesen (STEVENS 1964; KEYNES u. HARRISON 1970). CHIEN und STEVENS (1972) konnten zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen dem Natrium- und dem Chloridtransport besteht. Bei einer Reduktion von Natrium in der Inkubationslösung verminderte sich die Chloridaufnahme und umgekehrt. Bumetanid und Furosemid, spezifische Hemmstoffe eines direkten $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransportes, hatten aber keinen Einfluss auf den ruminalen Natriumtransport (MARTENS u. GÄBEL 1988; MARTENS et al. 1991). Dies führte zu der Hypothese, dass ein Na^+/H^+ -Austauscher und ein $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher parallel arbeiten. Diese Austauscher werden durch die intrazelluläre Bildung von HCO_3^- und H^+ parallel angetrieben. HCO_3^-

und H^+ werden durch die Carboanhydrase aus Kohlensäure ständig neu gebildet. Es erfolgt die apikale Ausschleusung des Bikarbonats im Austausch mit Chlorid. Außerdem wird durch die ansteigende H^+ -Konzentration der apikale NHE zur Ausschleusung von Protonen stimuliert. Der cytoplasmatische pH-Wert stellt somit das Bindeglied zwischen den beiden Austauschsystemen dar (MARTENS et al. 1991). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese führte eine Hemmung der epithelialen Carboanhydrase am isolierten Pansenepithel des Schafes durch die Zugabe von Azetazolamid zur Hemmung des Cl^- -Transportes (EMANOVIC et al. 1976).

KRAMER et al. (1996) wiesen erstmals einen Zusammenhang zwischen SCFA- und Chloridtransport am Pansenepithel von Schafen nach. Mit steigenden mukosalen Chloridkonzentrationen kam es zu einem signifikanten Abfall des ms-Fluxes von Propionat. Dies deutete darauf hin, dass SCFA- und Cl^- -Anionen entweder gemeinsam über einen Anionenaustauscher in die Epithelzellen transportiert werden, oder dass ein SCFA/ HCO_3^- -Austauscher existiert, der mit einem Cl^-/HCO_3^- -Austauscher um das intrazellulär vorhandene Bikarbonat konkurriert.

Für den ruminalen Cl^-/HCO_3^- -Austauscher konnte von WÜRMLI et al. (1987) eine Nitratsensitivität nachgewiesen werden. Nitrat erzeugt auch an anderen Epithelien eine kompetitive Hemmung von Cl^-/HCO_3^- -Austauschern (MEIER et al. 1985; SEIFTER u. ARONSON 1984). Ein hemmender Einfluss von Nitrat auf den Nettoflux von Propionat wurde ebenfalls an isolierten Pansenmukosen von Schafen festgestellt (KRAMER et al. 1996). Dies erhärtet die mögliche Existenz eines SCFA/ HCO_3^- -Austauschers. Ein direkter Zusammenhang zwischen ruminaler Bikarbonatsekretion und SCFA-Absorption konnte erstmals von GÄBEL et al. (1991a) *in vivo* am gewaschenen Pansen des Schafes nachgewiesen werden. Die Autoren konnten zeigen, dass die Abwesenheit von SCFA im Pansenlumen zu einer Umkehr der Bikarbonatsekretion in eine Bikarbonatresorption führte.

HCO_3^- -Austauschsysteme sind häufig gut durch das Stilbenderivat 4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-Disulfonsäure (DIDS) hemmbar (KNICKELBEIN et al. 1985; ALPER et al. 2002; IKUMA et al. 2003; JIANG et al. 2002; PETROVIC et al. 2002; WANG et al. 2002). Die DIDS-Sensitivität des Cl^-/HCO_3^- -Austauschers am Pansen ist allerdings umstritten. KRAMER et al. (1996) konnten bei 4 mM Chlorid eine Hemmung des ms-Fluxes mit DIDS nachweisen. Bei einer Chloridkonzentration von 96 bzw. 22 mM blieb ein DIDS-Effekt auf den ms-Flux in Untersuchungen von MARTENS et al. (1991) allerdings aus. MICHELBERGER (1994) erzielte selbst bei 4 mM Chlorid keine signifikante Hemmung des Chloridtransportes mit DIDS. Auch bezüglich der Hemmung der SCFA-Resorption durch DIDS gibt es unterschiedliche Beschreibungen. So konnten KRAMER et al. (1996) eine Hemmung des Propionatfluxes durch DIDS am Pansenepithel des Schafes bei sehr geringen Chlorid- (4 mM) und Propionatkonzentrationen (2 mM) nachweisen. Auch MICHELBERGER (1994) fand eine Sensitivität des ms-, sm- und des Nettofluxes gegenüber 0,1 mM DIDS am Pansen des Schafes bei einer Propionatkonzentration von 1 mM. SEHESTED et al. (1999b) konnten in Anwesenheit von Chlorid nur den sm-Flux von Butyrat mit 0,5 mM DIDS hemmen, während in Abwesenheit von Chlorid auch der Nettoflux und der ms-Flux von Butyrat am Pansen des Rindes hemmbar waren. Hingegen gelang es GÄBEL et al. (2001) weder die unidirektionalen Fluxe, noch den Nettoflux von 2 mM n-Butyrat in Anwesenheit von 4 mM Chlorid mit 0,1 mM DIDS zu hemmen.

Die Abhängigkeit von Bikarbonat, die Beeinflussung durch Variation der Chloridkonzentration und auch die Hemmbarkeit der SCFA-Resorption mit Nitrat und in geringem Umfang mit DIDS konnten am Pansen nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass bei der apikalen Aufnahme kurzkettiger Fettsäuren am Pansen zwar die Diffusion der undissoziierten Säure eine Rolle spielt, dass aber auch ein $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher, der gleichzeitig SCFA-Anionen akzeptiert und / oder ein spezifischer $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher beteiligt sein muss. Es ist allerdings noch nicht bekannt, welches Protein bzw. welche Proteine diesen Transport vermittelt bzw. vermitteln. Bei der Annäherung an diese Fragestellung können Befunde von anderen gastrointestinalen Epithelien hilfreich sein. Daher sollen im Folgenden die Transportmechanismen für SCFA an nicht-ruminalen, gastrointestinalen epithelialen Zellen näher betrachtet werden.

2.2.4 Apikale Aufnahme der dissoziierten Fettsäuren an anderen Epithelien des Magen-Darm-Traktes

Funktionell gibt es in Bezug auf die SCFA einige Parallelen zwischen dem Pansenepithel und anderen Epithelien des Magen-Darm-Traktes verschiedener Spezies. Insbesondere im Bereich des Colons und auch des Caecums erfolgt bei monogastrischen Pflanzenfressern aber auch bei Wiederkäuern eine mikrobielle Umsetzung von Polysacchariden zu kurzkettigen Fettsäuren (BUGAUT 1987). Auch im distalen Teil des Magen-Darm-Traktes werden z. T. ähnliche SCFA-Konzentrationen erreicht wie im Rumen (CUMMINGS 1981; MCNEIL 1984). Bei Monogastriern können zwischen 7 und 40 % der benötigten Energie durch die im distalen Magen-Darm-Trakt bereitgestellten SCFA gedeckt werden (BUGAUT 1987).

Für die distalen Abschnitte des Colons konnte sowohl die Aufnahme über Diffusion der HSCFA als auch die Aufnahme der SCFA^- nachgewiesen werden (RECHKEMMER et al. 1988; HARIG et al. 1996; TYAGI et al. 2002; VIDYASAGAR et al. 2004, 2005). Für die Diffusion der undissoziierten Säure wird sowohl im intakten Colongewebe als auch in Colonepithelzellen eine sekundäre Kopplung an den Natriumtransport beschrieben (HOLTUG 1989; MONTROSE u. CHU 1997; MUSCH et al. 2001). Wie im Pansen diffundieren auch im Colon HSCFA durch die apikale Zellmembran, dissoziieren intrazellulär aufgrund ihres niedrigen pK-Wertes (4,8) und bewirken somit einen Anstieg der intrazellulären Protonenkonzentration (CHU u. MONTROSE 1995). Dies stimuliert den apikalen Na^+/H^+ -Austauscher (NHE), der die Protonen im Antiport mit Natrium wieder nach luminal ausschleust. Hiermit lässt sich eine Stimulation der Natriumresorption in Anwesenheit von SCFA erklären (BINDER u. MEHTA 1989; MUSCH et al. 2001). Abweichend von diesen Befunden zeigten jedoch HARIG et al. (1996) an luminalen Membranvesikeln des menschlichen Colons, dass die Natriumaufnahme unabhängig von extrazellulärem Butyrat war. Die Autoren folgerten, dass ein proteinvermittelter Mechanismus an der Aufnahme von SCFA beteiligt ist.

Als proteinvermittelter nicht-diffusibler Mechanismus der apikalen SCFA-Aufnahme wird in den Epithelien der verschiedenen Darmabschnitte aufgrund der Ergebnisse von vielen Autoren ein $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher postuliert (HARIG et al. 1996; GENZ et al. 1999; MASCOLO et al.

1991; VIDYASGAR et al. 2004, 2005; KAWAMATA et al. 2007). RECHKEMMER et al. (1988) untersuchten am Meerschwein vergleichend proximale und auch distale Abschnitte des Colons. Hier zeigte sich im distalen Colon ein Anstieg der SCFA-Clearance um das 1,5 – 2-fache von Acetat über Propionat zu Butyrat, während die Unterschiede am proximalen Colon wesentlich geringer waren. Daraus folgerten die Autoren, dass im distalen Colon die Aufnahme wahrscheinlich größtenteils durch Diffusion der undissoziierten Säure vermittelt war. Für das proximale Colon postulierten die Autoren hingegen, dass ca. 50% als Anion resorbiert wurden. HARIG et al. (1991) konnten an Bürstensaum-Membranvesikeln aus dem Ileum des Menschen einen Na^+ -unabhängigen, HCO_3^- -abhängigen Transport von Propionat nachweisen, der einer Sättigungskinetik mit einer K_m von $1,5 \pm 3 \text{ mM}$ und einer V_{\max} von $50 \pm 3 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Protein}}^{-1} \cdot 3\text{s}^{-1}$ folgte. Weiterhin ließ sich der Propionattransport durch SCFA mit einer Kettenlänge von zwei bis vier C-Atomen zu ca. 40% hemmen. Gegenüber den Stilbenderivaten 4-Acetamido-4'-isothiocyanatostilben-2,2'-disulfonsäure (SITS) und DIDS, beides Hemmstoffe für Anionenaustauscher, war der gezeigte Propionattransport relativ insensitive. Für eine effektive Hemmung mussten die Hemmstoffe selbst bei einer Konzentration von nur $250 \mu\text{M}$ Propionat in Konzentrationen von 10 mM eingesetzt werden. Diese Untersuchungen wurden an luminalen Membranvesikeln (LMV) des menschlichen Colons mit n-Butyrat wiederholt (HARIG et al. 1996). Die n-Butyrat Aufnahme war Na^+ - und Cl^- -unabhängig, HCO_3^- -abhängig und hemmbar mit SCFA einer Kettenlänge von zwei bis vier C-Atomen (25 – 40%). Außerdem konnten sie zu 40 % durch Nifluminsäure, ein Hemmstoff für Anionentransporter und verschiedene Chloridkanäle, gehemmt werden (HARIG et al. 1996). MASCOLO et al. (1991) wiesen für die n-Butyrataufnahme in apikale Membranvesikel des distalen Colons der Ratte eine Michaelis-Menten-Kinetik mit einer K_m von $26,9 \pm 1,6 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ nach. VIDYASGAR et al. (2004, 2005) schlossen aufgrund ihrer Untersuchungen mit Isobutytrat und Butyrat an isolierten Krypten und apikalen Membranvesikeln des distalen Colons von Ratten auf das Vorhandensein dreier Mechanismen für die Bikarbonatsekretion. Sie konnten einen dieser drei Mechanismen als einen Cl^- -unabhängigen, sättigbaren und DIDS-insensitiven $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher charakterisieren. Dieser Austauscher war ebenfalls insensitive gegenüber 5-Nitro-2-(3-Phenylpropamino)-Benzoat (NPPB).

2.2.5 Kandidatenproteine für eine apikale SCFA-Aufnahme in das Pansenepithel

Wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben gibt es Parallelen zwischen Vormagen und Dickdarm. So werden in beiden Abschnitten des Magen-Darm-Traktes SCFA in z.T. ähnlichen Konzentrationen produziert und dienen sowohl beim Wiederkäuer als auch beim Monogastrier der Energiebereitstellung des Tieres. Für den Vormagen, wie auch den Dickdarm konnte bereits eine Abhängigkeit der apikalen SCFA-Aufnahme von Bikarbonat nachgewiesen werden (Kapitel 2.2.3 und 2.2.4). Angesichts dieser Parallelen auf funktioneller Ebene zwischen Vormagen und Dickdarm ist es wahrscheinlich, dass es auch Überschneidungen in der molekularen Identität von SCFA-Transportproteinen gibt. Im Folgenden sollen daher die in der Literatur beschriebenen Proteine aufgeführt werden, die Kandidaten für eine apikale Aufnahme von SCFA an Colon und Pansen darstellen könnten, bzw. im Colon bereits als SCFA-transportierende Proteine nachgewiesen wurden.

2.2.5.1 Downregulated in Adenoma (DRA = SLC26A3)

SCHWEINFEST et al. (1993) konnten erstmals ein Gen aus der Colonmukosa des Menschen isolieren, dessen Expression auf Protein- und mRNA-Ebene in Colonadenomen und -adenokarzinomen signifikant herunterreguliert war. Deswegen nannten sie es DRA – Downregulated in Adenoma. Eine Mutation dieses Genes löst eine als CLD – Congenital Chloride Diarrhoea – bekannte Erkrankung aus (HOGLUND et al. 1996a, b, 1998a, b). Die Ermittlung der Lokalisation des DRA-Proteins in der apikalen Zellmembran gelang als ersten BYEON et al. (1996) im Colon der Maus. Der Transporter ist in der apikalen Membran von Enterozyten des Dün- und Dickdarms (BYEON et al. 1996; JACOB et al. 2002), aber auch in Samenbläschen, in Schweißdrüsen (HAILA et al. 2000), im Pankreas (GREELEY et al. 2001) und in Zellkulturen von trachealen Epithelzellen exprimiert (WHEAT et al. 2000).

SILBERG et al. (1995) stellten mit Hilfe von Oozytenexpressionstudien fest, dass es sich um einen Transporter für Sulfat und Oxalat handelt. BYEON et al. (1998) konnten den Transport von Sulfat an DRA-transfizierten Sf9 Zellen (eine Ovarialzelllinie des Asiatischen Baumwollwurms) bestätigen. Im Weiteren wurde der DRA als Na^+ -unabhängiger $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher charakterisiert (MOSELEY et al. 1999; MELVIN et al. 1999; ALPER et al. 2001; KO et al. 2002). Kontrovers diskutiert wird die Möglichkeit, dass der DRA weitere Anionen wie Hydroxidionen und Nitrat transportiert. So konnte in Caco-2-Zellen (ALREFAI et al. 2001) und auch in Xenopus-Oozyten (MOSELEY et al. 1999) ein Transport von Hydroxidionen nachgewiesen werden, während LAMPRECHT et al. (2005) diesen Transport in HEK-293-Zellen nicht bestätigen konnten. STERLING et al. (2002) wiesen eine $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ -Austauscher-Aktivität in DRA-transfizierten HEK-293-Zellen nach. In Caco-2-Zellen konnte hingegen ein von den Autoren als DRA-vermittelt beschriebener Sulfattransport nicht mit Nitrat gehemmt werden (ALREFAI et al. 2001). VIDYASAGAR et al. (2004) schlossen den DRA als vermittelndes Protein des von Ihnen am Colon nachgewiesenen $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher aus. Ein Transport von SCFA wurde für den DRA bisher noch nicht bestätigt. MAHAJAN et al. (1996) konnten zwar die Chloridaufnahme an apikalen Membranvesikeln aus dem menschlichen Colon durch Nitrat und auch Acetat hemmen, die Autoren brachten dies aber nicht mit dem DRA in Verbindung.

Bezüglich der Hemmstoffsensitivität des DRA gibt es genauso wie für die Transporteigenschaften divergierende Untersuchungsergebnisse. Zum Teil wird der DRA als DIDS-sensitiv beschrieben (SILBERG et al. 1995; ALREFAI et al. 2001; JACOB et al. 2002). In anderen Untersuchungen wurde das Protein hingegen als relativ DIDS-insensitiv charakterisiert (MELVIN et al. 1999; ALPER et al. 2001; CHERNOVA et al. 2003; LAMPRECHT et al. 2005). Neben der umstrittenen DIDS-Hemmbarkeit zeigte der DRA eine Sensitivität gegenüber den Hemmstoffen Nifluminsäure (CHERNOVA et al. 2003; ALPER et al. 2001), Glibenclamid (LAMPRECHT et al. 2005), Tenidap (ALPER et al. 2001; CHERNOVA et al. 2003; LAMPRECHT et al. 2005), α -Cyano- β -(1-Phenylindol-3-yl)Acrylat (UK5099) (CHERNOVA et al. 2003) und NS1625 (CHERNOVA et al. 2003).

Die Elektrogenität des DRA wird ebenfalls kontrovers diskutiert. So konnten MELVIN et al. (1999) an DRA-transfizierten HEK-293-Zellen zeigen, dass es sich bei dem DRA um einen elektroneutralen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher handelt. Die Elektroneutralität bestätigten auch LAMPRECHT et al. (2005) an DRA-transfizierten HEK-293 Zellen. KO et al. (2002) hingegen postulierten für den DRA sowie auch für den PAT1 (Kap. 2.2.5.2) aufgrund Ihrer Untersuchungen an Oozyten und HEK-293-Zellen einen elektrogenen Transport. Dabei geben die Autoren für den DRA eine Stöchiometrie von $1 \text{ HCO}_3^- : \geq 2 \text{ Cl}^-$ an.

Funktionell besteht eine Kopplung zwischen dem DRA und dem NHE. An NHE3-defizienten Mäusen wurde eine erhöhte mRNA-Expression von DRA im proximalen Colon um ca. 75% und im distalen Colon um ca. 50% festgestellt (MELVIN et al. 1999). LAMPRECHT et al. (2002) konnten zudem zeigen, dass NHE3 und DRA über den Na^+/H^+ -Austauscher-Regulatorfaktor 3 (N a^+/H^+ Exchanger Regulator Factor 3 = NHERF3 = E3KARP) miteinander verbunden sind. Unter der Annahme, dass der DRA an der Aufnahme kurzkettiger Fettsäuren beteiligt ist, wäre die Verbindung über NHERF3 eine mögliche Erklärung für Ergebnisse der Autoren VON ENGELHARDT et al. (1993). Diese wiesen bei Zugabe von 1 mM Amilorid (ein Hemmstoff des NHE) am proximalen Colon und Caecum des Meerschweins eine signifikante Reduktion der SCFA Fluxe in ms-Richtung nach.

2.2.5.2 Putativer Anionentransporter 1 (PAT1 = SLC26A6)

Der Putative Anionentransporter 1 stellt ein weiteres Protein aus der SLC26 Familie dar. Im Jahre 2000 gelang die Identifikation durch Database Mining (LOHI et al. 2000). Der PAT1 wird relativ breit exprimiert und ist sowohl im Dünndarm, im Colon (WANG et al. 2002), im Herz (WANG et al. 2002; ALVAREZ et al. 2004), in der Niere (WANG et al. 2002), im Pankreas (LOHI et al. 2000) und auch im Magen (PETROVIC et al. 2002; WANG et al. 2002) vorhanden. Mensch und Maus weisen zwei unterschiedliche Splice-Varianten auf (CHERNOVA et al. 2005). Diese stimmen in der Aminosäuresequenz nur zu 78% überein (CHERNOVA et al. 2005), was auf eine große Heterogenität hindeutet. Der PAT1 der Maus wird auch als CFEX ($\text{Cl}^-/\text{Formiat}$ -Exchanger) bezeichnet. Er wurde als primärer Kandidat für einen apikalen $\text{Cl}^-/\text{Formiat}$ -Austauscher in den proximalen Tubuli der Niere beschrieben (KNAUF et al. 2001). Die apikale Lokalisation wurde in allen bisher untersuchten epithelialen Geweben durch Immunlokalisation bestätigt (LOHI et al. 2000; KNAUF et al. 2001; PETROVIC et al. 2002; WANG et al. 2002).

Bezüglich der Transporteigenschaften weist dieser Transporter in der SLC26 Familie das breiteste Spektrum an transportierten Anionen auf. In Oozyten exprimiert, fungiert der PAT1 als $\text{Cl}^-/\text{Oxalat}$ -, $\text{SO}_4^{2-}/\text{Oxalat}$ -, $\text{Oxalat}/\text{Formiat}$ -, $\text{SO}_4^{2-}/\text{Cl}^-$ -, $\text{Cl}^-/\text{Formiat}$ -, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ - und Cl^-/OH^- -Austauscher (JIANG et al. 2002; KO et al. 2002; WANG et al. 2002; XIE et al. 2002). Allerdings scheint der Transporter nur eine geringe bis keine Affinität zu Hydroxidionen aufzuweisen (JIANG et al. 2002; WANG et al. 2002). Der Sulfattransport scheint im Falle der Splice-Variante der Maus ausgeprägter zu sein als bei der Splice-Variante des Menschen (CHERNOVA et al. 2005). Ebenfalls beschrieben wird ein Transport kurzkettiger Fettsäuren (NOZAWA et al. 2004). Sowohl die Aufnahme von Acetat, Propionat als auch Butyrat konnte in PAT1-transfizierten HEK-293-Zellen nachgewiesen werden.

Der PAT1 ist ein DIDS-sensitiver Transporter (JIANG et al. 2002; WANG et al. 2002; PETROVIC et al. 2002), der zumindest beim Oxalattransport auch eine Sensitivität gegenüber Nifluminsäure, Tenidap und NS3262 besitzt (CHERNOVA et al. 2005). Die Elektrogenität des PAT1 wird kontrovers diskutiert. So konnten KO et al. (2002) anhand von Untersuchungen an transfizierten Oozyten und transfizierten HEK-293-Zellen einen elektrogenen Transport mit einer Stöchiometrie von $1 \text{ Cl}^- : 2 \text{ HCO}_3^-$ nachweisen. Eine Elektrogenität zeigte sich ebenfalls für den $\text{Cl}^-/\text{Oxalat}$ -Austausch bei der Maus in Oozytenexpressionstudien (CHERNOVA et al. 2005). Als elektroneutral wurde hingegen der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ - und der Cl^-/OH^- -Austausch bei Mensch und Maus beschrieben (CHERNOVA et al. 2005).

2.2.5.3 H^+ /Monocarboxylat-Kotransporter (MCT = SLC16A1-14)

Die Familie der Monocarboxylsäuretransporter (SLC16 Familie) weist inzwischen 14 Mitglieder auf, die bisher nur teilweise funktionell charakterisiert worden sind. Bei SLC16A10 handelt es sich nicht um einen Monocarboxylattransporter im klassischen Sinne, sondern um den T-Typ-Aminosäuretransporter 1 (TAT1) (KIM et al. 2001, 2002). Der MCT6 (SLC16A5) wurde erst kürzlich als H^+ -unabhängiger Bumetanidtransporter charakterisiert. Er transportiert außerdem auch Probenecid und Nateglinid, aber kein Laktat oder Tryptophan (MURAKAMI et al. 2005).

Für die Isoformen MCT1-4 (SLC16A1-4) konnte ein Transport von Monocarboxylsäuren (insbesondere Laktat) nachgewiesen werden. Laktat ist für manche Zellen, zum Beispiel Erythrozyten, weiße Muskelzellen und auch Tumorzellen, ein Endprodukt. Für Kardiomyozyten, Leberzellen, Nierenzellen und Neurone stellt Laktat hingegen ein wichtiges energielieferndes Substrat dar (POOLE u. HALESTRAP 1993). Angesichts der physiologischen Relevanz des Laktattransportes wurden die Transporter zunächst als H^+ /Laktat-Kotransporter charakterisiert und ausgewiesen. Später konnte aber gezeigt werden, dass die Transporter nicht nur Laktat, sondern auch unverzweigte, aliphatische Monocarboxylsäuren mit Kettenlängen von C2 - C5 akzeptieren (POOLE u. HALESTRAP 1993; WANG et al. 1996). Deswegen bezeichnet man sie heute als H^+ /Monocarboxylat-Kotransporter (MCT). Für die Expression einiger MCT-Isoformen in der Plasmamembran scheinen Hilfsproteine benötigt zu werden (HALESTRAP u. PRICE 1999; KIRK et al. 2000; HALESTRAP u. MEREDITH 2004). MCT1 und 4 benötigen CD147 oder verwandte Proteine, um in die Membran eingebaut zu werden und dort funktionelle Aktivität zu zeigen (KIRK et al. 2000, GRAHAM et al. 2007).

Der MCT1 ist, zumindest aufgrund der bisherigen Untersuchungen, der aus dieser Familie am breitesten exprimierte Transporter (HALESTRAP u. MEREDITH 2004). Im Magen-Darm-Trakt des Kalbes und des Schafes wurde kürzlich die Lokalisation mit Hilfe molekularbiologischer und immunhistochemischer Methoden dargestellt. Der MCT1 konnte in Pansen, Haube, Psalter, Blinddarm und Colon nachgewiesen werden (KIRAT et al. 2005, 2006b). In Labmagen und Duodenum war er nicht bzw. nur geringgradig exprimiert (KIRAT et al. 2005, 2006b). Für den gastrointestinalen MCT1 wurden sowohl basolaterale (GARCIA et al. 1994; ORSENIGO et al. 1996, 1999; MÜLLER et al. 2002; KIRAT et al. 2006a; KIRAT u. KATO 2006; GRAHAM et al.

2007) als auch apikale Lokalisationen nachgewiesen (RITZHAUPT et al. 1998a, b; CUFF et al. 2000; GILL et al. 2005). Im Pansen des Schafes und des Rindes ist die Lokalisation des MCT1 basolateral (MÜLLER et al. 2002; GRAHAM et al. 2007). Im Pansen der Ziege und im Blinddarm des Rindes konnte der MCT1 ebenfalls nur basolateral dargestellt werden (KIRAT et al. 2006a; KIRAT und KATO 2006). Somit scheint die Expression des MCT1 im Pansen von Wiederkäuern auf die basolaterale Membran beschränkt zu sein.

Die Hemmstoffe des MCT1 lassen sich in drei Kategorien einteilen:

1. Großmolekulare oder aromatische Monocarboxylate wie 2-Oxo-4-Methylpentanoat, Phenylpyruvat und Derivate der α -Cyanozimtsäure wie α -Cyano-4-Hydroxycimtsäure (CHC). Diese Hemmstoffe führen zu einer reversiblen Blockade des MCT1 (POOLE u. HALESTRAP 1993; GARCIA et al. 1995; MANNING FOX et al. 2000; HALESTRAP u. MEREDITH 2004).
2. Verschiedene amphiphile Substanzen mit divergierender Struktur. Dazu gehören die Bioflavonoide Quercetin und Phloretin (POOLE u. HALESTRAP 1993; MANNING FOX et al. 2000; HALESTRAP u. MEREDITH 2004), aber auch Hemmstoffe von Anionentransportern wie NPPB (MANNING FOX et al. 2000; HALESTRAP u. MEREDITH 2004) und Nifluminsäure (HALESTRAP u. MEREDITH 2004).
3. Stilbenderivate wie DIDS und 4,4'-Dibenzamidostilben-2,2'-Disulfonat (DBDS). Sie führen bei kurzfristiger Inkubation zu einer reversiblen Hemmung. Bei längerfristiger Inkubation rufen sie genauso wie organische Quecksilber-Thiolverbindungen (z.B. p-Chloromercuribenzensulfonsäure (pCMBS) eine irreversible Hemmung hervor (POOLE u. HALESTRAP 1993; MANNING FOX et al. 2000; HALESTRAP u. MEREDITH 2004).

Der MCT1 bewirkt einen elektroneutralen Kotransport von einem Proton und einem Monocarboxylat-Anion (POOLE u. HALESTRAP 1993; CARPENTER u. HALESTRAP 1994), womit er zur Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes beiträgt. Von RITZHAUPT et al. (1998a, b) wurde ein Laktat- und Butyrattransport in humane und porcine Bürstensaummembranvesikel beschrieben, der durch einen einwärtsgerichteten pH-Gradient sowie einen auswärtsgerichteten Anionengradient stimuliert wurde. Dieser Transport war DIDS-insensitiv aber durch Phloretin und NPPB sowie Pyruvat, L-Laktat und α -Ketobutyrat hemmbar. HADJIAGAPIOU et al. (2000) konnten die These eines MCT1-vermittelten Butyrattransportes in ihren Untersuchungen zum Butyrattransport in Caco-2-Zellen bestätigen. In der Folge wurden von GILL et al. (2005) und DUDEJA u. RAMASWAMY (2006) die Hypothese formuliert, dass der apikale MCT1 an der apikalen Aufnahme von SCFA in Form eines SCFA/ HCO_3^- -Austauschers beteiligt ist. Der von VIDYASAGAR et al. (2005) am Colon der Ratte beschriebene SCFA/ HCO_3^- -Austauscher war hingegen insensitiv gegenüber CHC. Deswegen schlossen die Autoren den MCT1 als vermittelndes Protein aus. Zu denselben Ergebnissen gelangten KAWAMATA et al. (2007) bezüglich des Propionattransportes am Caecum der Maus.

Bezüglich der Substratspezifität, der Hemmstoffe und auch der Lokalisation in den Geweben gibt es zum Teil beträchtliche Unterschiede zwischen den einzelnen MCT-Isoformen. So kommt der als CHC-, Phloretin- und pCMBS-insensitiv (GROLLMAN et al. 2000) angegebene MCT3 (SLC16A3) nur an der basolateralen Membran des Retina- und Pigmentepithels vor (YOON et al. 1997; PHILP et al. 2001). MCT2 und 5 werden in der basolateralen Membran beschrieben. Der MCT2 kommt

unter anderem in Leber, Niere, Kardiomyozyten und Magen, nicht aber im Darm vor (GARCIA et al. 1995; JACKSON et al. 1997). Im Pansen des Rindes konnte die Existenz des MCT2 mittels PCR nachgewiesen werden (GRAHAM et al. 2007). GRAHAM et al. (2007) fanden immunhistochemisch eine diffuse Lokalisation in allen Schichten des Pansen, mit Ausnahme des Stratum corneum (Bilder im Artikel nicht gezeigt). Der MCT4 wird zwar in monogastrischen Spezies im Darm bisher nur basolateral beschrieben (GILL et al. 2005), KIRAT et al. (2007) wiesen allerdings kürzlich für den Pansen eine apikale Lokalisation des MCT4 nach. MCT5 konnte unter anderem im Darm des Menschen beschrieben werden (GILL et al. 2005). Aufgrund der bisher nur basolateral nachgewiesenen Lokalisation in Epithelgeweben ist der MCT5 als Kandidat für eine apikale Aufnahme von SCFA eher auszuschließen. MCT4 und eventuell auch MCT2 erscheinen nach neuesten Untersuchungen im Pansen aber als mögliche Kandidaten für eine apikale SCFA-Aufnahme (GRAHAM et al. 2007; KIRAT et al. 2007).

2.2.5.4 Natrium/Monocarboxylat-Kotransporter

(Sodium/Monocarboxylate-Cotransporter = SMCT = SLC5A8 & 12)

Es gibt zwei Isoformen der Na⁺/Monocarboxylat-Kotransporter, den SMCT1 (SLC5A8) und SMCT2 (SLC5A12). Diese sind erst kürzlich beschriebene Mitglieder der Na⁺/Glukose-Kotransporter-Familie SLC5. Der SMCT1 wurde erstmalig von LI et al. (2003) als Tumorsupressor genannt, der in Colonkarzinomen durch Methylierung herunterreguliert wird. LI et al. (2003) konnten zeigen, dass der SMCT1 Natrium transportiert, während das Kosubstrat noch unklar blieb. In Oozytenexpressionsstudien konnte später nachgewiesen werden, dass der SMCT1 SCFA gemeinsam mit Natrium transportiert (MIYAUCHI et al. 2004). Der SMCT2 wurde erst 2005 von SRINIVAS et al. kloniert und funktionell identifiziert. Dabei wurde er als low-affinity-Transporter für Monocarboxylate beschrieben.

SMCT1 konnte bereits im Darm von Maus und Mensch (GOPAL et al. 2004; PARODER et al. 2006) und auch in der Niere und dem Gehirn der Maus nachgewiesen werden (GOPAL et al. 2004; MARTIN et al. 2006). Für den SMCT1 konnte eine apikale Lokalisation in Colon- und Nierenepithel gezeigt werden (PARODER et al. 2006). Der SMCT2 stellt nach SRINIVAS et al. (2005) ebenfalls einen zumindest bei der Maus relativ breit exprimierten Transporter dar. Bei der Maus kommt er sowohl in Niere, Dünndarm (im ersten Teil wenig, am Ende viel), Colon und Caecum als auch mit geringerer Expression in Lunge, Skelettmuskel, Leber, Herz und Gehirn vor.

SRINIVAS et al. (2005) stellten am Beispiel der Maus die These auf, dass der SMCT1 und der SMCT2 sich weniger in den transportierten Substraten als vielmehr in Ihrer Substrataffinität unterscheiden. Der SMCT1 stellt dabei das hoch affine System (hauptsächlich proximaler Dünndarm) und der SMCT2 das geringer affine System (distaler Dünndarm, Colon und Blinddarm) dar. Es werden nicht nur Laktat, Pyruvat (MIYAUCHI et al. 2004; GOPAL et al. 2004, 2005) und Ketonkörper transportiert (MARTIN et al. 2006) sondern auch die kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat (MIYAUCHI et al. 2004; GOPAL et al. 2004). Für den SMCT1 sind Sättigungskurven mit K_{0,5}-Werten von 81 ± 17 µM für Butyrat, von 127 ± 14 µM für Propionat und

von $2,46 \pm 0,89$ mM für Acetat in Oozytenstudien beschrieben (MIYAUCHI et al. 2004). Die K_m -Werte für Nikotinat liegen in HRPE-Zellen bei 300 μ M (GOPAL et al. 2005).

Ibuprofen und strukturell ähnliche, nicht-steroidale Antiphlogistika werden als Hemmstoffe für den SMCT1 beschrieben (ITAGAKI et al. 2006; PARODER et al. 2006). Interessanterweise führte die Zugabe von 5 mM CHC (bekannt als Hemmstoff des MCT) in SMCT1-transfizierten Zellen zu einer ca. 2-fach erhöhten Laktat- und Pyruvataufnahme (GOPAL et al. 2004). Der SMCT1 vermittelt einen elektrogenen Transport, wobei die Stöchiometrie von dem zu transportierenden Substrat abhängen könnte. So konnte sowohl der Kotransport von $4 \text{ Na}^+ : 1 \text{ SCFA}$ (MIYAUCHI et al. 2004; GOPAL et al. 2004), als auch der Transport von $\geq 2 \text{ Na}^+ : 1 \text{ Nikotinat/Laktat}$ (GOPAL et al. 2004, 2005) nachgewiesen werden.

Der SMCT1 stellt am Darm und auch in der Niere einen Mechanismus dar, der eine bikarbonat-unabhängige SCFA-Aufnahme vermittelt. Im Vormagen ist über dieses Transportprotein bisher nichts bekannt. Die Natriumaufnahme konnte durch die Anwesenheit von SCFA erhöht werden (GÄBEL 1988). Allerdings wurde der SCFA-Transport im Reticulorumen bisher als weitestgehend unabhängig von Natrium beschrieben (KRAMER et al. 1996).

2.2.5.5 CFTR

Der CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) stellt ein Mitglied der ATP-binding-cassette- (ABC-) Familie dar (HYDE et al. 1990). Er ist in dieser Familie das einzig bekannte Kanalprotein, was ihn von den anderen Mitgliedern der Familie (meist ATP-getriebene Transportproteine) unterscheidet (AKABAS 2000). Mutationen im Gen des CFTR-Kanals führen zur Erkrankung der zystischen Fibrose. Das CFTR-Gen konnte erstmals von ROMMENS et al. (1989), RIORDAN et al. (1989) und KEREM et al. (1989) isoliert werden.

Neben verschiedenen anderen epithelialen Lokalisationen wie dem Pankreas-, dem Lungen- und dem Kornea-Epithel des Rindes wurde der CFTR bereits im gesamten Darm-Trakt der Monogastrier nachgewiesen (CRAWFORD et al. 1991; HAYDEN u. CAREY 1996; AMEEN et al. 2000a, b; SUN u. BONANNO 2001; SPIEGEL et al. 2003). Innerhalb der Epithelien wird zumeist eine apikale Lokalisation (DENNING et al. 1992; AMEEN et al. 1999, 2000a; DOUCET et al. 2003), im Colon aber auch eine basolaterale Lokalisation beschrieben (DOUCET et al. 2003). Auch eine Lokalisation in subapikalen Vesikeln wurde gezeigt (DALEMANS et al. 1992; WEBSTER et al. 1994; AMEEN et al. 1999; AMEEN et al. 2000b).

Der CFTR besteht aus zwei gleichen Untereinheiten, die über eine cytoplasmatische R-Domäne verbunden sind (GADSBY u. NAIRN 1999; LI u. NAREN 2005). Diese cytoplasmatische R-Domäne besitzt mehrere Phosphorylierungsstellen für verschiedene Proteinkinasen (CHENG et al. 1991; LI u. NAREN 2005). Die Kanalaktivität wird durch Phosphorylierung kontrolliert (PICCIOTTO et al. 1992; RICH et al. 1993). Die Phosphorylierung kann durch cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen erfolgen (BEAR et al. 1991; CHENG et al. 1991; FRENCH et al. 1995; VAANDRAGER et al. 1997; DAHAN et al. 2001; GUGGINO u. STANTON 2006). Durch die Phosphorylierung werden nicht nur bereits in die Zellmembran inserierte CFTR-Moleküle aktiviert,

sondern es erfolgt auch ein verstärkter Einbau des CFTR in die Zellmembran durch Exozytose CFTR-haltiger Vesikel (AMEEN et al. 2003; COLIN-BISELLO et al. 2005). Der Einbau in die Zellmembran über Vesikel-Trafficking stellt eine wesentliche posttranslationale Expressionsregulation dar (KLEIZEN et al. 2000; BERTRAND u. FRIZZELL 2003; GUGGINO u. STANTON 2006).

Es ist bekannt, dass der CFTR neben Chlorid auch eine Permeabilität für zahlreiche andere Anionen besitzt (LINSDELL et al. 1997; ILLEK et al. 1999; SPIEGEL et al. 2003; HUG et al. 2003). Dabei besteht eine Leitfähigkeit für Acetat, die ca. 10% der Chloridleitfähigkeit beträgt (LINSDELL et al. 1997; ILLEK et al. 1999), während der Kanal für Nitrat die größte Leitfähigkeit hat (LINSDELL et al. 1997).

Bezüglich der Hemmstoffsensitivität erweist sich der CFTR nur bei intrazellulärer Zugabe als DIDS-sensitiv (LINSDELL u. HANRAHAN 1996; JENTSCH et al. 2002). Eine bessere Sensitivität besteht für die nichtsteroidalen Antiphlogistika Nifluminsäure und Flufenaminsäure sowie für NPPB und Glibenclamid (MCCARTY et al. 1993; JENTSCH et al. 2002; SCOTT-WARD et al. 2004). Ein neuartiger selektiver Hemmstoff des CFTR ist CFTRinh172 (THIAGARAJAH et al. 2004; AKIBA et al. 2005).

Der CFTR fungiert nicht nur als Anionenkanal in sezernierenden Epithelien, sondern hat auch Anteil an der Regulation verschiedener anderer Ionenkanäle und Transporter (SCHWIEBERT et al. 1999; KUNZELMANN 2001). So wurde ein aktivierender Einfluss auf auswärtsgerichtete Cl⁻-Kanäle (ORCC) (EGAN et al. 1992; GABRIEL et al. 1993; SCHWIEBERT et al. 1999) und ein hemmender Effekt auf epitheliale Na⁺-Kanäle (ENaC) nachgewiesen (STUTTS et al. 1995; ISMAILOV et al. 1996; SCHWIEBERT et al. 1999). Der CFTR aktiviert sowohl den DRA (WHEAT et al. 2000; GREELEY et al. 2001) als auch den PAT1 (GREELEY et al. 2001). Außerdem beeinflusst er den Renal Outer Medullary K⁺-Channel (ROMK) (SCHWIEBERT et al. 1999). Aufgrund der vielfältigen Interaktionen des CFTR mit anderen Transportproteinen wird eine Makromolekülkomplex-Bildung vermutet (LI u. NAREN 2005).

2.2.5.6 CIC-Familie

Mögliche Struktur einer SCFA-Leitfähigkeit an der apikalen Membran könnte ein Mitglied der CIC-Familie (Chloride Channel) sein. CIC werden zum Teil in vielen Geweben exprimiert, einige sind aber sehr Gewebe-spezifisch. So wurde der CIC0 aus dem elektrischen Organ des Zitterrochens isoliert (JENTSCH et al. 1990). Der CIC1 ist ein Muskel-spezifischer Chloridkanal (STEINMEYER et al. 1991; JENTSCH et al. 2002). CICKa und CICKb kommen fast ausschließlich in der Niere vor (ADACHI et al. 1994; KIEFERLE et al. 1994; VANDEWALLE et al. 1997; YOSHIKAWA et al. 1999; JENTSCH et al. 2002). Die Chloridkanäle CIC 3, 4, 5, 6 und 7 sind insgesamt noch weniger gut charakterisierte Kanäle. Zum Teil wird bei diesen Isoformen die Lokalisation an Zellorganellen diskutiert, wobei CIC3, 4 und 5 zumindest bei Überexpression auch in die Plasmamembran eingebaut werden können (JENTSCH et al. 1995, 2002, 2007; STEINMEYER et al. 1995; DEVUYST et al. 1999; FRIEDRICH et al. 1999; SAKAMOTO et al. 1999). Aufgrund der

Gewebespezifität und der zellulären Lokalisation zielten die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nur auf die CIC2, 3, 4 und 5 ab, die im Folgenden näher beschrieben werden.

CIC2

Der CIC2 wird sowohl in der apikalen Membran (GYOMOREY et al. 2000; CUPPOLETTI et al. 2004) als auch in der Nähe der Tight junctions bzw. in der basolateralen Membran gastrointestinaler Epithelien beschrieben (GYOMOREY et al. 2000; CATALAN et al. 2002; LIPECKA et al. 2002; JENTSCH 2007). In Ussing-Kammer Studien am Dünndarm der Maus konnte von GYOMOREY et al. (2000) ein apikaler Chloridstrom nachgewiesen werden, der durch mukosale NPPB-Gabe hemmbar war, aber keine DIDS-Sensitivität aufwies. Von den Autoren wurde dieser apikale Chloridstrom dem CIC2 zugeschrieben. Im distalen Colon des Meerschweinchens wurde der CIC2-Kanal nur in der basolateralen Membran der Colonzellen nachgewiesen (CATALÁN et al. 2002).

CIC3

Der CIC3 wird, was die Lokalisation betrifft, sowohl an intrazellulären Organellen als auch in der Plasmamembran lokalisiert (zumindest CIC3B) beschrieben (JENTSCH et al. 2002; NILIUS u. DROOGMANS 2003). Nach Coexpression der splice-Variante CIC3B mit EBP50 (= NHERF1) in der murinen Mammaepithelzelllinie Cl27 konnten OGURA et al. (2002) eine durch Depolarisation induzierte Kanalaktivität nachweisen. Die Autoren folgerten, dass die Membranexpression von CIC3B abhängig ist von einer Coexpression mit EBP50. Eine apikale Lokalisation des CIC3 fanden ebenfalls UBELS et al. (2006) im Tränenkanal der Ratte. Der CIC3 zeigte im Gegensatz zu den anderen CIC-Mitgliedern eine größere Leifähigkeit für Jod als für Chlorid (NILIUS u. DROOGMANS 2003).

CIC4

Über den CIC4 ist bisher noch relativ wenig bekannt (JENTSCH et al. 2005). Der CIC4 wurde bereits im Darm der Ratte in einer apikalen Lokalisation nachgewiesen (MOHAMMAD-PANAH et al. 2002). Kleinere Mengen von CIC4 befanden sich in subapikalen Endosomen. Die Autoren vermuteten, dass dieser Kanal an der intestinalen Chloridsekretion beteiligt ist. Es ist aber noch unklar, ob der CIC4 wirklich einen Chloridkanal darstellt, oder ob er, wie von PICOLLO und PUTSCH (2005) postulierte, als endosomaler Cl⁻/H⁺-Austauscher fungiert (JENTSCH et al. 2005). Für den CIC4 wurde von FRIEDRICH et al. (1999) mit NO₃⁻ > Cl⁻ > Br⁻ > I⁻ ein ähnliches Substratspektrum beschrieben, wie für den CIC5. Ein Transport von SCFA über den CIC4 wurde noch nicht untersucht.

CIC5

Der CIC5 stellt ein bisher noch relativ wenig untersuchtes Protein dar (JENTSCH et al. 2005). Für den CIC5 wird eine intrazelluläre Lokalisation angenommen (DOWLAND et al. 2000; JENTSCH et al. 2005, 2007). Es konnte aber ebenfalls der Einbau in die apikale Plasmamembran nachgewiesen werden (FRIEDRICH et al. 1999; JENTSCH et al. 2005) wo ein starker auswärtsgerichteter, pH-abhängiger Strom gemessen werden konnte. DOWLAND et al. (2000) wiesen folgendes Substratspektrum für den CIC5 nach: NO₃ >> Cl = Br > I > Acetat > Gluconat.

Hiermit wurde bereits gezeigt, dass der CIC5 auch Acetat transportiert und somit einen möglichen Kandidaten für eine SCFA-Leitfähigkeit darstellt.

2.3 Metabolismus der kurzkettigen Fettsäuren im Pansenepithel

Im Pansenepithel von Wiederkäuern werden kurzkettige Fettsäuren teilweise verstoffwechselt (MASSON u. PHILLIPSON 1951; WEIGAND et al. 1975; GOOSEN 1976; KRISTENSEN et al. 1998). Der Umfang dieser Metabolisierung ist umstritten. Deutlich gezeigt werden konnte aber, dass die im Pansen mengenmäßig bedeutenste und im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte kurzkettige Fettsäure Acetat in geringerem Umfang metabolisiert wird als Propionat und Butyrat (MASSON u. PHILLIPSON 1951; GOOSEN 1976; BRITTON u. KREHBIEL 1993; RÉMOND et al. 1995; KRISTENSEN et al. 1998; SEHESTED et al. 1999a). Für die intraepitheliale Verstoffwechslung werden die SCFA zunächst mit Hilfe von zwei Acyl-CoA Synthetasen aktiviert (SCAIFE u. TICHIVANGANA 1980). Nach dieser Aktivierung erfolgt für Butyrat und Acetat ein Abbau bis hin zu CO₂ und Wasser (RÉMOND et al. 1995; GÄBEL et al. 2002) und dient im Falle von Butyrat auch der Detoxifizierung dieser differenzierungsfördernden SCFA. Die im Rahmen der Verstoffwechslung im Pansenepithel produzierten Ketonkörper dienen extrahepatischen Geweben wie der Herzmuskulatur, der Niere, den mukosalen Zellen des Darmes und auch dem Gehirn als Energiesubstrate (ROBINSON u. WILLIAMSON 1980; HEITMANN et al. 1987; LEHNINGER et al. 1998; MORRIS 2005).

Der intraepitheliale Metabolismus hat folgende Konsequenzen für die apikale SCFA-Aufnahme in das Pansenepithel (GÄBEL et al. 2002):

- a) Modulation des SCFA-Gradienten
- b) Generierung von CO₂

a) Modulation des SCFA-Gradienten

Schon STEVENS und STETTLER (1966a), stellten fest, dass die Stimulation des intraepithelialen Metabolismus bei gleich bleibendem ruminalen SCFA-Angebot zu einem verstärkten SCFA-Eintritt in die Zellen führte. Das Erscheinen der SCFA im Blut war hingegen vermindert. Hinweise auf eine Modulation des SCFA-Gradienten durch intraepithelialen Metabolismus lieferten auch Untersuchungen von WEIGAND et al. (1975) am Pansen von Ochsen, die zeigen konnten, dass der Nettotransport von schwer metabolisierbaren SCFA (Isobutyrate und Isovaleriat) geringer war als der von n-Butyrat und n-Valeriat. Der geringere Nettotransport von Isobutyrate (schwer metabolisierbar) konnte sowohl unter *in vivo* als auch *in vitro* Bedingungen im Pansen von Schafen durch GÄBEL et al. (2001) bestätigt werden. Zudem führte eine Gewebeanoxie wie auch eine Zugabe von 2,4-Dinitrophenol (DNP, führt zu einer ATP-Depletion) zu einer geringeren Verschwindensrate von SCFA und einem verminderten Nettotransport von Butyrat (GÄBEL et al. 2001). Der intraepitheliale Metabolismus hält damit den Konzentrationsgradienten zwischen Pansenlumen und Pansenepithel für SCFA aufrecht.

b) Generierung von CO₂

Im Rahmen des intraepithelialen Metabolismus entsteht CO₂. Die mehrfach im Pansenepithel nachgewiesene Carboanhydrase konvertiert das anfallende CO₂ zusammen mit H₂O in Kohlen-

säure, die in Bikarbonat und Wasserstoffionen zerfällt (AAFJES 1967; CARTER 1971; ASARI et al. 1989; AMASAKI et al. 1991). Das intraepithelial gebildete Bikarbonat steht damit einem SCFA/HCO₃⁻-Austauscher zur Verfügung.

2.4 Mechanismen für die Ausschleusung der kurzkettigen Fettsäuren

Wie in Kapitel 2.3 erwähnt, werden die SCFA im Epithel nur partiell verstoffwechselt. *In vivo* tritt ein großer Teil in das Portalblut über (BRITTON u. KREHBIEL 1993; SEAL u. PARKER 1994; RÉMOND et al. 1995; KRISTENSEN et al. 1998, 2000a, b) und dient der Energieversorgung. Somit müssen SCFA an der basolateralen Membran wieder ausgeschleust werden. Die Mechanismen, die den basolateralen Transport der SCFA vermitteln, sind allerdings bisher weitestgehend unbekannt. Auch hier muss, wie an der apikalen Membran, zwischen der Diffusion der undissoziierten Säure und dem proteinvermittelten Transport unterschieden werden.

2.4.1 Ausschleusung der undissoziierten Fettsäuren

Der Mechanismus der Diffusion der undissoziierten Säure wurde schon in Kapitel 2.2.2 beschrieben. Für den Pansen gibt es allerdings bisher keine Untersuchungen, die auf die basolaterale Membran fokussieren. Am Darm wurden auch nur wenige Untersuchungen bezüglich der basolateralen Membran durchgeführt. BUSCHE et al. (2002) zeigten am Meerschweinchencolon und -caecum, dass auch basolateral die Diffusion der undissoziierten Säure eine wichtige Rolle spielt. Demgegenüber zeigten TYAGI et al. (2002) an basolateralen Membranvesikeln des proximalen humanen Colons, dass am Darm auch der basolaterale Transport nicht allein durch die Diffusion der undissoziierten Säure vermittelt wird.

2.4.2 Kandidatenproteine für eine SCFA-Ausschleusung aus dem Pansenepithel

Die basolaterale Ausschleusung dissoziierter, kurzkettiger Fettsäuren am Vormagenepithel ist bisher kaum untersucht. Im Folgenden werden einige theoretisch mögliche Transportproteine beschrieben, die einen SCFA⁻-Export leisten könnten. Neben einem potentiellen SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauscher gibt es dabei auch Indizien für eine Ausschleusung von SCFA über Anionenkanäle an der basolateralen Membran.

2.4.2.1 SCFA-Ausschleusung über Carrierproteine

AE2

Der AE2 ist ein Na⁺-unabhängiger Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher, der zur SLC4 Familie gehört. Neben dem AE2 sind in der Familie drei weitere Isoformen bekannt, die einen elektroneutralen Transport von einem extrazellulärem Cl⁻-Anion gegen ein intrazelluläres HCO₃⁻-Anion vermitteln (ALPER et

al. 2002; ROMERO et al. 2004). Dieser Transport ist umkehrbar (CALONGE et al. 1992; ILUNDAIN 1992). Der AE2 wird in vielen Geweben exprimiert und kommt unter anderem auch im Gastrointestinaltrakt vor (ALPER et al. 1999; ROMERO et al. 2004). In epithelialen Geweben ist der AE2 hauptsächlich basolateral lokalisiert (STUART-TILLEY et al. 1994; ALPER et al. 1999; CASTILLO et al. 2000; ROMERO et al. 2004). Der AE2 scheint an der Regulation des intrazellulären pH-Wertes beteiligt zu sein (JIANG et al. 1994; HUH 2004). Die Aktivierung erfolgt insbesondere bei einem hohen intrazellulären pH (HUHN 2004). Die DIDS-Sensitivität des AE2 wird kontrovers diskutiert, da es sowohl Befunde einer DIDS-Hemmbarkeit des Transporters (ROMERO et al. 2004) als auch gegenteilige Befunde gibt (GARCIA et al. 1997). Bisher wurde für den AE2 noch kein SCFA-Transport nachgewiesen.

MCT 1

Die Bedeutung des MCT1 für die basolaterale Ausschleusung von SCFA wurde bereits in Kap 2.2.5.3 erläutert. Für den MCT1 wurde im Pansen funktionell bisher nur ein Transport von Ketonkörpern und Laktat nachgewiesen (MÜLLER et al. 2002). Am Blinddarm des Rindes konnte in Ussing-Kammer Untersuchungen die serosale Aufnahme von Acetat mit pCMBS und Propionat gehemmt werden (KIRAT u. KATO et al. 2006). Die Autoren folgerten daraus, dass der MCT1 auch eine Rolle bei der Ausschleusung der SCFA an der basal-orientierten Membran spielt. Den hemmenden Effekt von pCMBS auf den Acetattransport konnten KIRAT et al. (2006a) kürzlich ebenfalls in *in vitro* und *in vivo* Studien am Pansen der Ziege nachweisen.

2.4.2.2 SCFA-Ausschleusung über Anionenkanäle

Die Existenz einer basolateralen Anionenleitfähigkeit konnte in *in vitro* Untersuchungen für das Pansenepithel bestätigt werden. LEONHARD-MAREK et al. (2006) führten Untersuchungen mit Mikroelektroden zur Chloridaufnahme am Pansenepithel von Schafen durch. Nach Erhöhung der luminalen Chloridkonzentration kam es nicht zu einer Hyperpolarisation sondern zu einer Depolarisation der apikalen Membran. Aufgrund dessen schlossen die Autoren eine apikale Chloridleitfähigkeit aus. Vielmehr vermuteten sie, dass am Pansen basolateral ein Chloridkanal existiert. Inwieweit eine basolaterale Anionenleitfähigkeit auch für SCFA besteht, ist noch nicht bekannt. Ein potentieller Kandidat für eine basolaterale Anionenleitfähigkeit könnte der CIC2 sein, der bereits als basolaterale Leitfähigkeit beschrieben wurde (Kap. 2.2.5.6).

2.5 Bedeutung der Literatur für die Fragestellung dieser Arbeit

Untersuchungen an Epithelien des Vormagens von Wiederkäuern und des Magen-Darm-Trakts der Monogastrier zeigen, dass die apikale Aufnahme kurzkettiger Fettsäuren durch Diffusion der undissoziierten Säure einerseits und durch einen weiteren Mechanismus andererseits vermittelt wird. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Untersuchungen konnten zeigen, dass ein $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$ Austausch ein möglicher Mechanismus für eine proteinvermittelte, apikale SCFA-Aufnahme ist. Für den Magen-Darm-Trakt monogastrischer Spezies werden verschiedene Transporter als Kandidaten für eine apikale SCFA-Aufnahme diskutiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die an der apikalen SCFA-Aufnahme des Pansens beteiligten Mechanismen mit Hilfe der Uptake-Methode in der Ussing-Kammer und intrazellulären pH-Wertmessungen darzustellen. Es sollte zunächst auf funktioneller Ebene die Existenz proteinvermittelter Mechanismen neben der Diffusion der undissoziierten Säure bestätigt werden.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

- Kann die Existenz eines bikarbonatabhängigen proteinvermittelten Mechanismus am Pansenepithel bestätigt werden? Nicht nur im Magen-Darm-Trakt von Monogastriern sondern auch im Pansenepithel des Wiederkäuers wurde bereits eine Bikarbonatabhängigkeit der SCFA-Aufnahme *in vivo* angenommen (GÄBEL et al. 1991a).
- Gibt es weitere proteinvermittelte Transportmechanismen am Pansenepithel des Schafes? Neben einem SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauscher werden für den Magen-Darm-Trakt monogastrischer Spezies auch bikarbonatunabhängige Transportmechanismen angenommen. Diesbezüglich gibt es für das Pansenepithel bisher keine Untersuchungen. Die mögliche Existenz und Bedeutung einer bikarbonatunabhängigen proteinvermittelten SCFA-Aufnahme sollte hier ebenfalls untersucht werden.
- Welchen Anteil haben die proteinvermittelte SCFA-Aufnahme und die Diffusion der undissoziierten Säure an der gesamten SCFA-Aufnahme im Pansenepithel des Schafes unter den gegebenen Versuchsbedingungen?

Die nachgewiesenen proteinvermittelten SCFA-Aufnahmemechanismen sollten funktionell eingehender charakterisiert werden. Dazu sollten Substratspezifität, Hemmbarkeit, Kinetik und Elektrogenität untersucht werden.

In der Literatur sind bisher keine Proteine beschrieben, die die SCFA-Resorption am Pansenepithel des Schafes vermitteln könnten. Deswegen sollte auf Grundlage der funktionellen Ergebnisse die Existenz potentieller Proteine für eine apikale SCFA-Aufnahme im Pansenepithel des Schafes mit molekularbiologischen Methoden untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere stammten aus dem Lehr- und Versuchsgut Oberholz der Universität Leipzig, von der Schäferei Drutschmann in Dippoldiswalde oder der Schäferei Kober in Bad Lausick. Sie wurden spätestens zwei Wochen vor Versuchsbeginn im Veterinär-Physiologischen Institut der Universität Leipzig aufgestellt. Bei den Tieren handelte es sich um Merzschafe der Rasse Merinolandschaf oder Schwarzköpfiges Fleischschaf. Die Schlachtung erfolgte im Institut für Anatomie der Universität Leipzig. Die Tötung der Tiere wurde beim Regierungspräsidium Leipzig angezeigt (AZ 24-9162.11-01-T58/04). Nach Eröffnen der Bauchhöhle wurden die für die jeweiligen Untersuchungen benötigten Bereiche des Magen-Darm-Traktes entnommen.

Das entnommene Gewebe wurde für folgende Untersuchungsmethoden verwendet:

- Ussing-Kammer Untersuchungen (3.2)
- Kultivierung von Pansenepithelzellen (3.4)
- Molekularbiologische Untersuchungen (3.8)

3.2 Ussing-Kammer Untersuchungen

3.2.1 Präparation des Pansenepithels

Der Pansen wurde eröffnet, entleert und der ventrale Pansensack entnommen. Die Pansenwand wurde in 37 °C warme und abhängig vom Versuchsplan Carbogen- oder O₂-begaste Pufferlösung gegeben. Nach mehrfacher Spülung wurden die Muskelschichten und die Serosa durch Strippen vom Pansenepithel entfernt. Das so gewonnene Epithel wurde in 37 °C warmer und Carbogen- bzw. O₂-begaster Pufferlösung ins Labor transportiert. Zwischen Schleimhautentnahme und Einspannen in die Ussing-Kammer vergingen max. 30 min.

3.2.2 Inkubationstechnik

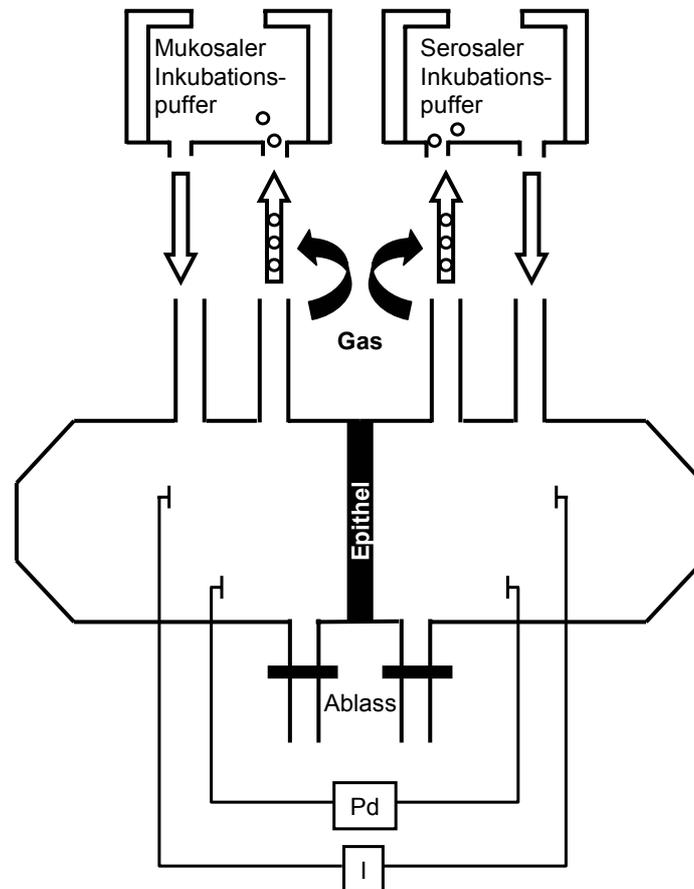


Abb. 2: Ussing-Kammer-Modell (Erläuterungen siehe Text)

Für die Ussing-Kammer Untersuchungen standen 16 (- 22) Plexiglaskammern zur Verfügung. Im Labor wurde aus dem kleinzottigen Bereich des ventralen Pansensackes ca. 5 • 5 cm große Stücke entnommen, die möglichst keine Blutgefäße aufwiesen. Diese wurden mit zwei Silikonringen zwischen die beiden Hälften einer Ussing-Kammer gespannt. Durch das Epithel wurden die mukosale (lumenseitige) und die serosale (blutseitige) Inkubationsseite voneinander getrennt. Die Kammern wurden in die Versuchsanordnung eingebaut und an das darüber befindliche Pufferreservoir / Begasungssystem angeschlossen. Das Pufferreservoir / Begasungssystem bestand aus zwei doppelwandigen Glassäulen. Das Pufferreservoir in den Glassäulen wurde zur Einstellung einer konstanten Puffertemperatur mit 38 °C warmem Wasser umspült. Die Begasung gewährleistete eine kontinuierliche Sauerstoff- bzw. Carbogenzufuhr und Durchmischung des Puffers. So erfolgte eine ständige Umspülung des Epithels mit 15 ml des begasten, temperierten Versuchspuffers sowohl mukosal wie auch serosal auf einer Fläche von 3,14 cm² (serosale Bezugsfläche). Eine schematische Darstellung einer derartigen Ussing-Kammer befindet sich in Abb. 2.

3.2.3 Elektrophysiologische Parameter

Durch eine computergesteuerte Mess- und Recheneinheit (Voltage-clamp-Anlage, Fa. Ingenieurbüro für Mess- und Datentechnik, Mußler, Aachen, Deutschland) wurden elektrophysiologische Messdaten erfasst. Zwei gewebefern angebrachte NaCl-Agarbrücken in Kombination mit Ag-AgCl-Elektroden wurden verwendet, um einen Strom in die Kammer einzuspeisen. Die Potentialdifferenz wurde über zwei gewebe nah angebrachte KCl-Agarbrücken gemessen, die mit externen Ag-AgCl-Bezugselektroden verbunden waren. Das Eigenpotential und der Eigenwiderstand der Anlage wurden vor Versuchsbeginn ermittelt und als Korrekturgröße mit den im Versuch ermittelten Daten verrechnet. Alle Versuche wurden unter Short-circuit-Bedingungen durchgeführt, das heißt, die transepitheliale Potentialdifferenz (PD_t) wurde konstant auf 0 mV geklemmt. Unter Short-circuit-Bedingungen existieren somit für den passiven, parazellulären Transport keine elektrogenen Triebkräfte. Als elektrische Kenngrößen des Pansenepithels wurden der Kurzschlussstrom (I_{sc}) und die Gewebeleitfähigkeit (G_t) erfasst.

Kurzschlussstrom I_{sc}

Durch einen elektrogenen Nettoladungstransport entsteht ein Strom über das Epithel, der so genannte Kurzschlussstrom. Dieser führt zum Aufbau einer Potentialdifferenz (PD_t) zwischen mukosaler und serosaler Epithelseite. Zur Messung des Kurzschlussstromes wird ein Klemmstrom (I_c) eingespeist, der die Potentialdifferenz auf null abgleicht. Dieser Klemmstrom ist vom Betrag her dem Kurzschlussstrom genau gleich, aber entgegengesetzt gerichtet.

Gewebeleitfähigkeit G_t

Die Gewebeleitfähigkeit ist der reziproke Wert des Gewebewiderstandes ($G_t = 1 / R$). Sie spiegelt die Dichtigkeit und Integrität des Epithels wider. Die G_t wurde ermittelt, indem auf das Epithel kurze, bipolare Strompulse von 100 μA (ΔI) in 60-Sekunden-Intervallen appliziert wurden. Dies führte zu einer Änderung der Potentialdifferenz (ΔPD_t). Mittels dieser beiden Werte ließ sich unter Zuhilfenahme des Ohmschen Gesetzes ($R = \Delta PD_t / \Delta I$) die Gewebeleitfähigkeit G_t ($mS \cdot cm^{-2}$) berechnen.

3.2.4 Gruppierung der Epithelien

Nach einer ca. 20-minütigen Equilibrierungsphase der Epithelien in der Ussing-Kammer erfolgte eine Einteilung der Epithelien in Gruppen. Dabei wurden die zu diesem Zeitpunkt gemessenen Gewebeleitfähigkeiten zugrunde gelegt. Die Einteilung der Epithelien erfolgte derart, dass in einer abgeschlossenen Versuchsserie in allen Gruppen der Mittelwert der initialen Gewebeleitfähigkeit möglichst gleich war.

3.3 Uptake-Studien

3.3.1 Allgemeiner Ablauf der Uptake-Studien

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die apikale Aufnahme (Uptake) von SCFA in das Pansenepithel mit Hilfe der Ussing-Kammer ermittelt. Hierzu wurde ^{14}C -markiertes Acetat verwendet.

Wurden in einer Versuchsserie verschiedene Acetatkonzentrationen zugegeben, so wurden die niedrig-molaren Acetatzugaben unter Zuhilfenahme von Natriumglukonat osmotisch ausgeglichen. Damit waren etwaige Effekte basierend auf osmotischen Unterschieden der verwendeten Acetatlösungen auf die Acetataufnahme ausgeschlossen. Die Zugabe von mehr als 10 mM Acetat im Rahmen der kinetischen Untersuchungen (Kap. 4.1.4) erfolgte durch vollständigen Ersatz der mukosalen Pufferlösung mit einer auf die entsprechende Acetatkonzentration eingestellten Lösung. Dadurch wurde eine Erhöhung der Gesamtosmolarität vermieden. Hydrostatische Druckschwankungen während des Pufferwechsels wurden durch Abklemmen der serosalen Pufferzirkulation unterbunden.

Nach der Zugabe des Acetats zur mukosalen Seite wurde die Aufnahme in das Epithel bestimmt. Dazu wurden mukosal 20 sec nach Zugabe des Acetats, zwei so genannte heiße Proben á 100 μl (Doppelbestimmung) entnommen. Diese Proben wurden mit 700 μl 0,1 N NaOH auf 800 μl aufgefüllt. Eine Minute nach Zugabe des Acetats wurde der Puffer auf beiden Seiten des Epithels abgelassen. Zum Abstoppen des Acetattransportes, sowie dem Entfernen von nicht aufgenommenem Acetat, erfolgte ein dreimaliges Waschen mit eiskaltem Grundpuffer (je nach Versuchsplan CO_2 -haltig/ HCO_3^- -gepuffert oder HEPES-gepuffert). Innerhalb einer Minute erfolgten der Ausbau der Kammer aus der Versuchapparatur und das Einbringen des Epithels in eine eisgekühlte Lysiervorrichtung. Diese Lysiervorrichtung bestand aus einer Platte, auf die Zylinder aufgeschraubt wurden. Das Epithel wurde mit der mukosalen Seite nach oben auf die Platte gelegt. Darauf wurde der Zylinder geschraubt. Durch Zugabe von 0,1 N eiskaltem Natronlauge in den Zylinder, erfolgte innerhalb von drei Minuten die Lyse des Epithels. Das Lysat wurde abpipettiert und in 15 ml Polypropylen-Röhrchen (Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) gegeben. Um die Hornschollen zu entfernen, wurde es 20 min bei 4 °C und 2000 g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 500 μl zur Bestimmung der enthaltenen Proteinmenge (Kap. 3.3.2) des jeweiligen Epithels verwendet. Zum anderen wurden von dem Überstand zwei so genannte kalte Proben á 800 μl (Doppelbestimmung) für die Radioaktivitätsmessung mittels Szintillationszählung (Kap. 3.3.3) entnommen.

3.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Da die Epitheloberfläche aufgrund wechselnder Zottenlänge variabel ist, wurde die Acetataufnahme auf den Proteingehalt der Epithelien bezogen. Dafür wurde die fotometrische Bestimmung nach SMITH et al. (1985) verwendet. Die Proben wurden in einem Verhältnis von 1 : 5 mit 0,1 N NaOH verdünnt. Darauf wurden zu je 10 μl der Probenverdünnung 200 μl einer

BCA-Reagenz (Kap. 9.4) in eine Mikrotiterplatte hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 60 °C in einem Inkubator (Hybridiser HB-2D, Fa. Techne AG, Jahnsdorf, Deutschland) wurde die optische Dichte durch ein Fotometer (Spectra Rainbow, Fa. Tecan, Crailsheim, Deutschland) bestimmt. Die Kalibrierung der Proben erfolgte mit einer zuvor hergestellten Eichreihe aus bovinem Serumalbumin (BSA) in 0,1 N NaOH. Im Messbereich der Proben ergab sich eine lineare Eichgerade. Es erfolgte generell eine Dreifach-Bestimmung des Proteingehaltes der Proben.

3.3.3 Szintillationszählung

Sowohl zu den beiden heißen Proben sowie auch den beiden kalten Proben wurden 4 ml Flüssigszintillator (Aquasafe® 300 Plus, Fa. Zinsser Analytic, Frankfurt, Deutschland) zugesetzt. Die Radioaktivität wurde im Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut mittels Flüssigszintillationszählung (Wallac 1409 LSC, Fa. Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland) durch fotooptische Messung in counts per minute (cpm) bestimmt.

3.3.4 Berechnung der Acetataufnahme

In die Berechnung der Acetataufnahme flossen die mukosal zugegebene Acetatmenge ([G] in nmol), die in der mukosalen Inkubationslösung befindliche Radioaktivität ([H]) und die in das Epithel aufgenommene Aktivität ([K]) ein. Die aufgenommene Aktivität wurde im Lysat des Epithels bestimmt. Sowohl die in der Inkubationslösung befindliche Radioaktivität als auch die aufgenommene Aktivität wurden um den Leerwert (0,1 N NaOH) korrigiert. Außerdem erfolgte eine Korrektur der Acetataufnahme um den Proteingehalt des Epithels ([P]). Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Uptake [U] (nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1}) = [\text{G}] \cdot [\text{K}] \cdot [\text{H}]^{-1} \cdot [\text{P}]^{-1}$$

Versuchsanordnungen: Uptake-Studien

Tabelle 1: Ablaufplan der Ussing-Kammer-Versuche (Erläuterungen s. nächste S.)

Kap.	Mukosaler Ausgangspuffer	Zeit	-20	-7	-2	0
4.1.1	B ⁺ Cl(90) pH7,4			B ⁺ Cl(90) pH7,4	± DIDS	U(0,5)
				B ⁺ Cl(4,5) pH7,4	± DIDS	U(0,5)
				B ⁺ Cl(90) pH6,1	± DIDS	U(0,5)
				B ⁺ Cl(4,5) pH6,1	± DIDS	U(0,5)
4.1.1	G _{B+}			± Cl(0,5)	U(0,5)	
4.1.2	G _{B+}				± NO ₃ ⁻ (10) / ± NO ₃ ⁻ (0,5)	U(0,5)
					± SO ₄ ²⁻	U(0,5)
4.1.3.1	G _{B+} oder G _{B-} (pH7,4/ 6,1)					U(0,5/10)
4.1.3.2	G _{B+} oder G _{B-}				± NO ₃ ⁻ (10) / ± EZ / ± EZ + NO ₃ ⁻ (10)	U(0,5/10)
4.1.3.3	G _{B+} oder G _{B-} (pH7,4/ 6,1)				± NO ₃ ⁻ (10) / ± NFA	U(0,5)
4.1.4	KONZ _{B+} oder KONZ _{B-}					U(n)
						± NO ₃ ⁻ (60)
4.1.5	G _{B+} oder G _{B-}				± DIDS / ± FFA / ± NFA / ± NO ₃ ⁻ (10) / ± NPPB / ± TA / ± TE	U(0,5/10)
					± NO ₃ ⁻ (10) / ± NFA / ± NO ₃ ⁻ (10) + NFA	U(0,5)
					± NO ₃ ⁻ (10) / ± DIDS / ± NO ₃ ⁻ (10) + DIDS	U(0,5)
4.1.6	K-				± pCMBS / ± PH	U(0,5)
4.1.7	K- / K+		± NO ₃ ⁻ (40) / ± AC(40)			U(0,5)

Erläuterungen zu Tabelle 1:

Die Kapitelnummer entspricht der zugehörigen Darstellung im Ergebnisteil.

Der serosale Inkubationspuffer entsprach mit Ausnahme des pH-Wertes dem mukosalen Ausgangspuffer (Ausnahme K^- / K^+ : serosal G_{B-}). Der serosale Puffer wies immer einen pH-Wert von 7,4 auf.

AC(40)	40 mM Acetat mukosal
B^+	CO_2 -haltige/ HCO_3^- -gepufferte Lösung (Kap. 9.2)
DIDS	200 μ M DIDS mukosal
Cl(0,5)	0,5 mM Chlorid mukosal
Cl(4,5)	4,5 mM Chlorid mukosal
Cl(90)	90 mM Chlorid mukosal
EZ	50 μ M Ethoxazolamid beidseitig
FFA	100 μ M Flufenaminsäure mukosal
G_{B+}	CO_2 -haltiger/ HCO_3^- -gepuffertes Grundpuffer, mukosal pH 6,1 (Kap. 9.2)
G_{B-}	HEPES-gepuffertes Grundpuffer, mukosal pH 6,1 (Kap. 9.2)
GL	100 μ M Glibenclamid mukosal
K^-	K^+ -freier Puffer, mukosal pH 6,1 (Kap. 9.2)
K^+	K^+ -reicher Puffer, mukosal pH 6,1 (Kap. 9.2)
(KONZ $_{B+}$)	CO_2 -haltige/ HCO_3^- -gepufferte Lösung für Acetatkonzentrationsreihe (5 – 60 mM), mukosal pH 6,1 (Kap. 9.2)
(KONZ $_{B-}$)	HEPES-gepufferte Lösung für Acetatkonzentrationsreihe (5 – 60 mM), mukosal pH 6,1 (Kap. 9.2)
NFA	200 μ M Nifluminsäure mukosal
$NO_3^-(0,5)$	0,5 mM Nitrat mukosal
$NO_3^-(10)$	10 mM Nitrat mukosal
$NO_3^-(40)$	40 mM Nitrat mukosal
$NO_3^-(60)$	60 mM Nitrat mukosal
NPPB	100 μ M NPPB mukosal
pCMBS	400 μ M pCMBS mukosal
PH	20 μ M Phloretin mukosal
SO_4^{2-}	5 mM Sulfat mukosal
TA	50 μ M Tamoxifen mukosal
TE	50 μ M Tenidap mukosal
U(0,5)	Untersuchung des Uptake bei einer Acetatkonzentration von 0,5 mM
U(0,5/10)	Untersuchung der Uptake vergleichend bei einer Acetatkonzentration von 0,5 und 10 mM
U(n)	Untersuchung der Uptakes bei niedrigen Acetatkonzentrationen zwischen 0,02 – 10 mM Acetat
U(h)	Untersuchung der Uptakes bei hohen Acetatkonzentrationen zwischen 5 – 60 mM Acetat

In der Versuchsserie, die in Kapitel 4.1.7 dargestellt ist, wurden die Epithelien während der ersten 20 Minuten in einem nitrat- und acetatfreien Puffer belassen. Danach erfolgte ein teilweiser

Austausch der Lösung um den Gehalt an Acetat bzw. Nitrat auf 40 mM einzustellen. Zu diesem Zweck wurden 8,2 ml eines acetat- bzw. nitratreichen Puffers (113 mM Acetat bzw. Nitrat, Kap. 9.2) zu den 15 ml der acetat- und nitratfreien Lösung zugegeben. Nach einer Minute, in der sich mit Hilfe des Gasliftes die Puffer durchmischt hatten, wurden wiederum 8,2 ml des Puffers aus den Säulen entfernt. Hydrostatische Druckschwankungen während des Pufferwechsels wurden durch Abklemmen der serosalen Pufferzirkulation unterbunden.

3.4 Kultivierung von Pansenepithelzellen

3.4.1 Gewinnung des Pansenepithels

Der gesamte Bereich des Pansenvorhofes mit mindestens 0,5 cm langen Zotten wurde entnommen und in 4 °C kalte, 0,9%ige NaCl-Lösung überführt. Die Serosa wurde entfernt. Es erfolgte ein zweimaliges Waschen in der 0,9%igen, 4 °C kalten NaCl-Lösung. Anschließend wurde der Pansenvorhof in ca. 4 • 4 cm große Stücke geschnitten. Die danach durchgeführte, nochmalige Reinigung erfolgte in eisgekühlter, kalzium- und magnesiumfreier Dulbeccos phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS), die mit 400.000 IU • ml⁻¹ Penicillin, 400 mg • ml⁻¹ Streptomycin und 180 IU • ml⁻¹ Nystatin versetzt war. In demselben Puffer erfolgte auch der Transport in das Labor. Dort inkubierte das Gewebe weitere 60 min in der kalten, antibiotikahaltigen Transportlösung, um anhaftende Bakterien und Pilze abzutöten.

3.4.2 Isolierung von Pansenepithelzellen

Es wurden zwei Methoden der Isolierung von Pansenepithelzellen verwandt.

Bei einem Teil der Zellen erfolgte die Isolierung fortlaufend bei 37 °C im Brutschrank (Warmisolierung). Bei der anderen Methode wurde die Warmisolierung mit einer Kaltisolierung bei 4 °C kombiniert.

Warmisolierung

Hierfür erfolgte die Isolierung der Pansenepithelzellen aus dem Zellverband der Pansenzotten in Anlehnung an die Methode von GALFI et al. (1981, 1993), die im Veterinär-Physiologischen Institut der Universität Leipzig von MÜLLER et al. (2000) modifiziert worden war.

Nach Inkubation des Gewebes in antibiotikahaltiger Transportlösung wurden die Zotten des Pansenvorhofes unter sterilen Bedingungen abgeschnitten und zweimal mit supplementierter DPBS (100.000 IU • ml⁻¹ Penicillin, 100 mg • ml⁻¹ Streptomycin) gewaschen. Die abgeschnittenen Zotten wurden in ein Becherglas überführt und je nach Ausgangsmenge mit ca. 50 ml Trypsinierungsmedium (Kap. 9.1) bedeckt. Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank auf unterem Level (ca. 150 U • min⁻¹) gerührt. Nach Überprüfen des Fortschreitens der Zellisolierung mit Hilfe des Trypanblau-Tests (Kap. 9.5) wurde der Überstand entfernt. Der Trypsinierungsvorgang wurde mit den im Becherglas verbliebenen angedauten Zotten je nach Verhornungsgrad des Pansenepithels ein- bis zweimal für bis zu 45 min wiederholt.

Nach dem letzten Trypsinierungsvorgang wurde der Überstand (Zellsuspension) vorsichtig durch eine sterile Mullkompressen in ein zweites Becherglas abgegossen. Das Filtrat wurde in ein 50 ml Polypropylen-Röhrchen (Fa. Greiner Bio-One GmbH) gefüllt und bei 4 °C und 170 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet je nach Menge in 5 – 10 ml supplementiertem Medium-199 (M-199, Kap. 9.1) resuspendiert. Um die Vitalität der Zellen zu prüfen und die Konzentration für die Aussaat einzustellen, wurde erneut der Trypanblau-Test (Kap. 9.5) durchgeführt. Die zur Aussaat vorgesehene Fraktion wurde mit supplementiertem M-199 auf eine Zellkonzentration von ca. $3 - 4 \cdot 10^5$ Zellen pro ml eingestellt. Von dieser Suspension wurden 3 ml in ein mit 5 sterilen Glasplättchen (Coverslips, Fa. Hecht Assistent, Sondheim, Deutschland) bestücktes, kollagenisiertes Zellkulturschälchen (Kollagenisierung: Kap. 9.6) gegeben.

Kombinierte Warm- und Kaltisolierung

Bei der Warmisolierung zeigte sich z.T. das Problem eines erhöhten Anteils an mesenchymalen Zellen, weswegen im Rahmen dieser Arbeit eine weitere Methode der Zellisolierung entwickelt wurde. Dabei erfolgte zunächst für eine Stunde eine Warmisolierung mit Hilfe von Trypsin wie unter Warmisolierung beschrieben. Diese ist notwendig, um die Hornschicht zu entfernen. Allerdings bewirkt Trypsin bei einer Einwirkdauer von über 1,5 - 2 Stunden (je nach Verhornungsgrad des Epithels) auch eine relativ starke Ablösung mesenchymaler Zellen. Deswegen wurde statt einer längeren Isolierung mit Trypsin eine Kaltisolierung mit dem Enzym Dispase angeschlossen.

Zur Kaltisolierung wurden die nach der 1. - 2. Trypsinierung verbliebenen Zotten in 50 ml einer Dispaselösung (Kap. 9.1) resuspendiert und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Dispaselösung mit den enthaltenen Zotten in ein 50 ml Polypropylen-Röhrchen überführt. Dieses wurde auf dem Vortex-Rührer für ca. 50 s gerührt, um lockere Epithelzellen zu lösen und so die Ausbeute an Epithelzellen zu erhöhen. Um die Reste der Zotten zu entfernen, wurde der Inhalt vorsichtig durch eine sterile Mullkompressen in ein Becherglas abgegossen. Das Filtrat wurde in ein neues 50 ml Polypropylen-Röhrchen gefüllt und bei 4 °C und 170 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet je nach Menge in 5 – 10 ml supplementiertem M-199 resuspendiert. Um die Vitalität der Zellen zu überprüfen und die Konzentration für die Aussaat einzustellen, wurde der Trypanblau-Test (Kap. 9.5) durchgeführt. Mit supplementiertem M-199 wurde die Konzentration vitaler Zellen auf ca. $3 - 4 \cdot 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$ eingestellt. Von dieser Suspension wurden 3 ml in ein mit 5 sterilen Coverslips bestücktes, kollagenisiertes Zellkulturschälchen (Kollagenisierung: Kap. 9.6) gegeben.

Die in Kap. 4.2 eingesetzten Zellen wurden mittels der kombinierten Warm- und Kaltisolierung gewonnen. Für die Untersuchungen in Kap. 4.3 wurden warmisolierte Pansenepithelzellen verwendet.

3.4.3 Kultivierung von Pansenepithelzellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank (Fa. Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland) bei 37 °C und 5% CO₂. Am 2. Tag der Kultivierung wurde das bisher als Kulturmedium verwendete supplementierte M-199 durch supplementiertes Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen (MEM-Nährmedium, Kap. 9.1) ersetzt und anschließend jeden 2. Tag über die Dauer der Kulturperiode gewechselt. Nach 7 – 14 Tagen bildete sich ein dichter Zellrasen. Nach Ausbildung dieses Zelllayers wurden die Zellen für unterschiedliche Zwecke verwendet:

- Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes (Kap. 3.5)
- Immunhistochemische Untersuchungen (Kap. 3.7)
- Molekularbiologische Untersuchungen (Kap. 3.8)

3.5 Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes

3.5.1 Beladung mit BCECF

Um die Veränderung des intrazellulären pH-Wertes zu messen, wurden die Zellen mit dem membrangängigen, pH-sensitiven Farbstoff 2',7'-bis-(Carboxethyl)-5(6')-Carboxyfluorescein / Acetoxymethylester (BCECF/AM) beladen. Die Coverslips wurden aus den Petrischalen entnommen und in eine Halterung für Coverslips (Fa. Perkin Elmer Ltd., Rodgau-Jügesheim, Deutschland) eingespannt. Danach wurden die Zellen in Versuchspufferlösung gewaschen (Kap. 9.2). Die Halterung mit dem eingespannten Coverslip wurde zur Inkubation in eine Präzisionsküvette aus optischem Spezialglas (Fa. Helma GmbH & Co. KG, Mülheim, Deutschland) gehängt. Zuvor wurde diese mit 1,5 ml des entsprechenden Versuchspuffers und 10 µM BCECF/AM bestückt. Darauf folgte eine Inkubation unter Lichtausschluss im 37 °C warmen Wasserbad für 35 min. Nach Beladung wurden die eingespannten Coverslips zweimal in Versuchspufferlösung gewaschen.

3.5.2 Messung der Fluoreszenzintensität

Zur Messung wurde eine Präzisionsküvette aus optischem Spezialglas mit 1,5 ml dem Versuchsplan entsprechend gewählter Pufferlösung befüllt. Die Halterung mit dem Coverslip wurde in die Küvette eingehängt und in das Messfach des Lumineszenzspektrometers (LS 50B, Fa. Perkin Elmer Ltd.) verbracht. Mit Hilfe des am Messfach angeschlossenen Umwälzthermostaten (Kompaktthermostat M 12B[®]; Fa. Lauda Dr. D. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) wurde die Temperatur während des Versuches auf konstante 37 °C eingestellt. Die Aufzeichnung des Fluoreszenzsignals erfolgte mittels eines angeschlossenen Computers und der Steuersoftware FL WinLab[™] (Fa. Perkin Elmer Ltd.).

Der Farbstoff BCECF besitzt zwei Anregungsmaxima: 495 nm für den an Protonen gebundenen Farbstoff und 440 nm für den freien Farbstoff. Entsprechend wurde der in den Zellen akkumulierte Fluoreszenzfarbstoff abwechselnd mit Licht der Wellenlänge 495 nm und 440 nm angeregt. Die Emissionsmessung erfolgt bei 530 nm. Aus den Emissionen bei 495 nm und 440 nm wurde durch die Steuersoftware (FL WinLabTM) des Lumineszenzspektrometers die „Ratio“ 495 nm / 440 nm gebildet. Die „Ratio“ ist proportional dem intrazellulären pH-Wert der Zellen. Da bei vorhergehenden Versuchen gezeigt werden konnte, dass die Eigenfluoreszenz der unbeladenen Pansenepithelzellen auf dem Coverslip bei 495 nm / 440 nm nur 0,5% - 2% des Gesamtsignals ausmacht (MÜLLER et al. 2000), wurde die aufgezeichnete Fluoreszenzintensität hinsichtlich der Hintergrundfluoreszenz nicht korrigiert.

3.5.3 Kalibrierung des intrazellulären pH-Wertes

An jede Messung wurde die Aufzeichnung einer Eichgerade angeschlossen, um die während der Messung ermittelten Ratios in den intrazellulären pH-Wert zu konvertieren. Hierfür wurde ein K⁺-reicher Puffer (Eichlösung: Kap. 9.2) und das Ionophor Nigericin (Stammlösung 2 mM in Ethanol, absolut) in einer Endkonzentration von 10 µM verwendet. Der K⁺-reiche Puffer wurde auf die pH-Werte 6,6; 6,9; 7,2; 7,5; 7,8 und 8,1 eingestellt (pH-Einstabmesselektrode (SenTix Mic) und pH-Meter (pH90); Fa. WTW, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland). Die Zugabe des Nigericins zu der K⁺-reichen Lösung bewirkt eine Angleichung der intrazellulären H⁺-Konzentration an die extrazelluläre H⁺-Konzentration bei gleichzeitiger Ausschaltung des K⁺-Diffusionspotentials. Der pH-Wert in den Zellen entspricht also nach Nigericin-Zugabe dem pH-Wert der Lösung. Die Ratio-Messung der Eichlösung (jeweils 1,5 ml mit 10 µM Nigericin) begann mit der Lösung mit pH-Wert 8,1. Das Fluoreszenzsignal wurde bis zu dem Erreichen eines Plateaus aufgezeichnet. Dann erfolgte der Wechsel in die Lösung mit dem nächst niedrigeren pH-Wert. Die Konvertierung der während der Versuche ermittelten Ratios in den intrazellulären pH-Wert erfolgte unter Zuhilfenahme der Software FL WinLabTM.

3.6 Versuchsanordnungen: intrazelluläre pH-Wertmessung

Die Versuchsansätze der intrazellulären pH-Wertmessung sind tabellarisch auf dieser Seite dargestellt. Angegeben sind die Zeiten, an denen ein Wechsel zu neuen Versuchsbedingungen erfolgte und die jeweils neuen Versuchsbedingungen.

Tabelle 2: Ablaufplan für die intrazelluläre pH-Wertmessung (Erläuterungen s. nächste S.)

Vers.-Serie	Zeit (min)	0 min	3 min	5 min	9 min	12 min	15 min	25 min
4.2.1		H1 ± EIPA	NH ₄ Cl ± EIPA		H1 ± EIPA			
		H1 ± EIPA		B1 ± EIPA				
4.2.2		B1		B1 – Cl ⁻ ± NFA		B1		
4.3.1		B2 – Cl ⁻		B2 + AC(20)			B2 – Cl ⁻	B2 – Cl ⁻ + AC(20)
		H2 – Cl ⁻		H2 + AC(20)			H2 – Cl ⁻	H2 – Cl ⁻ + AC(20)
4.3.2		B2		B2 – Cl ⁻ + AC(10) ± NO ₃ ⁻ (10) oder NFA			B2 – Cl ⁻	
		H2		H2 – Cl ⁻ + AC(10) ± NO ₃ ⁻ (10) oder NFA			H2 – Cl ⁻	

Erläuterungen zu Tabelle 2:

AC(10)	10 mM Acetat
AC(20)	20 mM Acetat
B1	CO ₂ -haltige/HCO ₃ ⁻ -gepufferte Lösung 1 (Kap. 9.2)
B2	CO ₂ -haltige/HCO ₃ ⁻ -gepufferte Lösung 2 (Kap. 9.2)
B1 – Cl ⁻	CO ₂ -haltige/HCO ₃ ⁻ -gepufferte, chloridfreie Lösung 1 (Kap. 9.2)
B2 – Cl ⁻	CO ₂ -haltige/HCO ₃ ⁻ -gepufferte, chloridfreie Lösung 2 (Kap. 9.2)
EIPA	10 µM EIPA
H1	HEPES-gepufferte Lösung 1 (Kap. 9.2)
H2	HEPES-gepufferte Lösung 2 (Kap. 9.2)
H2 – Cl ⁻	HEPES-gepufferte, chloridfreie Lösung 1 (Kap. 9.2)
NH ₄ Cl	NH ₄ /NH ₃ ⁺ -haltige, HEPES-gepufferte Lösung (Kap. 9.2)
NO ₃ ⁻ (10)	10 mM Nitrat
NFA	200 µM Nifluminsäure

Nach Nifluminsäureapplikation war der pH_i gegenüber der Kontrolle stark herabgesetzt (Abb. 22). Um zu untersuchen, ob Nifluminsäure einen direkten Einfluss auf das Fluoreszenzsignal hat, wurde unverestertes BCECF in Lösung mit Nifluminsäure ohne Zellen untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass Nifluminsäure selbst keinen Einfluss auf das Fluoreszenzsignal ausübte.

3.7 Immunzytochemische Untersuchungen

3.7.1 Fixierung

Nach dem Verwerfen des Kulturmediums wurden die Pansenepithelzellen dreimal für 10 min mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; 0,1 M Phosphat, 0,88% NaCl, pH 7,44) gewaschen, um Reste des Kulturmediums zu entfernen. Dann wurde zur Fixierung bei dem einen Teil der Zellen Methanol (100%), bei dem anderen Teil Poly-L-Lysin-Paraformaldehyd-Lösung (PLP; 0,1 M Phosphatpuffer, 0,2 M Lysin HCl, 0,01 M Na⁺-Metaperiodat, 8% Paraformaldehyd) hinzugegeben und für 20 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal für 10 min mit PBS gewaschen und in NaN₃-haltigem PBS (PBS/0,1%NaN₃) bis zur Färbung bei 4 °C gelagert.

3.7.2 Beladung mit Primärantikörper

Die kultivierten Zellen wurden mit Primärantikörpern gegen Cytokeratin, Fibronectin und Zonula-occludens-Protein-1 (ZO1) (Tabelle 3) beladen. Die mit Zellen bewachsenen Coverslips wurden in ELISA Platten verbracht und dort gefärbt. Zunächst wurden 200 µl einer PBS/NaN₃-HS-TritonX100-Lösung (PBS/0,1%NaN₃, 4% Pferdeserum, 0,5% TritonX100) aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Dies diente der Permeabilisierung der Zellen und der Verhinderung unspezifischer Bindungen der Antikörper. Danach wurde der gewünschte Primärantikörper mit PBS/NaN₃-HS-TritonX100-Lösung auf die

entsprechende Konzentration eingestellt und der Schnitt damit über Nacht bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Zu jeder Färbung wurde eine Kontrolle angefertigt, bei der PBS/NaN₃-HS-TritonX100-Lösung ohne Primärantikörper aufgetragen wurde.

Tabelle 3: Primärantikörper, sowie die jeweils verwendeten Konzentrationen

Färbung	Primärantikörper	Konzentration
Cytokeratin	Maus anti-Cytokeratin (MAB1636) (Fa. Chemicon, Temecula, USA)	1:100
Fibronectin	Kaninchen anti-Fibronectin (A0245) (Fa. Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark)	1:1000
ZO1	RATX anti-ZO-1 (MAB 1520) (Fa. Chemicon)	1:1000

3.7.3 Beladung mit Sekundärantikörper

Nicht gebundener Primärantikörper wurde nach 18-stündiger Inkubation durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Danach erfolgte die Beladung mit den entsprechenden Sekundärantikörpern, die entweder mit dem Fluorchrom Cy 3 (Carbocyanin 3) oder mit Cy 2 (Carbocyanin 2) markiert waren. Um das vorzeitige Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern, erfolgte die Inkubation für 2,5 Stunden unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur.

Tabelle 4: Sekundärantikörper, sowie die jeweils verwendete Konzentration (alle Sekundärantikörper wurden von der Fa. Dianova, Hamburg, Deutschland bezogen)

Färbung	Sekundärantikörper	Konzentration
Cytokeratin	Cy 3 Esel anti-Maus	1:500
Fibronectin	Cy 2 Esel anti-Kaninchen	1:200
ZO1	Cy 3 Esel anti-Ratte	1:500

Nach Abschluss der Inkubation wurden die Coverslips wiederum dreimal mit PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen.

3.7.4 Kernfärbung

An die Beladung mit dem Sekundärantikörper wurde eine Kernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) angeschlossen. DAPI interkaliert mit der DNA, wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffes um das 20-fache verstärkt wird.

DAPI wurde mit PBS auf eine Konzentration von 1:1000 eingestellt und unter Lichtausschluss für 1 min inkubiert. Danach wurden die Präparate dreimal für 10 min mit PBS gewaschen, um nicht gebundene Kernfarbstoffe zu entfernen. Die Coverslips mit anhaftenden, gefärbten

Pansenepithelzellen wurden auf Objektträger überführt. Es erfolgte die Trocknung unter Lichtausschluss. Danach wurden die Präparate zur Konservierung mit einer 80%igen Glycerol-Lösung (80% Glycerol, 0,1% NaN_3 , 0,5 M $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ (pH 8,6)) bedeckt und mit einem Deckgläschen versehen.

3.7.5 Auswertung

Die Auswertung der Färbung erfolgte mit Hilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskopes (IX50) und Filtern der Fa. Olympus Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland) sowie eines computer-gestützten Bildanalyse-systems (Fa. Scion Cooperation, Frederick, USA). Über eine LCD-Kamera (Mod. 4910, Fa. Cohu Inc., Poway, USA) wurden die Bilder an einen angeschlossenen PC übertragen. Cy 3 markierte Antikörper wurden mit einer Wellenlänge von 530 – 560 nm (Anregungsfilter HQ5450/30x) angeregt. Die Emission wurde bei 575 – 645 nm (Emissionsfilter HQ610/75M) erfasst. Bei dem Cy 2 gekoppelten Antikörper erfolgte die Anregung mit Licht der Wellenlänge 470 – 490 nm (Anregungsfilter BP470–490) und die Aufzeichnung der Emission bei 510 – 530 nm (Emissionsfilter D520). DAPI wurde mit einer Wellenlänge von 330 – 385 nm (Anregungsfilter BP330-385) angeregt. Die Emission wurde bei 460 - 490 nm (Emissionsfilter BP460-490) erfasst.

3.8 Molekularbiologische Untersuchungen

3.8.1 Gewinnung von Pansengewebe

Für die Isolierung aus dem frischen Gewebe wurde der Pansenvorhof zunächst mit 4 °C kalter, 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Dann wurden die Zotten mit einer sterilen Schere abgeschnitten und in ein zuvor gewogenes Kryo-Röhrchen (Fa. Greiner Bio-One GmbH) überführt. Das Röhrchen wurde sofort in flüssigen Stickstoff gegeben und anschließend bis zur weiteren Aufarbeitung (Kap. 3.8.4) bei -80 °C gelagert.

3.8.2 Ernten der kultivierten Pansenepithelzellen für die Molekularbiologie

Zur Isolierung der RNA aus den kultivierten Pansenepithelzellen wurden diese zunächst wie unter 3.4.3 beschrieben in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Nach der Ausbildung eines geschlossenen Zellrasens wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin/EDTA gelöst. Hierzu wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml DPBS gewaschen. Dann wurde der Zellrasen mit ca. 5 ml Trypsin/EDTA bedeckt. Nach ca. 15 min im Brutschrank bei 37 °C lösten sich die Zellen von der Unterlage. Die Trypsin-Reaktion wurde mit ca. 5 ml Kulturmedium (MEM Kap. 9.1) gestoppt. Mit einer Pipette wurden die gelösten Zellen in ein vorher gewogenes 50 ml Polypropylen-Röhrchen überführt. Die Zellkulturflaschen wurden mit weiteren 5 ml Kulturmedium (MEM Kap. 9.1) gespült, um restliche Zellen zu gewinnen. Es folgte eine Zentrifugation für 3 min bei 170 g. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet gewogen und sofort weiterverarbeitet (Kap. 3.8.3).

3.8.3 Isolierung von Gesamt-RNA und anschließende Gewinnung der Poly(A)⁺-RNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde Pansengewebe zunächst in einem vorgekühlten Mörser unter fortlaufender Zugabe von flüssigem Stickstoff pulverisiert und in einen Glashomogenisator überführt. Die Zellpellets (kultivierte Pansenepithelzellen, Kap. 3.8.2) wurden ohne zu mörsern direkt in den Glashomogenisator gegeben. Je 50 – 100 mg Gewebe bzw. Zellen wurden 1 ml Trizol zugegeben und mechanisch homogenisiert. Das Homogenat wurde je nach Menge in ein bis zwei Eppendorf-Cups (Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt und 10 min bei 4 °C und 5500 g zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene RNA wurde in ein neues Eppendorf-Cup gegeben und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. 200 µl Chloroform wurden hinzugefügt, der Ansatz ca. 15 sec gut geschüttelt und erneut 2 – 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der 15-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 5500 g wurde die RNA in der oberen wässrigen Phase abgetrennt. Dieser Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Die RNA-Präzipitation erfolgte nach Zugabe von 500 µl Isopropanol und einer Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min, mit anschließender 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 5500 g. Der Überstand des gelartigen Pellets wurde verworfen. Durch Zugabe von 1 ml Ethanol (70%) wurde die gefällte RNA gewaschen. An das Mischen auf dem Vortex-Rührer (Fa. Scientific Industries, Inc., New York, USA) schloss sich eine 5-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 3100 g an. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet für ca. 10 min getrocknet. Das trockene Pellet wurde je nach Größe mit 125 oder 250 µl Aqua bidest. gelöst. Im Anschluss erfolgte die unter 3.8.5.1 beschriebene Ermittlung der RNA Konzentration. Daraufhin wurde 1 µl RNA zur Kontrolle der Integrität auf ein analytisches Agarosegel (1%) aufgetragen (Kap.3.8.5.2).

Die Gewinnung der Poly(A)⁺-RNA aus der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des Oligotex mRNA Midi Kit (Fa. Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers. Die auf diese Weise erhaltene Poly(A)⁺-RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.8.4 (Two-Step)-RT-PCR

3.8.4.1 cDNA Synthese

Zur Synthese der cDNA aus der gewonnenen Poly(A)⁺-RNA wurde das 1st Strand cDNA Synthesis Kit der Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Synthese erfolgte nach Anleitung des Herstellers. In einem Peltier Thermocycler PTC-200 (Fa. Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) wurde folgendes Temperatur-Zeit-Protokoll angewandt: 10 min bei 25 °C, 60 min bei 42 °C, 5 min bei 90 °C, 5 min bei 4 °C. Bis zum weiteren Gebrauch erfolgte die Lagerung der cDNA bei -20 °C.

3.8.4.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Während für einige Transporter nur ein qualitativer Nachweis der entsprechenden mRNA-Expression erbracht wurde, wurde für die Transporter NHE1, NBC, AE2, DRA, PAT1 und MCT1 zudem die Methode der semiquantitativen PCR verwendet, um die Expression im Epithel und in den Zellen vergleichen zu können.

Für einfache und semiquantitative PCR wurde mit der cDNA und dem DyNAzyme™ II DNA Polymerase Kit (Finnzymes, Finnland) eine PCR durchgeführt. Für die PCR-Reaktionen wurde jeweils folgender Ansatz erstellt: 5 µl 10-fach Puffer, 2 µl der synthetisierten cDNA, 1 µl dNTP-Mix (10 mM), je 1 µl des vorwärtsgerichteten und des rückwärtsgerichteten Primers (10 pmol · µl⁻¹) und 0,5 µl Dynazyme (2 IU · µl⁻¹). Das Gesamtvolumen dieses Ansatzes wurde mit Aqua bidest. auf 50 µl aufgefüllt und der ganze Ansatz mittels Pipette gemischt. Darauf erfolgte die Inkubation im Thermocycler nach folgendem Protokoll:

- Initiale Denaturierung: (1 min; 95 °C)
- Zyklen: Es wurde die in Tabelle 5 gelistete Anzahl an Zyklen mit folgenden Teilschritten gefahren:
 - Denaturierung (20 sec; 95 °C)
 - Annealing (30 sec; primerspezifische Temperatur)
 - Elongation (Dauer abhängig von der Amplifikatlänge; 72 °C)
- Finale Elongation: (4 min; 72 °C)

Die verwendeten Primerpaare wurden von der Fa. MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert, nachdem sie mit Hilfe des Computerprogrammes „Primer Select“ der Fa. DNASTAR Inc. (Madison, USA) konstruiert wurden. Dieses Computerprogramm errechnete auch die primerspezifischen Annealingtemperaturen. Bei der Auswahl der Primerpaare wurde darauf geachtet, dass der GC-Gehalt (Gehalt an Guanin und Cytosin) bei ca. 50% lag. Außerdem wurden Primer gewählt, die zwischen 18 und 21 Nucleotide aufwiesen, um eine ausreichende Spezifität und eine hohe Hybridisierungstemperatur gewährleisten zu können.

Nach jeder PCR wurden 5 µl des Ansatzes auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und die Größe der Amplifikate elektrophoretisch analysiert (Kap. 3.8.5.2).

Tabelle 5: Primerpaare sowie Kenndaten für die PCR (Erläuterungen s. nächste S.)

Transporter		Primerpaar	GenBank Accession Nr.	Zyklus- zahl	E	A
β-Actin (ovine)	F11 R395	ATATTGCTGCGCTCGTGGTTG ATGGCAGGGGTGTTGAAGGTC	NM 001009784	26	45 s	58°C
NHE1 (bovine)	F3 R266	GGCCAACATCTCCCACAAGTC CCC CCGTAGGCAATGATGA	AF131763	30	60 s	58°C
NBC (bovine)	F2506 R2838	ATGGCCCTTCCGTGGTATGTGG CGGGACGTGGCGCAGGTAGAT	AF308160	26	60 s	59°C
AE2 (bovine)	F174 R373	GCGCTTCGTCTCCCGTTTCA CGTTCCTTGCCCCAGTGTG	AF176109	27	60 s	60°C
MCT1*	F R	GGAGAGGAAGCTTCCTAATT CACAAGCCCAGTATGTGTAT		23	45 s	50°C
DRA (human)	F1526 R2001	GCACGCTGGCTAATATTGGAAGAA AAGGCCCTCACTGAAGAAACATC	NM000111	35	45 s	52°C
DRA (chimär)	F220 R473	AGAAGAAAGGCCTGCTACAAG GCCCTCACTGAAGAAACAT	Eigene Daten (Kap. 4.5.1)	35 / 24	30 s	53°C
PAT1 (human)	F180 R855	ACCCGGTATCCTGTGCGTGA TGTGGCCCCGATGAGCGTGAG	NM022911	35	60 s	61°C
PAT1 (chimär)	F789 R1180	AAAAGCTACGGCGACATCTGC AGTTGCCCGGTGCTCTC	Eigene Daten (Kap. 4.5.2)	27	45 s	60°C
CFTR (ovine)	F2747 R3202	AGGTGGCTGCTTCTTTGGTTG CCGCTATCACTGGCACTGTA	NM 001009781	35	45 s	55°C
CIC2 (human)	F366 R746	GTCCCGGGGCTTGAACACCA CCCACCCCCACGGCACAG	NM04366	35	45 s	61°C
CIC3 (human)	F 1204 R 1635	CTTTGGGGAGCCTTTTTCAT CACCGCAATCCCCACAAT	AF 172729	35	90 s	55°C
CIC4 (bovine)	F777 R1300	GGCCGCTGCTGGGGTCTC CTGGCCGGTCTGGGGATGTC	NM 001031757	35	45 s	61°C
CIC5 (human)	F1537 R1880	GGGGTGA CTCGGATGACTGTT TCCCGGGATA CCACTG	NM000084	35	45 s	59°C
SMCT1 (human)	F106 R502	GGGGCGGCCAGCAGAC CCACTACCGCGCCCCACAG	NM145913	70	45 s	59°C
SMCT1 (chimär)	F49 R379	TGGCGTTGTCCCTCACC ACTACCGCGCCCCACAGAT	Eigene Daten (Kap. 4.5.5)	35	30 s	56°C

Erläuterungen zur Tabelle 5:

A	Annealingtemperatur
Chimäre Primer	Der vorwärtsgerichteter Primer wurde aus der Schaf-spezifischen Sequenz ermittelt, die mit den gelisteten Primern aus der humanen Sequenz generiert wurde. Der rückwärtsgerichtete Primer wurde aus der humanen Sequenz generiert.
E	Elongationsdauer
*	Primersequenz des MCT aus MÜLLER et al. 2002

Zur Ermittlung der optimalen Zyklenzahl für die semiquantitative PCR musste zunächst für jeden Transporter der lineare Bereich der Amplifikationskurve ermittelt werden. Dazu wurden für jeden Transporter mit den spezifischen Primern PCR in einem Mastermix für 15 Proben angesetzt. Diese Proben wurden, wie oben angegeben, im Thermocycler inkubiert. Transporterabhängig wurde dann ab dem 20. Zyklus nach Beendigung jedes Zyklus ein Reaktionsgefäß entnommen. Die Proben wurden elektrophoretisch (Kap. 3.8.5.2) aufgetrennt. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht (BioDoc Analyze, Whatman Biometra, Whatman GmbH i. L., Göttingen, Deutschland) analysiert und das Bild in einem angeschlossenen PC aufgezeichnet. Dabei wurde die Bandenintensität bestimmt (Abb. 3). Anhand der Bandenintensität konnte eine Zyklenzahl im oberen linearen Bereich ermittelt werden, bei der eine semiquantitativ-lineare Bestimmung der Transporterexpression des gesuchten Gens möglich war. Des Weiteren wurde die mRNA des nicht-regulierten Referenzgens (in der vorliegenden Arbeit β -Actin) zusätzlich zum zu untersuchenden Gen revers transkribiert und in der PCR amplifiziert.

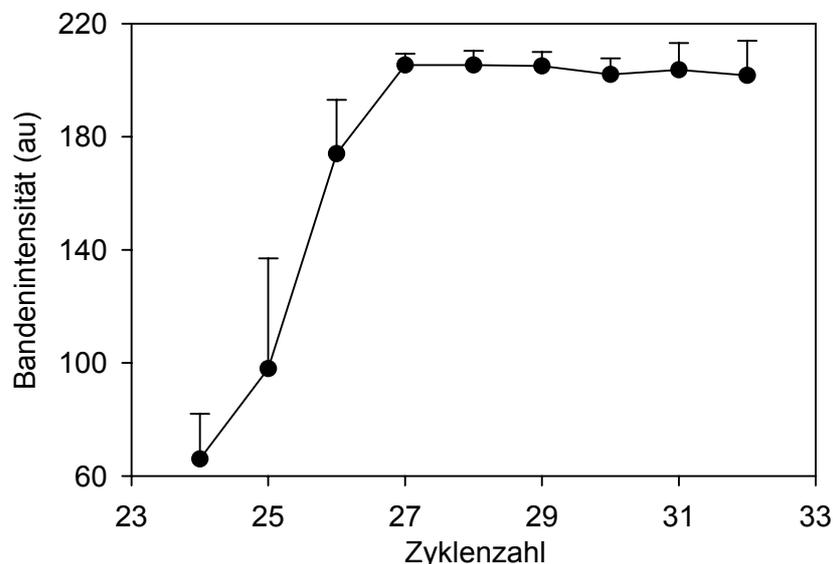


Abb. 3: Ermittlung des oberen, linearen Bereichs für die Semiquantifizierung am Beispiel des nicht-regulierten Referenzgenes β -Actin im Pansengewebe

Für β -Actin wurden Banden erst ab dem 24 Zyklus sichtbar. Weitere Erläuterungen zu der Abb. sind im Text beschrieben. Mittelwerte sind mit SEM abgebildet. $n = 3$, $N = 3$

3.8.5 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.8.5.1 Ermittlung der RNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mit Hilfe des Bio-Photometers (Fa. Eppendorf AG). Dieses misst die optische Dichte einer Probe bei 260 nm (OD_{260}). 2 μ l der RNA gelöst in 98 μ l Aqua bidest. wurden für die Bestimmung eingesetzt. Als Leerwert wurden 100 μ l Aqua bidest. verwendet. Die Konzentration der RNA (c) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}] = OD_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Multiplikationsfaktor}$$

In der vorliegenden Arbeit wurde eine 50-fache Verdünnung angewendet. Der Multiplikationsfaktor für RNA beträgt 40 (Bei der Wellenlänge 260 entspricht eine optische Dichte von 1 einer RNA-Konzentration von 40 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Als weiterer Parameter wurde die optische Dichte bei 280 nm (OD_{280}) ermittelt und das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} bestimmt. Dieses spiegelt die Reinheit der Probe wieder, da Proteine ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm haben. Nur Proben mit einem Verhältnis OD_{260}/OD_{280} zwischen 1,5 und 2,0 wurden für die weiteren Analysen verwendet.

3.8.5.2 Gelelektrophoretische Analyse

Analytisches Gel

Sowohl die Gesamt-RNA, als auch die PCR-Produkte wurden zur Analyse bzw. Detektion elektrophoretisch auf einem ethidiumbromidhaltigen 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Geltaschen dieses Gels fassten 12 μ l. Zur Analyse der Semiquantifizierung enthielt das Gel nur 0,4 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Ethidiumbromid. Dem Puffer in der Elektrophoreseapparatur war zusätzlich 0,4 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Ethidiumbromid beigemischt. Für die Analyse der Gesamt-RNA sowie für die Detektion von PCR-Produkten der RT-PCR Analyse wurde ein Agarosegel mit 4 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Ethidiumbromid verwendet. Hier wurde der Puffer in der Elektrophoreseapparatur nicht mit Ethidiumbromid versetzt. Die Elektrophorese erfolgte zunächst für 5 min bei 100 V, dann weitere 30 – 40 min bei 130 V. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht analysiert und das Bild in einem angeschlossenen PC aufgezeichnet.

Präparatives Gel

Die Vorbereitung des präparativen Gels erfolgte genauso wie auch für das analytische Gel. Allerdings wurden in diesem Falle Geltaschen für 24 μ l Proben mit Hilfe eines entsprechenden Kammes erzeugt. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte zunächst für 10 min bei 100 V, dann weitere 45 min bei 130 V. Nach der Auftrennung wurde die Bande, die dem spezifischen Produkt entsprach, unter UV-Licht ausgeschnitten. Die weitere Bearbeitung erfolgte mit Hilfe des Agarose Gel DNA Extraction Kits (Fa. Roche Diagnostics GmbH) nach Anleitung des Herstellers.

Präparativ aufgereinigte DNA-Fragmente wurden im Anschluss an die Agarosegelextraktion sequenziert (Kap. 3.8.5.3).

3.8.5.3 Sequenzierung und Homologiescreening

Die Sequenzierung der erhaltenen PCR-Produkte erfolgte mittels des ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA).

Zunächst wurden die zu sequenzierenden Proben gefällt. Die Amplifikate wurden in einem präparativen Gel (siehe 3.8.5.2) aufgetrennt. Aus diesem Gel wurde das fragliche Amplifikat ausgeschnitten und 1 µl der so eluierten DNA auf ein analytisches Gel (siehe 3.8.5.2) aufgetragen. Damit konnte ermittelt werden, wie viel DNA vorhanden war. Für die Sequenzierungsreaktion wurden nun ca. 45 ng des PCR-Produktes, 100 ng des gewünschten Primers und 4 µl des Terminator Ready Reaction Mixes mit Aqua bidest. auf 20 µl aufgefüllt. Im Terminator Ready Reaction Mix waren sowohl der für die Reaktion notwendige Puffer, die fluoreszenzmarkierten und -unmarkierten dNTP sowie auch die Polymerase bereits enthalten.

Die enthaltene DNA wurde zunächst denaturiert. Dies erfolgte mit Hilfe des Thermocyclers durch eine Inkubation bei 96 °C für 2 min. Anschließend wurden 25 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt für 15 sec bei 96 °C, einem Primer-Annealing für 15 sec bei 50 °C und einer Elongations-phase für 4 min bei 60 °C durchlaufen. Die Probe wurde dann mit 2 µl 3 M Natriumacetat und 50 µl Ethanol (99,8%) nach dem „Vortexen“ für 15 min unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert, um die enthaltene DNA zu fällen. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 18 °C und 14000 g. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet mit 200 µl Ethanol (70%, 4°C) durch 1-minütige Inkubation gewaschen. Nach Ablauf der einen Minute wurde der Überstand erneut abpipettiert und das Pellet im Blockthermostat (Fa. Eppendorf AG) bei 37 °C ca. 5 min getrocknet. Bis zur weiteren Sequenzanalyse wurde die Probe unter Lichtausschluss bei -20 °C gelagert.

Im Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung der Universität Leipzig wurde die Probe auf ein Acrylamid-Gel aufgetragen und durch einen ABI PRISM 377 DNA Sequenzer (Applied Biosystems) analysiert. Mit Hilfe der Internetseite des National Center for Biotechnology Information (NCBI) wurde überprüft, welches Protein die Sequenz des Amplifikates kodiert. Hierzu wurde online das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) der NCBI geöffnet und nucleotide-nucleotide blast gewählt. Desweiteren wurde die Nukleotid-Sequenz des ovinen, ruminalen PCR-Produktes mit Sequenzen anderer Spezies auf den Homologiegrad hin untersucht. Das Alignment wurde dabei mit der Clustal W Methode (Meg Align, Lasergene, DNASTAR Inc., Madison, USA) durchgeführt.

Die Sequenzierung wurde für alle untersuchten Transporter und hier sowohl für den vorwärtsgerichteten als auch für den rückwärtsgerichteten Primer durchgeführt.

3.9 Statistik und Darstellung der Ergebnisse

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde die Computer-Software Jandel Sigma Stat® 2.0 (Fa. Jandel Corporation) bzw. Microsoft Excel® 97 (Fa. Microsoft Corporation) verwendet. Die Ergebnisse werden als arithmetische Mittel mit ihrem Standardfehler (SEM, standard error of mean) angegeben.

Zunächst erfolgte in allen Versuchsgruppen eine Analyse auf Normal- (Kolmogorov-Smirnov-Test) und auf Gleichverteilung (Levene's Median-Test). Ein Vergleich zwischen zwei Versuchsgruppen erfolgte bei vorliegender Normal- und Gleichverteilung mit einem gepaarten t-Test. Bei fehlender Normal- und Gleichverteilung wurde der Wilcoxon Signed Rank Test angewendet. Zur Überprüfung der Signifikanzen bei mehr als zwei Versuchsgruppen wurde eine Varianzanalyse hinzugezogen. Hierzu wurde bei vorliegender Normal- und Gleichverteilung One-Way Repeated Measures Analysis of Variance (One-Way RM ANOVA) verwendet, bei fehlender Normal- und Gleichverteilung hingegen Friedman RM ANOVA. Im Anschluss an die jeweilige Varianzanalyse schloss sich ein Student-Newman-Keuls-Test an.

Zur Beschreibung der Konzentrationsabhängigkeit der Acetataufnahme wurden folgende Parameter durch nichtlineare Regressionsanalyse geschätzt:

U_{\max} : maximale Aufnahme (Uptake) [$\text{nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]

K_m : scheinbare Halbsättigungskonstante [$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$]

Zur Ermittlung dieser Parameter wurde die Acetataufnahme (U in $\text{nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) bei verschiedenen Acetatkonzentrationen (c in $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) durch Iteration an die nicht-lineare Regressionsgleichung $U = U_{\max} \cdot c \cdot (K_m + c)^{-1}$ angepasst (Software: Jandel Sigma Stat® 2.0).

Signifikante Unterschiede (mindestens $p < 0,05$) wurden beim Vergleich von zwei Mittelwerten mit „*“, bzw. bei Varianzanalysen mit a, b, c etc. gekennzeichnet. Die Anzahl der Stichproben ist mit n , die Zahl der für diese Stichproben verwendeten Versuchstiere mit N angegeben.

4 Ergebnisse

In Ergebnisteil und Diskussion wird die CO₂-haltige/HCO₃⁻-gepufferte Lösung im Folgenden als HCO₃⁻-gepufferte Lösung bezeichnet. Die Bikarbonatkonzentration in dieser CO₂-haltigen/HCO₃⁻-gepufferten Lösung ist abhängig von pH-Wert und pCO₂. In Tabelle 6 sind die hier verwendeten pH-Werte und Bikarbonatkonzentrationen sowie der pCO₂ ausgewiesen. Dabei wurde der pH-Wert von 6,1 nur in der mukosalen Lösung eingesetzt. Bei einem mukosalen pH-Wert von 6,1 betrug der serosale pH-Wert immer 7,4. Im Verlauf der Ergebnisdarstellung wird im Text nur der pH-Wert ohne die entsprechend zugehörige Bikarbonatkonzentration angegeben.

Tabelle 6: CO₂-Partialdruck (pCO₂) und Bikarbonatkonzentrationen ([HCO₃⁻]) in den verwendeten Pufferlösungen

Lösung	pCO ₂	[HCO ₃ ⁻]
HCO ₃ ⁻ -gepufferte Lösung, pH 7,4	5%	22,5 mM
HCO ₃ ⁻ -gepufferte Lösung, pH 6,1	5%	1,1 mM
HEPES-gepufferte Lösung, pH 7,4	0%	0 mM
HEPES-gepufferte Lösung, pH 6,1	0%	0 mM

4.1 Untersuchung der Acetataufnahme (Uptake) in das Pansenepithel

4.1.1 Einfluss von mukosalem Chlorid und pH-Wert auf die apikale Acetataufnahme

Um die Beteiligung eines Anionen/HCO₃⁻-Austauschers zu untersuchen, der sowohl Chlorid als auch SCFA akzeptiert, wurde in einer HCO₃⁻-gepufferten Lösung die apikale Acetataufnahme bei einem mukosalen Chloridgehalt von 90 mM mit der bei 4,5 mM verglichen (Abb. 4). Neben der Beteiligung eines Austauscher wurde auch der Anteil der Diffusion der undissoziierten Säure analysiert, indem dieser Vergleich sowohl bei pH_m 7,4 als auch bei pH_m 6,1 erfolgte, während der pH_s immer bei 7,4 lag.

Die Absenkung des mukosalen Chloridgehalts von 90 auf 4,5 mM induzierte sowohl bei pH_m 7,4 als auch bei pH_m 6,1 eine signifikante Zunahme der apikalen Acetataufnahme ($p < 0,05$). Bei einem pH_m von 6,1 war die absolute Zunahme größer. (ΔU : $0,11 \pm 0,06 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bei pH_m 7,4 vs.: $0,18 \pm 0,06 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bei pH_m 6,1; $p < 0,05$)

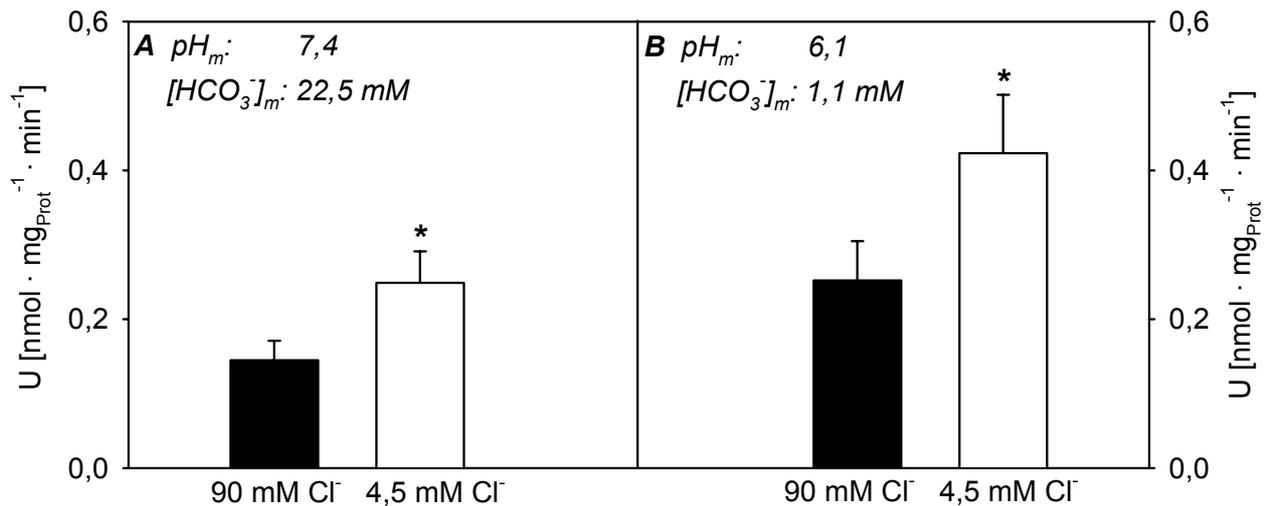


Abb. 4: *Einfluss von [Cl]_m auf die apikale Acetataufnahme bei unterschiedlichen pH_m und [HCO₃⁻]_m*

*Dargestellt sind die Aufnahmen (U) von Acetat (Konzentration 0,5 mM) in einer HCO₃⁻-gepufferten Lösung als Mittelwerte mit SEM. Der serosale Puffer war konstant auf einen pH-Wert von 7,4, eine [HCO₃⁻] von 22,5 mM und eine [Cl] von 90 mM eingestellt. [HCO₃⁻], [Cl] und pH der mukosalen Lösung sind in der Abbildung beschrieben. Signifikante Unterschiede innerhalb eines Graphen sind mit * gekennzeichnet (p < 0,05). n = 10, N = 5*

Der oben abgebildete Versuchsansatz wurde auch in Anwesenheit von 0,2 mM DIDS durchgeführt. DIDS ist bekannt als Hemmstoff verschiedener HCO₃⁻-Austauschsysteme und sollte weiteren Aufschluss über die Beteiligung eines Anionen/HCO₃⁻-Austauschers an der apikalen Acetataufnahme geben (Kap. 2.2.5.1 und 2.2.5.2). DIDS verursachte bei keiner der Versuchseinstellungen eine statistisch abzusichernde Reduktion der Acetataufnahme (Abb. 5).

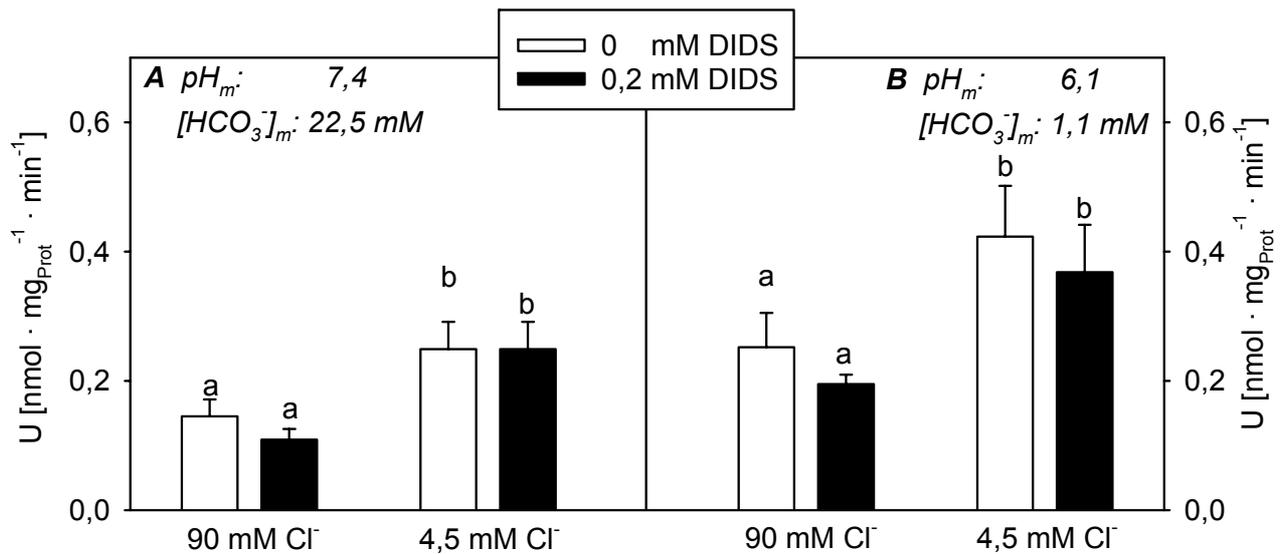


Abb. 5: *Einfluss einer mukosalen DIDS-Zugabe auf die apikale Acetataufnahme bei verschiedenen pH_m , $[\text{Cl}^-]_m$ und $[\text{HCO}_3^-]_m$*

Dargestellt sind die Aufnahmen (U) von Acetat (Konzentration 0,5 mM) in HCO_3^- -gepufferter Lösung als Mittelwerte mit SEM. Die Ergebnisse in Abwesenheit von DIDS entsprechen den Daten aus Abb. 4. Der serosale Puffer war konstant auf einen pH-Wert von 7,4 eine $[\text{HCO}_3^-]$ von 22,5 mM und eine $[\text{Cl}^-]$ von 90 mM eingestellt. pH-Wert, $[\text{HCO}_3^-]$, $[\text{Cl}^-]$ und $[\text{DIDS}]$ der mukosalen Lösung sind in der Abbildung angegeben. Verschiedene Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb von Abb. 5A bzw. B ($p < 0,05$). $n = 10$, $N = 5$

Um den Einfluss der mukosalen Chloridkonzentration noch weiter einzugrenzen, wurde in einem weiteren Versuchsansatz die apikale Acetataufnahme bei 0,5 mM bzw. 0 mM Chlorid untersucht (Abb. 6).

Zwischen 0,5 mM und 0 mM Chlorid konnte kein Unterschied in der Acetataufnahme festgestellt werden (Abb. 6). Vergleicht man die in Abb. 4 dargestellte Versuchserie mit der in Abb. 6 wiedergegebenen, so fällt allerdings auf, dass bei 0 mM und 0,5 mM Chlorid (Abb. 6) die Acetataufnahme um annähernd das Dreifache gegenüber 4,5 mM Chlorid erhöht war (Abb. 4). Ein statistischer Vergleich wurde jedoch nicht durchgeführt, da in beiden Versuchsserien auch die serosalen Chloridkonzentrationen unterschiedlich waren.

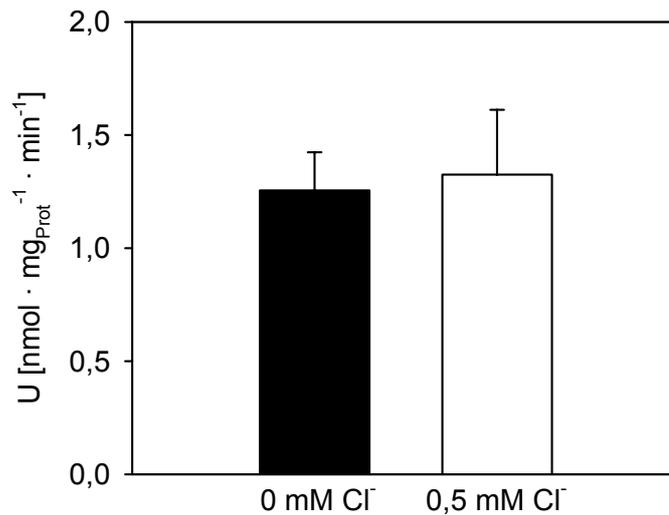


Abb. 6: **Apikale Acetataufnahme bei einer [Cl_m] von 0 bzw. 0,5 mM**

Dargestellt sind die Aufnahmen (U) von Acetat bei einer mukosalen Acetatkonzentration von 0,5 mM, einem pH_m von 6,1 und einer [HCO₃⁻]_m von 1,1 mM. Die serosale Pufferlösung war nominell frei von Cl⁻, enthielt 22,5 mM HCO₃⁻ und war auf pH 7,4 eingestellt. Mittelwerte sind mit SEM angegeben. n = 10, N = 7

Die in Abb. 4 und Abb. 5 dargestellten Versuche machten deutlich, dass das Absenken des pH_m von 7,4 auf 6,1 bzw. der [HCO₃⁻]_m von 22,5 mM auf 1,1 mM die apikale Aufnahme von Acetat erhöhte. Allerdings war der Anstieg wesentlich geringer als der pH-induzierte Anstieg der Konzentration an undissoziiertem Acetat (ca. 20-fach). Die Senkung der mukosalen Chloridkonzentration führte zu einer signifikanten Steigerung der Acetataufnahme. DIDS hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Acetataufnahme.

Die folgenden Versuche wurden vorzugsweise bei einem pH_m von 6,1 ([HCO₃⁻]_m: 1,1 mM) durchgeführt, da bei dieser Versuchseinstellung die chloridsensitive und damit vermutlich proteinvermittelte apikale Acetataufnahme die größten basalen Werte aufwies. Der serosale pH-Wert betrug immer 7,4 ([HCO₃⁻]_s: 22,5 mM). Des Weiteren wurde ein Puffer verwendet, der sowohl mukosal als auch serosal kein Chlorid enthielt, um eine mögliche kompetitive Hemmung der Acetataufnahme durch Chlorid zu vermeiden.

4.1.2 Einfluss von Nitrat und Sulfat auf die apikale Acetataufnahme

In dieser Versuchsserie sollte untersucht werden, ob außer Cl⁻ auch noch andere Anionen (NO₃⁻, SO₄²⁻) die proteinvermittelte apikale Acetataufnahme hemmen können.

Verglichen mit den Kontrollepithelien führte die mukosale Zugabe von 0,5 mM bzw. 10 mM Nitrat zu einer signifikanten Hemmung der Acetataufnahme um $0,67 \pm 0,14 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bzw. $0,91 \pm 0,17 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Abb. 7A, p < 0,05). Die mukosale Zugabe von 5 mM Sulfat hatte keine Auswirkung auf die Acetataufnahme (Abb. 7B).

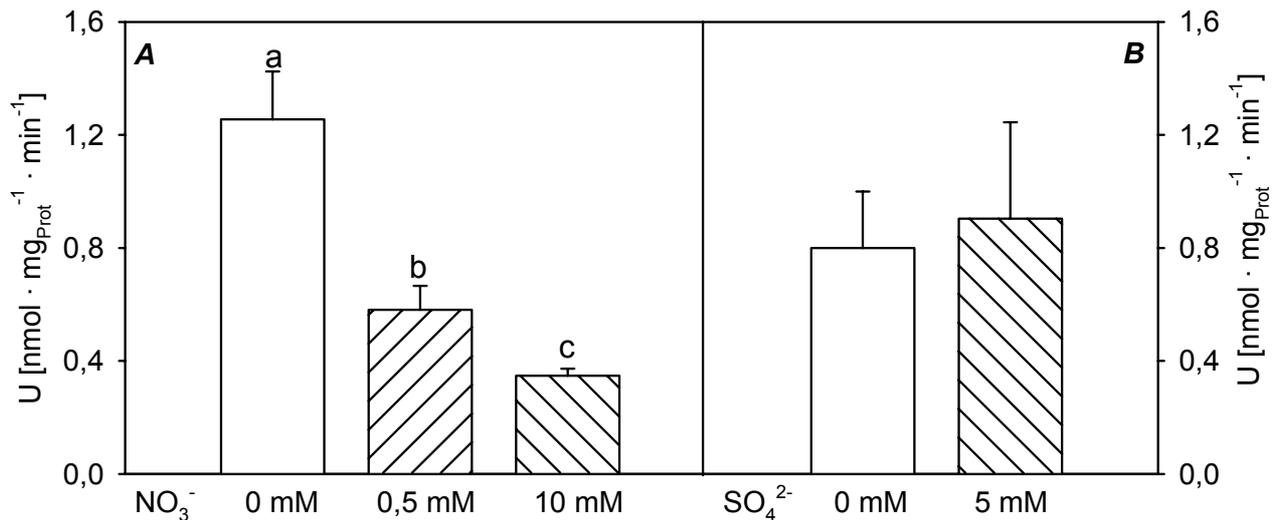


Abb. 7: **Einfluss von NO₃⁻ bzw. SO₄²⁻ auf die apikale Acetataufnahme**

Dargestellt sind die Aufnahmen (U) von Acetat (Konzentration: 0,5 mM) unter Einfluss einer mukosalen Applikation von (A) 0,5 bzw. 10 mM NO₃⁻ und (B) 5 mM SO₄²⁻. Die mukosale Lösung war frei von Cl⁻, der pH_m lag bei 6,1 und die [HCO₃⁻]_m betrug 1,1 mM. Die serosale Lösung war ebenfalls frei von Cl⁻, der pH_s betrug 7,4 und die [HCO₃⁻]_s lag bei 22,5 mM. Abgebildet sind Mittelwerte mit SEM. Verschiedene Buchstaben weisen signifikante Unterschiede innerhalb Abb. 7A aus ($p < 0,05$). (A) $n = 10$, $N = 7$; (B) $n = 6$, $N = 6$

4.1.3 Einfluss von Bikarbonat auf die apikale Acetataufnahme

GÄBEL et al. (1991a) hatten eine direkte Kopplung zwischen der HCO₃⁻-Sekretion und der SCFA-Resorption am Pansenepithel des Schafes vermutet. Die Ergebnisse der unter 4.1.1 und 4.1.2 dargestellten Untersuchungen könnten somit zumindest teilweise auf einem chlorid- und nitratsensitiven Acetat/HCO₃⁻-Austauscher beruhen. Um dieses eingehender zu analysieren, wurde die apikale Aufnahme von Acetat in einer HCO₃⁻-gepufferten mit der in einer HEPES-gepufferten Lösung verglichen. Da durch den Metabolismus auch in HEPES-gepufferter Lösung noch CO₂ generiert wird, wurde in den Versuchsserien zusätzlich Ethoxazolamid eingesetzt. Ethoxazolamid hemmt die Carboanhydrase und somit die intrazelluläre Generierung von HCO₃⁻ aus CO₂.

4.1.3.1 Einfluss einer Reduktion der Bikarbonatkonzentration auf die apikale Acetataufnahme

Bei einer Acetatkonzentration von 0,5 mM kam es bei Absenken des pH_m von 7,4 auf 6,1 in HCO₃⁻-gepufferten Lösung ([HCO₃⁻]_m von 22,5 mM auf 1,1 mM) zu einem Anstieg der Acetataufnahme um $0,48 \pm 0,10$ nmol · mg_{Prot}⁻¹ · min⁻¹ (Abb. 8A und Abb. 8C; $p < 0,05$). Alleiniges Absenken des pH_m von 7,4 auf 6,1 in HEPES-gepufferten Lösung führte hingegen nur zu einem Anstieg der Acetataufnahme von $0,13 \pm 0,06$ nmol · mg_{Prot}⁻¹ · min⁻¹ (Abb. 8A und Abb. 8B, $p < 0,05$). Bei einer

Acetatkonzentration von 10 mM erfolgte in HCO_3^- -gepufferter Lösung ein Anstieg der Acetataufnahme bei Absenken des pH_m von 7,4 auf 6,1 ($[\text{HCO}_3^-]_m$ von 22,5 mM auf 1,1 mM) um $5,82 \pm 1,21 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Abb. 8D und Abb. 8F, $p < 0,05$). Bei alleinigem Absenken des pH_m betrug der Anstieg nur $1,97 \pm 0,32 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Abb. 8E und Abb. 8F, $p < 0,05$).

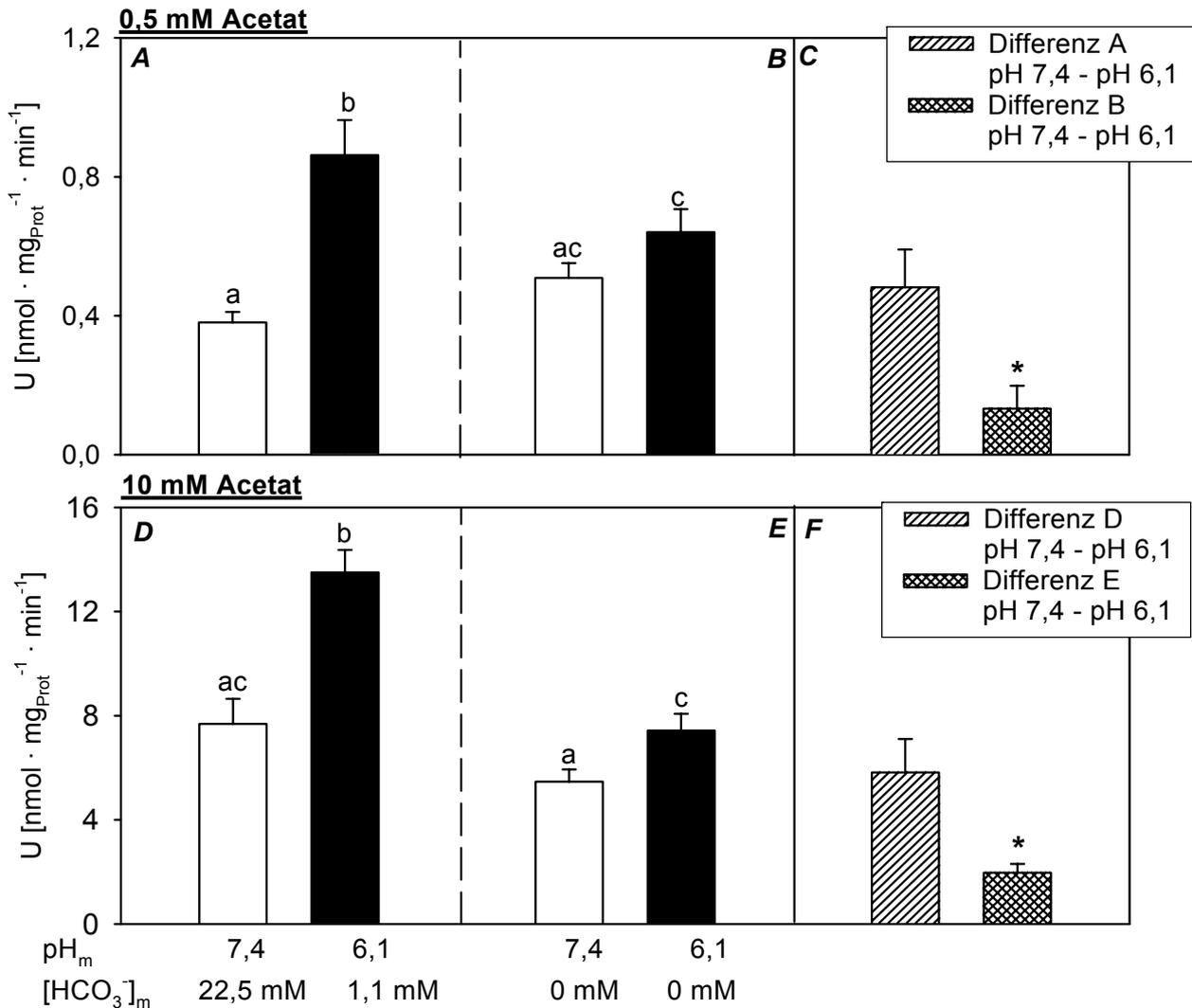


Abb. 8: Einfluss von pH_m und $[\text{HCO}_3^-]_m$ auf die apikale Acetataufnahme

Dargestellt sind Mittelwerte der Acetataufnahme (U) mit SEM. Der serosale Puffer wies generell einen pH -Wert von 7,4 auf und enthielt in HCO_3^- -gepufferter Lösung (A, D) 22,5 mM HCO_3^- . Die Konzentrations- und pH -Angaben in der Abbildung beziehen sich auf die mukosale Lösung. Alle Lösungen enthielten Ethoxazolamid (50 μM) und waren frei von Cl . Abb. A, B, D und E zeigen die absolute Acetataufnahme, während C und F die Differenz der Acetataufnahme zwischen pH 7,4 und 6,1 jeweils in An- und Abwesenheit von HCO_3^- wiedergeben. Verschiedene Buchstaben geben signifikante Unterschiede übergreifend in Abb. A und B bzw. Abb. D und E wieder ($p < 0,05$). Signifikante Unterschiede innerhalb von C bzw. F sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$). $n = 9$, $N = 3$

Die Ergebnisse dieses Kapitels zeigten, dass die Steigerung der apikalen Acetataufnahme bei Absenkung des mukosalen pH -wertes v.a. auf einer Erniedrigung der mukosalen Bikarbonat-

konzentration beruhte. Der bikarbonatunabhängige pH-Effekt auf die Acetataufnahme (z.B. über Stimulation der Diffusion der undissoziierten Säure) war vergleichsweise geringer.

4.1.3.2 Apikale Acetataufnahme in Abhängigkeit von der intrazellulären Bikarbonatproduktion unter zusätzlicher Analyse des Nitrats effekts auf die Acetataufnahme

Inwieweit die intrazelluläre Produktion von CO_2 einen Anteil an der Bikarbonatbereitstellung für einen $\text{SCFA}/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher hat, sollte in der folgenden Versuchsserie durch eine vergleichende Addition von Ethoxylolamid ($50 \mu\text{M}$) in An- wie auch in Abwesenheit von extrazellulärem Bikarbonat untersucht werden. Da der Acetattransport eine starke Sensitivität gegenüber Nitrat (Kap. 4.1.2) aufwies, wurde in allen Versuchseinstellungen auch die Hemmbarkeit durch Nitrat vergleichend analysiert. Die Aufnahmeuntersuchungen wurden bei pH_m 6,1 sowohl mit 0,5 als auch mit 10 mM Acetat durchgeführt.

Bei 0,5 mM Acetat konnte durch die Substitution von extrazellulärem Bikarbonat durch HEPES keine statistisch absicherbare Reduktion der apikalen Acetataufnahme induziert werden (Abb. 9A). Die nitratsensitiven Anteile der Acetataufnahme, das heißt die Differenz der Acetataufnahmen bei nitratfreier vs. nitrathaltiger Inkubation unterschieden sich in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Bikarbonat nicht voneinander (HCO_3^- -gepufferte Lösung pH_m 6,1 / pH_s 7,4: $0,63 \pm 0,10 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; HEPES-gepufferte Lösung pH_m 6,1 / pH_s 7,4: $0,57 \pm 0,10 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Die Hemmung der intrazellulären Bikarbonatproduktion durch $50 \mu\text{M}$ Ethoxylolamid senkte die Acetataufnahme in HEPES-gepufferter Lösung im Vergleich zu einer HCO_3^- -gepufferten Lösung (Abb. 9B, $p < 0,05$). Damit unterschied sich auch der nitratsensitive Anteil der Acetataufnahme in ethoxylolamidhaltiger, HEPES-gepufferter Lösung signifikant von dem nitratsensitiven Anteil der Acetataufnahme in HCO_3^- -gepufferten Lösung ($p < 0,05$) (HCO_3^- -gepufferte Lösung pH_m 6,1 / pH_s 7,4: $0,90 \pm 0,16 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; HEPES-gepufferte Lösung pH_m 6,1 / pH_s 7,4: $0,45 \pm 0,07 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

Bei einer erhöhten Acetatkonzentration von 10 mM wurde eine Hemmung der Acetataufnahme durch bikarbonatfreie Inkubation in HEPES-gepufferter Lösung deutlich, unabhängig davon, ob Ethoxylolamid in der Lösung anwesend war oder nicht (Abb. 9C und Abb. 9D; $p < 0,05$). Entsprechend unterschieden sich die nitratsensitiven Acetataufnahmen zwar zwischen bikarbonathaltiger und -freier Inkubation nicht jedoch zwischen ethoxylolamidhaltiger und -freier Inkubation (Anwesenheit von Ethoxylolamid: HCO_3^- -gepufferte Lösung pH_m 6,1 / pH_s 7,4: $8,89 \pm 1,35 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; HEPES gepufferte Lösung pH_m 6,1 / pH_s 7,4: $3,88 \pm 0,47 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) (Abwesenheit von Ethoxylolamid: HCO_3^- -gepufferte Lösung pH_m 6,1 / pH_s 7,4: $9,83 \pm 1,09 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; HEPES gepufferte Lösung pH_m 6,1 / pH_s 7,4: $5,06 \pm 0,63 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) (Abb. 9C und Abb. 9D).

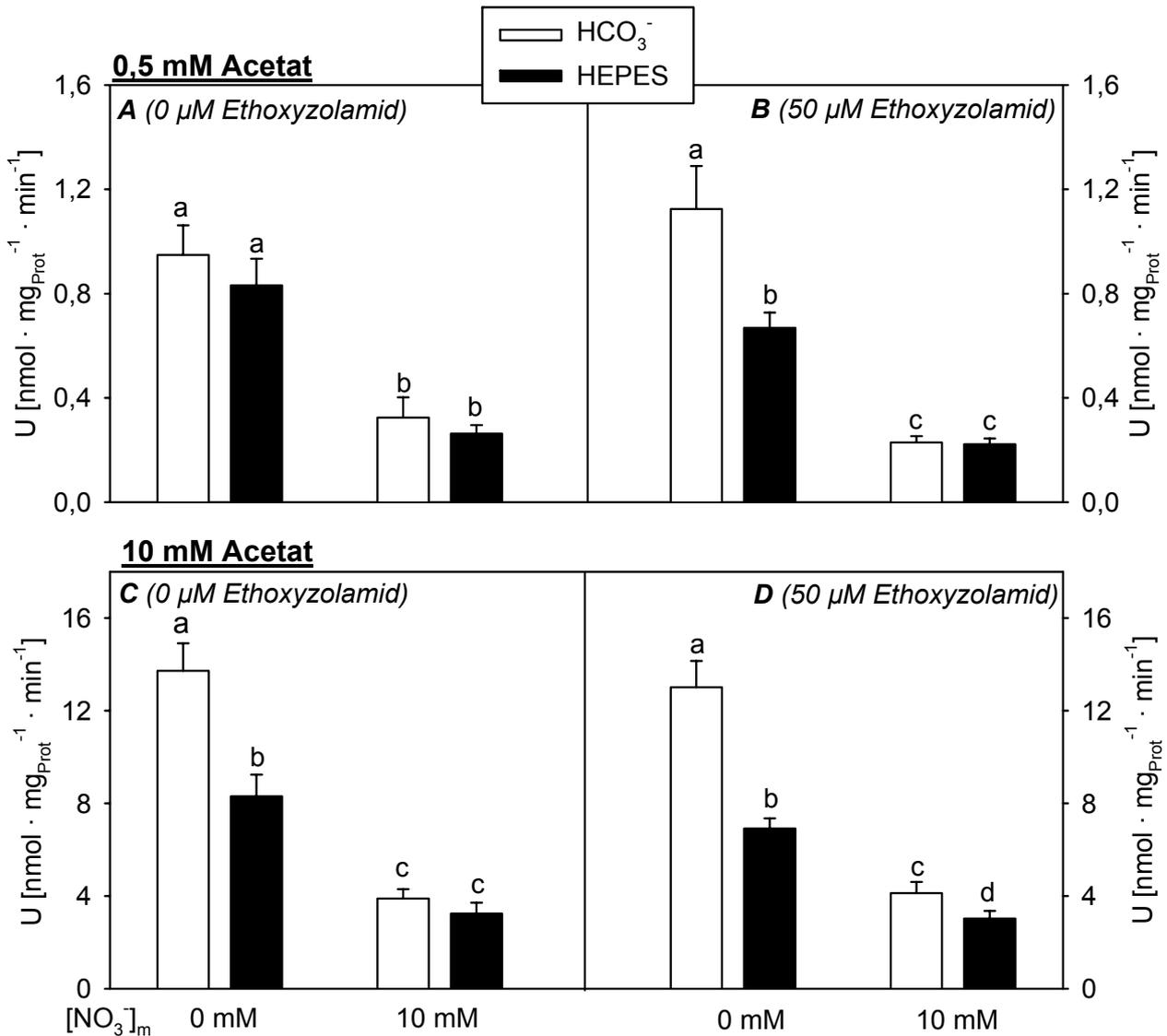


Abb. 9: Einfluss von Ethoxycyclamid auf die apikale Acetataufnahme in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Bikarbonat bzw. Nitrat

Vergleichend dargestellt ist der Einfluss von Ethoxycyclamid (50 μM beidseitig) und Nitrat (10 mM mukosal) auf die Acetataufnahme (U) bei 0,5 mM (A, B) bzw. 10 mM Acetat (C, D). Der pH_m war 6,1. Dementsprechend betrug $[\text{HCO}_3^-]_m$ 1,1 mM (HCO_3^- -gepufferte Lösung) bzw. 0 mM (HEPES-gepufferte Lösung). Die serosale Lösung wies einen pH von 7,4 und eine $[\text{HCO}_3^-]_s$ von 22,5 mM (HCO_3^- -gepufferte Lösung) bzw. 0 mM (HEPES-gepufferte Lösung) auf. Alle Lösungen waren frei von Cl⁻. Abb. A und C zeigen die Acetataufnahme in Abwesenheit von Ethoxycyclamid, Abb. B und D in dessen Anwesenheit. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM. Verschiedene Buchstaben geben signifikante Unterschiede innerhalb eines Graphen wieder ($p < 0,05$). $n = 11$, $N = 11$

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Ethoxycyclamid nur bei niedrigen Acetatkonzentrationen (0,5 mM) und nur in HEPES-gepufferter Lösung zu einer Hemmung der apikalen Acetataufnahme führte. Die intrazelluläre Bikarbonatproduktion aus CO₂ scheint also zumindest unter den gegebenen Versuchsbedingungen nur in begrenztem Umfang als Bikarbonatquelle für einen SCFA/HCO₃⁻-Austausch dienen zu können. Da diese intrazelluläre Bikarbonatproduktion aber nicht vernachlässigt werden kann, wurde in den folgenden Versuchen bei Einsatz einer HEPES-

gepufferten Lösung immer gleichzeitig Ethoxylamid zugesetzt. Nitrat hemmte die Acetataufnahme deutlicher als eine bikarbonatfreie Inkubation. Zudem erfolgte die Nitrathemmung sowohl in der An- als auch in der Abwesenheit von Bikarbonat auf etwa das gleiche Niveau. Dies legt nahe, dass sowohl der bikarbonatabhängige als auch der bikarbonatunabhängige Acetattransport in hohem Maße durch Nitrat hemmbar ist.

4.1.3.3 Einfluss von Nifluminsäure auf die apikale Acetataufnahme bei verschiedenen Bikarbonatkonzentrationen vergleichend zu Nitrat

Nifluminsäure ist bekannt als Hemmstoff verschiedener HCO_3^- -Austauschsysteme (Kap. 2.2.5.1 und 2.2.5.2). Daher sollte im Folgenden die Sensitivität der bikarbonatabhängigen apikalen Acetataufnahme gegenüber einer mukosalen Applikation von Nifluminsäure (NFA) überprüft und mit der Nitrathemmwirkung (ebenfalls mukosale Applikation) verglichen werden.

Bei einer Konzentration von 0,5 mM Acetat wurde die Acetataufnahme in HCO_3^- -gepufferten Lösung und pH_m 7,4 durch Nitrat (um $0,20 \pm 0,05 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) aber auch durch Nifluminsäure (um $0,11 \pm 0,03 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) signifikant gehemmt (Abb. 10B; $p < 0,05$). In HEPES-gepufferten Lösung bei pH_m 7,4 zeigten sich sowohl in der Höhe der Uptakes als auch im Grad der Hemmung (10 mM Nitrat: um $0,21 \pm 0,05 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; 0,2 mM NFA: um $0,10 \pm 0,03 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) keine Unterschiede gegenüber der HCO_3^- -gepufferten Lösung (Abb. 10B). Ein Absenken der mukosalen Bikarbonatkonzentration auf 1,1 mM bzw. des mukosalen pH-Wertes auf 6,1 führte sowohl in An- (2,5-fach) wie auch in Abwesenheit (1,6-fach) von Bikarbonat zu einem Anstieg der gesamten Acetataufnahme (Vgl.: Abb. 10A und C bzw. Abb. 10B und D). Dieser Anstieg der Acetataufnahme war in HCO_3^- -gepufferten Lösung signifikant größer als in HEPES-gepufferten Lösung ($p < 0,05$). Auch bei $[\text{HCO}_3^-]_m$ von 1,1 mM und pH_m 6,1 war die Acetataufnahme nicht nur sensitiv gegenüber 10 mM Nitrat (um $0,44 \pm 0,07 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) sondern in gleichem Maße auch gegenüber 0,2 mM NFA (um $0,42 \pm 0,07 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) (Abb. 10C). In HEPES-gepufferten Lösung erfolgte bei pH_m 6,1 ($[\text{HCO}_3^-]_m$: 0 mM) ebenfalls eine signifikante Hemmung der Acetataufnahme durch 10 mM Nitrat (um $0,29 \pm 0,06 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) sowie durch 0,2 mM NFA (um $0,19 \pm 0,06 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) (Abb. 10D). Die Endwerte der Hemmung in HCO_3^- -gepufferten und HEPES-gepufferten Lösung waren dabei fast gleich groß. Aufgrund des niedrigeren Ausgangsniveaus waren aber die Hemmwirkungen von Nitrat und NFA in HEPES-gepufferten Lösung kleiner ($p < 0,05$).

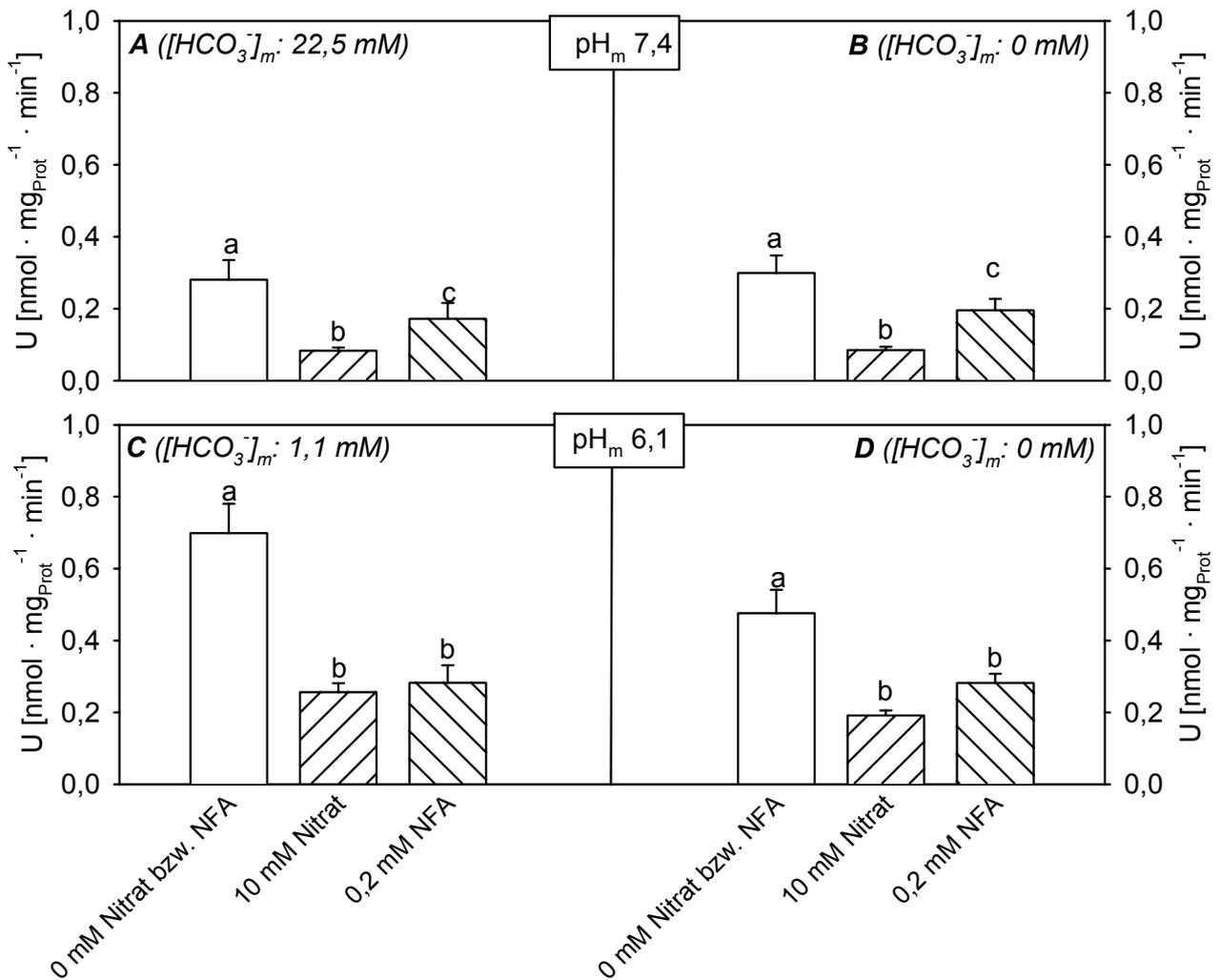


Abb. 10: Einfluss von NFA und NO_3^- auf die apikale Acetataufnahme in HCO_3^- -gepufferter und HEPES-gepufferter Lösung bei unterschiedlichen pH_m

Dargestellt ist der Effekt von NFA und NO_3^- auf die Aufnahme (U) von Acetat (Konzentration: 0,5 mM) in An- und Abwesenheit von HCO_3^- . Serosal wurden in Abb A und C eine HCO_3^- -gepufferte Lösung ($[\text{HCO}_3^-]$: 22,5 mM), in Abb. B und D eine HEPES-gepufferte Lösung verwendet (pH_s 7,4). Die Konzentrations- und pH -Angaben in der Abbildung beziehen sich auf die mukosale Lösung. Alle Lösungen waren frei von Cl⁻. Mittelwerte sind mit SEM angegeben. Verschiedene Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede jeweils innerhalb von Abbildung A, B, C oder D ($p < 0,05$). (A, C) $n = 10$, $N = 5$; (B, D) $n = 11$, $N = 6$

Die Ergebnisse dieser Versuchsserie zeigten, dass Nifluminsäure zu einer ähnlich starken Reduktion der apikalen Acetataufnahme führte wie Nitrat. Der nachgewiesene nitrat- bzw. nifluminsäuresensitive Anteil der Acetataufnahme stieg nach Stimulation der Acetataufnahme durch Absenkung des mukosalen pH -Wertes bzw. der mukosalen Bikarbonatkonzentration an. Im Fall des nitratsensitiven Anteils der Acetataufnahme erfolgte der Anstieg in HEPES-gepufferter Lösung nur tendenziell ($p = 0,08$). Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass Nifluminsäure wie auch schon Nitrat (Kap. 4.1.3.2) zu einer Reduktion der Acetataufnahme in Abwesenheit von Bikarbonat führte.

4.1.4 Konzentrationsabhängigkeit der apikalen Acetataufnahme

Die HCO_3^- -Abhängigkeit und NO_3^-/NFA -Sensitivität der apikalen Acetataufnahme (Kap. 4.1.3) deuten auf die Beteiligung von Transportproteinen und gegebenenfalls auch Kanalproteinen hin. Transportproteine folgen bei ansteigenden Substratkonzentrationen einer Sättigungskinetik (LEHNINGER et al. 1998). Deshalb wurde in der nächsten Versuchsserie die Acetataufnahme bei ansteigenden Konzentrationen von 20 μM bis 10 mM in HCO_3^- -gepufferter Lösung (pH_m 6,1) untersucht (Abb. 11). Es zeigte sich allerdings, dass die Acetataufnahme im untersuchten Konzentrationsbereich keine Sättigung zeigte und weitestgehend linear mit steigender Acetatkonzentration zunahm.

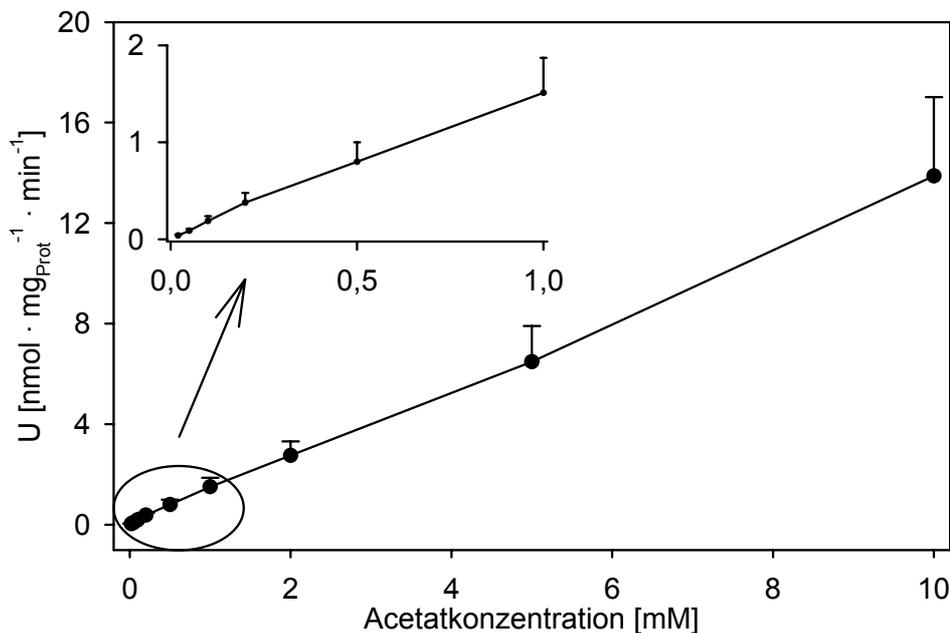


Abb. 11: **Apikale Acetataufnahme (U) im Konzentrationsbereich von 20 μM bis 10 mM**
 Das Insert zeigt den Bereich von 20 μM bis 1 mM in größerer Auflösung. Der serosale Puffer war auf einen pH-Wert von 7,4 und eine $[\text{HCO}_3^-]$ von 22,5 mM eingestellt, während pH_m 6,1 und $[\text{HCO}_3^-]_m$ 1,1 mM betrug. Beide Lösungen waren frei von Cl⁻. Angegeben sind Mittelwerte mit SEM. $n = 6$, $N = 6$

In einer nächsten Versuchsserie wurde die Konzentrationskinetik bei Konzentrationen von 5 bis 60 mM Acetat analysiert (Abb. 12). Die Messung erfolgte sowohl in HCO_3^- -gepufferter Lösung als auch in HEPES-gepufferter Lösung ohne bzw. mit 60 mM Nitrat (Abb. 12). Auf diese Weise sollte sowohl der bikarbonatabhängige Anteil der Acetataufnahme als auch der bikarbonatunabhängige nitratsensitive Anteil der Acetataufnahme erfasst werden. In HEPES-gepufferter Lösung war die Acetataufnahme bei den Konzentrationen 15 mM, 20 mM, 30 mM und 60 mM Acetat signifikant niedriger als in HCO_3^- -gepufferter Lösung ($p < 0,05$). Die Addition von 60 mM Nitrat zu einer HEPES-gepufferten Lösung bewirkte eine weitere, signifikante Reduktion der Acetataufnahme bei allen untersuchten Konzentrationen ($p < 0,05$).

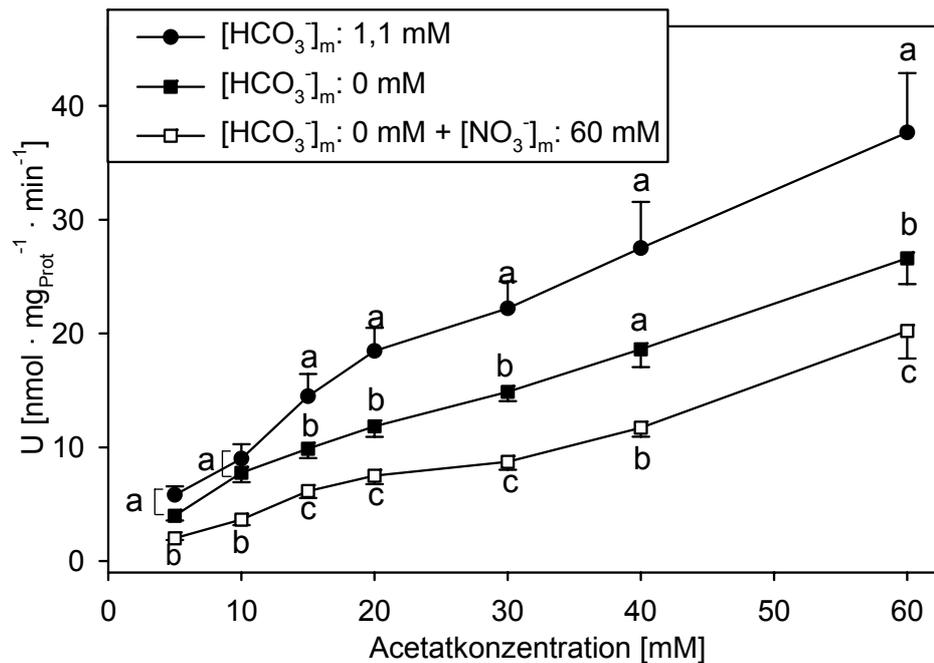


Abb. 12: **Einfluss steigender, mukosaler Acetatkonzentrationen auf die apikale Acetataufnahme**

Es wurde vergleichend die Acetataufnahme (U) in Anwesenheit von HCO_3^- und in Abwesenheit von HCO_3^- mit und ohne 60 mM NO_3^- untersucht (pH_m : 6,1; pH_s : 7,4). Die mukosale und die serosale Lösung waren frei von Cl^- . Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM. Verschiedene Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). $n = 9$, $N = 9$

In der Annahme, dass die Bikarbonatabwesenheit in Kombination mit Nitrat den proteinvermittelten SCFA-Transport komplett hemmt, d.h. unter diesen Bedingungen nur der lipophile Anteil verbleibt, müsste die Differenz zur Acetataufnahme in HCO_3^- -gepufferter Lösung den proteinvermittelten Transport widerspiegeln und daher eine entsprechende Kinetik aufweisen. Dazu wurde die Differenz des Acetatuptakes bei mukosal 1,1 mM Bikarbonat und bei mukosal 0 mM Bikarbonat + 60 mM Nitrat gebildet (Abb. 13). Diese Differenz folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik mit einer U_{\max} von $28,3 \pm 2,4 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und einer K_m von $34,5 \pm 5,6 \text{ mM}$.

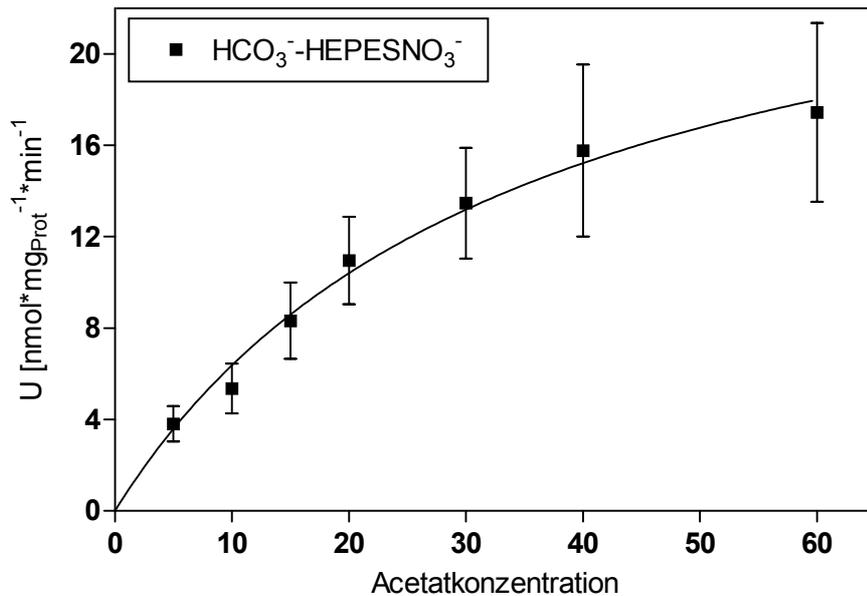


Abb. 13: *Korrelation zwischen der NO₃⁻-sensitiven apikalen Acetataufnahme und steigenden Acetatkonzentrationen*

Die bikarbonatabhängige nitratsensitive Acetataufnahme wurde ermittelt durch Bildung der Differenz zwischen der Acetataufnahme (U) in HCO₃⁻-gepufferter Lösung und in HEPES-gepufferter Lösung mit 60 mM NO₃⁻ (Abb. 12). Die durchgezogene Linie entspricht der nicht linearen Regression entsprechend einer Michaelis-Menten-Funktion. Mittelwerte sind mit SEM angegeben. n = 9, N = 9

In Abb. 13 ist die Korrelation zwischen nitratsensitiver Acetataufnahme und steigenden Acetatkonzentrationen dargestellt. Der nitratsensitive Anteil der Acetataufnahme beinhaltet einen bikarbonatabhängigen und einen bikarbonatunabhängigen Anteil der Acetataufnahme. Diese beiden Anteile der Acetataufnahme könnten durch zwei verschiedene Transportproteine vermittelt werden. Deswegen wurde überprüft, ob sowohl der bikarbonatabhängige als auch der bikarbonatunabhängige Anteil der Acetataufnahme einer nicht linearen Regression in Form einer Michaelis-Menten-Kinetik folgen. Dabei zeigte sich, dass die Differenzen der Acetatuptakes bei mukosal 1,1 mM Bikarbonat und bei mukosal 0 mM Bikarbonat (bikarbonatabhängige Acetataufnahme) bzw. bei mukosal 0 mM Bikarbonat und bei mukosal 0 mM Bikarbonat + 60 mM Nitrat (bikarbonatunabhängige Acetataufnahme) auch jeweils einer Michaelis-Menten-Kinetik folgten (Tabelle 7). Der U_{max}-Wert der bikarbonatabhängigen Acetataufnahme war tendenziell größer als der U_{max}-Wert der bikarbonatunabhängigen Acetataufnahme (p = 0,084), es konnten aber weder für die U_{max}- noch für die K_m-Werte signifikante Unterschiede festgestellt werden.

Tabelle 7: U_{max} - und K_m -Werte der bikarbonatabhängigen und der bikarbonat-unabhängigen Acetataufnahme

	U_{max} (in $\text{nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	K_m (in mM)
<i>Bikarbonatabhängige Acetataufnahme</i>	$23,8 \pm 8,0$	$67,1 \pm 35,2$
<i>Bikarbonatunabhängige Acetataufnahme</i>	$8,6 \pm 1,1$	$14,9 \pm 5,2$

Die Ergebnisse dieser Versuchsserie zeigten, dass die Acetataufnahme auch bei hohen Acetatkonzentrationen bikarbonatabhängig ist und eine über die Bikarbonatabhängigkeit hinausgehende Nitratsensitivität, also einen bikarbonatunabhängigen Anteil besitzt. Die in Abb. 13 dargestellte Korrelation zwischen nitratsensitiver Acetataufnahme und steigenden Acetatkonzentrationen stellt eine Mischkinetik bestehend aus einem bikarbonatabhängigen und einem bikarbonatunabhängigen Anteil dar.

4.1.5 Einfluss verschiedener Hemmstoffe auf die apikale Acetataufnahme

Die vorherigen Untersuchungen weisen darauf hin, dass neben einem bikarbonatabhängigen auch ein bikarbonatunabhängiger, nitrat- und nifluminsäuresensitiver Mechanismus an der apikalen Acetataufnahme beteiligt ist. Dieser bikarbonatunabhängige Mechanismus wird vermutlich nicht durch den postulierten Anionenaustauscher repräsentiert (Kap. 2.2.3). Im Folgenden wurde die mukosale Applikation verschiedener Hemmstoffe untersucht, um den bikarbonatunabhängigen Acetattransport näher einzugrenzen. Dabei handelt es sich um Antagonisten, die zur Hemmung von Anionenleitfähigkeiten eingesetzt werden (Nifluminsäure, Nitrat, NPPB, DIDS, Flufenaminsäure, Glibenclamid und Tamoxifen). Allerdings gilt es zu beachten, dass die Hemmstoffe teilweise auch einen Effekt auf bestimmte Austauschsysteme haben (Nifluminsäure, Nitrat, Tenidap, NPPB und DIDS). Die Studien erfolgten bei Acetatkonzentrationen von 0,5 bzw. 10 mM in An- bzw. Abwesenheit von Bikarbonat. In den Abbildungen ist Tenidap getrennt von den anderen Hemmstoffen dargestellt, da die Tenidap-Untersuchungen in einer anderen Versuchsreihe erfolgten.

Einfluss verschiedener Hemmstoffe in einer HCO_3^- -gepufferten Lösung

Bei 0,5 mM Acetat führten sowohl Nifluminsäure als auch NPPB zu einer signifikanten Hemmung der Aufnahme um $0,68 \pm 0,20 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bzw. $0,32 \pm 0,18 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Abb. 14A; $p < 0,05$). Glibenclamid (Abb. 14A) sowie Tenidap (Abb. 14B) hemmten die Acetataufnahme nicht. Bei 10 mM Acetat führte nur noch Nifluminsäure mit einer Reduktion um $6,48 \pm 1,69 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ zu einer signifikanten Hemmung der Acetataufnahme (Abb. 14C; $p < 0,05$), während NPPB, Glibenclamid (Abb. 14C) und Tenidap (Abb. 14D) keine Reduktion der Aufnahme bewirkten.

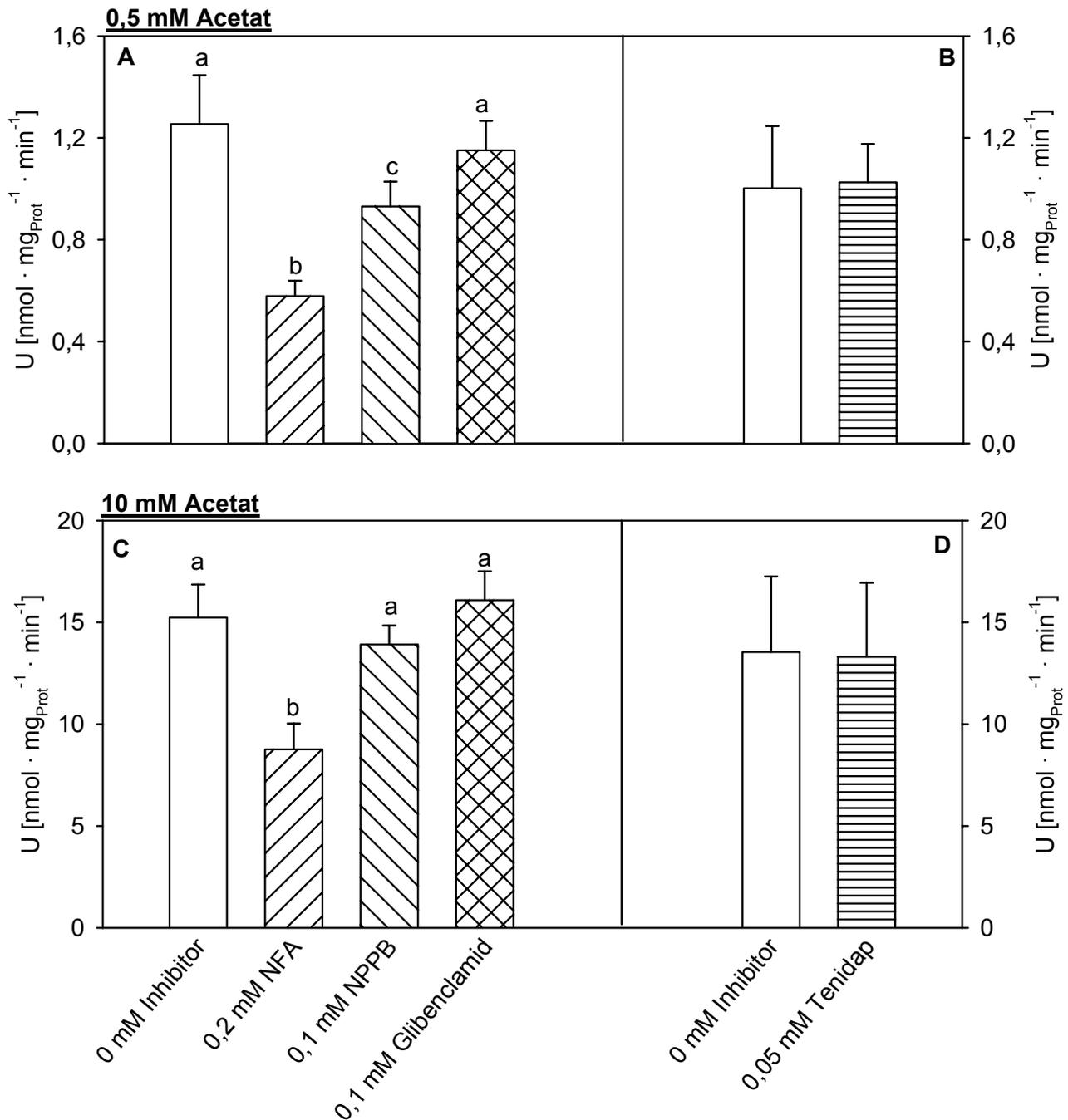


Abb. 14: Einfluss verschiedener Hemmstoffe auf die apikale Acetataufnahme in Anwesenheit von HCO_3^-

Nach mukosaler Zugabe der genannten Hemmstoffe wurde die Aufnahme (U) von Acetat bei einer Konzentration von (A, B) 0,5 mM Acetat bzw. (C, D) 10 mM Acetat gemessen. Die Untersuchung erfolgte in HCO_3^- -gepufferter, Cl^- -freier Lösung mit pH_m 6,1 und pH_s 7,4. Mittelwerte sind mit SEM abgebildet. Verschiedene Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb eines Graphen ($p < 0,05$). (A, C) $n = 9$, $N = 7$; (B, D) $n = 3$, $N = 3$

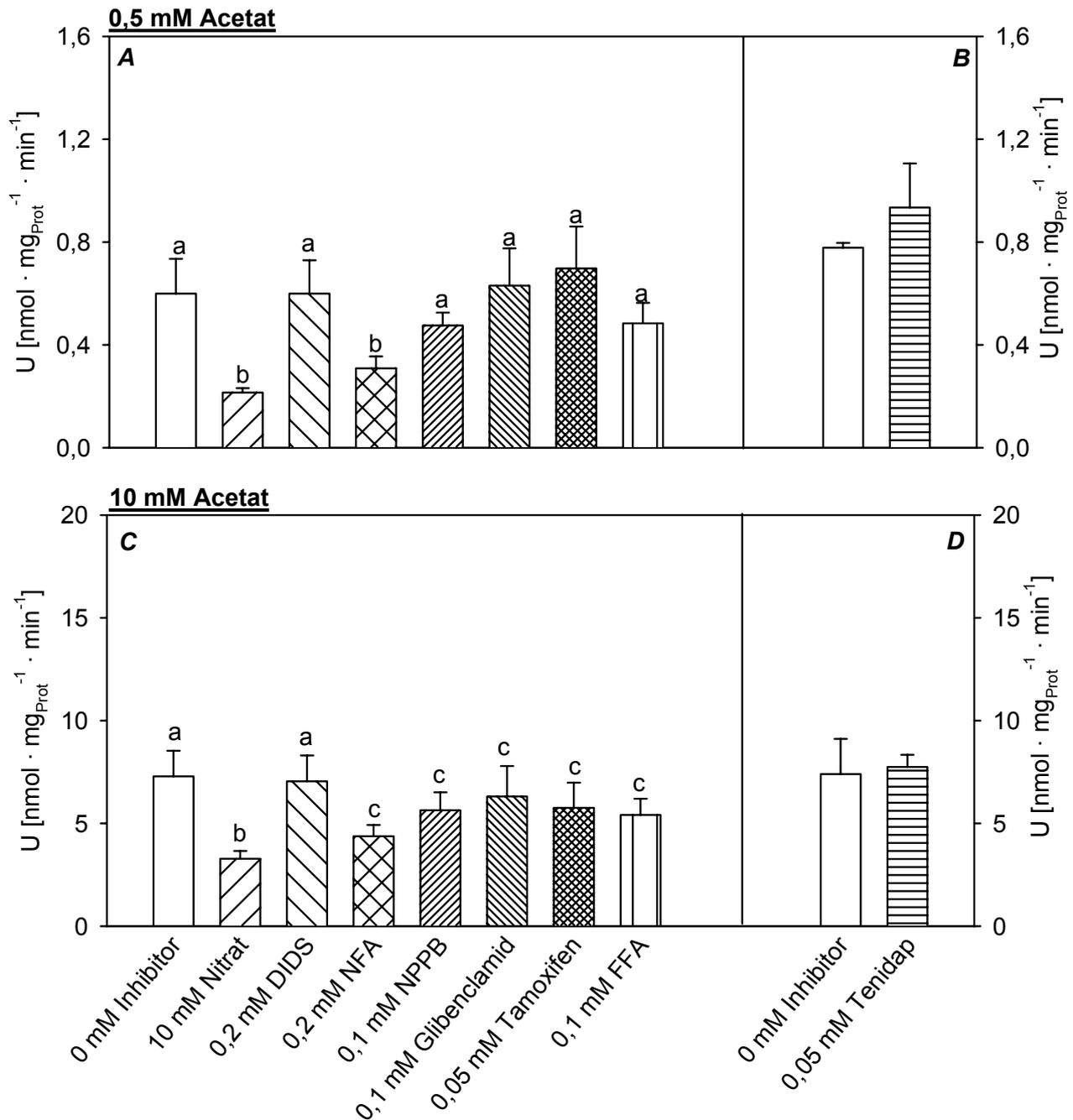


Abb. 15: Einfluss verschiedener Hemmstoffe auf die apikale Acetataufnahme in Abwesenheit von HCO_3^-

Nach mukosaler Zugabe der Hemmstoffe wurde die Aufnahme (U) von Acetat bei einer Konzentration von (A, B) 0,5 mM Acetat bzw. (C, D) 10 mM Acetat erfasst. Die Untersuchung erfolgte in HEPES-gepufferter, Cl^- -freier Lösung mit pH_m 6,1 und pH_s 7,4. Mittelwerte sind mit SEM abgebildet. Verschiedene Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb eines Graphen ($p < 0,05$). (A, C) $n = 10$, $N = 10$; (B, D) $n = 3$, $N = 3$

Einfluss verschiedener Hemmstoffe in einer HEPES-gepufferten Lösung

Bei 0,5 mM Acetat und gleichzeitiger Abwesenheit von Bikarbonat führten in HEPES-gepufferten Lösung nur Nitrat und Nifluminsäure zu einer signifikanten Hemmung der Acetataufnahme um $0,39 \pm 0,14 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bzw. $0,29 \pm 0,10 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Abb. 15A; $p < 0,05$). DIDS, Nifluminsäure, NPPB, Glibenclamid, Tamoxifen, Flufenaminsäure (Abb. 15A) sowie Tenidap (Abb. 15B) hemmten die Acetataufnahme nicht.

Bei 10 mM Acetat wurde die Aufnahme durch Nitrat (um $4,01 \pm 1,11 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), NFA (um $2,92 \pm 0,89 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), NPPB (um $1,65 \pm 0,53 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), Glibenclamid (um $0,98 \pm 0,76 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), Tamoxifen (um $1,54 \pm 1,13 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) und Flufenaminsäure (um $1,88 \pm 0,69 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) signifikant gehemmt (Abb. 15C; $p < 0,05$), während DIDS (Abb. 15C) und Tenidap (Abb. 15D) keine Reduktion der Aufnahme bewirkten.

Die Versuchsserie zeigte, dass neben Nitrat und Nifluminsäure zumindest in HEPES-gepufferten Lösung auch Hemmstoffe von Anionenleitfähigkeiten (NPPB, Glibenclamid, Tamoxifen und Flufenaminsäure) einen Einfluss auf die apikale Acetataufnahme hatten.

Kombinierte Hemmstoffwirkung in HCO_3^- -gepufferten Lösung

In den vorausgegangenen Versuchsserien wurden die Effekte verschiedener Hemmstoffe auf die apikale Acetataufnahme einzeln getestet. Im Folgenden sollte nun überprüft werden, ob die Hemmeffekte der effizientesten Inhibitoren, Nitrat und Nifluminsäure, additiv sind. Wie Abb. 16A zeigt kam es durch kombinierte Applikation von Nifluminsäure und Nitrat zu einer vergleichbaren Hemmung der Acetataufnahme wie bei alleiniger Nitratzugabe. Eine additive Wirkung blieb aus.

Zusätzlich sollte überprüft werden, ob DIDS gegebenenfalls eine additive Wirkung zu Nitrat hatte. Damit sollte untersucht werden, ob durch Vorinkubation mit Nitrat ein gegebenenfalls vorhandener, aber bisher nicht darstellbarer (Abb. 5) DIDS-Effekt demaskiert werden könnte. Wie Abb. 16B zeigt, führte die alleinige Zugabe von DIDS nicht zu einer signifikanten Hemmung der Acetataufnahme. Des Weiteren konnte DIDS auch die durch Nitrat gehemmte Acetataufnahme nicht weiter vermindern (Abb. 16B).

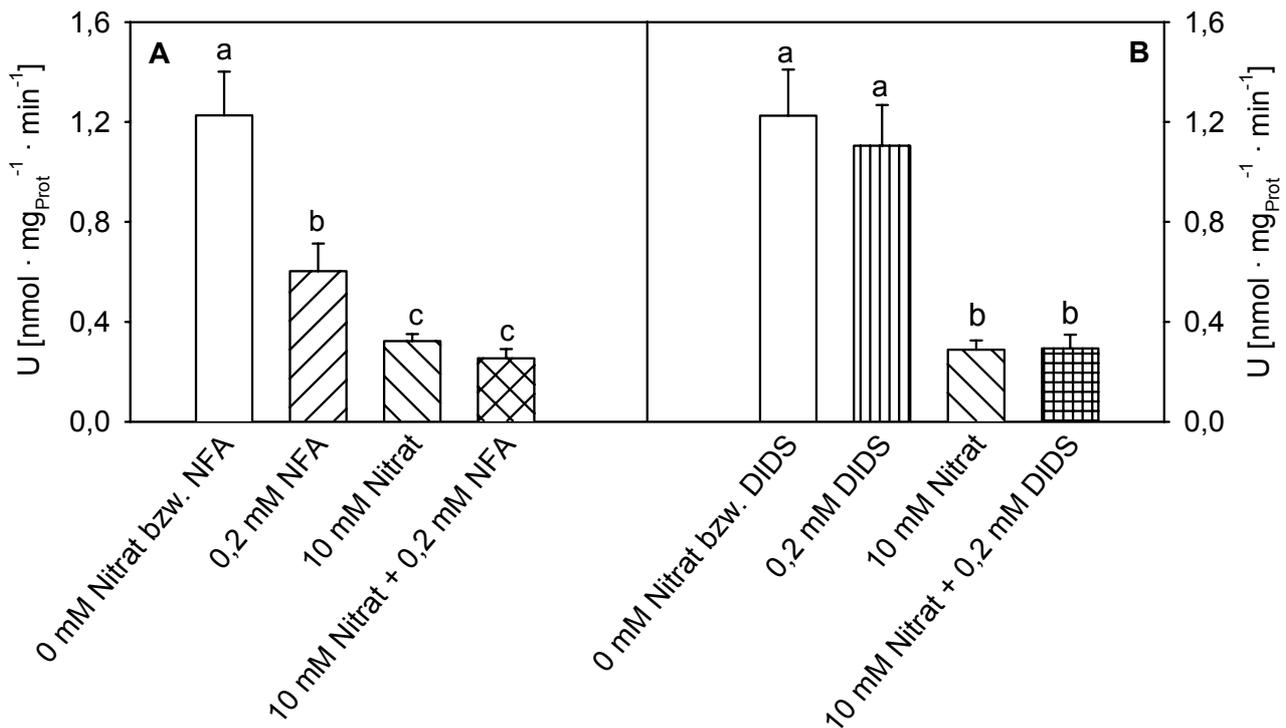


Abb. 16: **Additive Hemmeffekte einer mukosalen Zugabe von (A) NFA und NO₃⁻ bzw. (B) DIDS und NO₃⁻ auf die apikale Acetataufnahme**

Dargestellt sind die Aufnahme (U) von Acetat bei einer Konzentration von 0,5 mM Acetat in Mittelwerten mit SEM in HCO₃⁻-gepufferter Lösung. Die Cl⁻-freie Lösung wies einen pH_m von 6,1 und eine pH_s von 7,4 auf. Verschiedene Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb eines Graphen ($p < 0,05$). (A) $n = 10$, $N = 5$; (B) $n = 10$, $N = 6$

4.1.6 Wirkung von Phloretin und pCMBS auf die apikale Acetataufnahme

Ein MCT könnte theoretisch an einer bikarbonatunabhängigen proteinvermittelten Aufnahme von SCFA beteiligt sein. Um der apikalen Beteiligung eines MCT nachzugehen, wurde die Acetataufnahme in dieser Versuchsserie in der Anwesenheit der MCT-Hemmstoffe Phloretin und pCMBS erfasst. Weder Phloretin noch pCMBS konnten die Aufnahme von 10 mM Acetat in einer HEPES-gepufferten Lösung hemmen (Abb. 17). Beide Hemmstoffe führten vielmehr nominal zu einer Erhöhung der Acetataufnahme. Die Acetataufnahme war nach pCMBS-Applikation tendenziell größer als in den Kontrollepitelien ($p = 0,09$).

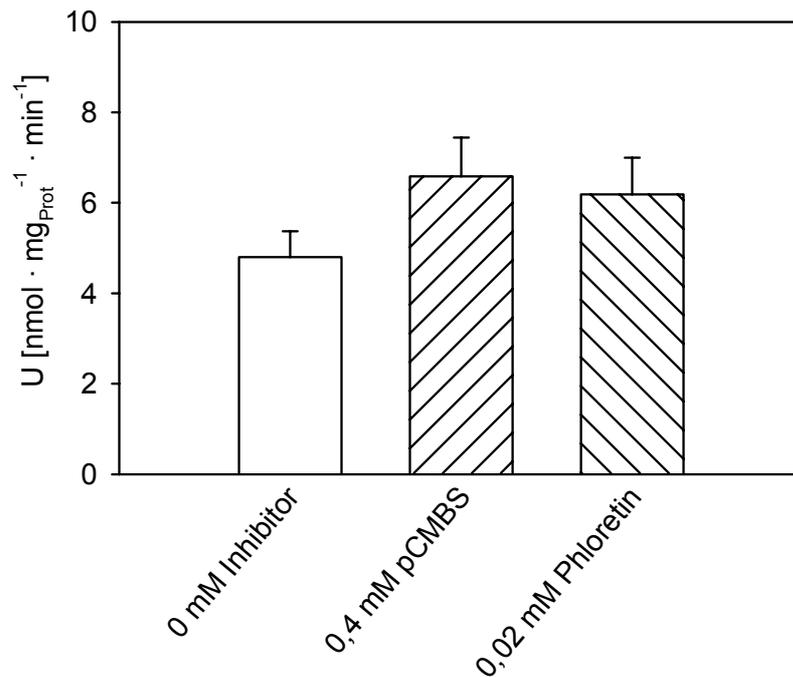


Abb. 17: **Effekt von pCMBS und Phloretin auf die apikale Acetataufnahme**
 Dargestellt ist die Aufnahme (U) von 10 mM Acetat nach mukosaler Zugabe von 0,4 mM pCMBS bzw. 0,02 mM Phloretin. Die Untersuchung erfolgte in einer Cl⁻-freien HEPES-gepufferten Lösung, die mukosal 16 mM Na⁺ und kein K⁺ enthielt, sowie einen pH_m von 6,1 aufwies. Der serosale Puffer war ebenfalls Cl⁻-frei und enthielt 107 mM Na⁺, 5,5 mM K⁺ und wies einen pH_s von 7,4 auf. Mittelwerte sind mit SEM abgebildet. n = 10, N = 5

Insgesamt zeigte die Versuchserie, dass ein apikaler, Phloretin- sowie pCMBS-sensitiver MCT zumindest in einem bikarbonatunabhängigen Modus im Pansenepithel des Schafes bei der Acetataufnahme keine große Rolle zu spielen scheint.

4.1.7 Einfluss von Acetat und Nitrat auf Kurzschlussstrom und Gewebeleitfähigkeit

In den vorausgegangenen Versuchsserien konnten zwei Feststellungen gemacht werden:

1. Ein Teil der apikalen Acetataufnahme war bikarbonatunabhängig aber nitratsensitiv (Kap. 4.1.4: Abb. 12).
2. Die apikale Acetataufnahme konnte mit Anionenkanalblockern in HEPES-gepufferten Lösung (Kap. 4.1.5: Abb. 15) gehemmt werden.

Die Beteiligung einer Anionenleitfähigkeit an der Acetataufnahme wäre eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse. Daher sollte in den folgenden Experimenten versucht werden, entsprechende Acetatströme über den Kurzschlussstrom (I_{sc}) und Acetatileitfähigkeiten über die transepitheliale Gewebeleitfähigkeit (G_t) zu erfassen. Die mukosale Lösung wies einen pH-Wert von 6,1 auf, war Na⁺-reduziert ([Na⁺]: 16 mM), HEPES-gepuffert und entweder K⁺-frei oder K⁺-reich ([K⁺]: 100 mM).

Die kaliumreiche Lösung führt über eine Depolarisation der apikalen Membran zu einer erhöhten elektrischen Triebkraft für einen Anionenstrom in die Zelle.

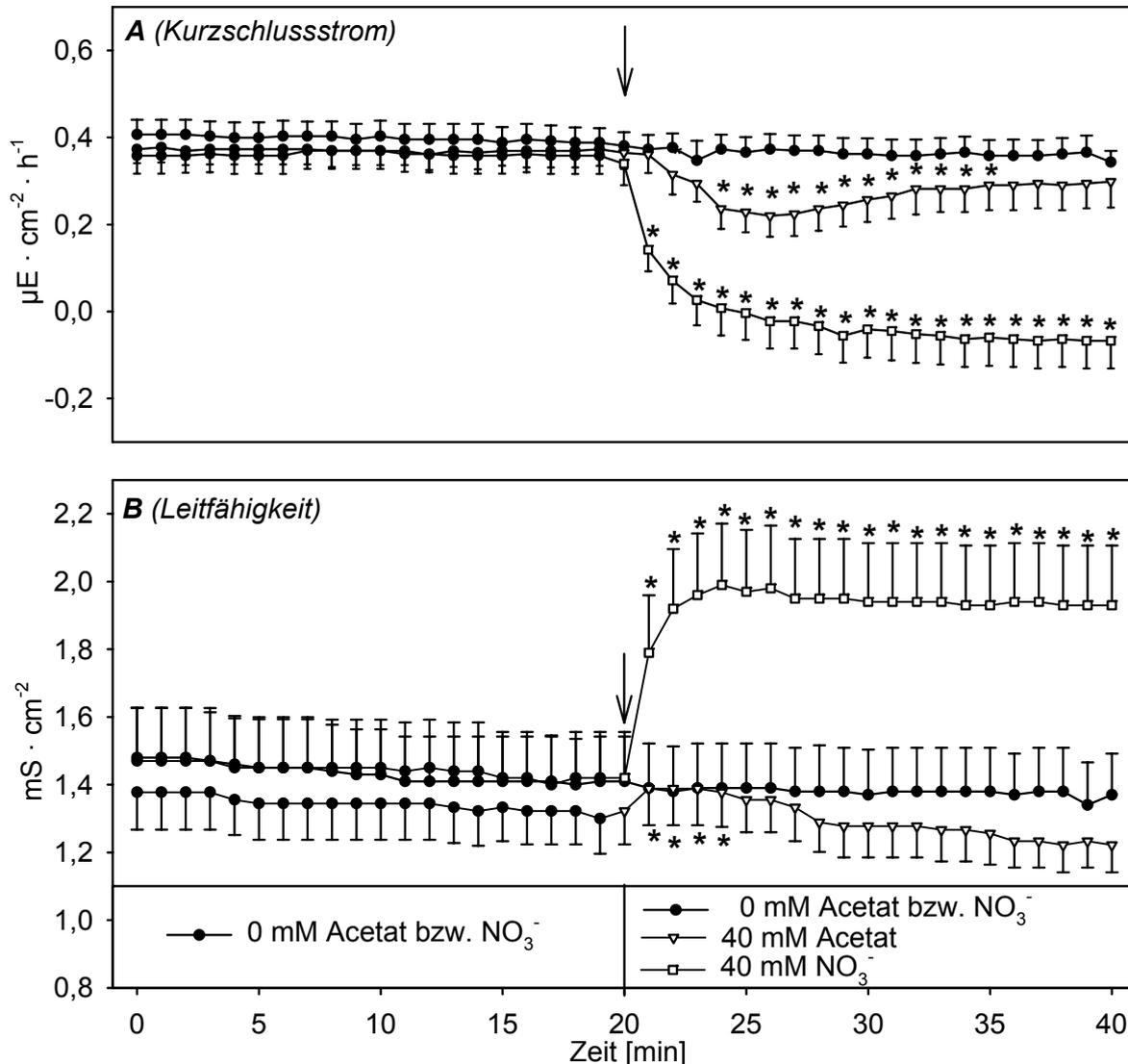


Abb. 18: Einfluss einer mukosalen Erhöhung der [Acetat] bzw. [NO₃⁻] auf (A) den I_{sc} bzw. (B) die G_t bei mukosaler Abwesenheit von K⁺. Der Pfeil markiert die Einstellung der mukosalen [Acetat] bzw. [NO₃⁻] auf 40 mM. Der mukosale Puffer wies eine [Na⁺] von 16 mM, eine [K⁺] von 0 mM und einen pH-Wert von 6,1 auf. Der serosale Puffer enthielt 110 mM Na⁺ und 5,5 mM K⁺, der pH-Wert betrug 7,4. Beide Lösungen waren HEPES-gepuffert und Cl⁻-frei. Mittelwerte sind mit SEM angegeben. Signifikante Unterschiede innerhalb des jeweiligen Kurvenverlaufs sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$). $n = 10$, $N = 5$

Wie Abb. 18 zeigte, führte die Einstellung der mukosalen Acetatkonzentration auf 40 mM zu einem Abfall des Kurzschlussstromes (Abb. 18A). Hieran schloss sich eine partielle Gegenregulation in Richtung Ausgangswert an. Die Erhöhung der mukosalen Nitratkonzentration von 0 auf 40 mM führte ebenfalls zu einem Abfall des Kurzschlussstromes ($p < 0,05$). Der nitratinduzierte Abfall war stärker als der durch Acetat ausgelöste ($p < 0,05$). Zudem erfolgte nach Nitratgabe keine Gegenregulation. Die G_t stieg beim Wechsel zur acetathaltigen (40 mM) wie auch zur nitrathaltigen Pufferlösung (40 mM) signifikant an (Abb. 18B; $p < 0,05$). Nitrat führte zu einem signifikant

stärkeren Anstieg ohne darauf folgende Gegenregulation, während unter Acetateinfluss eine Gegenregulation der G_t auftrat ($p < 0,05$).

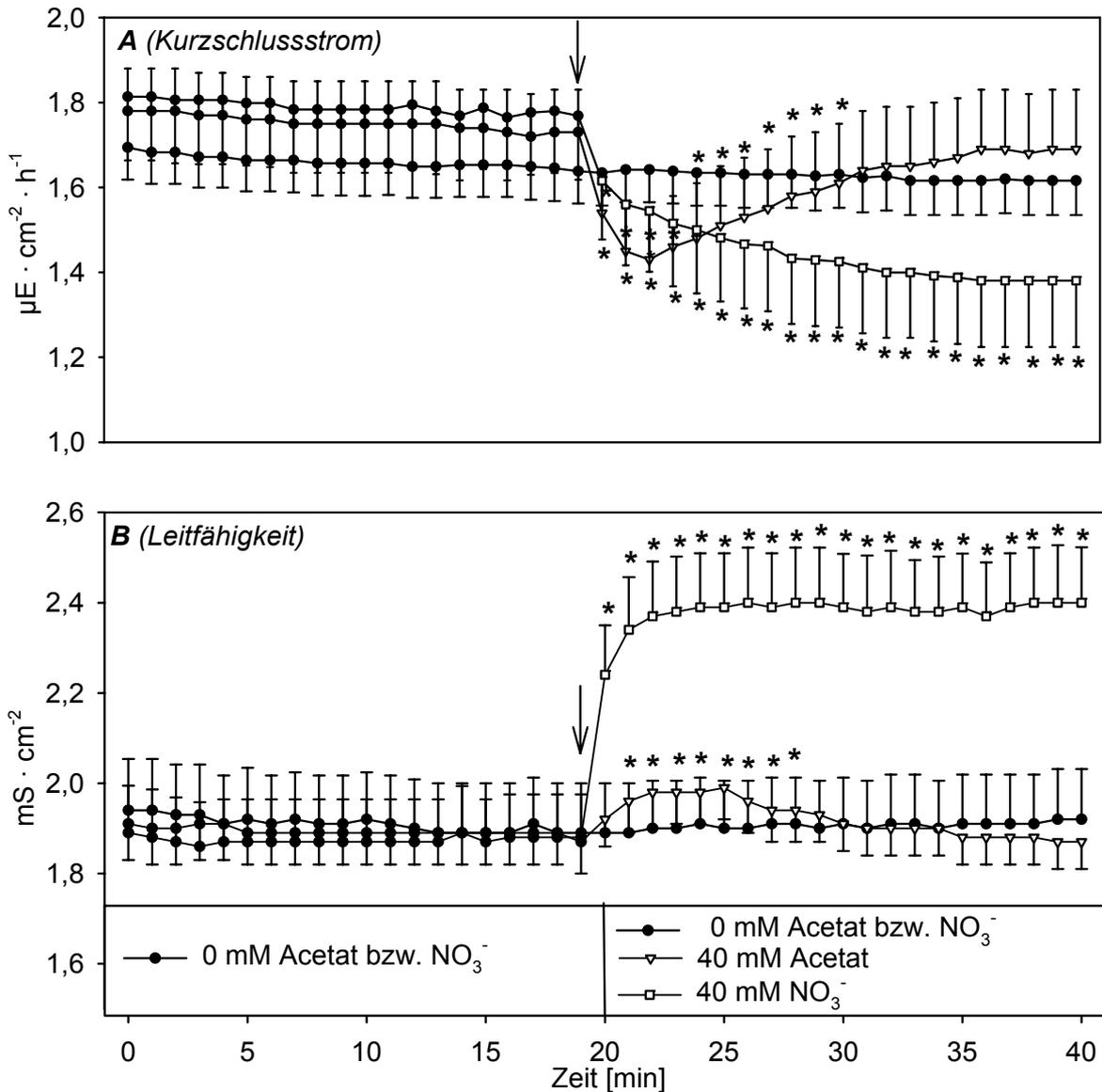


Abb. 19: Einfluss einer mukosalen Erhöhung der [Acetat] bzw. [NO₃⁻] auf (A) den I_{sc} bzw. (B) die G_t bei mukosal erhöhter [K⁺]

Mit dem Pfeil ist die Erhöhung der mukosalen [Acetat] bzw. [NO₃⁻] von 0 auf 40 mM gekennzeichnet. Die mukosale bzw. serosale Lösung enthielt 16 bzw. 110 mM Na⁺, 100 bzw. 5,5 mM K⁺ und wies einen pH-Wert von 6,1 bzw. 7,4 auf. Beide Lösungen waren HEPES-gepuffert und Cl⁻-frei. Mittelwerte sind mit SEM angegeben. Signifikante Unterschiede innerhalb des jeweiligen Kurvenverlaufs sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$). $n = 10$, $N = 5$

Abb. 19A zeigt die acetat- bzw. nitratinduzierten Veränderungen bei erhöhter, mukosaler Kaliumkonzentration. Zunächst konnte festgestellt werden, dass die Basalwerte des Kurzschlussstromes und der Gewebeleitfähigkeit in K⁺-reicher Lösung signifikant höher waren als die Basalwerte in K⁺-freier Lösung (Vgl. Abb. 18 und Abb. 19; $p < 0,05$).

In der K^+ -reichen Lösung erfolgte wie auch in der K^+ -freien Lösung ein signifikanter, transients Abfall des Kurzschlussstromes nach Einstellung einer mukosalen Acetatkonzentration von 40 mM (Abb. 19A; $p < 0,05$). 40 mM Nitrat führten in K^+ -reicher, HEPES-gepufferter Lösung ebenfalls zu einem Abfall des Kurzschlussstromes auf den keine Gegenregulation folgte. Die Gewebeleitfähigkeit stieg bei Erhöhung der Acetat- bzw. Nitratkonzentration von 0 auf 40 mM signifikant an (Abb. 19B; $p < 0,05$). Nitrat führte auch in K^+ -reicher, HEPES-gepufferter Lösung zu einem signifikant stärkeren Anstieg der G_t ohne darauf folgende Gegenregulation, während unter Acetateinfluss eine Gegenregulation der G_t auftrat ($p < 0,05$).

Im Anschluss an die Aufzeichnung der elektrophysiologischen Parameter (Vgl. Abb. 18 und Abb. 19) wurden dieselben Epithelien zusätzlich für Aufnahmestudien verwendet. Es wurde die apikale Aufnahme von 10 mM Acetat in die unbehandelten sowie die mit Nitrat inkubierten Epithelien gemessen (Abb. 20). Dies erfolgte vergleichend in der K^+ -freien und der K^+ -reichen Pufferlösung. Wie Abb. 20 zeigt, war die Acetataufnahme bei den mit 40 mM Nitrat behandelten Epithelien in K^+ -freier Lösung um $1,54 \pm 0,44 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und in K^+ -reicher Lösung um $3,24 \pm 0,85 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ signifikant gehemmt (Abb. 20A; $p < 0,05$). Der nitratsensitive Anteil der Acetataufnahme war in K^+ -reichem Puffer absolut größer als in K^+ -freier Lösung (Abb. 20B; $p < 0,05$).

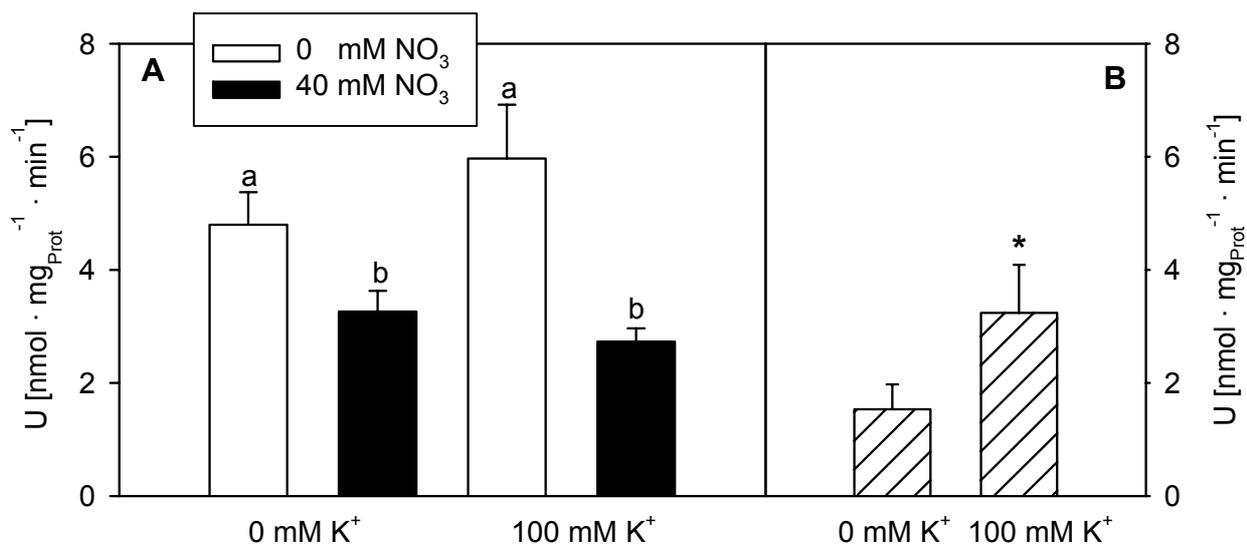


Abb. 20: Einfluss der mukosalen $[K^+]$ auf die apikale Acetataufnahme

Dargestellt sind Mittelwerte der Aufnahme (U) von Acetat (Konzentration 10 mM) in Epithelien, die mukosal K^+ -freier bzw. K^+ -reicher Lösung exponiert wurden. A zeigt die absolute Aufnahme unter den verschiedenen Versuchsbedingungen, B gibt die Differenz der Acetataufnahme zwischen den unbehandelten und den mit NO_3^- präinkubierten Epithelien in K^+ -freier bzw. K^+ -reicher Lösung wieder. Verschiedene Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb von A ($p < 0,05$). In B werden signifikante Unterschiede durch * markiert ($p < 0,05$). $n = 10$, $N = 5$

4.2 Untersuchung bikarbonattransportierender Mechanismen an primärkultivierten Pansenepithelzellen

Sowohl beim Austausch von Acetat (pK 4,8) gegen Bikarbonat (pK 6,1) als auch bei der Diffusion der undissoziierten Säure von Acetat in die Zelle sind Beeinflussungen des intrazellulären pH-Wertes (pH_i) zu erwarten. Eine indirekte Charakterisierung des Acetateinstromes müsste somit über den intrazellulären pH-Wert kultivierter Pansenepithelzellen möglich sein. Bevor jedoch die Effekte von Bikarbonat, Nitrat und Nifluminsäure auf die acetatbedingten pH_i -Veränderungen untersucht wurden (Kap.4.3), wurde zunächst eine Validierung des Zellkulturmodells (Kap. 4.2.1) und eine Charakterisierung des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers durchgeführt (Kap. 4.2.2).

4.2.1 Validierung der Pansenepithelzellkultur

MÜLLER et al. (2000) konnten zeigen, dass der Wechsel von einer ammoniumchloridhaltigen, HEPES-gepufferten Lösung in eine ammoniumchloridfreie, HEPES-gepufferte Lösung eine starke Ansäuerung des pH_i auslöst. Auf diese Ansäuerung folgte eine pH_i -Gegenregulation über den NHE, der mit EIPA (Hemmstoff des NHE1) gehemmt werden konnte. Nach Wechsel aus einer HEPES-gepufferten in eine HCO_3^- -gepufferte Lösung erfolgte bei MÜLLER et al. (2000) ebenfalls eine Ansäuerung, deren Gegenregulation jedoch weitgehend EIPA-insensitiv war. Zur Abklärung der funktionellen Integrität der hier verwendeten Pansenepithelzellkultur wurden entsprechend die Effekte eines $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -Präpuls, einer intrazellulären Ansäuerung mit CO_2 sowie von EIPA auf diese Ansäuerungen untersucht.

Nach Überführung der Zellen aus einer HEPES-gepufferten in eine HEPES-gepufferte, 20 mM $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -haltige Lösung kam es zu einem sprunghaften, signifikanten Anstieg des pH_i um $0,55 \pm 0,07$ Einheiten (Abb. 21A; $p < 0,05$). Die anschließende Rückführung in die $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -freie Ausgangslösung führte zu einer signifikanten cytoplasmatischen Ansäuerung um $0,69 \pm 0,09$ Einheiten (Abb. 21A; $p < 0,05$) mit nachfolgender pH_i -Gegenregulation ($\Delta\text{pH}_i/300\text{sec}$: $0,47 \pm 0,05$) (Abb. 21A). Die pH_i -Gegenregulation nach intrazellulärer Azidifizierung war in Gegenwart von 10 μM EIPA signifikant verringert ($\Delta\text{pH}_i/300\text{sec}$: $0,12 \pm 0,04$) (Abb. 21A; $p < 0,05$). Der Wechsel der kultivierten Zellen aus einer HEPES-gepufferten in eine HCO_3^- -gepufferte Lösung führte ebenfalls zu einer intrazellulären Ansäuerung (um $0,37 \pm 0,02$ Einheiten; $p < 0,05$) gefolgt von einer pH_i -Gegenregulation in Richtung Ausgangs- pH_i ($\Delta\text{pH}_i/300\text{sec}$: $0,24 \pm 0,02$; $p < 0,05$). Die pH_i -Gegenregulation in HCO_3^- -gepufferter Lösung konnte ebenfalls mit EIPA signifikant gehemmt werden ($\Delta\text{pH}_i/300\text{sec}$: $0,03 \pm 0,03$) ($p < 0,05$).

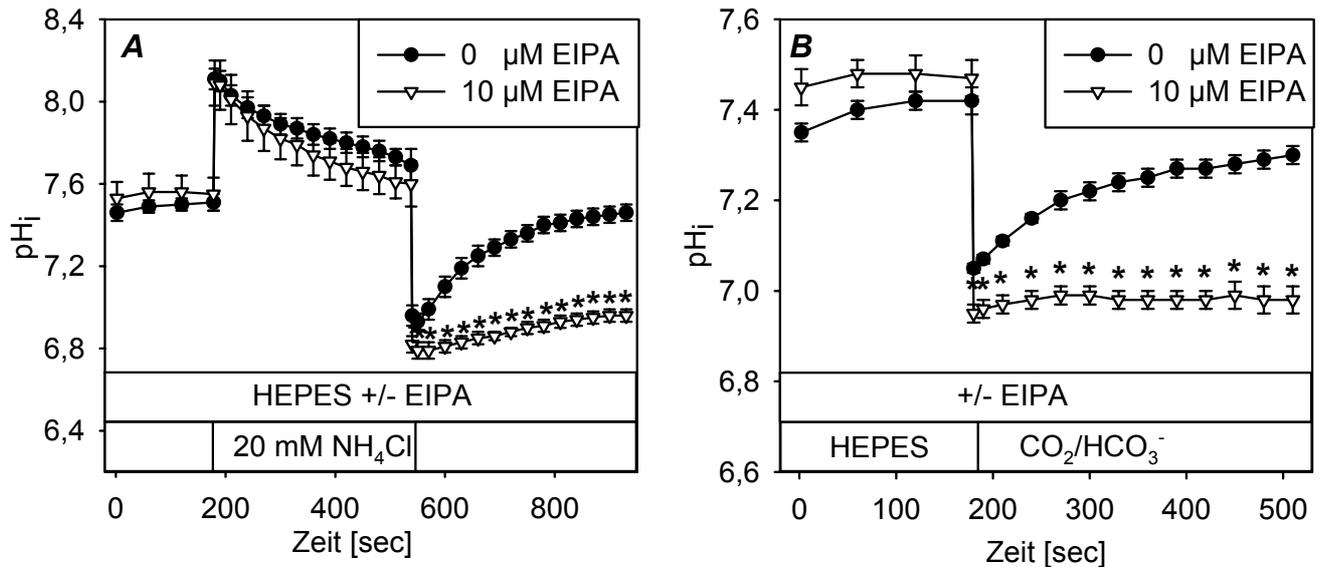


Abb. 21: *Einfluss von EIPA auf die pH_i-Gegenregulation nach intrazellulärer Ansäuerung mittels (A) NH₄⁺/NH₃-Präpuls in HEPES-gepufferter Lösung bzw. (B) Wechsel aus einer HCO₃⁻-haltigen in eine HEPES-gepufferte Lösung*

Alle Lösungen waren auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die Ammoniumchloridlösung enthielt 20 mM NH₄Cl. EIPA wurde in einer Konzentration von 10 μM zugegeben. Mittelwerte sind mit SEM aufgeführt. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Kontrolle und EIPA sind mit * angezeigt. 0 μM EIPA: (A) $n = 10$, $N = 6$, (B) $n = 15$, $N = 9$; 10 μM EIPA: (A) $n = 12$, $N = 7$, (B) $n = 8$, $N = 6$

Insgesamt zeigten die kultivierten Pansenepithelzellen dieser Studie somit ein ähnliches Verhalten wie schon MÜLLER et al. (2000) nachweisen konnten. Allerdings konnte die pH_i-Gegenregulation nicht nur in HEPES-gepufferter Lösung sondern auch in Anwesenheit von Bikarbonat fast vollständig mit EIPA gehemmt werden. In den hier kultivierten Zellen scheint ein pH_i-regulativer, alkalisierender, bikarbonatabhängiger Mechanismus, wie ihn MÜLLER et al. (2000) beschreiben, keine bedeutende Rolle zu spielen.

4.2.2 Untersuchung der Kopplung zwischen Bikarbonat- und Chloridtransport

Die Ergebnisse des Kapitels 4.1.1 legten nahe, dass sich Chlorid und Acetat an einem nifluminsäuresensitiven Anionen/HCO₃⁻-Austauscher evtl. kompetitiv verhalten. Zur Untersuchung der Kopplung zwischen Bikarbonat- und Chloridtransport wurden die Zellen in den hier beschriebenen Versuchen abwechselnd in Cl⁻-haltige und Cl⁻-freie Lösung verbracht, die jeweils auch Bikarbonat enthielten. Bei Vorhandensein eines Anionen/HCO₃⁻-Austauschers wäre zu erwarten, dass es nach dem Wechsel in die Cl⁻-freie Lösung aufgrund eines von intra- nach extrazellulär gerichteten Chloridgradienten zu einem Einstrom von Bikarbonat und damit zu einem Anstieg des intrazellulären pH-Wertes kommt.

Der pH_i in der Cl⁻-haltigen Ausgangslösung betrug in der Kontrollgruppe $7,32 \pm 0,02$. Nach Wechsel von Cl⁻-haltiger in Cl⁻-freie Lösung kam es zu einem signifikanten Anstieg des cyto-

plasmatischen pH-Wertes um $0,24 \pm 0,03$ Einheiten (Abb. 22; $p < 0,05$). Bei der Rückführung der Zellen in Cl^- -haltige Lösung erfolgte ein signifikantes Absinken des pH-Wertes um $0,23 \pm 0,02$ Einheiten (Abb. 22; $p < 0,05$). Durch die Exposition gegenüber Nifluminsäure ergab sich zunächst eine signifikante Absenkung des Ausgangs-pH_i (auf $7,11 \pm 0,02$) (Abb. 22; $p < 0,05$). Nifluminsäure führte sowohl zu einer signifikanten Hemmung der cytoplasmatischen Alkalisierung bei dem Wechsel in die Cl^- -freier Lösung (Anstieg um $0,09 \pm 0,02$ Einheiten) als auch zu einer signifikanten Reduktion des pH-Abfalls beim Wechsel zurück in die Cl^- -haltige Lösung (Abfall um $0,09 \pm 0,01$ Einheiten) (Abb. 22; $p < 0,05$).

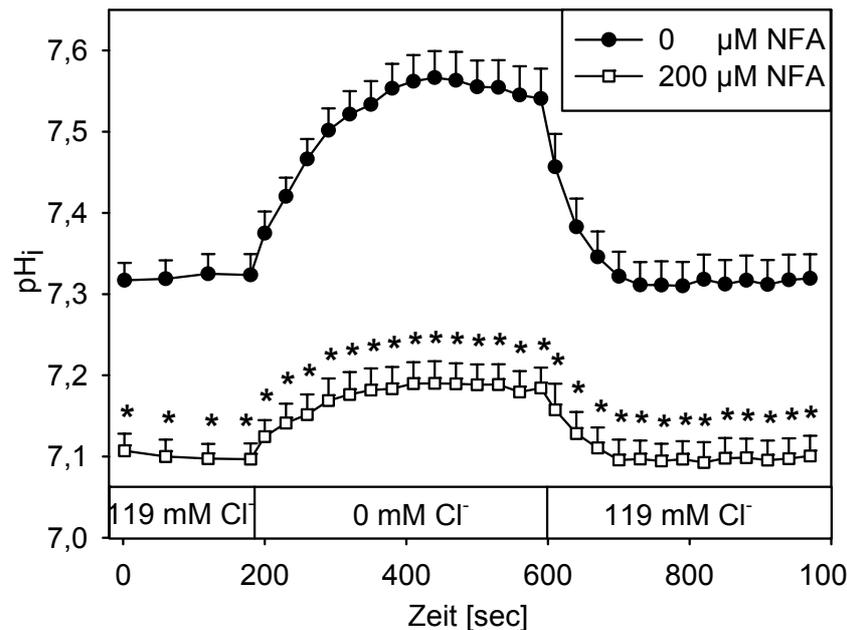


Abb. 22: *pH_i-Verlauf bei Wechsel von Cl⁻-haltiger in Cl⁻-freie, HCO₃⁻-gepufferte Lösung mit bzw. ohne NFA*

*Die [Cl⁻] betrug 119 bzw. 0 mM. Beide Lösungen wiesen einen pH-Wert von 7,4 und eine [HCO₃⁻] von 22,5 mM auf. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM. Signifikante Unterschiede zwischen 0 und 200 μM NFA sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$). Kontrolle: $n = 10$, $N = 3$; NFA: $n = 7$, $N = 4$*

Die Ergebnisse dieses Kapitels zeigten, dass eine Chloridsubstitution in Anwesenheit von Bikarbonat zu einem deutlichen Anstieg des intrazellulären pH-Wertes führt. Dieser Anstieg war reversibel und durch Nifluminsäure hemmbar. Die chloridinduzierten pH_i-Veränderungen sind somit Hinweise auf die Existenz eines Anionen/HCO₃⁻-Austauscher, selbst wenn der Nifluminsäureeffekt aufgrund einer generellen Absenkung des Ausgangs-pH_i mit Vorsicht zu betrachten ist.

4.3 Wirkung von Acetat auf den pH_i kultivierter Pansenepithelzellen

4.3.1 Fettsäurebedingte, intrazelluläre Ansäuerung in An- und Abwesenheit von Chlorid

Die Ergebnisse in Kap. 4.2.2 wiesen darauf hin, dass über einen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher der intrazelluläre pH-Wert moduliert wird. Nun sollte untersucht werden, inwieweit auch Acetat über

einen solchen Anionenaustauscher den pH_i -Wert beeinflusst. Diese Untersuchungen wurden sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Bikarbonat durchgeführt. Bei Einsatz der HEPES-gepufferten Lösung wurde zusätzlich die intrazelluläre Bikarbonatbildung durch Ethoxazolamid gehemmt.

Die Ausgangs- pH_i -Werte waren in HCO_3^- -gepuffert und in HEPES-gepuffert Lösung signifikant verschieden (Abb. 23; $p < 0,05$). Applikation von 20 mM Acetat führte in Cl^- -haltiger Lösung in Anwesenheit von 22,5 mM Bikarbonat zu einer Ansäuerung gefolgt von einer pH_i -Gegenregulation (Abb. 23; $p < 0,05$). Auf den darauf folgenden Wechsel in eine Cl^- -freie und acetatfreie, HCO_3^- -gepufferte Lösung reagierten die Zellen mit einer Alkalisierung (Abb. 23; $p < 0,05$). Wurde nun in eine Cl^- -freie aber acetathaltige Lösung gewechselt, so erfolgte in Anwesenheit von Bikarbonat eine Ansäuerung der Zellen mit nur gering ausgeprägter pH_i -Gegenregulation (Abb. 23). In Abwesenheit von Bikarbonat verlief die Kurve zum Teil unterschiedlich verglichen mit der HCO_3^- -gepufferten Lösung. Die auf den Wechsel in eine Cl^- -freie und acetatfreie, HEPES-gepufferte Lösung folgende Alkalisierung und die darauf folgende Gegenregulation waren signifikant stärker als in HCO_3^- -gepuffert Lösung (Abb. 23; $p < 0,05$). Wurde nun in eine Cl^- -freie aber acetathaltige Lösung gewechselt, so kam es in Abwesenheit von Bikarbonat zu einer Ansäuerung der Zellen, auf die eine signifikant stärkere pH_i -Gegenregulation folgte als in HCO_3^- -gepuffert Lösung (Abb. 23; $p < 0,05$).

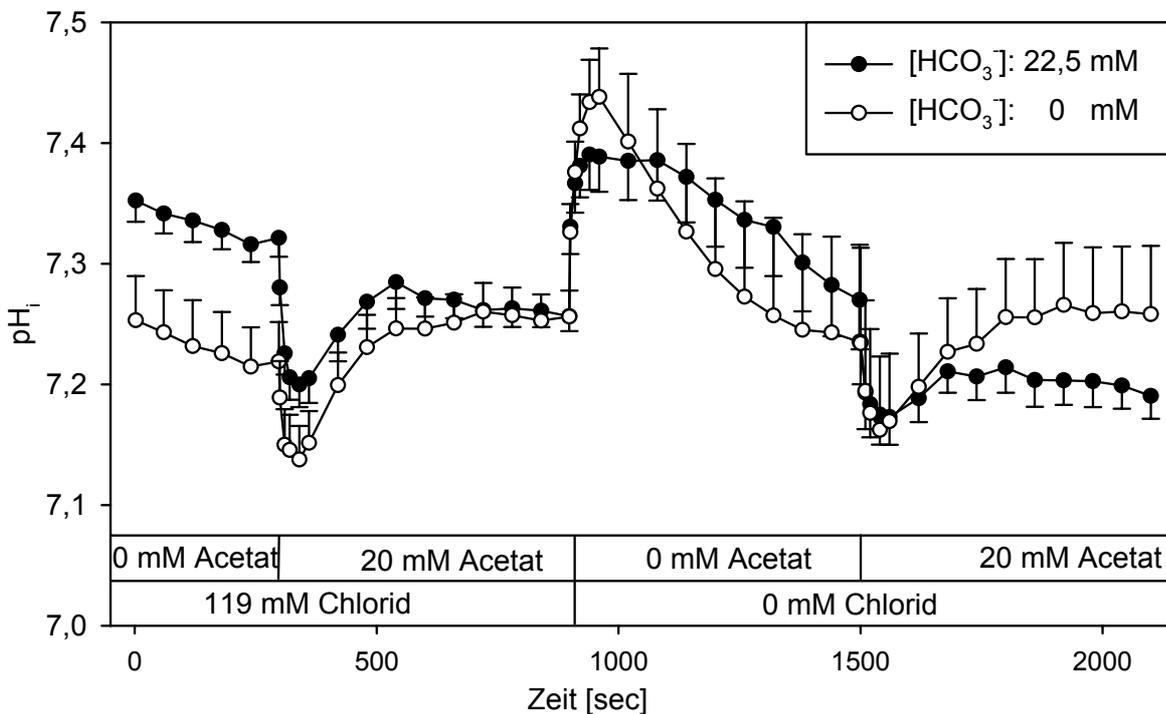


Abb. 23: *Einfluss von 20 mM Acetat auf den pH_i bei An- oder Abwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ und / oder Cl^-*

Dargestellt sind die Auswirkungen der Zugabe bzw. des Entfernens von 20 mM Acetat vergleichend in einer Lösung mit einer $[\text{HCO}_3^-]$ von 22,5 mM und einer HEPES-gepufferten Lösung. Die HCO_3^- -gepufferte und auch die HEPES-gepufferte Lösung enthielten dabei während der ersten 900 sec 119 mM Cl^- , in den folgenden 1200 sec 0 mM Cl^- . Mittelwerte sind mit SEM gekennzeichnet. $n = 16$, $N = 8$

Die Ergebnisse zeigten insgesamt, dass Acetatzugabe bzw. -entzug sowohl in HCO_3^- -gepufferter als auch in HEPES-gepufferter Lösung zu Auslenkungen des pH_i führten. Die Gegenregulationen auf eine acetatbedingte, intrazelluläre Ansäuerung fielen in HCO_3^- -gepuffertem Medium schwächer aus. Auch bei Acetatentzug war sowohl die Alkalisierung als auch die darauf folgende Gegenregulation in Anwesenheit von 22,5 mM Bikarbonat geringer als in Abwesenheit von Bikarbonat.

4.3.2 Hemmbarkeit der fettsäurebedingten, intrazellulären Ansäuerung durch Nitrat und Nifluminsäure

Im Rahmen der unter Kapitel 4.1.2, 4.1.3.2 und 4.1.3.3 beschriebenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sowohl Nitrat- als auch Nifluminsäureapplikation die Acetataufnahme signifikant hemmten. Analog dazu wurde die Hemmbarkeit der fettsäurebedingten, intrazellulären Ansäuerung durch Nitrat und Nifluminsäure sowohl in HCO_3^- -gepufferter, wie auch HEPES-gepufferter Lösung untersucht. Der Puffer enthielt kein Chlorid um die Konkurrenz von Chlorid und Acetat an einem Anionen/ HCO_3^- -Austauscher zu vermeiden.

Die Ausgangs- pH_i -Werte waren in HCO_3^- -gepufferter und in HEPES-gepufferter Lösung signifikant voneinander verschieden. Die Zugabe von 10 mM Acetat führte in HCO_3^- -gepufferter Lösung in Abwesenheit von Nitrat bzw. Nifluminsäure zu einem geringen pH_i -Abfall gefolgt von einer pH_i -Gegenregulation, wobei sowohl der pH_i -Abfall als auch die Gegenregulation sich statistisch nicht von Null unterschieden (Abb. 24A). Nach Acetatentzug erfolgten in HCO_3^- -gepufferter Lösung eine signifikante Alkalisierung und eine signifikante Gegenregulation auf diese Alkalisierung (Abb. 24A; $p < 0,05$). Eine zweite Zugabe von 10 mM Acetat in HCO_3^- -gepufferter Lösung führte zu einem nicht signifikanten pH_i -Abfall mit darauf folgender, nicht signifikanter pH_i -Gegenregulation (Abb. 24A). In HEPES-gepufferter Lösung stellte sich das gleiche Bild auf einem niedrigeren pH -Niveau dar (Abb. 24A). Abb. 24B stellt die Effekte von 10 mM Nitrat dar. Dabei wurden die Zellen während der ersten 900 sec mit zusätzlich 10 mM Nitrat inkubiert. In den restlichen 1200 sec erhielten sie die gleiche Behandlung wie die Kontrollzellen (Abb. 24A). Als einziger Unterschied zu den Kontrollzellen zeigte sich in Anwesenheit von Bikarbonat eine signifikant geringere pH_i -Gegenregulation nach Überführung in nitrat- und acetatfreie Lösung ($t = 900$ sec) (Vgl. Abb. 24A und Abb. 24B; $p < 0,05$). In Abwesenheit von Bikarbonat war dieser Unterschied zu den Kontrollzellen nicht festzustellen (Vgl. Abb. 24A und Abb. 24B). Abb. 24C stellt die Effekte von 0,2 mM Nifluminsäure dar. Die Nifluminsäureinkubation erfolgte zeitlich wie die Nitratinkubation in Abb. 24B. Unter Einfluss von Nifluminsäure war wie auch schon in den Versuchen zur Chloridabhängigkeit (Kap. 4.2.2) der Ausgangs- pH_i signifikant um 0,24 bzw. 0,33 Einheiten (in HCO_3^- -gepufferter bzw. HEPES-gepufferter Lösung) gegenüber den unbehandelten Zellen erniedrigt (Abb. 24C; $p < 0,05$). Nach Entfernen von sowohl Nifluminsäure als auch Acetat zum Zeitpunkt $t = 900$ sec kam es zu einem signifikanten Anstieg des pH_i in HCO_3^- -gepufferter bzw. HEPES-gepufferter Lösung, ohne dass sich eine pH_i -Gegenregulation anschloss (Abb. 24C).

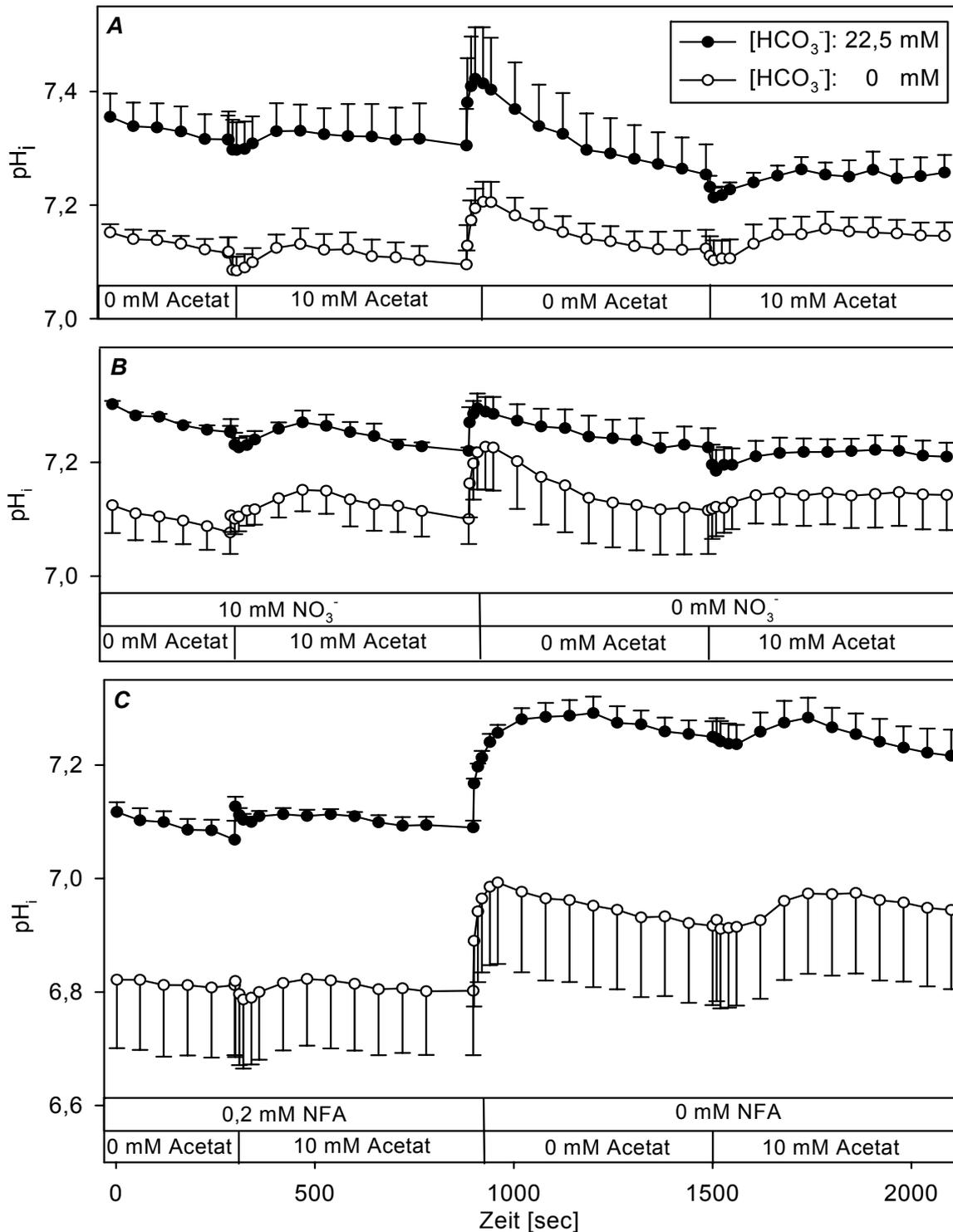


Abb. 24: **Einfluss von 10 mM NO₃⁻ bzw. 0,2 mM NFA auf acetatbedingte Veränderungen des pHi**
 Die Abbildung zeigt den Effekt von (B) 10 mM NO₃⁻ bzw. (C) 0,2 mM NFA auf die acetatbedingten Veränderungen des pHi gegenüber den (A) unbehandelten Zellen. Die Acetatkonzentration betrug dabei 10 mM. Die Untersuchungen erfolgten sowohl in An- als auch in Abwesenheit von HCO₃⁻. Alle Lösungen waren frei von Cl⁻. Mittelwerte sind mit SEM gekennzeichnet. (A) n = 4, N = 3, (B/C) n = 5, N = 3

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Auslenkungen des intrazellulären pH-Wertes bei Zugabe von 10 mM Acetat in dieser Versuchsserie nur minimal waren. Die pH_i -Anstiege nach Acetatentzug waren dabei deutlicher ausgeprägt als die pH_i -Abfälle nach Acetatzugabe. Es wurde ein Unterschied zwischen HCO_3^- -gepufferter und HEPES-gepufferter Lösung deutlich: Nach vorheriger Nitratinkubation war der pH_i -Anstieg nach Acetatentzug in HCO_3^- -gepufferter Lösung tendenziell, die pH_i -Gegenregulation signifikant niedriger als in den unbehandelten Zellen, während derartige Unterschiede in der HEPES-gepufferten Lösung fehlten. Über den Einfluss von Nifluminsäure auf acetatbedingte Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes kann im Rahmen dieser Versuche kaum eine Aussage getroffen werden, da Nifluminsäure einen sehr ausgeprägten Eigeneffekt auf den intrazellulären pH-Wert hatte.

4.4 Immunzytochemische Untersuchungen

Mit Hilfe der Immunzytochemie wurde der epitheliale Charakter der kultivierten Zellen überprüft. Hierzu wurde ein Pancytokeratin-Antikörper als Epithel-spezifischer Marker (FUCHS 1988) eingesetzt. Desweiteren wurde ein Fibronectin Antikörper (Nachweis von Zellen mesenchymalen Ursprungs) und ein Zonula-occludens-Protein1-Antikörper (Nachweis differenzierter Epithelzellen) verwendet. Gebundene Cytokeratin- und ZO-1-Antikörper wurden mit einem orange-fluoreszierenden Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Gebundene Antikörper gegen Fibronectin wurden hingegen mit einem grün-fluoreszierenden Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper visualisiert. Zu jeder Färbung wurde eine Kontrolle angefertigt, in der kein Primärantikörper sondern nur ein Sekundärantikörper appliziert wurde. Die Kontrollen wiesen dabei keine Fluoreszenz auf.

Abb. 25 stellt die Färbung der kultivierten Pansenepithelzellen mit einem Pancytokeratin-Antikörper dar. Dabei zeigten sich kräftig gefärbte, fädige Strukturen wie in Abb. 25 zu erkennen ist. Ganz deutlich sind die im Geflecht der Cytokeratinfasern liegenden, mit DAPI markierten Zellkerne zu sehen. Abb. 26 stellt die Färbung gegen Fibronectin sowie auch die Anfärbung mit einem Zonula-occludens-Protein1 Antikörper dar. Die Färbung gegen Fibronectin wurde eingesetzt, um den Anteil an mesenchymalen Zellen zu bestimmen. Dabei zeigten die gefärbten Zellkulturen einen grünlichen Schimmer und einzelne, spindelförmige, grünlich fluoreszierende Strukturen (Abb. 26). Der Anteil an Fibronectin-positiven Zellen lag in den Pansenepithelzellkulturen bei maximal 5% (Abb. 26). Die Anfärbung mit dem ZO1-Antikörper zeigte eine spezifische Fluoreszenz im Bereich der Zellgrenzen, die sich als orange-fluoreszierende, netzartige Strukturen darstellten (Abb. 26).

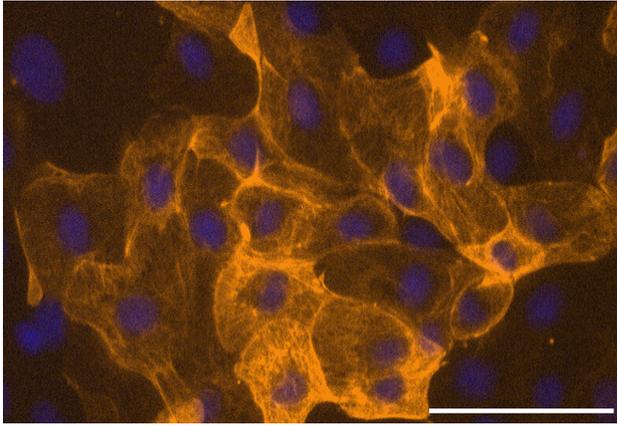


Abb. 25: Immunzytochemischer Pancytokeratinnachweis in den primär-kultivierten Pansenepithelzellen

Es wurde ein Pancytokeratinantikörper verwendet. Cytokeratin-positive Bereiche stellten sich orange dar. Die Zellen wurden zusätzlich mit DAPI markiert, um Nukleinsäuren (Zellkerne) darzustellen (blau). Die Balkenlänge entspricht 100 μM .

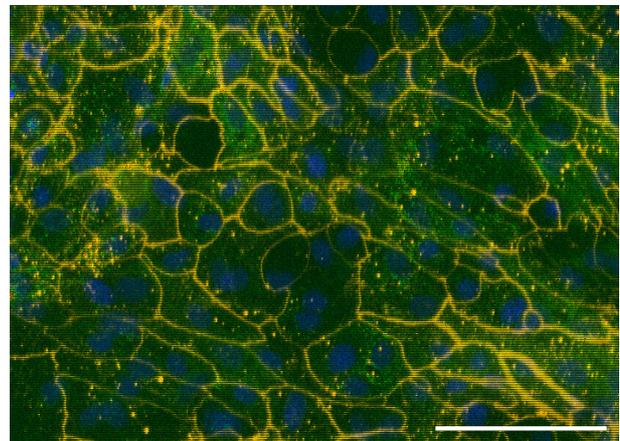
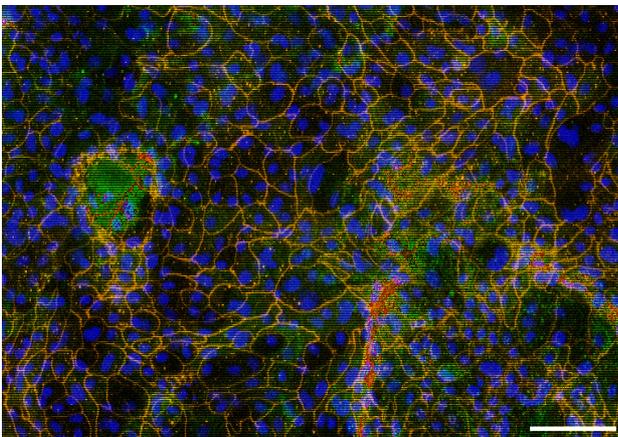


Abb. 26: Doppelinkubation primärkultivierter Pansenepithelzellen mit einem polyklonalen Fibronektin- und einem monoklonalen ZO1-Antikörper

Dargestellt ist eine Doppelinkubation gegen sowohl Fibronektin (grün) als auch ZO1 (orange). Die Zellen wurden zusätzlich mit DAPI markiert, um Nukleinsäuren (Zellkerne) darzustellen (blau). Die Balkenlänge entspricht 100 μM .

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die hier primärkultivierten Zellen eindeutig epithelialer Herkunft und nur zu einem geringen Grad von Zellen anderen Typs durchsetzt waren. Diese geringfügige Kontamination sollte die Versuche weitgehend unbeeinflusst lassen.

4.5 Molekularbiologische Untersuchungen

Im Rahmen der molekularbiologischen Untersuchungen sollte das Pansenepithel auf das Vorhandensein möglicher SCFA-transportierender Proteine untersucht werden. Von Interesse waren hier neben den möglichen SCFA/HCO₃⁻-Austauschern DRA und PAT1 auch Strukturen, die eine Leitfähigkeit für Acetat aufweisen könnten (CFTR, CIC). Außerdem sollte die Existenz von SMCT-Proteinen abgeklärt werden, die eine bikarbonatunabhängige Aufnahme von Acetat vermitteln könnten (Kap. 2.2.5.4).

Alle beschriebenen Analysen wurden sowohl mit mRNA aus den kultivierten Pansenepithelzellen als auch mit mRNA direkt aus dem Pansenepithel durchgeführt. Des Weiteren wurde bei jeder RT-PCR die verwendete Poly(A)⁺-RNA auf mögliche DNA-Kontaminationen getestet, indem anstelle des cDNA-Templates eine äquivalente Menge nicht revers-transkribierter Poly(A)⁺-RNA in der PCR eingesetzt wurde (Negativkontrolle). Die dargestellten Teilsequenzen sind ohne Primersequenzen angegeben. Die Zyklenzahlen wurden in den Legenden mit Zy abgekürzt.

4.5.1 Nachweis eines DRA

Um eine DRA-kodierende mRNA sowohl in den kultivierten Pansenepithelzellen als auch direkt im Pansenepithel nachzuweisen, wurde jeweils eine RT-PCR mit entsprechender cDNA durchgeführt. Da bisher keine Sequenz eines ovinen DRA bekannt war, wurde das eingesetzte PCR-Primerpaar vom humanen DRA abgeleitet (Tabelle 5; GenBank Accession Number NM 000111). Das erhaltene PCR-Produkt hatte mit 475 bp die erwartete Größe und zeigte nach Sequenzanalyse eine Homologie von > 80% zu den DRA-Sequenzen von Mensch, Maus und Ratte (GenBank Accession Number NM000111, NM021353 und AF337809) (Abb. 28). Aus der so erhaltenen Schaf-spezifischen DRA-Sequenz wurde nun ein chimäres Primerpaar generiert. Dabei entstammte der vorwärtsgerichtete Primer aus der ermittelten Schaf-spezifischen DRA-Sequenz. Der rückwärtsgerichtete Primer lag mit seinen 20 Nukleotiden innerhalb des 24 Nukleotide umfassenden, zuvor aus der humanen Sequenz abgeleiteten, rückwärtsgerichteten Primers. Eine mit dem chimären Primerpaar durchgeführte RT-PCR lieferte eine Bande der erwarteten Größe von 253 bp im Pansenepithel (Abb. 27). Auch in den kultivierten Pansenepithelzellen ließ sich der DRA auf mRNA-Ebene nachweisen. Der Nachweis gelang allerdings nicht bei 35 Zyklen, sondern erst bei 43 Zyklen (nicht abgebildet). Die Sequenz der amplifizierten Fragmente aus Pansenepithel und kultivierten Zellen entsprach zu 100% dem entsprechenden Abschnitt des zuvor mit Human-spezifischen Primern amplifizierten Fragments (Abb. 28). Die Nukleotid-Sequenz des 253 bp großen, ruminalen PCR-Produktes wies einen Homologiegrad von 88,7% zu dem humanen DRA (GenBank Accession Number NM000111), von 78,8% zu einer DRA-Sequenz aus der Maus (NM021353) und von 81,6% zu einer DRA-Sequenz aus der Ratte (AF337809) auf.

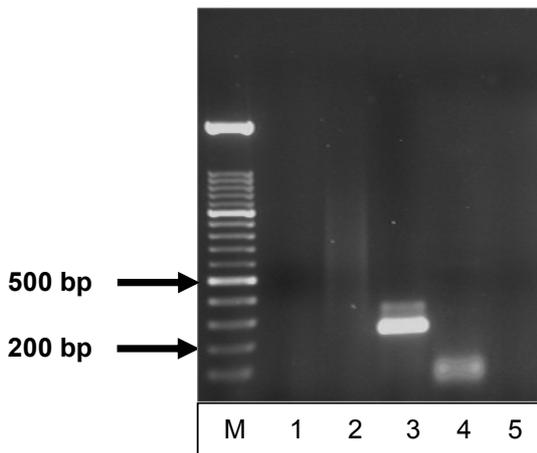


Abb. 27: Analytische Gelelektrophorese der RT-PCR mit DRA-spezifischen Primern

Spur 1 bzw. 2: Produkt bzw. Negativkontrolle: kultivierte PEZ (35 Zy)

Spur 3 bzw. 4: Produkt bzw. Negativkontrolle: Pansenepithel (35 Zy)

Spur 5: Reagenzienkontrolle (mit H₂O statt Template) (35 Zy)

M: 100 Basenpaar-Leiter

1	GCAACATCTA	TAAGAATAGA	AAAGATTATT	CTGAAATATA
41	TGAACCAGAA	GCCGTGAAGA	TTTTCAGATG	CCCATCTCCT
81	ATCTACTTTG	CAAACATTAG	TTTCTTTAAG	CAGAAACTTA
121	TTGATGCTAT	TGGCTTTCGT	CCACTTCGAA	TTCTTCGCAA
161	GCGCAACAAG	GCTTTGAAGA	AAATCCGAAA	AATGCAGAAG
201	AAAGGCCTGC	TACAAGTAAC	ACCAAAGGA	TTTATATGTA
241	CTGTTGATGG	CTTTAAAGAT	TCTGATGAAG	AGCTGGACAA
281	TGATAAGATT	GAAGAGCTGG	ATCAGCCCAT	CAATACCACA
321	GACCTGCCTT	TCCAAATAGA	CTGGAATGCT	AATCTTCCTC
361	TCAACATTGT	GGTCCCTAAA	ATCAACCTCC	ACAGCCTCAT
401	TCTTGACTTT	TCAGCAGTGT	CATTTCTT	

Abb. 28: Teilsequenz des ruminalen DRA (ohne Primersequenzen)

Die fettgedruckten Buchstaben repräsentieren die Teilsequenz des in Abb. 27 dargestellten PCR-Fragmentes.

4.5.2 Nachweis eines PAT1

Zum Nachweis einer PAT1-kodierenden mRNA in den Zellen und dem Pansenepithel wurde entsprechend dem Vorgehen bei der Charakterisierung des DRA zunächst ein spezifisches Primerpaar aus der veröffentlichten Sequenz des humanen PAT1 (NM022911) abgeleitet. Nach der Amplifikation zeigten sich neben einer Bande in erwarteter Größe (675 bp) weitere Banden. Die Bande, die die erwartete Größe aufwies, wurde ausgeschnitten und zeigte nach Sequenzierung eine Homologie von > 75% zu den PAT1-Sequenzen von Schwein, Mensch und Maus (NM001012298, NM022911 und NM134420). Anschließend wurde ein weiteres Primerpaar generiert wobei der vorwärtsgerichtete Primer aus dem Schaf-spezifischen Teil, der rückwärtsgerichtete Primer aus der humanen PAT1-Sequenz erstellt wurde. Die mit diesen chimären Primern durchgeführte RT-PCR ergab eine Bande der Größe 391 bp, was aufgrund der eingesetzten Primer den Erwartungen entsprach (Abb. 29). Die Nukleotid-Sequenz der ruminalen PCR-Produkte wies einen Homologiegrad von 87,2% zu der PAT1-Sequenz des Schweines (NM001012298), von 87,2% zu dem humanen PAT1 (NM022911) sowie von 81,2% zu einer PAT1-Sequenz aus der Maus (NM134420) auf.

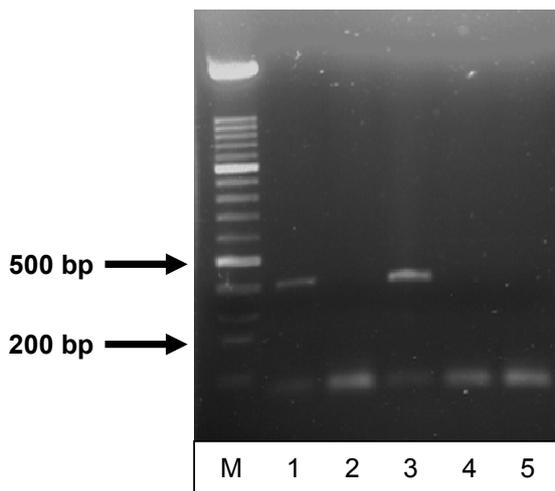


Abb. 29: Analytische Gelelektrophorese der RT-PCR mit PAT1-spezifischen Primern

Spur 1 bzw. 2: Produkt bzw. Negativkontrolle: Pansenepithel (27 Zy)

Spur 3 bzw. 4: Produkt bzw. Negativkontrolle: kultivierte PEZ (27 Zy)

Spur 5: Reagenzienkontrolle (mit H₂O statt Template) (27 Zy)

M: 100 Basenpaar-Leiter

1	GCTTCTGGGT	GACTTGTTGT	CTGGCCTGAG	TGTGGCCATT
41	ATGCAGCTAC	CACAGGGCCT	GGCCTATGCC	CTCCTGGCTG
81	GACTGCCCCC	CGTGTATGGC	CTCTACAGCT	CCTTCTATCC
121	TGTCTTTGTT	TATTTCTGT	TTGGCACTTC	CCGGCACATC
161	TCTGTGGGCA	CCTTTGCCGT	CATGTCCGTG	ATGGTGGGCA
201	GTGTGATGGA	ATCGCTGGCT	CCGGACGACG	CCTTCCTGCT
241	GGGCTTGAAC	TCCACAGTCA	ACGTGACAGC	CCGGGACGAC
281	ACCCGGGTGC	AGCTGGCCTC	CACTCTCAGT	GTCCTCGTGG
321	GCCTCTTCCA	GGTGGGACTG	GGCATGGTCC	ACTTCGGCTT
361	CGTGGTCACC	TACCTATCAG	AGCCTCTGGT	CCGAGCCTAC
401	ACCACGGCCG	CGTCTGTGCA	CGTGTTTATC	TCGCAACTCA
441	AGTATGTGTT	TGGCCTCCAT	CTAAGCAGCC	GCTCTGGACC
481	GCTGTCCCTC	ATCTATACAG	TACTGGAGGT	CTGCTGGAAG
521	CTGCCCCAGA	CGGTGGTCGG	TACCGTGATC	ACTGCCATCG
561	TGGCGGGAGT	GGTGCTCGTG	CTGGTGAAGC	TGCTGAATGA
601	AAAGCTACGG	CGACATCTGC	CCATGCCACT	CCCCGGGGAG
641	CTGCTCACGC	TCATCGGGGC	CACAGGCATC	TCCTACGGCG
681	TGGGCCTGCA	GCAGGCATTT	GGGGTGGACA	TCGTGGGCAA
721	AATCCCCGCA	GGGCTGGTGC	CCCCGAAGGC	CCCCACCCA
761	CAGCTGTTT	CAAAGCTTCT	GGGCAATGCC	TTCGCCATCG
801	CTGTGGTCCG	GTTTCGCCAT	GCCATCTCGC	TGGGCAAGAT
841	CTTCGCCTTG	AGGCACGGCT	ACCGGGTGTA	CAGCAACCAG
881	GAGCTGGTGG	CTCTCGGCCT	CAGTAACCTC	CTTGGGGGCA
921	TCTTCCAGTG	CTTCCCCTGT	GAGCTGCTCT	ATGTCTCGGA
961	GCCTGGTGCA	G		

Abb. 30: Teilsequenz des ruminalen PAT1 (ohne Primersequenzen)

Die fettgedruckten Buchstaben repräsentieren die Teilsequenz des in Abb. 29 dargestellten PCR-Fragmentes.

4.5.3 Nachweis eines CFTR

Um CFTR-kodierende mRNA nachzuweisen, wurde aus der veröffentlichten Sequenz des ovinen CFTR (NM001009781) ein spezifisches Primerpaar abgeleitet. Die mit diesen Primern durchgeführte RT-PCR ergab sowohl im Pansenepithel als auch in den kultivierten Epithelzellen mit 455 bp eine Bande der erwarteten Größe (Abb. 31). Die Nukleotid-Sequenzen aus Pansenepithel und kultivierten Epithelzellen waren untereinander sowie auch mit der publizierten, ovinen CFTR-Sequenz (NM001009781) zu 100% identisch. Das ermittelte PCR-Fragment umfasste inklusive der Primersequenzen die Basen 2747 – 3202 der publizierten Sequenz. Ein

Speziesvergleich ergab einen Homologiegrad von 96,7% zu einer bovinen CFTR-Sequenz (NM174018), von 88,0% sowohl zu dem humanen CFTR (NM000492) als auch zu dem porcinen CFTR (AY585334) und von 81,0% zu dem murinen CFTR (NM021050).

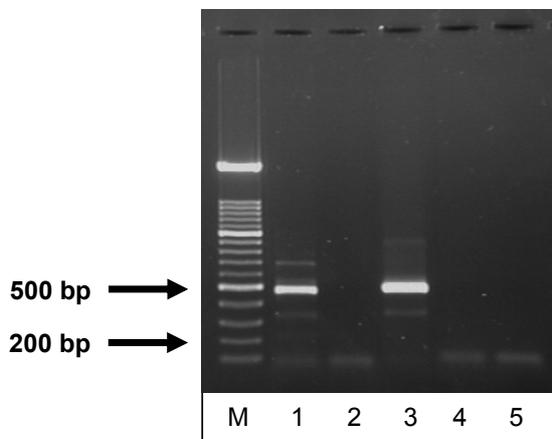


Abb. 31: Analytische Gelelektrophorese der RT-PCR mit CFTR-spezifischen Primern

Spur 1 bzw. 2: Produkt bzw. Negativkontrolle:

Pansenepithel (35 Zy)

Spur 3 bzw. 4: Produkt bzw. Negativkontrolle:

kultivierte PEZ (35 Zy)

Spur 5: Reagenzienkontrolle (mit H₂O statt Template) (35 Zy)

M: 100 Basenpaar-Leiter

4.5.4 Nachweis der CIC-Isoformen 2, 4 und 5

Die spezifischen Primerpaare für den Nachweis von CIC2- und CIC5-kodierender mRNA wurden aus humanen Sequenzen (NM04366 und NM000084) abgeleitet. Mit dem aus einer humanen Sequenz (AF172729) abgeleiteten Primerpaar gegen den CIC3 konnte keine CIC3-mRNA im ovinen Pansenepithel detektiert werden. Zur Ableitung eines Primerpaares zum Nachweis des CIC4 wurde eine bovine Sequenz (NM001031757) herangezogen.

Die durchgeführte RT-PCR ergab für den CIC2 eine Bande der erwarteten Größe von 380 bp sowohl in den kultivierten Pansenepithelzellen als auch im Pansenepithel (Abb. 32). Die Sequenzen der beiden amplifizierten Produkte waren identisch. Ein Vergleich der ermittelten Nukleotid-Sequenz des ruminalen PCR-Produktes (veröffentlicht in GenBank: EU048231, Abb. 33) mit analogen Sequenzen der Ratte (NM017137), der Maus (NM009900) und des Menschen (NM004366) ergab folgende Homologiegrade: Mensch: 91,8%, Ratte: 90,1%, Maus: 88,9%.

Die Amplifikation mit Hilfe der CIC4-spezifischen Primer ergab eine Bande, die mit einer Größe von 523 bp der zu erwartenden entsprach. Diese war sowohl in den kultivierten Pansenepithelzellen als auch im Pansenepithel vorhanden (Abb. 32). Verglichen mit analogen Sequenzen des Menschen (BC036068) und des Rindes (NM001031757) ergab sich im Falle des Rindes ein Homologiegrad von 97,9%, während die Sequenz des Menschen zu 87,8% homolog war. Die Nukleotid-Sequenz des ruminalen PCR-Produktes (Abb. 34) wurde in der GenBank veröffentlicht (EU048232).

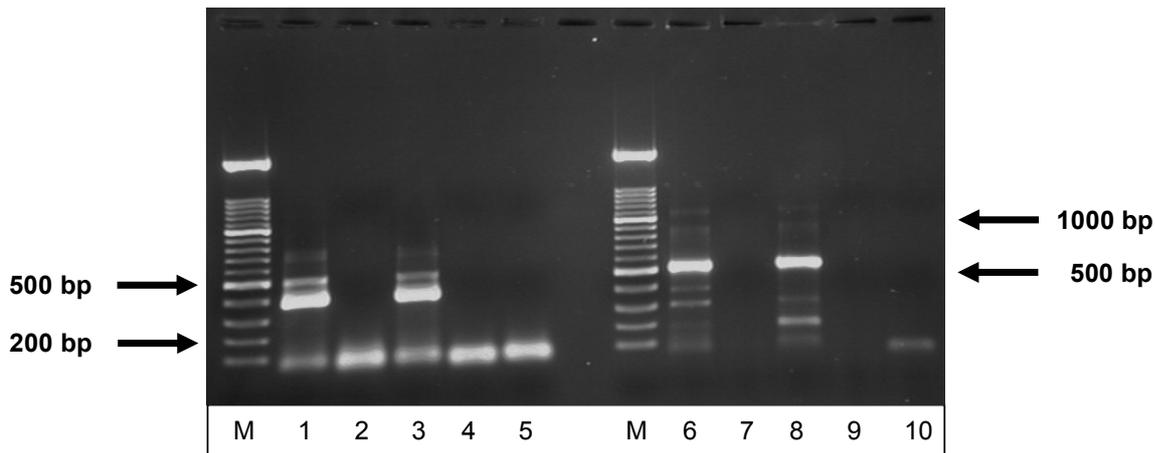


Abb. 32: Analytische Gelelektrophorese der RT-PCR mit CIC2- und CIC4-spezifischen Primern

Spur 1 bzw. 6: CIC2 bzw. CIC4: Pansenepithel (35 Zy)

Spur 2 bzw. 7: Negativkontrolle (CIC2 bzw. CIC4): Pansenepithel (35 Zy)

Spur 3 bzw. 8: CIC2 bzw. CIC4: kultivierte PEZ (35 Zy)

Spur 4 bzw. 9: Negativkontrolle (CIC2 bzw. CIC4): kultivierte PEZ (35 Zy)

Spur 5 bzw. 10: Reagenzienkontrolle (CIC2 bzw. CIC4) (mit H₂O statt Template) (35 Zy)

M: 100 Basenpaar-Leiter

1	CCTGTTACTC	CAGTATCTGG	CCTGGGGTCAC	CTACCCCGTC
41	GTCCTCATCA	CTTTCTCTGC	CGGATTCACA	CAGATCCTGG
81	CTCCTCAGGC	TGTTGGGTCT	GGCATCCCGG	AGATGAAGAC
121	CATCTTGCGA	GGAGTGGTGC	TGAAGGAATA	CCTCACCCCTC
161	AAGACCTTCG	TAGCTAAGGT	CATCGGGCTG	ACTTGTGCCC
201	TCGGCAGTGG	GATGCCCTT	GGCAAAGAGG	GCCCTTTTGT
241	GCATATCGCA	AGCATGTGTG	CCGCCCTTCT	CAGCAAGTTC
281	CTCTCGCTGT	TTGGGGGCAT	CTACGAGAAT	GAATCCCGGA
321	ACACAGAGAT	GCTGGCCGCC	GC	

Abb. 33: Teilsequenz des ruminalen CIC2 (ohne Primersequenzen)

1	TGTGGCCTTT	GGTGCCCCGA	TTGGGGGTGT	GCTTTTCAGT
41	CTGGAAGAGG	TCAGCTACTA	CTTCCGTTA	AAGACCCTGT
81	GGCGGTCCTT	TTTTGCGGCC	CTGGTGGCAG	CCTTCACGCT
121	GCGATCCATC	AATCCATTCG	GGAACAGCCG	CCTTGTCCCTC
161	TTCTACGTGG	AGTATCACAC	GCCCTGGTAC	ATGGCTGAGC
201	TCTTCCCCTT	CATCCTGCTT	GGAGTCTTCG	GGGGCTTGTG
241	GGGGACTCTC	TTCATCCGCT	GCAACATCGC	CTGGTGCCCGG
281	AGGCGCAAGA	CCACCAAGCT	GGGGAAGTAC	CCAGTATTGG
321	AGGTCATCGC	AGTGACTGCC	ATCACCGCCA	TTGTTGCCTA
361	CCCCAACCCC	TACACACGCC	GCAGCACAAG	TGAGTTCATT
401	TCCGAGCTCT	TCAATGATTG	CGGGGCCCTT	GAGTCTCCC
441	AGCTGTGTGA	CTACATCAAC	GACCCCAACA	TGACGCGGAC
481	CGT			

Abb. 34: Teilsequenz des ruminalen CIC4 (ohne Primersequenzen)

Auch für den CIC5 ergaben die spezifischen Primerpaare sowohl in den kultivierten Pansenepithelzellen als auch im Pansenepithel eine Bande der entsprechenden Größe von 343 bp (Abb. 35). Ein Vergleich mit sechs verschiedenen Transkriptvarianten von möglichen („predicted“) bovinen Sequenzen (XM592066, XM864613, XM873548, XM873831, XM873929, XM874020)

ergab einen Homologiegrad von 98,6% der ovinen Sequenz mit allen sechs Transkriptvarianten. Des Weiteren ergaben sich Homologien von 97,3% gegenüber der humanen Sequenz (NM000084), von 93,9% gegenüber einer porcinen Sequenz (NM214139) und von 93,2% gegenüber einer murinen Sequenz (NM016691). Die Nukleotid-Sequenz des ruminalen PCR-Produktes (Abb. 36) wurde in der GenBank veröffentlicht (EU048230).

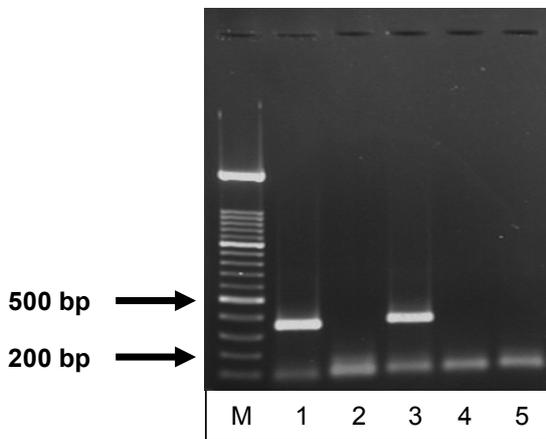


Abb. 35: Analytische Gelelektrophorese der RT-PCR mit CIC5-spezifischen Primern

Spur 1 bzw. 2: Produkt bzw. Negativkontrolle: Pansenepithel (35 Zy)

Spur 3 bzw. 4: Produkt bzw. Negativkontrolle: kultivierte PEZ (35 Zy)

Spur 5: Reagenzienkontrolle (mit H₂O statt Template) (35 Zy)

M: 100 Basenpaar-Leiter

1	TCTCTTGTTG	TCATAATGTT	TGAGCTAACT	GGTGGCTTGG
41	AATACATTGT	GCCTCTGATG	GCTGCAGCTA	TGACAAGCAA
81	GTGGGTGGCA	GATGCTCTTG	GCGGGGAGGG	CATCTATGAT
121	GCCACATCC	GTCTCAATGG	GTACCCCTTT	CTTGAAGCCA
161	AAGAAGAGTT	TGCTCATAAG	ACCCTGGCAA	TGGATGTGAT
201	GAAACCCCGG	AGAAATGATC	CTTTGTTGAC	TGTCCTTACT
241	CAGGACAGTA	TGACTGTGGA	AGATGTAGAG	ACCATAATAA
281	GTGAAACAAC	TTACAG		

Abb. 36: Teilsequenz des ruminalen CIC5 (ohne Primersequenzen)

4.5.5 Nachweis eines SMCT

Zum Nachweis einer SMCT1-kodierenden mRNA in den Zellen und dem Pansenepithel wurde wie beim PAT1 zunächst ein spezifisches Primerpaar aus der veröffentlichten Sequenz des humanen SMCT1 (NM145913) abgeleitet. Mit Hilfe einer doppelten PCR-Amplifikation (2 x 35 Zyklen) konnte eine schwache Bande in erwarteter Größe (396 bp) nachgewiesen werden. Die Bande, welche die erwartete Größe aufwies, wurde ausgeschnitten und mittels Sequenzanalyse auf Spezifität untersucht. Mit der so gewonnenen Schafsequenz wurde ein vorwärtsgerichteter Primer generiert. Der rückwärtsgerichteter Primer wurde aus der humanen Sequenz erstellt. Die mit diesen chimären Primern durchgeführte RT-PCR ergab eine Bande der Größe 330 bp, was aufgrund der eingesetzten Primer den Erwartungen entsprach (Abb. 37). Die Nukleotid-Sequenz der ruminalen PCR-Produkte (veröffentlicht in GenBank: EU048233; Abb. 38) wies einen Homologiegrad von 94,6% gegenüber der humanen Sequenz (NM145913) und von 86,8% gegenüber einer murinen Sequenz (NM145423) auf.

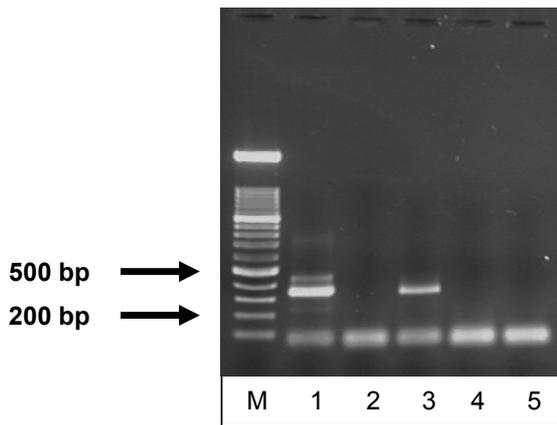


Abb. 37: Analytische Gelelektrophorese der RT-PCR mit SMCT1-spezifischen Primern

Spur 1 bzw. 2: Produkt bzw. Negativkontrolle: Pansenepithel (35 Zy)

Spur 3 bzw. 4: Produkt bzw. Negativkontrolle: kultivierte PEZ (35 Zy)

Spur 5: Reagenzienkontrolle (mit H₂O statt Template (35 Zy)

M: 100 Basenpaar-Leiter

1	GCAAGCTTCA	TGTCGGCCGT	CACCGTCCTG	GGCACCCCGT
41	CGGAGGTCTA	CCGTTTTGGA	GCCATATTCA	GCATCTTTGC
81	CATCACCTAC	TTCCTCGTGG	TGGTCCTCAG	TGCGGAGGTC
121	TTCCTCCCCG	TGTTCTACAA	ACTGGGCATT	ACCAGCACCT
161	ACGAGTATTT	AGAACTTCGA	TTTAACAAAT	GTGTTCGTCT
201	CTGTGGAACA	GTCCTCTTCA	TTGTTCAAAC	AATTCTGTAT
241	ACTGGAATTG	TTATTTATGC	CCCTGCCCTG	GCTTTGAATC
281	AAGTCACGGG	ATTTG		

Abb. 38: Teilsequenz des ruminalen SMCT1 (ohne Primersequenzen)

4.5.6 Semiquantitative RT-PCR

Um die Expression der Transporter auf mRNA-Ebene im Gewebe und in den kultivierten Epithelzellen vergleichen zu können, wurde eine semiquantitative Analyse der Transporter an Geweben bzw. Pansenepithelzellen von drei verschiedenen Tieren durchgeführt (Kap. 3.8.4.2). Hierfür wurden RT-PCR mit den für die Transporter ermittelten, optimalen Zyklenzahlen durchgeführt (Tabelle 8). Zusätzlich zu den potentiellen Kandidatenproteinen für einen SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauscher DRA und PAT1 wurde auch die Expression von NHE1, NBC, AE2 und MCT1 semiquantitativ in Geweben und kultivierten Zellen verglichen. Die letztgenannten Transporter waren im Pansenepithel bereits von MÜLLER (2000) und HUHN (2004) nachgewiesen worden und wurden zur zusätzlichen Validierung der Pansenepithelzellkultur in der vorliegenden Arbeit mit erfasst.

Tabelle 8: Optimale Zyklenzahlen zur Semiquantifizierung verschiedener mRNA im Pansengewebe

Transporter	Zyklenzahl
β -Actin	26
NHE1	30
NBC	26
AE2	27
MCT1	23
DRA	24
PAT1	27

Entsprechend der in Kapitel 3.8.4.2 beschriebenen Methode wurde anhand des oberen linearen Bereiches die optimale Zyklenzahl zur Semiquantifizierung ermittelt (Einzeldaten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse sind in Abb. 39 dargestellt. Für β -Actin zeigte sich ein gleichmäßig hoher Gehalt auf mRNA-Ebene in Gewebe und Zellen. Die Expression von NBC und PAT1 waren in den kultivierten Zellen signifikant höher als im Pansengewebe. AE2 und NHE1 unterschieden sich nur tendenziell. Der DRA konnte bei 24 Zyklen nur im Gewebe nachgewiesen werden. Die Transkription des MCT1 war in den kultivierten Zellen auf mRNA-Ebene signifikant niedriger als im Gewebe.

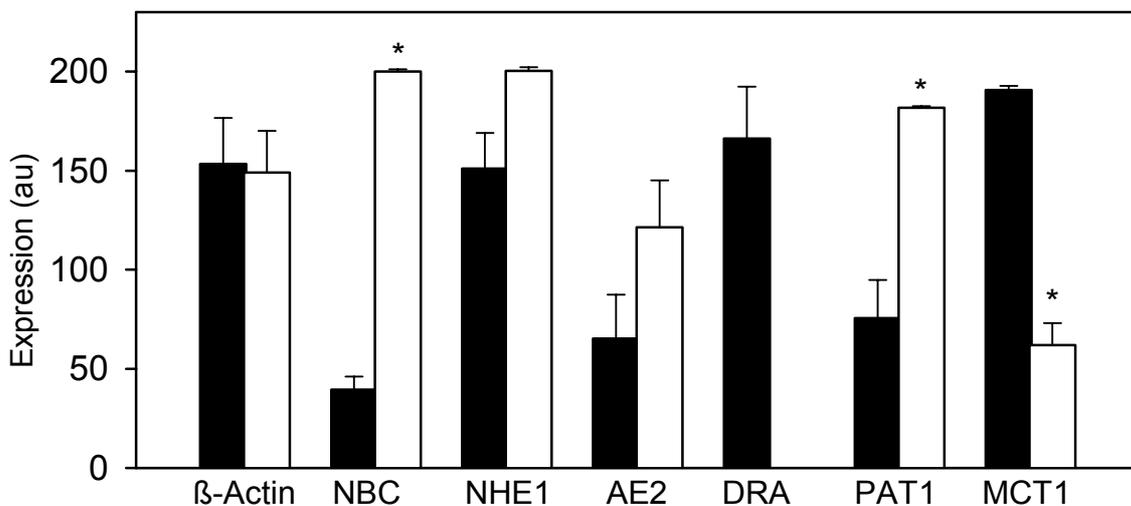


Abb. 39: Semiquantitativer Vergleich von NBC, NHE1, AE2, DRA, PAT1 und MCT1 mRNA in Panseneithel und primärkultivierten Panseneithelzellen

Mittelwerte sind mit SEM angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen dem Pansengewebe (schwarze Balken) und den kultivierten Panseneithelzellen (weiße Balken) sind mit * gekennzeichnet. $n = 3$, $N = 3$

5 Diskussion

Die Aufnahme von kurzkettigen Fettsäuren hat für die Energiebereitstellung des Wiederkäuers eine essentielle Bedeutung (BERGMAN 1990). Mit Hilfe der angewendeten Untersuchungsverfahren (Ussing-Kammer-Technik, intrazelluläre pH-Wertmessungen und molekularbiologische Methoden) sollten in der vorliegenden Arbeit die Mechanismen der ruminalen Acetataufnahme eingegrenzt werden. Ausgangspunkt der Untersuchungen war dabei das zuletzt von MÜLLER (2000) weiterentwickelte Modell, dass von einer Diffusion der undissoziierten Säure und einem SCFA⁻/HCO₃⁻-Austausch an der apikalen Membran ausgeht. An der basolateralen Membran erfolgt der Efflux entweder als Diffusion der undissoziierten SCFA oder als H⁺-Kotransport von SCFA-Metaboliten über einen MCT1 (Abb. 1). In der vorliegenden Arbeit wurden für Acetat kaum Befunde erhoben, die für eine Diffusion der undissoziierten Säure in größerem Umfang sprechen. Hierzu ist anzumerken, dass Acetat aufgrund der kurzen Kettenlänge die am wenigsten lipophile SCFA ist. Entsprechend wurde Acetat bewusst für diese Studie ausgewählt, um die Mechanismen der anionischen SCFA-Resorption besser charakterisieren zu können. Als nichtdiffusibler Resorptionsmechanismus wurde die Existenz eines apikalen SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauschers bestätigt. Daneben lieferte diese Arbeit erstmals Hinweise auf die Beteiligung eines apikalen, bikarbonat-unabhängigen Transportmechanismus. In den folgenden Kapiteln sollen die an der Acetataufnahme beteiligten Mechanismen näher analysiert werden:

- Diffusion von undissoziiertem Acetat (Kap. 5.1)
- Bikarbonatabhängige proteinvermittelte Acetataufnahme (Kap. 5.2)
- Bikarbonatunabhängige proteinvermittelte Acetataufnahme (Kap. 5.3)

Neben der Darlegung der einzelnen Mechanismen sollen mögliche strukturelle Grundlagen erörtert und gegeneinander abgewogen werden.

5.1 Diffusion von undissoziiertem Acetat

Für den Psalter gehen ALLI et al. (2006) davon aus, dass die Diffusion der undissoziierten Säure den alleinigen Mechanismus für die Resorption von Acetat darstellt. Auch für den Pansen ist die Diffusion von HSCFA als wichtiger Mechanismus beschrieben (SEHESTED et al. 1999a). So steigt *in vivo* die SCFA-Clearance aus dem vorübergehend isolierten, gewaschenen Pansen von Kühen mit zunehmender Kettenlänge an (Übersicht in GÄBEL 1995, GÄBEL u. ASCHENBACH 2007). Die Abhängigkeit der SCFA-Clearance von der Kettenlänge der kurzkettigen Fettsäure ist ein Hinweis auf Diffusion der undissoziierten Säure. In verschiedenen Studien war jedoch auffällig, dass der experimentell ermittelte Einfluss der Kettenlänge auf die Resorptionsgeschwindigkeit der SCFA immer deutlich hinter dem rechnerisch zu erwartenden Effekt zurückblieb. So ist nach WALTER u. GUTKNECHT (1986) die Permeabilität einer Ei-Phosphatidylcholin-Decan-Doppelmembran für Propionat 5,1-fach größer als für Acetat und wiederum 2,7-fach größer für n-Butyrat als für Propionat. In verschiedenen Untersuchungen (Übersicht in GÄBEL 1995, GÄBEL u. ASCHENBACH 2007) war der Anstieg der Resorption im Vergleich zwischen Acetat, Propionat und Butyrat aber wesentlich geringer als der relative Anstieg der von WALTER u. GUTKNECHT (1986) bestimmten Permeabilitäten. Dies spricht gegen eine ausschließliche oder bevorzugte

Diffusion der undissoziierten Säure. Neben der Kettenlänge hatte auch der pH-Wert nur geringen Einfluss auf die Resorptionsgeschwindigkeit der SCFA (Übersicht in GÄBEL 1995, GÄBEL u. ASCHENBACH 2007). Der pH-Effekt war auch Gegenstand der eigenen Untersuchungen, um die Bedeutung der Diffusion der undissoziierten Säure für Acetat abzuklären. So wurde in der Ussing-Kammer die Aufnahme von 0,5 mM Acetat bei einem luminalen pH-Wert von 7,4 sowie 6,1 untersucht. Nach Henderson-Hasselbalch führt ein Absenken des pH-Wertes von 7,4 auf 6,1 zu einem Anstieg des Gehalts an undissoziierter Säure um das ca. 20-fache. Bei alleiniger Aufnahme der SCFA mittels Diffusion der undissoziierten Säure müsste die Acetataufnahme um den gleichen Faktor ansteigen. Wie in Abb. 8 zu sehen ist, stieg in der HCO_3^- -gepufferten Lösung die Acetataufnahme mit Absenken des mukosalen pH-Wertes von 7,4 auf 6,1 aber nur um das ca. Zweifache an. In Abwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ betrug der Anstieg das 1,3-fache (Abb. 8). Damit war die Zunahme der Acetataufnahme um ein Vielfaches niedriger als nach Henderson-Hasselbalch erwartet. Gründe für diese große Diskrepanz könnten sein:

1. Der apikale Na^+/H^+ -Austauscher stellt nahe der apikalen Membran Wasserstoffionen für die Protonierung der SCFA⁻ zur Verfügung. Demnach wäre schon bei einem pH-Wert der Lösung von 7,4 eine höhere Konzentration von HSCFA an der Membranoberfläche als in der Pufferlösung vorhanden. Der tatsächliche Anstieg des Gehalts an undissoziierten SCFA wäre dann bei Absenken des pH-Wertes nicht so groß, wie eigentlich nach Henderson-Hasselbalch erwartet. Dieses Modell wurde ursprünglich an der Gallenblase des Meerschweinchens entwickelt (PETERSEN et al. 1981) und auch für die gastrointestinalen Epithelien Colon und Pansen diskutiert (BINDER u. METHA 1989; GÄBEL et al. 1991b).
2. Es könnte sich in der epithelnahen Schicht ein pH-Mikroklima ausbilden, welches sich nicht im Equilibrium mit der restlichen Pufferlösung befindet. Dadurch würde bei einer Absenkung des pH-Wertes in der Pufferlösung der pH-Wert im epithelnahen Bereich nicht im gleichen Maße absinken. Die SCFA-Aufnahme würde demnach nicht um den nach Henderson-Hasselbalch errechneten Faktor ansteigen. GENZ et al. (1999) zeigten die Ausbildung eines derartigen pH-Mikroklimas am distalen Colonepithel des Meerschweinchens. Die Autoren konnten nachweisen, dass in einer HCO_3^- -gepufferten Lösung mit einem pH-Wert von 6,4 die epithelnahe Schicht einen pH-Wert von 6,98 aufwies. Für den Pansen wurde von Aschenbach et al. (2000) die These formuliert, dass das Stratum corneum ein pH-Mikroklima ausbilden könnte.
3. Die Diffusion der undissoziierten Säure stellt nicht den alleinigen Mechanismus der SCFA-Aufnahme dar. Vielmehr könnte ein proteinvermittelter Mechanismus an der apikalen Acetataufnahme beteiligt sein. In diesem Fall bestünde die apikale Acetataufnahme aus zwei Komponenten, der Diffusion der undissoziierten Säure einerseits und einem proteinvermittelten Mechanismus andererseits. Es würde also nur ein Teil der SCFA-Aufnahme dem nach Henderson-Hasselbalch berechneten Anstieg folgen. Der Anstieg der SCFA-Aufnahme wäre somit geringer als nach Henderson-Hasselbalch erwartet.

Die unter 1. beschriebene Annahme der NHE-vermittelten Protonierung von SCFA wurde in vorausgegangenen Studien sowohl im Pansen als auch im Darm monogastrischer Spezies untersucht. Der Theorie entsprechend würde eine Hemmung des NHE zu einer Verringerung der SCFA-Aufnahme bzw. der Fluxes von mukosal nach serosal führen, da nicht mehr genügend

Protonen bereitgestellt werden könnten. Studien am porcinen Colon sowie dem Caecum und Colon des Meerschweinchens beschreiben unter Einsatz von NHE-Hemmstoffen eine Reduktion der ms-Fluxe von Acetat, Propionat und Butyrat (HOLTUG 1989; VON ENGELHARDT et al. 1993). Demgegenüber konnten MASCOLO et al. (1991) im distalen Colon der Ratte bei einer Amilorid-vermittelten Hemmung des NHE keine parallele Abnahme der Butyrataufnahme nachweisen. Gleiches gilt für den Pansen. Amilorid bewirkte *in vitro* weder am Pansenepithel des Rindes (SEHESTED 1994), noch des Schafes (MICHELBERGER 1994; KRAMER et al. 1996) signifikante Veränderungen der unidirektionalen SCFA-Fluxe bzw. des SCFA-Nettofluxe. KRAMER (1994) untersuchte zusätzlich die Auswirkung einer Inaktivierung des NHE durch Na⁺-freie Inkubation auf die SCFA-Resorption aus dem gewaschenen, vorübergehend isolierten Pansen des Schafes. Selbst das gänzliche Fehlen von Natrium in der luminalen Lösung beeinflusste nicht die SCFA-Resorption. Die Wirkungslosigkeit von NHE-Hemmstoffen sowie die Unabhängigkeit der SCFA-Aufnahme von luminalem Natrium zeigen, dass ein apikalorientierter NHE im Pansenepithel vermutlich keine Bedeutung für die HSCFA-Diffusion mittels Protonierung von SCFA⁻ hat.

Die Ausbildung eines pH-Mikroklima's im epithelnahen Bereich kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. In Übereinstimmung mit Studien von KRAMER et al. (1996), GÄBEL und SEHESTED (1997) und GÄBEL et al. (2002) belegen die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse aber eindeutig das Vorhandensein von proteinvermittelten Mechanismen zur Acetataufnahme. Wie oben schon angesprochenen, war die Zunahme der Acetataufnahme nach Absenken des mukosalen pH-Wertes um ein Vielfaches niedriger als nach Henderson-Hasselbalch zu erwarten. Darüber hinaus zeigte sich 1) eine teilweise Abhängigkeit der Acetataufnahme von Bikarbonat (Abb. 8, Abb. 9 und Abb. 10), 2) eine Hemmbarkeit der Acetataufnahme durch verschiedene Substanzen und 3) auch eine Sättigbarkeit der Acetataufnahme. Die letztgenannten drei Punkte sind weitere eindeutige Belege für das Vorhandensein von proteinvermittelten Mechanismen und werden in den nachfolgenden Kapiteln ausführlicher diskutiert.

5.2 Bikarbonatabhängiger proteinvermittelter Transport von Acetat in das Pansenepithel

Schon in früheren Untersuchungen wurde bei dem proteinvermittelten Transport von Acetat von einem Zusammenhang zwischen Bikarbonatsekretion und SCFA-Resorption ausgegangen. Die Kopplung von SCFA-Aufnahme und Bikarbonatausschleusung wurde mehrfach sowohl für den Pansen als auch den Dickdarm beschrieben (MASSON u. PHILLIPSON 1951; STEVENS u. STETTLER 1966a; ARGENZIO et al. 1977; ARGENZIO u. WHIPP 1979; SOERGEL et al. 1989; GÄBEL et al. 1991a; MASCOLO et al. 1991; HARIG et al. 1996; GÄBEL u. SEHESTED 1997; VIDYASAGAR et al. 2004; BINDER et al. 2005; VIDYASAGAR et al. 2005). Bisher werden zwei kontroverse Modelle einer Bikarbonatabhängigkeit der SCFA-Aufnahme diskutiert:

1. Ein Modell geht von einer indirekten Kopplung von SCFA-Aufnahme und Bikarbonatsekretion aus. HSCFA werden über Diffusion der undissoziierten Säure in die Zellen aufgenommen. Aufgrund der intrazellulären Dissoziation der HSCFA (pK-Wert ca. 4,8) kommt es zu einem Abfall des intrazellulären pH-Wertes. Durch die intrazelluläre Ansäuerung wird der NHE

aktiviert. Dabei kommt es nicht nur zu einer Stimulation eines NHE sondern auch eines $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers welcher indirekt an den NHE gekoppelt ist (CHIEN u. STEVENS 1972; MARTENS u. GÄBEL 1988; MARTENS et al. 1991; DIERNAES et al. 1994; SEHESTED et al. 1996). Über den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher würde dann Bikarbonat ins Lumen sezerniert. Gegen diese Modellvorstellung spricht jedoch die Tatsache, dass eine Hemmung des NHE1 kaum einen Einfluss auf die Fettsäureresorption am Pansen hat (Kap. 5.1). Folglich muss auch der bikarbonatabhängige Teil der SCFA-Resorption losgelöst von dieser Funktion eines NHE1 erfolgen können.

2. Ein weiteres Modell sieht eine direkte Kopplung des Bikarbonatexports mit dem SCFA-Import über einen Anionen/ HCO_3^- -Austauscher vor (GÄBEL u. SEHESTED 1997; GÄBEL et al. 2002). Möglicherweise transportiert dieser Anionenaustauscher sowohl SCFA als auch Chlorid (MICHELBERGER 1994; KRAMER et al. 1996).

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchung konnten das zweite Modell, also eine direkte Kopplung zwischen Acetataufnahme und Bikarbonatsekretion bestätigen. So zeigen Abb. 8, Abb. 9 und Abb. 10, dass die Acetataufnahme bei einem mukosalen pH-Wert von 6,1 in Anwesenheit von Bikarbonat signifikant größer war als in Bikarbonatabwesenheit. Das Modell der indirekten Kopplung kann hier eindeutig ausgeschlossen werden, da die Untersuchungen in chloridfreier Lösung durchgeführt wurden. Somit konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit das von GÄBEL und SEHESTED (1997) und GÄBEL et al. (2002) für den Pansen eingeführte Modell einer direkten Kopplung zwischen SCFA-Aufnahme und Bikarbonatsekretion erstmals funktionell eindeutig bestätigt werden.

Die Bikarbonatabhängigkeit konnte in den eigenen Untersuchungen bei pH_m 6,1 nachgewiesen werden. Durch die pH-Wert-Absenkung von pH_m 7,4 auf pH_m 6,1 wurde eine Reduktion der Bikarbonatkonzentration von 22,5 mM (pH_m 7,4) auf 1,1 mM (pH_m 6,1) bei unverändertem pCO_2 induziert (Abb. 8). Da der serosale Puffer auch bei erniedrigtem mukosalen pH-Wert eine Bikarbonatkonzentration von 22,5 mM (pH_s 7,4) aufwies, bestand neben einem erhöhten Anteil undissoziierten Acetats auf mukosaler Seite auch ein Bikarbonatgradient von serosal nach mukosal (Abb. 8C). Ein Vergleich in HCO_3^- -gepufferter Lösung und HEPES-gepufferter Lösung zeigte Folgendes: Bei mukosaler pH-Wert-Absenkung mit gleichzeitiger Absenkung der mukosalen Bikarbonatkonzentration wurde die Acetataufnahme deutlich gefördert. In HEPES-gepufferter Lösung betrug der Anstieg der Acetataufnahme bei Absenkung des mukosalen pH-Wertes nur ein Drittel des Effektes in HCO_3^- -gepufferter Lösung. Damit können zwei Drittel des Anstiegs der Acetataufnahme bei Absenkung des mukosalen pH-Wertes bzw. der mukosalen Bikarbonatkonzentration mit der Stimulation der bikarbonatabhängigen Acetataufnahme infolge eines luminal gerichteten Bikarbonatgradienten erklärt werden. Nur ein Drittel ist durch Diffusion der undissoziierten Säure zu erklären. Entgegen bisheriger Untersuchungsergebnisse, welche die Annahme stützen, dass die SCFA-Aufnahme hauptsächlich durch Diffusion der undissoziierten Säure vermittelt wird (STEVENS u. STETTLER 1966b; THORLACIUS u. LODGE 1973; SEHESTED et al. 1999b), erlangt gerade bei Absenkung des luminalen pH-Wertes / $[\text{HCO}_3^-]$ ein bikarbonatabhängiger proteinvermittelter Acetataufnahmemechanismus am Pansenepithel eine stärkere Bedeutung. Hier scheint dem von serosal nach luminal gerichteten Bikarbonatgradienten unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine entscheidende Rolle zu zukommen.

Im Weiteren sollte die Bikarbonatabhängigkeit der Acetataufnahme bei Acetatkonzentrationen bis zu 60 mM untersucht werden. Dabei konnte bei hohen Acetatkonzentrationen (20, 30 und 60 mM) eine signifikante Bikarbonatabhängigkeit nachgewiesen werden (Abb. 10). Der bikarbonatabhängige Anteil der Acetataufnahme wurde durch Bildung der Differenz der Acetataufnahme in HCO_3^- -gepufferter Lösung und HEPES-gepufferter Lösung errechnet. Dieser berechnete Anteil der Acetataufnahme zeigte mit ansteigenden Acetatkonzentrationen Charakteristika einer Sättigung (Kap. 4.1.4), die einer Michaelis-Menten-Kinetik mit einer U_{\max} von $23,8 \pm 8,0 \text{ nM} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und einer K_m von $67,1 \pm 35,2 \text{ mM}$ folgte (Abb. 13). Die ermittelte Sättigungskurve ist ein weiteres Kennzeichen für einen proteinvermittelten Mechanismus. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass die proteinvermittelte bikarbonatabhängige Acetataufnahme einen quantitativ bedeutenden Anteil an der gesamten Acetataufnahme auch bei Acetatkonzentrationen von bis zu 60 mM hatte.

Das Versuchsmodell ging davon aus, dass neben dem basolateralen Transport von Bikarbonat auch die Carboanhydrase-bedingte Konvertierung metabolischen CO_2 einen möglichen Anteil an der intrazellulären Bereitstellung von Bikarbonat für einen apikalen SCFA/ HCO_3^- -Austauscher hat. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde vergleichend in HCO_3^- -gepufferter Lösung und HEPES-gepufferter Lösung die Acetataufnahme in An- und Abwesenheit von Ethoxazolamid untersucht. Ethoxazolamid ist ein Hemmstoff der Carboanhydrase (FISCHBARG u. LIM 1974; LU et al. 2006; BECKER u. DEITMER 2007). In Abwesenheit von Ethoxazolamid war die Acetataufnahme bei mukosal 10 mM Acetat signifikant abhängig von extrazellulärem Bikarbonat (Abb. 9A und Abb. 9C). Bei 0,5 mM Acetat konnte eine Hemmung der Acetataufnahme in HEPES-gepufferter Lösung gegenüber der HCO_3^- -gepufferten Lösung nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von 0,05 mM Ethoxazolamid erzeugt werden (Abb. 9A und Abb. 9B). Dies zeigte, dass die Konvertierung von CO_2 aus dem intraepithelialen Metabolismus zu Bikarbonat bei geringer Acetatkonzentration das Fehlen von extrazellulärem Bikarbonat kompensieren kann. Schon bei einer Erhöhung der Acetatkonzentration auf 10 mM war die Acetataufnahme in HEPES-gepufferter Lösung auch in Abwesenheit von Ethoxazolamid signifikant niedriger als in HCO_3^- -gepufferter Lösung (Abb. 9C). Die Bikarbonatproduktion durch Carboanhydrase-bedingte Konvertierung metabolischen CO_2 kann somit zumindest unter den gegebenen Versuchsbedingungen nur bei sehr niedrigen Acetatkonzentrationen (0,5 mM Acetat) ausreichend Bikarbonat für den bikarbonatabhängigen proteinvermittelten Mechanismus bereitstellen.

5.2.1 Funktionelle Eingrenzung einer bikarbonatabhängigen Acetataufnahme

Die bisherigen Ergebnisse legen eine direkte Kopplung zwischen Acetataufnahme und Bikarbonatsekretion nahe. Als mechanistische Grundlage der bikarbonatabhängigen Acetataufnahme wird die Beteiligung eines apikalen Anionen/ HCO_3^- -Austauschers diskutiert (Kap. 2.2), der sowohl Chlorid als auch große Anionen wie SCFA akzeptiert und insbesondere bei hohen Acetatkonzentrationen einen nicht unerheblichen Anteil der gesamten Aufnahme vermittelt. Dieser mutmaßliche SCFA/ HCO_3^- -Austauscher sollte in den weiteren Untersuchungen funktionell näher charakterisiert werden.

Es ist wahrscheinlich, dass Chlorid und SCFA um den Transport mittels eines apikalen Anionen/ HCO_3^- -Austauschers konkurrieren und sich kompetitiv hemmen. Folglich würde die SCFA-Aufnahme mit sinkenden Chloridkonzentrationen ansteigen. Dies konnte in Versuchsansatz 4.1.1 nachgewiesen werden (Abb. 4 und Abb. 6). So war die Acetataufnahme in Anwesenheit von 90 mM Chlorid signifikant geringer als in Anwesenheit von nur 4 mM Chlorid (Abb. 4). In Abwesenheit von Chlorid war die Acetataufnahme am größten (Abb. 6). Die Aufnahme von Acetat kann somit durch die Anwesenheit von Chlorid gehemmt werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass zumindest ein Teil der Acetat- und Chloridaufnahme von demselben Protein vermittelt werden. Für dieses Protein scheint Acetat das bevorzugte Substrat zu sein, da 0,5 mM Chlorid die Aufnahme von 0,5 mM Acetat nicht hemmten. In der Literatur wurde eine wechselseitige Beeinflussung zwischen Acetat bzw. anderen SCFA und Chlorid im Pansen bereits beschrieben. So konnte MAREK (1991) *in vivo* zeigen, dass die Substitution von SCFA eine gesteigerte Chloridresorption nach sich zog. CRÖNERT et al. (1993) wiesen am isolierten Pansenepithel im Falle einer Propionatabwesenheit einen vermehrten mukoserosalen Chloridflux, sowie umgekehrt einen vermehrten Propionsäureflux bei mukosaler Chloridabwesenheit nach. Eine gegenseitige Hemmung der Nettoresorption von Acetat, Propionat bzw. Butyrat und Chlorid wurde auch von TADESSE (1996) im Rahmen von *in vivo* Untersuchungen am vorübergehend isolierten, gewaschenen Pansen des Schafes gezeigt.

Neben Chlorid wurde als weiteres einwertiges Anion auch der Einfluss von Nitrat auf die Acetataufnahme untersucht. Wie Abb. 7A zeigt, führte die Applikation von Nitrat zu einer signifikanten Hemmung der Aufnahme von Acetat. Schon bei equimolaren Konzentrationen von Nitrat und Acetat war die Acetataufnahme um die Hälfte reduziert. Die nitratbedingte Hemmung zeigt, dass die Acetataufnahme zu einem bedeutenden Teil proteinvermittelt sein muß. Im Rahmen der Untersuchungen an den kultivierten Pansenepithelzellen konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Hemmung der Acetataufnahme durch Nitrat direkt am Protein erfolgt und nicht durch eine Beeinflussung des intrazellulären pH-Wertes, denn die Applikation von 10 mM Nitrat bewirkte in chloridfreier Lösung keine Änderung des pH_i (Abb. 24). Nitrat konnte bereits von KRAMER et al. (1996) als Hemmstoff des ruminalen Propionatfluxes eingegrenzt werden und wurde von WÜRMLI et al. (1987) als Blocker von HCO_3^- -Austauschsystemen im Pansen charakterisiert.

Neben Anionen wie Chlorid und Nitrat sind an HCO_3^- -Austauschsystemen auch bestimmte Hemmstoffe zur Aktivitätsreduzierung wirksam (Kap. 2.2.5.1 und 2.2.5.2). Ob der SCFA/ HCO_3^- -Austauscher im Pansen mit Hemmstoffen inaktiviert werden kann, sollte im Rahmen der funktionellen Charakterisierung analysiert werden. Die Untersuchungen bezüglich einer Sensitivität des bikarbonatabhängigen Mechanismus gegenüber verschiedenen Antagonisten ergaben eine deutliche Hemmung der Acetataufnahme bei 0,5 und 10 mM Acetat durch Nifluminsäure (Abb. 10, Abb. 14 und Abb. 16).

Im Rahmen der intrazellulären pH-Wertmessungen an den kultivierten Pansenepithelzellen wurde unter Nifluminsäureapplikation eine starke Absenkung des Ausgangs- pH_i festgestellt (Abb. 22 und Abb. 24). Eine derartige Reduktion des Ausgangs- pH_i könnte auf verschiedene Mechanismen zurückgeführt werden:

1. Eine protonophore Wirkung der Nifluminsäure wurde von BROWN u. DUDLEY (1996) und RINGEL (2004) angenommen, die in Ihren Untersuchungen ebenfalls einen pH_i -Abfall nach Nifluminsäurezugabe beobachteten. In diesem Licht sind die unter Nifluminsäureapplikation erzielten Ergebnisse der pH_i -Untersuchungen mit Vorsicht zu interpretieren. Allerdings ist in Abb. 24 zu erkennen, dass das Entfernen von Nifluminsäure zu einer sofortigen Anhebung des intrazellulären pH-Wertes führte. Dies deutet daraufhin, dass die protonophore Wirkung reversibel ist.
2. Eine andere Erklärung wäre die reversible Hemmung pH_i -regulativer Mechanismen der Zelle. Dabei müsste die Hemmung an einem bikarbonatunabhängigen Mechanismus erfolgen, da die pH_i -Reduktion durch Nifluminsäure auch in HEPES-gepufferter Lösung vorhanden war (Abb. 24). Eine Hemmung des NHE, der von MÜLLER et al. (2000) und HUHN (2004) als Mechanismus der bikarbonatunabhängigen pH_i -Regulation charakterisiert werden konnte, wurde für Nifluminsäure bisher noch nicht beschrieben.

Anhand der Acetataufnahmestudien wird belegt, dass eine mögliche Beeinflussung des intraepithelialen pH-Wertes durch Nifluminsäure keinen Einfluss auf die Diffusion des undissoziierten Acetats hatte. Wäre dies der Fall gewesen, so hätte Nifluminsäure den nitratinsensitiven Anteil der Acetataufnahme variieren müssen. Eine additive Wirkung bei gleichzeitiger Applikation von Nitrat und Nifluminsäure konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 16). Ein Einfluss von Nitrat auf den intraepithelialen pH-Wert kann ausgeschlossen werden, da sich eine Nitratapplikation nicht auf den intrazellulären pH-Wert auswirkte (Abb. 22). Somit kann eindeutig festgestellt werden, dass die Nifluminsäure-induzierte Hemmung der Acetataufnahme nicht auf einer Beeinflussung des intraepithelialen pH-Wertes beruhte sondern vielmehr an denselben Mechanismen wie Nitrat ansetzte, also zu einer Hemmung der proteinvermittelten Acetataufnahme führte. Dabei sind zwei mögliche Angriffspunkte für Nifluminsäure denkbar:

1. Eine indirekte Hemmung eines $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers durch Reduktion des intraepithelialen Bikarbonatgehalts infolge einer intraepithelialen pH-Wertabsenkung. Gegen diese Erklärung spricht eine Hemmung der Acetataufnahme in Abwesenheit von Bikarbonat (Abb. 10 und Abb. 15).
2. Eine Hemmung durch Nifluminsäure am Austauschprotein (AE2) erfolgt nach FALKE und CHAN (1986) durch Blockierung der Translokation der Ionenbindungsstelle. Nifluminsäure könnte im Rahmen der eigenen Untersuchungen zumindest teilweise zu einer direkten Hemmung der Acetataufnahme an einem $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher geführt haben.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die bikarbonatabhängige Acetataufnahme durch das einwertige Anion Nitrat blockiert werden konnte, wobei Nitrat in equimolarer Konzentration bereits zu einer Reduktion der Acetataufnahme um ca. die Hälfte führte (Abb. 7A). Nitrat wirkte dabei direkt an einem acetattransportierenden Protein und nicht über die Beeinflussung des intrazellulären pH-Wertes auf die Acetataufnahme ein. Neben der Bikarbonatabhängigkeit bei hohen Acetatkonzentrationen (Kap. 5.2) ist die Nitratsensitivität ein weiterer Hinweis dafür, dass ein beträchtlicher Anteil des Acetats bikarbonatabhängig und proteinvermittelt aufgenommen wird.

Der hier funktionell nachgewiesene SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauscher konnte als nifluminsäuresensitiv charakterisiert werden.

5.2.2 Kandidatenproteine für eine bikarbonatabhängige Acetataufnahme

Angesichts der funktionellen Befunde ergibt sich die Frage nach möglichen Proteinen, die diesen Austausch von Acetat und Bikarbonat vermitteln könnten. In der vorliegenden Arbeit sollte daher auf molekularer Ebene das Vorhandensein von Kandidatenproteinen für eine bikarbonatabhängige Acetataufnahme untersucht werden. Die Ergebnisse zeigten, dass neben dem bereits von MÜLLER et al. (2002) nachgewiesenen MCT1 auch DRA und PAT1 im Pansenepithel des Schafes vorhanden waren (Abb. 27 und Abb. 29). Eine mögliche Beteiligung dieser drei Proteine an der apikalen bikarbonatabhängigen Acetataufnahme soll im Folgenden diskutiert werden.

Da für das Pansenepithel sowohl bezüglich der Lokalisation als auch der Funktion von DRA und PAT1 bisher keine Untersuchungen vorliegen, kann hier nur auf Untersuchungen am Gastrointestinaltrakt anderer Spezies zurückgegriffen werden. In deren gastrointestinalen Epithelien wurden bisher DRA und PAT1 als apikal lokalisierte Anionen/HCO₃⁻-Austauscher beschrieben, für die der Transport verschiedener Anionen nachgewiesen werden konnte (Kap. 2.2.5.1 und 2.2.5.2). Allerdings postulierten DUDEJA und RAMASWAMY (2006) kürzlich für das humane Colonepithel, dass nicht DRA oder PAT1, sondern vielmehr MCT1 das Protein sei, welches die apikale Aufnahme von SCFA im Austausch mit Bikarbonat vermittelt. Am Caecum der Maus schließen KAWAMATA et al. (2007) den MCT1 als strukturelle Grundlage für einen apikalen SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauscher aufgrund funktioneller Untersuchungen hingegen aus. Im Pansenepithel wurde der MCT1 bisher ausschließlich basalorientiert dargestellt (MÜLLER et al. 2002; KIRAT et al. 2006a, b). Somit ist der MCT1 im Rahmen der vorliegenden Arbeit als strukturelle Grundlage der apikalen bikarbonatabhängigen Acetataufnahme eher unwahrscheinlich. Vielmehr gibt es für den Pansen Hinweise darauf, dass eine andere MCT-Isoform an der apikalen Membran lokalisiert ist. Untersuchungen von KIRAT et al. (2007) zur Lokalisation des MCT4 im Magen-Darm-Trakt von Wiederkäuern zeigten, dass der MCT4 in den Zellmembranen des Stratum corneum sowie Stratum granulosum eingebaut ist, während er im Stratum basale vornehmlich diffus im Cytoplasma verteilt ist. Die Autoren stellten in der Folge für den Pansen ein Modell auf, in dem der MCT4 apikalorientiert ist, wohingegen der MCT1 basalorientiert den Kotransport von SCFA und Protonen vermittelt. Eine mögliche Erklärung für die divergierende Lokalisation und die damit einhergehend unterschiedliche Funktion des MCT1 in Vormagen und Darm liefern neuere Untersuchungen an Mäusen sowie verschiedenen Zelllinien bezüglich einer Koexpression des transmembranalen Glykoproteins CD147 mit MCT1, 3 und 4 (KIRK et al. 2000; PHILP et al. 2003). DEORA et al. (2005) zeigten an der Niere und dem Retinaepithel, dass abhängig von der MCT-Isoform der MCT oder aber CD147 über die Polarität des MCT und damit den Einbau des MCT-CD147-Komplexes in die apikale oder basolaterale Membran entscheiden. Unterschiede im MCT-Chaperon CD147 könnten auch verantwortlich sein für die unterschiedliche Polarität von MCT1 und anderer MCT-Isoformen in Pansen und Darm. Der MCT4 ist neben DRA und PAT1 aufgrund einer apikalen Lokalisation als Kandidatenprotein für einen SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauscher zu erwägen.

Der in dieser Arbeit funktionell nachgewiesene SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauscher war nifluminsäuresensitiv, sowie DIDS-, Glibenclamid- und Tenidap-insensitiv (Abb. 5, Abb. 10, Abb. 14 und Abb. 16). Eine Nifluminsäure-Sensitivität konnte schon bei verschiedenen Anionenaustauschern nachgewiesen werden (COUSIN u. MOTAIS 1979; LACOSTE et al. 1991; CONEJERO et al. 1997; LOPEZ et al. 1999; TYAGI et al. 2002). Auch eine Hemmung von DRA und PAT1 durch Nifluminsäure wurde bereits gezeigt (CHERNOVA et al. 2003; 2005). CHERNOVA et al. (2003, 2005) konnten DRA und PAT1 zusätzlich auch mit Tenidap hemmen. In den eigenen Untersuchungen hatte Tenidap allerdings keinen Einfluss auf die Acetataufnahme.

DIDS stellt für den PAT1 einen wirksamen Hemmstoff dar (JIANG et al. 2002; WANG et al. 2002; PETROVIC et al. 2002), während DRA und MCT4 weitestgehend insensitive gegenüber DIDS sind (SILBERG et al. 1995; MANNING-FOX et al. 2000; LAMPRECHT et al. 2005; ROSSMANN et al. 2005). Im Rahmen der eigenen Ergebnisse bestand keine DIDS-Sensitivität der Acetataufnahme (Abb. 5, Abb. 15 und Abb. 16). Die nicht vorhandene DIDS-Sensitivität deutet darauf hin, dass der hier untersuchte SCFA⁻/HCO₃⁻-Austausch am Pansen eher durch den DIDS-insensitiven DRA und / oder MCT4 (oder eine andere MCT-Isoform) als durch den DIDS-sensitiven PAT1 vermittelt sein könnte.

Zur Postulierung einer stärkeren Beteiligung von DRA und / oder MCT4 an einem SCFA⁻/HCO₃⁻-Austausch als von PAT1 können auch die vergleichenden Studien an isoliertem Pansengewebe und kultivierten Pansenepithelzellen herangezogen werden. Die semiquantitative Analyse auf mRNA-Ebene zeigte, dass PAT1 im Pansengewebe geringer exprimiert war als in den kultivierten Pansenepithelzellen (Abb. 39). DRA wird hingegen im Pansengewebe deutlich exprimiert, während in den kultivierten Pansenepithelzellen keine Expression detektiert werden konnte (Abb. 39). Bei den Ergebnissen der pH_i-Messungen an kultivierten Pansenepithelzellen zeigte sich die Existenz eines Cl⁻/HCO₃⁻-Austauschers nach Umkehr der Transportrichtung von Chlorid (Abb. 22). Nach der Umkehr des Chloridgradienten trat eine Alkalisierung ein, die auf einen Bikarbonatimport (mittels eines Cl⁻/HCO₃⁻-Austauschers) schließen lässt (Abb. 22). Im Gegensatz dazu konnten im Rahmen der pH_i-Messung kaum Befunde für die Existenz eines SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauscher erhoben werden, da die Kurven in HCO₃⁻-gepufferter und HEPES-gepufferter Lösung weitestgehend gleich verliefen (Abb. 23 und Abb. 24). Als einziges Zeichen für dessen Existenz könnte die signifikant geringere Gegenregulation in HCO₃⁻-gepufferter gegenüber der Gegenregulation in HEPES-gepufferter Lösung nach dem dritten Wechsel der Zellen in eine acetathaltige Lösung (Zeitpunkt: 1500 sec) gewertet werden (Abb. 23). Eine mögliche Erklärung ist eine Beladung der Zellen mit Bikarbonat vor dem Wechsel in die acetathaltige Lösung aufgrund einer Umkehr der Transportrichtung des Cl⁻/HCO₃⁻-Austauschers, die nur in der HCO₃⁻-gepufferten Lösung erfolgen konnte. Nach dem Wechsel in die acetathaltige Lösung zeigte sich dann eine Aktivität des SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauschers, der durch den Bikarbonatexport die pH_i-Gegenregulation verhinderte (Abb. 23). Beim ersten Wechsel der Zellen zum Zeitpunkt von 300 sec konnte allerdings kein Unterschied in HCO₃⁻-gepufferter und HEPES-gepufferter Lösung festgestellt werden, was somit insgesamt auf eine nur geringe Aktivität eines SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauschers in den kultivierten Pansenepithelzellen hindeutet. Es erscheint deshalb denkbar, dass die Expression eines SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauschers in den kultivierten Pansenepithelzellen aufgrund des Fehlens von SCFA im Kulturmedium stark reduziert wurde (Kap. 5.4). Da bei der Semiquantifizierung keine DRA-

Expression in den kultivierten Pansenepithelzellen auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnte (Abb. 39 und Kap. 5.4), könnte die Defizienz des SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauschers in den kultivierten Pansenepithelzellen durch die Defizienz des DRA erklärt werden. Daraus lässt sich die These formulieren, dass ein PAT1 im Pansen eher als Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher fungiert, wohingegen der DRA möglicherweise an einem SCFA⁻/HCO₃⁻-Austausch beteiligt sein könnte. Ein MCT1 kann aufgrund seiner Lokalisation im Pansenepithel als strukturelle Grundlage eines apikalen SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauschers ausgeschlossen werden. Eine andere MCT-Isoform, wie zum Beispiel der MCT4 könnte jedoch an der apikalen SCFA-Aufnahme im Austausch mit Bikarbonat beteiligt sein.

5.3 Bikarbonatunabhängiger proteinvermittelter Transport von Acetat

Die bisher dargestellten Ergebnisse machten deutlich, dass neben der Diffusion der undissoziierten Säure ein bikarbonatabhängiger proteinvermittelter Mechanismus an der Acetataufnahme beteiligt ist. Darüber hinaus konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die SCFA-Aufnahme in das Pansenepithel durch einen bikarbonatunabhängigen proteinvermittelten Mechanismus unterstützt wird. Deutlich wurde der bikarbonatunabhängige proteinvermittelte Mechanismus durch die Hemmung der Acetataufnahme durch Nitrat in einer HEPES-gepufferten Lösung. So konnte die Acetataufnahme bei 0,5 mM und auch 10 mM Acetat in HCO₃⁻-gepuffertes und HEPES-gepuffertes Lösung mit Nitrat auf den gleichen Wert gehemmt werden (Abb. 9A/B/C/D). Das heißt, dass die inhibitorische Wirkung von Nitrat bei beiden Acetatkonzentrationen signifikant stärker war als die einer Bikarbonatsubstitution. Die Hemmung der bikarbonatunabhängigen Acetataufnahme durch Nitrat konnte im Weiteren auch bei 5, 10, 15, 20, 30, 40 und 60 mM Acetat festgestellt werden (Abb. 12). Dabei zeigte sich auch, dass der bikarbonatunabhängige Mechanismus selbst bei Acetatkonzentrationen von bis zu 60 mM etwa ein Drittel der gesamten Acetataufnahme ausmachte (Abb. 12). Unter den gegebenen Versuchsbedingungen war also neben dem bikarbonatabhängigen Anteil der Acetataufnahme noch ein zweiter, bikarbonatunabhängiger, nitratsensitiver Anteil der Acetataufnahme existent, der möglicherweise eine ähnlich große Bedeutung für die Acetataufnahme *in vivo* hat wie der bikarbonatabhängige Mechanismus. Der Aspekt einer bikarbonatunabhängigen proteinvermittelten Acetataufnahme stellt eine völlig neue Erkenntnis bezüglich der Acetataufnahme im Pansenepithel dar.

5.3.1 Funktionelle Eingrenzung der bikarbonatunabhängigen proteinvermittelten Acetataufnahme

Der in der vorliegenden Arbeit erstmals nachgewiesene bikarbonatunabhängige proteinvermittelte Mechanismus der Acetataufnahme sollte im Weiteren funktionell eingehender charakterisiert werden.

Da Nifluminsäure neben Nitrat schon den bikarbonatabhängigen Mechanismus der Acetataufnahme hemmen konnte, wurde ebenfalls ein möglicher Effekt auf den

bikarbonatunabhängigen Mechanismus getestet. Um Nifluminsäure als Inhibitor der bikarbonatunabhängigen Acetataufnahme vergleichend mit Nitrat zu untersuchen, wurde der Effekt beider Hemmstoffe in An- bzw. Abwesenheit von Bikarbonat bei pH 7,4 ($[\text{HCO}_3^-]$: 22,5 bzw. 0 mM) und pH 6,1 ($[\text{HCO}_3^-]$: 1,1 bzw. 0 mM) analysiert. Die Acetataufnahme war bei pH 7,4 und pH 6,1 in Abwesenheit von Bikarbonat sowohl mit Nitrat als auch mit Nifluminsäure signifikant hemmbar (Abb. 10 und Abb. 15). Aufgrund dieser Nitrat- und Nifluminsäure-Sensitivität, die schon für die bikarbonatabhängige proteinvermittelte Acetataufnahme festgestellt werden konnte, ergeben sich zwei Möglichkeiten bezüglich der vermittelnden Proteine:

1. Die bikarbonatabhängige und die bikarbonatunabhängige proteinvermittelte Acetataufnahme erfolgen über den gleichen Mechanismus. Für diese These spricht die Tatsache, dass Nitrat und Nifluminsäure beide Komponenten hemmten und bei gleichzeitiger Applikation keine additive Wirkung ausübten (Abb. 16).
2. Die bikarbonatabhängige und die bikarbonatunabhängige proteinvermittelte Acetataufnahme könnte zumindest teilweise von verschiedenen Proteinen getragen werden. Auch dies ist aufgrund der hier erhobenen Ergebnisse denkbar. So führte Glibenclamid in Abwesenheit von Bikarbonat zu einer Hemmung der Acetataufnahme, während in Anwesenheit von Bikarbonat keine Hemmung erfolgte (Abb. 14 und Abb. 15). NPPB reduzierte in Anwesenheit von Bikarbonat nur bei 0,5 mM Acetat in der mukosalen Lösung die Aufnahme von Acetat signifikant, während es in Abwesenheit von Bikarbonat die Acetataufnahme nur bei 10 mM Acetat signifikant hemmte (Abb. 14 und Abb. 15). Allerdings kann dies nur als sehr vorsichtiger Hinweis auf zwei verschiedene Proteine bewertet werden, da in bikarbonathaltiger Lösung nicht unterschieden werden kann, ob die Hemmung der Acetataufnahme durch NPPB auf den bikarbonatabhängigen oder auf den bikarbonatunabhängigen Anteil der Acetataufnahme entfiel. Zusätzlich zu NPPB und Glibenclamid führten auch Flufenaminsäure und Tamoxifen zu einer signifikanten Reduktion der Acetataufnahme in Abwesenheit von Bikarbonat. Allerdings wurde der Einfluss dieser Substanzen nicht in Anwesenheit von Bikarbonat untersucht (Abb. 15).

Als funktioneller Mechanismus für eine zusätzliche bikarbonatunabhängige Acetataufnahme können folgende Möglichkeiten in Betracht gezogen werden:

1. Die Beteiligung einer Anionenleitfähigkeit als bikarbonatunabhängiger Mechanismus der Acetataufnahme wäre denkbar. So konnten die Hemmstoffe Nifluminsäure, NPPB, Flufenaminsäure, Glibenclamid und Tamoxifen in anderen Studien bereits verschiedene Anionenkanäle wie CIC, CFTR, CaCC und ORCC hemmen (GYOMOREY 2000; JENTSCH et al. 2002; CRUICKSHANK et al. 2003; JIN et al. 2003; KIM et al. 2003; REYES et al. 2004; DEMION et al. 2006; LIANTONIO et al. 2007).
2. Neben einer Anionenleitfähigkeit könnte die bikarbonatunabhängige Acetataufnahme auch durch ein Carrierprotein vermittelt werden. Dieses Carrierprotein könnte sowohl ein elektroneutral-arbeitender Carrier als auch ein elektrogen-arbeitender Carrier sein. Für die Beteiligung eines Carrierproteins spricht die Tatsache, dass die bikarbonatunabhängige proteinvermittelte Acetataufnahme (Differenz der Acetataufnahme in HEPES-gepufferter Lösung und der Aufnahme in HEPES-gepufferter Lösung mit 60 mM NO_3^-) nicht-linear mit

ansteigenden Acetatkonzentrationen korrelierte (Kap. 4.1.4). Die Sättigungskinetik wies dabei eine U_{\max} von $8,57 \pm 1,10 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und eine K_m von $14,94 \pm 5,18 \text{ mM}$ auf.

Um zwischen einem elektroneutralen und einem elektrogenen Mechanismus der Acetataufnahme zu unterscheiden, wurden die Auswirkungen von Acetat und Nitrat auf die elektrophysiologischen Parameter untersucht. Die mukosale Erhöhung der Acetatkonzentration von 0 auf 40 mM führte in mukosal K^+ -freier, HEPES-gepufferter Lösung zu einem transienten Abfall des I_{sc} und zu einem geringen aber signifikanten, transienten Anstieg der G_t (Abb. 18A/B). Eine direkt- oder indirekt-elektrogene Komponente hatte hier somit Anteil am Acetattransport über das Epithel. Nach Depolarisation der apikalen Membran, durch Erhöhung der mukosalen K^+ -Konzentration auf 100 mM zeigte sich eine signifikante Zunahme des elektrogenen Acetattransportes in Form eines stärkeren Abfalls des I_{sc} (Abb. 18A/B und Abb. 19A/B). Die zusätzlich durchgeführte Untersuchung der Acetataufnahme in mukosal K^+ -freier, HEPES-gepufferter Lösung und in mukosal K^+ -reicher, HEPES-gepufferter Lösung zeigte, dass der nitratsensitive Anteil, also der proteinvermittelte Anteil der Acetataufnahme in K^+ -reicher Lösung signifikant größer war als in K^+ -freier Lösung (Abb. 20). Die Depolarisation durch eine K^+ -reiche Inkubation führte somit zu einem verstärkten Acetattransport. Diese Ergebnisse sind als Beleg für eine elektrogene Komponente der Acetataufnahme zu werten.

Da Nitrat zu einer Hemmung der Acetataufnahme in Abwesenheit von Bikarbonat führte (Abb. 9) und genauso wie Acetat mittels einer Anionenleitfähigkeit transportiert werden könnte, wurde auch der Einfluss von Nitrat auf die elektrophysiologischen Parameter untersucht. Es zeigte sich, dass Nitrat und Acetat einen gleichgerichteten Einfluss auf I_{sc} und G_t hatten (Abb. 18A/B und Abb. 19A/B). Die mukosale Erhöhung der Nitratkonzentration von 0 auf 40 mM in mukosal K^+ -freier, HEPES-gepufferter Lösung führte zu einem stärkeren I_{sc} -Abfall und einem stärkeren G_t -Anstieg als die Erhöhung der mukosalen Acetatkonzentration. Die Nitrateffekte auf G_t und I_{sc} waren aber in mukosal K^+ -freier und K^+ -reicher Lösung nicht unterschiedlich (Abb. 18A/B und Abb. 19A/B). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass beide, Nitrat und Acetat, transepithelial elektrogen transportiert werden können.

Geht man von einer zellulären Lokalisation der elektrogenen Komponente aus, so zeigte sich, dass zwar eine elektrogene Permeation von Acetat möglich ist, der Anteil dieser elektrogenen Permeation an der gesamten bikarbonatunabhängigen Acetataufnahme (inklusive der NO_3^- -insensitiven Acetataufnahme) aber rechnerisch nur ca. 3% ausmachte (gesamte bikarbonatunabhängige Acetataufnahme: $78,02 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$; elektrogene bikarbonatunabhängige Acetataufnahme: $2,5 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ (errechnet aus dem Abfall des Kurzschluss nach Erhöhung der Acetatkonzentration von 0 auf 40 mM)). Als mechanistische Grundlage dieser geringen, elektrogenen Permeation von Acetat sind einerseits ein elektrogenagierendes Carrierprotein und andererseits auch eine Anionenleitfähigkeit in Erwägung zu ziehen.

In der Arbeit konnte erstmals eine bikarbonatunabhängige proteinvermittelte Acetataufnahme nachgewiesen werden. Diese bikarbonatunabhängige, nitratsensitive Acetataufnahme wies mit einer U_{\max} von $8,57 \pm 1,10 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und einer K_m von $14,94 \pm 5,18 \text{ mM}$ das Verhalten

einer Sättigungskinetik auf. Als mechanistische Grundlage für diese Acetataufnahme kommt aufgrund der hier ermittelten Befunde ein elektroneutraler Carrier in Betracht. Zusätzlich existiert ein elektrogener Mechanismus, der aber zumindest unter den hier vorliegenden Versuchsbedingungen nur zu einem geringen Anteil an der Acetataufnahme beteiligt war.

5.3.2 Kandidatenproteine für eine bikarbonatunabhängige Acetataufnahme

Für die bikarbonatunabhängige proteinvermittelte Acetataufnahme am Pansenepithel sollte im Weiteren das Vorhandensein potentieller Transportproteine auf mRNA-Ebene untersucht werden.

Der Hauptanteil der bikarbonatunabhängigen proteinvermittelten Acetataufnahme scheint durch einen elektroneutralen Carrier vermittelt zu werden. Dabei ist es möglich, dass die bikarbonatabhängige und die bikarbonatunabhängige Acetataufnahme von zwei verschiedenen Transportproteinen vermittelt werden. Die gesamte proteinvermittelte Acetataufnahme wies dabei eine Mischkinetik auf (Abb. 13). Bei geringen Acetatkonzentrationen dominiert die bikarbonatunabhängige Acetataufnahme mit einer K_m von $14,9 \pm 5,2$ mM, während v.a. bei höheren Acetatkonzentrationen ein bikarbonatabhängiger Mechanismus mit einer K_m von $67,1 \pm 35,2$ mM verstärkt zum Tragen kommt (Kap. 4.1.4). Als Kandidatenproteine für den zweiten, eigenständigen, bikarbonatunabhängigen Mechanismus der Acetataufnahme sind DRA und PAT1 eher auszuschließen. Wie in Kap. 5.2.2 diskutiert, könnte der PAT1 möglicherweise als Cl^- -Austauscher fungieren, während DRA und MCT als wahrscheinlichere Kandidaten für einen bikarbonatabhängigen SCFA-Transport zu nennen sind. Dabei wird bezüglich des DRA ein Transport von Hydroxidionen anstelle des Bikarbonats diskutiert (MELVIN et al. 1999; ALREFAI et al. 2001; LAMPRECHT et al. 2005). Folglich könnte der DRA auch bikarbonatunabhängig operieren. Die Affinität des DRA gegenüber Hydroxidionen ist aber um ein Vielfaches geringer als diejenige gegenüber Bikarbonat. Deswegen ist für den ovinen DRA eher die Funktion eines bikarbonatabhängigen Mechanismus anzunehmen. Für die MCT-Isoformen wäre sowohl ein SCFA/ HCO_3^- -Austausch als auch ein SCFA/ H^+ -Kotransport denkbar. Beides wurde bereits in Oozytenexpressionsstudien nachgewiesen bzw. als Modell für den Menschen angenommen (MANNING-FOX et al. 2000; GILL et al. 2005; DUDEJA u. RAMASWAMY 2006). Allerdings wird vermutlich der Austausch von zwei Anionen (SCFA/ HCO_3^- -Austauscher) und der Kotransport von einem Proton und einem Anion (SCFA/ H^+ -Kotransport) durch zwei verschiedene MCT-Isoformen vermittelt, sofern ein MCT an beiden Transporten beteiligt ist. So wäre eine MCT-Isoform neben dem DRA ein potentielles Transportprotein für den bikarbonatabhängigen Mechanismus der Acetataufnahme, während eine andere MCT-Isoform als SCFA/ H^+ -Kotransporter eine elektroneutrale, bikarbonatunabhängige Acetataufnahme vermitteln könnte. GRAHAM et al. (2007) konnten den MCT2 mittels PCR und Immunhistochemie im Pansen des Rindes nachweisen. Die Autoren fanden eine diffuse Lokalisation in allen Schichten mit Ausnahme des Stratum corneum. Für den MCT4 konnten KIRAT et al. (2007) beim Rind eine Lokalisation im Stratum corneum sowie Stratum granulosum des Pansen immunhistochemisch nachweisen. Damit stellen der MCT4 und eventuell auch der MCT2 einen Kandidaten für die bikarbonatabhängige oder aber die bikarbonatunabhängige proteinvermittelte Acetataufnahme dar. Im Pansenepithel des Schafes ist

die Expression apikal lokalisierter MCT-Isoformen denkbar, jedoch bisher nicht experimentell belegt.

Wie in Kap. 5.3 gezeigt, konnte zusätzlich eine geringe Beteiligung eines elektrogenen Mechanismus an der bikarbonatunabhängigen Acetataufnahme nachgewiesen werden. Dabei könnte es sich sowohl um einen elektrogen agierenden Carrier als auch eine Anionenleitfähigkeit handeln. Auch für diesen elektrogenen Mechanismus wurde die Existenz möglicher struktureller Korrelate auf mRNA-Ebene untersucht.

Als elektrogen agierender Carrier könnte ein SMCT1 fungieren, dessen Existenz auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR und anschließender Sequenzierung nachweisbar war (Kap. 4.5.5). Der SMCT1 wurde wie auch der SMCT2 im Darm bereits als bikarbonatunabhängiger, elektrogener SCFA-Aufnahmemechanismus (Na^+ /SCFA-Kotransport) charakterisiert (SRINIVAS et al. 2005). Die apikale Lokalisation in Darm und Niere lassen den SMCT1 auch als Kandidaten für die elektrogene SCFA-Aufnahme im Pansen als möglich erscheinen (MIYAUCHI et al. 2004; SRINIVAS et al. 2005; GOPAL et al. 2004, 2005; PARODER et al. 2006). Aufgrund einer Stöchiometrie von 2 - 4 Na und 1 SCFA/Monocarboxylsäure, also einem effektiven Transport positiver Ladung, der zu einem Anstieg des I_{sc} führen müsste, stellen die eigenen Ergebnisse mit einem Abfall des I_{sc} die Beteiligung eines SMCT1 aber zumindest in Frage (MIYAUCHI et al. 2004; GOPAL et al. 2004, 2005). Ein Indiz für die mögliche Beteiligung eines SMCT an der apikalen SCFA-Aufnahme besteht allerdings in der Tatsache, dass pCMBS und Phloretin tendenziell zu einer Erhöhung der Acetataufnahme führten. GOPAL et al. (2004) fanden bei Oozytenexpressionsstudien ebenfalls eine um das 2-fache erhöhte Laktat- und Propionataufnahme bei Zugabe eines MCT-Hemmstoffes (α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure (CHC)). Dafür wurde von den Autoren der SMCT1 verantwortlich gemacht.

Nachdem sich auf funktioneller Ebene Hinweise ergaben, dass möglicherweise ein Anionenkanal am transepithelialen Acetattransport beteiligt ist, sollten im Weiteren in Frage kommende Proteine auf molekularer Ebene identifiziert werden. Mit Hilfe von RT-PCR Studien und anschließender Sequenzanalyse konnten Teilsequenzen der ovinen CFTR, CIC2, CIC4 und CIC5 im Pansenepithel ermittelt werden (Abb. 31, Abb. 32 und Abb. 35), die die Expression entsprechender Transporter zumindest auf mRNA-Ebene belegen. Der Nachweis eines CIC3 gelang hingegen nicht.

Potentielle Kandidaten für die strukturelle Grundlage einer Anionenleitfähigkeit stellen die Mitglieder der CIC-Familie dar, insbesondere da sie bis auf den CIC3 auf molekularer Ebene im Pansenepithel nachgewiesen werden konnten. CIC0 und CIC 1 können allerdings von vornherein ausgeschlossen werden. Der CIC0 ist der Chloridkanal im elektrischen Organ des Zitterrochens (JENTSCH et al. 2002) und war das zuerst identifizierte Mitglied der CIC-Familie. Der CIC1 wiederum ist ausschließlich im Skelettmuskel zu finden (JENTSCH et al. 2002). Der CIC2 hingegen stellt einen möglichen Kandidaten für einen basaloorientierten Anionenkanal im Pansen dar. Für den basolateralen CIC2 konnte bereits funktionell eine Chloridleitfähigkeit gezeigt werden (GYÖMÖREY et al. 2000). Der Nachweis eines CIC3 im Pansenepithel des Schafes gelang hier nicht. Als Kandidat für die hier postulierte Anionenleitfähigkeit ist ein CIC3 aufgrund der bisher nur intrazellulär nachgewiesenen Lokalisation als unwahrscheinlich anzusehen (JENTSCH et al. 2002,

2005). Über den CIC4 und den CIC5 ist bisher wenig bekannt (JENTSCH et al. 2005). Vermutlich handelt es sich hierbei entweder um endosomale Cl^-/H^+ -Austauscher oder um Chloridkanäle, die sowohl intrazellulär als auch in der Plasmamembran exprimiert sein können (JENTSCH et al. 2005). Für den CIC4 wurde bezüglich der Lokalisation ein gleiches Verteilungsmuster wie für den CFTR beschrieben (MOHAMMAD-PANAH et al. 2002). Deswegen ist davon auszugehen, dass er eher an einer apikalorientierten Chloridsekretion beteiligt ist. Der CIC5 stellt theoretisch eine mögliche strukturelle Grundlage für eine basaloorientierte Anionenleitfähigkeit im Pansen dar. Für diesen Kanal wurde an LLC-PK1 Zellen (proximale Tubuluszelllinie) folgendes Substratspektrum nachgewiesen: $\text{NO}_3 \gg \text{Cl} = \text{Br} > \text{I} > \text{Acetat} > \text{Gluconat}$ (DOWLAND et al. 2000). Damit konnte bereits gezeigt werden, dass der CIC5 Nitrat und auch Acetat als Substrat akzeptiert. Allerdings wird noch kontrovers diskutiert ob der CIC5 einen Anionenkanal darstellt oder aber als Cl^-/H^+ -Austauscher fungiert (JENTSCH et al. 2005).

Für den CFTR ist allgemein eine Leitfähigkeit sowohl für Nitrat (LINSDELL et al. 1997) als auch für Acetat (LINSDELL et al. 1997; ILLEK et al. 1999) nachgewiesen worden. Der CFTR ist im Magen-Darm-Trakt sowohl in der apikalen Zellmembran als auch in subapikalen Vesikeln lokalisiert (DENNING et al. 1992; AMEEN et al. 1999, 2000a, b; DOUCET et al. 2003). Aufgrund seiner apikalen Membranlokalisation und der eindeutig nachgewiesenen Anionenleitfähigkeit in anderen Epithelien des Magen-Darm-Trakts, stellt der CFTR von den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten potentiellen Kanalproteinen den wahrscheinlichsten für eine mögliche apikale Acetatileitfähigkeit dar.

5.4 Vergleichende Betrachtung der Transporterexpression auf mRNA-Ebene im intakten Pansenepithel und in kultivierten Pansenepithelzellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Semiquantifizierung die mRNA-Expression verschiedener, potentieller Bikarbonat- und SCFA-transportierender Proteine untersucht (Abb. 39). Dabei zeigte sich, dass die Expression zwischen Gewebe und Zellen je nach Transporter variierte (Abb. 39). Die unterschiedlichen Expressionslevel zwischen Gewebe und kultivierten Zellen für NBC, PAT1, DRA und MCT1 machen deutlich, dass in der Zellkultur die mRNA bestimmter Transporter schwächer und die anderer Transporter stärker exprimiert werden. Die Regulation der mRNA-Expression ist eine Möglichkeit, die Produktion nicht-benötigter Transportproteine auszuschalten und andere Transporter, die unter bestimmten Bedingungen häufiger benötigt werden, stärker zu exprimieren.

Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Transportern fällt insbesondere der DRA mit einem stark unterschiedlichen Expressionsniveau zwischen Pansengewebe (stark exprimiert) und kultivierten Zellen (nicht detektierbar) auf. Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedliche Expression könnte in der Funktion des DRA als $\text{SCFA}/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher begründet sein. So ist dessen Expression nur dann notwendig, wenn auch SCFA für eine Aufnahme in die Zellen zur Verfügung stehen. Das in der Arbeit verwendete Kulturmedium enthielt allerdings keine SCFA. Das

Fehlen des Substrates im Kulturmedium könnte in den kultivierten Pansenepithelzellen zur Einstellung der DRA mRNA-Expression geführt haben. Gleiches könnte auch für den MCT1 gelten, der in den kultivierten Zellen ebenfalls schwächer exprimiert wurde. Die Untersuchungen lieferten demnach erste Hinweise, dass am SCFA-Transport beteiligte Proteine einer Regulation auf mRNA-Ebene unterliegen. Da beide Proteine neben den SCFA auch HCO_3^- transportieren, müsste aufgrund ihres Fehlens das Bikarbonat auf anderem Weg befördert werden. Diese Funktion könnte der PAT1 übernehmen, der in den kultivierten Pansenepithelzellen signifikant stärker exprimiert wurde als im nativen Pansengewebe (Abb. 40). Des Weiteren liegt der Schluss nahe, dass der PAT1 als $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher fungiert, weswegen er im Pansengewebe aufgrund des geringen luminalen Chloridgehalts nicht so stark exprimiert ist wie in den kultivierten Pansenepithelzellen. Zusätzlich zu MCT1, DRA und PAT1 wurde mit dem von HUHN et al. (2003) und HUHN (2004) im Pansen näher charakterisierten NBC ein pH-regulativer Mechanismus in den kultivierten Pansenepithelzellen stärker exprimiert als im Pansengewebe. Möglicherweise kann dies auf die verringerte MCT1-Expression zurückgeführt werden. Der NBC könnte so die zellalkalisierende Wirkung eines schwächer exprimierten MCT1 kompensieren.

Um die Pansenepithelzellkultur auch als Modell für die SCFA-Aufnahme einsetzen zu können sind weiterführende Untersuchungen nötig. Dabei müsste die Transporterexpression nach Hinzufügen von SCFA in das Kulturmedium überprüft werden.

5.5 Zusammenfassende Betrachtung der möglichen Transportproteine

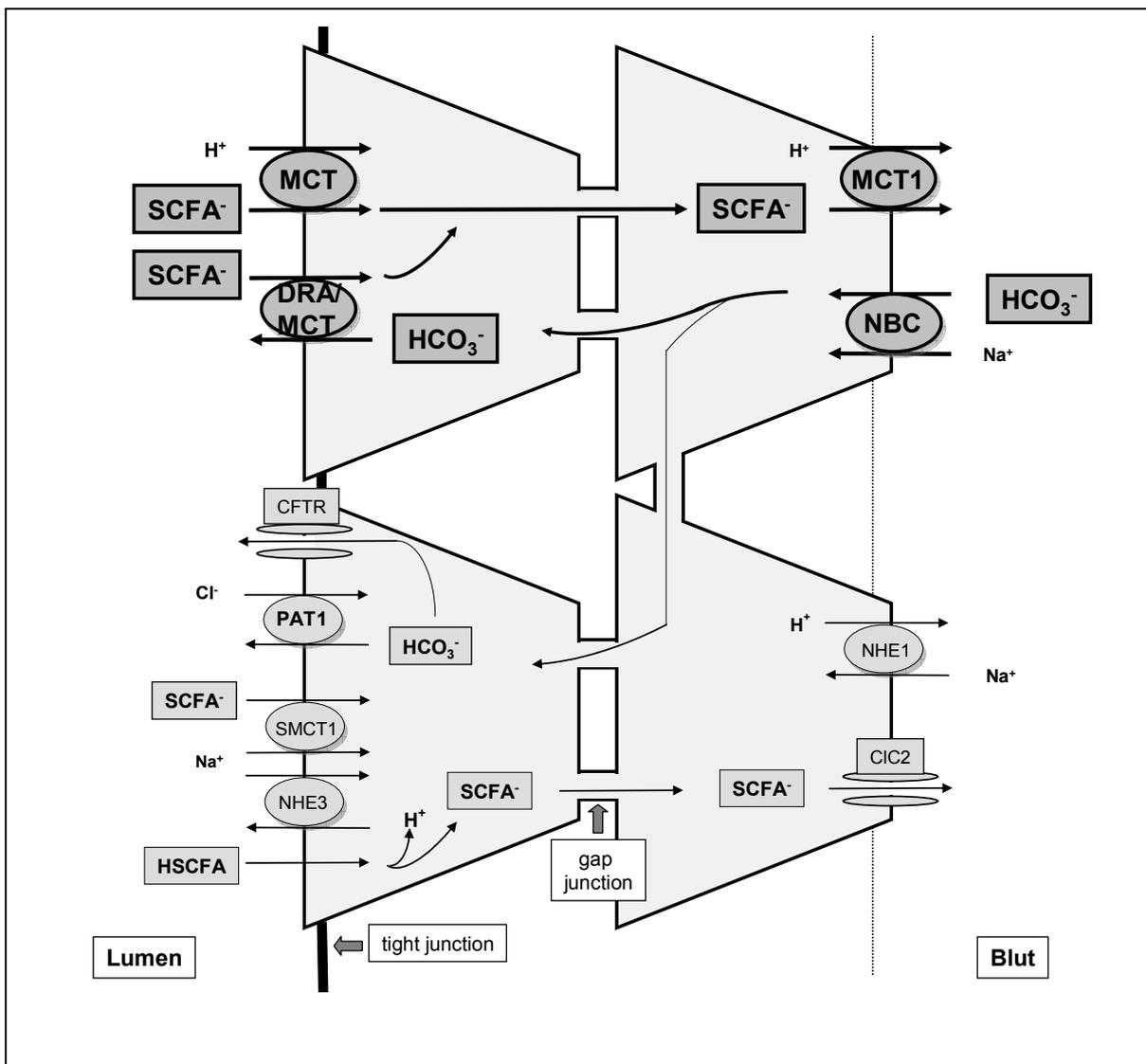


Abb. 40: *Erweitertes Modell der SCFA-Resorption im Pansenepithel des Schafes*
Das Modell wurde aus den Befunden der eigenen Arbeit zusammen mit Daten aus der Literatur erstellt. GRAHAM et al. (2007) stellten den NHE1 mittels Immunhistochemie im Pansen des Rindes zwar apikal dar, für das Schaf wurde von MÜLLER et al. (2000) und HUHN (2004) aber eine basolaterale Position beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben einer Diffusion der undissoziierten Säure für Acetat v.a. zwei weitere Mechanismen an der apikalen Aufnahme beteiligt sind. Diese sind:

1. Ein bikarbonatabhängiger, nitrat- und nifluminsäuresensitiver Mechanismus, der einen bedeutenden Teil der Acetataufnahme gewährleistet.
2. Ein bikarbonatunabhängiger, nitrat- und nifluminsäuresensitiver Mechanismus. Dies ist der erstmalige Nachweis, dass die SCFA-Aufnahme zumindest im Fall von Acetat bikarbonatunabhängig, aber proteinvermittelt erfolgen kann.

Als strukturelle Grundlage des bikarbonatabhängigen, nitratsensitiven Mechanismus können verschiedene Transportproteine in Betracht gezogen werden. Der MCT1 ist im Pansen als apikalorientierter SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauscher auszuschließen, da er im Pansen ausschließlich basolateral exprimiert wird (Kap. 2.2.5.3). Allerdings wären andere, apikalorientierte MCT-Isoformen, sofern sie als SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauscher fungieren, mögliche Proteine für eine bikarbonatabhängige SCFA-Aufnahme. Analog zu dem kürzlich von KIRAT et al. (2007) aufgestellten Modell ist hier der apikal-orientierte MCT4 als Kandidat zu benennen. Der PAT1 ist aufgrund der DIDS-Insensitivität der Acetataufnahme als apikaler SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauscher eher unwahrscheinlich. Vielmehr könnte der auf mRNA-Ebene nachgewiesene PAT1 im Pansen hauptsächlich einen Cl⁻/HCO₃⁻-Austausch vermitteln. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse scheint neben einer apikalorientierten MCT-Isoform der DRA von den bekannten HCO₃⁻-Austauschsystemen ein potentieller Kandidat für den SCFA⁻/HCO₃⁻-Austausch am Pansenepithel des Schafes zu sein. Folgende Gründe sprechen dafür:

- Die Acetataufnahme war DIDS-insensitiv. Dies wird für den DRA in der Literatur ebenfalls beschrieben (SILBERG et al. 1995; ALPER et al. 2001; LAMPRECHT et al. 2005; ROSSMANN et al. 2005).
- Die Acetataufnahme war sensitiv gegenüber Nifluminsäure. CHERNOVA et al. (2003) stellten eine Nifluminsäure-Sensitivität des DRA fest.
- Die Semiquantifizierung zeigte, dass der DRA in den kultivierten Zellen auf mRNA-Ebene nicht vorhanden war. In Übereinstimmung damit war die SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauscher-Aktivität in den kultivierten Zellen, soweit mit den pH_i-Messungen erfassbar, nur geringgradig ausgebildet.

Der bikarbonatunabhängige proteinvermittelte Acetattransport scheint zum größten Teil durch einen elektroneutralen, sättigbaren Mechanismus vermittelt zu werden (U_{max} : $8,6 \pm 1,1 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{Prot}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; K_m : $14,9 \pm 5,2 \text{ mM}$). Ein geringer Teil des transportierten Acetats, der möglicherweise quantitativ eine eher untergeordnete Rolle spielt, könnte das Epithel auch elektrogen permeieren. Für eine apikale, bikarbonatunabhängige proteinvermittelte Acetataufnahme sind damit verschiedene Möglichkeiten in Betracht zu ziehen:

1. MCT könnte bei apikalorientierter Lokalisation eine elektroneutrale bikarbonatunabhängige Aufnahme von SCFA im Pansenepithel vermitteln, sofern er als H⁺/SCFA⁻-Kotransporter fungieren würde.
2. Der SMCT1 könnte apikalorientiert einen elektrogenen bikarbonatunabhängigen Transport von SCFA im Pansenepithel vermitteln. Allerdings kann aufgrund der eigenen Untersuchungen davon ausgegangen werden, dass der SMCT1 keinen hauptsächlich Transportweg für SCFA darstellt.
3. Als elektrogener Transportmechanismus könnte auch eine Anionenleitfähigkeit (die allerdings ebenfalls keinen hauptsächlich Transportweg darstellt) an dem transepithelialen Acetattransport beteiligt sein. Als Kandidaten sind dabei der CFTR für eine apikal lokalisierte Anionenleitfähigkeit und der CIC2 für eine basolaterale Anionenleitfähigkeit zu nennen.

5.6 Bedeutung der transportproteinvermittelten Acetataufnahme für den Wiederkäuer

Die Resorption der kurzkettigen Fettsäuren aus dem Pansenlumen stellt nicht nur einen wichtigen Mechanismus für die Energiebereitstellung des Wiederkäuers dar, sondern ist auch von essentieller Bedeutung für die Aufrechterhaltung des intraruminalen Milieus (BERGMAN 1990). Eine Störung des intraruminalen Milieus und damit der mikrobiellen Aktivität durch ungenügendes Entfernen von mikrobiellen Fermentationsprodukten steht im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen des Wiederkäuers (RUSSELL u. RYCHLIK 2001). Von großer Bedeutung ist hierbei die Pansenazidose und damit einhergehende Symptome (DIRKSEN 1985, 1986; MARTENS 2005). Somit wird dem Pansenepithel die entscheidende Aufgabe zuteil, beste Bedingungen sowohl für das mikrobielle Ökosystem im Pansenlumen als auch für das Pansenepithel und das Tier selbst zu schaffen. Die Aufrechterhaltung des intraruminalen Milieus für Mikroben, welche als Lieferanten wichtiger Nährstoffe dienen (BREVES u. LEONHARD-MAREK 2005), ist somit von essentieller Bedeutung für den Organismus.

Insbesondere die bei hohen Milchleistungen notwendige energiereiche Fütterung führt zum Anfallen großer Mengen kurzkettiger Fettsäuren. Diese müssen aus dem Pansenlumen entfernt werden, um einem luminalen pH-Wertabfall entgegen zu wirken. Schon früher konnte gezeigt werden, dass die Adaptation des Pansenepithels an energiereiche Fütterung zwei Aspekte aufweist:

1. Die Vergrößerung der Oberfläche, die mit einer erhöhten Anzahl an Papillen und Epithelzellen sowie auch Kapillaren einhergeht (WEIGAND et al. 1975; DIRKSEN et al. 1984; SHEN et al. 2004).
2. Eine verstärkte Absorptionskapazität der einzelnen Epithelzellen (SEHESTED et al. 2000). Diese erhöhte, epitheliale Absorptionskapazität kann im Wesentlichen nur über vermehrt exprimierte Transportproteine realisiert werden.

GÄBEL et al. (1993) konnten eine starke Verminderung der absorptiven Kapazität für kurzkettige Fettsäuren bei Schafen, die einem Futtermangel ausgesetzt wurden, nachweisen. Somit stellen Transportproteine neben der reinen Oberflächenvergrößerung ein wichtiges Instrument der Adaptation des Pansenepithels an energiearme bzw. -reiche Fütterungen und damit Anpassung an das verminderte bzw. erhöhte Angebot an kurzkettigen Fettsäuren dar. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, welche im Rahmen der durchgeführten *in vitro* Untersuchungen zeigten, dass proteinvermittelte SCFA-Aufnahmemechanismen zumindest beim Acetat in höherem Maße am SCFA-Transport beteiligt zu sein scheinen, als die Diffusion der undissoziierten Säure. In Übereinstimmung damit konnten auch SEHESTED et al. (2000) zeigen, dass ein kurzer „SCFA-burst“ zu einer Erhöhung des SCFA-Transportes führte, ohne dabei morphologische Veränderungen hervorzurufen. Dies könnte bedeuten, dass die Expression der für den SCFA-Transport verantwortlichen Proteine durch die SCFA selbst verstärkt wird. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse lässt sich ebenfalls eine derartige Regulation SCFA-transportierender Proteine vermuten. So konnte in den kultivierten Pansenepithelzellen keine mRNA-Expression des

DRA, welcher anhand der vorliegenden Ergebnisse als wahrscheinlichstes Protein für die bikarbonatabhängige Acetataufnahme angenommen wird, festgestellt werden. Eine plausible Erklärung dafür wäre die Abwesenheit von SCFA im Kulturmedium der Pansenepithelzellen.

Im Rahmen der Adaptation ist sowohl eine erhöhte transepitheliale Elimination der SCFA als auch eine erhöhte epitheliale Bikarbonatsekretion wichtig. Letztere benötigt wiederum bikarbonat-transportierende Proteine, wie sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnten. Zudem stellt die mehrfach im Pansenepithel nachgewiesene Carboanhydrase intraepitheliales Bikarbonat bereit (AAFJES 1967; CARTER 1971; ASARI et al. 1989; AMASAKI et al. 1991). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten zwar daraufhin, dass die intraepitheliale Bikarbonatproduktion durch die Carboanhydrase unter den Versuchsbedingungen nur bei niedrigen Acetatkonzentrationen eine Rolle für die Acetataufnahme spielte (Abb. 9), das Substrat der Carboanhydrase, CO_2 , steht dem Pansenepithel *in vivo* jedoch in weitaus größeren Mengen zur Verfügung, als es in den vorliegenden Untersuchungen der Fall war. So wurden die verwendeten Pufferlösungen mit 5% CO_2 begast, während CO_2 *in vivo* mit 50 – 60 % den Hauptanteil der Gasfraktion im Pansenumen ausmacht (BREVES u. LEONHARD-MAREK 2005). Dieses CO_2 kann aufgrund seiner Lipophilie ungehindert mittels Diffusion der undissoziierten Säure die Zellmembran permeieren. Zudem wird CO_2 im intraepithelialen Metabolismus gebildet. Die epitheliale Konvertierung von Bikarbonat und die darauf folgende Bikarbonatsekretion über einen $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher könnte insbesondere bei der Adaptation an energiereiche Nahrung eine große Rolle spielen. Es konnte gezeigt werden, dass bei energiereicher Fütterung die Speichelproduktion, die auch einen gewissen Anteil an der Bikarbonatbereitstellung im Pansen hat, stark abnimmt, während die intraruminale SCFA-Produktion ansteigt (KAUFMANN et al. 1980; DIRKSEN 1985). Bei Schafen und Rindern, welche ein energiereiches Futter erhielten, wurde festgestellt, dass das Epithel eine größere Fähigkeit besaß, den intraruminalen pH-Wert anzuheben (GÄBEL et al. 1991a; DIRKSEN et al. 1992; WEISS 1994). Die Anhebung des pH-Wertes ging einher mit einer SCFA-abhängigen Bikarbonatsekretion. Diese Ergebnisse zeigen, dass unter energiereicher Fütterung eine vermehrte Bikarbonatsekretion erfolgen kann (GÄBEL et al. 1991a). Dieses Bikarbonat muss für die Sekretion bereitgestellt werden. Zwar konnte das extrazelluläre Bikarbonat im Rahmen der eigenen Untersuchungen nur bei 0,5 mM Acetat in der mukosalen Lösung ausreichend durch die intraepitheliale Bikarbonatproduktion ersetzt werden, es gilt aber zu bedenken, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen kein extrazelluläres CO_2 zur Verfügung stand. So könnte die intraepitheliale Bikarbonatproduktion unter *in vivo* Bedingungen und insbesondere auch bei energiereicher Fütterung an Bedeutung gewinnen.

Neben der Aufrechterhaltung des luminalen Milieus durch Resorption von SCFA und Sekretion von Bikarbonat, spielen die Transportproteine ebenfalls bei der Regulation des intraepithelialen Milieus eine große Rolle. Da es durch Dissoziation der aufgenommenen HSCFA zu einer starken intrazellulären Ansäuerung kommt, ist das Pansenepithel selbst einer großen Säurebelastung ausgesetzt. Auch die Aufnahme durch einen $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher führt zu einer gewissen pH_i -Wertabsenkung, da Bikarbonat sezerniert wird und damit Pufferkapazität für die Epithelzellen verloren geht. Um einem zu starken pH-Wertabfall entgegen zu wirken, besitzt das Pansenepithel mit dem NHE1, dem NBC1, einer vakuolären H^+ -ATPase und einem MCT1 effektive Mechanismen für die pH_i -Regulation (MÜLLER et al. 2000, 2002; HUHNS et al. 2003; SCHWEIGEL u. MARTENS

2003; ETSCHMANN et al. 2006). Abhängig von der Funktionsweise des in dieser Arbeit erstmals nachgewiesenen bikarbonatunabhängigen Mechanismus, könnte dieser dem Epithel zudem die Möglichkeit der SCFA-Aufnahme, ohne Gefährdung des intraepithelialen pH-Wertes bieten.

6 Zusammenfassung

Sabine Bilk

Mechanismen der anionischen SCFA-Resorption im Pansen des Schafes

Veterinär-Physiologisches Institut, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im September 2007

107 Seiten, 40 Abbildungen, 8 Tabellen, 296 Literaturstellen, 6 Anhänge

Aufnahme kurzkettiger Fettsäuren, Pansenepithel, SCFA/HCO₃⁻-Austauscher

Die im Reticulorumen als Endprodukte der mikrobiellen Fermentation in großen Mengen anfallenden und direkt resorbierten kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat spielen für den Wiederkäuer eine zentrale Rolle bei der Deckung seines Energiebedarfs. Trotz dieser herausragenden Bedeutung der SCFA-Resorption gibt es heute noch kein generell anerkanntes Modell für die Transportwege kurzkettiger Fettsäuren im Pansenepithel. In dieser Arbeit wurde die apikale Aufnahme von radioaktiv markiertem Acetat in das Pansenepithel gemessen. Acetat ist die mengenmäßig bedeutendste kurzkettige Fettsäure. Zusätzlich wurden elektrophysiologische Studien zur Erfassung des transepithelialen Kurzschlussstromes und der transepithelialen Leitfähigkeit mit Hilfe der Ussing-Kammer-Technik durchgeführt. Aufgrund der Tatsache, dass der extra- und intrazelluläre pH-Wert und die Aufnahme kurzkettiger Fettsäuren in das Pansenepithel einander gegenseitig beeinflussen, wurden zusätzlich Messungen des intrazellulären pH-Wertes an primärkultivierten Pansenepithelzellen durchgeführt. In Ergänzung der funktionellen Untersuchungen wurde das Vorhandensein potentieller SCFA-Transportproteine auf mRNA-Ebene molekularbiologisch untersucht.

Bezüglich der anionischen Acetatresorption in das Pansenepithel des Schafes konnten folgende Befunde erhoben werden:

- Ein Teil der Acetataufnahme erfolgt bikarbonatabhängig. Dieser bikarbonatabhängige Mechanismus stellte sich im Rahmen der funktionellen Untersuchungen als nitrat- und nifluminsäuresensitiv dar.
- Ein weiterer Teil der Acetataufnahme erwies sich als bikarbonatunabhängig aber ebenfalls nitrat- und nifluminsäuresensitiv.
- Die Messungen des intrazellulären pH-Wertes (pH_i) zeigten, dass der hemmende Einfluss von Nitrat auf die Acetataufnahme nicht durch eine Beeinflussung des pH_i hervorgerufen wurde. Nifluminsäure veränderte zwar den pH_i, die Untersuchungen der Acetataufnahme machten aber deutlich, dass Nifluminsäure keine additive Wirkung zu Nitrat hatte.
- Die Messung des transepithelialen Kurzschlussstromes (I_{sc}) zeigte, dass es nach mukosaler Acetatzugabe in bikarbonatfreier Lösung zu einem signifikanten Abfall des I_{sc} kam. Bei Berechnung der Acetatmenge, die diesem I_{sc}-Abfall zugrunde lag, war festzustellen, dass dieser elektrogene Teil der bikarbonatunabhängigen Acetataufnahme wahrscheinlich nur ca. 3% der insgesamt erfolgten bikarbonatunabhängigen Acetataufnahme ausmacht.
- Im Rahmen der intrazellulären pH-Wertmessungen zeigte sich nach Entfernen von extrazellulärem Chlorid in HCO₃⁻-haltiger Lösung eine starke, reversible Alkalisierung der Zellen.

- Auf mRNA Ebene gelang erstmals der Nachweis der Carrierproteine DRA (SLC26A3), PAT1 (SLC26A6), SMCT1 (SLC5A8) und auch des CFTR sowie der potentiellen Anionenleitfähigkeiten CIC2, CIC4 und CIC5 im Pansenepithel des Schafes.
- Mit Hilfe der Semiquantifizierung konnte eine unterschiedliche Expression von NBC, MCT1, DRA und PAT1 auf mRNA-Ebene im Pansengewebe und in den primärkultivierten Pansenepithelzellen nachgewiesen werden. Dabei waren DRA und MCT1 im Pansengewebe, NBC und PAT1 hingegen in den kultivierten Pansenepithelzellen signifikant stärker exprimiert. Bei NHE1 und AE2 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Pansengewebe und kultivierten Pansenepithelzellen.

Die Sensitivität der bikarbonatabhängigen und der bikarbonatunabhängigen Acetataufnahme gegenüber Nitrat und Nifluminsäure zeigte, dass an beiden Transportwegen ein (oder mehrere) Protein(e) beteiligt ist (sind). Damit konnte mit Hilfe der Uptake-Technik die Existenz eines SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauschers weiter verifiziert werden. Der funktionelle Nachweis einer bikarbonatunabhängigen proteinvermittelten apikalen SCFA-Aufnahme stellt für das Pansenepithel eine völlig neue Erkenntnis dar. An den kultivierten Pansenepithelzellen konnten Hinweise für die Existenz eines Cl⁻/HCO₃⁻-Austauschers erhoben werden. Das Vorhandensein eines SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauschers in den kultivierten Zellen kann aufgrund der hier durchgeführten Untersuchungen nicht eindeutig bestätigt werden, da die Veränderungen des pH_i auch auf die Diffusion der undissoziierten Säure zurückgeführt werden können. Möglicherweise ist ein SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauscher in den kultivierten Pansenepithelzellen aufgrund des Fehlens von SCFA im Kulturmedium herabreguliert.

In der vorliegenden Arbeit konnten verschiedene Proteine (DRA, PAT1, CFTR, CIC2, 4 und 5 sowie SMCT1) erstmals auf mRNA-Ebene im Pansenepithel des Schafes nachgewiesen werden. Alle diese Proteine könnten potentiell am Transport von SCFA durch das Pansenepithel beteiligt sein. Eine vollständige Struktur-Funktions-Beziehung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Bezieht man aber die Ergebnisse der Semiquantifizierung in die Betrachtung der Ergebnisse der pH_i-Messung und der Ussing-Kammer Untersuchung mit ein, so wäre ein Modell denkbar, in dem der PAT1 vorwiegend als Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher, der DRA, der in den kultivierten Pansenepithelzellen im Rahmen der Semiquantifizierung nicht nachgewiesen werden konnte, hingegen vorwiegend als apikaler SCFA⁻/HCO₃⁻-Austauscher fungiert. Die bikarbonatunabhängige proteinvermittelte apikale Acetataufnahme scheint zum größten Teil elektroneutral zu erfolgen. Als Protein könnte eine MCT-Isoform daran beteiligt sein. Ein geringer Anteil der transepithelialen bikarbonatunabhängigen Acetatresorption scheint elektrogen zu erfolgen. Hier wäre sowohl die Beteiligung einer Anionenleitfähigkeit (z.B. der CFTR) als auch die Beteiligung eines elektrogenen Carriers (z.B. der SMCT1) denkbar.

7 Summary

Sabine Bilk

Mechanisms of anionic SCFA absorption in the rumen of sheep

Institute of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in September 2007

107 pages, 40 figures, 8 tables, 296 references, 8 appendices

Absorption of short chain fatty acids, rumen epithelium, SCFA/HCO₃⁻ exchanger

In the reticulorumen, large amounts of short chain fatty acids (acetate, propionate and butyrate) are microbially produced and directly absorbed. These SCFA play a major role in covering the energy requirement of ruminants. Despite the importance of SCFA absorption, there is no generally accepted model for transport pathways of SCFA. To evaluate transport mechanisms for short chain fatty acids, the apical uptake of radioactively labelled acetate was measured. Acetate is the quantitatively most important SCFA. Furthermore, transepithelial short-circuit current and transepithelial conductance were measured by using the Ussing chamber technique. Concerning the close relationship between the uptake of short chain fatty acids into the ruminal epithelium and the extra- and intracellular pH, dynamic changes of the intracellular pH were detected. In addition, the presence of potential SCFA transport proteins was investigated on mRNA level to complement the functional results.

Concerning anionic acetate absorption into the ruminal epithelium of sheep, the following results were obtained:

- Part of acetate uptake was bicarbonate-dependent. The bicarbonate-dependent mechanism was nitrate- and niflumic acid-sensitive.
- A second part of acetate uptake was bicarbonate-independent but nitrate- and niflumic acid-sensitive as well.
- Measurement of intracellular pH showed that the inhibiting influence of nitrate on acetate uptake did not arise from an influence on intracellular pH. Niflumic acid altered the pH_i. However nitrate and niflumic acid applied together had no additive effects on acetate uptake.
- Measurement of the transepithelial short-circuit current (I_{sc}) showed a significant decrease of I_{sc} in bicarbonate-free solution after mucosal acetate application. Although the calculated amount of acetate inducing this drop of I_{sc} was only 3% of total bicarbonate-independent acetate uptake, this decrease of I_{sc} is an indication for an electrogenic mechanism being involved in bicarbonate-independent acetate uptake.
- After removal of extracellular chloride in a bicarbonate-containing solution, a large, reversible alkalinization of pH_i was observed.
- The carrier proteins DRA (SLC26A3), PAT1 (SLC26A6), SMCT1 (SLC5A8) as well as the possible anion conductances CFTR, CIC2, 4 and 5 were confirmed on mRNA level in the ruminal epithelium of sheep for the first time.
- Different expression levels of NBC, MCT1, DRA and PAT1 could be detected on mRNA level in ruminal epithelium and in primary cultured ruminal epithelial cells by semiquantification. DRA and MCT1 were higher expressed in the ruminal epithelium whereas NBC and PAT1 were

higher expressed in cultured ruminal epithelial cells. Expression of NHE1 and AE2 was not significantly different between ruminal epithelium and cultured ruminal epithelial cells.

Sensitivity of both bicarbonate-dependent and bicarbonate-independent acetate uptake against nitrate and niflumic acid demonstrate that one (or more) protein-mediated mechanism(s) are involved in this transport pathways. Using the uptake technique the existence of a SCFA⁻/HCO₃⁻ exchanger could be verified. The functional confirmation of bicarbonate-independent protein-mediated SCFA uptake in the ruminal epithelium is a novel finding. In cultured ruminal epithelial cells, hints for the existence of a Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger were obtained. By contrast, existence of a SCFA⁻/HCO₃⁻ exchanger could not be verified on the level of intracellular pH-measurement, because changes of pH_i determined could both be due to bicarbonate-dependent protein-mediated mechanism as well as diffusion of undissociated acid. Possibly, a SCFA⁻/HCO₃⁻ exchanger was absent in the cultured ruminal epithelial cells because of the missing SCFA in the nutrient solution. In the work presented, various proteins (DRA, PAT1, CFTR, CIC2, 4 und 5 as well as SMCT1) were detected on mRNA-level in ruminal epithelium of sheep for the first time. All these proteins might be involved in acetate transport across ruminal epithelium. However a clear structure-function relationship could not be determined. But relating semiquantification to the results of pH_i-measurement and Ussing-chamber experiments, a model can be assumed, where PAT1 mediates predominantly Cl⁻/HCO₃⁻ exchange. In this model DRA, which could not be detected in the cultured ruminal epithelial cells by semiquantification, might be the predominant apical SCFA⁻/HCO₃⁻ exchanger in the intact ruminal epithelium. The observed bicarbonate-independent mechanism seems to be electroneutral for the most part. An MCT isoform is a possible candidate for this bicarbonate-independent acetate uptake. Finally, small parts of transepithelial acetate absorption were mediated by an electrogenic transport. This electrogenic transport might be facilitated by an anion conductance (for example CFTR) or an electrogenic carrier (for example SMCT1).

8 Literaturverzeichnis

- Aafjes JH. Carbonic anhydrase in the wall of the forestomachs of cows. *Br Vet J.* 1967;123:252-6.
- Adachi S, Uchida S, Ito H, Hata M, Hiroe M, Marumo F, Sasaki S. Two isoforms of a chloride channel predominantly expressed in thick ascending limb of Henle's loop and collecting ducts of rat kidney. *J Biol Chem.* 1994;269:17677-83.
- Akabas MH. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. *J Biol Chem.* 2000;275:3729-32.
- Akiba Y, Jung M, Ouk S, Kaunitz JD. A novel small molecule CFTR inhibitor attenuates HCO_3^- secretion and duodenal ulcer formation in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;289:G753-9.
- Ali O, Shen Z, Tietjen U, Martens H. Transport of acetate and sodium in sheep omasum: mutual, but asymmetric interactions. *J Comp Physiol [B].* 2006;176:477-487.
- Alper SL, Chernova MN, Stewart AK. Regulation of Na^+ -independent $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchangers by pH. *JOP.* 2001;2:171-5.
- Alper SL, Darman RB, Chernova MN, Dahl NK. The AE gene family of $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchangers. *J Nephrol.* 2002;15:S41-53.
- Alper SL, Rossmann H, Wilhelm S, Stuart-Tilley AK, Shmukler BE, Seidler U. Expression of AE2 anion exchanger in mouse intestine. *Am J Physiol.* 1999;277:G321-32.
- Alrefai WA, Tyagi S, Mansour F, Saksena S, Syed I, Ramaswamy K, Dudeja PK. Sulfate and chloride transport in Caco-2 cells: differential regulation by thyroxine and the possible role of DRA gene. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;280:G603-13.
- Alvarez BV, Kieller DM, Quon AL, Markovich D, Casey JR. Slc26a6: a cardiac chloride-hydroxyl exchanger and predominant chloride-bicarbonate exchanger of the mouse heart. *J Physiol.* 2004;1561:721-34.
- Amasaki H, Matsumoto S, Daigo M. Distributions of fibronectin, laminin, type I and IV collagens and carbonic anhydrase isozyme III during bovine ruminal epithelial development. *Acta Anat (Basel).* 1991;140:169-74.
- Ameen NA, Alexis J, Salas PJ. Cellular localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in mouse intestinal tract. *Histochem Cell Biol.* 2000a;114:69-75.
- Ameen NA, Marino C, Salas PJ. cAMP-dependent exocytosis and vesicle traffic regulate CFTR and fluid transport in rat jejunum *in vivo*. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;284:C429-38.

- Ameen NA, Martensson B, Bourguignon L, Marino C, Isenberg J, McLaughlin GE. CFTR channel insertion to the apical surface in rat duodenal villus epithelial cells is upregulated by VIP *in vivo*. *J Cell Sci.* 1999;112(Pt 6);887-94.
- Ameen NA, Van Donselaar E, Posthuma G, De Jonge H, McLaughlin GE, Geuze HJ, Marino C, Peters PJ. Subcellular distribution of CFTR in rat intestine supports a physiologic role for CFTR regulation by vesicle traffic. *Histochem Cell Biol.* 2000b;114:219-28.
- Annison EF, Armstrong DG. Volatile fatty acid metabolism and energy supply. In: Phillipson AT, Hrsg. *Physiology of Digestion and Metabolism in Ruminants.* Newcastle-upon-Tyne, Oriel Press; 1970. S. 422-37
- Annison EF, Hill KJ, Lewis D. Studies on the portal blood of sheep. II. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of the sheep. *Biochem J.* 1957;66;592-9.
- Argenzio RA, Southworth M, Lowe JE, Stevens CE. Interrelationship of Na, HCO₃, and volatile fatty acid transport by equine large intestine. *Am J Physiol.* 1977;233:E469-78.
- Argenzio RA, Whipp SC. Interrelationship of sodium, chloride, bicarbonate and acetate transport by the colon of the pig. *J Physiol.* 1979;295:365-81.
- Asari M, Sasaki K, Kano Y, Nishita T. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isozymes I, II and III in the bovine salivary glands and stomach. *Arch Histol Cytoll.* 1989;52:337-44.
- Aschenbach JR, Oswald R, Gäbel G. Transport, catabolism and release of histamine in the ruminal epithelium of sheep. *Eur J Physiol.* 2000;440:171-8.
- Baldwin RL 6TH, Jesse BW. Developmental changes in glucose and butyrate metabolism by isolated sheep ruminal cells. *J Nutr.* 1992;122:1149-53.
- BarcroftJ, McAnally RA, Phillipson AT. Absorption of volatile acids from the alimentary tract of sheep and other animals. *J Exp Biol.* 1944;20:120-29
- Bear CE, Duguay F, Naismith AL, Kartner N, Hanrahan JW, Riordan JR. Cl⁻ channel activity in *Xenopus* oocytes expressing the cystic fibrosis gene. *J Biol Chem.* 1991;266:19142-5.
- Becker HM, Deitmer JW. Carbonic anhydrase II increases the activity of the human electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter. *J Biol Chem* 2007;282:13508-21
- Bergman EN. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev.* 1990;70:567-90.
- Bergman EN, Reid RS, Murray MG, Brockway JM, WHhitelaw FG. Interconversions and production of volatile fatty acids in the sheep rumen. *Biochem J.* 1965;97:53-8.
- Bertrand CA, Frizzell RA. The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *Am J Physiol.* 2003;285:C1-18.

- Binder HJ, Mehta P. Short-chain fatty acids stimulate active sodium and chloride absorption *in vitro* in the rat distal colon. *Gastroenterology*. 1989;96:989-96.
- Binder HJ, Rajendran V, Sadasivan V, Geipel JP. Bicarbonate transport: a neglected aspect of colonic ion transport. *J Clin Gastroenterol*. 2005;39:S53-6.
- Breves G, Leonhard-Marek S. Verdauungsvorgänge in den Vormägen. In Von Engehardt W, Breves G, Hrsg. *Physiologie der Haustiere*. 2. Aufl. Enke Verl Stuttgart; 2005. S. 357-66
- Britton R, Kregbiel C. Nutrient metabolism by gut tissues. *J Dairy Sci*. 1993;76:2125-31.
- Brown CD, Dudley AJ. Chloride channel blockers decrease intracellular pH in cultured renal epithelial LLC-PK1 cells. *Br J Pharmacol* 1996;118:443-4.
- Bugaut M. Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. *Comp Biochem Physiol B*. 1987;86:439-72.
- Busche R, Bartels J, Engelhardt Wv. Regulation of intracellular pH in the colonic epithelial cell line HT29 clone 19A. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 1995;102:161-2.
- Busche R, Dittmann J, Meyer Zu Duttingdorf HD, Glockenthor U, Engelhardt Wv, Sallmann HP. Permeability properties of apical and basolateral membranes of the guinea pig caecal and colonic epithelia for short-chain fatty acids. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1565:55-63.
- Byeon MK, Westermann MA, Maroulakou IG, Henderson KW, Suster S, Zhang XK, Papas TS, Veseley J, Willingham MC, Green JE, Schweinfest CW. The down-regulated in adenoma (DRA) gene encodes an intestine specific membrane glycoprotein. *Oncogene*. 1996;12:387-96.
- Byeon MK, Frankel A, Papas TS, Henderson KW, Schweinfest CW. Human DRA functions as a sulfate transporter in Sf9 insect cells. *Protein Expr Purif*. 1998;12:67-74.
- Calonge ML, Molina MT, Ilundain A. Cl⁻/base exchange and cellular pH regulation in enterocytes isolated from chick small intestine. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1103:45-50.
- Carpenter L, Halestrap AP. The kinetics, substrate and inhibitor specificity of the lactate transporter of Ehrlich-Lette tumour cells studied with the intracellular pH indicator BCECF. *Biochem J*. 1994;304(Pt3):751-60.
- Caroll EJ, Hungate RE. The magnitude of the microbial fermentation in the bovine rumen. *Appl Microbiol*. 1954;2:205-14.
- Carter MJ. The carbonic anhydrase in the rumen epithelial tissue of the ox. *Biochim Biophys Acta*. 1971;235:222-36.
- Castillo JE, Martinez-Anso E, Malumbres R, De Alava E, Garcia C, Medina JF, Prieto J. In situ localization of anion exchanger-2 in the human kidney. *Cell Tissue Res*. 2000;299:81-7.

- Catalan M, Cornejo I, Figueroa CD, Niemeyer MI, Sepulveda FV, Cid LP. CIC-2 in guinea pig colon: mRNA, immunolabeling, and functional evidence for surface epithelium localization. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;283:G1004-13.
- Charney AN, Micic L, Egnor RW. Nonionic diffusion of short-chain fatty acids across rat colon. *Am J Physiol.* 1998;274:G518-24.
- Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE. Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell.* 1991;66:1027-36.
- Chernova MN, Jiang L, Freedman DJ, Darman RB, LohiH, Kere J, Vandorpe DH, Alper SL. Functional comparison of mouse *slc26a6* anion exchanger with human SLC26A6 polypeptide variants: differences in anion selectivity, regulation, and electrogenicity. *J Biol Chem.* 2005;280:8564-80.
- Chernova MN, Jiang L, Shmukler BE, Schweinfest CW, Blanco P, Freedman DJ, Stewart AK, Alper SL. Acute regulation of the SLC26A3 congenital chloride diarrhoea anion exchanger (DRA) expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 2003;549:9-13.
- Chien WJ, Stevens CE. Coupled active transport of Na and Cl across forestomach epithelium. *Am J Physiol.* 1972;223:997-1003.
- Chu S, Montrose MH. (): Extracellular pH regulation in microdomains of colonic crypts: effects of short-chain fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:3303-7.
- Conejero C. Anion exchanger AE1 as a candidate pathway for taurine transport in rat erythrocytes. *Am J Physiol.* 1997;272:C1457-64.
- Counotte GM. Regulation of lactate metabolism in the rumen [Ph D thesis]. Utrecht: Universiteit Utrecht; 1981.
- Cousin JL, Motais R. Inhibition of anion permeability by amphiphilic compounds in human red cell: evidence for an interaction of niflumic acid with the band 3 protein. *J Membr Biol.* 1979;46:125-53.
- Crawford I, Maloney PC, Zeitlin PL, Guggino WB, Hyde SC, Turley H, Gatter KC, Harris A, Higgins CF. Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:9262-66.
- Cruickshank SF, Baxter LM, Drummond RM. The Cl⁻ channel blocker niflumic acid releases Ca²⁺ from an intracellular store in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 2003;140:1442-50.
- Cronert T, Gäbel G, Martens H. Propionsäuretransport über das isolierte Pansenepithel von Schafen. *Proc Soc Nutr Physiol.* 1993;1:14.
- Cuff MA, Lambert DW, Shirazi-Beechy SP. Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *J Physiol.* 2000;539:361-71.

Cummings JH. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut*. 1981;22:763-79.

Cuppoletti J, Malinowska DH, Tewari KP, LI QJ, Sherry AM, Patchen ML, Ueno R. SPI-0211 activates T84 cell chloride transport and recombinant human ClC-2 chloride currents. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287:C1173-83.

Dahan D, Evagelidis A, Hanrahan JW, Hinkson DA, Jia Y, Luo J, ZHU T. Regulation of the CFTR channel by phosphorylation. *Pflügers Arch*. 2001;443:S92-6.

Dalemans W, Hinrasky J, Slos P, Dreyer D, Fuchey C, Pavirani A, Puchelle E. Immunocytochemical analysis reveals differences between the subcellular localization of normal and delta Phe508 recombinant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Exp Cell Res*. 1992;201:235-40.

Danielli JF, Hitchcock MWS, Marshall RA, Phillipson AT. The mechanism of absorption from the rumen as exemplified by the behaviour of acetic, propionic and butyric acid. *J Exp Biol*. 1945;22:75-84.

Demion M, Guinamard R, El Chemaly A, Rahmati M, Bois P. An outwardly rectifying chloride channel in human atrial cardiomyocytes. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2006;17:60-8.

Denning GM, Ostedgaard LS, Cheng SH, Smith AE, Welsh MJ. Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in chloride secretory epithelia. *J Clin Invest*. 1992;89:339-49.

Deora AA, Philp N, Hu J, Bok D, Boulan-Rodriguez E. Mechanisms regulating tissue-specific polarity of monocarboxylate transporters and their chaperon CD147 in kidney and retina epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:16245-50.

Devuyst O, Christie PT, Courtoy PJ, Beauwens R, Thakker RV. Intrarenal and subcellular distribution of the human chloride channel, CLC-5, reveals a pathophysiological basis for Dent's disease. *Hum Mol Genet*. 1999;8:247-57.

Diernaes L, Sehested J, Moller PD, Skadhauge E. Sodium and chloride transport across the rumen epithelium of cattle *in vitro*: effect of short-chain fatty acids and amiloride. *Exp Physiol*. 1994;79:755-62.

Dijkstra J, Boer H, Van Bruchem J, Bruining M, Tamminga S. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. *Br J Nutr*. 1993;69:385-96.

Dirksen G. Der Pansenazidose-Komplex - neuere Erkenntnisse und Erfahrungen (1). *Tierärztl Prax*. 1985;13:501-12.

Dirksen G. Der Pansenazidose-Komplex - neuere Erkenntnisse und Erfahrungen (2). *Tierärztl Prax*. 1986;14:23-33.

- Dirksen G, Liebich HG, Brosi G, Hagemester H, Mayer E. Morphologie der Pansenschleimhaut und Fettsäureresorption beim Rind – bedeutende Faktoren für Gesundheit und Leistung. *Zentralbl Veterinärmed A*. 1984;31:414-430.
- Dirksen G, Ahrens F, Schoen J, Liebich HG. Vorbereitungsfütterung der trockenstehenden Kuh im Hinblick auf Ernährungszustand und Status von Pansenschleimhaut und Pansenflora bei der Kalbung. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*. 1992;105:1-4.
- Dobson A, Phillipson AT. The absorption of chloride ions from the reticulo-rumen sac. *J Physiol*. 1958;140:94-104.
- Doucet L, Mendes F, Montier T, Delepine P, Penque D, Ferec C, Amaral MD. Applicability of different antibodies for the immunohistochemical localization of CFTR in respiratory and intestinal tissues of human and murine origin. *J Histochem Cytochem*. 2003;51:1191-9.
- Dowland LK, Luyckx VA, Enck AH, Leclercq B, Yu AS. Molecular cloning and characterization of an intracellular chloride channel in the proximal tubule cell line, LLC-PK1. *J Biol Chem*. 2000;275:37765-73.
- Dudeja PK, Ramaswamy K. Intestinal anion transport. In: Johnson LR, Hrsg. *Physiology of the gastrointestinal tract* 4th edition, Academic Press; 2006. S. 1881-1915
- Egan M, Flotte T, Afione S, Solow R, Zeitlin PL, Carter BJ, Guggion WB. Defective regulation of outwardly rectifying Cl⁻ channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR. *Nature*. 1992;358:581-4.
- Emanovic D, Harrison FA, Keynes RD, Rankin JC. The effect of acetazolamide on ion transport across isolated sheep rumen epithelium. *J Physiol*. 1976;254:803-12.
- Etschmann B, Heipertz KS, Von Der Schulenburg A, Schweigel M. A vH⁺-ATPase is present in cultured sheep ruminal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;291:G1171-9.
- Fahey JR GC, Berger LL. Carbohydrate nutrition of ruminants. In: Church DC, Hrsg. *The Ruminant Animal. Digestive Physiology and Nutrition*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey; 1988. S. 269-97
- Falke JJ, Chan SI. Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 3. Translocation inhibitors. *Biochemistry*. 1986;25:7899-906.
- Fischbarg J, Lim JJ. Role of cations, anions and carbonic anhydrase in fluid transport across rabbit corneal endothelium. *J Physiol*. 1974;241:647-75.
- French PJ, Bijman J, Edixhoven M, Vaandrager AB, Scholte BJ, Lohmann SM, Nairn AC, De Jonge HR. Isotype-specific activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-chloride channels by cGMP-dependent protein kinase II. *J Biol Chem*. 1995;270:26626-31.
- Friedrich T, Breiderhoff T, Jentsch TJ. Mutational analysis demonstrates that ClC-4 and ClC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J Biol Chem*. 1999;274:896-902.

- Fuchs E. Keratins as biochemical markers of epithelial differentiation. *Trends Genet.* 1988;4:277-81.
- Gäbel G. Natrium- und Chloridtransport im Pansen von Schafen: Mechanismen und ihre Beeinflussung durch intraruminale Fermentationsprodukte [Habil-Schr. med. vet]. Hannover: Tierärztl Hochsch Hannover; 1988.
- Gäbel G. Transport of short chain fatty acids in the forestomach of ruminants. In: Cummings JH, Rombeau JL, Sakata T, Hrsg. *Physiological aspects of short chain fatty acids.* University Press, Cambridge; 1995. S. 133-147.
- Gäbel G, Aschenbach JR. SCFA, protons and ruminal epithelium: the good, the bad and the barrier. In: Fürll M, Hrsg. *Proceedings: Production diseases in farm animals.* Univ Leipzig; 2007 S. 291-97.
- Gäbel G, Aschenbach JR, Müller F. Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: implications and limitations. *Anim Health Res Rev.* 2002;3: 15-30.
- Gäbel G, Bestmann M, Martens H. Influences of diet, short-chain fatty acids, lactate and chloride on bicarbonate movement across the reticulo-rumen wall of sheep. *Zentralbl Veterinärmed A.* 1991a;38:523-9.
- Gäbel G, Marek M, MARTENS H. Influence of food deprivation on SCFA and electrolyte transport across sheep reticulorumen. *Zentralbl Veterinärmed A.* 1993;40:339-44.
- Gäbel G, Müller F, Pfannkuche H, Aschenbach JR. Influence of isoform and DNP on butyrate transport across the sheep ruminal epithelium. *J Comp Physiol [B].* 2001;171:215-21.
- Gäbel G, Sehested J. SCFA transport in the forestomach of ruminants. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* 1997;118:367-74.
- Gäbel G, Vogler S, Martens H. Short-chain fatty acids and CO₂ as regulators of Na⁺ and Cl⁻ absorption in isolated sheep rumen mucosa. *J Comp Physiol [B].* 1991b;161:419-26.
- Gabriel SE, Clarke LL, Boucher RC, Stutts MJ. CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature.* 1993;363:263-8.
- Gadsby DC, Nairn AC. Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol Rev.* 1999;79:S77-107.
- Galfi P, Gäbel G, MARTENS H. Influences of extracellular matrix components on the growth and differentiation of ruminal epithelial cells in primary culture. *Res Vet Sci.* 1993;54:102-9.
- Galfi P, Neogrady S, Kutas F. Culture of epithelial cells from bovine ruminal mucosa. *Vet Res Commun.* 1981;4:295-300.
- Garcia CK, Brown MS, Pathak RK, Goldstein JL. cDNA cloning of MCT2, a second monocarboxylate transporter expressed in different cells than MCT1. *J Biol Chem.* 1995;270:1843-9.

- Garcia CK, Goldstein JL, Pathak RK, Anderson RG, Brown MS. Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle. *Cell*. 1994;76:865-73.
- Garcia L, Boue-Grabot E, Garret M, Sartor P. Regulation of intracellular pH in rat lactotrophs: Involvement of anionic exchangers. *Endocrinology*. 1997;138:4191-98.
- Genz AK, Von Engelhardt W, Busche R. Maintenance and regulation of the pH microclimate at the luminal surface of the distal colon of guinea-pig. *J Physiol*. 1999;517(Pt2):507-19.
- Gill RK, Saksena S, Alrefail WA, Sarwar Z, Goldstein JL, Carroll RE, Ramaswamy K, Dudejya PK. Expression and membrane localization of MCT isoforms along the length of the human intestine. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;289:C846-52.
- Golin-Bisello F, Bradbury N, Ameen NA. STa and cGMP stimulate CFTR translocation to the surface of villus enterocytes in rat jejunum and is regulated by protein kinase G. *Am J Physiol*. 2005;289:C708-16.
- Gossen PC. Metabolism in rumen epithelium oxidation of substrates and formation of ketone bodies by pieces of rumen epithelium. *Z Tierphysiol Tierernähr Futtermittelkd*. 1976;37:14-25.
- Gopal E, Fei YJ, Miyauchi S, Zhuang L, Prasad PD, Ganapathy V. (): Sodium-coupled and electrogenic transport of B-complex vitamin nicotinic acid by slc5a8, a member of the Na/glucose co-transporter gene family. *Biochem J*. 2005;388:309-16.
- Gopal E, Fei YJ, Sugawara M, Miyauchi S, Zhuang L, Martin P, Smith SB, Prasad PD, Ganapathy V. Expression of slc5a8 in kidney and its role in Na(+)-coupled transport of lactate. *J Biol Chem*. 2004;279:44522-32.
- Graham C, Gatherar I, Haslam I, Glanville M, Simmons NL. Expression and localisation of monocarboxylate transporters and sodium proton exchangers in bovine rumen epithelium. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292:R997-1007.
- Greeley T, Shumaker H, Wang Z, Schweinfest CW, Soleimani M. Downregulated in adenoma and putative anion transporter are regulated by CFTR in cultured pancreatic duct cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;281:G1301-8.
- Grollman EF, Philp NJ, McPhie P, Ward RD, Sauer B. Determination of transport kinetics of chick MCT3 monocarboxylate transporter from retinal pigment epithelium by expression in genetically modified yeast. *Biochemistry*. 2000;39:9351-7.
- Guggino WB, Stanton BA. New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:426-36.
- Gyomerey K, Yeger H, Ackerley C, Garami E, Bear CE. Expression of the chloride channel ClC-2 in the murine small intestine epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;279:C1787-94.

- Hadjiagapiou C, Schmidt L, Dudeja PK, Layden TJ, Ramaswamy K. Mechanism(s) of butyrate transport in Caco-2 cells: role of monocarboxylate transporter 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;279:G775-80.
- Haila S, Saarialho-Kere U, Karjalainen-Lindsberg ML, Lohi H, Airola K, Holmberg C, Hastabacka J, Kere J, Hoglund P. The congenital chloride diarrhea gene is expressed in seminal vesicle, sweat gland, inflammatory colon epithelium, and in some dysplastic colon cells. *Histochem Cell Biol.* 2000;113:279-86.
- Halestrap AP, Meredith D. The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflügers Arch.* 2004;447:619-28.
- Halestrap AP, Price NT. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J.* 1999;343Pt2:281-99.
- Harig JM, Ng EK, Dudeja PK, Brasitus TA, Ramaswamy K. Transport of n-butyrate into human colonic luminal membrane vesicles. *Am J Physiol.* 1996;271:G415-22.
- Harig JM, Soergel KH, Barry JA, Ramaswamy K. Transport of propionate by human ileal brush-border membrane vesicles. *Am J Physiol.* 1991;260:G776-82.
- Hayden UL, Carey HV. (): Cellular localization of cystic fibrosis transmembrane regulator protein in piglet and mouse intestine. *Cell Tissue Res.* 1996;283:209-13.
- Heitmann RN, Dawes DJ, Sensenig SC. Hepatic ketogenesis and peripheral ketone body utilization in the ruminant. *J Nutr.* 1987;117:1174-80.
- Hoglund P, Auranen M, Socha J, Popinska K, Nazer H, Rajaram U, Al Sanie A, Al-Ghanim M, Holmberg C, De La Chapelle A, Kere J. Genetic background of congenital chloride diarrhea in high-incidence populations: Finland, Poland, and Saudi Arabia and Kuwait. *Am J Hum Genet.* 1998a63:760-8
- Hoglund P, Haila S, Gustavson KH, Taipale M, Hannula K, Popinska K, Holmberg C, Socha J, De La Chapelle A, Kere J. Clustering of private mutations in the congenital chloride diarrhea/down-regulated in adenoma gene. *Hum Mutat.* 1998b;11:321-7.
- Hoglund P, Haila S, Scherer SW, Tsui LC, Green ED, Weissenbach J, Holmberg C, De La Chapelle A, Kere J. Positional candidate genes for congenital chloride diarrhea suggested by high-resolution physical mapping in chromosome region 7q31. *Genome Res.* 1996a;6:202-10.
- Hoglund P, Haila S, Socha J, Tomaszewski L, Saarialho-Kere U, Karjalainen-Lindsberg ML, Airola K, Holmberg C, De La Chapelle A, Kere J. Mutations of the Down-regulated in adenoma (DRA) gene cause congenital chloride diarrhoea. *Nat Genet.* 1996b;14:316-9.
- Holtug K. Mechanisms of absorption of short chain fatty acids-coupling to intracellular pH regulation. *Acta Vet Scand Suppl.* 1989;86:126-33.

- Hug MJ, Tamada T, Bridges RJ. CFTR and bicarbonate secretion by [correction of to] epithelial cells. *News Physiol Sci*. 2003;18:38-42.
- Huhn K, Müller F, Honscha KU, Pfannkuche H, Gäbel G. Molecular and functional evidence for a Na^+ - HCO_3^- -cotransporter in sheep ruminal epithelium. *J Comp Physiol B*. 2003;173:277-84.
- Huhn K. Regulationsmechanismen des intrazellulären pH-Wertes im Pansenepithel des Schafes [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2004.
- Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*. 1990;346:362-5.
- Ikuma M, Geibel J, Binder HJ, Rajendran VM. Characterization of $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange in basolateral membrane of rat distal colon. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;285:C912-21.
- Illek B, Tam AW, Fischer H, Machen TE. Anion selectivity of apical membrane conductance of Calu 3 human airway epithelium. *Pflügers Arch*. 1999;437:812-22.
- Ilundain A. Intracellular pH regulation in intestinal and renal epithelial cells. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol*. 1992;101:413-24.
- Ismailov II, Awayda MS, Jovov B, Berdiev BK, Fuller CM, Dedman JR, Kaetzel M, Benoa DJ. Regulation of epithelial sodium channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*. 1996;271:4725-32.
- Itagaki S, Gopal E, Zhuang L, Fei YJ, Miyauchi S, Prasad PD, Ganapathy V. Interaction of ibuprofen and other structurally related NSAIDs with the sodium-coupled monocarboxylate transporter SMCT1 (SLC5A8). *Pharm Res*. 2006;23:1209-16.
- Jackson VN, Price NT, Carpenter L, Halestrap AP. Cloning of the monocarboxylate transporter isoform MCT2 from rat testis provides evidence that expression in tissues is species-specific and may involve post-transcriptional regulation. *Biochem J*. 1997;324(Pt2):447-53.
- Jacob P, Rossmann H, Lamprecht G, Kretz A, Neff C, Lin-Wu E, Gregor M, Groneberg DA, Kere J, Seidler U. Down-regulated in adenoma mediates apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange in rabbit, rat, and human duodenum. *Gastroenterology*. 2002;122:709-24.
- Jentsch TJ, Gunther W, Pusch M, Schwappach B. Properties of voltage-gated chloride channels of the ClC gene family. *J Physiol*. 1995;482:19S-25S.
- Jentsch TJ, Neagoe I, Scheel O. ClC chloride channels and transporters. *Curr Opin Neurobiol*. 2005;15:319-25.
- Jentsch TJ, Sten V, Weinreich F, Zdebik AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev*. 2002;82:503-68.

Jentsch TJ, Steinmeyer K, Schwarz G. Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature*. 1990;348:510-4.

Jentsch TJ. Chloride conductance in plasma membranes and the endosomal/lysosomal pathway: Novel insights from disease and biophysics. *J Physiol Biochem*. 2007;63:3.

Jiang L, Stuart-Tilley A, Parkash J, Alper SL. pH_i and serum regulate AE2-mediated Cl^-/HCO_3^- exchange in CHOP cells of defined transient transfection status. *Am J Physiol*. 1994;267:C845-56.

Jiang Z, Grichtchenko II, Boron WF, Aronson PS. Specificity of anion exchange mediated by mouse Slc26a6. *J Biol Chem*. 2002;277:33963-7.

Jin NG, Kim JK, Yang DK, Cho SJ, Kim JM, Koh EJ, Jung HC, So I, Kim KW Fundamental role of ClC3 in volume-sensitive Cl^- channel function and cell volume regulation in AGS cells. *Am J Physiol*. 2003;285:G938-48.

Kaufmann W, Hagemeister H, Dirksen G. Adaptation to changes in dietary composition, level and frequency of feeding. In: Ruckebusch Y, Thivend P, Hrsg. *Digestive Physiology and metabolism in ruminants*, Lancaster, MTP Press; 1980. S. 587-602.

Kawamata K, Hayashi H, Suzuki Y. Propionate absorption associated with bicarbonate secretion in vitro in the mouse cecum. *Pflügers Arch*. 2007;454:253-62.

Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chavkravarti A, Buchwald DM, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989;245:1073-80.

Keynes RD, Harrison FA. Transport of inorganic ions across the ruminal epithelium. In: Phillipson AT Hrsg. *Physiology of Digestion and Metabolism in Ruminants*. Newcastle-upon-Tyne, Oriel Press, 1970. S. 422-37.

Kieferle S, Fong P, Bens M, Vandewalle A, Jentsch TJ. Two highly homologous members of the ClC chloride channel family in both rat and human kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:6943-7.

Kim DK, Kanai Y, Chairoungdua A, Matsuo H, Cha SH, Endu H. Expression cloning of a Na^+ -independent aromatic acid transporter with structural similarity to H^+ /Monocarboxylate transporters. *J Biol Chem*. 2001;276:17221-8.

Kim DK, Kanai Y, Matsuo H, Kim JY, Chairoungdua A, Kobayashi Y, Enomoto A, Cha SH, Goya T, Endu H. The human t-type amino acid transporter1: characterization, gene organization, and chromosomal location. *Genomis*. 2002;79:95-103.

Kim SJ, Shin SY, Lee JE, Kim JH, Uhm DY. Ca^{2+} -activated Cl^- channel currents in rat ventral prostate epithelial cells. *Prostate*. 2003;55:118-27.

Kirat D, Inoue H, Iwano H, Hirayama K, Yokota H, Taniyama H, Kato S. Expression and distribution of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) in the gastrointestinal tract of calves. *Vet J*. 2005;171:462-7.

- Kirat D, Masuoka J, Hayashi H, Iwano H, Yokota H, Taniyama H, Kato S. Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) plays a direct role in short chain fatty acids absorption in caprine rumen. *J Physiol.* 2006a;576(Pt2):635-47.
- Kirat D, Inoue H, Iwano H, Hirayama K, Yokota H, Taniyama H, Kato S. Monocarboxylate transporter 1 gene expression in the ovine gastrointestinal tract. *Vet J.* 2006b;171:462-7.
- Kirat D, Matsuda Y, Yamashiki N, Hayashi H, Kato S. Expression, cellular localization and functional role of monocarboxylate transporter 4 (MCT4) in gastrointestinal tract of ruminants. *Gene.* 2007;391:140-9.
- Kirat D, Kato S. Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) mediates transport of short chain fatty acids in bovine caecum. *Exp Physiol.* 2006;91:835-44.
- Kirk P, Wilson MC, Heddle C, Brown MH, Barclay AN, Halestrap AP. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J.* 2000;19:3896-904.
- Kleizen B, Braakman I, De Jonge HR. (): Regulated trafficking of the CFTR chloride channel. *Eur J Cell Biol.* 2000;79:544-56.
- Knauf F, Yang CL, Thomson RB, Mentone SA, Giebisch G, Aronson PS. Identification of a chloride-formate exchanger expressed on the brush border membrane of renal proximal tubule cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:9425-30.
- Knickelbein RG, Aronson PS, Dobbins JW. Substrate and inhibitor specificity of anion exchangers on the brush border membrane of rabbit ileum. *J Membrane Biol.* 1985;88:199-204.
- Ko SB, Shcheynikov N, Choi JY, Luo X, Ishibashi K, Thomas PJ, Kim JY, Kim KH, Lee MG, Naruse S, Muallem S. A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO_3^- transport in cystic fibrosis. *EMBO J.* 2002;21:5662-72.
- Kramer T. Interaktion bei der Resorption von kurzkettigen Fettsäuren und Elektrolyten aus dem Retikulorumen von Schafen [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 1994.
- Kramer T, Michelberger T, Gürtler H, Gäbel G. Absorption of short-chain fatty acids across ruminal epithelium of sheep. *J Comp Physiol [B].* 1996;166:262-9.
- Kristensen NB, Danfaer A, Agergaard N. Absorption and metabolism of short-chain fatty acids in ruminants. *Arch Tierernähr.* 1998;51:165-75.
- Kristensen NB, Gäbel G, Pierzynowski SG, Danfaer A. Portal recovery of short-chain fatty acids infused into the temporarily-isolated and washed reticulo-rumen of sheep. *Br J Nutr.* 2000a;84:477-82
- Kristensen NB, Pierzynowski SG, Danfaer A. Net portal appearance of volatile fatty acids in sheep intraruminally infused with mixtures of acetate, propionate, isobutyrate, butyrate, and valerate. *J Anim Sci.* 2000b;78:1372-9.

- Kunzelmann K. CFTR: interacting with everything? *News Physiol Sci.* 2001;16:167-70.
- Lacoste I, Harvey BJ, Ehrenfeld J. Cl⁻ permeability of the basolateral membrane of the *Rana esculenta* epithelium: activation of Cl⁻/HCO₃⁻ exchange by alkaline intracellular pH. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1063:103-10.
- Lamprecht G, Baisch S, Schoenleber E, Gregor M. Transport properties of the human intestinal anion exchanger DRA (down-regulated in adenoma) in transfected HEK293 cells. *Pflügers Arch.* 2005;449:479-90.
- Lamprecht G, Heil A, Baisch S, Lin-Wu E, Yun CC, Kalbacher H, Gregor M, Seidler U. 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⁻/HCO₃⁻ exchange to Na⁺/H⁺ exchange. *Biochemistry.* 2002;41:12336-42.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Prinzipien der Biochemie* Hrsg. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin/Oxford; 1998.
- Leo A, Hansch C, Elkins D. Partition coefficients and their use. *Chemical Reviews.* 1971;71:525-616.
- Leonhard-Marek S, Breves G, Busche R. Effect of chloride on pH microclimate and electrogenic Na⁺ absorption across the rumen epithelium of goat and sheep. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;291:G246-52.
- Li H, Myerhoff L, Smiraglia D, Romero MF, Pretlow TP, Kasturi L, Lutterbaugh J, Rerko RM, Casey G, Issa JP, Willis J, Willson JK, Plass C, Markowitz SD. SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:8412-7.
- Li C, Naren AP. Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners. *Pharmacol Ther.* 2005;108:208-23.
- Linsdell P, Hanrahan JW. Disulphonic stilbene block of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels expressed in a mammalian cell line and its regulation by a critical pore residue. *J Physiol.* 1996;496(Pt3):687-93.
- Linsdell P, Tabcharani JA, Rommens JM, Hou YX, Chang XB, Tsui LC, Riordan JR, Hanrahan JW. Permeability of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels to polyatomic anions. *J Gen Physiol.* 1997;110:355-64.
- Liantonio A, Giannuzzi V, Picollo A, Babini E, Pusch M, Conte Camerino D. Niflumic acid inhibits chloride conductance of rat skeletal muscle by directly inhibiting the ClC1 channel and by increasing intracellular calcium. *Br J Pharmacol.* 2007;150:235-47.
- Lipecka J, Bali M, Thomas A, Fanen P, Edelman A, Fritsch J. Distribution of ClC-2 chloride channel in rat and human epithelial tissues. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;282:C805-16.

- Lohi H, Kujala M, Kerkela E, Saarialho-Kere U, Kestila M, Kere J. Mapping of five new putative anion transporter genes in human and characterization of SLC26A6, a candidate gene for pancreatic anion exchanger. *Genomics*. 2000;70:102-12.
- Lopez CH, Bracht A, Yamamoto NS, Ishi-Iwamoto EL, Sampaio E, Kelmer-Bracht AM. The action of flufenamic acid and other nonsteroidal anti-inflammatories on sulfate transport in the isolated perfused rat liver. *Gen Pharmacol*. 1999;32:713-20.
- Lu J, Daly CM, Parker MD, Gill HS, Piermarini PM, Pelletier MF, Boron WF. Effect of human carbonic anhydrase II on the activity of the human electrogenic Na/HCO₃ cotransporter NBCe1-A in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*. 2006;281:19241-50.
- Mahajan RJ, Baldwin ML, Harig JM, Ramaswamy K, Dudeja PK. Chloride transport in human proximal colonic apical membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1280:12-8.
- Manning Fox JE, Meredith D, Halestrap AP. Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. *J Physiol*. 2000;529(Pt2):285-93.
- Marek M. Resorption von kurzkettigen Fettsäuren und Elektrolyten aus dem Retikulumen von Schafen: Beeinflussung durch Nahrungsentzug und intraruminale Infusion von Natrium-n-Butyrat [Dissertation med. vet]. Berlin: Freie Univ Berlin;1991.
- Marshall RA, Phillipson AT. The production and absorption of the volatile acids in the rumen. *Proc Nutr Soc*. 1945;3:238-43.
- Martens H. Transportmechanismen des Pansenepithels. In Von Engelhardt W, Breves G, Hrsg. *Physiologie der Haustiere*, 2. Aufl. Enke Verl Stuttgart; 2005 S. 366-72.
- Martens H, Gäbel G. Transport of Na and Cl across the epithelium of ruminant forestomachs: rumen and omasum. A review. *Comp Biochem Physiol A*. 1988;90:569-75.
- Martens H, Gäbel G, Strozyk B. Mechanism of electrically silent Na and Cl transport across the rumen epithelium of sheep. *Exp Physiol*. 1991;76:103-14.
- Martin PM, Gopal E, Ananth S, Zhuang L, Itagaki S, Prasad BM, Smith SB, Prasad PD, Ganapathy V. Identity of SMCT1 (SLC5A8) as a neuron-specific Na⁺-coupled transporter for active uptake of L-lactate and ketone bodies in the brain. *J Neurochem*. 2006;98:279-88.
- Mascolo N, Rajendran VM, Binder HJ. Mechanism of short-chain fatty acid uptake by apical membrane vesicles of rat distal colon. *Gastroenterology*. 1991;101:331-8.
- Masson MJ, Phillipson AT. The absorption of acetate, propionate and butyrate from the rumen of sheep. *J Physiol*. 1951;113:189-206.
- McCarty NA, McDonough S, Cohen BN, Rirdan JR, Davidson N, Lester HA. Voltage-dependent block of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by two closely related arylaminobenzoates. *J Gen Physiol*. 1993;102:1-23.

- McNeil NI. The contribution of the large intestine to energy supplies in man. *Am J Clin Nutr.* 1984;39:338-42.
- Meier PJ, Knickelbein R, Moseley RH, Dobbins JW, Boyer JL. Evidence for carrier-mediated chloride/bicarbonate exchange in canalicular rat liver plasma membrane vesicles. *J Clin Invest.* 1985;75:1256-63.
- Melvin JE, Park K, Richardson L, Schultheis PJ, Shull GE. Mouse down-regulated in adenoma (DRA) is an intestinal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger and is up-regulated in colon of mice lacking the NHE3 Na^+/H^+ exchanger. *J Biol Chem.* 1999;274:22855-61.
- Michelberger T. Propionsäure-Transport über das isolierte Pansenepithel des Schafes [Dissertation med. vet]. Berlin: Freie Univ Berlin; 1994.
- Miyauchi S, Gopal E, Fei YJ, Ganapathy V. Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na^+ -coupled transporter for short-chain fatty acids. *J Biol Chem.* 2004;279:13293-6.
- Mohammad-Panah R, Ackerley C, Rommens J, Choudhury M, Wang Y, Bear CE. The chloride channel ClC-4 colocalizes with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and may mediate chloride flux across the apical membrane of intestinal epithelia. *J Biol Chem.* 2002;277:566-74.
- Montrose MH, Chu S. Transepithelial SCFA gradients regulate polarized Na/H exchangers and pH microdomains in colonic epithelia. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* 1997;118:389-93.
- Morris AA. Cerebral ketone body metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 2005;28:109-21.
- Moseley RH, Høglund P, Wu GD, Silberg DG, Haila S, De La Chapelle A, Holmberg C, Kere J. Downregulated in adenoma gene encodes a chloride transporter defective in congenital chloride diarrhea. *Am J Physiol.* 1999;27: G185-92.
- Müller F. Einfluss schwacher Säuren auf den pH-Wert oviner Pansenepithelzellen: Mechanismen der Gegenregulation [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ Leipzig; 2000.
- Müller F, Aschenbach JR, Gäbel G. Role of Na^+/H^+ exchange and HCO_3^- transport in pH_i recovery from intracellular acid load in cultured epithelial cell of sheep rumen. *J Comp Physiol [B].* 2000;170:337-43.
- Müller F, Huber K, Pfannkuche H, Aschenbach JR, Breves G, Gäbel G. (): Transport of ketone bodies and lactate in the sheep ruminal epithelium by monocarboxylate transporter 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;283:G1139-46.
- Murakami Y, Kohyama N, Kobayashi Y, Ohbayashi M, Ohtani H, Sawada Y, Yamamoto T. Functional characterization of human monocarboxylate transporter 6 (SLC16A5). *Drug Metab Dispos.* 2005;33:1845-51.

- Musch MW, Bookstein C, Xie Y, Sellin JH, Chang EB. SCFA increase intestinal Na absorption by induction of NHE3 in rat colon and human intestinal C2/bbe cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;280:G687-93.
- Nilius B, Droogmans G. Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand.* 2003;177:119-47.
- Nozawa T, Sugiura S, Hashino Y, Tsuji A, Tamai I. Role of anion exchange transporter PAT1 (SLC26A6) in intestinal absorption of organic anions. *J Drug Target.* 2004;12:97-104.
- Ogura T, Furukawa T, Toyozaki T, Yamada K, Zheng YJ, Katayama Y, Nakaya H, Inagaki N. CIC3B, a novel CIC3 splicing variant that interacts with EBP50 and facilitates expression of CFTR-regulated ORCC. *FASEB J.* 2002;16:U189-205.
- Orsenigo MN, Tosco M, Bazzini C, Laforenza U, Faelli A. A monocarboxylate transporter MCT1 is located at the basolateral pole of rat jejunum. *Exp Physiol.* 1999;84:1033-42.
- Orsenigo MN, Tosco M, Laforenza U, Faelli A. Proton-lactate cotransport in basolateral membrane vesicles from rat jejunum. *Biosci Rep.* 1996;16:521-7.
- Paroder V, Spencer SR, Paroder M, Arango D, Schwartz S JR, Mariadason JM, Augenlicht LH, Eskandari S, Carrasco N. Na⁺/monocarboxylate transport (SMCT) protein expression correlates with survival in colon cancer: molecular characterization of SMCT. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:7270-5.
- Pennington RJ The metabolism of short-chain fatty acids in the sheep. I. Fatty acid utilization and ketone body production by rumen epithelium and other tissues. *Biochem J.* 1952;51:251-8.
- Pennington RJ. The metabolism of short-chain fatty acids in the sheep. II. Further studies with rumen epithelium. *Biochem J.* 1954;57:685-92.
- Pennington RJ, Sutherland TM. Ketone-body production from various substrates by sheep-rumen epithelium. *Biochem J.* 1956a;63:353-61.
- Pennington RJ, Sutherland TM. The metabolism of short-chain fatty acids in the sheep. IV. The pathway of propionate metabolism in rumen epithelial tissue. *Biochem J.* 1956b;63:618-28.
- Peters JP, Shen RYW, Robinson JA. Disappearance of acetic acid from the bovine reticulorumen at basal and elevated concentrations of acetic acid. *J Anim Sci.* 1992;70:1509-17.
- Petersen KU, Wood JR, Schulze G, Heintze K Stimulation of gallbladder fluid and electrolyte absorption by butyrate. *J Membr Biol.* 1981;62:183-93.
- Petrovic S, Wang Z, Ma L, Seidler U, Forte JG, Shull GE, Soleimani M. Colocalization of the apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger PAT1 and gastric H-K-ATPase in stomach parietal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;283:G1207-16.

Philp NJ, Yoon H, Lombardi L. Mouse MCT3 gene is expressed preferentially in retinal pigment and choroid plexus epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280:C1319-26.

Philp NJ, Ochrietor JD, Rudoy C, Muramatsu T, Linser PJ. Loss of MCT1, MCT3 and MCT4 expression in the retinal pigment epithelium and neural retina of the 5A11/basigin-null mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:1305-11.

Piccioletto MR, Cohn JA, Bertuzzi G, Greencard P, Nairn AC. Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem.* 1992;267:12742-52.

Piccolo A, Pusch M. (): Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CIC-4 and CIC-5. *Nature.* 2005;436:420-3.

Poole RC, Halestrap AP. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol.* 1993;264:C761-82.

Rechkemmer G, Rönnau K, Von Engelhardt W. Fermentation of polysaccharides and absorption of short chain fatty acids in the mammalian hindgut. *Comp Biochem Physiol A.* 1988;90:563-8.

Rechkemmer G. *In vitro* studies of short chain fatty acid transport with intact tissue. In: Binder HJ, Cummings J, Soergel K, Hrsg. Short chain fatty acids. Kluwer academic publisher, Dordrecht/Boston/London; 1994. S. 82-93

Remond D, Ortigues I, Jouany JP. Energy substrates for the rumen epithelium. *Proc Nutr Soc.* 1995;54:95-105.

Reyes JP, Hernandez-Carballo CY, Perez-Cornejo P, Meza U, Espinosa-Tanguma R, Arreola J. Novel outwardly rectifying anion conductance in *Xenopus* oocytes. *Pflügers Arch.* 2004;449:271-7.

Reynolds PJ, Huntigton GB. Net portal absorption of volatile fatty acids and L(+)-lactate by lactating Holstein cows. *J Dairy Sci.* 1988;71:124-33.

Rich DP, Berger HA, Cheng SH, Travis SM, Saxena M, Smith AE, Welsh MJ. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by negative charge in the R domain. *J Biol Chem.* 1993;268:20259-67.

Ringel FA. Die Azidose-induzierte Schwellung und intrazelluläre Azidose von Gliazellen – Bedeutung von Anionen und Kalzium [Dissertation med]. München: Ludwig-Maximilian-Univ; 2004.

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelcack Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Et AL. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 1989;245:1066-73.

Ritzhaupt A, Ellis A, Hosie KB, Shirazi-Beechey SP. The characterization of butyrate transport across pig and human colonic luminal membrane. *J Physiol.* 1998a;507(Pt3):819-30.

- Ritzhaupt A, Wood IS, Ellis A, Hosie KB, Shirazi-Beechey SP. Identification and characterization of a monocarboxylate transporter (MCT1) in pig and human colon: Its potential to transport L-lactate as well as butyrate. *J Physiol.* 1998b;513(Pt3):719-32.
- Robinson AM, Williamson DH. Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol Rev.* 1980;60:143-87.
- Romero MF, Fulton CM, Boron WF. The SLC4 family of HCO_3^- transporters. *Pflügers Arch.* 2004;447:495-509.
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, ET AL. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science.* 1989;245:1059-65.
- Rossmann H, Jacob P, Baisch S, Hassoun R, Meier J, Natour D, Yahya K, Yun C, Biber J, Lackner KJ, Fiehn W, Gregor M, Seidler U, Lamprecht G. The CFTR associated protein CAP70 interacts with the apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger DRA in rabbit small intestinal mucosa. *Biochemistry.* 2005;44:4477-87.
- Russell JB, Rychlik JL. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science.* 2001;292:1119 – 22.
- Sakamoto H, Sado Y, Naito I, Kwon TH, Inoue S, Endo K, Kawasakil M, Uchida S, Nielsen S, Sasaki S, Marumo F. Cellular and subcellular immunolocalization of ClC-5 channel in mouse kidney: colocalization with H^+ -ATPase. *Am J Physiol.* 1999;277:F957-65.
- Scaife JR, Tichivangana JZ. Short chain acyl-CoA synthetases in ovine rumen epithelium. *Biochim Biophys Acta.* 1980;619:445-50.
- Schweigel M, Martens H. Anion-dependent Mg^{2+} influx and a role for a vacuolar H^+ -ATPase in sheep ruminal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;285:G45-53.
- Schweinfest CW, Henderson KW, Suster S, Kondoh N, Papas TS. Identification of a colon mucosa gene that is down-regulated in colon adenomas and adenocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:4166-70.
- Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev.* 1999;79:S145-66.
- Scott-Ward TS, Li H, Schmidt A, Cai Z, Sheppard DN. Direct block of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl^- channel by niflumic acid. *Mol Membr Biol.* 2004;21:27-38.
- Seal CJ, Parker DS. Effect of intraruminal propionic acid infusion on metabolism of mesenteric- and portal-drained viscera in growing steers fed a forage diet: I. Volatile fatty acids, glucose, and lactate. *J Anim Sci.* 1994;72:1325-34.
- Seifter JL, Aronson PS. Cl^- transport via anion exchange in *Necturus* renal microvilli membranes. *Am J Physiol.* 1984;247:F888-95.

Sehested J. Transport of short-chain fatty acids and sodium across the ruminal epithelium of cattle [Ph. D. Thesis]. Copenhagen: The Royal Veterinary and Agricultural University; 1994.

Sehested J, Andersen JB, Aaes O, Kristensen JB, Diernaes L, Moller PD, Skadhauge E. Feed-induced changes in the transport of butyrate, sodium and chloride ions across the isolated bovine rumen epithelium. *Acta Agri Scand A*. 2000;5: 47-55.

Sehested J, Diernaes L, Möller PD, Skadhauge E. Transport of sodium across the isolated bovine rumen epithelium: interaction with short-chain fatty acids, chloride and bicarbonate. *Exp Physiol*. 1996;81:79-94.

Sehested J, Diernaes L, Möller PD, Skadhauge E. 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*. 1999a;123:359-68.

Sehested J, Diernaes L, Möller PD, Skadhauge E. Transport of butyrate across the isolated bovine rumen epithelium-interaction with sodium, chloride and bicarbonate. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 1999b;123:399-408.

Sellin JH, Desoignie R, Burlingame S. Segmental differences in short-chain fatty acid transport in rabbit colon: effect of pH and Na. *J Membr Biol*. 1993;136:147-58.

Shen Z, Seyfert HM, Lohrke B, Schneider F, Zitnan R, Chudy A, Kuhla S, Hammon HM, Blum JW, Martens H, Hagemeister H, Voigt J. An energy-rich diet causes rumen papillae proliferation associated with more IGF-type 1 receptors and increased plasma IGF-1 concentrations in young goat. *J Nutr*. 2004;134:11-7.

Silberg DG, Wang W, Moseley RH, Traber PG. The Down regulated in Adenoma (dra) gene encodes an intestine-specific membrane sulfate transport protein. *J Biol Chem*. 1995;270:11897-902.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150:76-85.

Soergel KH, Harig JM, Loo FD, Ramaswamy K, Wood CM. Colonic fermentation and absorption of SCFA in man. *Acta Vet Scand Suppl*. 1989;86:107-15.

Spiegel S, Phillipper M, Rossmann H, Riederer B, Gregor M, Seidler U. Independence of apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange and anion conductance in duodenal HCO_3^- secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;285:G887-97.

Srinivas SR, Gopal E, Zhuang L, Itagaki S, Martin PM, Fei YJ, Ganapathy V, Prasad PD. Cloning and functional identification of *slc5a12* as a sodium-coupled low-affinity transporter for monocarboxylates (SMCT2). *Biochem J*. 2005;392:655-64.

- Steinmeyer K, Ortlund C, Jentsch TJ. Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature*. 1991;354:301-4.
- Steinmeyer K, Schwappach B, Bens M, Vandewalle A, Jentsch TJ. Cloning and functional expression of rat CLC-5, a chloride channel related to kidney disease. *J Biol Chem*. 1995;270:31172-7.
- Sterling D, Brown NJ, Supuran CT, Casey JR. The functional and physical relationship between the DRA bicarbonate transporter and carbonic anhydrase II. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283:C1522-9.
- Stevens CE. Transport of sodium and chloride by the isolated rumen epithelium. *Am J Physiol*. 1964;206:1099-105.
- Stevens CE, Stettler BK. Factors affecting the transport of volatile fatty acids across rumen epithelium. *Am J Physiol*. 1966a;210:365-72.
- Stevens CE, Stettler BK. Transport of fatty acid mixtures across rumen epithelium. *Am J Physiol*. 1966b;211:264-71.
- Stevens CE, Stettler BK. Evidence for active transport of acetate across bovine rumen epithelium. *Am J Physiol*. 1967;213:1335-9.
- Stuart-Tilley A, Sardet C, Pouyssegur J, Schwartz MA, Brown D, Alper SL. Immunolocalization of anion exchanger AE2 and cation exchanger NHE-1 in distinct adjacent cells of gastric mucosa. *Am J Physiol*. 1994;266:C559-68.
- Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, Boucher RC. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science*. 1995;269:847-50.
- Sündermann M. Untersuchungen über den Einfluss energiereicher Fütterung auf Transportvorgänge der Pansenwand [Dissertation med. vet]. Hannover:; Tierärztl Hochsch Hannover; 1986.
- Sun XC, Bonanno JA. Expression, localization and functional evaluation of CFTR in bovine cornea endothelial cell. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;281:C673-83.
- Tadesse G. Interaktion kurzkettiger Fettsäuren untereinander und mit Elektrolyten bei ihrer Resorption aus dem Retikulum des Schafes [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ Leipzig; 1996.
- Thiagarajah JR, Song Y, Haggie PM, Verkman AS. A small molecule CFTR inhibitor produces cystic fibrosis-like submucosal gland fluid secretions in normal airways. *FASEB J*. 2004;18:875-7.
- Thorlacius SO, Lodge GA. Absorption of steam-volatile fatty acids from the rumen of the cow as influenced by diet, buffers and pH. *Can J Anim Sci*. 1973;53:279-88.

- Tyagi S, Venugopalakrishnan J, Ramaswamy K, Dudeja PK. Mechanism of n-butyrate uptake in the human proximal colonic basolateral membranes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;282:G676-82.
- Ubels JL, Hoffman HM, Srikanth S, Resau JH, Webb CP. Gene expression in rat lacrimal gland duct cells collected using laser capture microdissection: Evidence for K⁺ Secretion by duct cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:1876-85.
- Vaandrager AB, Tilly BC, Smolenski A, Schneider-Rasp S, Bot AG, Edixhoven M, Scholte BJ, Jarchau T, Walter U, Lohmann SM, Poller WC, De Jonge HR cGMP stimulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels co-expressed with cGMP-dependent protein kinase type II but not type Ibeta. *J Biol Chem.* 1997;272:4195-200.
- Vandewalle A, Cluzeaud F, Bens M, Kieferle S, Steinmeyer K, Jentsch TJ. Localization and induction by dehydration of ClC-K chloride channels in the rat kidney. *Am J Physiol.* 1997;272:F678-88.
- Vidyasager S, Barmeyer C, Geibel J, Binder HJ, Rajendran VM. Role of short-chain fatty acids in colonic HCO₃⁻ secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288:G1217-26.
- Vidyasagar S, Rajendran VM, Binder HJ. Three distinct mechanisms of HCO₃⁻ secretion in rat distal colon. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287:C612-21.
- Von Engelhardt W, Burmester M, Hansen K, Becker G, Rechkemmer G. Effects of amiloride and ouabain on short-chain fatty acid transport in guinea-pig large intestine. *J Physiol.* 1993;460:455-66.
- Walter A, Gutknecht J. Permeability of small nonelectrolytes through lipid bilayer membranes. *J Membr Biol.* 1986;90:207-17.
- Walter A, Hastings D, Gutknecht J. Weak acid permeability through lipid bilayer membranes. Role of chemical reactions in the unstirred layer. *J Gen Physiol.* 1982;79:917-33.
- Wang X, Levi AJ, Halestrap AP. Substrate and inhibitor specificities of the monocarboxylate transporters of single rat heart cells. *Am J Physiol.* 1996;270:H476-84.
- Wang Z, Petrovic S, Mann E, Soleimani M. Identification of an apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;282:G573-9.
- Webster P, Vanacore L, Nairn AC, Marino CR. Subcellular localization of CFTR to endosomes in a ductal epithelium. *Am J Physiol.* 1994;267:C340-8.
- Weigand, E, Young JW, McGilliard AD. Extent of butyrate metabolism by bovine ruminoreticulum epithelium and the relationship to absorption rate. *J Dairy Sci.* 1972a;55:589-97.
- Weigand, E, Young JW, McGilliard AD. Extent of propionate metabolism during absorption from the bovine ruminoreticulum. *Biochem J.* 1972b;126:201-9.

- Weigand, E, Young JW, McGilliard AD. Volatile fatty acid metabolism by rumen mucosa from cattle fed hay or grain. *J Dairy Sci.* 1975;**58**:1294-300.
- Weiss B. Untersuchungen über Beziehungen zwischen der Azidität des Panseninhalts und dem Proliferationszustand der Pansenschleimhaut beim Rind. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* 199;107:73-8.
- Wheat VJ, Shumaker H, Burnham C, Shull GE, Yankaskas JR, Soleimani M. CFTR induces the expression of DRA along with Cl⁻/HCO₃⁻ exchange activity in tracheal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;279:C62-71.
- Würmli R, Wolfram S, Scharrer E. Inhibition of chloride absorption from the sheep rumen by nitrate. *Zentralbl Veterinärmed A.* 1987;34:476-9.
- Xie Q, Welch R, Mercado A, Romero MF, Mount DB. Molecular characterization of the murine Slc26a6 anion exchanger: functional comparison with Slc26a1. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;283:F826-38.
- Yoon H, Fanelli A, Grollman EF, Philp NJ. Identification of a unique monocarboxylate transporter (MCT3) in retinal pigment epithelium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;234:90-4.
- Yoshikawa M, Uchida S, Yamauchi A, Miyai A, Tanaka Y, Sasaki S, Marumo F. Localization of rat CLC-K2 chloride channel mRNA in the kidney. *Am J Physiol.* 1999;276:F552-8.

9 Anhang

9.1 *Verwendete Medien in der Zellkultur*

Trypsinierungslösung

111 ml Hank`s gepufferte Salzlösung
12,5 ml Trypsin ($25 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$)
0,025 g Na_4EDTA
1,25 ml Penicillin / Streptomycin ($100000 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$; $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)

Dispaselösung

25 ml Hank`s gepufferte Salzlösung
50 mg Dispase II ($>2,4 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$)
0,25 ml Gentamicin ($10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)
25 μl Amphotericin B ($5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)

Supplementiertes Medium M-199

50 ml Medium 199 mit Earle`s Salzen
7,5 ml fetales Kälberserum
1 ml HEPES (1 M)
0,25 ml Gentamicin ($10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)
0,2 ml L-Glutamin (200 mM)
0,5 ml Nystatin ($\geq 4,400 \text{ USP units mg}^{-1}$)

Supplemetiertes MEM

50 ml MEM mit Earle`s Salzen
5 ml fetales Kälberserum
1 ml HEPES (1 M)
0,25 ml Gentamicin ($10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)
0,2 ml L-Glutamin (200 mM)

9.2 Zusammensetzung der Pufferlösungen

Zusammensetzung der Pufferlösungen der pH_i-Messungen

Tab. A1: *Cl⁻-haltige Lösungen, die bei der pH_i-Messung an kultivierten Pansenepithelzellen verwendet wurden.*

Substanz	Pufferlösung					
	Lösung 1	Lösung 2	Lösung 3	Lösung 4	Lösung 5	Eichlösung
NaCl	90	110	110	95	95	
Na-Glukonat					14	
NH₄Cl	20					
KCl	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	121,5
CaCl₂ • 2 H₂O	0,6	0,6	0,6	1	1	1
MgCl₂ • 6 H₂O	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1
NaH₂PO₄ • H₂O	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	
Na₂HPO₄ • H₂O	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	
NaHCO₃	20	20		24		
HEPES-Na			20		10	10
Glukose	10	10	10	10	10	10
Mannitol	10	10	10	15	15	21
Cl⁻-Konzentration	119	119	119	104,8	104,8	125,5
Osmolalität	288 ± 5	288 ± 5	288 ± 5	275 ± 5	275 ± 5	288 ± 5
pH-Wert	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4

Lösung 1: NH₄/NH₃⁺-haltige, HEPES-gepufferte Lösung (**NH₄Cl**) (Kap. 4.2.1)

Lösung 2: CO₂-haltige/HCO₃⁻-gepufferte Lösung 1 (**B1**) (Kap. 4.2.1 und 4.2.2)

Lösung 3: HEPES-gepufferte Lösung 1 (**H1**) (Kap. 4.2.1 und 4.2.2)

Lösung 4: CO₂-haltige/HCO₃⁻-gepufferte Lösung 2 (**B2**) (Kap. 4.3.1 und 4.3.2)

Lösung 5: HEPES-gepufferte Lösung 2 (**H2**) (Kap. 4.3.1 und 4.3.2)

Die Eichlösung wurde in allen Versuchen (Kap. 4.2.1, 4.2.2, 4.3.1 und 4.3.2) eingesetzt, um im Anschluss an die eigentliche Messung eine Eichgerade aufzuzeichnen (Kap. 3.5.3).

Tab. A2: Cl⁻-freie Lösungen, die bei der pH_i-Messung an kultivierten Pansenepithelzellen verwendet wurden.

Substanz	Pufferlösung		
	Lösung 6	Lösung 7	Lösung 8
<i>Na-Glukonat</i>	110	95	109
<i>K-Glukonat</i>	5,4	5,4	5,4
<i>Ca-Glukonat • 2 H₂O</i>	0,6	1	0,6
<i>Mg-Glukonat • 6 H₂O</i>	1,2	1,2	1,2
<i>NaH₂PO₄ • H₂O</i>	0,6	0,6	0,6
<i>Na₂HPO₄ • H₂O</i>	2,4	2,4	2,4
<i>NaHCO₃</i>	20	24	
<i>HEPES-Na</i>			10
<i>Glukose</i>	10	10	10
<i>Mannitol</i>	10	15	15
<i>Cl⁻-Konzentration</i>	0	0	0
<i>Osmolalität</i>	288 ± 5	275 ± 5	275 ± 5
<i>pH-Wert</i>	7,4	7,4	7,4

Lösung 6: CO₂-haltige/HCO₃⁻-gepufferte, Cl⁻-freie Lösung 1 (**B1 - Cl⁻**) (Kap. 4.2.2)

Lösung 7: CO₂-haltige/HCO₃⁻-gepufferte, Cl⁻-freie Lösung 2 (**B2 - Cl⁻**) (Kap. 4.3.1 und. 4.3.2)

Lösung 8: HEPES-gepufferte, Cl⁻-freie Lösung 1 (**H1 - Cl⁻**) (Kap. 4.3.1 und. 4.3.2)

Die Lösungen 4, 5, 7 und 8 wurden auf eine niedrigere Osmolalität eingestellt, da hier während des Versuches die Zugabe von 10 mM Acetat + 10 mM Glukonat, 20 mM Acetat oder 10 mM Acetat + 10 mM Nitrat erfolgte. In den Kontrollzellen wurde entsprechend 20 mM Glukonat hinzugefügt.

Zusammensetzung der Pufferlösungen der Aufnahmestudien**Tab. A3: Lösungen, die zur Untersuchung des Einflusses von Chlorid auf die Acetataufnahme verwendet wurden (Kap. 4.1.1).**

Substanz	Pufferlösung			
	Lösung 1	Lösung 2	Lösung 3	Lösung 4
<i>NaCl</i>	80	80		
<i>Na-Glukonat</i>			80	80
<i>KCl</i>	5,5	5,5		
<i>K-Glukonat</i>			5,5	5,5
<i>CaCl₂ • 2 H₂O</i>	1	1	1	1
<i>MgCl₂ • 6 H₂O</i>	1,25	1,25	1,25	1,25
<i>NaH₂PO₄ • H₂O</i>	0,6	0,6	0,6	0,6
<i>Na₂HPO₄ • H₂O</i>	2,4	2,4	2,4	2,4
<i>L-Glutamin</i>	1	1	1	1
<i>NaHCO₃</i>	24	24	24	24
<i>HEPES-free acid</i>	10	10	10	10
<i>Glukose</i>	10	10	10	10
<i>Mannitol</i>	50	35	50	35
<i>Gluconsäure</i>	0	15	0	15
<i>Cl-Konzentration</i>	90	90	4,5	4,5
<i>Osmolalität</i>	288 ± 5	288 ± 5	288 ± 5	288 ± 5
<i>pH-Wert</i>	7,4	6,1	7,4	6,1

Lösung 1: CO₂-haltige/HCO₃⁻-gepufferte Lösung: **B⁺ Cl(90) pH7,4** (Kap. 4.1.1)

Lösung 2: CO₂-haltige/HCO₃⁻-gepufferte Lösung: **B⁺ Cl(90) pH6,1** (Kap. 4.1.1)

Lösung 3: CO₂-haltige/HCO₃⁻-gepufferte Lösung: **B⁺ Cl(4,5) pH7,4** (Kap. 4.1.1)

Lösung 4: CO₂-haltige/HCO₃⁻-gepufferte Lösung: **B⁺ Cl(4,5) pH6,1** (Kap. 4.1.1)

Tab. A4: Serosaler Standardpuffer sowie mukosale Lösungen

Die mukosalen Lösungen, die zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Acetataufnahme (5 mM – 60 mM) (Kap. 4.1.4), der Wirkung von pCMBS und Phloretin auf die Acetataufnahme (Kap. 4.1.6) und des Einflusses von Acetat und Nitrat auf die elektrophysiologischen Parameter (Kap. 4.1.7) verwendet wurden sind in Tab. A5 und Tab. A6 dargestellt.

Substanz	Pufferlösung			
	Lösung 5	Lösung 6	Lösung 7	Lösung 8
Na-Glukonat	80	80	104	104
K-Glukonat	5,5	5,5	5,5	5,5
Ca-Glukonat • 2 H₂O	1	1	1	1
Mg-Glukonat • 6 H₂O	1,25	1,25	1,25	1,25
NaH₂PO₄ • H₂O	0,6	0,6	0,6	0,6
Na₂HPO₄ • H₂O	2,4	2,4	2,4	2,4
L-Glutamin	1	1	1	1
NaHCO₃	24	24		
HEPES-free acid	10	10	10	10
Glukose	10	10	10	10
Mannitol	50	30	45	48
Gluconsäure		20		2
Choline			5	
Cl⁻-Konzentration	0	0	0	0
Osmolalität	288 ± 5	288 ± 5	288 ± 5	288 ± 5
pH-Wert	7,4	6,1	7,4	6,1

- Lösung 5: CO₂-haltige/HCO₃⁻-gepufferte Lösung (**serosaler Standardpuffer & G_{B+} pH7,4**) (Kap. 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4 und 4.1.5)
- Lösung 6: CO₂-haltige/HCO₃⁻-gepufferte Lösung (**G_{B+}**) (Kap. 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4 (für die Konzentrationsreihe 20 µM – 10 mM) und 4.1.5)
- Lösung 7: HEPES-gepufferte Lösung, (**serosaler Standardpuffer & G_{B-} pH 7,4**) (Kap. 4.1.3, 4.1.4 4.1.5, 4.1.6 und 4.1.7)
- Lösung 8: HEPES-gepufferte Lösung (**G_{B-}**) (Kap. 4.1.3, 4.1.5, 4.1.6 und 4.1.7)

Tab. A5: *Mukosale Lösungen, die zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Acetataufnahme (5 mM – 60 mM) verwendet wurden (Kap. 4.1.4).*

Als serosale Lösung wurde in diesen Untersuchungen der serosale Standardpuffer (CO_2 -haltige/ HCO_3^- -gepufferte bzw. HEPES-gepufferte Lösung, pH 7,4) verwendet (Tab. A4). Die in dem Versuch verwendeten Acetatkonzentrationen sowie die Nitratkonzentration von konstant 60 mM (in HEPES-gepuffertes Lösung) wurden durch Mischen der entsprechenden Lösungen erreicht.

Substanz	Pufferlösung				
	Lösung 9	Lösung 10	Lösung 11	Lösung 12	Lösung 13
Na-Glukonat	80		104		
Na-Acetat		80		104	
Na-Nitrat					104
K-Glukonat	5,5		5,5		
K-Acetat		5,5		5,5	
K-Nitrat					5,5
Ca-Glukonat • 2 H ₂ O	1	1	1	1	1
Mg-Glukonat • 6 H ₂ O	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Na ₂ HPO ₄ • H ₂ O	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
L-Glutamin	1	1	1	1	1
NaHCO ₃	24	24			
HEPES-free acid	10	10	10	10	10
Glukose	10	10	10	10	10
Essigsäure		34,5		10,5	
Salpetersäure					10,5
Gluconsäure	34,5		34,5	24	24
Choline	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5
Cl ⁻ -Konzentration	0	0	0	0	0
Osmolalität	288 ± 5	288 ± 5	288 ± 5	288 ± 5	288 ± 5
pH-Wert	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1

Lösung 9: CO_2 -haltige/ HCO_3^- -gepufferte Lösung (**KONZ_{B+}**)

Lösung 10: CO_2 -haltigen/ HCO_3^- -gepufferte, acetathaltige Lösung

Lösung 11: HEPES-gepufferte Lösung (**KONZ_{B-}**)

Lösung 12: HEPES-gepufferte, acetathaltige Lösung

Lösung 13: HEPES-gepufferte, nitrathaltige Lösung

Zusammensetzung der Pufferlösungen (Elektrophysiologie)

Tab. A6: *Mukosale Lösungen, die zur Untersuchung der Wirkung von pCMBS und Phloretin auf die Acetataufnahme (Kap. 4.1.6) sowie des Einflusses von Acetat und Nitrat auf die elektrophysiologischen Parameter verwendet wurden (Kap. 4.1.7)*

Als serosale Lösung wurde in diesen Untersuchungen der serosale Standardpuffer (HEPES-gepufferte Lösung, pH 7,4) verwendet (Tab. A4). Um den Gehalt an Acetat bzw. Nitrat mukosal auf 40 mM einzustellen erfolgte ein teilweiser Austausch der Lösungen 1 bzw. 4 gegen die Lösungen 2 oder 3 bzw. 5 oder 6 (genau Durchführung s. Kap. 0).

Substanz	Pufferlösung					
	Lösung 1	Lösung 2	Lösung 3	Lösung 4	Lösung 5	Lösung 6
Na-Glukonat	10			10		
Na-Acetat		10			10	
Na-Nitrat			10			10
K-Glukonat				100		
K-Acetat					100	
K-Nitrat						100
Ca-Glukonat • 2 H₂O	1	1	1	1	1	1
Mg-Glukonat • 6 H₂O	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
NaH₂PO₄ • H₂O	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Na₂HPO₄ • H₂O	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
L-Glutamin	1	1	1	1	1	1
NaHCO₃						
HEPES-free acid	10	10	10	10	10	10
Glukose	10	10	10	10	10	10
Mannitol	45	45	45	45	45	45
Essigsäure		103			3	
Salpetersäure			103			3
Gluconsäure	103			3		
Choline	101	101	101	1	1	1
Cl-Konzentration	0	0	0	0	0	0
Osmolalität	288 ± 5	288 ± 5	288 ± 5	288 ± 5	288 ± 5	288 ± 5
pH-Wert	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1

Lösung 1: Na⁺-arme, K⁺-freie, HEPES-gepufferte Lösung (**K⁻**) (Kap. 4.1.6 und 4.1.7)

Lösung 2: Na⁺-arme, K⁺-freie, HEPES-gepufferte, acetathaltige Lösung (Kap. 4.1.6 und 4.1.7)

Lösung 3: Na⁺-arme, K⁺-freie, HEPES-gepufferte, nitrathaltige Lösung (Kap. 4.1.6 und 4.1.7)

Lösung 4: Na⁺-arme, K⁺-reiche, HEPES-gepufferte Lösung (**K⁺**) (Kap. 4.1.6 und 4.1.7)

Lösung 5: Na⁺-arme, K⁺-reiche, HEPES-gepufferte, acetathaltige Lösung (Kap. 4.1.6 und 4.1.7)

Lösung 6: Na⁺-arme, K⁺-reiche, HEPES-gepufferte, nitrathaltige Lösung (Kap. 4.1.6 und 4.1.7)

9.3 Verwendete Hemmstoffe

Tab. A7

Substanzen	Lösungsmittel	Eingesetzte Konzentration
DIDS	DMSO	200 µM
Nifluminsäure	DMSO	200 µM
NPPB	DMSO	100 µM
Flufenaminsäure	DMSO	100 µM
Tamoxifen	DMSO	50 µM
Glibenclamid	DMSO	100 µM
Tenidap	DMSO	50 µM
Sulfat	Aqua dest.	5 mM
Nitrat	Aqua dest	0,5, 10 oder 60 mM
pCMBS	Aqua dest	400 µM
Phloretin	Ethanol	20 µM
EIPA	Aqua dest	10 µM
Ethoxazolamid	DMSO	50 µM

9.4 Zusammensetzung des BCA-Reagenz zur Proteinanalyse (nach SMITH et al. 1985)

Tab. A8

Reagenz A	Konzentration (mM)	Reagenz B	Konzentration (mM)
BCA (free acid)	26	CuSO₄ • 5 H₂O	160
Na₂CO₃	161		
NaOH	152		
NaHCO₃	115		
Na₂-Tatrat • 2 H₂O	7		

- Vor Verwendung wurden 100 Volumen-Anteilen Reagenz A mit 2 Volumen-Anteilen Reagenz B gemischt
- pH-Wert (Reagenz A): 11,25

9.5 Trypanblau-Test

Mit Hilfe des Trypanblau-Tests färben sich die toten Zellen blau an, während lebende Zellen ungefärbt bleiben.

Aus dem filtrierten, flüssigen Überstand wurden steril 20 µl Zellsuspension entnommen und mit 20µl Trypanblau (0,4%ig in 0,9%iger NaCl-Lösung) angefärbt. Anschließend wurden die angefärbten Zellen lichtmikroskopisch (Lichtmikroskop Televal® 31 der Fa. Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) in einer Neubauer-Zählkammer hinsichtlich Morphologie und Vitalität beurteilt. Des Weiteren wurde die Zellzahl ermittelt.

9.6 Kollagenisierung der Coverslips

Zur Kollagenisierung wurde eine 0,01 %ige Kollagenlösung hergestellt. Hierzu wurden 5 mg Kollagen Typ I (aus Kälberhaut) abgewogen. Diese wurden in 50 ml einer 0,1 M Essigsäure durch Rühren unter sterilen Bedingungen in 1 - 3 Stunden gelöst.

In Zellkulturschalen wurden 5 sterile Glasplättchen (Coverslips, Fa. Hecht Assistent, Sondheim, Deutschland) gegeben. Diese Coverslips wurden für die Messung des intrazellulären pH Wertes am Ende der Kulturperiode benötigt. Die Coverslips wurden mit 1,5 ml (10 µg Kollagen pro cm²) der Kollagenlösung bedeckt. Danach erfolgte eine Trocknung unter der Sterilbank über Nacht bei Raumtemperatur.

Die beschichteten Zellkulturschalen wurden entweder am nächsten Tag für die Anzucht von Pansenepithelzellen verwendet oder aber für max. 4 Wochen bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

Am Tag der Verwendung erfolgte eine Sterilisation der Zellkulturschalen mittels UV-Licht (Mobiler Desinfektionsstrahler UVC 30®; Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich in den letzten Jahren auf vielfältige Weise unterstützt und so die Entstehung dieser Arbeit erst möglich gemacht haben.

Besonders danke ich:

Prof. Gotthold Gäbel für die Überlassung des interessanten Themas, die außergewöhnlich gute Betreuung und das in mich gesetzte Vertrauen während der gesamten Anfertigungszeit dieser Dissertation.

Jörg für die kompetente, jederzeit gewährleistete Hilfestellung bei kleinen und großen Problemen in der Ussing-Kammer und weit darüber hinaus, das geduldige Erklären, die unermüdlichen Korrekturen dieser Arbeit und die vielen freundschaftlichen, persönlichen Gespräche.

Kerstin und Helga für die intensive Einarbeitung in die Molekularbiologie bzw. Immunhistochemie und das immer offene Ohr für berufliche und private Sorgen.

Jana, Ines, Anke, Yvonne, Carola, Tina, Arite, Thomas sowie allen anderen Doktoranden der Arbeitsgruppe für die wunderschöne Zeit, die wir miteinander verbracht haben, für Aufmunterung, Hilfe und Trost, für nötige Kritik, für perfekten Kaffee und so manches Alster am Abend. Nicht zu vergessen ist die Unterstützung bei den alltäglichen Arbeiten und Sorgen im Labor und am Schreibtisch.

Allen Mitarbeitern des Veterinär-Physiologischen Instituts danke ich für das tolle, familiäre Arbeitsklima, dass mich die Zeit in Leipzig immer als einen sehr schönen Abschnitt meines Lebens in Erinnerung behalten lässt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und Pfizer für die kostenlose Bereitstellung von Tenidap.

Zuletzt aber eigentlich allen voran danke ich meiner Familie, die mich in all meinem Handeln uneingeschränkt gefördert und unterstützt hat. Euer Rückhalt in jeder Situation hat mir Kraft und das nötige Durchhaltevermögen gegeben.

Michael, ich danke dir für Deine endlose Geduld bei allen (nicht nur zeitlichen) Rückschlägen, die Du klaglos ertragen hast. Das Wissen um Deine Unterstützung und Dein Vertrauen hat mich immer wieder Kraft gegeben. Ich danke Dir von ganzem Herzen.