

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

**T r a n s p o r t   k u r z k e t t i g e r   F e t t s ä u r e n   ü b e r   d i e  
b a s o l a t e r a l e   M e m b r a n   d e s   o v i n e n   P a n s e n e p i t h e l s :  
M e c h a n i s m e n   u n d   R e g u l a t i o n   a u f   G e n e b e n e**

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

eingereicht von  
Franziska Dengler  
aus Hof/Saale

Leipzig, 2015

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Manfred Coenen

Betreuer: Prof. Dr. Gotthold Gäbel

Gutachter: Prof. Dr. Gotthold Gäbel,  
Veterinär-Physiologisches Institut, Universität Leipzig, Leipzig  
Prof. Dr. Gerhard Breves,  
Physiologisches Institut, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover,  
Hannover

Tag der Verteidigung: 09. Dezember 2014

*Meiner Familie*  
*In Liebe und Dankbarkeit*

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Literaturübersicht .....	3
2.1	Bedeutung kurzkettiger Fettsäuren für Wiederkäuer .....	3
2.2	Metabolismus von SCFA im Pansenepithel .....	4
2.2.1	Aufrechterhaltung des Konzentrationsgradienten vom Pansenlumen ins Epithel.....	4
2.2.2	Produktion von $\text{HCO}_3^-$ aus $\text{CO}_2$ durch die Carboanhydrase .....	5
2.2.3	Bereitstellung von Energie für die Epithelzellen.....	5
2.2.4	Bereitstellung von wasserlöslichen, glukosesparenden Energiesubstraten für die periphere Zirkulation .....	5
2.2.5	Verhinderung möglicher Schädigungen durch Butyrat.....	6
2.3	Transportmechanismen für kurzkettige Fettsäuren .....	7
2.3.1	Para- versus transzelluläre Resorption.....	7
2.3.2	Transzelluläre Resorption mittels lipophiler Diffusion .....	7
2.3.3	Proteinvermittelte SCFA-Permeation.....	9
2.3.4	Permeation von SCFA aus dem Epithel ins Blut.....	11
2.4	Beeinflussung der SCFA-Resorption auf Genexpressionsebene.....	17
2.4.1	Beeinflussung der Genexpression durch Butyrat.....	17
2.4.2	Beeinflussung der Genexpression durch Hypoxie .....	20
2.4.3	Mechanismen für die Regulation der Genexpression durch Butyrat (-Metaboliten) und Hypoxie.....	21
2.5	Fragestellungen dieser Arbeit .....	26
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Publikation 1 .....	28
3.2	Publikation 2.....	41
4	Diskussion .....	54
4.1	Transport von SCFA über die basolaterale Membran des Pansenepithels .....	54
4.1.1	Transport mittels lipophiler Diffusion.....	57
4.1.2	SCFA werden bevorzugt über die basolaterale Membran transportiert .....	58
4.1.3	SCFA(-Metaboliten) werden bikarbonatabhängig über die basolaterale Membran transportiert .....	59
4.1.4	SCFA(-Metaboliten) werden durch einen Anionenaustauschmechanismus ins Blut ausgeschleust .....	61

4.1.5 Azetat wird durch einen pHMB- und CHC-sensitiven Mechanismus transportiert.....	63
4.2 Der Transport von SCFA über das Pansene­pithel unterliegt regulativen Einflüssen.....	68
4.2.1 Einfluss von Butyrat(-Metaboliten) auf die Expression von potentiellen SCFA Transportern.....	68
4.2.2 Mechanismen für die Regulation der Expression durch Butyrat(-Metaboliten) ..	72
4.3 Theoretisches Modell des SCFA-Transports und dessen Regulation auf Genexpressionsebene auf Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.....	74
5 Zusammenfassung .....	76
6 Summary .....	78
7 Literaturverzeichnis.....	80
Danksagung.....	98

## Abkürzungsverzeichnis

ACO	AcylCoA Oxidase
AE	Anionenaustauscher ( <i>engl.</i> anion exchanger)
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>engl.</i> analysis of variance)
AUC	Fläche unter der Kurve ( <i>engl.</i> area under the curve)
Az	Azetat
AzAz	Azetoazetat
$\beta$ -HOB	$\beta$ -Hydroxybutyrat
BLAST	Basic local alignment search tool
cDNA	Komplementäre DNA
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CHC	$\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymzimtsäure
CLC	Chloridkanal ( <i>engl.</i> chloride channel)
COX	Cyclooxygenase
CPT	Carnitin-Palmitoyl-Transferase
DBDS	4,4'-Dibenzamidostilben-2,2'-disulfonsäure
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	Dinitrophenol
DOI	Digitaler Objektbezeichner ( <i>engl.</i> Digital object identifier)
DRA	Down regulated in adenoma
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glukose Transporter
$G_t$	Gewebeleitfähigkeit ( <i>engl.</i> tissue conductance)
$[\text{HCO}_3^-]$	Bikarbonatkonzentration
HDI	Histondeazetylaseinhibitor
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>engl.</i> horseradish peroxidase)
HSCFA	Undissoziierte kurzkettige Fettsäuren
IBD	Chronisch entzündliche Darmerkrankung (inflammatory bowel disease)
I $\kappa$ B	Inhibitorisches $\kappa$ B-Molekül
IKK	I $\kappa$ B-Kinase
$I_{sc}$	Kurzschlussstrom ( <i>engl.</i> short-circuit current)
$J_{ms}$	Transepithelialer Flux von mukosal nach serosal

$J_{sm}$	Transepithelialer Flux von serosal nach mukosal
Lak	Laktat
MCDA	Medium-Chain AcylCoA Dehydrogenase
MCT	Monocarboxylattransporter
mRNA	Messenger RNA
n	Anzahl der Stichproben
N	Anzahl der Tiere
NBC	$Na^+/HCO_3^-$ -Kotransporter
NF $\kappa$ B	Nukleärer Faktor $\kappa$ B
NHE	$Na^+/H^+$ -Austauscher ( <i>engl.</i> $Na^+/H^+$ -exchanger)
NPPB	5-Nitro-2-(3-phenyl-propylamino-)benzoesäure
NTC	Negativkontrolle ( <i>engl.</i> no template control)
ORCC	Outward Rectifying Chloride Channel
p	Irrtumswahrscheinlichkeit ( <i>engl.</i> probability)
PAT	Putativer Anionentransporter ( <i>engl.</i> putative anion transporter)
pCMBS	p-Chloromercuribenzoessulfat
pCO <sub>2</sub>	Sauerstoffdioxidpartialdruck
PHD	Prolylhydroxylase
pHMB	p-Hydroxymercuribenzoessäure
pK <sub>a</sub>	Säurekonstante
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion ( <i>engl.</i> real-time quantitative polymerase chain reaction)
REST	Relative expression software tool
RNA	Ribonukleinsäure
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SCFA	Kurzkettige Fettsäuren ( <i>engl.</i> short chain fatty acids)
SCFA <sup>-</sup>	Dissoziierte kurzkettige Fettsäuren
SD	Standardabweichung ( <i>engl.</i> standard deviation)
ser	serosal
SEM	Standardfehler ( <i>engl.</i> standard error of mean)
SITS	4-Acetamido-4'-isothiocyanatostilben-2,2'-disulfonsäure
SLC	Solute Carrier
SMCT	$Na^+$ /Monocarboxylat-Transporter ( <i>engl.</i> sodium-monocarboxylat transporter)

TNF

Tumornekrosefaktor

## 1 Einleitung

Die steigenden Anforderungen, die in der modernen Tierhaltung in Bezug auf Laktations-, Mast- und Reproduktionsleistung gestellt werden, ziehen einen enormen Energiebedarf von Milchkuh und Mastrind nach sich. Demzufolge ist die Sicherstellung der Energieversorgung von zentraler Bedeutung für die Gesundheit der Tiere und die Wirtschaftlichkeit der Betriebe. Bei der Sicherung der Energieversorgung gilt es aber zu beachten, dass Wiederkäuer - anders als Monogastrier - ihren Energiebedarf hauptsächlich durch kurzkettige Fettsäuren (SCFA = short chain fatty acids) decken. Dank ihrer Vormägen und der darin beheimateten Mikroorganismen gelingt es Wiederkäuern, ansonsten schwer verdauliche Pflanzenbestandteile wie Cellulose zu SCFA abzubauen (BREVES und LEONHARD-MAREK 2010). Dabei entstehen v.a. Azetat, Propionat und Butyrat, die dem Tier als hauptsächliche energieliefernde Substrate zur Verfügung stehen (BERGMAN 1990). Es genügt aber nicht, dass die pflanzlichen Futterbestandteile effizient zu SCFA abgebaut werden, diese Abbauprodukte müssen ebenso effizient resorbiert werden. Eine genaue Kenntnis dieser Resorptionsmechanismen erlaubt somit nicht nur Einblicke in evolutionäre Anpassungsmechanismen des Wiederkäuers, sondern bei Kenntnis eventueller resorptiver Engpässe evtl. auch gezielte fütterungstechnische Maßnahmen zur weiteren Effizienzsteigerung.

Hinsichtlich der Lokalisation der SCFA-Aufnahme erscheint es folgerichtig, dass sie schon am Ort ihrer Entstehung, also in den Vormägen, zu großen Teilen resorbiert werden (BARCROFT et al. 1944; MARSHALL und PHILLIPSON 1945). Mögliche Mechanismen des Vormagen- und insbesondere Pansenepithels zur SCFA-Resorption werden schon lange Zeit diskutiert und erforscht (STEVENS und STETTLER 1966b; GÄBEL und SEHESTED 1997; SEHESTED et al. 1999a; BILK 2007; RACKWITZ 2011).

Grundsätzlich ist zwischen dem Transport vom Panseninneren in die Epithelzellen hinein und der Ausschleusung der SCFA sowie ihrer beim intrazellulären Abbau entstandenen Metabolite ins Blut zu unterscheiden. Während der erste Schritt der Aufnahme der SCFA vom Lumen ins Zellinnere bereits Gegenstand intensiver Untersuchungen war (BILK 2007; ASCHENBACH et al. 2009; RACKWITZ 2011), ist zur Ausschleusung der SCFA(-Metabolite) ins Blut erst wenig bekannt (MÜLLER et al. 2002; GÄBEL et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Transport von SCFA und deren Metaboliten vom Zellinneren in Richtung Blut auf funktioneller Ebene zunächst näher eingegrenzt und charakterisiert werden. Dieser erste Abschnitt der Untersuchungen zeigte, dass, wie auch

auf der apikalen Seite des Epithels, verschiedene Transportproteine an der Permeation von SCFA ins Blut beteiligt sind und somit für eine effiziente Ausschleusung sorgen.

In Anbetracht der Bedeutung dieser Resorptionswege für den Energiehaushalt und somit für die Leistungsfähigkeit, aber auch für die Gesunderhaltung des Tieres ist es vonnöten, dass diese nicht nur grundsätzlich effektiv arbeiten, sondern sie müssen sich auch an wechselnde Anforderungen adaptieren können. So muss beispielsweise eine Milchkuh Jahr für Jahr ihren Energiehaushalt an ihr aktuelles Laktations- sowie Graviditätsstadium anpassen. Dies wird zwar durch wechselnde Fütterungsregimes unterstützt, doch die Resorption muss mit diesen wechselnden Regimes Schritt halten. Daher ist es von großem Interesse, Adaptationsmechanismen der beteiligten Resorptionswege zu kennen, um diese in Zukunft gezielter unterstützen zu können. Eine Anpassung der Resorption könnte beispielsweise über eine Regulierung der Expression von Transportproteinen abhängig von der SCFA-Konzentration erfolgen. Deshalb wurde in einem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit untersucht, inwiefern eine erhöhte intraruminale Konzentration von Butyrat Auswirkungen auf die Expression von Proteinen hat, die am Transport der SCFA über das Pansenepithel beteiligt sind. Zudem wurde die Beteiligung von Signalwegen, die eine solche Anpassung der Genexpression vermitteln könnten, evaluiert.

## **2 Literaturübersicht**

In diesem Abschnitt soll die herausragende Bedeutung der intraruminal produzierten kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) für die Energieversorgung des Wiederkäuers sowie der aktuelle Wissensstand zu ihrer Resorption aus dem Pansenlumen ins Blut dargestellt werden. Da SCFA aber nicht nur der Energieversorgung des Tiers dienen, sondern auch direkt Einfluss auf die Pansenepithelzellen nehmen, wird auch ihr Metabolismus im Pansenepithel beschrieben. Zudem sollen mögliche Mechanismen zur Beeinflussung der SCFA-Resorption auf Genexpressionsebene ausgeführt werden.

### ***2.1 Bedeutung kurzkettiger Fettsäuren für Wiederkäuer***

Während Monogastrier, insbesondere Herbivoren, das Caecum als Gärkammer und Lebensraum für Mikroorganismen nutzen (BUGAUT 1987), haben sich Wiederkäuer durch die Ausbildung eines Vormagensystems noch weiter auf die Aufnahme unverdaulicher Pflanzenbestandteile wie Pektine, (Hemi-)Zellulosen und Lignin spezialisiert. Insbesondere das Retikulum bietet Lebensraum für unzählige Mikroorganismen, die die Zellwandbestandteile hauptsächlich zu kurzkettigen Fettsäuren (SCFA), Methan und Kohlendioxid abbauen (MARSHALL und PHILLIPSON 1945; BUGAUT 1987). Die im Retikulum gebildeten SCFA sind vor allem Azetat, Propionat und Butyrat. Bei einer Gesamtkonzentration von 60 bis 150 mM (BERGMAN 1990) liegen Azetat, Propionat und Butyrat in Konzentrationsverhältnissen von ca. 75 : 15 : 10 bei konzentratarmer bzw. ca. 40 : 40 : 20 bei konzentratreicher Fütterung vor (BERGMAN 1990; PENNER et al. 2009b). Insgesamt können im Vormagen eines Schafes zwischen 3 und 10 Mol SCFA pro Tag und kg Trockenmasse des aufgenommenen Futters entstehen (BERGMAN 1990; MARTIN et al. 2001). Ein Großteil der SCFA wird direkt über das Pansenepithel aufgenommen (BARCROFT et al. 1944; BUGAUT 1987; GÄBEL und SEHESTED 1997; NOZIERE et al. 2000; STORM und KRISTENSEN 2010). Ihrem hohen Aufkommen entsprechend stellen SCFA das Haupt-Energiesubstrat für Wiederkäuer dar. Es wird davon ausgegangen, dass 70 - 80 % bzw. 50 - 70 % des täglichen Energiebedarfs von Schafen bzw. laktierenden Kühen durch SCFA gedeckt werden können (BERGMAN et al. 1965; BUGAUT 1987; SICILIANO-JONES und MURPHY 1989; RÉMOND et al. 1995).

## **2.2 Metabolismus von SCFA im Pansenepithel**

Schon bei ersten Untersuchungen zur Resorption von SCFA aus dem Pansen fiel auf, dass bei Infusion gleicher Mengen SCFA in den vorübergehend isolierten, gewaschenen Pansen Butyrat deutlich schneller und in größerem Ausmaß aus der ruminalen Flüssigkeit verschwand als Azetat und Propionat (MASSON und PHILLIPSON 1951). Im peripheren Blutkreislauf erschienen jedoch bei gleichem luminalen Angebot deutlich mehr Azetat und Propionat als Butyrat (BARCROFT et al. 1944; ANNISON et al. 1957). Diese Diskrepanz wurde bereits damals auf den intraepithelialen Metabolismus der SCFA zurückgeführt (MASSON und PHILLIPSON 1951). BUGAUT (1987) beobachtete *in vitro* eine Verstoffwechslung von bis zu 92 % des aufgenommenen Butyrats in den Epithelzellen. Dies deckt sich mit der Schätzung von BERGMANN et al. (1990), der zufolge jeweils 30, 50 und 90 % von Azetat, Propionat und Butyrat intraepithelial verstoffwechselt werden. Nachfolgende Untersuchungen setzen das Ausmaß des Metabolismus von Azetat und Propionat aber deutlich niedriger an als ursprünglich von BERGMANN et al. (1990) veranschlagt (KRISTENSEN et al. 1998; KRISTENSEN et al. 2000a; GÄBEL et al. 2002). Als Konsens aller diesbezüglichen Untersuchungen gilt, dass Butyrat zu einem sehr viel höheren Anteil metabolisiert wird als Azetat und Propionat. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede zwischen den Katabolismusraten der SCFA ist, dass die zur Aktivierung der SCFA nötigen AcylCoA-Synthetasen entsprechend steigende spezifische Aktivitäten von Azetat über Propionat zu Butyrat zeigen (RÉMOND et al. 1995).

Nach der Bildung der jeweiligen AcylCoA-SCFA erfolgt der Abbau der SCFA entweder komplett bis hin zu CO<sub>2</sub> und Wasser (BUGAUT 1987; RÉMOND et al. 1995) oder, im Falle von Butyrat und in deutlich geringerem Umfang auch von Azetat, zu den Ketonkörpern Azetoazetat und  $\beta$ -Hydroxybutyrat (KRISTENSEN et al. 1998). Ein weiterer wichtiger Metabolit ist L-Laktat, das aus dem Abbau von Propionat hervorgeht (WEIGAND et al. 1972b). Der intraepitheliale Metabolismus der SCFA, insbesondere von Butyrat, hat eine zentrale Bedeutung für den Stoffwechsel des Pansenepithels und auch für den Gesamtorganismus. Es entstehen verschiedene Vorteile für den Wiederkäuer, die im Folgenden erläutert werden sollen.

### **2.2.1 Aufrechterhaltung des Konzentrationsgradienten vom Pansenlumen ins Epithel**

Verschiedene Untersuchungen deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Absorptionsrate der SCFA und deren Metabolismus hin. Es konnte beobachtet werden,

dass die Transportrate des kaum metabolisierbaren Isobutyrate im Vergleich zu gut metabolisierbarem n-Butyrat deutlich geringer ausfällt (GÄBEL et al. 2001). Dieser Effekt lässt sich damit erklären, dass der Konzentrationsgradient von Butyrat vom Pansen in die Epithelzellen durch den intraepithelialen Abbau konstant hoch gehalten wird.

### **2.2.2 Produktion von $\text{HCO}_3^-$ aus $\text{CO}_2$ durch die Carboanhydrase**

Ein weiteres Produkt des SCFA-Metabolismus ist  $\text{CO}_2$ , das letztendlich durch die im Pansenepithel nachgewiesene Carboanhydrase (CARTER 1971; EMANOVIC et al. 1976) in  $\text{HCO}_3^-$  umgewandelt wird. Dieses  $\text{HCO}_3^-$  wiederum sorgt für den Antrieb eines oder mehrerer Anionenaustauscher, die eine große Rolle bei der apikalen Aufnahme von SCFA ins Pansenepithel spielen (KRAMER et al. 1996; BILK et al. 2005; ASCHENBACH et al. 2009) (s. 2.3.3 *Proteinvermittelte SCFA-Permeation*). Somit wird die Aufnahme weiterer SCFA-Moleküle durch deren Abbau zusätzlich gefördert. Zudem wirkt das dadurch ins Pansenlumen sezernierte  $\text{HCO}_3^-$  als wichtiger Puffer, mit dessen Hilfe der intraruminale pH-Wert trotz der Dissoziation und Absorption von SCFA (und somit der Abspaltung von Protonen) konstant gehalten wird (ASCHENBACH et al. 2009; ASCHENBACH et al. 2011).

### **2.2.3 Bereitstellung von Energie für die Epithelzellen**

Während andere intestinale Epithelien ihren Energiebedarf für Absorptionsmechanismen, Proteinaufbau und Proliferation vorrangig durch den Abbau von Glukose und Glutamin decken (BRITTON und KREHBIEL 1993), zeigen diejenigen gastrointestinalen Abschnitte, die über eine mikrobielle Besiedlung verfügen, eine weitere evolutionäre Anpassung an ihre Funktion. Obwohl die Versorgung des Gewebes mit Glukose und Glutamin über das Blut gewährleistet wäre (RÉMOND et al. 1995), bedienen sich die Pansenepithelzellen bevorzugt der aus dem Lumen aufgenommenen SCFA, v.a. des Butyrats, um den Energiebedarf energieaufwändiger Prozesse wie Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und Proliferation zu decken (BERGMAN 1990; BALDWIN und JESSE 1992; BRITTON und KREHBIEL 1993; DEFRAIN et al. 2004; WIESE et al. 2013). Dadurch wird der Abbau der Blutglukose vermindert und somit systemisch wichtige Energielieferanten gespart.

### **2.2.4 Bereitstellung von wasserlöslichen, glukosesparenden Energiesubstraten für die periphere Zirkulation**

Im Gegensatz zu der eher lipophilen SCFA Butyrat selbst zeichnen sich die durch deren Abbau entstehenden Ketonkörper durch eine gute Wasserlöslichkeit aus. Somit können

sie leicht mit dem Blutstrom zu peripheren Organen wie Herz, Nieren und Gehirn transportiert werden, in denen Ketonkörper bevorzugt als Hauptenergiequelle genutzt werden (ROBINSON und WILLIAMSON 1980; GÄBEL et al. 2002).

### **2.2.5 Verhinderung möglicher Schädigungen durch Butyrat**

Eine Beeinflussung von Zellproliferation, -differenzierung, -apoptose und Genexpression verschiedenster Zellarten durch Butyrat wurde in vielen Studien beobachtet (SAKATA und TAMATE 1978; GALFI et al. 1991; VELAZQUEZ et al. 1996; HAMER et al. 2008; PLÖGER et al. 2012). An stark Butyrat exponierten Pansenepithelien fällt bereits makroskopisch eine Hyperkeratose und Vergrößerung der Pansenzotten auf (DIRKSEN et al. 1984; DIRKSEN et al. 1992; MALHI et al. 2013). Dies könnte eine Reaktion auf unzureichend metabolisiertes Butyrat sein, das durch die Überschreitung der Kapazitäten für dessen Abbau verstärkt in den Epithelzellen akkumuliert.

In der Folge gelangt auch vermehrt unmetabolisiertes Butyrat in die Zirkulation und muss von der Leber abgebaut werden, was die Aufnahme von Propionat und somit die Glukoneogenese behindert (REYNOLDS et al. 1988; KREHBIEL et al. 1992). Dies stellt insbesondere laktierende Tiere wegen des hohen Glukosebedarfes der Milchdrüse vor Schwierigkeiten. Aber auch viele andere Gewebe präferieren Glukose zur Energiegewinnung (BRITTON und KREHBIEL 1993). Somit könnte ein verstärktes Auftauchen von Butyrat in der Zirkulation negative Folgen für den gesamten Organismus haben. Der Abbau von Butyrat zu den „unschädlichen“ Ketonkörpern verhindert eine solche Entgleisung.

## **2.3 Transportmechanismen für kurzkettige Fettsäuren**

### **2.3.1 Para- versus transzelluläre Resorption**

In der Transportphysiologie wird im Allgemeinen zwischen sogenannten „leaky“, also durchlässigen, und sogenannten „tight“, d.h. dichten, Epithelien unterschieden. Erstere finden sich v.a. in Dünndarm und proximalen Abschnitten der Nierentubuli, wogegen in den distalen Nierentubuli, Colon und Caecum zunehmend dichtere Epithelien vertreten sind (ULLRICH et al. 1979). Diese Formen unterscheiden sich wesentlich in der Menge und Art der transportierten Substrate. Während bei durchlässigen Epithelien viele Substanzen parazellulär getrieben durch elektrochemische Gradienten bzw. solvent drag permeieren können (SCHULTZ 1977), ist dies bei dichten Epithelien nur sehr begrenzt möglich, sodass der Schwerpunkt bei letzteren auf dem transzellulären Transport liegt.

SCFA liegen im Pansenlumen größtenteils dissoziiert, d.h. als Anionen, vor (s. 2.3.2 *Transzelluläre Resorption mittels lipophiler Diffusion*), sodass eine parazelluläre Permeation der SCFA über das Pansenepithel einen einfachen Resorptionsweg darstellen würde. Hinsichtlich der Wege der SCFA-Resorption aus dem Pansen haben Ussing-Kammer-Untersuchungen am isolierten bovinen und ovinen Pansenepithel allerdings ergeben, dass - bei Ausschluss des chemischen Gradienten - elektrische Gradienten kaum Einfluss auf die Transportrate von SCFA haben, sodass davon ausgegangen werden kann, dass der parazelluläre Transport bei der Resorption von SCFA keine Rolle spielt (STEVENS und STETTLER 1966b; RACKWITZ 2011). Somit ist das Pansenepithel im Hinblick auf die SCFA als dichtes Epithel einzuordnen. Die *in vivo* festgestellten hohen Resorptionsraten von Azetat, Propionat und Butyrat über das Pansenepithel (KRISTENSEN et al. 2000a; KRISTENSEN et al. 2000b) lassen sich daher nur durch eine vorwiegend transzelluläre Permeation dieser SCFA erklären.

### **2.3.2 Transzelluläre Resorption mittels lipophiler Diffusion**

Bei der transzellulären Permeation über das Pansenepithel ist zu beachten, dass das Epithel der Vormägen ein mehrschichtiges Plattenepithel ist. Histologisch kann es in ein *Stratum basale*, mehrere Lagen der *Strata spinosum* und *granulosum* sowie ein sich anschließendes *Stratum corneum* mit zunehmend abflachenden Zellen, die nach und nach abschilfern, eingeteilt werden (STEVEN und MARSHALL 1970). Aufgrund der zahlreichen Zellverbindungen wird das Epithel funktionell als ein Synzytium mit einer apikalen (lumenseitigen) und einer basolateralen (blutseitigen) Membran angesehen (GÄBEL et al.

2002; GRAHAM und SIMMONS 2005; PENNER et al. 2011). Beim transzellulären Transport müssen also mindestens zwei Membranen überwunden und die dazwischen liegenden Zellen durchquert werden.

SCFA können grundsätzlich in zwei Formen vorliegen, zum einen protoniert (HSCFA) und zum anderen als Fettsäureanion ( $\text{SCFA}^-$ ). Die protonierte Form ist aufgrund ihrer Lipophilie in der Lage, die Zellmembran mittels Diffusion zu passieren (WALTER und GUTKNECHT 1986). Da HSCFA keinerlei elektrische Ladung besitzen, bleibt als einzige Triebkraft dieser Diffusion ein chemischer Gradient (RECHKEMMER et al. 1995). Mit einer intraruminalen Konzentration der SCFA von 60 - 150 mM (BERGMAN 1990) gegenüber einer 20- bis 100fach geringeren Blutkonzentration (MASSON und PHILLIPSON 1951; ANNISON et al. 1957) ist der Gradient *in vivo* in Richtung des Blutes gerichtet.

Das Gleichgewicht zwischen HSCFA und  $\text{SCFA}^-$  ist nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung ( $\text{pH} = \text{pK} + \log (\text{SCFA}^-/\text{HSCFA})$ ) abhängig vom pH-Wert. Bei einem  $\text{pK}_a$  der SCFA von  $\sim 4,8$  (CISTOLA et al. 1982; VELAZQUEZ et al. 1997) ist bei einem pH-Wert im Panseninhalt von  $\sim 6,4$  (DANIELLI et al. 1945; ASCHENBACH et al. 2010) ein größerer Anteil protoniert als bei einem pH-Wert zwischen 6,8 und 7,4 im Zellinneren (ROTHENPIELER 1991; MÜLLER et al. 2000; SCHWEIGEL et al. 2005) oder 7,4 im Blut (HÄSDENTEUFEL und SCHNEIDER 2014). Daraus resultiert ein zusätzlicher Gradient für die protonierte Form vom Pansenlumen ins Epithel bzw. Blut.

Mehrere Befunde unterstützen zwar eine Beteiligung der Permeation von HSCFA am transzellulären Transport der SCFA, allerdings zeigen diese Untersuchungen auch, dass dies nicht der alleinige Mechanismus sein kann:

- Obwohl einige Untersuchungen untersetzen, dass die Resorption der SCFA linear zu ihrer Konzentration steigt (WEIGAND et al. 1972a; DIJKSTRA et al. 1993; LOPEZ et al. 2003), konnten auch Sättigungskinetiken für den Transport der SCFA erstellt werden (RECHKEMMER et al. 1995; SEHESTED et al. 1999b; ASCHENBACH et al. 2009), was eher für eine Beteiligung eines proteinvermittelten Mechanismus, der dissoziierte SCFA akzeptiert, spricht.
- Einen weiteren Hinweis liefert die pH-Abhängigkeit der Resorption. So verschiebt sich bei sinkendem pH-Wert das Gleichgewicht zwischen  $\text{SCFA}^-$  und HSCFA zunehmend in Richtung der HSCFA. Somit stünde die protonierte Form vermehrt für eine passive Diffusion über das Pansenepithel zur Verfügung. Eine Proportionalität der SCFA-Resorption zum luminalen pH-Wert konnte zwar qualitativ *in vivo* (DANIELLI et al. 1945; WEIGAND et al. 1972a; DIJKSTRA et al. 1993) und *in vitro* (STEVENS und STETTLER 1966b; KRAMER et al. 1996;

SEHESTED et al. 1999a) bestätigt werden. Allerdings war die in diesen Untersuchungen beobachtete Steigerung der Resorption nicht annähernd so groß, wie sie entsprechend der Zunahme der Konzentration von HSCFA hätte sein müssen (GÄBEL und SEHESTED 1997; GÄBEL et al. 2002; ASCHENBACH et al. 2009).

- Auch aus dem Einfluss der Kettenlänge auf die Resorption lässt sich auf die resorbierte Form schließen. So steigt die Lipophilie von HSCFA analog zu ihrer Kettenlänge an, was bei künstlichen Lipidmembranen zu einer Steigerung des Permeabilitätskoeffizienten von Azetat über Propionat (5,1fach höherer Koeffizient als Azetat) zu Butyrat (2,1fach höher als Propionat) führte (WALTER und GUTKNECHT 1986). Dieser Zusammenhang spiegelt sich zwar in einer Zunahme der (reticulo-)ruminale SCFA-Resorption in der Reihenfolge Butyrat > Propionat > Azetat wider (BARCROFT et al. 1944; STEVENS und STETTLER 1966a; WEIGAND et al. 1972a; DIJKSTRA et al. 1993; SEHESTED et al. 1999a), der Unterschied zwischen der Resorption der einzelnen SCFA liegt aber in allen Untersuchungen deutlich unter den von WALTER und GUTKNECHT (1986) festgestellten Unterschieden in den Permeabilitätskoeffizienten der SCFA. Infolgedessen kann auch bei Berücksichtigung dieses Aspektes die lipophile Diffusion von HSCFA nicht als alleiniger Mechanismus der SCFA-Aufnahme abgeleitet werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die lipophile Diffusion von HSCFA beim Transport der SCFA über das Pansenepithel - wegen des pH-Gefälles zum Zellinneren insbesondere auf der apikalen Seite - eine Rolle spielen könnte, keinesfalls jedoch den einzigen Mechanismus für deren transzelluläre Permeation darstellt. Deshalb sollen im Folgenden proteinvermittelte Transportmechanismen vorgestellt werden, deren Beteiligung am Transport der SCFA diskutiert wird.

### **2.3.3 Proteinvermittelte SCFA-Permeation**

Dieselben Untersuchungen, die demonstrierten, dass sich die Permeation der SCFA nicht alleine durch lipophile Diffusion erklären lässt, erbrachten auch Hinweise auf die Beteiligung aktiver Transportmechanismen an diesem Prozess. STEVENS und STETTLER (1967) entwarfen hierfür ein Drei-Kompartiment-Modell, wobei sie davon ausgingen, dass ein Kompartiment (der Intrazellulärraum) durch zwei verschiedenen permeable Membranen von den übrigen beiden Kompartimenten (Pansenlumen und Blut) getrennt ist. Aufgrund ihrer Beobachtungen zu den Transportcharakteristika von Azetat

entstand aus ihrem Modell das Postulat eines aktiven Transportmechanismus für SCFA auf der weniger permeablen Seite (STEVENS und STETTLER 1967).

In nachfolgenden Studien wurde zwar weiterhin eine lipophile Diffusion als wichtiger Permeationsmechanismus betrachtet, jetzt allerdings sekundär angetrieben durch einen apikal im Epithel nachgewiesenen Natrium-Protonen-Austauscher (NHE), der unter Natriumaufnahme die im Zytosol anfallenden Protonen ins Lumen rezirkuliert, sodass dort erneut HSCFA zur Diffusion entstehen können und gleichzeitig ein zu starkes Absinken des intrazellulären pH-Werts verhindert wird (GÄBEL et al. 1991b; DIERNÆS et al. 1994). Unterstützt wurde dieser Gedanke von der Beobachtung, dass die Na-Resorption abhängig von der ruminalen SCFA-Konzentration ist (GÄBEL et al. 1991b). Allerdings war umgekehrt die SCFA-Resorption unabhängig von der Na-Konzentration (GÄBEL et al. 1991b), was untersetzt, dass neben der direkten bzw. indirekt über den NHE betriebenen Permeation von HSCFA auch eine effektive Permeation von SCFA<sup>-</sup> möglich ist. So stellte BUGAUT (1987) fest, dass der Transport von SCFA übers Pansenepithel durch eine Sättigungskinetik und kompetitive Substratinhibition gekennzeichnet ist, was Hinweise auf einen proteinvermittelten Transport von SCFA gab. Es wurde postuliert, dass der apikal in Colon- und Pansenepithel nachgewiesene HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup>-Austauscher (CHIEN und STEVENS 1972; FRIZZELL et al. 1976) anstelle von Cl<sup>-</sup> auch SCFA<sup>-</sup> akzeptieren könnte (BUGAUT 1987).

Auch SEHESTED et al. (1999a) kamen zu dem Schluss, dass die lipophile Diffusion zwar eine pH-abhängige Komponente des SCFA-Transports darstellt, die deutliche Asymmetrie im SCFA-Transport jedoch eindeutig für einen proteinvermittelten Transport spricht. Sie beobachteten unterschiedliche Transportraten von SCFA über das Pansenepithel *in vitro*, wobei Azetat und Propionat verstärkt von serosal nach mukosal transportiert wurden, woraus eine Nettosekretion resultierte, während für Butyrat eine Nettoresorption festgestellt wurde (SEHESTED et al. 1999a). Diese Hypothese wurde in weiteren Untersuchungen zum Transport von Butyrat bestärkt, wobei auch hier ein Austausch von Butyrat gegen HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> unterstellt wurde (SEHESTED et al. 1999b).

Am isolierten Pansenepithel wurde ein apikaler Austausch von SCFA<sup>-</sup> gegen HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> von ASCHENBACH et al. (2009) bestätigt. Die Identität des dafür verantwortlichen Proteins konnte jedoch noch nicht abschließend geklärt werden. Konsens ist aktuell, dass SCFA die apikale Membran des Pansenepithels sowohl via lipophiler Diffusion als auch über einen SCFA/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher überqueren können.

### 2.3.4 Permeation von SCFA aus dem Epithel ins Blut

Im Gegensatz zum Transport der SCFA über die apikale Membran des Pansenepithels gibt es bislang nur wenige Untersuchungen, die sich mit dem Weg der SCFA über die basolaterale Membran und somit aus den Epithelzellen ins Blut beschäftigen.

Einige Autoren betrachten auf der basolateralen Seite des Epithels die lipophile Diffusion von HSCFA als zentralen Transportmechanismus (ALI et al. 2006). Allerdings kann - wie unter 2.3.2 (*Transzelluläre Resorption mittels lipophiler Diffusion*) dargestellt - nicht der gesamte Transport durch lipophile Diffusion von HSCFA vermittelt werden. Dieses Postulat trifft auf die basolaterale Membran noch stärker zu als auf die apikale, da der pH-Gradient (der zwischen Pansenlumen und dem Zellinneren einen Konzentrationsgradienten von HSCFA herzustellen vermag) zwischen Zellinnerem (6,8 - 7,4 (ROTHENPIELER 1991; MÜLLER et al. 2000; SCHWEIGEL et al. 2005)) und Blut (7,4 (HABDENTEUFEL und SCHNEIDER 2014)) kaum vorhanden ist. Weiterhin kommt auf dieser Seite des Epithels hinzu, dass nicht nur die SCFA selbst ausgeschleust werden müssen, sondern auch die hydrophilen Produkte ihres intrazellulären Metabolismus, d.h. Azetoazetat,  $\beta$ -Hydroxybutyrat und Laktat (s. 2.2 *Metabolismus von SCFA im Pansenepithel*). Um die effektive Ausschleusung der SCFA bzw. ihrer Metabolite aus der Zelle zu ermöglichen, müsste es also auch in der basolateralen Membran proteinabhängige Transportmechanismen geben.

Neben einem elektrogenen Transport mittels eines Anionenkanals (STUMPPFF et al. 2009; LEONHARD-MAREK et al. 2010), wird auch ein protonengekoppelter Symport, insbesondere der Metaboliten, über einen in der basolateralen Membran nachgewiesenen Monocarboxylattransporter (MCT) diskutiert (MÜLLER et al. 2002; KIRAT et al. 2006b; CONNOR et al. 2010). Zudem wurde, analog zur apikalen Seite, auch für die basolaterale Seite bereits ein SCFA/ $\text{HCO}_3^-$ -Austauscher postuliert (SEHESTED et al. 1999b). Diese Hypothese findet Unterstützung durch einen Vergleich des Pansenepithels mit dem Colonepithel von Monogastriern, das ebenfalls Mechanismen für den Transport von SCFA aufweist. Im Colon wird der im Pansenepithel basolateral lokalisierte MCT 1 von einigen Autoren als SCFA/ $\text{HCO}_3^-$ -Austauscher betrachtet (REYNOLDS et al. 1993; HADJIAGAPIOU et al. 2000; TYAGI et al. 2002; DUDEJA und RAMASWAMY 2006). Eine Ausschleusung der SCFA(-Metaboliten) im Austausch mit  $\text{HCO}_3^-$  brächte den Vorteil, dass ein steter Nachschub dieses wichtigen Puffers für die apikale Sekretion gesichert wäre.

Es konnte für das Pansenepithel bislang jedoch keines der Modelle für die basolaterale Ausschleusung abschließend bestätigt werden. Auf mRNA-Ebene konnten zwar verschiedene (Austauscher-)Proteine im Pansenepithel nachgewiesen werden, die für die

beobachteten bzw. vermuteten Transportmechanismen verantwortlich sein könnten (BILK et al. 2005), allerdings gelang bei der Mehrzahl dieser Transporter noch keine eindeutige Zuordnung ihrer Lokalisation im Pansenepithel, sodass sie sowohl auf der apikalen als auch der basolateralen Seite des Epithels für den Transport der SCFA in Frage kommen. Die Beteiligung dieser Proteine an der Permeation der SCFA über die basolaterale Membran des Pansenepithels sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden. Deshalb werden sie im Folgenden näher vorgestellt.

### **2.3.4.1 Anion Exchanger (AE) 2**

Der AE 2 gehört zur Familie der SLC4-Transporter. Diese beinhaltet Bikarbonattransporter, darunter eine in vielen Geweben verbreitete Gruppe von Anionenaustauschern, AE 1-4. Dabei gilt AE 2 als der hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt vorherrschende Vertreter (JONS und DRENCKHAHN 1998; ALPER et al. 2002), es wurde aber auch die Isoform 1 bereits im Colon der Ratte nachgewiesen (RAJENDRAN und BINDER 2000; RAJENDRAN et al. 2000). Im Pansenepithel des Schafes wurde ebenfalls mRNA gefunden, die AE 2 codiert (BILK et al. 2005). Allerdings konnte hier seine genaue Lokalisation noch nicht festgestellt werden. In Magen und Colon von Mensch und Ratte wurde der AE 2 in immunhistochemischen Untersuchungen sowie Membranvesikelpräparationen durchwegs in der basolateralen Membran detektiert; AE 1 hingegen, falls vorhanden, eher apikal (JONS und DRENCKHAHN 1998; RAJENDRAN und BINDER 2000; RAJENDRAN et al. 2000; IKUMA et al. 2003). Bezüglich der Substratspezifität werden AE grundsätzlich als  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher beschrieben, die jedoch auch als  $\text{Cl}^-/\text{OH}^-$  oder  $\text{Cl}^-/\text{Butyrat}$ -Austauscher fungieren können (JONS und DRENCKHAHN 1998; RAJENDRAN und BINDER 2000; IKUMA et al. 2003). Die Stilbenderivate 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonsäure (DIDS) und 4-Acetamido-4'-isothiocyanatostilben-2,2'-disulfonsäure (SITS) sind bislang die einzigen bekannten spezifischen Inhibitoren dieser Transporterfamilie (OBRADOR et al. 1998; IKUMA et al. 2003; BERGER et al. 2010; GAWENIS et al. 2010).

### **2.3.4.2 Down Regulated in Adenoma (DRA)**

Aus der Familie der sog. multifunktionalen Anionen-Austauscher, SLC26, gibt es zwei Vertreter, die auf molekularer Ebene auch im Pansenepithel des Schafes nachgewiesen wurden (BILK et al. 2005), einer davon ist DRA. Die erste Eigenschaft, die diesem Transporter zugeschrieben wurde, war eine herabregulierte Expression in Adenomen und

Adenokarzinomen des Colons, sodass man ihn als „Down Regulated in Adenoma“ (DRA) bezeichnete (SCHWEINFEST et al. 1993). Er konnte in der apikalen Membran aller Darmabschnitte (BYEON et al. 1996) nachgewiesen werden. Im Colon von Mensch und Nagern wurde DRA hauptsächlich als elektroneutraler  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher beschrieben (MELVIN et al. 1999; ALPER et al. 2001; JACOB et al. 2002). Im Gegensatz dazu halten KO et al. (2002) einen elektrogenen Transport dieser Ionen in einer Stöchiometrie von 2:1 für wahrscheinlicher. Neben  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$  akzeptiert der DRA auch Sulfat und Oxalat (SILBERG et al. 1995). Eine Akzeptanz von SCFA wurde bislang nicht nachgewiesen. Als gesichert erscheint hingegen eine Kopplung zwischen DRA und NHE (LAMPRECHT et al. 2002), was eine Erklärung für die bereits beobachtete Stimulation der Natriumabsorption bei SCFA-Zugabe in Pansen und Colon bieten könnte (GÄBEL et al. 1991b; VON ENGELHARDT et al. 1993).

DRA wird als DIDS-sensitiv beschrieben (SILBERG et al. 1995; JACOB et al. 2002), in einigen Untersuchungen zeigte sich das Protein jedoch unempfindlich gegenüber DIDS (MELVIN et al. 1999; ALPER et al. 2001). Daneben gibt es Berichte einer Empfindlichkeit gegenüber Nifluminsäure und Tenidap (ALPER et al. 2001).

### **2.3.4.3 Putativer Anionentransporter (PAT) 1**

Ein weiterer Vertreter der SLC26-Transporterfamilie, der im Pansen des Schafes auf mRNA-Ebene nachgewiesen wurde, ist der PAT 1 (BILK et al. 2005). Immunhistochemische Nachweise gelangen bereits in der apikalen Membran von Magen, Dünn- und Dickdarm sowie in weiteren Organen wie Herz und Nieren monogastrischer Spezies (PETROVIC et al. 2002; WANG et al. 2002). Dabei war eine große Heterogenität zwischen den Proteinen der einzelnen Tierarten auffällig, die sich auch in unterschiedlichen Transporteigenschaften widerspiegelt (CHERNOVA et al. 2005). Bei allen untersuchten Varianten konnte ein elektroneutraler  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch nachgewiesen werden (WANG et al. 2002; CHERNOVA et al. 2005), allerdings variierten die Affinitäten beispielsweise für Formiat, Oxalat und Sulfat stark (CHERNOVA et al. 2005). An mit murinem PAT 1 transfizierten HEK293-Zellen konnte eine Affinität für organische Anionen, unter anderem auch SCFA, gezeigt werden (NOZAWA et al. 2004). Analog zu DRA und AE 2 soll auch PAT 1 DIDS-sensitiv sein (PETROVIC et al. 2002; WANG et al. 2002).

#### **2.3.4.4 Monocarboxylattransporter (MCT)**

MCT der Transporterfamilie SLC16 wurden erstmals in der Plasmamembran von Erythrozyten (DEUTICKE 1982; POOLE und HALESTRAP 1993; HALESTRAP und PRICE 1999) und auch von Skelettmuskelzellen nachgewiesen, wo sie eine Schlüsselrolle für den Export von Laktat spielen (JUEL und HALESTRAP 1999; MANNING FOX et al. 2000). Auch in CaCo2-Zellen konnte ein Vertreter dieser Familie, MCT 1, nachgewiesen werden, woraufhin ihm eine Rolle beim Transport schwacher organischer Anionen über das Epithel des Gastrointestinaltraktes zugeschrieben wurde (TAMAI et al. 1995; HADJIAGAPIOU et al. 2000). Am Colon von Schwein und Mensch sowie am Jejunum der Ratte wurde ein Transport von Laktat und Butyrat beobachtet, der sich in seiner Hemmstoffcharakteristik von den bislang bekannten Transportern unterschied. Auf molekularbiologischer Ebene wurden Beweise für die Expression von MCT 1 im Gastrointestinaltrakt dieser Spezies erbracht (RITZHAUPT et al. 1998a; RITZHAUPT et al. 1998b; ORSENIGO et al. 1999).

Auch im Pansen des Schafes konnte die Expression von MCT 1 auf mRNA- und Protein-Ebene erstmals von der Leipziger Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (MÜLLER et al. 2002). Immunhistochemisch wurde seine Lokalisation in der basolateralen Membran des Pansenepithels gezeigt (MÜLLER et al. 2002; KIRAT et al. 2006a; GRAHAM et al. 2007). Außerdem wurden weitere Isoformen, MCT 2, 7, 8 sowie 4, in den basolateralen bzw. apikalen Zellschichten des Pansenepithels gefunden, teilweise wiesen immunhistochemische Färbungen jedoch eher auf eine intrazelluläre als eine membranständige Lokalisation hin (KIRAT et al. 2007; KIRAT et al. 2013). Die Vermutung, dass das Substrat der MCT im Pansen analog zum Colon von Monogastriern SCFA und/oder deren Metaboliten sind, wurde in verschiedenen Studien bestätigt (MÜLLER et al. 2002; KIRAT und KATO 2006; KIRAT et al. 2006b).

Zur Transportcharakteristik der MCT gibt es zwei verschiedene Hypothesen. Die erste Theorie beruht auf der ursprünglichen Beschreibung der MCT als Monocarboxylat/H<sup>+</sup>-Cotransporter in Erythrozyten und Skelett- sowie Herzmuskel (POOLE und HALESTRAP 1993; HALESTRAP und PRICE 1999; HALESTRAP und MEREDITH 2004; MEREDITH und CHRISTIAN 2008). Hier wurde gezeigt, dass Laktat im Symport mit einem Proton aus- bzw. eingeschleust wird, sodass der Nettoladungstransport gleich null, also elektroneutral ist. Durch den Export von Protonen wird eine effektive Möglichkeit der pH-Regulation gewährleistet (HALESTRAP und PRICE 1999; MÜLLER et al. 2002). Bislang wird davon ausgegangen, dass die MCT im Pansenepithel auf diese Weise SCFA-Metaboliten wie  $\beta$ -

Hydroxybutyrat, Azetoazetat und Laktat, aber auch Azetat transportieren (MÜLLER et al. 2002; KIRAT et al. 2006b; KIRAT et al. 2007).

Bezüglich der Elektroneutralität stimmt der zweite Ansatz, der vor allem für den SCFA-Transport im Colon postuliert wird, mit dem ersten überein, hier soll dies jedoch durch einen Antiport der (Fettsäure-)Anionen mit  $\text{HCO}_3^-$  erreicht werden (DUDEJA und RAMASWAMY 2006). TYAGI et al. (2002) konnten am humanen Colon Hinweise für einen  $\text{HCO}_3^-$ -gekoppelten Transportmechanismus für Butyrat finden, der Charakteristika eines MCT aufweist. Ein derartiger Transportmechanismus wäre im Pansen insofern sinnvoll, als die apikale  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion ins Pansenslumen auf diese Weise wirkungsvoll unterstützt würde.

Der Nachweis der Beteiligung eines MCT am Substrattransport wird in der Regel über den Einsatz spezifischer Hemmstoffe geführt. Für die verschiedenen Isoformen des MCT sind mehrere Hemmstoffe beschrieben, die nach HALESTRAP und MEREDITH (2004) grob in vier Gruppen unterteilt werden können:

- Substituierte aromatische Monocarboxylate bzw. allgemein Monocarboxylate mit längeren, verzweigten aliphatischen oder aromatischen, also „sperrigen“ Seitenketten hemmen den Transport mittels MCT kompetitiv. Beispiele hierfür sind Phenylpyruvat und  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymizinsäure (CHC).
- Substituierte Stilbendisulfonate wie 4,4'-Dibenzamidostilben-2,2'-disulfonsäure (DBDS) oder DIDS hemmen den MCT bei kurzfristiger Inkubation reversibel, durch kovalente Modifikationen nach längerer Inkubation irreversibel; allerdings ist diese Gruppe von Inhibitoren eher unspezifisch, da sie auch viele andere Anionenaustauscher, wie z.B. AE, DRA und PAT 1 blockieren (s. 2.3.4.1 - 2.3.4.3) (HALESTRAP und MEREDITH 2004).
- Amphiphile Substanzen wie Phloretin, 5-Nitro-2-(3-phenyl-propylamino-)benzoesäure (NPPB), Nifluminsäure oder Quercetin hemmen ebenfalls den MCT. Allerdings lassen sich viele weitere Transportproteine durch diese Stoffe blockieren, sodass auch hier die Spezifität fraglich ist.
- Eine vierte Gruppe umfasst Substanzen, die MCT 1 und 4 irreversibel hemmen; hierzu gehören p-Hydroxymercuribenzoessäure (pHMB) und p-Chloromercuribenzoessulfat (pCMBS). Sie entfalten ihre Wirkung durch Bindung an CD 147, ein Chaperon, das diese beiden Isoformen des MCT für ihre korrekte Verankerung in der Membran und somit Funktion benötigen (MEREDITH und CHRISTIAN 2008). Deshalb wird diesen Hemmstoffen eine besondere Spezifität für MCT 1 und 4 zugeschrieben (HALESTRAP und MEREDITH 2004).

#### **2.3.4.5 Natrium-Monocarboxylat Cotransporter (SMCT)**

Dieser Transporter aus der Familie der Natrium-Solute-Carrier, SLC5, wurde 2003 von LI et al. als Tumorsuppressor, der in Colonkarzinomen durch Methylierung herabreguliert wird, beschrieben. Im Pansenepithel konnte seine Expression bislang nur auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (BILK 2007).

Der SMCT vermittelt den Transport von Natrium mit einem Kosubstrat in einer Stöchiometrie von 2-4 Na : 1, der Transport ist also elektrogen (GOPAL et al. 2004; MIYAUCHI et al. 2004). MIYAUCHI et al. (2004) konnten zeigen, dass mittels dieses Transporters im Colon nicht nur Laktat, sondern auch Azetat, Propionat und Butyrat im Kotransport mit Natrium permeieren. Die Lokalisation des SMCT wird im Colon bislang apikal vermutet (PARODER et al. 2006; GUPTA et al. 2006) und er wird als Ibuprofen-hemmbar beschrieben (PARODER et al. 2006).

#### **2.3.4.6 Kanalproteine**

Auf der Basis von Ussing-Kammer- und Patch-Clamp-Versuchen wurde wiederholt die Existenz eines oder mehrerer Kanalproteine am Pansenepithel postuliert (BILK 2007; STUMPF et al. 2009; RACKWITZ et al. 2011; RACKWITZ 2011). Kandidaten hierfür sind die Kanalproteine der CLC-Familie (Chloride-Channel), der CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), Maxi Anionen Kanäle oder auch ORCC (Outward Rectifying Chloride Channels) (STUMPF et al. 2009; RACKWITZ 2011). RACKWITZ (2011) untersuchte die genannten Kandidatenproteine auf ihre Beteiligung an einem elektrogenen Transport der im Pansen anfallenden SCFA und kam zu dem Schluss, dass es in der apikalen Membran des Pansenepithels eine Leitfähigkeit für Azetat gibt. Diese kann funktionell jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden, eine Beteiligung von CLC und CFTR werden ausgeschlossen (RACKWITZ 2011). STUMPF et al. (2009) postulieren hingegen eine basolaterale Lokalisation dieser Leitfähigkeit.

## **2.4 Beeinflussung der SCFA-Resorption auf Genexpressionsebene**

Eine Akkumulation von SCFA bzw. deren Metaboliten im Pansenlumen kann zu Entgleisungen des ruminalen Milieus und in der Folge des gesamten Stoffwechsels des Tieres führen (PENNER et al. 2009a; ASCHENBACH et al. 2011). Auch im Zytosol der Epithelzellen ist eine Anhäufung dieser Substrate nicht unproblematisch (s. 2.2 *Metabolismus von SCFA im Pansenepithel*). Deshalb werden Mechanismen benötigt, die dies effektiv verhindern, indem bei vermehrter Anflutung von SCFA auch die Kapazitäten für deren Ausschleusung gesteigert werden.

Der einfachste Weg für eine solche Anpassungsreaktion wäre eine Kopplung der Genexpression der verantwortlichen Transportproteine an das Vorhandensein ihrer Substrate, also SCFA. Betrachtet man diese näher, scheinen v.a. Butyrat bzw. dessen Metaboliten, die aufgrund ihrer Hydrophilität ausschließlich proteinvermittelt über das Pansenepithel permeieren können, eine Schlüsselrolle zu spielen. In verschiedenen nicht-ruminalen Geweben bzw. Zellen wurde als Reaktion auf erhöhte Butyrat-Konzentrationen eine verstärkte Expression von MCT 1 und 4, die auch im Pansenepithel nachgewiesen werden konnten (MÜLLER et al. 2002; KIRAT et al. 2007), beobachtet (CUFF et al. 2002; LACORN et al. 2010). Daher liegt der Gedanke nahe, dass diese SCFA auch im Pansenepithel Einfluss auf die Genexpression der Transportproteine, insbesondere MCT, hat. Der bisherige Wissensstand zu den Effekten von Butyrat bzw. dessen Metaboliten auf die Genexpression sowie Zellproliferation, -differenzierung und -stoffwechsel soll deshalb im Folgenden erläutert werden.

### **2.4.1 Beeinflussung der Genexpression durch Butyrat**

#### **2.4.1.1 Effekte von Butyrat auf die Genexpression in nicht-ruminalen Geweben**

SCFA im Allgemeinen und Butyrat im Besonderen werden seit Längerem insbesondere in der Humanmedizin in Hinblick auf ihre scheinbar positiven Auswirkungen auf das Epithel des Dickdarmes untersucht. Teilweise werden Klistiere oder orale Gaben von Butyrat sogar schon klinisch zur Therapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (inflammatory bowel disease, IBD) eingesetzt (VELAZQUEZ et al. 1997; DI SABATINO et al. 2005). Der genaue Wirkmechanismus ist dabei noch nicht detailliert geklärt. So haben verschiedene Untersuchungen gezeigt, dass es gravierende Unterschiede zwischen den Wirkungen von Butyrat auf verschiedene Zelltypen sowie unter *in vitro*- und *in vivo*-Bedingungen zu geben scheint (SCHEPPACH et al. 1992; COMALADA et al. 2006). Im

humanen Colon und anderen Geweben wurde wiederholt eine tumorsuppressive Wirkung von Butyrat durch Hemmung der Proliferation der Zellen und Förderung ihrer Differenzierung beschrieben (VELAZQUEZ et al. 1996; SCHRÖDER et al. 1999; ABRAHAMSE et al. 1999; INAN et al. 2000a; HAMER et al. 2008). Bei nicht entarteten Zellen wurde allerdings genau die umgekehrte Wirkung, d.h. eine Stimulation der Proliferation und verringerte Differenzierung, beobachtet, was als „Butyrat-Paradoxon“ bezeichnet wird (SCHEPPACH et al. 1992; VELAZQUEZ et al. 1996; COMALADA et al. 2006; HAMER et al. 2008).

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde anfangs vor allem die Wirkung von Butyrat auf Proteine untersucht, die als Protoonkogene fungieren oder anderweitig in Zellproliferation und -untergang eingebunden sind. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Expression von p21, einem Protein, das zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase führt, unter Butyratexposition erhöht ist (BLOTTIERE et al. 2003; HAMER et al. 2008). Damit kann möglicherweise ein Teil der antiproliferativen Wirkung von Butyrat auf Tumorzellen erklärt werden.

Allerdings können auch entzündungshemmende Wirkungen, Reduktion von oxidativem Stress und eine Förderung der intestinalen Barrierefunktion von Butyrat ausgehen (HAMER et al. 2008; PLÖGER et al. 2012). Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit ist aber die Beobachtung, dass Transportproteine aus der MCT-Familie, die auch im Pansenepithel nachgewiesen wurden (MÜLLER et al. 2002), ebenfalls dem Einfluss von Butyrat unterliegen. So wurde in Brustkrebszellen sowie CaCo2-Zellen nach Inkubation mit Butyrat eine verstärkte Expression von MCT 4 und CD 147 sowie MCT 1 beobachtet (BORTHAKUR et al. 2008; QUEIROS et al. 2012). Auch in gastrointestinalen Epithelzellen aus Colon und Ileum berichteten CUFF et al. (2002) sowie LACORN et al. (2010) von einer Erhöhung der MCT1-mRNA-Expression nach Behandlung mit Butyrat. Dies erscheint insofern sinnvoll, als ein erhöhtes Substratangebot auch erhöhte Transportkapazitäten erfordert und dem MCT 1 v.a. im Gastrointestinaltrakt eine Schlüsselrolle beim Transport von Butyrat zugeschrieben wird (HADJIAGAPIOU et al. 2000; CUFF et al. 2002; DUDEJA und RAMASWAMY 2006).

### 2.4.1.2 Effekte von Butyrat auf das Pansenepithel

Auch im Vormagensystem der Wiederkäuer wurde der Wirkung von Butyrat bereits viel Beachtung geschenkt. Butyrat ist dafür bekannt, die Entwicklung der Vormägen bei Kälbern und Lämmern voranzutreiben. So erreichte das Retikulum von Kälbern durch Fütterung von Natriumbutytrat ein größeres Gewicht und wies besser ausgebildete Pansenzotten auf als das gleich alter Kontrolltiere ohne Butyrat-Gabe (SUAREZ et al. 2006; GORKA et al. 2009; NAEEM et al. 2012). Bei adulten Tieren konnte durch Butyratinfusionen in den Pansen die Proliferation der Epithelzellen gefördert (SAKATA und TAMATE 1978; SHEN et al. 2005) und eine Vergrößerung der Pansenzotten (SHEN et al. 2004; MALHI et al. 2013) hervorgerufen werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass neben diesen makroskopischen Veränderungen hohe Butyratkonzentrationen im Pansen auch zu erhöhten Transportraten von Nährstoffen wie  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  und sogar von Butyrat selbst führen (SEHESTED et al. 1997). Die Autoren folgerten, dass dies nicht allein als eine Folge der vergrößerten Absorptionsfläche durch die Proliferation der Zotten betrachtet werden kann (DIRKSEN et al. 1992), sondern zusätzlich von einer Adaptation der beteiligten Transportproteine ausgegangen werden muss, ohne die Identität dieser Proteine näher benennen zu können (SEHESTED et al. 1997).

In neueren Untersuchungen wurde der Schwerpunkt daher vermehrt auf die Effekte von Butyrat auf Protein- und Genexpressionsebene gelegt. BALDWIN et al. (2012) berichteten nach intraruminaler Butyratinfusion bei Kühen über einen immensen Einfluss von Butyrat auf die Genexpression im Pansenepithel. So wurde in ihrer Untersuchung die Expression von 80 verschiedenen Genen signifikant beeinflusst, unter anderem des SMCT 1. Insgesamt liegen bislang allerdings nur unzureichend Daten vor, was die Beeinflussung der Expression von (SCFA-)Transportproteinen im Pansen betrifft. In den meisten diesbezüglichen Studien wurde den Tieren ein erhöhter Kraftfutteranteil gefüttert, was indirekt zu erhöhten intraruminalen Butyratkonzentrationen führt, aber auch andere Einflussfaktoren auf die Genexpression - beispielsweise Futteraufnahme, -verwertung und unterschiedliche Nährstoffkonzentrationen im Pansen - mit sich bringen könnte.

Bezüglich des NHE konnten YANG et al. (2012) eine erhöhte mRNA-Expression der Isoformen 1 und 3 im Pansenepithel der Ziege nach vermehrter Konzentratfütterung zeigen. Dies wird als Reaktion auf erhöhte SCFA-Konzentrationen sowie einen erniedrigten pH-Wert im Pansen in Form verstärkter (Gegen-) Regulationsmechanismen des ruminalen pH-Werts angesehen (YANG et al. 2012). Analog wäre es denkbar, dass erhöhte SCFA-Konzentrationen auch zu höheren Transport- und/oder

Stoffwechselkapazitäten für SCFA und somit einer erhöhten mRNA-Expression von SCFA-Transportproteinen führen.

Tatsächlich beobachteten STEELE et al. (2012) nach Krafffuttergabe Veränderungen in der mRNA-Expression mehrerer Gene, insbesondere von in die Cholesterolsynthese involvierten Enzymen. Jedoch wurden in dieser Studie außer MCT 1 keine weiteren SCFA-Transportproteine untersucht, wobei zudem keine Effekte auf die mRNA-Expression von MCT 1 beobachtet werden konnten (STEELE et al. 2012). LAARMAN et al. (2012) hingegen konnten bei Kälbern nachweisen, dass eine frühzeitige zusätzliche Fütterung von Kälbern mit „Starter“, d.h. einem Raufutter für die Übergangsphase von Milch zu festem Futter, im Vergleich zu Tieren, die nur Milchaustauscher erhielten, zu einer erhöhten Expression des MCT 1 im Pansenepithel führt. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten in den stark voneinander abweichenden Versuchsansätzen begründet sein, die, da *in vivo* durchgeführt, auch von Gesundheitszustand, Futteraufnahme (andere Nährstoffe, Pansen-pH, Pansenflora und somit Bildung von SCFA) sowie dem Entwicklungszustand der Tiere abhängen.

Es muss also festgestellt werden, dass - im Gegensatz zu nicht-ruminalen Geweben - bezüglich der Regulation von potentiellen SCFA-Transportprozessen im Pansenepithel bislang nur vereinzelte Befunde auf Genexpressionsebene vorliegen, die noch keine eindeutigen Schlussfolgerungen zulassen. Doch gerade die Anpassungsfähigkeit dieser Transportmechanismen ist von zentraler Bedeutung für die Leistungsfähigkeit und Gesundheit unserer Hauswiederkäuer.

### **2.4.2 Beeinflussung der Genexpression durch Hypoxie**

Neben einer erhöhten Expression der MCT in verschiedenen Gewebetypen durch Butyratinkubation ist in der Literatur häufig beschrieben, dass dieselben Transportproteine auch durch hypoxische Bedingungen verstärkt exprimiert werden (PEREZ DE HEREDIA et al. 2010; BOIDOT et al. 2012).

Natürlicherweise kommt Hypoxie besonders häufig in tumorös entarteten Geweben vor, die aufgrund ihres schnellen Wachstums eine Unterversorgung mit Sauerstoff erleiden. Deshalb ist dieser Einfluss auf die Genexpression in Tumorgeweben bereits häufig beschrieben worden. Dabei fällt auf, dass wiederum Vertreter der MCT-Familie eine zentrale Rolle bei der Adaptation der Genexpression an die hypoxischen Bedingungen zu spielen scheinen. So zeigte sich - analog zu den Effekten, die CUFF et al. (2002) in Colonzellen durch Butyratexposition erzielen konnten - an humanen Mammatumoren, gastrointestinalen Tumoren sowie Adipozyten eine Erhöhung der Expression von MCT 1

als Reaktion auf Hypoxie (PEREZ DE HEREDIA et al. 2010; DE OLIVEIRA et al. 2012; BOIDOT et al. 2012).

Auch MCT 4 und der Glukosetransporter GLUT 1 wurden unter hypoxischen Bedingungen in humanen Mamma- und Blasentumoren vermehrt exprimiert (ORD et al. 2005; ULLAH et al. 2006; HARRIS et al. 2009; PINHEIRO et al. 2011). Dies unterstützt sowohl die Einschleusung von Substraten für eine gesteigerte anaerobe Glykolyse (über GLUT 1) als auch die Ausschleusung der dabei anfallenden Metaboliten (über MCT) und führt somit zu besseren Überlebensraten der Zellen unter den sauerstoffarmen Bedingungen eines schnell wachsenden Tumors (BOIDOT et al. 2012). Während eine erhöhte Expression von GLUT 1 spezifisch für hypoxische Bedingungen zu sein scheint (ULLAH et al. 2006; PEREZ DE HEREDIA et al. 2010), konnte eine vermehrte mRNA Expression von MCT 1 und 4 nicht nur in Tumorzellen beobachtet werden, sondern scheint eine allgemeine Antwort auf Stresssituationen wie Hypoxie oder Entzündungen zu sein (RIUS et al. 2008; MARTINOV et al. 2009; PEREZ DE HEREDIA et al. 2010).

Dabei ist diesen Situationen eine verstärkte Akkumulation von Metaboliten gemein, die auch bei erhöhten Butyratkonzentrationen im Pansen anfallen dürften (s. 2.2 *Metabolismus von SCFA im Pansenepithel*). Somit könnte eine vermehrte Entstehung von Metaboliten ein möglicher gemeinsamer Trigger für die Effekte von Butyrat und Hypoxie sein. Die wiederholten Berichte über die erhöhte Expression von MCT 1 und 4 weisen auf eine zentrale Rolle dieser Transportproteine bei der Ausschleusung dieser Metabolite hin, die auch im Pansenepithel denkbar ist.

### **2.4.3 Mechanismen für die Regulation der Genexpression durch Butyrat (-Metaboliten) und Hypoxie**

Butyrat und Hypoxie stellen auf den ersten Blick zwei sehr unterschiedliche Faktoren dar, scheinen aber dennoch vergleichbare Effekte auf die Expression derjenigen Transportproteine auszuüben, die auch in den ruminalen SCFA-Transport involviert sein könnten. Im Folgenden soll daher der Kenntnisstand zu den intrazellulären Pathways dargelegt werden, durch die diese Effekte erzielt werden, um potentielle Gemeinsamkeiten von Butyrat- und Hypoxie-induzierten Veränderungen der Genexpression nachvollziehen zu können.

#### **2.4.3.1 Butyrat als Deazetylaseinhibitor**

Einer der wichtigsten Mechanismen bei der Beeinflussung der Genexpression durch Butyrat scheint seine Wirkung als Histondeazetylaseinhibitor (HDI) zu sein (KOURAKLIS

und THEOCHARIS 2006). Histone sind wichtige Regulatoren der Genaktivität und können durch Histon-Azetyl-Transferasen bzw. -Deazetylasen azetyliert oder deazetyliert werden (GRUNSTEIN 1997). Diese Enzyme liegen in einem empfindlichen Gleichgewicht vor, das durch verschiedene Faktoren, u.a. HDI, verschoben werden kann. Durch die Azetylierung von Histonen werden Lysinreste neutralisiert, woraufhin die Affinität der Histone zur DNA sinkt und das Nukleosom sich entfaltet. Somit liegt DNA, die stark azetyliert ist, in einer „offeneren“ Konformation vor und Transkriptionsfaktoren können leichter binden. Dies führt zu vermehrter Transkription der codierten Gene (GRUNSTEIN 1997; KOURAKLIS und THEOCHARIS 2006). Werden die Histone hingegen deazetyliert, binden sie fester an das Phosphatgerüst der DNA und es wird schwerer für Transkriptionsfaktoren, daran zu binden (KOURAKLIS und THEOCHARIS 2006).

Auf diese Weise beeinflusst Butyrat auch die Effekte des Transkriptionsfaktors NFκB (INAN et al. 2000a; CANANI et al. 2011), der wiederum in die Regulation von Transportproteinen im Pansenepithel eingebunden sein kann. So gibt es starke Hinweise auf eine Regulation von MCT 1 durch NFκB (HADJIAGAPIOU et al. 2005). Deshalb soll im Folgenden näher auf diesen Faktor eingegangen werden.

### **2.4.3.2 Nukleärer Faktor κB (NFκB)**

NFκB ist ein Transkriptionsfaktor, der eine zentrale Rolle bei Entzündung, Tumorgenese und -wachstum sowie der Immunantwort spielt (KERN 2007).

ADAM et al. (2003) konnten eine verlängerte NFκB-Aktivität durch Inkubation von Zellen einer Nierenzelllinie (Cos7) mit Na-Butyrat zeigen, während mehrere andere Untersuchungen am Colon eher auf eine Unterdrückung seiner Aktivierung durch Butyrat hindeuten (INAN et al. 2000a; HAMER et al. 2008). Trotz der divergenten Resultate wird doch in den meisten Studien postuliert, dass es einen Zusammenhang zwischen Butyrat als HDI und der Wirkung von NFκB gibt (INAN et al. 2000a; CANANI et al. 2011). Untersuchungen von BORTHAKUR et al. (2008) an Caco-2-Zellen weisen allerdings darauf hin, dass es sich bei den Effekten der Hemmung der Histonazetylierung und des Transkriptionsfaktors NFκB um zwei voneinander getrennte, Butyrat-induzierte Mechanismen handelt, deren Effekte additiv zueinander wirken.

Ein aktiver NFκB-Dimer besteht aus einem Dimer der verschiedenen Untereinheiten p50, p52, p65 (RelA), c-Rel und RelB (INAN et al. 2000b; KERN 2007). Deren Aktivität wird hauptsächlich auf Proteinebene beeinflusst. Im Zytoplasma liegen die NFκB-Untereinheiten bzw. deren Vorläuferformen gebunden an inhibitorische κB-Moleküle (IκB) vor. Erst wenn diese durch eine IκB-Kinase (IKK) der proteosomalen Degradation

preisgegeben werden, kann der Dimer in den Kern transloziert werden und an spezifischen Bindungsstellen andocken. Durch eine Stabilisierung dieser I $\kappa$ B oder eine Aktivierung der IKK kann so die Aktivität von NF $\kappa$ B moduliert werden (RIUS et al. 2008). Im Gegenzug werden IKK durch O<sub>2</sub>-abhängige Prolyl-Hydroxylasen (PHD) bei Normoxie der proteosomalen Degradation zugeführt und so eine Aktivierung von NF $\kappa$ B verhindert (CUMMINS und TAYLOR 2005; CUMMINS et al. 2006; RIUS et al. 2008). Das bedeutet, dass es auch bei Hypoxie zu einer Aktivierung von NF $\kappa$ B kommt.

Klassische Zielgene von NF $\kappa$ B sind Entzündungsmediatoren wie die Cyclooxygenase (COX) 2, Tumornekrosefaktor (TNF)  $\alpha$  und viele Interleukine (VAUPEL 2004). Auch die Promotorregion des MCT 1, dessen Regulation durch Butyrat(-Metaboliten) bereits in verschiedenen Geweben beschrieben wurde (CUFF et al. 2002; LACORN et al. 2010; LAARMAN et al. 2012), weist eine Bindungsstelle für NF $\kappa$ B auf (HADJIAGAPIOU et al. 2005). Dieser Befund legt nahe, dass eine NF $\kappa$ B-vermittelte Änderung der Genexpression von MCT 1 auch im Pansenepithel eine Rolle bei der Adaptation an erhöhte Konzentrationen von Butyrat(-Metaboliten) spielt.

Allerdings reguliert NF $\kappa$ B wiederum auch die Expression weiterer Transkriptionsfaktoren, wie z.B. den Hypoxie-induzierbaren Faktor (HIF) 1 (RIUS et al. 2008). Dieser wurde als Mediator von durch Hypoxie hervorgerufenen Veränderungen der Genexpression, wie eine erhöhte Expression von GLUT 1, MCT 1 und 4, beschrieben (VAUPEL 2004). Deshalb wird auch auf diesen Faktor im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

### 2.4.3.3 Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF) 1

Wie bereits erläutert, kommt es unter hypoxischen Bedingungen in den meisten Zellen zu ähnlichen Veränderungen der Genexpression, die auch durch Butyratinkubation induziert werden. Eine mögliche Verknüpfung dieser unterschiedlichen Faktoren stellt der gemeinsame Aktivierungsweg dar: Wie bei NF $\kappa$ B wird auch die Aktivität von HIF 1 über O<sub>2</sub>-abhängige PHD reguliert, die bei Normoxie dessen cytosolische  $\alpha$ -Untereinheit der proteosomalen Degradation zuführen (CUMMINS und TAYLOR 2005; CUMMINS et al. 2006; RIUS et al. 2008). Aus der verminderten Aktivität dieser PHD bei Hypoxie ergibt sich ein höherer Anteil von cytosolischen HIF 1 $\alpha$ -Untereinheiten. Diese HIF 1 $\alpha$ -Untereinheiten wandern verstärkt in den Zellkern und dimerisieren dort mit HIF 1 $\beta$ -Untereinheiten, sodass der aktive Transkriptionsfaktor entsteht. Er bindet im Zellkern an entsprechende *response elements* und moduliert so die Genexpression mit dem Ziel, den Stoffwechsel der Zelle an die veränderten Bedingungen anzupassen (CUMMINS und TAYLOR 2005). Es wird jedoch neben dieser posttranskriptionellen auch über eine (zusätzliche) Regulation der

Genexpression von HIF 1 $\alpha$  über NF $\kappa$ B diskutiert (s. 2.4.3.2 *Nukleärer Faktor  $\kappa$ B*) (VAUPEL 2004; CUMMINS und TAYLOR 2005; CUMMINS et al. 2006; PEREZ DE HEREDIA et al. 2010), findet sich doch in dessen Promotorregion eine klassische NF $\kappa$ B-Bindungsstelle (RIUS et al. 2008). Die Bedeutung dieses Mechanismus wurde in IKK-knockout-Mäusen nachgewiesen, bei denen die mRNA-Expression für HIF 1 $\alpha$  aufgrund der mangelnden Aktivität von NF $\kappa$ B deutlich verringert war (RIUS et al. 2008). Zu den Zielgenen von HIF 1 $\alpha$  ist bislang nur wenig bekannt. Als gesichert gilt die Steigerung der Expression von GLUT 1 durch HIF 1 (ULLAH et al. 2006; GANAPATHY et al. 2009; PEREZ DE HEREDIA et al. 2010). In Untersuchungen an Tumorbiopsien konnten Korrelationen zwischen der mRNA-Expression von GLUT 1 und MCT 1 sowie MCT 4 beobachtet werden. Deshalb wird angenommen, dass auch die Genexpression der beiden letzteren Transporter durch HIF 1 $\alpha$  beeinflusst wird (PINHEIRO et al. 2011; RADEMAKERS et al. 2011).

#### **2.4.3.4 Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor (PPAR) $\alpha$**

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der vermutlich durch Butyrat aktiviert wird, ist PPAR  $\alpha$  (BENESCH et al. 2012; CONNOR et al. 2013). PPAR  $\alpha$  wird im Zytosol durch Bindung eines Liganden, beispielsweise einer langkettigen Fettsäure, aktiviert und wandert daraufhin in den Zellkern, wo er mit dem Retinoid-X-Rezeptor dimerisiert und so zum aktiven Transkriptionsfaktor wird (KLEWER et al. 1992; SCHOONJANS et al. 1996). Bekannte Zielgene von PPAR  $\alpha$  sind insbesondere Enzyme der  $\beta$ -Oxidation wie die AcylCoA Oxidase (ACO), die Medium-Chain AcylCoA Dehydrogenase (MCAD) und die Carnitin-Pamitoyl-Transferase I (CPTI) (MANDARD et al. 2004). An Mäusen konnte gezeigt werden, dass durch einen synthetischen Agonisten von PPAR  $\alpha$  die mRNA Expression des MCT 1, der bereits mehrfach als Kandidat für den Transport von SCFA(-Metaboliten) im Pansenepithel genannt wurde, in Leber, Niere und Dünndarm gesteigert wird (KÖNIG et al. 2008; KÖNIG et al. 2010). Einzelne Untersuchungen fanden auch Hinweise auf eine Beeinflussung der Aktivität von NF $\kappa$ B durch PPAR  $\alpha$  (MISHRA et al. 2004).

#### **2.4.3.5 Abschließende Beurteilung der Regulationsmechanismen der Genexpression im Pansenepithel**

Es gibt also Hinweise, dass sowohl Butyrat als auch Hypoxie die Genexpression in verschiedenen Geweben ähnlich beeinflussen. Dabei fällt auf, dass insbesondere Transportproteine aus der MCT-Familie, die wahrscheinlich auch im Pansenepithel eine

Rolle bei der Ausschleusung von SCFA(-Metaboliten) spielen, unter diesen Bedingungen stark reguliert werden. Auch scheint es Überschneidungen zwischen den jeweiligen zugrunde liegenden Mechanismen zu geben. So sind Beteiligungen von NFκB, HIF 1 sowie PPARα denkbar.

Inwiefern beide Bedingungen (Butyrat und Hypoxie) auch am Pansenepithel die Genexpression, insbesondere von SCFA-Transportproteinen, beeinflussen und ob sich diese vergleichen lassen, ist von größtem Interesse für das Verständnis der Adaptationsprozesse an veränderte Stoffwechsellanforderungen und somit auch für die Gestaltung von Fütterungsregimes bei Wiederkäuern.

## **2.5 Fragestellungen dieser Arbeit**

Die vorangegangenen Ausführungen zeigen, dass die Mechanismen des SCFA-Transports über die apikale Membran des Pansenepithels bereits intensiv untersucht wurden. Dagegen wurde noch nicht näher erforscht, wie die SCFA oder ihre Metaboliten über die basolaterale Membran ins Blut gelangen. Es ist anzunehmen, dass für die Permeation der SCFA auf dieser Seite des Pansenepithels lipophile Diffusion eine noch geringere Rolle spielt als auf der apikalen Seite, wogegen proteinvermittelte Mechanismen wesentlich beteiligt sind (KIRAT et al. 2006b). Verschiedene Hypothesen legen die Existenz eines SCFA<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauschmechanismus auf der basolateralen Seite nahe, gestützt durch die Analogie zu aus dem Colon bekannten Transportmechanismen für SCFA (TYAGI et al. 2002; DUDEJA und RAMASWAMY 2006), den Nachweis eines SCFA<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauschmechanismus auf der apikalen Seite (ASCHENBACH et al. 2009), sowie die Überlegung, dass für die Sekretion von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ins Lumen auch HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> aus dem Blut in die Epithelzellen gelangen muss. Kandidaten für die Vermittlung dieses Austauschs über die basolaterale Membran des Pansenepithels sind AE 2, DRA, MCT 1 und PAT 1, wobei MCT 1 als bislang einziges Transportprotein eindeutig der basolateralen Membran zugeordnet werden konnte (MÜLLER et al. 2002). Daraus ergibt sich der erste Ansatz dieser Arbeit, der den folgenden Fragestellungen nachgehen sollte:

- *Kann eine signifikante Beteiligung von lipophiler Diffusion an der Permeation von SCFA über die basolaterale Membran des Pansenepithels sicher ausgeschlossen werden?*
- *Ist die Permeation von SCFA über die basolaterale Membran des Pansenepithels abhängig von der Anwesenheit von Bikarbonat?*
- *Spielt der basolateral nachgewiesene MCT 1 eine Rolle bei diesen Transportvorgängen?*

In einem zweiten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern die ruminalen Transportmechanismen für SCFA an veränderte Anforderungen, d.h. eine Substratakkumulation, angepasst werden können. Deshalb sollte der Einfluss von Butyrat auf die Regulation dieser Transportvorgänge auf der Ebene der Genexpression untersucht werden. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass MCT 1 eine zentrale Rolle bei der Ausschleusung von SCFA aus dem Pansenepithel ins Blut spielt (s. 3.1 Publikation 1). Somit wäre eine substratabhängige Regulation der Expression dieses

Proteins durchaus sinnvoll, um eine Anpassung an veränderte intraruminale SCFA-Mengen zu ermöglichen. Eine Modulation der mRNA-Expression von MCT 1 und 4 durch Butyrat, aber auch Hypoxie wurde bereits in anderen Geweben beobachtet (CUFF et al. 2002; PEREZ DE HEREDIA et al. 2010). Bei dieser Regulation der Expression von MCT 1 und 4 in anderen Geweben scheinen redundante Mechanismen, insbesondere eine Aktivierung von NF $\kappa$ B, HIF 1 und/oder PPAR $\alpha$  eine Rolle zu spielen.

Deshalb sollten im zweiten Teil der Arbeit die Auswirkungen von Butyrat und Hypoxie auf die Expression von Kandidaten für den SCFA-Transport über das Pansenepithel sowie die Beteiligung möglicher intrazellulärer Pathways untersucht werden. Die zu klärenden Fragen waren:

- *Ist die Expression der am SCFA-Transport beteiligten Proteine, insbesondere MCT 1 und 4, durch Butyrat und/oder Hypoxie beeinflussbar?*
- *Sind die Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B, HIF 1 und/oder PPAR $\alpha$  an dieser Regulation der Genexpression beteiligt?*

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Publikation 1**

Bicarbonate-dependent transport of acetate and butyrate across the basolateral membrane of sheep rumen epithelium

F. Dengler, R. Rackwitz, F. Benesch, H. Pfannkuche and G. Gäbel

Acta Physiologica Scandinavica 2013; doi: 10.1111/apha.12155

## Bicarbonate-dependent transport of acetate and butyrate across the basolateral membrane of sheep rumen epithelium

F. Dengler, R. Rackwitz, F. Benesch, H. Pfannkuche and G. Gäbel

Institute of Veterinary Physiology, University of Leipzig, Leipzig, Germany

Received 15 April 2013,  
revision requested 6 June 2013,  
revision received 8 July 2013,  
accepted 30 July 2013  
Correspondence: F. Dengler,  
Institute of Veterinary Physiology,  
University of Leipzig, An den  
Tierkliniken 7, 04103 Leipzig,  
Germany.  
E-mail: dengler@vmf.uni-leipzig.de

### Abstract

**Aim:** This study aimed to assess the role of  $\text{HCO}_3^-$  in the transport of acetate and butyrate across the basolateral membrane of rumen epithelium and to identify transport proteins involved.

**Methods:** The effects of basolateral variation in  $\text{HCO}_3^-$  concentrations on acetate and butyrate efflux out of the epithelium and the transepithelial flux of these short-chain fatty acids were tested in Ussing chamber experiments using  $^{14}\text{C}$ -labelled substrates.  $\text{HCO}_3^-$ -dependent transport mechanisms were characterized by adding specific inhibitors of candidate proteins to the serosal side.

**Results:** Effluxes of acetate and butyrate out of the epithelium were higher to the serosal side than to the mucosal side. Acetate and butyrate effluxes to both sides of rumen epithelium consisted of  $\text{HCO}_3^-$ -independent and -dependent parts.  $\text{HCO}_3^-$ -dependent transport across the basolateral membrane was confirmed in studies of transepithelial fluxes. Mucosal to serosal fluxes of acetate and butyrate decreased with lowering serosal  $\text{HCO}_3^-$  concentrations. In the presence of 25 mM  $\text{HCO}_3^-$ , transepithelial flux of acetate was inhibited effectively by p-hydroxymercuribenzoic acid or  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, while butyrate flux was unaffected by the blockers. Fluxes of both acetate and butyrate from the serosal to the mucosal side were diminished largely by the addition of  $\text{NO}_3^-$  to the serosal side, with this effect being more pronounced for acetate.

**Conclusion:** Our results indicate the existence of a basolateral short-chain fatty acid/ $\text{HCO}_3^-$  exchanger, with monocarboxylate transporter 1 as a primary candidate for acetate transfer.

**Keywords** anion exchange, flux studies, monocarboxylate transporter 1, rumen, short-chain fatty acids.

Most carbohydrates, such as cellulose, hemicellulose, pectin and lignin, that are taken up by ruminants are indigestible for the animal itself, but microorganisms in the forestomach are able to break them down nearly completely to short-chain fatty acids (SCFA), primarily acetate, propionate and butyrate (Stevens & Stettler 1966, Diernæs *et al.* 1994, Sehested *et al.* 1999a). SCFA produced in the forestomach can account for as much as 75% of the animal's total metabolizable energy intake (Gäbel *et al.* 2002).

Short-chain fatty acids are primarily absorbed directly in the forestomach, especially from its largest part, the rumen (Barcroft *et al.* 1944, Marshall & Phillipson 1945). Consequently, mechanisms for SCFA transport across rumen epithelium have been studied intensely. Regarding apical uptake from the lumen into the cell, lipophilic diffusion, protein-mediated SCFA exchange with bicarbonate and electrogenic uptake have been shown to be involved (Gäbel *et al.* 2002, Aschenbach *et al.* 2009, Rackwitz *et al.* 2011). All of these

mechanisms ensure the effective transfer of SCFA from the lumen into the cell interior. However, SCFA that are taken up into the epithelial cells must leave the cells at the same rate to prevent intracellular accumulation, that is, the extrusion mechanisms on the basolateral side must be as effective as those on the apical side. At the basolateral side, lipophilic diffusion is difficult because the intracellular concentration of undissociated SCFA (HSCFA) is low due to the intracellular pH of 6.8 to 7.4 (Rothenpieler 1991, Müller *et al.* 2000, Schweigel *et al.* 2005), given that the  $pK_a$  of the SCFA is 4.8 (Cistola *et al.* 1982). Thus, protein-mediated transfer of dissociated SCFA most likely plays an even larger role at the basolateral side than at the apical side. Several mechanisms for SCFA transport from the cell interior into the blood have been discussed in recent years (Sehested *et al.* 1999b, Stumpff *et al.* 2009, Connor *et al.* 2010, Leonhard-Marek *et al.* 2010). However, the quantitative contributions and identities of these transport proteins are still under discussion. While Stumpff *et al.* (2009) and Leonhard-Marek *et al.* (2010) assumed a solely electrogenic transfer via an anion channel, Connor *et al.* (2010) and Kirat *et al.* (2006b) hypothesized an exclusive proton-coupled permeation via the monocarboxylate transporter 1 (MCT1). In contrast, Sehested *et al.* (1999b) assumed a SCFA/bicarbonate exchange as the primary mechanism, reporting a strong dependence of SCFA transfer on the presence of bicarbonate.

The hypothesis of Sehested *et al.* (1999b) is also supported by the observation that many anion exchange proteins, such as putative anion transporter 1 (PAT1), downregulated in adenoma (DRA) and anion exchanger 2 (AE2), have been observed to be present in the ruminal epithelium on the molecular level (Bilk *et al.* 2005). All of these proteins can operate as bicarbonate-dependent exchange mechanisms (Mount & Romero 2004, Romero *et al.* 2004). However, their (apical and/or basolateral) localization within the ruminal epithelium as well as their role in SCFA transport has not been elucidated. The important role of bicarbonate in SCFA transfer may also be inferred indirectly from the observations that (a) the  $HCO_3^-$  concentration  $[(HCO_3^-)]$  in the blood is continuously high and thus provides an effective and stable driving force, and (b) the apical (SCFA-coupled) secretion of  $HCO_3^-$  is quantitatively important (Ash & Dobson 1963, Gäbel *et al.* 1991) and thus needs a constant and large  $HCO_3^-$  supply from the cell interior. We therefore proposed that bicarbonate plays an essential role in basolateral SCFA transfer, thus supporting the hypothesis of Sehested *et al.* (1999b).

It is important to keep in mind, however, that SCFA are metabolized to different extents following apical uptake into the epithelium. Thus, not only the

original SCFA but also their metabolites require effective transport mechanisms on the blood side of the epithelium. All of the studies that have been conducted to date show that high amounts of butyrate are converted to  $\beta$ -hydroxybutyrate, acetoacetate and lactate (Annison *et al.* 1957, Hird & Weidemann 1964, Kristensen *et al.* 1998). The products of butyrate catabolism are assumed to leave the cells via MCT1 (Gäbel *et al.* 2002, Müller *et al.* 2002). This transfer has been shown to be primarily proton-coupled (Müller *et al.* 2002). However, MCT1 has also been described to function as a bicarbonate-dependent mechanism in colon epithelium (Tyagi *et al.* 2002a, Dudeja & Ramaswamy 2006). Therefore, not only non-metabolized acetate and butyrate but also the products of butyrate metabolism may permeate the basolateral membrane in a bicarbonate-dependent manner. Thus, we used Ussing chambers to investigate the influence of  $HCO_3^-$  on the transport of both acetate (which is barely metabolizable) and butyrate (which is easily metabolizable) across the basolateral membrane of rumen epithelium. To elucidate the involvement of bicarbonate, effluxes of acetate and butyrate out of epithelia that were preloaded with the respective SCFA were determined both under  $HCO_3^-$ -free and -containing conditions. These studies were followed by transepithelial flux studies with different serosal  $[HCO_3^-]$  values to vary the driving force for  $HCO_3^-$ -dependent transport mechanisms at the basolateral membrane. In a third series of experiments, epithelia were incubated with different inhibitors to identify the transport protein(s) involved more precisely.

## Materials and methods

### Animals and preparation of rumen epithelium

One- to six-year-old Merino breed sheep (*ovis aries*) of both sexes were fed *ad libitum* with hay and water for at least 2 weeks before slaughter. The animals were killed by exsanguination after captive bolt stunning.

The abdominal cavity was opened, and the ventral rumen (approx. 400 cm<sup>2</sup>) was cut out and rinsed with 37 °C warm buffer solution until the buffer solution remained clear. The epithelium was stripped off the muscle layers manually and transported to the laboratory in gassed buffer solution. The epithelium was cut into pieces of approx. 4 × 4 cm and mounted in Ussing chambers as described by Gäbel *et al.* (1991). The area exposed accounted for 3.14 cm<sup>2</sup>. Before determining fluxes, the epithelia were allowed to equilibrate in the system for at least 30 min.

The experiments were in accordance with the German legislation on the protection of animals and

were reported to the Landesdirektion Leipzig as T 86/10. The study conforms to Good Publishing Practice in Physiology (Persson & Henriksson 2011).

#### Electrical measurements

Electrical measurements were taken continuously with the aid of a computer-controlled voltage clamp device (Ingenieurbüro für Mess- und Datentechnik, Dipl.-Ing. K. Mußler, Aachen, Germany). The short-circuit current ( $I_{sc}$ ) and transepithelial tissue conductance ( $G_T$ ) were calculated computationally as described by Gäbel *et al.* (2001). In each experiment, mounted epithelia were assigned to the different treatment groups according to their  $G_T$  measured after 30 min of equilibration such that all of the groups with different treatments (inhibitors, pH,  $[HCO_3^-]$ ,  $pCO_2$ ) averaged a similar mean  $G_T$ , which ranged between 1.73 and 2.23  $mS\ cm^{-2}$ . The  $I_{sc}$  measured after 30 min of equilibration ranged between 0.62 and 1.04  $\mu Eq\ cm^{-2}\ h^{-1}$ . All of the experiments were conducted under short-circuit conditions, that is, without an electrical gradient between the mucosal and the serosal side.

#### Buffer solutions

The buffer solutions were prepared with chemicals obtained from Sigma-Aldrich (Germany), Carl Roth (Germany), VWR (Germany) or Merck (Germany) if not stated otherwise. The gasses were procured from Linde Gas (Germany).

In all of the experiments, a basic buffer solution consisting of 120 mM NaCl, 5.5 mM KCl, 1.25 mM  $CaCl_2$ , 1.25 mM  $MgCl$ , 0.6 mM  $NaH_2PO_4$ , 2.4 mM  $Na_2HPO_4$ , 10 mM glucose, 1 mM L-glutamine and 10 mM HEPES was used for rinsing, preparation and transport of the epithelia. Mannitol was used to adjust osmolarity to  $280 \pm 5\ mosm$ . The pH was adjusted to 7.4 using HCl or gluconic acid and NaOH unless described otherwise.  $HCO_3^-$ -free solutions were gassed with oxygen and contained 50  $\mu M$  ethoxzolamide to prevent the epithelia from producing  $HCO_3^-$  by carbonic anhydrase. All of the other buffer solutions contained  $NaHCO_3$  rather than the equivalent amount NaCl and were gassed with carbogen (5%  $CO_2$ , 95%  $O_2$ ) or 25%  $CO_2$  and 75%  $O_2$ , depending on the experimental design.

#### The influence of $HCO_3^-$ on efflux of acetate and butyrate

To evaluate the role of  $HCO_3^-$  in the transport of SCFA across the basolateral membrane, effluxes of  $^{14}C$ -labelled acetate and butyrate out of the epithelium were measured. For this purpose, epithelia were

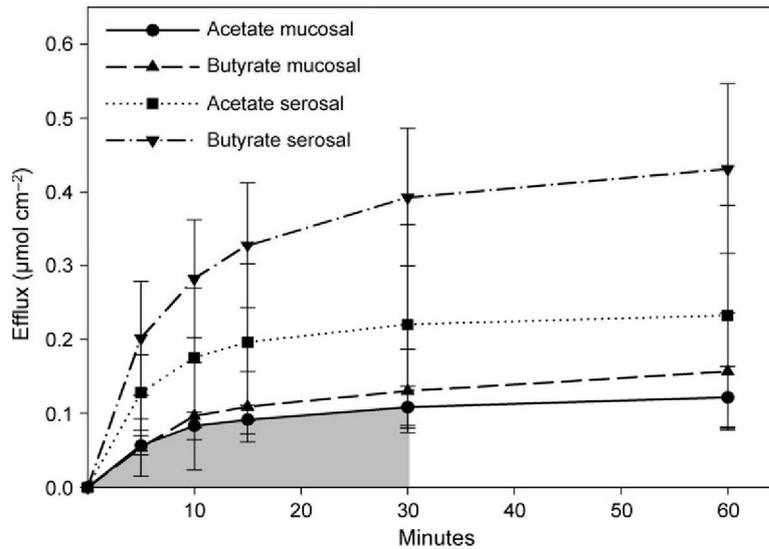
incubated in a buffer solution similar to the basic buffer, but containing only 100 mM NaCl and 10 mM Na-acetate and Na-butyrate each. Either acetate or butyrate was labelled radioactively (final activity in the incubation solution: 2.8  $kBq\ mL^{-1}$  or 2.1  $kBq\ mL^{-1}$  respectively). After 120 min of incubation, the chambers were rinsed with basic buffer three times and refilled with SCFA-free buffer solution containing NaCl rather than Na-acetate and Na-butyrate and nominally 25 or 0 mM  $NaHCO_3$  (instead of NaCl). The effluxes were measured by taking samples (0.8 mL) from both the mucosal and the serosal buffer solutions at certain time intervals to detect the amount of substrate accumulation in the buffer solution. Based on the efflux values determined at 5, 10, 15 and 30 min after rinsing, the area under the curve (AUC) of the first 30 min ( $AUC_{30}$ ) was calculated using the trapezoidal rule as described by Matthews *et al.* (1990) (Fig. 1).

#### The influence of different $HCO_3^-$ gradients on mucosal to serosal flux of acetate and butyrate

To determine the  $HCO_3^-$  dependency of SCFA transport across the basolateral membrane of rumen epithelium, transepithelial fluxes of acetate and butyrate from the mucosal to the serosal side ( $J_{ms}^{ac}$  and  $J_{ms}^{bu}$ , respectively) were measured by applying different concentration gradients of  $HCO_3^-$ . The buffer solutions contained 10 mM Na-acetate or Na-butyrate on the mucosal side and 1 mM on the serosal side. Additionally, both of these buffer solutions differed from the basic buffer solution, consisting of only 18 mM NaCl, 10 mM MOPS rather than HEPES and nominally either 25 mM  $NaHCO_3$  in combination with 75 mM Na-gluconate or 100 mM  $NaHCO_3$ .

According to the Henderson–Hasselbalch equation ( $pH = pK + \log ([HCO_3^-]/\{CO_2 + H_2CO_3\})$ ),  $[HCO_3^-]$  depends on pH and  $pCO_2$ . Thus, these three parameters were varied on the serosal side and controlled by (blood) gas analysis (system ABL5, Radiometer GmbH, Willich, Germany) (Table 1). Corresponding to the analysis, the four experimental conditions will further be referred to as 87/19/7.4, 20/19/6.9, 20/4/7.4 and 5/4/6.9 ( $[HCO_3^-]$  (mM)/ $pCO_2$  (kPa)/pH).

In the 87/19/7.4 condition, the buffer solution applied to the serosal side contained 87 mM  $HCO_3^-$ . This was achieved by gassing the buffer solution with 25%  $CO_2$ , that is, keeping  $pCO_2$  at 19 kPa. In the 20/19/6.9 condition, the buffer solution was gassed with 25%  $CO_2$ , but contained only 20 mM  $HCO_3^-$ , leading to a pH of 6.9. In the 20/4/7.4 condition, the buffer solution used had the same composition on the serosal as on the mucosal side, that is, a pH of 7.4 and 20 mM  $HCO_3^-$ , and was gassed with carbogen



**Figure 1** Time course of effluxes of acetate and butyrate in the absence of  $\text{HCO}_3^-$ . Epithelia were incubated with 10 mM acetate and butyrate each. One of them was labelled radioactively. After rinsing, the amount of substance accumulating at each side was measured. Effluxes of both short-chain fatty acids to both sides followed a hyperbolic course. As shown for the efflux of acetate to the mucosal side (grey area), AUC between 0 and 30 min ( $\text{AUC}_{30}$ ) was calculated using the trapezoid rule (Matthews et al. 1990). Results of  $\text{AUC}_{30}$  calculation are shown in Fig. 2. Data represent means  $\pm$  SEM;  $n = 8$  and  $N = 4$  for each treatment.

**Table 1**  $[\text{HCO}_3^-]$ ,  $\text{pCO}_2$  and pH in the buffer solutions for flux studies with different  $\text{HCO}_3^-$  gradients measured in samples taken hourly from three chambers of each treatment for 5 h; data obtained from the measurements of the mucosal buffer solutions were pooled, as no influence of the serosal conditions was observed (means  $\pm$  SEM;  $n = 15$  measurements in  $N = 3$  epithelia for the serosal side;  $n = 24$  measurements in  $N = 12$  epithelia for the mucosal side (measured with ABL5, Radiometer GmbH, Willich, Germany). Experimental conditions were denominated according to  $[\text{HCO}_3^-]$ ,  $\text{pCO}_2$  and pH on the serosal side

	Condition				Mucosal
	Serosal				
	87/19/7.4	20/19/6.9	20/4/7.4	5/4/6.9	20/4/7.4
$[\text{HCO}_3^-]$ (mM)	$86.8 \pm 2.00$	$21.2 \pm 0.45$	$19.7 \pm 0.90$	$4.91 \pm 0.05$	$19.6 \pm 0.33$
$\text{pCO}_2$ (kPa)	$19.3 \pm 0.60$	$18.8 \pm 0.40$	$4.34 \pm 0.18$	$4.34 \pm 0.18$	$4.34 \pm 0.06$
pH	$7.35 \pm 0.05$	$6.90 \pm 0.01$	$7.35 \pm 0.05$	$6.85 \pm 0.02$	$7.43 \pm 0.01$

(5%  $\text{CO}_2$ ). The 5/4/6.9 condition was composed of a serosal buffer solution that was titrated to a pH of 6.9 with HCl and gassed with carbogen, leading to a diminution of  $[\text{HCO}_3^-]$  to 5 mM. In all of the conditions,  $[\text{HCO}_3^-]$  and pH on the mucosal side were kept constant at nominally 20 mM and 7.4, respectively, with the solution gassed with carbogen. Blood gas analysis showed that even the 87/19/7.4 condition on the serosal side did not influence the composition of the buffer solution on the mucosal side. Under these serosal conditions, mean values measured in buffer solutions on the mucosal side were 21.7 mM  $[\text{HCO}_3^-]$ , 4.34 kPa  $\text{pCO}_2$  and pH 7.40.

After equilibrating the epithelia in the system for approx. 30 min,  $^{14}\text{C}$ -labelled acetate or butyrate (final

activity: 3.3 kBq  $\text{mL}^{-1}$  or 2.5 kBq  $\text{mL}^{-1}$ , respectively) was added to the mucosal side. Next, 60 min after the addition of radioactivity, samples (0.8 mL) were taken from the serosal side at intervals of 30 min for the measurement of  $J_{\text{ms}}$  for 1 h. The volume removed was replaced by the respective buffer solution and corrected for in flux ratio calculations.

#### *Inhibitor sensitivity of mucosal to serosal flux of acetate and butyrate*

Known inhibitors of  $\text{HCO}_3^-$ -dependent transport mechanisms were tested for effects on acetate and butyrate transport across the basolateral membrane. In these studies, the 20/4/7.4 condition (Table 1) was

applied, that is, epithelia were incubated in the buffer solution described above with a pH of 7.4, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> and gassed with carbogen on both sides. p-Hydroxymercuribenzoic acid (pHMB) (1.6 mM, dissolved in 1N NaOH),  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHC) (5 mM, dissolved in DMSO) and 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS) (1 mM) were used to inhibit MCT1 (Halestrap & Price 1999), PAT1 (Petrovic *et al.* 2002), DRA (Silberg *et al.* 1995), AE2 (Kramer *et al.* 1996) and a DIDS-sensitive anion channel described by Stumpff *et al.* (2009).

Sixty minutes after the addition of the labelled substrate,  $J_{ms}$  was measured in the absence of the respective inhibitor for a first flux period of 60 min. Thereafter, a stock solution of the inhibitor was added to the serosal buffer solution. In the chambers of the control groups, the solvents of these inhibitors were applied. Given that epithelia of the various control treatments did not differ in  $J_{ms}$  ( $P = 0.80$ , repeated-measures one-way analysis of variance,  $N = 8$ ,  $n = 15$ ), the  $J_{ms}$  of the control epithelia was pooled for each animal, irrespective of the solvent added. After 30 min of incubation with the respective inhibitor,  $J_{ms}$  was measured for another 60 min such that effects of the inhibitor could be compared with each epithelium's individual flux rate before the addition of the respective blocker.

The data were pooled for each animal for the statistical analysis of inhibitor effects. The samples were taken as described in the flux experiments before.

#### Nitrate sensitivity of serosal to mucosal flux of acetate and butyrate

To test the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sensitivity of basolateral SCFA transport, labelled acetate or butyrate (final activity: 3.3 kBq mL<sup>-1</sup> or 2.5 kBq mL<sup>-1</sup>, respectively) was added to the serosal side, and transepithelial flux rates were measured by taking samples (0.8 mL) from the mucosal side. The studies were conducted with HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-free buffer solutions similar to the basic buffer solution, but containing only 115 mM NaCl and 10 mM Na-acetate or Na-butyrate. In the buffer solution on the serosal side, Cl<sup>-</sup> was omitted completely and substituted by gluconate to ensure that only SCFA anions remained for transport by a putative anion exchanger. On the mucosal side, the concentration of Cl<sup>-</sup> was 124 mM.

NaNO<sub>3</sub><sup>-</sup> was added to the serosal side in aqueous solution to achieve a final concentration of 50 mM. Na-gluconate was added in the same amount and final concentration on the mucosal side of the NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-treated chambers and on both sides of the control group.

Fluxes from the serosal to the mucosal side ( $J_{sm}$ ) were determined as described above.

In the control group, the addition of gluconate to the already present gluconate might influence the concentration of free Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]) in the buffer solution on the serosal side. Therefore, free [Ca<sup>2+</sup>] in the buffer solutions (before and after addition of NaNO<sub>3</sub> and Na-gluconate, respectively) was measured by blood gas analysis (ABL80 flex, Radiometer GmbH, Willich, Germany). We detected 0.23 mM free [Ca<sup>2+</sup>] in the buffer solution with 124 mM gluconate and 0.31 mM free [Ca<sup>2+</sup>] in the buffer solution containing additional 50 mM NaNO<sub>3</sub>, whereas the buffer solution with extra Na-gluconate contained 0.18 mM free [Ca<sup>2+</sup>]. Although there was a small difference between the incubation conditions after the addition of gluconate or NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, the change in free [Ca<sup>2+</sup>] in the control group did not induce any differences in its flux rates, that is, there was no change in flux rates before and after addition of the Na-gluconate solution in the control group (Fig. 5).

#### Measurement of radioisotopes

The activity of radioisotopes was measured as decays per minute (dpm) by photometric measurements [Perkin Elmer Liquid Scintillation Analyzer Tri Carb 2810 TR (Perkin Elmer Inc., Waltham, USA)]. The corresponding amount of substrate was calculated using a simple ratio equation. In each experiment, two samples (0.1 mL) were taken from the side to which the labelled substrate was added, and their averaged dpm were used to calculate the specific activity used. Aquasafe<sup>®</sup> 300 Plus [Fa. Zinsser Analytic (Germany)] was used as scintillation fluid. <sup>14</sup>C-labelled acetate and butyrate were obtained from Hartmann Analytic GmbH (Germany).

Flux measurements using <sup>14</sup>C-labelled substrates cannot discriminate between the flux of the original substance and the flux of its metabolites. In the following, the respective fluxes are referred to as acetate and butyrate fluxes, while this implies the flux of <sup>14</sup>C-labelled metabolites of SCFA as well.

#### Statistics

The results are described as arithmetic means  $\pm$  standard error of means (SEM). The significance is expressed as the probability of error ( $P$ ).  $N$  represents the number of animals used, and  $n$  represents the number of epithelia for each treatment. The data of each treatment ( $n$ ) were pooled for each animal ( $N$ ) for the statistical analysis. The differences between mean values of two groups were tested using a paired Student's  $t$ -test or repeated-measures one- or two-way

analysis of variance (ANOVA) with subsequent Holm–Sidak test for comparison of more than two groups (SigmaPlot 11.0, Systat Software Inc., USA). The differences were assumed to be statistically significant if  $P < 0.05$ .

## Results

### The influence of $\text{HCO}_3^-$ on efflux of acetate and butyrate

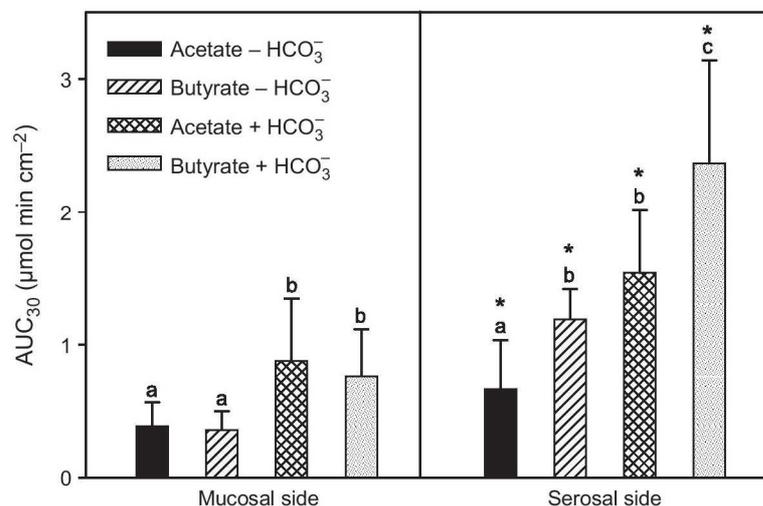
In the first series of experiments, effluxes of acetate and butyrate out of the epithelium to both the mucosal and the serosal side were measured. As shown in Fig. 1, SCFA accumulated in the buffer solutions on both sides following a hyperbolic course. After a period of increase, the amount of SCFA permeating out of the epithelium plateaued after approx. 30 min. To evaluate the total amount of substrate appearing within a certain time interval,  $\text{AUC}_{30}$  was calculated as described by Matthews *et al.* (1990). These were compared for differences between acetate and butyrate as well as between  $\text{HCO}_3^-$ -free and -containing buffer solutions concentrating on the mucosal or serosal side only. Additionally, the corresponding combinations of SCFA and  $\text{HCO}_3^-$  availability were compared for side-dependent differences (mucosal vs. serosal).

In the nominal absence of extracellular  $\text{HCO}_3^-$  and under suppressed intracellular  $\text{HCO}_3^-$  delivery

(ethoxyzalamide), both acetate and butyrate effluxes exhibited a marked side dependency (Fig. 2). With respect to acetate,  $\text{AUC}_{30}$  to the mucosal side amounted to  $0.39 \pm 0.05 \mu\text{mol min cm}^{-2}$ , whereas  $\text{AUC}_{30}$  to the serosal side reached  $0.67 \pm 0.11 \mu\text{mol min cm}^{-2}$ , that is,  $\text{AUC}_{30}$  to the serosal side was significantly higher than  $\text{AUC}_{30}$  to the mucosal side. With respect to butyrate, the difference was even more pronounced (mucosal  $\text{AUC}_{30}$ :  $0.36 \pm 0.04 \mu\text{mol min cm}^{-2}$ , serosal  $\text{AUC}_{30}$ :  $1.19 \pm 0.07 \mu\text{mol min cm}^{-2}$ ). Comparing acetate and butyrate, the  $\text{AUC}_{30}$  of both SCFA to the mucosal side were equal, whereas the  $\text{AUC}_{30}$  of butyrate to the serosal side was approximately twice that of acetate.

The presence of  $25 \text{ mM } \text{HCO}_3^-$  approximately doubled the effluxes of both SCFA to each side of the epithelium (Fig. 2) compared with the effluxes without  $\text{HCO}_3^-$  available. Nevertheless, the side asymmetry between mucosal and serosal effluxes was also observed in the presence of  $\text{HCO}_3^-$  and was more pronounced in the case of butyrate permeation.

Consequently, permeation of acetate and butyrate across the basolateral as well as the apical membrane can be divided into a  $\text{HCO}_3^-$ -independent and a  $\text{HCO}_3^-$ -dependent fraction, with higher permeability on the basolateral membrane of the epithelium. There also appears to be a difference in transport characteristics between acetate and butyrate across the basolateral membrane.



**Figure 2**  $\text{AUC}_{30}$  of acetate and butyrate to the mucosal and serosal side in the absence or presence of  $\text{HCO}_3^-$ . Epithelia were incubated in a buffer solution containing  $10 \text{ mM}$  acetate and butyrate each and either  $0$  or  $25 \text{ mM } \text{HCO}_3^-$ . Effluxes of acetate and butyrate were measured, and  $\text{AUC}_{30}$  was calculated as described in Fig. 1. Different letters mark significant differences between the  $\text{AUC}_{30}$  measured under the different  $\text{HCO}_3^-$  concentrations and short-chain fatty acids (SCFA), respectively, on either the mucosal or the serosal side ( $P < 0.01$ ; two-way repeated-measures analysis of Variance (factors: ‘acetate/butyrate’;  $\text{HCO}_3^-$ -free/-containing’) + subsequent Holm–Sidak test); asterisks mark significant differences between serosal and mucosal  $\text{AUC}_{30}$  of the corresponding conditions (SCFA/ $\text{HCO}_3^-$ ) ( $P < 0.01$ , paired Student’s *t*-test). Data represent means  $\pm$  SEM;  $n = 16$  and  $N = 8$  for each treatment.

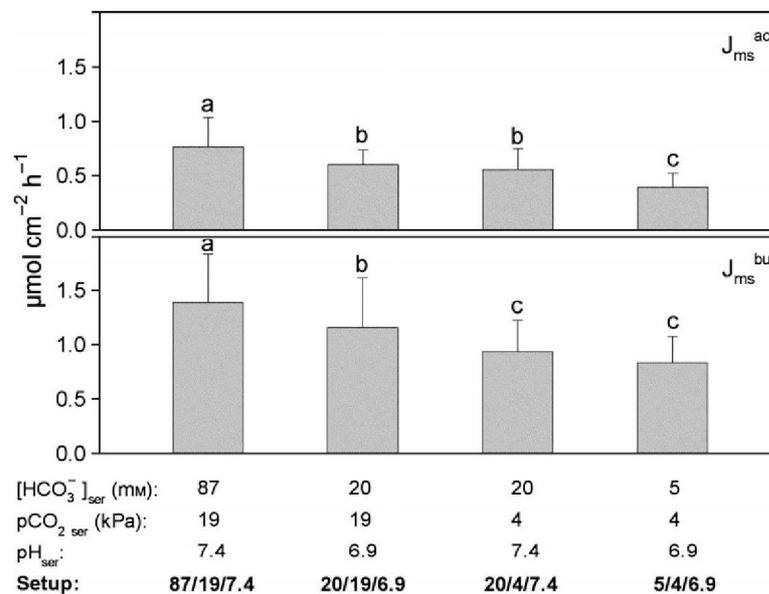
### 3 Ergebnisse

#### The influence of different $\text{HCO}_3^-$ gradients on mucosal to serosal flux of acetate and butyrate

To characterize the  $\text{HCO}_3^-$ -dependent SCFA transport across the basolateral membrane more precisely, trans-epithelial flux studies with different  $[\text{HCO}_3^-]$  values on the serosal side were conducted. Varying serosal  $[\text{HCO}_3^-]$  should provide different driving forces for a putative  $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger. On the mucosal side, the  $[\text{HCO}_3^-]$  and  $\text{pCO}_2$  were maintained at 20 mM and approx. 4 kPa respectively. In the 87/19/7.4 condition (87 mM  $\text{HCO}_3^-$ /19 kPa  $\text{pCO}_2$ /pH 7.4), a large  $\text{HCO}_3^-$  gradient from the serosal (87 mM) to the mucosal side (20 mM) was applied. Thus,  $J_{\text{ms}}$  would be expected to be highest in this group if transport of the respective SCFA is mediated by a bicarbonate-dependent anion exchanger. As shown in Fig. 3, both the  $J_{\text{ms}}^{\text{ac}}$  and  $J_{\text{ms}}^{\text{bu}}$  observed in the 87/19/7.4 condition were significantly higher than those observed in the other conditions. Correspondingly, the lowest driving force of  $\text{HCO}_3^-$  in the 5/4/6.9 condition (5 mM  $\text{HCO}_3^-$ /4 kPa  $\text{pCO}_2$ /pH 6.9) was accompanied by the lowest  $J_{\text{ms}}^{\text{ac}}$  and  $J_{\text{ms}}^{\text{bu}}$  (Fig. 3).

However, changing  $[\text{HCO}_3^-]$  is coupled to changes in  $\text{pCO}_2$  and/or pH. To evaluate these effects, the 20/19/6.9 (20 mM  $\text{HCO}_3^-$ /19 kPa  $\text{pCO}_2$ /pH 6.9) and 20/4/7.4 (20 mM  $\text{HCO}_3^-$ /4 kPa  $\text{pCO}_2$ /pH 7.4) conditions were applied. With respect to acetate, other effects than those of  $[\text{HCO}_3^-]$  can be excluded largely.

Whereas the pH was decreased to 6.9 in the 20/19/6.9 condition, it was kept at 7.4 in the 20/4/7.4 condition. Despite the change in pH, the  $J_{\text{ms}}^{\text{ac}}$  measured in the 20/4/7.4 condition was equal to that measured in the 20/19/6.9 condition (Fig. 3). However, intracellular pH ( $\text{pH}_i$ ) might be influenced by  $\text{CO}_2$  diffusing into the epithelium. The conditions used to check for effects of pH differed in  $\text{pCO}_2$  as well. Thus, the same comparison as before contradicts effects of  $\text{pCO}_2$ , as  $J_{\text{ms}}^{\text{ac}}$  was equal in both conditions. With respect to butyrate,  $J_{\text{ms}}^{\text{bu}}$  in the 20/4/7.4 condition was lower than that in the 20/19/6.9 condition, despite the same  $[\text{HCO}_3^-]$  (Fig. 3). If pH influenced  $J_{\text{ms}}^{\text{bu}}$ , that is, if it was mediated in part by lipophilic diffusion, a lower serosal pH (as in the 20/19/6.9 condition) would rather restrain this permeation given that the concentration gradient of HSCFA is directed from the serosal buffer solution ( $\text{pK}_a = 4.8$  (Cistola et al. 1982)  $\rightarrow$  pH 6.9  $\sim$  1% HSCFA) to the cell interior or at least absent under the conditions applied ( $\text{pH}_i$  6.8 to 7.4 (Müller et al. 2000, Rothenpieler 1991, Schweigel et al. 2005)  $\sim$  1 to 0.1% HSCFA). Thus, this difference in  $J_{\text{ms}}^{\text{bu}}$ , despite the same  $[\text{HCO}_3^-]$ , cannot primarily be explained by effects of changes in extracellular pH. This difference may rather be an effect of  $\text{CO}_2$  entering the epithelium via lipophilic diffusion and leading to a lower  $\text{pH}_i$  and thus enhancing the transition of butyrate into the serosal buffer solution. As we did not measure  $\text{pH}_i$  in our experiments, we



**Figure 3** Serosal  $\text{HCO}_3^-$  concentrations, pH and  $\text{pCO}_2$  were varied as indicated at the x-axis. The buffer solution on the mucosal side equalled the 20/4/7.4 condition. Epithelia were incubated in a buffer solution containing 10 mM acetate or butyrate on the mucosal and 1 mM on the serosal side. After equilibrating for 30 min,  $J_{\text{ms}}^{\text{ac}}$  and  $J_{\text{ms}}^{\text{bu}}$  were measured for two flux periods of 30 min each under the same conditions. Data of the two consecutive flux periods were averaged to obtain one value per epithelial piece. Different letters mark significant differences between the flux rates measured ( $P < 0.05$ ; one-way repeated-measures analysis of variance + subsequent Holm–Sidak test). Data represent means  $\pm$  SEM;  $n = 16$  and  $N = 8$  for each treatment.

cannot exclude indirect effects of pH and/or  $p\text{CO}_2$  on the permeation of butyrate completely. However, it has been observed in studies measuring  $\text{pH}_i$  of ruminal epithelial cells that there are efficient mechanisms counter-regulating changes in extracellular  $p\text{CO}_2$  and thus keeping the intracellular pH in the alkaline range (Müller *et al.* 2000).

To avoid these problems and to concentrate on effects of  $\text{HCO}_3^-$  only, the use of out-of-equilibrium conditions as described by Zhao *et al.* (1995) would have been a more appropriate approach. However, to achieve constant out-of-equilibrium conditions, the buffer solution bathing the tissue has to be changed continuously, which would have made it impossible to measure the flux rates across the epithelium.

Nevertheless, the results of our experiments show that – in spite of possible side effects –  $J_{\text{ms}}$  of both SCFA was strongly correlated with  $[\text{HCO}_3^-]$  on the serosal side. Setting the  $J_{\text{ms}}$  of the 20/4/7.4 condition at 100%,  $J_{\text{ms}}^{\text{ac}}$  equalled 143%, 104%, 100% and 77% in the groups containing nominally 87, 20, 20 and 5 mM  $\text{HCO}_3^-$  on the serosal side respectively (Table 1). With respect to butyrate, these values were 147, 125, 100 and 96% respectively (Fig. 3).

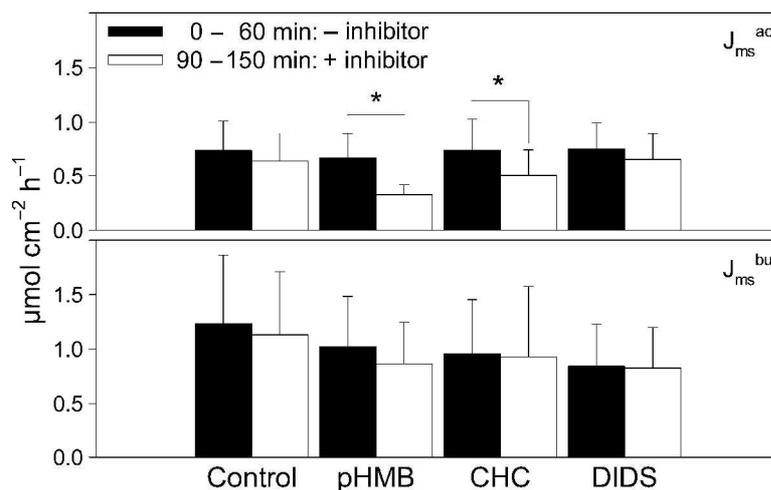
#### Inhibitor sensitivity of mucosal to serosal flux of acetate and butyrate

$J_{\text{ms}}^{\text{ac}}$  and  $J_{\text{ms}}^{\text{bu}}$  were measured as described above by incubating epithelia in a buffer solution containing 20 mM  $\text{HCO}_3^-$  at a pH of 7.4 on both sides. pHMB, CHC and DIDS were used as specific inhibitors of

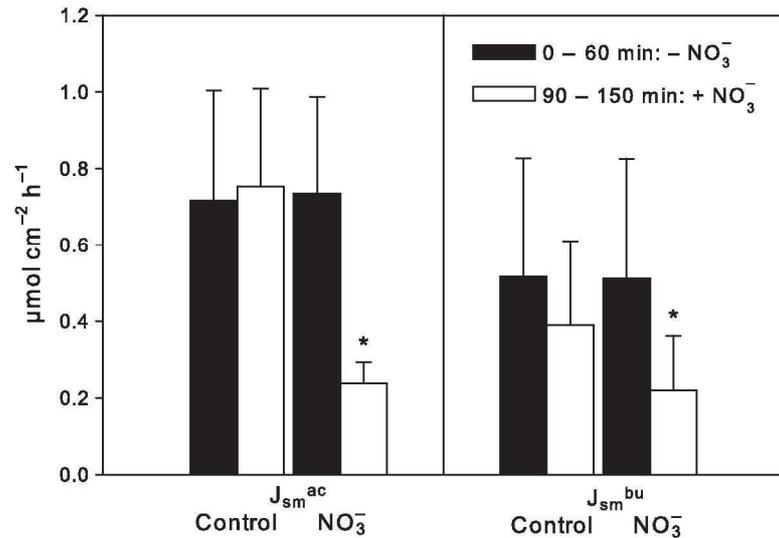
candidate proteins that are able to mediate SCFA transport. The effects of serosal addition of the inhibitors on  $J_{\text{ms}}$  are displayed in Fig. 4. To elucidate effects of the inhibitors,  $J_{\text{ms}}$  in the inhibitor-free flux period (0–60 min) was compared with the flux period after the addition of the respective inhibitor (90–150 min). A small though not significant time-dependent decrease in  $J_{\text{ms}}$  was observed in the control group (accounting for 13% of the initial flux rate).  $J_{\text{ms}}^{\text{ac}}$  was decreased significantly by the serosal addition of pHMB or CHC, 51 or 32% respectively (Fig. 4). DIDS had no significant effect on  $J_{\text{ms}}^{\text{ac}}$  (Fig. 4). With respect to butyrate, none of the inhibitors used changed  $J_{\text{ms}}^{\text{bu}}$  significantly (Fig. 4).

#### Nitrate sensitivity of serosal to mucosal flux of acetate and butyrate

$\text{NO}_3^-$  is known to interact with anion exchange mechanisms in several tissues (Seifter & Aronson 1984, Würmli *et al.* 1987), including the transport of SCFA across the apical membrane of rumen epithelium via  $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$  exchange (Kramer *et al.* 1996, Aschenbach *et al.* 2009).  $\text{NO}_3^-$  acts in a competitive way, that is, it competes with the original substrate for the transporters' binding site (Seifter & Aronson 1984, Würmli *et al.* 1987). Thus, the addition of  $\text{NO}_3^-$  to the serosal side would enhance the flux of SCFA from the mucosal to the serosal side if it were mediated by an anion exchange mechanism. Therefore, to reveal an inhibitory effect of  $\text{NO}_3^-$  on basolateral SCFA transport, we tested its influence on the oppositely



**Figure 4** Effects of inhibitors on  $J_{\text{ms}}^{\text{ac}}$  and  $J_{\text{ms}}^{\text{bu}}$ . Epithelia were incubated in buffer solutions containing 10 mM acetate or butyrate and 20 mM  $\text{HCO}_3^-$  on both sides. After a first flux period lasting 60 min (0–60 min), pHMB (1.6 mM), CHC (5 mM), DIDS (1 mM) or their solvents (NaOH or DMSO) as control were added to the serosal side.  $J_{\text{ms}}$  was measured for another hour (90–150 min).  $J_{\text{ms}}$  before was compared with that after addition of the inhibitor. Asterisks mark a significant difference of  $J_{\text{ms}}$  before and after addition of inhibitors ( $P < 0.01$ ; paired Student's  $t$ -test). Data represent means  $\pm$  SEM;  $n = 16$  and  $N = 8$  for each treatment.



**Figure 5**  $J_{sm}^{ac}$  and  $J_{sm}^{bu}$  were measured before (0–60 min) and after (90–150 min) incubation with 50 mM  $NO_3^-$  or gluconate (control) on the serosal side respectively. Asterisks indicate a significant difference of  $J_{sm}$  after addition of  $NO_3^-$  to that before ( $P < 0.05$ ; paired Student's *t*-test). Data represent means  $\pm$  SEM;  $n = 6$  and  $N = 3$  (acetate) or  $n = 12$  and  $N = 6$  (butyrate) for each treatment.

directed fluxes of acetate and butyrate. By doing so, we assumed that the  $HCO_3^-$ -dependent transport mechanism observed in the previous experiments also accepts  $SCFA^-$  (instead of  $HCO_3^-$ ) on the external side. This assumption is supported by the observation that many other anion exchange mechanisms, for example, the apical  $Cl^-/HCO_3^-$  or  $SCFA^-/HCO_3^-$  exchangers, are able to transport  $SCFA^-$  (or  $Cl^-$ ) each way (Seifter & Aronson 1984, Aronson 2006, Aschenbach *et al.* 2009, Singh *et al.* 2010). The buffer solution applied on the serosal side was nominally  $Cl^-$ -free, so that no other anions could interfere with the  $SCFA^-$  or  $NO_3^-$ . As described above,  $J_{sm}$  was first measured in an inhibitor-free flux period and after incubation with  $NO_3^-$  in another flux period. After the addition of  $NO_3^-$  (50 mM),  $J_{sm}^{ac}$  ceased nearly completely (Fig. 5).  $J_{sm}^{bu}$  was decreased less, but still significantly (Fig. 5).

## Discussion

This study aimed to elucidate SCFA permeation across the basolateral membrane of rumen epithelium, its dependence on  $HCO_3^-$  and presumed  $HCO_3^-$ -dependent transport mechanisms involved. Studies were conducted with both acetate and butyrate to compare the permeation of a barely metabolizable SCFA (acetate) with the permeation of an easily metabolizable SCFA (butyrate). It was shown that effluxes of both acetate and butyrate (and/or its metabolites) to the serosal side were more efficient than to the mucosal side (Figs. 1 and 2). This result supports the views that a) SCFA accumulating in the cell interior are transported preferentially to the blood side and b) efficient transport mechanisms for SCFA are present in the basolateral membrane.

$HCO_3^-$ -dependent transport of SCFA was demonstrated at both the apical and basolateral sides of the ruminal epithelium. In the presence of  $HCO_3^-$ , the  $AUC_{30}$  values of acetate and butyrate to both sides were significantly higher in comparison with the  $AUC_{30}$  values that were detected under  $HCO_3^-$ -free conditions (Fig. 2). The influence of serosal  $HCO_3^-$  is emphasized by the finding that both  $J_{ms}^{ac}$  and  $J_{ms}^{bu}$  were increased by elevating serosal  $[HCO_3^-]$  (Fig. 3).

An enhancement of  $AUC_{30}$  to the mucosal side by  $HCO_3^-$  was expected because an apical  $HCO_3^-/SCFA^-$  exchange mechanism has been observed both *in vitro* and *in vivo* before (Kramer *et al.* 1996, Gäbel & Sehested 1997, Aschenbach *et al.* 2009). With respect to the basolateral side, it has been assumed that lipophilic permeation of HSCFA (Gäbel *et al.* 2002), anion exchange mechanisms and electrogenic acetate transfer are involved in SCFA transport, although these mechanisms are uncharacterized (Sehested *et al.* 1999b, Connor *et al.* 2010). The possibility of lipophilic diffusion of HSCFA can be deduced from the alterations of  $J_{ms}$  induced by lowering serosal pH. This increases the concentration of HSCFA at the serosal side and thus decreases the concentration gradient for HSCFA from the cytosol to the serosal buffer solution. Consequently, the lower concentration gradient should lead to a diminished transfer, that is,  $J_{ms}$ , if lipophilic permeation of HSCFA were the dominant mechanism. However, neither  $J_{ms}^{ac}$  nor  $J_{ms}^{bu}$  was decreased by lowering serosal pH (Fig. 3).  $J_{ms}^{bu}$  was even higher at pH 6.9 than at pH 7.4 (at equal  $[HCO_3^-]$ ). Thus, lipophilic permeation of HSCFA most likely plays a minor role in SCFA transport across the basolateral membrane.

In contrast, the basolateral exit of SCFA appears to be largely dependent on  $[HCO_3^-]$  on the blood side

given that increasing serosal  $[\text{HCO}_3^-]$  led to increased  $J_{\text{ms}}$  of both SCFA (Fig. 3).

With respect to acetate permeation only, it must be assumed that an anion exchange linking acetate exit with  $\text{HCO}_3^-$  uptake is the underlying mechanism because serosal addition of  $\text{NO}_3^-$  led to an immense decline of  $J_{\text{sm}}^{\text{ac}}$  (Fig. 5).  $\text{NO}_3^-$  has been described as a competitive inhibitor of anion exchange mechanisms (Seifter & Aronson 1984, Würmli *et al.* 1987) and has previously been used to prove the existence of such mechanisms at the apical membrane of the rumen epithelium (Würmli *et al.* 1987, Kramer *et al.* 1996, Aschenbach *et al.* 2009). By reversing the direction of SCFA transport, we revealed a strong  $\text{NO}_3^-$ -induced inhibition of acetate transfer from the serosal to the mucosal side.

As candidate proteins underlying the acetate/anion exchange, AE2, DRA and PAT1 were identified by RT-PCR in the rumen epithelium (Bilk *et al.* 2005). However, all of these mechanisms are sensitive to DIDS, but not to CHC or pHMB (Silberg *et al.* 1995, Jacob *et al.* 2002, Petrovic *et al.* 2002). Therefore, the inhibitor sensitivity observed (Fig. 4) indicates that the proteins identified by Bilk *et al.* (2005) appear less likely to be involved in acetate transport across the basolateral membrane. Stumpff *et al.* (2009) characterized a large-conductance channel in cultured ruminal epithelial cells, which they claimed to be involved in transport of  $\text{SCFA}^-$  across the basolateral membrane of rumen epithelium. However, the channel was shown to be pHMB- and DIDS-sensitive and described to be  $\text{NO}_3^-$ -insensitive (Stumpff *et al.* 2009). This result is inconsistent with our findings. Consequently, this anion channel most likely played no or only a minor role in acetate transfer under the conditions tested.

Lacking DIDS sensitivity and inhibition by CHC and pHMB have been described as characteristic for MCT1 (Halestrap & Price 1999, Hadjiagapiou *et al.* 2000), which was immunohistochemically detected in the basolateral membrane of rumen epithelium (Müller *et al.* 2002, Koho *et al.* 2005, Kirat *et al.* 2006a). Thus, a  $\text{HCO}_3^-$ -dependent exit of acetate on the basolateral side may be explained by MCT1 working as a  $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger on this side. This hypothesis has previously been suggested for MCT1 in the colon based on studies with membrane vesicles obtained from rat and human colonocytes (Reynolds *et al.* 1993, Hadjiagapiou *et al.* 2000, Tyagi *et al.* 2002b, Dudeja & Ramaswamy 2006). Ruminal MCT1, however, has been described mainly as a lactate $^-/\text{H}^+$  or  $\text{SCFA}^-/\text{H}^+$  symport mechanism (Müller *et al.* 2002, Kirat *et al.* 2006b), similar to MCTs in many other tissues (Deuticke 1982, Poole & Halestrap 1993, Halestrap & Price 1999, Halestrap & Meredith

2004, Meredith & Christian 2008). Thus, it may be that other yet unidentified anion exchange mechanisms with similar inhibitor characteristics to MCT1 are present on the basolateral side of the epithelium.

The mechanisms discussed above apply primarily for acetate. However, acetate transfer appears to differ at least in part from that of butyrate. In the efflux experiments, the  $\text{AUC}_{30}$  of butyrate to the serosal side exceeded that of acetate significantly, while the amount of both SCFA accumulating at the mucosal side was similar (Fig. 2). The larger  $\text{AUC}_{30}$  of butyrate at the serosal side paralleled a larger  $J_{\text{ms}}$  (Fig. 3). In contrast, permeation of butyrate in the opposite direction appears to be hindered given that absolute  $J_{\text{sm}}^{\text{bu}}$  did not reach  $J_{\text{sm}}^{\text{ac}}$  (Fig. 5). Comparing acetate and butyrate movement, it must be borne in mind that it is primarily metabolites that must permeate the basolateral membrane in the case of butyrate. Asymmetries in  $J_{\text{ms}}^{\text{bu}}$  and  $J_{\text{sm}}^{\text{bu}}$  have previously been observed by Sehested *et al.* (1999b). Measuring apparent metabolism rates of butyrate in flux studies, these authors showed that these rates are determined by the transport direction. The amount of metabolites reaching the mucosal side was 38% of the total amount of the butyrate transported when studying  $J_{\text{sm}}$ , but 95% on the serosal side when studying  $J_{\text{ms}}$  (Sehested *et al.* 1999a). The authors proposed a polarized excretion of butyrate metabolites out of the epithelium by  $\text{HCO}_3^-$  exchange mechanisms on both sides of rumen epithelium with different affinities for butyrate on the one hand and its metabolites on the other (Sehested *et al.* 1999b). With respect to the present study, a favoured permeation of butyrate metabolites in the mucosal to serosal direction may not only explain its larger  $J_{\text{ms}}$  and  $\text{AUC}_{30}$  at the serosal side (Figs. 2 and 3) compared with those of acetate but also may be the underlying reason for the lower absolute and less  $\text{NO}_3^-$ -sensitive  $J_{\text{sm}}^{\text{bu}}$  (Fig. 5) in comparison with  $J_{\text{sm}}^{\text{ac}}$ . When examining serosal to mucosal fluxes, it must be assumed that butyrate is taken up across the basolateral membrane into the cytosol very well, by lipophilic diffusion and/or by a transport protein. After metabolism inside the epithelial cells, the metabolites are transferred primarily across the basolateral membrane and only poorly across the apical membrane, thus leading to a decreased serosal to mucosal permeation.

However, a protein-mediated transport mechanism would be necessary for the hydrophilic metabolites to cross the basolateral membrane. As outlined above, it can be assumed that a  $\text{HCO}_3^-$  exchanger accepting acetate is present on the basolateral membrane. With respect to permeation of butyrate and its metabolites, the same mechanism may accept metabolites of butyrate in addition to acetate. Alternatively or

additionally, a second mechanism for the extrusion of butyrate metabolites may exist. However, this issue cannot be resolved completely in this study because it is not possible to discriminate between butyrate and its metabolites.

In summary, our results suggest that transport of SCFA across the basolateral membrane of rumen epithelium is primarily protein mediated. The transport of SCFA across the basolateral membrane can be divided into  $\text{HCO}_3^-$ -dependent and -independent parts. The  $\text{HCO}_3^-$ -dependent component is most likely mediated by a  $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$  exchange mechanism, which shows characteristics of MCT1, at least concerning the transport of acetate. However, multiple  $\text{HCO}_3^-$ -dependent transport mechanisms may be present, including one that mediates the extrusion of butyrate metabolites. Taking up  $\text{HCO}_3^-$  in exchange for  $\text{SCFA}^-$  from the blood into the cytosol delivers  $\text{HCO}_3^-$  for secretion into rumen lumen by apical  $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$  exchange (Aschenbach et al. 2009). There it serves as an important buffer system (Kohn & Dunlap 1998) that is crucial for the stabilization of the ruminal milieu and thereby protects the animal from ruminal acidosis (Penner et al. 2009).

### Conflict of interest

The authors have no conflict of interests to disclose.

We are grateful to A. Schmidt-Mähne, P. Philipp and R. Reiche for expert technical assistance. This work was supported by 'Deutsche Forschungsgemeinschaft' (GA 329/7-1).

### References

- Annisson, E.F., Hill, K.J. & Lewis, D. 1957. Studies on the portal blood of sheep. II. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of the sheep. *Biochem J* **66**, 592–599.
- Aronson, P.S. 2006. Ion exchangers mediating  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{Cl}^-$  transport in the renal proximal tubule. *J Nephrol* **19**(Suppl 9), S3–S10.
- Aschenbach, J.R., Bilk, S., Tadesse, G., Stumpf, F. & Gäbel, G. 2009. Bicarbonate-dependent and bicarbonate-independent mechanisms contribute to nondiffusive uptake of acetate in the ruminal epithelium of sheep. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**, G1098–G1107.
- Ash, R.W. & Dobson, A. 1963. The effect of absorption on the acidity of rumen contents. *J Physiol* **169**, 39–61.
- Barcroft, J., McAnally, R.A. & Phillipson, A.T. 1944. Absorption of volatile acids from the alimentary tract of the sheep and other mammals. *J Exp Biol* **20**, 120–129.
- Bilk, S., Huhn, K., Honscha, K.U., Pfannkuche, H. & Gäbel, G. 2005. Bicarbonate exporting transporters in the ovine ruminal epithelium. *J Comp Physiol B* **175**, 365–374.
- Cistola, D.P., Small, D.M. & Hamilton, J.A. 1982. Ionization behavior of aqueous short-chain carboxylic acids: a carbon-13 NMR study. *J Lipid Res* **23**, 795–799.
- Connor, E.E., Li, R.W., Baldwin, R.L. & Li, C. 2010. Gene expression in the digestive tissues of ruminants and their relationships with feeding and digestive processes. *Animal* **4**, 993–1007.
- Deuticke, B. 1982. Monocarboxylate transport in erythrocytes. *J Membr Biol* **70**, 89–103.
- Diernæs, L., Sehested, J., Möller, P.D. & Skadhauge, E. 1994. Sodium and chloride transport across the rumen epithelium of cattle in vitro: effect of short-chain fatty acids and amiloride. *Exp Physiol* **79**, 755–762.
- Dudeja, P.K. & Ramaswamy, K. 2006. Intestinal anion absorption. In: L.R. Johnson (ed) *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 4th edn, pp. 1881–1916. Academic press, Oxford.
- Gäbel, G. & Sehested, J. 1997. SCFA transport in the forestomach of ruminants. *Comp Biochem Physiol A Physiol* **118**, 367–374.
- Gäbel, G., Vogler, S. & Martens, H. 1991. Short-chain fatty acids and  $\text{CO}_2$  as regulators of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  absorption in isolated sheep rumen mucosa. *J Comp Physiol B* **161**, 419–426.
- Gäbel, G., Müller, F., Pfannkuche, H. & Aschenbach, J.R. 2001. Influence of isoform and DNP on butyrate transport across the sheep ruminal epithelium. *J Comp Physiol B* **171**, 215–221.
- Gäbel, G., Aschenbach, J.R. & Müller, F. 2002. Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: implications and limitations. *Anim Health Res Rev* **3**, 15–30.
- Hadjiagapiou, C., Schmidt, L., Dudeja, P.K., Layden, T.J. & Ramaswamy, K. 2000. Mechanism(s) of butyrate transporter in Caco-2 cells: role of monocarboxylate transporter 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**, G775–G780.
- Halestrap, A.P. & Meredith, D. 2004. The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflügers Arch* **447**, 619–628.
- Halestrap, A.P. & Price, N.T. 1999. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* **343**(Pt 2), 281–299.
- Hird, F.J. & Weidemann, M.J. 1964. Transport and Metabolism of Butyrate by Isolated Rumen Epithelium. *Biochem J* **92**, 585–589.
- Jacob, P., Rossmann, H., Lamprecht, G., Kretz, A., Neff, C., Lin-Wu, E., Gregor, M., Groneberg, D.A., Kere, J. & Seidler, U. 2002. Down-regulated in adenoma mediates apical  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchange in rabbit, rat, and human duodenum. *Gastroenterology* **122**, 709–724.
- Kirat, D., Inoue, H., Iwano, H., Hirayama, K., Yokota, H., Taniyama, H. & Kato, S. 2006a. Monocarboxylate transporter 1 gene expression in the ovine gastrointestinal tract. *Vet J* **171**, 462–467.
- Kirat, D., Masuoka, J., Hayashi, H., Iwano, H., Yokota, H., Taniyama, H. & Kato, S. 2006b. Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) plays a direct role in short-chain fatty acids absorption in caprine rumen. *J Physiol* **576**, 635–647.
- Kohn, R.A. & Dunlap, T.F. 1998. Calculation of the buffering capacity of bicarbonate in the rumen and in vitro. *J Anim Sci* **76**, 1702–1709.

- Koho, N., Maijala, V., Norberg, H., Nieminen, M. & Poso, A.R. 2005. Expression of MCT1, MCT2 and MCT4 in the rumen, small intestine and liver of reindeer (*Rangifer tarandus tarandus* L.). *Comp Biochem. Physiol A Mol Integr Physiol* **141**, 29–34.
- Kramer, T., Michelberger, T., Gürtler, H. & Gäbel, G. 1996. Absorption of short-chain fatty acids across ruminal epithelium of sheep. *J Comp Physiol B* **166**, 262–269.
- Kristensen, N.B., Danfær, A. & Agergaard, N. 1998. Absorption and metabolism of short-chain fatty acids in ruminants. *Arch Tierernähr* **51**, 165–175.
- Leonhard-Marek, S., Stumpff, F. & Martens, H. 2010. Transport of cations and anions across forestomach epithelia: conclusions from in vitro studies. *Animal* **4**, 1037–1056.
- Marshall, R.A. & Phillipson, A.T. 1945. The production and absorption of the volatile acids in the rumen. *Proc Nutr Soc* **3**, 238–243.
- Matthews, J.N., Altman, D.G., Campbell, M.J. & Royston, P. 1990. Analysis of serial measurements in medical research. *BMJ* **300**, 230–235.
- Meredith, D. & Christian, H.C. 2008. The SLC16 monocarboxylate transporter family. *Xenobiotica* **38**, 1072–1106.
- Mount, D.B. & Romero, M.F. 2004. The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflugers Arch* **447**, 710–721.
- Müller, F., Aschenbach, J.R. & Gäbel, G. 2000. Role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in pH<sub>i</sub> recovery from intracellular acid load in cultured epithelial cells of sheep rumen. *J Comp Physiol B* **170**, 337–343.
- Müller, F., Huber, K., Pfannkuche, H., Aschenbach, J.R., Breves, G. & Gäbel, G. 2002. Transport of ketone bodies and lactate in the sheep ruminal epithelium by monocarboxylate transporter 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**, G1139–G1146.
- Penner, G.B., Aschenbach, J.R., Gäbel, G., Rackwitz, R. & Oba, M. 2009. Epithelial capacity for apical uptake of short chain fatty acids is a key determinant for intraruminal pH and the susceptibility to subacute ruminal acidosis in sheep. *J Nutr* **139**, 1714–1720.
- Persson, P.B. & Henriksson, J. 2011. Good publication practise in physiology. *Acta Physiol Scand* **203**, 403–407.
- Petrovic, S., Wang, Z., Ma, L., Seidler, U., Forte, J.G., Shull, G.E. & Soleimani, M. 2002. Colocalization of the apical Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger PAT1 and gastric H-K-ATPase in stomach parietal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**, G1207–G1216.
- Poole, R.C. & Halestrap, A.P. 1993. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol* **264**, C761–C782.
- Rackwitz, R., Philipp, P., Schmidt-Mähne, A. & Gäbel, G. 2011. Permeation of short-chain fatty acids (SCFA) across rumen epithelium: electrogenic pathways. In: W. Staudacher & S. Adrian (eds) *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology* **20**, pp. 56. Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, Frankfurt/Main.
- Reynolds, D.A., Rajendran, V.M. & Binder, H.J. 1993. Bicarbonate-stimulated [<sup>14</sup>C]butyrate uptake in basolateral membrane vesicles of rat distal colon. *Gastroenterology* **105**, 725–732.
- Romero, M.F., Fulton, C.M. & Boron, W.F. 2004. The SLC4 family of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporters. *Pflugers Arch* **447**, 495–509.
- Rothenpieler, P. 1991. *Untersuchungen zum Benzoesäuretransport über das isolierte Pansenepithel von Schafen: Hinweise für eine Interaktion mit dem Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher*. Dissertation Stiftung Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- Schweigel, M., Freyer, M., Leclercq, S., Etschmann, B., Lodemann, U., Böttcher, A. & Martens, H. 2005. Luminal hyperosmolarity decreases Na transport and impairs barrier function of sheep rumen epithelium. *J Comp Physiol B* **175**, 575–591.
- Sehested, J., Diernæs, L., Møller, P.D. & Skadhauge, E. 1999a. Ruminal transport and metabolism of short-chain fatty acids (SCFA) in vitro: effect of SCFA chain length and pH. *Comp Biochem. Physiol A Mol Integr Physiol* **123**, 359–368.
- Sehested, J., Diernæs, L., Møller, P.D. & Skadhauge, E. 1999b. Transport of butyrate across the isolated bovine rumen epithelium - interaction with sodium, chloride and bicarbonate. *Comp Biochem. Physiol A Mol Integr Physiol* **123**, 399–408.
- Seifter, J.L. & Aronson, P.S. 1984. Cl<sup>-</sup> transport via anion exchange in Necturus renal microvillus membranes. *Am J Physiol* **247**, F888–F895.
- Silberg, D.G., Wang, W., Moseley, R.H. & Traber, P.G. 1995. The Down regulated in Adenoma (dra) gene encodes an intestine-specific membrane sulfate transport protein. *J Biol Chem* **270**, 11897–11902.
- Singh, A.K., Riederer, B., Chen, M., Xiao, F., Krabbenhoft, A., Engelhardt, R., Nylander, O., Soleimani, M. & Seidler, U. 2010. The switch of intestinal Slc26 exchangers from anion absorptive to HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretory mode is dependent on CFTR anion channel function. *Am J Physiol Cell Physiol* **298**, C1057–C1065.
- Stevens, C.E. & Stettler, B.K. 1966. Factors affecting the transport of volatile fatty acids across rumen epithelium. *Am J Physiol* **210**, 365–372.
- Stumpff, F., Martens, H., Bilk, S., Aschenbach, J.R. & Gäbel, G. 2009. Cultured ruminal epithelial cells express a large-conductance channel permeable to chloride, bicarbonate, and acetate. *Pflugers Arch* **457**, 1003–1022.
- Tyagi, S., Venugopalakrishnan, J., Ramaswamy, K. & Dudeja, P.K. 2002a. Mechanism of n-butyrate uptake in the human proximal colonic basolateral membranes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**, G676–G682.
- Tyagi, S., Venugopalakrishnan, J., Ramaswamy, K. & Dudeja, P.K. 2002b. Mechanism of n-butyrate uptake in the human proximal colonic basolateral membranes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**, G676–G682.
- Würmli, R., Wolfram, S. & Scharrer, E. 1987. Inhibition of chloride absorption from the sheep rumen by nitrate. *Zentralbl Veterinärmed A* **34**, 476–479.
- Zhao, J., Hogan, E., Bevensee, M.O. & Boron, W.F. 1995. Out-of-equilibrium CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> solutions and their use in characterizing a new K/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter. *Nature* **374**, 636–639.

### **3.2 Publikation 2**

Both butyrate incubation and hypoxia upregulate genes involved in the ruminal transport of SCFA and their metabolites

F. Dengler, R. Rackwitz, F. Benesch, H. Pfannkuche and G. Gäbel

Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 2014; doi: 10.1111/jpn.12201

## ORIGINAL ARTICLE

**Both butyrate incubation and hypoxia upregulate genes involved in the ruminal transport of SCFA and their metabolites**

F. Dengler, R. Rackwitz, F. Benesch, H. Pfannkuche and G. Gäbel

Institute of Veterinary Physiology, University of Leipzig, Leipzig, Germany

**Summary**

Butyrate modulates the differentiation, proliferation and gene expression profiles of various cell types. Ruminal epithelium is exposed to a high intraluminal concentration and inflow of n-butyrate. We aimed to investigate the influence of n-butyrate on the mRNA expression of proteins involved in the transmembranal transfer of n-butyrate metabolites and short-chain fatty acids in ruminal epithelium. N-butyrate-induced changes were compared with the effects of hypoxia because metabolite accumulation after O<sub>2</sub> depletion is at least partly comparable to the accumulation of metabolites after n-butyrate exposure. Furthermore, in various tissues, O<sub>2</sub> depletion modulates the expression of transport proteins that are also involved in the extrusion of metabolites derived from n-butyrate breakdown in ruminal epithelium. Sheep ruminal epithelia mounted in Ussing chambers were exposed to 50 mM n-butyrate or incubated under hypoxic conditions for 6 h. Electrophysiological measurements showed hypoxia-induced damage in the epithelia. The mRNA expression levels of monocarboxylate transporters (MCT) 1 and 4, anion exchanger (AE) 2, downregulated in adenoma (DRA), putative anion transporter (PAT) 1 and glucose transporter (GLUT) 1 were assessed by RT-qPCR. We also examined the mRNA expression of nuclear factor (NF)  $\kappa$ B, cyclooxygenase (COX) 2, hypoxia-inducible factor (HIF) 1 $\alpha$  and acyl-CoA oxidase (ACO) to elucidate the possible signalling pathways involved in the modulation of gene expression. The mRNA expression levels of MCT 1, MCT 4, GLUT 1, HIF 1 $\alpha$  and COX 2 were upregulated after both n-butyrate exposure and hypoxia. ACO and PAT 1 were upregulated only after n-butyrate incubation. Upregulation of both MCT isoforms and NF $\kappa$ B after n-butyrate incubation could be detected on protein level as well. Our study suggests key roles for MCT 1 and 4 in the adaptation to an increased intracellular load of metabolites, whereas an involvement of PAT 1 in the transport of n-butyrate also seems possible.

**Keywords** MCT, NF $\kappa$ B, PPAR $\alpha$ , HIF 1 $\alpha$ , mRNA expression, protein expression

**Correspondence** F. Dengler, Institute of Veterinary Physiology, University of Leipzig, An den Tierkliniken 7, 04103 Leipzig, Germany. Tel: +49 341 97 38 0 73; Fax: +49 341 97 38 0 97; E-mail: dengler@vmf.uni-leipzig.de

Received: 9 October 2013; accepted: 11 April 2014

**Introduction**

The performance of feedlot and dairy cattle has increased appreciably over the last decades. High-concentrate feeding to fulfil the animals' energy requirements leads to elevated concentrations of intraruminal short-chain fatty acids (SCFA). The intraruminal synthesis of SCFA is mainly counteracted by the elimination of SCFA from the ruminal content via transepithelial transport (Gäbel et al., 2002).

However, during transfer across the epithelial layers, SCFA are degraded to a significant amount, mainly to keto acids and lactic acid. Of the three main SCFA, acetate, propionate and n-butyrate, the latter is degraded to the greatest extent; that is, up to 90% of

the n-butyrate taken up luminally can be metabolised to  $\beta$ -hydroxybutyrate and acetoacetate within the epithelial cells (Bergman et al., 1965; Bugaut, 1987; Kristensen et al., 1998; Kristensen and Harmon, 2004). The metabolites are thought to be extruded out of the ruminal epithelium into the blood mostly by MCT 1 (Müller et al., 2002; Connor et al., 2010). Thus, MCT 1 must be regarded as the main transport protein that maintains a low cytosolic concentration of the n-butyrate metabolites and consequently also of non-degraded n-butyrate. Therefore, the ruminal epithelium may adapt to high butyrate inflow by upregulating the abundance of MCT 1. An upregulated expression of MCT 1 after n-butyrate incubation has already been shown in colonic epithelial cells (Cuff et al., 2002).

A similar upregulation of MCT 1 has also been observed in hypoxic cells (Harris et al., 2009; Pinheiro et al., 2011). Especially in fast-growing tumour tissues, this upregulation is thought to be induced by the increased anaerobic metabolism due to hypoxia. MCT 1 effectively eliminates anaerobic metabolites, primarily lactate, thus its upregulation is part of an adaptation to the accumulation of these metabolites. By applying hypoxic conditions, an upregulation of MCT 1 expression could be shown in human adipocytes as well (Perez de Heredia et al., 2010). Because of the observation that MCT 1 can be upregulated by two different triggers, that is, n-butyrate and hypoxia, we wanted to investigate whether ruminal MCT 1 expression can also be influenced by hypoxic conditions and/or an accumulation of hypoxic metabolites and whether this reaction is at least qualitatively comparable, as n-butyrate is broken down to similar metabolites intracellularly as well.

In addition to MCT 1 on the blood-facing side of the ruminal epithelium, MCT isoform 4 has been detected both lumen-facing and intracellularly (Kirat et al., 2007), where it might play a role in the transport of SCFA into cells and/or the intracellular shuttling of SCFA metabolites (Kirat et al., 2007; Brooks, 2009). Recent studies in goats showed that long-term intraruminal infusion of Na-n-butyrate induced an upregulation of MCT 4 (Malhi et al., 2013). In tumour cells of various origins, MCT 4 was shown to be upregulated along with MCT 1 under hypoxic conditions (Ullah et al., 2006; Perez de Heredia et al., 2010), indicating an adaptation potential that might also be valuable in the ruminal epithelium.

Assuming a substrate-induced regulation of MCT 1 and 4 gene expression, it must be kept in mind that – in addition to MCT – other transport proteins that possibly accept intact SCFA have been identified in the ruminal epithelium (Bilk et al., 2005). If these proteins play a role in the transport of SCFA across the ruminal epithelium, they might be influenced by n-butyrate as well. Therefore, we also measured the mRNA expression of other potential SCFA transport proteins: anion exchanger (AE) 2, putative anion transporter (PAT) 1 and downregulated in adenoma (DRA).

Under hypoxic conditions, however, metabolite extrusion is not the only required adaptation; the entire cell metabolism must also adapt to the new situation. Increasing the glucose supply allows cells to meet their energetic demands using anaerobic glycolysis. Therefore, glucose transporter (GLUT) 1 is a protein that is specifically upregulated during hypoxia (Ullah et al., 2006; Perez de Heredia et al., 2010). This

is why we assessed the mRNA expression of GLUT 1 as a specific marker for the effects of hypoxia.

Looking for upstream pathways mediating the alteration in gene expression, we studied the influence of n-butyrate as well as hypoxia on the activity of several candidates, such as nuclear factor (NF)  $\kappa$ B (Inan et al., 2000a; Borthakur et al., 2008), subunit  $\alpha$  of hypoxia-inducible factor (HIF) 1 (Vaupel, 2004; Rius et al., 2008) and peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$  (König et al., 2010). Because the activity of several of these factors is not regulated at the mRNA level, we also measured the mRNA expression of known target genes, that is, cyclooxygenase (COX) 2 for NF $\kappa$ B (Rius et al., 2008) and acyl-CoA oxidase (ACO) for PPAR $\alpha$  (Mandard et al., 2004).

To assess the postulated effects of n-butyrate or its metabolites on gene expression, we mounted isolated ruminal epithelia in Ussing chambers and exposed them to buffer solutions containing 0 or 50 mM n-butyrate. Hypoxia was induced by N<sub>2</sub> gassing. In a second experiment, we tried to evaluate whether the changes observed on mRNA level are followed by alterations on protein level. Therefore, we incubated epithelia in a tissue culture system for 24 h with or without 50 mM n-butyrate and assessed the protein expression of MCT 1 and 4 as well as NF $\kappa$ B with the Western blot technique. The *in vitro* approaches were chosen because most experiments measuring gene expression in the ruminal epithelium have been conducted as feeding or infusion experiments. In these studies, an enhanced n-butyrate concentration in the rumen was accompanied by many other changes in the intraruminal fluid (Baldwin et al., 2012; Laarman et al., 2012) and/or led to side effects, such as morphological alterations (Malhi et al., 2013).

## Materials and methods

### Animals and preparation of ruminal epithelium

Female sheep (*Ovis aries*), Merino breed, 2–5 years old, were fed with hay and water *ad libitum* for at least 2 weeks before slaughter. Six sheep were used for the incubation in Ussing chambers and four for tissue culture experiments. The animals were killed by exsanguination after captive bolt stunning. Then, the abdominal cavity was opened, and the ventral rumen (approximately 400 cm<sup>2</sup>) was cut out and rinsed with 37 °C warm basic buffer solution until the solution remained clear. The epithelium was manually stripped of the muscle layers and transported to the laboratory in an oxygen-gassed buffer solution. In the laboratory, the epithelium was cut into 4 × 4 cm pieces and

mounted in Ussing chambers, as described by Gäbel *et al.* (1991), or in Petri dishes for tissue culture.

The experiments were performed in accordance with the German legislation on the protection of animals and were reported to the Landesdirektion Leipzig as T 86/10.

#### Buffer solutions

The basic buffer solution contained 5.5 mM KCl, 120 mM NaCl, 1.25 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM L-glutamine, 10 mM HEPES and 10 mM glucose. For incubating the epithelia with n-butyrate, 50 mM Na-n-butyrate was added instead of NaCl. Mannitol was used to adjust the osmolarity to 280 ± 5 mOsmol. The pH was adjusted to 7.4 using 1 N NaOH.

In all experiments, the basic buffer solution was used for rinsing, preparation and transport of the epithelia. Buffer solutions were gassed with 100% oxygen (control treatment, n-butyrate treatment) or 100% nitrogen (hypoxic treatment).

For tissue culture, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, #D8437, Sigma Aldrich, München, Germany) was supplemented with 10% foetal bovine serum and 50 mM Na-n-butyrate or the equivalent amount NaCl respectively. Osmolarity and pH were adjusted to 280 ± 5 mOsmol and 7.4 respectively. Before the incubation period started, the medium was allowed to equilibrate in the incubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) for at least 6 h.

All chemicals were obtained from Sigma Aldrich/Fluka (München, Germany), Carl Roth (Karlsruhe, Germany), VWR (Darmstadt, Germany) or Merck Millipore (Darmstadt, Germany), if not stated otherwise. The gasses were procured from Linde Gas (Leuna, Germany).

#### Incubation of the epithelia in Ussing chambers

Epithelia of each sheep were incubated in Ussing chambers under three different conditions. For the first condition, epithelia were incubated in basic buffer solution and gassed with 100% oxygen to serve as a control group. For the second condition, epithelia were incubated with basic buffer solution as well but were gassed with 100% nitrogen to induce hypoxia in the epithelia. For the third condition, epithelia were incubated with a buffer solution containing 50 mM Na-n-butyrate instead of NaCl and gassed with 100% oxygen. In each trial (i.e. one sheep), the epithelial pieces were randomly assigned to each of these conditions. Of the first two sheep, two epithelial pieces

were subjected to each treatment. Of the latter four sheep, each treatment was tested in three epithelial pieces. The incubation lasted 6 h. Buffer solutions were changed each 90 min to remove the metabolic by-products of the cells and to provide stable conditions (pH was monitored regularly and remained stable at 7.4 ± 0.2). After this period of time, the epithelia were dismantled, and the exposed area, accounting for 3.14 cm<sup>2</sup>, was cut out with surgical scissors and rinsed in Mg<sup>2+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-free Dulbecco's PBS (Cat. No. H15-002, PAA, Pasching, Austria) twice. After rinsing, the samples were snap-frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -80 °C for RNA extraction on the following day.

Using high concentrations of n-butyrate [usually there are approximately 10–15 mM n-butyrate in ruminal fluid (Bergman *et al.*, 1965; Bergman, 1990)], we wanted to make sure that the portion which is oxidised is negligibly low in our set-up. There are different routes that n-butyrate metabolism can take in ruminal epithelium: oxidation or ketogenesis. Baldwin and Jesse (1996) showed that the rate of ketogenesis from n-butyrate is nearly thrice that of its oxidation to CO<sub>2</sub> at a n-butyrate concentration at 10 mM. Moreover, with increasing concentrations of n-butyrate, the formation of ketone bodies increases and n-butyrate oxidation decreases (Beck *et al.*, 1984; Giesecke *et al.*, 1985).

#### Electrical measurements

Electrical measurements were conducted continuously with the aid of a computer-controlled voltage clamp device (Ingenieurbüro für Mess- und Datentechnik, Dipl.-Ing. K. Mußler, Aachen, Germany). The short-circuit current ( $I_{sc}$ ) and transepithelial tissue conductance ( $G_T$ ) were calculated computationally, as described by Gäbel *et al.* (2001). All of the experiments were conducted under short-circuit conditions, that is, without an electrical gradient between the mucosal and the serosal sides. The measurements were started after mounting all epithelia, that is, 30 min after the incubation had already begun.

#### Two-step real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR)

After one night of storage at -80 °C, total RNA was isolated from 100 mg of the tissue, which was first homogenised in liquid nitrogen in a mortar and then in a homogeniser. Then, the tissues were processed using 'RNeasy Midi Kit' according to the manufacturer's protocol (Cat. No. 75144, Qiagen, Hilden, Germany)

### 3 Ergebnisse

including treatment with DNase (RNase-Free DNase Set, Cat. No. 79254, Qiagen). The RNA concentration and quality were determined with the aid of a spectrophotometer (BioPhotometer, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germany) and an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent RNA 6000 Nano Kit, Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG Life Sciences & Chemical Analyses, Waldbronn, Germany).

Next, 1 µg of high-quality RNA was first incubated with 1 µl of oligo (dT) primer in a 12 µl reaction volume for 5 min at 65 °C in a MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, München, Germany). Then, the remaining components (reaction buffer, dNTPs, RNase inhibitor and reverse transcriptase) of the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1622, Thermo Scientific/Fermentas Molecular Biology Tools, St. Leon-Rot, Germany) were added to a total volume of 20 µl, according to the manufacturer's protocol, and incubated in the cycler at 42 °C for 60 min and finally at 70 °C for 5 min for cDNA synthesis.

For qPCR, 1 µl of the resulting cDNA was used in a 20 µl reaction volume containing 10 µl of a ready-to-use premix of SYBR Green I dye, dNTPs, stabilisers and enhancers (SensiMix SYBR No-ROX Kit, Bioline GmbH, Luckenwalde, Germany), 112 nM primer mix

and DNase-free water. These mixtures were pipetted in strip tubes (0.1 ml Strips, LTF Labortechnik, Wasserburg, Germany) and processed in a Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen) at individually optimal protocols (Table 1). A no-template control (NTC) with DNase-free water instead of cDNA was applied for each run along with a negative control using RNA instead of cDNA to test each sample for genomic DNA. qPCRs for each sample and gene were run in duplicate to minimise dispensation artefacts. The deviation of  $C_t$  of the technical replicates was <0.3. If it was higher, data were discarded and the run was repeated. The PCR cycles were run using automatic fluorescence emission following each PCR cycle, and the amplification specificity was checked after each run by melting curve analysis. The primer sequences and conditions for qPCR are shown in Table 1; the denaturation temperature was always 95 °C, and the extension took place at 72 °C.

The primers were designed with the program Primer Select™ (DNASTAR, Madison, WI, USA) according to known sequences from the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) in the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) and synthesised by Eurofins MWG (Ebersberg, Germany). The amplicons were

**Table 1** Primers for qPCR

Gene	GenBank accession number	30 s Annealing T (°C)	Amplicon size (bp)	Sequence (5' - 3')
ACO forward	NM001035289	56	104	TCACTCAGGGAAAATGCTATG
ACO reverse				TGGGGCCAATGTCTCCTA
AE 2 forward	NM001205664	67	107	GCTCATGCCGCCAAACACCAC
AE 2 reverse				AGAGCACGGCCAGGCAGAGCAG
β-Actin forward	NM001009784.1	67	104	CCCAAGGCCAACCGTGAAGATG
β-Actin reverse				CCAGAGGCGTACAGGGACAGCACA
DRA forward	NM001184899	67	130	CGGCTGGGCTTCGTGGTG
DRA reverse				GATCGGTATGTGCGGGACTGT
GAPDH forward	NM001190390	67	110	CCACGGCACAGTCAAGGCAGAGAA
GAPDH reverse				TCAGCACCAGCATCACCCACTTG
GLUT 1 forward	NM006516.2	62	92	CACCAGCTGGGCATCGTCGTC
GLUT 1 reverse				CAGCAGCAGGGGCCACAGGTC
HIF 1α forward	JF267353.1	60	93	ACCACCGCCACCAATGATGAAT
HIF 1α reverse				GTACGTGGGGAGGAGATGGAAATG
MCT 1 forward	NM001037319	50	106	TTAGCAATTATGGCAAGAGT
MCT 1 reverse				TACAAGTCCCATAGAAGGTC
MCT 4 forward	NM001109980	64	119	ACTACGGTGGGCTGGTGGTC
MCT 4 reverse				CAATGGGCTGGAGAAGCTT
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase forward	NM001009360	67	96	GAGCTGGGTGGCCTGGGAGAAC
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase reverse				CATCGTGGTGTCAAAGTGAAGC
PAT 1 forward	NM001076852	67	128	GAGCTGAGGCGGCGAGACTACCAT
PAT 1 reverse				GCACGGGAGCAGCGAAACCAG

sequenced again, and the product sequences were verified by BLAST.

The quantification cycle and amplification efficiency of each amplification curve were determined using the ROTOR GENE 6000 Series Software 1.7 (Corbett/Qiagen). For analysis of the data, the 'Relative expression software tool' (REST 2009-RG Mode, Qiagen) established by Pfaffl et al. (2002) was used to calculate the relative mRNA expression with reference to the control group, whose expression was set to 1. The  $C_t$  values set by the software were applied after checking them optically.

Normalisation of the samples was achieved using the same amounts of tissue and RNA for processing and by normalising the data for the target genes with the aid of the reference genes  $\beta$ -actin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. These genes have successfully been used as reference genes for ruminal epithelium previously (Steele et al., 2012) and also proved to be stable under the experimental conditions applied in our study. Their stability was tested using the programs BESTKEEPER© (Version 1 by M.W. Pfaffl, Institute of Physiology, Center of Life and Food Sciences, TUM-Weihenstephan, Germany, 2004) and GENORM (Vandesompele et al., 2002), which showed a power of 2.1, 2.01 and 2.53 and gene stability values ( $M$ ) of 0.534, 0.534 and 0.451 for  $\beta$ -Actin, GAPDH and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase respectively.

#### Western blot analysis

For Western blot analysis, epithelial pieces of approximately  $4 \times 4$  cm were incubated in Petri dishes with DMEM supplemented with 50 mM Na-n-butyrate or an equivalent amount of NaCl in the control group. Of each sheep, two epithelial pieces were incubated in the respective supplemented medium.

Tissue culture was conducted on a shaking device in a humidified 5%  $\text{CO}_2$  air atmosphere at 37 °C. The medium was changed in 6-h intervals. After 24 h,

tissues were cut into pieces of  $1 \times 1$  cm, snap-frozen immediately in liquid nitrogen and stored at  $-80$  °C until extraction of total protein. For this purpose, 50 mg of the sample was homogenised in liquid nitrogen in a mortar and then in a homogeniser with 500  $\mu\text{l}$  of a lysis buffer consisting of 50 mM TRIS buffer, 4 mM EGTA, 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 100 mM  $\beta$ -glycerine-phosphate-disodium pentahydrate, 100 mM sodium pyrophosphate tetrabasic decahydrate, 15 mM sodium orthovanadate and 2.5 mM NaF (pH 7.4).

The protein concentration was measured using the bicinchoninic acid (BCA) method with a Tecan Spectra Rainbow Microplate Reader (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Germany) and bovine serum albumin (BSA) as standard. These protein samples were diluted to a final concentration of 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  and used for separation by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; 10  $\mu\text{g}$  per well). After that, the samples were transferred onto a nitrocellulose membrane (Carl Roth) using the Mini-Protean© system (Bio-Rad laboratories). The membrane was pre-incubated in 3% BSA in Tris-buffered saline containing 0.2% Tween-20 (TBST) before it was incubated with the primary antibodies (Table 2) at 4 °C over night. After washing five times with TBST, the membranes were incubated with HRP-coupled secondary antibodies (Table 2) at room temperature for 1 h. Subsequently, the membranes were rinsed again with TBST five times and once with TBS, then the signal was detected by enhanced chemiluminescence using a G:BOX Chemi XT4 (Syngene, Cambridge, UK) and analysed with the GeneTools© software (Syngene). This SDS-PAGE with subsequent blotting and protein detection was repeated three times for each protein preparation.

#### Calculations and statistics

The results are expressed as the arithmetic means  $\pm$  standard deviation (SD).  $N$  indicates the

**Table 2** Antibodies for Western blot analysis

Primary antibody	Dilution	Purchased from	Secondary antibody	Dilution	Purchased from	Protein size (kDa)
Mouse-anti- $\beta$ -Actin	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, sc-47778	Goat-anti-mouse HRP	1:10 000	Dianova, #115-035-146	43
Chicken-anti-MCT 1	1:1000	Millipore, # AB1286-l	Goat-anti-chicken HRP	1:10 000	Dianova, #103-035-155	55 + 47
Goat-anti-MCT 4	1:500	Santa Cruz Biotechnology, sc-14930	Donkey-anti-goat HRP	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, sc-3851	54
Rabbit-anti-NF $\kappa$ B p50	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, sc-114	Donkey-anti-rabbit HRP	1:5000	Santa Cruz Biotechnology, sc-2077	50

number of animals used, and  $n$  is the number of epithelial samples incubated separately for each treatment. The data of the epithelial pieces ( $n$ ) used for each treatment were pooled per animal for statistical analysis, that is, statistics are based on the number of animals ( $N$ ).

For the determination of  $I_{sc}$  and  $G_t$ , 100 data points were collected per 10 min. These values were averaged for each animal and treatment. The arithmetic means were compared for differences between the treatments using two-way repeated-measures ANOVA with a subsequent Multiple Comparison Test (Holm-Sidak; SigmaPlot 11.0, Systat Software GmbH, Erkrath, Germany).

To calculate the relative changes in mRNA expression, the respective data from the control epithelia were set to 100%, and the expression data after n-butyrate and hypoxic incubation were adjusted accordingly. To compare the degree of a gene's up- or downregulation properly, the relative expression data were log-transformed (to base 10). After checking for normality, differences between the mean values of mRNA expression were tested using one-way repeated-measures ANOVA with a subsequent Multiple Comparison Test (Holm-Sidak; SIGMAPLOT 11.0, Systat Software GmbH).

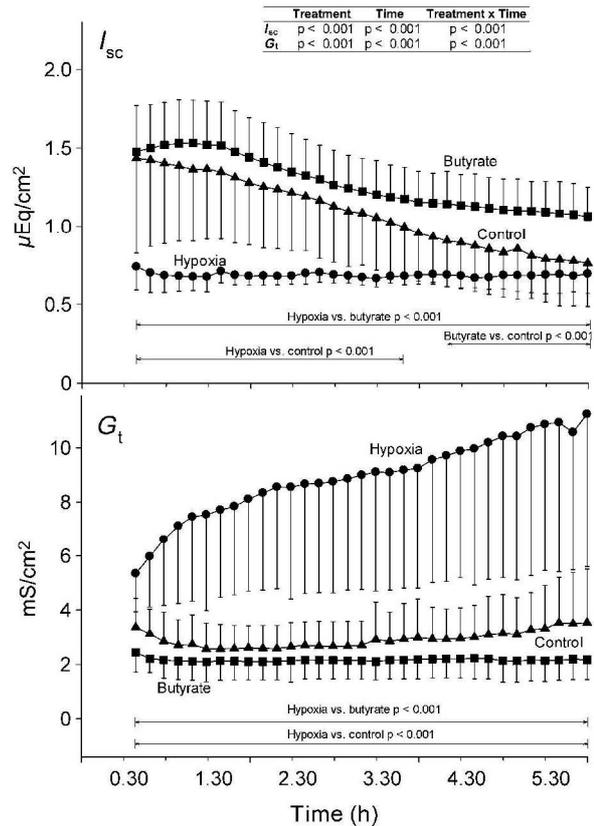
The evaluation of changes in protein expression was conducted with the GENETOOLS© software by measuring the chemiluminescent signals. Data were normalised for protein loading using  $\beta$ -actin as reference protein and treated similar to the mRNA expression data, that is, the control was set 100% and data were log-transformed to base 10. Differences between n-butyrate and control incubation were assessed using Student's  $t$ -test (SIGMAPLOT 11.0, Systat Software GmbH). Differences were assumed to be significant at  $p < 0.05$ .

## Results

### Electrical measurements

The  $I_{sc}$  and  $G_t$  recordings were started 30 min after mounting the epithelia in Ussing chambers, that is, the epithelia were exposed to the different conditions for that time before the first data were obtained.

For both electrophysiological parameters, the two-way repeated-measures ANOVA showed a significant effect of treatment and time ( $p < 0.001$ ). Additionally, there was also an interaction of treatment and time. In the epithelia of the control group, the mean initial  $I_{sc}$  amounted to  $0.94 \mu\text{Eq}/\text{cm}^2$  and declined to  $0.25 \mu\text{Eq}/\text{cm}^2$  at the end of the incubation period of 6 h. As shown in Fig. 1, the time-dependent decline



**Fig. 1** Changes in  $I_{sc}$  and  $G_t$  of rumen epithelium induced by 50 mM n-butyrate or hypoxia. Starting 30 min after mounting the epithelial pieces in Ussing chambers,  $I_{sc}$  and  $G_t$  were recorded over 6 h, that is, epithelia were exposed to the various conditions for 6 h. The arithmetic means  $\pm$  SD of all chambers of one group were calculated and averaged over 10 min. The values were compared using a two-way repeated-measures ANOVA with a subsequent multiple comparison Holm-Sidak test based on  $N = 6$  animals ( $n = 16$  epithelial pieces). Results of the two-way ANOVA are shown in the insert. Results of the multiple comparison procedure (Holm-Sidak test) for the effects of treatment are indicated by horizontal arrows in the graph.

in  $I_{sc}$  was at least partly prevented by the presence of 50 mM n-butyrate. Under that condition,  $I_{sc}$  only decreased from  $0.98$  to  $0.56 \mu\text{Eq}/\text{cm}^2$  after 6 h. The epithelia exposed to hypoxia for 30 min started with a significantly lower mean  $I_{sc}$  of  $0.24 \mu\text{Eq}/\text{cm}^2$ , which remained low till the end of the incubation period (Fig. 1).

The hypoxia group showed the highest initial mean  $G_t$  values of  $5.34 \text{ mS}/\text{cm}^2$ , that is, after 30 min of incubation under hypoxic conditions. The mean  $G_t$  increased up to  $11.4 \text{ mS}/\text{cm}^2$  after 6 h of hypoxic incubation. The mean  $G_t$  of the control group started significantly lower at  $3.36 \text{ mS}/\text{cm}^2$  and remained almost stable until the end of the incubation period. The  $G_t$  in the n-butyrate group was not significantly

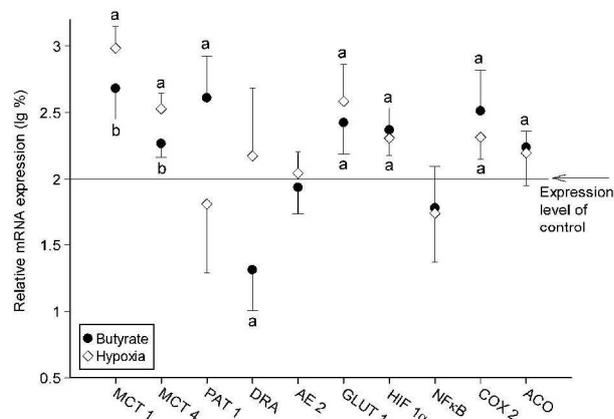
lower than that in the control group (between 2.45 mS/cm<sup>2</sup> at the beginning and 2.17 mS/cm<sup>2</sup> at the end of 6 h incubation; Fig. 1).

### mRNA expression

To assess the changes induced by 6-h incubation with 50 mM n-butyrate or under hypoxic conditions, the mRNA expression in these epithelia was calculated relative to that in the control epithelia incubated with basic buffer solution and gassed with 100% oxygen, whose expression level was set at 100%. Thus, the mRNA expression in n-butyrate- or hypoxia-incubated epithelia is reported as a multiple of that of the control. The data of the relative expression rates were log-transformed to scale both the increases and the decreases similarly.

As shown in Fig. 2, some of the investigated genes showed similar responsiveness to n-butyrate as well as to hypoxia. The MCT 1 mRNA expression was increased significantly both by n-butyrate and even more by hypoxia. The MCT 4 and GLUT 1 mRNA expression were also upregulated significantly. Of the regulatory factors, HIF 1 $\alpha$  and COX 2 were upregulated significantly by both experimental conditions conjointly as well.

However, there were also effects of the n-butyrate treatment that did not coincide with the outcome of



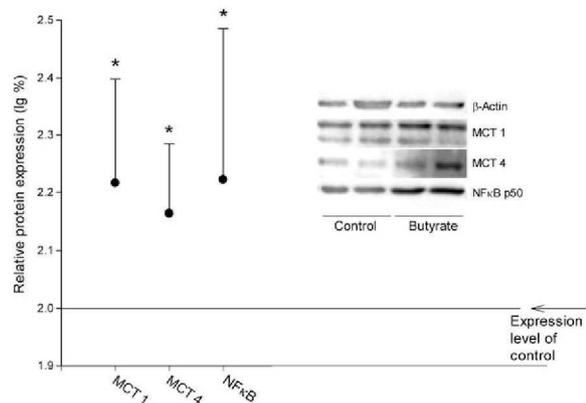
**Fig. 2** Changes in mRNA expression in rumen epithelium induced by incubation with 50 mM n-butyrate or hypoxia. The mRNA expression levels of the samples incubated under hypoxic conditions (white rhombs) or with 50 mM n-butyrate (black dots) were calculated relative to that of the control group, which was set to 100%. To demonstrate the differences in the mRNA expression proportionally, the data (in%) were log-transformed to base 10. The dots/rhombos represent the log arithmetic means  $\pm$  SD; letters a and b indicate statistically significant differences to control ( $p < 0.05$ ). Differences between the treatments are indicated by different letters. One-way repeated-measures ANOVA with subsequent Holm-Sidak test based on  $N = 6$  animals ( $n = 16$  epithelial pieces).

hypoxic conditions (Fig. 2). In addition to the effects reported above, n-butyrate incubation led to a significantly increased mRNA expression of PAT 1 and ACO as well. In contrast, the mRNA expression of DRA was decreased significantly after n-butyrate incubation. All of these genes remained unaffected by hypoxia. The expression of AE 2 and NF $\kappa$ B mRNA was not altered by either of the two experimental conditions.

### Protein expression

In order to confirm the influence of n-butyrate we observed on mRNA level, we assessed the expression of those genes that seemed to be affected most on mRNA level, that is, MCT 1 and 4, on protein level as well. For this purpose, a longer period of incubation was necessary. This is why we incubated the epithelia in DMEM supplemented with 50 mM Na-n-butyrate or an equivalent amount of NaCl for 24 h using a tissue culture system.

Consistent with the mRNA expression data, the protein expression of MCT 1 and 4 was increased significantly after incubation with 50 mM n-butyrate compared with the control group (Fig. 3). Additionally, we wanted to confirm an activation of NF $\kappa$ B. This activation had already been indicated by the upregulation of its target gene COX 2 on mRNA level. Therefore, we assessed the protein expression of its activated subunit p50. The protein expression of NF $\kappa$ B p50 was increased significantly after butyrate incubation as well, confirming NF $\kappa$ B activation (Fig. 3).



**Fig. 3** Changes in protein expression in rumen epithelium induced by 24-h incubation with 50 mM n-butyrate. The protein expression of the samples incubated with 50 mM n-butyrate was calculated relative to that of the control group, which was set to 100%. To demonstrate differences proportionally, the data (in%) were log-transformed to base 10. Asterisks mark statistically significant differences to the protein expression in the control tissues ( $p < 0.05$ ). Student's  $t$ -test based on  $N = 4$  animals ( $n = 8$  epithelial pieces).

The investigation on protein level could only be conducted to evaluate the effects of n-butyrate, as the studies using the Ussing chamber system showed that the viability of the tissues was drastically reduced even after 6 h of hypoxia.

### Discussion

Monocarboxylate transporters have been described to mediate the transfer of monocarboxylates such as lactate and pyruvate in many cell types (Deuticke, 1982; Poole and Halestrap, 1993; Halestrap and Price, 1999; Halestrap and Meredith, 2004; Meredith and Christian, 2008). In ruminal epithelium, MCT isoform 1 has been shown to be involved in the transport of SCFA and their metabolites, that is, mainly ketone bodies, into the blood (Müller *et al.*, 2002; Kirat *et al.*, 2006; Dengler *et al.*, 2013) and is considered to be a bottleneck for SCFA transport (Gäbel *et al.*, 2002). MCT isoform 4 was detected on the lumen-facing side of the ruminal epithelium (Kirat *et al.*, 2007), but also inside the ruminal epithelial cells, and is assumed to be involved either in the uptake of SCFA from ruminal lumen and/or in the intracellular shuttling of metabolites (Kirat *et al.*, 2007).

Studies in various tissues showed that both MCT 1 and MCT 4 are upregulated by exposure to high concentrations of n-butyrate or to hypoxic conditions (Ord *et al.*, 2005; Perez de Heredia *et al.*, 2010; Queiros *et al.*, 2012). Assuming a similar regulation of MCT 1 in ruminal epithelium to that observed in other tissues, we aimed to investigate whether the expression of ruminal MCT 1 can also be modulated by these triggers and whether hypoxia-induced changes in MCT 1 and MCT 4 expression may be comparable to changes induced by n-butyrate. We also tested whether other transport proteins involved in ruminal SCFA transport are influenced. Subsequently, we tried to characterise upstream signalling pathways responsible for this.

A concomitant upregulation of MCT 1 and 4 mRNA expression was found under both incubation conditions applied and could be confirmed on protein level after 24-h n-butyrate incubation as well. This finding supports the thesis that these transport proteins play a pivotal role in the extrusion and/or intracellular handling of n-butyrate- and/or hypoxia-induced metabolites in the ruminal epithelium. Our results are in good accordance with reports about the upregulation of MCT 1 and 4 by hypoxia in cell cultures of human adipocytes and several tumour cells (Ord *et al.*, 2005; Perez de Heredia *et al.*, 2010; Queiros *et al.*, 2012) as well as in rat brains and hearts

(Martinov *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2009). This upregulation is easy to interpret because MCT 1 mediates the extrusion of the products of anaerobic glycolysis occurring under hypoxic conditions (Boi-dot *et al.*, 2012), that is, the upregulation of MCT 1 is an adaptive response to the accumulation of metabolites, thus increasing their export from the cytosol in many tissues. The same seems to apply for the ruminal epithelium, where the metabolism of n-butyrate is a major energy source and MCT 1 has already been shown to play a role in the extrusion of accumulating metabolites (Müller *et al.*, 2002). The lumen-facing localisation of MCT 4, however, makes an interpretation of its upregulation in ruminal epithelium difficult. Any transfer of metabolites from the cell interior into the ruminal lumen would imply that the cells do not remove the metabolites, as they may be recycled. However, an intracellular localisation of MCT 4 as suggested by Kirat *et al.* (2007) and thus its involvement in the intracellular shuttling of metabolites seem likely. Therefore, the upregulation of MCT 4 by both n-butyrate and hypoxia might also be part of the elevated intracellular handling of the metabolites.

In contrast to MCT 1 and 4, PAT 1 was upregulated only by n-butyrate incubation. Hypoxia did not affect its expression at all. The unique upregulation of PAT 1 by n-butyrate provides a hint that it transports and is regulated by the original SCFA but not by their metabolites. In other tissues, PAT 1 is known as a  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger, which also accepts organic anions such as dissociated SCFA (Wang *et al.*, 2002; Nozawa *et al.*, 2004; Chernova *et al.*, 2005). Thus, a role in ruminal SCFA transport appears to be possible.

Conversely, DRA was downregulated by n-butyrate incubation, while it was unaffected by hypoxia. In human and rodent colonic epithelium, DRA has been described as a  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger located at the lumen-facing side of these epithelia so far (Melvin *et al.*, 1999; Alper *et al.*, 2001; Jacob *et al.*, 2002). An acceptance of SCFA in rumen epithelium is discussed to be likely with respect to the high SCFA concentrations in the forestomach (Bilk *et al.*, 2005) and was also suggested for rat colonic epithelium (Barmeyer *et al.*, 2007). The changes in its mRNA expression after n-butyrate incubation suggest that DRA either does not accept SCFA and/or their metabolites in ruminal epithelium or is not involved in its adaptation to larger amounts of SCFA. However, downregulation of DRA might also be part of a protective function. Assuming a lumen-facing localisation in ruminal epithelium like in the colonic epithelium of rat, rabbit and humans (Jacob *et al.*, 2002), the downregulation

of a SCFA transport protein could be a mechanism to prevent an overload of SCFA in the epithelial cells.

AE 2 is another anion exchanger protein hypothesised to be involved in SCFA transport (Bilk et al., 2005). It has mainly been described to work as a  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger like PAT 1 and DRA, but has been shown to accept n-butyrate as well in colonic epithelium (Jons and Drenckhahn, 1998; Rajendran and Binder, 2000; Ikuma et al., 2003). Its localisation and substrate affinities in the ruminal epithelium are still unknown. In the present study, its expression was unaffected by both experimental conditions, casting its acceptance of SCFA (-metabolites) or at least its role in an adaptation to an increase in ruminal SCFA concentrations into doubt.

In spite of the fact that the consequences of MCT 4 upregulation cannot be interpreted definitely, the increased mRNA expression of MCT 1 and 4, that is, transport proteins that can eliminate accumulating metabolites, can be considered a sign of the cells' attempt to compensate for and survive the challenges we applied. In the case of n-butyrate, this attempt seems to work quite well, while under hypoxic conditions, this upregulation was not sufficient to prevent damage, as reflected by the electrophysiological measurements. For the epithelia exposed to hypoxic conditions,  $G_t$  increased and reached an endpoint of approximately thrice the value of the control and n-butyrate groups after an incubation period of 6 h. This must be interpreted as a decreased viability of the tissues under hypoxic conditions. Also,  $I_{sc}$  in the hypoxic group was strikingly lower than in the other two groups, whereas  $I_{sc}$  in the n-butyrate-incubated group remained even higher during the incubation period than in the control group, indicating differences in the maintenance of epithelial transport processes between the treatments. A time-dependent decrease in  $I_{sc}$  is known as usual behaviour of tissues incubated in Ussing chambers under 'physiological' conditions (Martens et al., 1987). However, it attracts attention that  $I_{sc}$  was more stable in the n-butyrate-incubated group than under control conditions. Thus, it may be assumed that n-butyrate as an additional energy source supports the cells' viability. In contrast, the high  $G_t$  and low  $I_{sc}$  clearly show tissue damage under hypoxic conditions. Nevertheless, the stable expression of the reference genes, as outlined in the material and methods section (*Two-step real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR)*), demonstrates an intact mRNA expression and thus makes the evidence of the conducted RT-qPCR valid.

To obtain a better understanding of the compensation mechanisms by which the epithelium seems to

cope with the conditions applied, we investigated the upstream regulatory mechanisms mediating the observed changes in transcription induced by both incubation conditions. Under hypoxic conditions, the GLUT 1 gene is characteristically upregulated via HIF 1 (Baumann et al., 2007; Ganapathy et al., 2009). While the functional meaning of an increased expression of GLUT 1 under hypoxia is clearly an enhanced transport of substrates for anaerobic glycolysis, it is surprising that this also happened at high n-butyrate concentrations. However, it has been shown in various tissues that GLUT 1 is upregulated concomitantly with MCT 1 (Ullah et al., 2006; Perez de Heredia et al., 2010). In tumour cells and adipocytes, the correlation between MCT 1 and 4 as well as GLUT 1 upregulation after hypoxia was interpreted as a sign of their cooperative regulation via HIF 1 (Ullah et al., 2006; Perez de Heredia et al., 2010; Pinheiro et al., 2011). To test whether such a cooperative regulation might also exist in the ruminal epithelium, we assessed the mRNA expression of its cytoplasmatic subunit, HIF 1 $\alpha$ . Although this transcription factor is only partially regulated at the mRNA level, the increase in its mRNA expression under both the n-butyrate incubation and the hypoxia suggests an involvement of HIF 1. Thus, the upregulation of GLUT 1 (although this transport protein may be of minor importance in rumen epithelium) under both incubation conditions strongly underlines the role of HIF 1 activation. HIF 1, in turn, is not only activated by hypoxic conditions, but also by inflammatory mediators like NF $\kappa$ B (Rius et al., 2008). Because NF $\kappa$ B is activated at the protein level and not on the mRNA level (Inan et al., 2000a,b), we may have detected only an elevated protein but not mRNA expression. Furthermore, the upregulation of the mRNA expression of the NF $\kappa$ B target gene COX 2 (Rius et al., 2008) by both n-butyrate and hypoxia strongly points to an activation of the NF $\kappa$ B pathway as well. In agreement with our study, there are also reports about an activation of NF $\kappa$ B by n-butyrate in human intestinal cells (Borthakur et al., 2008). However, NF $\kappa$ B can mediate an upregulation of SCFA transport proteins not only by activating HIF 1. A binding site for NF $\kappa$ B was also detected at the promoter region of MCT 1 (Hadjigapiou et al., 2005). Consequently, NF $\kappa$ B might regulate the expression of MCT 1 both directly and indirectly via activation of HIF 1 $\alpha$ .

In addition to HIF 1 $\alpha$  and NF $\kappa$ B, PPAR $\alpha$  has been shown to modulate the expression level of MCT 1 (König et al., 2010; Benesch et al., 2012). Because PPAR $\alpha$  is expressed constitutionally in a manner

similar to that of NF $\kappa$ B, we measured the mRNA expression of a PPAR $\alpha$  target gene, ACO (Mandard et al., 2004). ACO was upregulated after n-butyrate incubation but not by hypoxia. This suggests that unique pathways are also activated by n-butyrate and/or its metabolites only.

The present study shows that the expression of certain transport proteins can be influenced by n-butyrate and/or (anaerobic) metabolites via distinct pathways. In addition to intracellular signal cascades, n-butyrate might influence gene expression non-specifically by its action as a potent deacetylase inhibitor, leading to a hyperacetylation of histones (Kouraklis and Theocharis, 2006; Hamer et al., 2008). The participation of these mechanisms as well as other regulatory pathways cannot be excluded definitely. However, the comparison of the effects of n-butyrate incubation with those of hypoxia leads to the conclusion that the accumulation of metabolites initiates the activation of NF $\kappa$ B and HIF 1, while n-butyrate itself additionally activates PPAR $\alpha$ .

These pathways lead to an upregulation of MCT 1, 4, GLUT 1 and, in the case of n-butyrate, also PAT 1.

Thus, MCT 1 and 4 as well as PAT 1 might be considered the key transporters for n-butyrate metabolites and intact n-butyrate in the ruminal epithelium. By adapting the expression of these proteins and thus the epithelium's transport capacities, the animal is able to react effectively to challenges that are accompanied by and increase intraruminal SCFA release, such as enhanced concentrate feeding, up to a certain point. Beyond this point, however, these regulatory mechanisms are not sufficient to balance the genesis and extrusion of metabolites, as could be observed under the hypoxic conditions in our study, and might lead to severe distress for the animal.

### Acknowledgements

We are grateful to Dr Christoph Engel from the Institute for Medical Informatics, Statistics and Epidemiology (IMISE), University of Leipzig, for his help with the statistics. We thank Petra Philipp and Ines Urbansky for expert technical assistance. The study was supported by the German Research Foundation (DFG, Ga 329/7-1).

### References

- Alper, S. L.; Chernova, M. N.; Stewart, A. K., 2001: Regulation of Na<sup>+</sup>-independent Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchangers by pH. *Journal of the Pancreas* **2**, 171–175.
- Baldwin, R. L.; Jesse, B. W., 1996: Propionate modulation of ruminal ketogenesis. *Journal of Animal Science* **74**, 1694–1700.
- Baldwin, R. L.; Wu, S.; Li, W.; Li, C.; Bequette, B. J.; Li, R. W., 2012: Quantification of transcriptome responses of the rumen epithelium to butyrate infusion using RNA-seq technology. *Gene Regulation and Systems Biology* **6**, 67–80.
- Barmeyer, C.; Ye, J. H.; Sidani, S.; Geibel, J.; Binder, H. J.; Rajendran, V. M., 2007: Characteristics of rat downregulated in adenoma (rDRA) expressed in HEK 293 cells. *Pflügers Archiv* **454**, 441–450.
- Baumann, M. U.; Zamudio, S.; Illsley, N. P., 2007: Hypoxic upregulation of glucose transporters in BeWo choriocarcinoma cells is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **293**, C477–C485.
- Beck, U.; Emmanuel, B.; Giesecke, D., 1984: The ketogenic effect of glucose in rumen epithelium of ovine (*Ovis aries*) and bovine (*Bos taurus*) origin. *Comparative Biochemistry and Physiology B* **77**, 517–521.
- Benesch, F.; Honscha, K. U.; Urbansky, I.; Gäbel, G., 2012: Regulatory influences on monocarboxylate transporter 1 (MCT1) in ovine ruminal epithelial cells. In: G. Perozzi, F. Virgili (eds), *Proceedings of the 24th Meeting of the European Intestinal Transport Group (EITG)*. Springer Verlag, Oxford. *Genes and Nutrition* **6**(Suppl 1), S57.
- Bergman, E. N.; Reid, R. S.; Murray, M. G.; Brockway, J. M.; Whitelaw, F. G., 1965: Interconversions and production of volatile fatty acids in the sheep rumen. *Biochemical Journal* **97**, 53–58.
- Bergmann, E. N., 1990: Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews* **70**, 567–590.
- Bilk, S.; Huhn, K.; Honscha, K. U.; Pfannkuche, H.; Gäbel, G., 2005: Bicarbonate exporting transporters in the ovine ruminal epithelium. *Journal of Comparative Physiology B* **175**, 365–374.
- Boidot, R.; Vegran, F.; Meulle, A.; Le, B. A.; Dessy, C.; Sonveaux, P.; Lizard-Nacol, S.; Feron, O., 2012: Regulation of monocarboxylate transporter MCT1 expression by p53 mediates inward and outward lactate fluxes in tumors. *Cancer Research* **72**, 939–948.
- Borthakur, A.; Saksena, S.; Gill, R. K.; Alrefai, W. A.; Ramaswamy, K.; Dudeja, P. K., 2008: Regulation of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) promoter by butyrate in human intestinal epithelial cells: involvement of NF-kappaB pathway. *Journal of Cellular Biochemistry* **103**, 1452–1463.
- Brooks, G. A., 2009: Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *Journal of Physiology* **587**, 5591–5600.
- Bugaut, M., 1987: Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology B* **86**, 439–472.
- Chernova, M. N.; Jiang, L.; Friedman, D. J.; Darman, R. B.; Lohi, H.; Kere, J.; Vandorpe, D. H.; Alper, S. L., 2005: Functional comparison of mouse slc26a6 anion exchanger with human SLC26A6 polypeptide variants: differences in anion selectivity, regulation, and electrogenicity. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 8564–8580.
- Connor, E. E.; Li, R. W.; Baldwin, R. L.; Li, C., 2010: Gene expression in the digestive tissues of ruminants and their relationships with feeding and digestive processes. *Animal: An International*

- Journal of Animal Bioscience* **4**, 993–1007.
- Cuff, M. A.; Lambert, D. W.; Shirazi-Beechey, S. P., 2002: Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *Journal of Physiology* **539**, 361–371.
- Dengler, F.; Rackwitz, R.; Benesch, F.; Pfannkuche, H.; Gäbel, G., 2013: Bicarbonate-dependent transport of acetate and butyrate across the basolateral membrane of sheep rumen epithelium. *Acta Physiologica Scandinavica (Oxford, England)* Doi: 10.1111/apha.12155. [Epub ahead of print].
- Deuticke, B., 1982: Monocarboxylate transport in erythrocytes. *The Journal of Membrane Biology* **70**, 89–103.
- Gäbel, G.; Vogler, S.; Martens, H., 1991: Short-chain fatty acids and CO<sub>2</sub> as regulators of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> absorption in isolated sheep rumen mucosa. *Journal of Comparative Physiology B* **161**, 419–426.
- Gäbel, G.; Müller, F.; Pfannkuche, H.; Aschenbach, J. R., 2001: Influence of isoform and DNP on butyrate transport across the sheep ruminal epithelium. *Journal of Comparative Physiology B* **171**, 215–221.
- Gäbel, G.; Aschenbach, J. R.; Müller, F., 2002: Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: implications and limitations. *Animal Health Research Reviews* **3**, 15–30.
- Ganapathy, V.; Thangaraju, M.; Prasad, P. D., 2009: Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacology & Therapeutics* **121**, 29–40.
- Giesecke, D.; Beck, U.; Emmanuel, B., 1985: Ketogenic regulation by certain metabolites in rumen epithelium. *Journal of Comparative Physiology B* **81**, 863–867.
- Hadjigapiou, C.; Borthakur, A.; Dahdal, R. Y.; Gill, R. K.; Malakooti, J.; Ramaswamy, K.; Dudeja, P. K., 2005: Role of USF1 and USF2 as potential repressor proteins for human intestinal monocarboxylate transporter 1 promoter. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **288**, G1118–G1126.
- Halestrap, A. P.; Price, N. T., 1999: The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *The Biochemical Journal* **343** (Pt 2), 281–299.
- Halestrap, A. P.; Meredith, D., 2004: The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflügers Archiv* **447**, 619–628.
- Hamer, H. M.; Jonkers, D.; Venema, K.; Vanhoutvin, S.; Troost, F. J.; Brummer, R. J., 2008: Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **27**, 104–119.
- Harris, T.; Eliyahu, G.; Frydman, L.; Degani, H., 2009: Kinetics of hyperpolarized <sup>13</sup>C1-pyruvate transport and metabolism in living human breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 18131–18136.
- Ikuma, M.; Geibel, J.; Binder, H. J.; Rajendran, V. M., 2003: Characterization of Cl-HCO<sub>3</sub> exchange in basolateral membrane of rat distal colon. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **285**, C912–C921.
- Inan, M. S.; Rasoulpour, R. J.; Yin, L.; Hubbard, A. K.; Rosenberg, D. W.; Giardina, C., 2000a: The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology* **118**, 724–734.
- Inan, M. S.; Tolmacheva, V.; Wang, Q. S.; Rosenberg, D. W.; Giardina, C., 2000b: Transcription factor NF-kappaB participates in regulation of epithelial cell turnover in the colon. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **279**, G1282–G1291.
- Jacob, P.; Rossmann, H.; Lamprecht, G.; Kretz, A.; Neff, C.; Lin-Wu, E.; Gregor, M.; Groneberg, D. A.; Kere, J.; Seidler, U., 2002: Down-regulated in adenoma mediates apical Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange in rabbit, rat, and human duodenum. *Gastroenterology* **122**, 709–724.
- Jons, T.; Drenckhahn, D., 1998: Anion exchanger 2 (AE2) binds to erythrocyte ankyrin and is colocalized with ankyrin along the basolateral plasma membrane of human gastric parietal cells. *European Journal of Cell Biology* **75**, 232–236.
- Kirat, D.; Masuoka, J.; Hayashi, H.; Iwano, H.; Yokota, H.; Taniyama, H.; Kato, S., 2006: Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) plays a direct role in short-chain fatty acids absorption in caprine rumen. *The Journal of Physiology* **576**, 635–647.
- Kirat, D.; Matsuda, Y.; Yamashiki, N.; Hayashi, H.; Kato, S., 2007: Expression, cellular localization, and functional role of monocarboxylate transporter 4 (MCT4) in the gastrointestinal tract of ruminants. *Gene* **391**, 140–149.
- König, B.; Fischer, S.; Schlotte, S.; Wen, G.; Eder, K.; Stangl, G. I., 2010: Monocarboxylate transporter 1 and CD147 are up-regulated by natural and synthetic peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists in livers of rodents and pigs. *Molecular Nutrition & Food Research* **54**, 1248–1256.
- Kouraklis, G.; Theocharis, S., 2006: Histone deacetylase inhibitors: a novel target of anticancer therapy (review). *Oncology Reports* **15**, 489–494.
- Kristensen, N. B.; Harmon, D. L., 2004: Effect of increasing ruminal butyrate absorption on splanchnic metabolism of volatile fatty acids absorbed from the washed reticulorumen of steers. *Journal of Animal Science* **82**, 3549–3559.
- Kristensen, N. B.; Danfaer, A.; Agergaard, N., 1998: Absorption and metabolism of short-chain fatty acids in ruminants. *Archiv für Tierernährung* **51**, 165–175.
- Laarman, A. H.; Sugino, T.; Oba, M., 2012: Effects of starch content of calf starter on growth and rumen pH in Holstein calves during the weaning transition. *Journal of Dairy Science* **95**, 4478–4487.
- Malhi, M.; Gui, H.; Yao, L.; Aschenbach, J. R.; Gäbel, G.; Shen, Z., 2013: Increased papillae growth and enhanced short chain fatty acid absorption in the rumen of goats are associated with transient increases in cyclin D1 expression after ruminal butyrate infusion. *Journal of Dairy Science* **96**, 7603–7616.
- Mandard, S.; Müller, M.; Kersten, S., 2004: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 393–416.
- Martens, H.; Gäbel, G.; Strozyk, H., 1987: The effect of potassium and the transmural potential difference on magnesium transport across an isolated preparation of sheep rumen epithelium. *Quarterly Journal of Experimental Physiology (Cambridge, England)* **72**, 181–188.
- Martinov, V.; Rizvi, S. M.; Weiseth, S. A.; Sagave, J.; Bergersen, L. H.; Valen, G., 2009: Increased expression of monocarboxylate transporter 1 after acute ischemia of isolated, perfused mouse hearts. *Life Sciences* **85**, 379–385.
- Melvin, J. E.; Park, K.; Richardson, L.; Schultheis, P. J.; Shull, G. E., 1999: Mouse down-regulated in adenoma (DRA) is an intestinal Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger and is up-regulated in colon of mice lacking the NHE3 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>

- exchanger. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 22855–22861.
- Meredith, D.; Christian, H. C., 2008: The SLC16 monocarboxylate transporter family. *Xenobiotica* **38**, 1072–1106.
- Moreira, T. J.; Pierre, K.; Maekawa, F.; Repond, C.; Cebere, A.; Liljequist, S.; Pellerin, L., 2009: Enhanced cerebral expression of MCT1 and MCT2 in a rat ischemia model occurs in activated microglial cells. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **29**, 1273–1283.
- Müller, F.; Huber, K.; Pfannkuche, H.; Aschenbach, J. R.; Breves, G.; Gäbel, G., 2002: Transport of ketone bodies and lactate in the sheep ruminal epithelium by monocarboxylate transporter 1. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **283**, G1139–G1146.
- Nozawa, T.; Sugiura, S.; Hashino, Y.; Tsuji, A.; Tamai, I., 2004: Role of anion exchange transporter PAT1 (SLC26A6) in intestinal absorption of organic anions. *Journal of Drug Targeting* **12**, 97–104.
- Ord, J. J.; Streeter, E. H.; Roberts, I. S.; Cranston, D.; Harris, A. L., 2005: Comparison of hypoxia transcriptome *in vitro* with *in vivo* gene expression in human bladder cancer. *British Journal of Cancer* **93**, 346–354.
- Perez de Heredia, F.; Wood, I. S.; Trayhurn, P., 2010: Hypoxia stimulates lactate release and modulates monocarboxylate transporter (MCT1, MCT2, and MCT4) expression in human adipocytes. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* **459**, 509–518.
- Pfaffl, M. W.; Horgan, G. W.; Dempfle, L., 2002: Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* **30**, e36.
- Pinheiro, C.; Sousa, B.; Albergaria, A.; Paredes, J.; Dufloth, R.; Vieira, D.; Schmitt, F.; Baltazar, F., 2011: GLUT1 and CAIX expression profiles in breast cancer correlate with adverse prognostic factors and MCT1 overexpression. *Histology and Histopathology* **26**, 1279–1286.
- Poole, R. C.; Halestrap, A. P., 1993: Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *American Journal of Physiology* **264**, C761–C782.
- Queiros, O.; Preto, A.; Pacheco, A.; Pinheiro, C.; Zevedo-Silva, J.; Moreira, R.; Pedro, M.; Ko, Y. H.; Pedersen, P. L.; Baltazar, F.; Casal, M., 2012: Butyrate activates the monocarboxylate transporter MCT4 expression in breast cancer cells and enhances the antitumor activity of 3-bromopyruvate. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **44**, 141–153.
- Rajendran, V. M.; Binder, H. J., 2000: Characterization and molecular localization of anion transporters in colonic epithelial cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **915**, 15–29.
- Rius, J.; Guma, M.; Schachtrup, C.; Akassoglou, K.; Zinkernagel, A. S.; Nizet, V.; Johnson, R. S.; Haddad, G. G.; Karin, M., 2008: NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* **453**, 807–811.
- Steele, M. A.; Dionissopoulos, L.; AlZahal, O.; Doelman, J.; McBride, B. W., 2012: Rumen epithelial adaptation to ruminal acidosis in lactating cattle involves the coordinated expression of insulin-like growth factor-binding proteins and a cholesterolgenic enzyme. *Journal of Dairy Science* **95**, 318–327.
- Ullah, M. S.; Davies, A. J.; Halestrap, A. P., 2006: The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 9030–9037.
- Vandesompele, J.; DePreter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; DePaepe, A.; Speleman, F., 2002: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**, RESEARCH0034.
- Vaupel, P., 2004: The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *The Oncologist* **9**(Suppl 5), 10–17.
- Wang, Z.; Petrovic, S.; Mann, E.; Soleimani, M., 2002: Identification of an apical Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger in the small intestine. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **282**, G573–G579.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, durch welche Mechanismen die Ausschleusung von SCFA(-Metaboliten) über die basolaterale Membran des Pansenepithels vermittelt wird. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Transport eine bikarbonatabhängige sowie eine bikarbonatunabhängige Komponente aufweist. Hemmstoffeffekte deuten auf eine Beteiligung von MCT 1 als Anionenaustauschprotein hin, was auch durch Untersuchungen auf Genexpressionsebene unteretzt wird. Hier konnte eine adaptive Heraufregulierung der Expression von MCT 1, 4 sowie PAT 1 nach verstärkter Butyrat-Inkubation nachgewiesen werden. Die Ergebnisse werden im Folgenden übergreifend diskutiert.

### **4.1 Transport von SCFA über die basolaterale Membran des Pansenepithels**

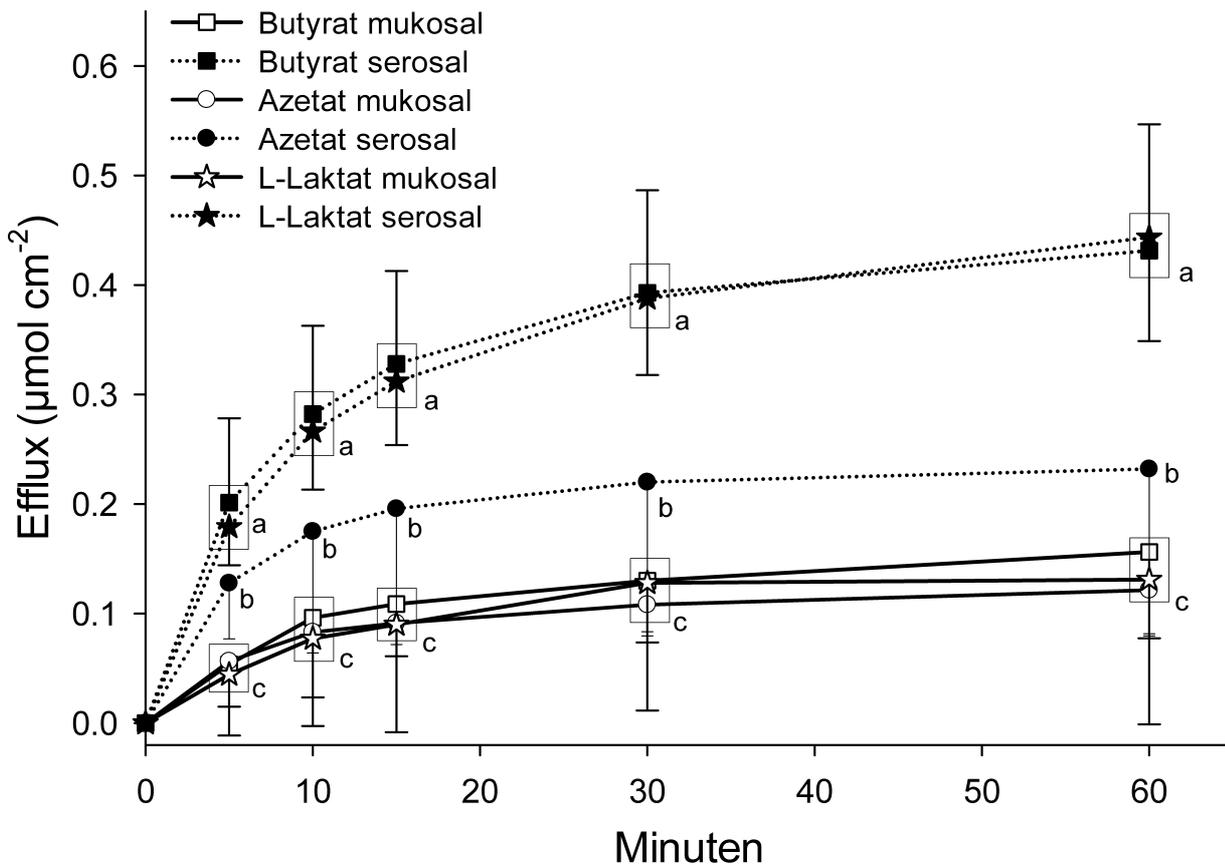
Im Unterschied zum Transport der SCFA über die apikale Membran des Pansenepithels, der bereits Gegenstand vieler Studien war (KRAMER et al. 1996; BILK 2007; ASCHENBACH et al. 2009) (s. 2.3.3 *Proteinvermittelte SCFA-Permeation*), wurde in der vorliegenden Arbeit das Augenmerk erstmals intensiv auf die Ausschleusung der SCFA aus dem Zellinneren über die basolaterale Membran gerichtet. Diese Transportmechanismen müssen nicht nur die Permeation der SCFA, sondern zusätzlich auch deren Metaboliten ins Blut vermitteln (s. 2.2 *Metabolismus von SCFA im Pansenepithel*). Insbesondere Butyrat und in geringerem Umfang auch Propionat werden von den Pansenepithelzellen zur Deckung ihres Energiebedarfs zu den Ketonkörpern Azetoazetat und  $\beta$ -Hydroxybutyrat bzw. zu Laktat abgebaut (WEIGAND et al. 1972b; KRISTENSEN et al. 1998). Bei der Charakterisierung des Butyrattransportes sind also auch dessen Metaboliten mit einzubeziehen.

Azetat hingegen gilt als nicht bzw. kaum intraepithelial metabolisierte SCFA (BERGMAN et al. 1965; GÄBEL et al. 2002) (s. 2.2 *Metabolismus von SCFA im Pansenepithel*), kann also als weitgehend repräsentativ für nicht metabolisierte SFCA angesehen werden. Um den Transport einer nicht metabolisierten SCFA über die basolaterale Membran des Pansenepithels zu untersuchen, wurde deshalb mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Azetat gearbeitet. Im Gegensatz dazu wurde radioaktiv markiertes Butyrat herangezogen, um auch Untersuchungen zur Ausschleusung von SCFA-Metaboliten anzustellen. Bei der Messung der radioaktiv markierten Moleküle kann im Falle von Butyrat also nicht davon ausgegangen werden, dass es sich grundsätzlich um das Originalsubstrat handelt,

sondern es muss vielmehr jedes markierte Molekül als möglicher Metabolit betrachtet werden.

Im direkten Vergleich zwischen Azetat und Butyrat konnten sowohl Übereinstimmungen als auch Unterschiede zwischen den Transportmechanismen für SCFA und deren Metaboliten aufgedeckt werden.

So war bei der Messung der Ausschleusung beider SCFA aus einem zuvor mit den SCFA beladenen Epithel eine Diskrepanz in der basolateralen Ausschleusung zwischen Azetat und Butyrat(-Metaboliten) zu beobachten. Der Transport zur mukosalen Seite hin war zwar gleich groß, in der serosalen Pufferlösung akkumulierte(n) jedoch deutlich mehr Butyrat (-Metaboliten) als Azetat (Publikation 1, Fig. 1 und 2), was auf unterschiedliche Transportmechanismen für nicht metabolisierte SCFA und ihre Metaboliten auf der basolateralen Seite hindeutet. Diese Annahme unterstützen für <sup>14</sup>C-markiertes L-Laktat gemessene Ausschleusungsraten. Diese verliefen beinahe identisch zu denen von Butyrat (Abb. 1, unveröffentlichte Ergebnisse). Da auch Laktat ein SCFA-Metabolit ist, deuten die synchron verlaufenden Ausschleusungsraten darauf hin, dass Butyrat in den Epithelzellen schnell verstoffwechselt wird, sodass die in Form von radioaktiv markierten C-Atomen gemessene Ausschleusung hauptsächlich Metaboliten betrifft, die auf denselben Wegen transportiert werden wie L-Laktat. Somit erscheint es sinnvoll, bei der Betrachtung möglicher Transportmechanismen zwischen Azetat und Butyrat(-Metaboliten) zu differenzieren. Welche Mechanismen dies sein können, soll im Folgenden erörtert werden.

**Abb. 1**

Zeitlicher Verlauf der Effluxraten von Azetat, Butyrat(-Metaboliten) und L-Laktat aus dem Panseneithel nach zweistündiger Inkubation mit dem jeweiligen Substrat.

Analog zu den in Publikation 1 beschriebenen Versuchen zur Ausschleusung von Azetat und Butyrat aus zuvor mit <sup>14</sup>C-markierten Isotopen dieser SCFA beladenen isolierten Panseneithelstücken, wurde dies auch mit L-Laktat (in einer Gesamtkonzentration von 50 mM) durchgeführt.

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD der in der Pufferlösung akkumulierenden Menge des jeweils radioaktiv markierten Substrats. Wie durch die Buchstaben a, b und c angezeigt, ergibt sich zu jedem Zeitpunkt im Vergleich der Ausschleusungsraten ein signifikanter Unterschied zwischen denen zur mukosalen Seite und denen zur serosalen Seite, wobei hier wiederum die Effluxraten von Butyrat(-Metaboliten) und L-Laktat die von Azetat signifikant übersteigen (N = 4; n = 8; p < 0.05; One-Way Repeated Measurements ANOVA mit nachfolgendem Holm-Sidak-Test; SigmaPlot 11.0, Systat Software, USA).

### 4.1.1 Transport mittels lipophiler Diffusion

Bislang wurde von einer Kombination aus lipophiler Diffusion und proteinvermittelten Transportmechanismen für den Transport der SCFA ins Blut ausgegangen (RECHKEMMER et al. 1995; GÄBEL et al. 2002). Im Gegensatz zu Azetat ist Butyrat aufgrund seiner Kettenlänge deutlich lipophiler. Damit besteht grundsätzlich die Möglichkeit, dass der nicht metabolisierte Anteil dieser SCFA die basolaterale Membran via lipophiler Diffusion überquert. Ihre Metaboliten, also hauptsächlich Azetoazetat und  $\beta$ -Hydroxybutyrat, sind hingegen weniger lipophil und somit verstärkt auf einen proteinvermittelten Transportmechanismus angewiesen. Um die Bedeutung der lipophilen Diffusion für die Permeation der basolateralen Membran zu evaluieren, wurde im ersten Teil der Arbeit der Einfluss verschiedener serosaler pH-Werte auf die transepitheliale Fluxrate von mukosal nach serosal betrachtet. Im Ergebnis konnte nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Permeation von Butyrat über die basolaterale Membran durch pH-Wert und  $p\text{CO}_2$  zu einem gewissen Grad beeinflusst wird und somit die lipophile Diffusion bei der Permeation dieser SCFA ins Blut eine gewisse Rolle spielt (Publikation 1, Fig. 3). Dennoch ist diese offensichtlich von so geringer Bedeutung, dass keine direkten Effekte des serosalen pH-Werts auf die transepitheliale Fluxrate von Butyrat zu beobachten waren. In Bezug auf Azetat, stellvertretend für nicht metabolisierte SCFA, zeigte sich keinerlei Hinweis auf eine pH-abhängige und somit lipophile Permeation über das Pansenepithel (vgl. Publikation 1, results: *The influence of different  $\text{HCO}_3^-$  gradients on mucosal to serosal flux of acetate and butyrate*).

Somit spielt lipophile Diffusion - entgegen den ursprünglichen Ansichten (BARCROFT et al. 1944; ALI et al. 2006) - für die Permeation von SCFA über die basolaterale Membran des Pansenepithels keine signifikante Rolle. Daher muss dieser Transport von SCFA bzw. deren Metaboliten hauptsächlich proteinvermittelt erfolgen.

Diese Beobachtung stimmt mit der von STEVENS und STETTLER (1967) geäußerten Vermutung überein, dass Azetat die basolaterale Membran nur mit Hilfe eines aktiven Transportmechanismus überwinden kann. In dem von ihnen entworfenen Drei-Kompartiment-Modell postulierten sie die Existenz einer weniger permeablen, limitierenden sowie einer durchlässigeren Membran auf der entgegengesetzten Seite des Pansenepithels (STEVENS und STETTLER 1967). Auf der Grundlage der vorliegenden Arbeit wäre also die apikale als die in Hinblick auf Diffusionsvorgänge durchlässigere und die basolaterale als die für die Permeation von HSCFA limitierende Membran anzusehen. Auch SEHESTED et al. (1999a) schlossen aus Ussing-Kammer-Studien auf die

Beteiligung einer aktiven Komponente und eine untergeordnete Bedeutung der lipophilen Diffusion beim SCFA-Transport über das Pansenepithel. Diese Annahme konnte in anderen Untersuchungen bekräftigt werden (MICHELBERGER 1994; GÄBEL und SEHESTED 1997). Die Charakteristika dieser aktiven Komponente sollen im Folgenden eruiert werden.

### **4.1.2 SCFA werden bevorzugt über die basolaterale Membran transportiert**

Anhand der ermittelten Effluxraten der SCFA zu beiden Seiten des Pansenepithels kann der direkte Vergleich zwischen ihrem Transport über die apikale und die basolaterale Membran gezogen werden. Obwohl die Ausschleusungsraten von Azetat über die basolaterale Membran deutlich geringer waren als die von Butyrat und L-Laktat, zeigte sich dennoch auch bei Azetat ein bevorzugter Transport zur serosalen Seite des Epithels, d.h. ins Blut. Die in der serosalen Pufferlösung akkumulierende Substratmenge betrug bei allen drei untersuchten Substraten in etwa das Doppelte der auf der mukosalen Seite ausgeschleusten (Publikation 1, Fig. 1; Abb. 1). Da die Inkubationspuffer auf beiden Seiten des Epithels identisch waren, lässt sich daraus der Schluss ziehen, dass mehr und/oder effektivere Transportmechanismen für SCFA in der basolateralen als in der apikalen Membran vorhanden sind.

Dies bekräftigen Uptakestudien von STEVENS und STETTLER (1967), bei denen, ähnlich dem in Abb. 1 dargestellten Verlauf, eine rasche Absorption von Azetat in den ersten 30 Minuten und eine sich anschließende konstante Aufnahme beobachtet werden konnte. Von besonderem Interesse ist, dass auch STEVENS und STETTLER (1967) ein Überwiegen der Absorption von Azetat aus der serosalen Pufferlösung gegenüber der Absorption aus der mukosalen Lösung feststellten. Somit scheint die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Asymmetrie des Azetattransportes über die beiden Membranen des Pansenepithels sowohl für die Ein- als auch die Ausschleusung der SCFA zu gelten. Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Ausschleusungsraten zeigen, dass beinahe doppelt so viel Azetat (stellvertretend für nicht metabolisierte SCFA) über die basolaterale Membran transportiert wird wie über die apikale.

Aber auch im Fall von Butyrat wurde eine polarisierte Exkretion dieser SCFA bzw. ihrer Metaboliten schon von SEHESTED et al. postuliert (1999b). Diese beobachteten, dass der Transport von Butyrat von mukosal nach serosal einer Michaelis-Menten-Kinetik folgte, während der Transport in der Gegenrichtung linear verlief. Aus diesen Befunden leiteten sie die Existenz einer proteinvermittelten Komponente ab (SEHESTED et al. 1999b). Vor dem Hintergrund des intraepithelialen Metabolismus von Butyrat stellten sie die Theorie

auf, dass die Asymmetrie des Butyrattransportes in beide Richtungen auf einer polarisierten Exkretion der Metaboliten durch proteinvermittelte Mechanismen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten auf beiden Seiten beruhen könnte. *In vivo* war bei Untersuchungen am vorübergehend isolierten und gewaschenen Retikulumen zu beobachten, dass deutlich mehr n-Butyrat als das kaum metabolisierbare iso-Butyrat aus dem Pansen resorbiert wird (RECHKEMMER et al. 1995; GÄBEL und SEHESTED 1997). Dies unterstützt ebenfalls die Auffassung, dass es sich bei den bevorzugt über die basolaterale Membran ausgeschleusten <sup>14</sup>C-markierten Molekülen hauptsächlich um Metaboliten von Butyrat handelt (Abb. 1).

Die über die apikale Membran transportierte Menge von Butyrat entsprach quantitativ weitgehend der von Azetat (Abb. 1). Dies lässt vermuten, dass diese Seite des Epithels präferentiell die nicht metabolisierten originalen SCFA, wenn auch mit geringerer Effizienz als basolateral, permeieren lässt. In der basolateralen Membran zusätzlich vorhandene Mechanismen für die Permeation der Metaboliten können eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen dem Transport von Azetat und Butyrat bzw. L-Laktat über die basolaterale Membran sein. Unabhängig davon bleibt aber allen untersuchten Substraten gemein, dass ihr Transport über die basolaterale Membran bevorzugt erfolgt. Nachdem eine maßgebliche Bedeutung der lipophilen Diffusion ins Blut bereits ausgeschlossen werden konnte, muss dies in effizienteren Transportmechanismen für SCFA bzw. deren Metaboliten begründet sein. Diese sollen im Anschluss näher charakterisiert werden.

### **4.1.3 SCFA(-Metaboliten) werden bikarbonatabhängig über die basolaterale Membran transportiert**

Nachdem alles darauf hindeutete, dass in der basolateralen Membran mehr bzw. potentere Transportproteine für SCFA(-Metaboliten) vorhanden sind als auf der apikalen Seite, stellte sich die Frage nach deren Funktionsweise. Analog zur apikalen Membran wäre auch in der basolateralen Membran ein bikarbonatabhängiger Austauschmechanismus denkbar. Auf diese Weise wäre ein beständiger Antrieb des SCFA-Transports durch die im Blut konstant hohe  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration gegeben und Nachschub von  $\text{HCO}_3^-$  aus dem Blut für die Sekretion auf der apikalen Seite gewährleistet. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Ausschleusung der SCFA aus dem Epithel sowohl unter bikarbonatfreien als auch -haltigen Bedingungen vergleichend untersucht. Es konnte eine Steigerung der Ausschleusung von Azetat und Butyrat(-Metaboliten) zu beiden Seiten des Epithels auf das Doppelte induziert werden, wenn Bikarbonat in der

umgebenden Pufferlösung zur Verfügung stand, verglichen mit bikarbonatfreien Inkubationsbedingungen (Publikation 1, Fig. 2).

Eine Steigerung der Ausschleusung über die apikale Seite des Epithels war zu erwarten gewesen, da hier die Existenz eines SCFA/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauschproteins bereits nachgewiesen wurde (KRAMER et al. 1996; ASCHENBACH et al. 2009). Schon STEVENS und STETTLER (1967) beobachteten eine erhöhte Azetataufnahme aus der mukosalen Pufferlösung, wenn Bikarbonat im Puffer enthalten war. Umgekehrt konnte auch eine Abhängigkeit der Sekretion von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> auf der mukosalen Seite von der mukosalen Verfügbarkeit von SCFA gezeigt werden (GÄBEL et al. 1991a).

In der vorliegenden Arbeit stieg jedoch auch die schon zuvor beobachtete bevorzugte Ausschleusung zur serosalen Seite an, wenn HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> verfügbar war. Die bikarbonatvermittelte Steigerung des Transportes war auf der basolateralen Seite sogar noch größer als auf der apikalen Seite.

Es ist also davon auszugehen, dass auf beiden Seiten des Epithels ein bikarbonatunabhängiger und ein bikarbonatabhängiger Anteil des Transportes von Azetat und Butyrat aus dem Epithel ins Blut existiert. Dabei sind beide Anteile auf der basolateralen Seite größer als auf der apikalen (Publikation 1, Fig. 2).

Die Abhängigkeit des Transportes von Azetat über die basolaterale Membran des Pansenepithels von Bikarbonat wurde in transepithelialen Fluxstudien verifiziert. Dazu wurden auf der serosalen Seite verschiedene Bikarbonatkonzentrationen vorgegeben, die entweder einen hohen Gradienten von serosal (87 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) nach mukosal (20 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), keinen Gradienten (20 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> beidseits) oder einen Gradienten von mukosal (20 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) nach serosal (5 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) bewirkten. Dabei konnte eine Steigerung der Fluxrate analog zur serosal verfügbaren Menge an HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> verzeichnet werden, was die Existenz eines bikarbonatabhängigen Transportmechanismus in der basolateralen Membran des Pansenepithels weiter bestätigte (Publikation 1, Fig. 3).

Auch mit Butyrat wurden entsprechende Untersuchungen durchgeführt, die eine Korrelation des Butyrattransportes mit der Bikarbonatkonzentration auf der serosalen Seite zeigen konnten (Publikation 1, Fig. 3). Wie bereits erläutert, können hier geringfügige Effekte von pH und pCO<sub>2</sub> nicht vollständig ausgeschlossen werden, dennoch ist ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß des Butyrattransports und der serosalen HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Konzentration klar ersichtlich (vgl. Publikation 1, results: *The influence of different HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> gradients on mucosal to serosal flux of acetate and butyrate*). Ein Grund dafür, dass die Bikarbonatabhängigkeit im Fall von Butyrat(-Metaboliten) nicht ganz so klar hervortritt wie bei Azetat, liegt höchstwahrscheinlich in dem unbekanntem Grad der Metabolisierung des

eingesetzten Butyrats. So könnte der bikarbonatabhängige Transport hauptsächlich die Metabolite betreffen, aber ein kleiner, nicht metabolisierter Anteil ursprünglichen Butyrats könnte die basolaterale Membran durch lipophile Diffusion überqueren und so eine gewisse „Unschärfe“ in die Erfassung des bikarbonatabhängigen Fluxes bringen.

Eine Abhängigkeit der Butyratresorption über das Pansenepithel des Rindes von der Bikarbonatkonzentration in der umgebenden Pufferlösung wurde bereits durch SEHESTED et al. (1999b) beobachtet. Fehlte  $\text{HCO}_3^-$  in der Pufferlösung, kam es statt einer Resorption zu einer Nettosekretion von Butyrat, was als nicht metabolisierte Fraktion (die die apikale Membran mittels lipophiler Diffusion überqueren kann) interpretiert wurde, während der polarisierte Transport der Metaboliten über die basolaterale Membran als  $\text{HCO}_3^-$ -abhängig postuliert wurde (SEHESTED et al. 1999b).

Hinweise für die Existenz eines bikarbonatabhängigen Transportmechanismus für SCFA zeichneten sich auch zuvor schon in Untersuchungen von STEVENS und STETTLER (1966a) ab, wobei hier der fördernde Einfluss von  $\text{HCO}_3^-$  auf den Azetattransport nicht eindeutig der apikalen oder basolateralen Membran zugeordnet werden konnte. In Anbetracht der aktuellen Befunde, dass es nämlich auf beiden Seiten des Epithels bikarbonatabhängige SCFA-Transportmechanismen gibt, ist es nicht verwunderlich, dass die Zuordnung der Effekte von  $\text{HCO}_3^-$  zu einer Seite nicht leicht fiel. Auch bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ist es durchaus möglich, dass nach einer gewissen Zeitspanne genügend  $\text{HCO}_3^-$  durch den Austausch mit SCFA in das Epithel gelangen konnte, um auch den apikalen Austausch anzuregen, wie es für die tatsächliche Funktionsweise *in vivo* sinnvoll wäre. Allerdings machte sich dies nicht in den gemessenen Fluxraten bemerkbar, was wohl auch an der deutlich geringeren Transportrate der SCFA über die apikale Membran liegt. Es kann also mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass ein (Groß-)Teil der SCFA(-Metaboliten) bikarbonatabhängig über die basolaterale Membran des Pansenepithels transportiert wird.

#### **4.1.4 SCFA(-Metaboliten) werden durch einen Anionenaustauschmechanismus ins Blut ausgeschleust**

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte die Bikarbonatabhängigkeit des Azetattransportes über die basolaterale Membran belegt werden. Ein Austauschmechanismus, wie er schon apikal nachgewiesen worden war, böte Elektroneutralität und zugleich stetige Bereitstellung von  $\text{HCO}_3^-$  für die apikale Sekretion. Im Folgenden sollte die Identität des/der dafür verantwortlichen Transportproteins/e geklärt

werden. Um einen basolateralen Anionenaustausch nachzuweisen und näher zu charakterisieren, wurden verschiedene Hemmstoffe bzw. alternative Substrate getestet. Wie viele andere Anionenaustauschmechanismen auch, konnte im Pansenepithel der apikal lokalisierte SCFA<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher mit NO<sub>3</sub><sup>-</sup> kompetitiv gehemmt werden (SEIFTER und ARONSON 1984; WÜRMLI et al. 1987; KRAMER et al. 1996; BILK 2007). Daher wurde auch in der vorliegenden Arbeit bei der Charakterisierung des basolateralen Austauschmechanismus angenommen, dass dieser NO<sub>3</sub><sup>-</sup> akzeptiert bzw. durch dieses hemmbar ist. Da die Bindungsstellen von Anionenaustauschern im Allgemeinen als relativ unselektiv gelten, wird davon ausgegangen, dass man ihre Transportrichtung auch umdrehen kann, d.h. dass ihre Substrate in beide Richtungen gegeneinander ausgetauscht werden können (WRIGHT und DIAMOND 1977; GEORGI 2010). Dies und die potentielle Akzeptanz von NO<sub>3</sub><sup>-</sup> wurde in der vorliegenden Arbeit ausgenutzt, um die SCFA auf der serosalen anstatt der mukosalen Seite mit NO<sub>3</sub><sup>-</sup> konkurrieren zu lassen und so einen basolateral lokalisierten Austauschmechanismus nachweisen zu können. Es konnte gezeigt werden, dass eine serosale Zugabe von NO<sub>3</sub><sup>-</sup> den transepithelialen Flux von serosal nach mukosal von Azetat (um 68% des vorherigen Fluxes) und Butyrat (um 57%) reduziert (Publikation 1, Fig. 5), d.h. es ist nicht nur in der apikalen, sondern auch in der basolateralen Membran ein nitratsensitiver Transportmechanismus für SCFA(-Metaboliten) lokalisiert. Der kleinere Effekt von NO<sub>3</sub><sup>-</sup> auf den Transport von Butyrat(-Metaboliten) kann auch hier wieder dem teilweisen Metabolismus und der präferentiellen Ausschleusung von Metaboliten auf der basolateralen Seite geschuldet sein, d.h. nachdem Butyrat auf der serosalen Seite aufgenommen wurde, rezyklieren dessen Metabolite auf der gleichen Seite und tauchen somit nicht auf der apikalen Seite auf, sodass ihr basolateraler Transport bei den Fluxmessungen nicht detektierbar ist. Es könnte auch sein, dass der für das nicht metabolisierbare Butyrat verantwortliche Transportmechanismus im Gegensatz zu den Mechanismen für Azetat und/oder die SCFA-Metaboliten nicht nitratsensitiv ist.

Eine nitratsensitive Komponente des SCFA-Transportes über die basolaterale Membran des Pansenepithels konnte somit in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden. Ein Großteil der intrazellulär akkumulierenden SCFA wird also auf einem nitratsensitiven Weg ausgeschleust. Aufgrund der geringen Spezifität von NO<sub>3</sub><sup>-</sup> kann daraus jedoch noch nicht konkreter auf den zugrunde liegende Mechanismus rückgeschlossen werden.

In vorangegangenen Untersuchungen konnte eine mukosale Zugabe von NO<sub>3</sub><sup>-</sup> neben der Verringerung des J<sub>ms</sub> von SCFA (KRAMER et al. 1996) auch eine Hemmung der Cl<sup>-</sup>-Absorption induzieren (WÜRMLI et al. 1987). In der Gegenrichtung (J<sub>sm</sub>) war diese

Hemmung des Cl<sup>-</sup>-Fluxes hingegen nicht möglich, sodass der Nettoflux von Cl<sup>-</sup> durch NO<sub>3</sub><sup>-</sup> verringert wurde (WÜRMLI et al. 1987). Dies könnte als Hinweis aufgefasst werden, dass der in der basolateralen Membran befindliche Anionenaustauscher eine größere Selektivität aufweist als der apikal lokalisierte. Allerdings ist es auch möglich, dass in der apikalen Membran neben dem für den SCFA-Transport zuständigen ein zusätzlicher Austauschmechanismus für Cl<sup>-</sup> existiert. Dies würde wiederum einen weiteren Sekretionsweg für das ungleich effektiver über die basolaterale Membran eingeschleuste HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> bieten.

Um die Identität des basolateral lokalisierten Austauscherproteins zu ergründen, wurden in der vorliegenden Arbeit Studien mit weiteren Hemmstoffen für im Pansenepithel nachgewiesene Transportproteine, die auch als Anionenaustauscher in Frage kommen, durchgeführt. Diese Untersuchungen werden im Folgenden weiter diskutiert.

### **4.1.5 Azetat wird durch einen pHMB- und CHC-sensitiven Mechanismus transportiert**

BILK (2007) konnte die Existenz der Anionenaustauschproteine AE 2, DRA und PAT 1 im Pansenepithel molekularbiologisch (auf mRNA-Ebene) nachweisen, die genaue Lokalisation dieser Proteine im Epithel ist jedoch noch ungeklärt. Des Weiteren ist bekannt, dass MCT 4 in der apikalen und MCT 1 in der basolateralen Membran des Pansenepithels lokalisiert sind (MÜLLER et al. 2002; KIRAT et al. 2006a; KIRAT et al. 2007). Auch MCT 2, 7 und 8 wurden in den basalen Zellschichten des Pansenepithels nachgewiesen (KIRAT et al. 2013). All diese Proteine haben gemeinsam, dass sie theoretisch einen bikarbonatgekoppelten Transport von SCFA<sup>-</sup> vermitteln könnten (s. 2.3.3 *Proteinvermittelte SCFA-Permeation*). Durch den Einsatz verschiedener Hemmstoffe für diese Proteine sollte deren Beteiligung am Transport von Azetat und Butyrat(-Metaboliten) über das Pansenepithel untersucht werden. Wie in Publikation 1, Fig. 4 zu sehen, konnte der transepitheliale Flux von Azetat von mukosal nach serosal durch serosale Zugabe von pHMB oder CHC signifikant verringert werden. Die Hemmstoffe Phloretin und DIDS hingegen zeigten keine Wirkung auf die Transportrate von Azetat.

Diese Unempfindlichkeit gegen DIDS schließt eine Beteiligung der meisten nachgewiesenen Transportproteine von vornherein aus. So werden AE 2, DRA und PAT 1 als DIDS-sensitiv beschrieben, nicht jedoch als pHMB- oder CHC-sensitiv (SILBERG et al. 1995; JACOB et al. 2002; PETROVIC et al. 2002; WANG et al. 2002; IKUMA et al. 2003; BERGER et al. 2010). Allerdings scheint die hemmende Wirkung von DIDS auf Anionenaustauscher stark von den spezifischen Versuchsbedingungen abzuhängen. So

beobachteten KRAMER et al. (1996) eine hemmende Wirkung von DIDS auf den apikal im Pansenepithel lokalisierten  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher nur bei sehr geringen  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen. MARTENS et al. (1991) gelang dies bei keiner Variation der  $\text{Cl}^-$ -Konzentration. Die fehlende Hemmung des Azetatflusses durch DIDS in der vorliegenden Arbeit sollte also mit Vorsicht interpretiert werden. Sie deutet zwar darauf hin, dass AE 2, DRA und PAT 1 keine Rolle beim Transport von originären SCFA über die basolaterale Membran spielen, sollte jedoch nicht als endgültiger Beweis betrachtet werden.

Im Gegensatz zu den übrigen Austauschproteinen werden die Vertreter der MCT-Familie als CHC-sensitiv und insbesondere MCT 1 und 4 auch als pHMB-sensitiv beschrieben (MÜLLER et al. 2002; MEREDITH und CHRISTIAN 2008). Allerdings wurde für die MCT-Familie mitunter auch eine Empfindlichkeit gegenüber DIDS und Phloretin beobachtet (POOLE und HALESTRAP 1993; KIRAT et al. 2006b; MEREDITH und CHRISTIAN 2008), die in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte. Es wäre allerdings möglich, dass die Hemmstoffcharakteristika der MCT im Pansenepithel nicht dem kompletten Spektrum dessen entsprechen, was in anderen Geweben beobachtet wurde oder DIDS und Phloretin unter den in der vorliegenden Arbeit gewählten Versuchsbedingungen, wie bereits zuvor erläutert, keine Wirkung zeigten. Obwohl neben dem MCT 1 auch andere Isoformen in den basal orientierten Zellschichten des Pansenepithels nachgewiesen wurden (KIRAT et al. 2013), spricht die Inhibition der Azetatfluxe durch pHMB doch für eine Beteiligung dieser Isoform, da nur MCT 1 und der apikal lokalisierte MCT 4 (KIRAT et al. 2007) das Chaperon CD 147, das durch pHMB blockiert wird, für ihre Funktion benötigen. Die ermittelten Hemmstoffcharakteristika deuten also auf eine Beteiligung des MCT 1 am Transport von Azetat über die basolaterale Membran hin.

Der ruminale MCT 1 wurde zwar bislang hauptsächlich als  $\text{SCFA}^-/\text{H}^+$ -Symporter beschrieben (MÜLLER et al. 2002; KIRAT et al. 2006b), allerdings postulierten schon DUDEJA und RAMASWAMY (2006) eine Funktion des MCT 1 als  $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher im Gastrointestinaltrakt. In CaCo2-Zellen und anhand von Membran-Vesikel-Untersuchungen des humanen Colonepithels konnte diese Stöchiometrie unteretzt werden (HARIG et al. 1996; HADJIAGAPIOU et al. 2000; TYAGI et al. 2002). Auch die Untersuchungen von KIRAT et al. (2006b), die in Ussing-Kammer-Studien einen Transport von Azetat via MCT 1 im Pansenepithel zeigen konnten, schließen dies nicht aus, da in diesen Untersuchungen dem Epithel  $\text{HCO}_3^-$  aus der Pufferlösung sowie der intraepithelialen Produktion durch die Carboanhydrase zur Verfügung stand.

Um zu zeigen, dass die pHMB-sensitive Komponente des Azetattransportes zugleich auch abhängig von der Bikarbonatkonzentration ist, wurde dieser Hemmstoff bei verschiedenen

serosalen Bikarbonatkonzentrationen eingesetzt. So wurde der Effekt einer serosalen Zugabe von pHMB auf die transepitheliale Fluxrate von Azetat von mukosal nach serosal mit 87, 20 und 5 mM  $\text{HCO}_3^-$  auf der serosalen Seite gegenüber 20 mM  $\text{HCO}_3^-$  auf der mukosalen Seite gemessen. Es war zu beobachten, dass der pHMB-sensitive Anteil entsprechend des serosal verfügbaren Bikarbonats abnahm (Abb. 2, nicht veröffentlicht). Dies lässt darauf schließen, dass der so gehemmte Mechanismus tatsächlich ein SCFA/ $\text{HCO}_3^-$ -Austauschprotein ist.

Es ist natürlich auch möglich, dass neben dem MCT 1 ein anderer, bislang nicht identifizierter Austauschmechanismus mit ähnlichen Hemmstoffcharakteristika für die Vermittlung dieses Transports verantwortlich ist. Zusätzlich scheint es jeweils (mindestens) einen weiteren bikarbonatabhängigen und -unabhängigen Mechanismus zu geben, da die pHMB- und CHC-sensitive Komponente nicht den gesamten nitratsensitiven Anteil des Azetattransports über die basolaterale Membran des Pansenepithels abdeckt, bzw. auch nach Blockade mit  $\text{NO}_3^-$  noch ein geringer Transport von Azetat nachweisbar ist. So zeigten die Ergebnisse des zweiten Teils dieser Arbeit Hinweise auf eine Beteiligung von PAT 1 am Transport von SCFA über das Pansenepithel, wobei dessen Lokalisation noch unbekannt ist, sodass dieses Transportprotein genauso gut den Transfer der SCFA über die apikale Membran vermitteln könnte.

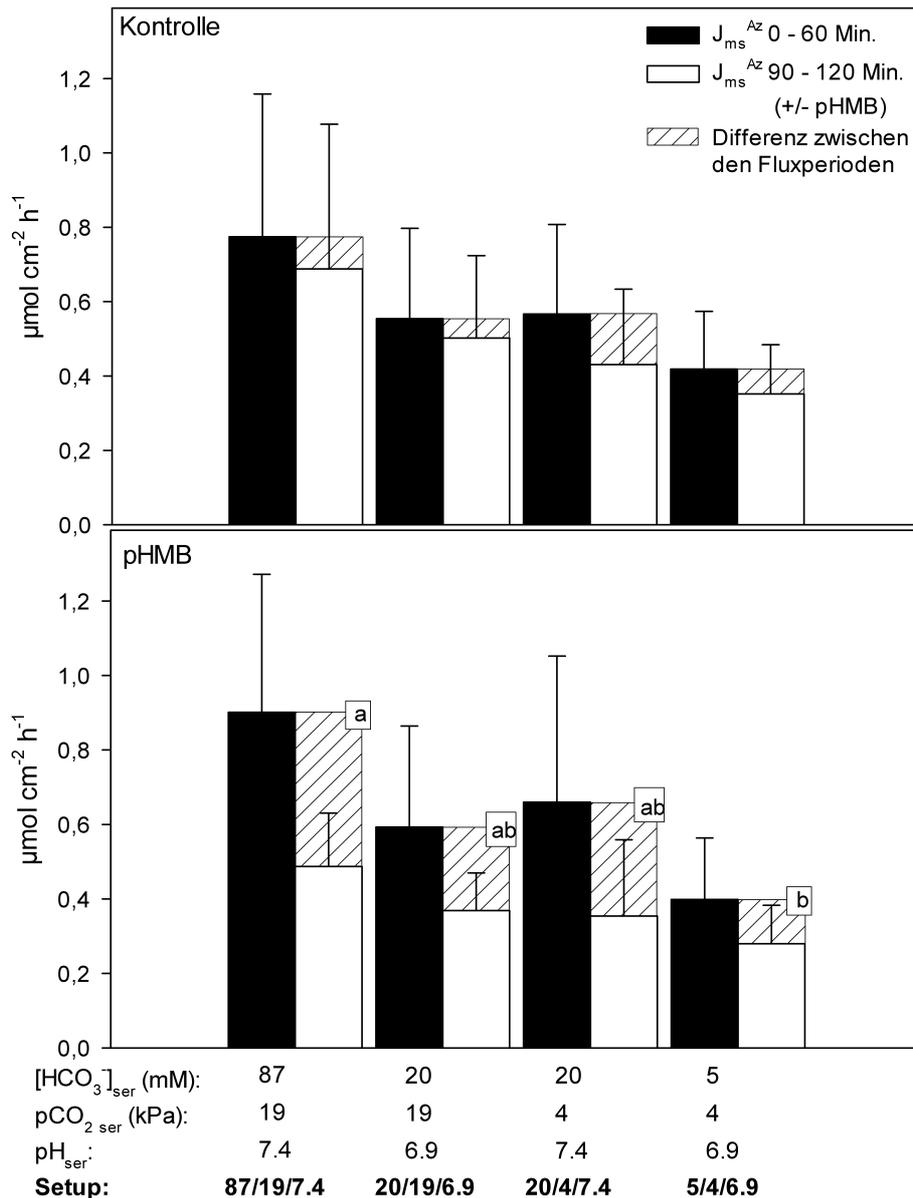


Abb. 2

Hemmstoffeffekte auf den bikarbonatabhängigen Transport von 10 mM Azetat von mukosal nach serosal  
 Die serosale Konzentration von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, pH-Wert und pCO<sub>2</sub> wurden analog zu Publikation 1, Fig. 3 variiert (s. Abszisse). Auf der mukosalen Seite herrschten stets dieselben Bedingungen wie in Setup 20/4/7.4. Nach einer Equilibrierungsphase von 30 Min. wurden die Fluxraten von <sup>14</sup>C-Azetat von mukosal nach serosal (J<sub>ms</sub><sup>Az</sup>) in 30-minütigen Intervallen gemessen. Nach einer Stunde Fluxmessung (0 - 60 Min., schwarze Balken) wurde der Hemmstoff pHMB (untere Hälfte der Abb.) bzw. dessen Solvens Ethanol (obere Hälfte der Abb.) zur serosalen Pufferlösung zugegeben und erneut J<sub>ms</sub><sup>Az</sup> gemessen (90 - 120 Min., weiße Balken). Während sich die Fluxraten in den Kontrollgruppen nur geringfügig zeitabhängig verringerten (schraffierte Flächen), wurden sie durch pHMB-Zugabe signifikant erniedrigt. Dabei war eine signifikante Verringerung dieser Hemmstoffwirkung (schraffierte Flächen) bei verminderter serosaler Verfügbarkeit von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> zu beobachten. Die statistischen Unterschiede zwischen den erzielten Hemmstoffeffekten (schraffierte Fläche) ist durch unterschiedliche Buchstaben (a, b) gekennzeichnet (p < 0.05; One-Way Repeated Measurements ANOVA mit nachfolgendem Holm-Sidak-Test; SigmaPlot 11.0, Systat Software, USA). Mittelwert ± SD; N = 7; n = 14.

Der Flux von Butyrat war durch keinen der verwendeten Hemmstoffe beeinträchtigt, was wiederum als Zeichen für unterschiedliche Transportmechanismen und -substrate im Fall von Azetat und Butyrat bzw. dessen Metaboliten gewertet werden kann. Somit können für den Transport von Butyrat(-Metaboliten) über die basolaterale Membran wie auch für Azetat AE 2, PAT 1, DRA sowie Anionenkanäle scheinbar ausgeschlossen werden. Anders als im Fall von Azetat gibt es keine zwingenden Hinweise auf eine Beteiligung eines MCT.

Dagegen konnten MÜLLER et al. (2002) den Laktat- bzw.  $\beta$ -Hydroxybutyrat-getriebenen Protonenexport aus kultivierten Pansenepithelzellen durch pHMB stark hemmen. BENESCH et al. (2012) konnten dies erneut nachweisen. Diese Befunde würden vermuten lassen, dass eine starke pHMB-Wirkung bei der Messung des Fluxes von Butyrat(-Metaboliten) von mukosal nach serosal zu erwarten wäre. In der vorliegenden Arbeit war das nicht der Fall.

Möglicherweise sind im intakten Gewebe für die verschiedenen Substrate aber mehrere redundante Transportmechanismen vorhanden, sodass bei Hemmung des einen der andere Ersatz leistet und jeder Anteil den jeweils anderen verschleiern kann, wenn es um eindeutige Hemmstoffcharakteristika geht. Zudem ist die Wirkung der verwendeten Hemmstoffe, insbesondere DIDS, wie oben erläutert, oft unzuverlässig. Anhand der fehlenden Hemmstoffeffekte auf den Butyrat-Flux kann also eine Beteiligung der o.g. Transportproteine nicht vollständig ausgeschlossen werden. Einen indirekten Hinweis hierauf bieten die Untersuchungen auf Genexpressionsebene. So zeigte sich im zweiten Teil dieser Arbeit eine Erhöhung der mRNA-Expression von MCT 1 und PAT 1 durch Exposition des Epithels gegenüber Butyrat(-Metaboliten). Das macht eine Rolle dieser Transportproteine in der Ausschleusung von Butyrat und/oder dessen Metaboliten wahrscheinlich. Ein endgültiger Nachweis steht dennoch aus.

## **4.2 Der Transport von SCFA über das Pansenepithel unterliegt regulativen Einflüssen**

Wie unter 2.2 *Metabolismus von SCFA im Pansenepithel* ausgeführt, ist der Export von SCFA(-Metaboliten) aus den Epithelzellen ins Blut von großer Bedeutung sowohl für die Homöostase der Epithelzellen als auch die Energieversorgung des Gesamtorganismus. Werden also intraruminal mehr SCFA(-Metaboliten) gebildet und/oder durch Milch- oder Mastleistung mehr Energie benötigt, wäre eine rasche Anpassung dieser Transportkapazitäten sinnvoll. Wie im vorhergehenden Abschnitt dargelegt, sind vermutlich Vertreter der MCT-Familie entscheidend für die Permeation der SCFA bzw. ihrer Metaboliten. Die nachgewiesenen Vertreter der MCT-Familie scheinen ein hohes Adaptationspotential zu besitzen, das bereits in verschiedenen nicht-ruminalen Geweben beobachtet wurde (BORTHAKUR et al. 2008; PEREZ DE HEREDIA et al. 2010; QUEIROS et al. 2012; BOIDOT et al. 2012). Ob eine solche Anpassung auch im Pansenepithel möglich ist, sollte in einem zweiten Abschnitt dieser Arbeit untersucht werden. Dabei wurde die Protein- und mRNA-Expression der MCT, aber auch die mRNA-Expression verschiedener anderer Kandidaten für den Transport der SCFA(-Metaboliten) im isolierten Pansenepithel nach Inkubation mit Butyrat oder unter hypoxischen Bedingungen untersucht. Diese Untersuchungen lieferten zudem indirekte Hinweise, welche der untersuchten Transportproteine eine entscheidende Rolle beim Transfer der SCFA(-Metaboliten) spielen könnten.

### **4.2.1 Einfluss von Butyrat(-Metaboliten) auf die Expression von potentiellen SCFA-Transportern**

Um eine verstärkte Anflutung von SCFA(-Metaboliten) zu simulieren, wurde Epithel aus dem ventralen Pansensack in Ussing-Kammern sechs Stunden lang mit 50 mM Butyrat inkubiert. In einem zweiten Ansatz wurden durch N<sub>2</sub>-Begasung hypoxische Bedingungen induziert, unter denen eine Anpassung der MCT-Expression bereits mehrfach beschrieben wurde (ORD et al. 2005; PEREZ DE HEREDIA et al. 2010) (vgl. 2.4.2 *Beeinflussung der Genexpression durch Hypoxie*).

Im direkten Vergleich dieser Inkubationsbedingungen sollten Effekte von SCFA(-Metaboliten) einerseits und von hypoxischen Bedingungen andererseits differenziert werden, um weiterhin Rückschlüsse auf intrazelluläre Mechanismen ziehen zu können, die an der Beeinflussung der Genexpression von SCFA-Transportproteinen beteiligt sind. Hinsichtlich des Vergleichs der Inkubationsbedingungen stellt sich natürlich die Frage, ob die Hypoxie

selbst oder aber erst eine dadurch induzierte Akkumulation von Metaboliten (s. 2.4.2 *Beeinflussung der Genexpression durch Hypoxie*) die Anpassung der Genexpression triggert. Die Frage kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht definitiv beantwortet werden, das Pansenepithel scheint aber auf beide Stimuli mit ähnlichen Reaktionen auf Genebene zu antworten, wie im Folgenden ausgeführt wird.

Es wurde die mRNA-Expression von AE 2, DRA, MCT 1 und 4 sowie PAT 1 untersucht. Dabei war der Inkubation mit Butyrat und unter Hypoxie gemein, dass sowohl MCT 1 als auch MCT 4 im Vergleich zur Kontrolle verstärkt exprimiert wurden. Unter Hypoxie waren dies die einzigen Transporterproteine, die beeinflusst wurden, während nach Butyratinkubation außerdem auch noch PAT 1 herauf- sowie DRA herunterreguliert wurde. Die simultane Erhöhung der Expression von MCT 1 und 4 spricht für eine zentrale Rolle dieser Transportproteine in der Adaptation an eine verstärkte Anflutung von SCFA- (Metaboliten). Ihre gesteigerte Expression durch eine längerfristige (24 h) Inkubation von Pansenepithel mit 50 mM Butyrat konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden. Western-Blot-Analysen zeigten deutlich eine gegenüber Kontrollepithelien, die ohne Butyrat inkubiert worden waren, erhöhte Expression beider MCT-Proteine (Publikation 2, Fig. 3).

Inwiefern die Expressionssteigerungen bei Butyratinkubation durch dessen Metaboliten oder durch das nicht metabolisierte Butyrat hervorgerufen wurde, lässt sich anhand der bislang durchgeführten Untersuchungen nicht ableiten. Somit bleibt weiter unklar, ob MCT 1 und 4 nur eine Rolle beim Transport der originalen SCFA oder auch für den Transport der Metaboliten spielen. Auf funktioneller Ebene konnten im ersten Teil dieser Arbeit allerdings starke Hinweise auf eine primäre Beteiligung des MCT 1 am Transport der originalen SCFA beobachtet werden, da der Transport des kaum metabolisierten Azetat durch spezifische Hemmstoffe des MCT 1 blockierbar war (s. 4.1.5 *Azetat wird durch einen pHMB- und CHC-sensitiven Mechanismus transportiert*). Auf diesen Ergebnissen basierend ist eine grundsätzliche Funktion des MCT 1 als  $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher denkbar, der bei einer Akkumulation von Metaboliten den Anforderungen entsprechend dann neben den SCFA auch diese akzeptiert.

Auch BORTHAKUR et al. (2012) konnten an Colonepithelzellen eine Heraufregulierung der MCT 1-Expression und -Funktion durch Butyratinkubation nachweisen. Eine ähnliche Heraufregulierung von MCT 1 und/oder 4 wurde bereits häufig in schnell wachsenden Tumoren beobachtet, in denen aufgrund der langsamer einwachsenden Gefäße ausgeprägte Hypoxie herrscht (ORD et al. 2005; PEREZ DE HEREDIA et al. 2010; QUEIROS et al. 2012). Dies wiederum führt zu verstärkter anaerober Glykolyse in den

betroffenen Zellen, was eine Akkumulation von Metaboliten, insbesondere Laktat, zur Folge hat. Auch in nicht entarteten Geweben wird bei Hypoxie vermehrt anaerobe Glykolyse betrieben und in der Folge die Expression der MCT gesteigert (MOREIRA et al. 2009; MARTINOV et al. 2009), um auf diesem Weg die anfallenden Metaboliten effektiv aus der Zelle ausschleusen zu können (BOIDOT et al. 2012).

Wie bereits ausgeführt (*2.2 Metabolismus der SCFA im Pansenepithel*), entstehen auch im Pansenepithel große Mengen an SCFA-Metaboliten, deren Ausschleusung ebenfalls von großer Bedeutung ist. Da unter Hypoxie und mangelndem SCFA-Angebot auch die Zellen des Pansenepithels auf anaerobe Glykolyse zurückgreifen, kann davon ausgegangen werden, dass es unter den hypoxischen Versuchsbedingungen zu einer Steigerung der intraepithelialen Konzentration der Metaboliten der anaeroben Glykolyse kommt. Somit kann ein Teil der Effekte der hypoxischen Inkubation vielleicht auch als Reaktion auf eine vermehrte Akkumulation von Metaboliten, wie sie auch beim intraepithelialen Abbau der SCFA entstehen, angesehen werden. Aufgrund seiner Lokalisation in der basolateralen Membran wäre MCT 1 für die Ausschleusung dieser Metaboliten der ideale Transportmechanismus (MÜLLER et al. 2002). Auch der Befund seiner verstärkten Expression unter Butyrat-Einfluss unterstützt diese These. Funktionell konnte in dieser Arbeit jedoch keine zentrale Rolle des MCT 1 im Transport von Butyrat(-Metaboliten) gezeigt werden. Dies steht im Widerspruch zu vorherigen Untersuchungen, die eine Beteiligung von MCT 1 am Transport von SCFA-Metaboliten zeigen konnten (MÜLLER et al. 2002; BENESCH et al. 2012). Dabei muss jedoch beachtet werden, dass diese Untersuchungen an kultivierten Pansenepithelzellen vorgenommen wurden, sodass sich die unterschiedlichen Befunde durch unterschiedliche bzw. aktivere Transportmechanismen für SCFA im intakten Gewebe erklären lassen könnten. So könnte ein Grund für die fehlende Wirkung von MCT-Hemmstoffen auf den Butyrattransport sein, dass der MCT 1 im Pansenepithel grundsätzlich originale SCFA, und somit in der vorliegenden Arbeit Azetat, bevorzugt und erst bei Transportengpässen, wie etwa einer verstärkten Anflutung von Metaboliten, auch diese akzeptiert bzw. sogar verstärkt exprimiert wird um die Transportkapazitäten zu erhöhen. Möglicherweise ist dieser Zustand unter Zellkulturbedingungen grundsätzlich vorhanden, sodass die Affinität des MCT 1 zu SCFA-Metaboliten deutlicher zutage tritt als es unter den in dieser Arbeit gewählten Versuchsbedingungen der Fall war.

Im Gegensatz zu Isoform 1 wurde der ebenfalls heraufregulierte MCT 4 bislang apikal detektiert (KIRAT et al. 2007). Allerdings gibt es neben dieser Membranlokalisation auch Hinweise auf eine Rolle des MCT 4 beim intrazellulären Shuttling der SCFA-Metaboliten

(KIRAT et al. 2007), was auch bei einer verstärkten Anflutung von Metaboliten Sinn und Zweck einer erhöhten mRNA-Expression zu erklären vermag.

Vor diesem Hintergrund kann auch die alleinige Expressionssteigerung von PAT 1 nach Butyratinkubation, nicht jedoch unter Hypoxie, die bereits auf funktioneller Ebene gezeigten Unterschiede im Transport von SCFA und ihren Metaboliten unterstreichen. Die spezifische Regulation durch Butyratinkubation deutet darauf hin, dass dieser Transporter in den Transfer von nicht metabolisierten SCFA, nicht aber den der Metaboliten involviert sein könnte. Im ersten, funktionellen Teil dieser Arbeit konnten allerdings keine unmittelbaren Rückschlüsse auf eine Beteiligung dieses Proteins am SCFA-Transport gezogen werden. Es ist aber noch sehr wenig zum ruminalen PAT 1 bekannt, sodass es nicht möglich ist, dessen Beteiligung nur anhand der fehlenden DIDS-Sensitivität des SCFA-Transports über die basolaterale Membran auszuschließen; zumal ein nitratsensitiver, nicht pHMB-hemmbarer Anteil beobachtet werden konnte, was durchaus zu den Charakteristika eines ruminalen PAT 1 passen könnte (Publikation 1, Fig. 4 und 5). Zudem besteht die Möglichkeit, dass auch dieses Transportprotein erst bei erhöhtem Substratangebot signifikant am Transport der SCFA beteiligt wird und/oder aber in der apikalen Membran lokalisiert ist.

Im Gegensatz zu der deutlichen Expressionssteigerung von MCT 1 und 4 lässt die unveränderte bzw. sogar verringerte mRNA-Expression von AE 2 und DRA nach Butyratexposition sowie Hypoxie auf eine eher geringe Rolle dieser Transportproteine im Transfer von SCFA(-Metaboliten) schließen. Natürlich ist es nicht vollständig auszuschließen, dass sie zwar nicht an erhöhtes Substratangebot angepasst werden, aber dennoch SCFA(-Metaboliten) akzeptieren. Doch auch in Zusammenhang mit den Ergebnissen der funktionellen Untersuchungen im ersten Teil der Arbeit erscheint eine Beteiligung von DRA und AE 2 eher unwahrscheinlich, da beide Transportproteine als DIDS-sensitiv beschrieben werden, dieser Hemmstoff allerdings keine Auswirkungen auf den SCFA(-Metaboliten)-Transport hatte (SILBERG et al. 1995; JACOB et al. 2002; IKUMA et al. 2003; BERGER et al. 2010) (s. *4.1.5 SCFA werden über einen CHC- und pHMB-sensitiven Mechanismus ausgeschleust*).

Abschließend ist also festzuhalten, dass MCT 1 und 4 eine zentrale Rolle in der Anpassung der epithelialen Transportkapazitäten an eine erhöhte Anflutung von SCFA(-Metaboliten) spielen. Auch PAT 1 scheint in den Transport von SCFA bzw. die Anpassung der Pansenepithelzellen an deren intrazelluläre Akkumulation involviert zu sein.

#### 4.2.2 Mechanismen für die Regulation der Expression durch Butyrat(-Metaboliten)

Nachdem die bisherigen Ergebnisse die These untersetzten, dass die Transportkapazitäten des Pansenepithels an das jeweilige Substratangebot angepasst werden können, war es nun auch von Interesse, durch welche Mechanismen diese Anpassung vermittelt ist.

Es wurde bereits mehrfach beobachtet, dass es bei einer Inkubation von Zellen unterschiedlichen Ursprungs mit Butyrat zu einer Aktivierung des NFκB-Signalwegs kommt (ADAM et al. 2003; BORTHAKUR et al. 2008). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression eines klassischen Zielgens von NFκB, der COX 2 (VAUPEL 2004), untersucht. Es konnte eine verstärkte mRNA-Expression von COX 2 sowohl nach Butyrat- als auch nach hypoxischer Inkubation im Vergleich zu der Inkubation unter Kontrollbedingungen nachgewiesen werden, was als Zeichen für eine erhöhte Aktivität von NFκB zu werten ist. Auch die Proteinexpression von NFκB p50 war parallel zu der von MCT 1 im Pansenepithel nach 24-stündiger Butyratinkubation im Vergleich zur Inkubation ohne SCFA erhöht (Publikation 2, Fig. 3).

Eine Aktivierung von NFκB durch Butyrat wurde bereits mehrfach in Colonepithelzellen beobachtet (INAN et al. 2000a) und dessen Wirkung als HDI zugeschrieben (HAMER et al. 2008). Ebenfalls im Colonepithel wurde eine butyratinduzierte Heraufregulierung der Expression von MCT 1 durch NFκB gezeigt, die allerdings nicht durch HDI-Hemmstoffe blockierbar war. Das deutet darauf hin, dass die NFκB-vermittelte Beeinflussung der Genexpression von MCT 1 unabhängig von der Azetylierung der Histone als ein additiver Effekt von Butyrat zu betrachten ist (BORTHAKUR et al. 2008).

Auch Hypoxie - oder die dadurch bedingte Akkumulation von Metaboliten - führte zu einer erhöhten Expression von MCT 1 und 4 in verschiedenen Tumorzellen. Durch *Silencing*, d.h. Verhinderung der Genexpression, von NFκB konnte dies jedoch unterdrückt werden (BOIDOT et al. 2012). HADIJAGAPIOU et al. (2005) konnten eine NFκB-Bindungsstelle in der Promotorregion des MCT 1 nachweisen. Diese Indizien sprechen eindeutig dafür, dass auch im Pansenepithel durch Butyrat(-Metaboliten) NFκB aktiviert und so Einfluss auf die Expression der MCT genommen wird.

Im Zusammenhang mit einer Aktivierung von NFκB wird oft auch die von HIF 1α gesehen. In der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte mRNA-Expression von HIF 1α nach Butyrat- sowie Hypoxie-Inkubation nachgewiesen werden. BALDWIN et al. (2012) postulierten, dass die Regulation der Genexpression nach Infusion von Butyrat in den Pansen von Kühen u.a. HIF 1α-vermittelt erfolgt. Auch unter Hypoxie wurden in

verschiedenen Geweben enge Zusammenhänge von HIF 1 und der Regulation der Genexpression, darunter auch MCT 1 und 4, beobachtet (VAUPEL 2004; PEREZ DE HEREDIA et al. 2010). RIUS et al. (2008) zeigten, dass unter hypoxischen Bedingungen die Expression von HIF 1 $\alpha$  durch NF $\kappa$ B erhöht wird. Ein Zusammenhang zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren kann in der vorliegenden Arbeit nicht mit Sicherheit bestätigt werden, die simultane Erhöhung ihrer mRNA-Expression unter beiden Versuchsbedingungen deutet jedoch stark darauf hin, dass auch im Pansenepithel die Aktivierung von HIF 1 durch NF $\kappa$ B erfolgt, was wiederum eine erhöhte Expression von MCT 1 und 4 zur Folge hat.

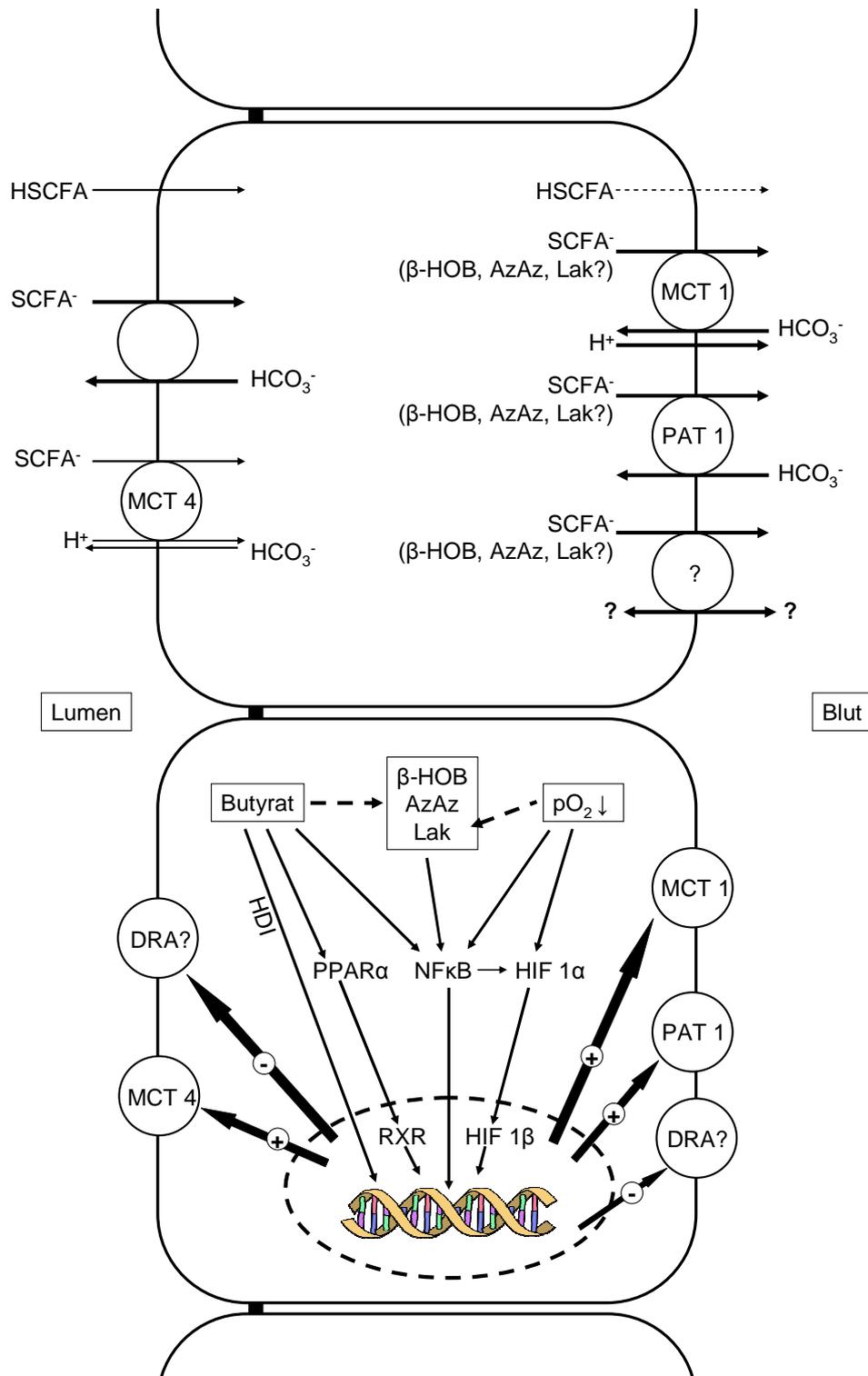
Die erhöhte Expression der ACO nach Butyratinkubation wies auch auf eine verstärkte Aktivität von PPAR $\alpha$  hin, einem weiteren Transkriptionsfaktor, dessen Einfluss auf die Expression der MCT bereits mehrfach beschrieben wurde (KÖNIG et al. 2008; KÖNIG et al. 2010; BENESCH et al. 2012). Seine Aktivierung durch langkettige Fettsäuren ist bekannt (KLIEWER et al. 1992; SCHOONJANS et al. 1996), sodass es nahe liegt, dass auch SCFA einen Einfluss haben können, zumal diese im Pansen das wichtigste Energiesubstrat darstellen. Die spezifische Hochregulierung der ACO nach Butyratinkubation im Gegensatz zu Hypoxie kann als Hinweis verstanden werden, dass neben langkettigen Fettsäuren auch SCFA, nicht aber deren Metaboliten, als Liganden dienen. Gleichzeitig wurde auch PAT 1 nur nach Butyrat-, aber nicht nach hypoxischer Inkubation stärker exprimiert. Dies legt den Gedanken nahe, dass die Expression des PAT 1 im Pansenepithel durch PPAR $\alpha$  reguliert wird.

Diese Vermutung wird durch die Untersuchung der Genexpression in kultivierten Pansenepithelzellen nach Stimulation mit WY14.643, einem Agonisten von PPAR $\alpha$ , für 48 Stunden (BENESCH et al. 2012) bestätigt. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen war nach Inkubation mit WY14.643 die mRNA-Expression von PAT 1 um etwa das Zweifache erhöht ( $p < 0.01$ ,  $N = 4$ ; student's t-test, SigmaPlot 11.0, Systat Software, USA; unveröffentlicht; Dank an F. Benesch für die Überlassung der Proben).

Es kann also davon ausgegangen werden, dass PAT 1 und eventuell auch MCT 1 und 4 bei einer Akkumulation von SCFA in der Pansenepithelzelle PPAR $\alpha$ -vermittelt verstärkt exprimiert werden. NF $\kappa$ B und HIF 1 werden dagegen durch verschiedene Stimuli, d.h. durch eine Akkumulation von SCFA(-Metaboliten) sowie Hypoxie verstärkt aktiviert, was ebenso in einer erhöhten Expression von MCT 1 und 4 mündet. Diese Transportproteine tragen also nicht nur grundsätzlich zum Transport der SCFA(-Metaboliten) bei, wie es im ersten Teil dieser Arbeit bereits gezeigt wurde, sondern spielen auch bei der Anpassung des Pansenepithels an veränderte Konzentrationen dieser Substrate eine Schlüsselrolle.

### ***4.3 Theoretisches Modell des SCFA-Transports und dessen Regulation auf Genexpressionsebene auf Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit***

Abschließend lässt sich feststellen, dass beim Transport der SCFA über die basolaterale Membran die lipophile Diffusion eine sehr viel geringere Rolle spielt als auf der apikalen Seite. Dagegen haben bikarbonatabhängige Anionenaustauschprozesse für den Transfer von SCFA(-Metaboliten) ins Blut eine größere Bedeutung, ergänzt von einem oder mehreren noch nicht identifizierten bikarbonatunabhängigen Mechanismen. Für den Anionenaustausch spielen höchstwahrscheinlich MCT 1 sowie PAT 1 eine zentrale Rolle. Kürzlich konnten auch für den PAT 1 im Pansenepithel Hinweise auf eine basolaterale Lokalisation gefunden werden (persönliche Mitteilung, REIKO RACKWITZ, Leipzig 2014). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass insbesondere MCT 1 und 4 sowie PAT 1 einer starken substratabhängigen Regulation unterliegen und somit den Kern einer Anpassung des Pansenepithels an veränderte SCFA(-Metaboliten)-Konzentrationen bilden, wohingegen AE 2 unbeeinflusst vom Substratangebot bleibt bzw. die Expression von DRA (zugunsten der anderer Transportproteine?) sogar verringert wird. Die Mechanismen, über die diese Regulation vermittelt wird, beinhalten eine Aktivierung von NFκB und HIF sowie von PPARα. Diese Anpassungsreaktion ist ein wichtiger Mechanismus, um die Entstehung von Azidosen sowie Schädigungen der epithelialen Barriere bei kurzfristigen Änderungen im Fütterungsregime zu vermeiden. Eine Modellvorstellung des SCFA-Transports über das Pansenepithel sowie regulative Prozesse dafür auf der Basis des aktuellen Wissensstandes inklusive der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in Abb. 3 veranschaulicht.



**Abb. 3**

Erläuterungen zu Abb. 3 s. Text (4.3 Theoretisches Modell des SCFA-Transports und dessen Regulation auf Genexpressionsebene auf Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit).

Legende: AzAz = Azetoazetat; β-HOB = β-Hydroxybutyrat; DRA = Down Regulated in Adenoma; HDI = Histondeazetylaseinhibitor; HIF = Hypoxie-induzierbarer Faktor; HSCFA = undissoziierte kurzkettige Fettsäuren; Lak = Laktat; MCT = Monocarboxylattransporter; NFκB = Nukleärer factor κB; PAT = Putativer Anionentransporter; pO<sub>2</sub> = Sauerstoffpartialdruck; PPAR = Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor; RXR = Retinoid-X-Rezeptor; SCFA<sup>-</sup> = dissoziiertes Anion der kurzkettigen Fettsäuren.

## 5 Zusammenfassung

Franziska Dengler

Transport kurzkettiger Fettsäuren über die basolaterale Membran des ovinen Pansenepithels: Mechanismen und Regulation auf Genebene

Veterinär-Physiologisches Institut  
der Veterinärmedizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

Eingereicht im August 2014

Bibliographische Angaben:

79 Seiten, 2 Publikationen, 3 Abbildungen, 184 Literaturangaben

Schlüsselwörter: Kurzkettige Fettsäuren, Monocarboxyltransporter, mRNA-Expression, Pansenepithel, Putativer Anionentransporter, Proteinexpression, Ussing-Kammer

**Einleitung:** Kurzkettige Fettsäuren (SCFA) stellen das hauptsächliche Energiesubstrat für Wiederkäuer dar. In Anbetracht des - bedingt durch höhere Milch-, Mast und Reproduktionsleistung - steigenden Energiebedarfs von Hauswiederkäuern wie Milchkuh und Mastbulle ist es von zentraler Bedeutung, die Mechanismen zur Resorption dieser Energielieferanten bzw. Ansatzpunkte für die Beeinflussung dieser Transportprozesse genau zu kennen. Dieses Wissen kann möglicherweise dabei helfen, zukünftig die Energieaufnahme der Tiere zu unterstützen bzw. sogar effizienter zu gestalten.

**Ziele der Untersuchungen:** Deshalb war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Mechanismen zur Resorption von SCFA zu charakterisieren, wobei der Schwerpunkt auf den Transport aus den Pansenepithelzellen ins Blut gelegt wurde, da hierzu im Gegensatz zu ihrer Aufnahme aus dem Pansenlumen in die Epithelzellen noch sehr wenig bekannt war. In einem zweiten Schritt sollte untersucht werden, inwiefern die nachgewiesenen Mechanismen einer Regulation unterliegen und über welche Signalwege diese vermittelt werden könnte.

**Materialien und Methoden:** Zur Charakterisierung der beteiligten Resorptionsmechanismen wurden Epithelstücke aus dem ventralen Pansensack von

Schafen in Ussing-Kammern eingespannt und mit Hilfe radioaktiv markierten Azetats, Butyrats und L-Laktats der Transport dieser Substrate unter verschiedenen Bedingungen sowie verschiedenen Hemmstoffeinflüssen untersucht. Zur Charakterisierung regulativer Einflüsse wurden die Epithelstücke über sechs bzw. 24 Stunden mit Butyrat inkubiert und anschließend RNA bzw. Totalprotein extrahiert. Hiermit konnten Veränderungen in mRNA- und Proteinexpression mittels quantitativer Echtzeit-PCR bzw. Western Blot nachgewiesen werden.

**Ergebnisse:** Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass der Transport von SCFA über die basolaterale Membran des Pansenepithels hauptsächlich proteinvermittelt erfolgt. Eine signifikante Beteiligung lipophiler Diffusion, d.h. ein passiver Transport, kann weitgehend ausgeschlossen werden. Der aktive Transport wies eine bikarbonatabhängige und eine bikarbonatunabhängige Komponente auf. Der Einsatz von Hemmstoffen verschiedener Transportproteine ergab deutliche Hinweise darauf, dass der Monocarboxylattransporter (MCT) 1 eine Rolle beim bikarbonatgekoppelten Transport von Azetat bzw. allgemein unmetabolisierten SCFA spielt. Diese Hinweise wurden unteretzt durch die Beobachtung, dass MCT 1, aber auch der apikal bzw. intrazellulär lokalisierte MCT 4 durch langfristige Inkubation des Epithels mit Butyrat sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene signifikant erhöht exprimiert wurden, was als Anpassungsreaktion an eine Substratakkumulation interpretiert werden kann. Außerdem wurde auch die mRNA-Expression des Putativen Anionentransporters (PAT) 1 durch Inkubation mit Butyrat erhöht, was für eine Beteiligung auch dieses Transportproteins am SCFA-Transport über das Pansenepithel spricht. Allerdings ist im Gegensatz zu MCT 1 die Lokalisation des PAT 1 in der basolateralen Membran noch fraglich. Die Expressionssteigerung von Zielgenen des Nukleären Faktors  $\kappa$ B und des Peroxisomenproliferator-aktivierten Rezeptors  $\alpha$  sowie des Hypoxie-induzierbaren Faktors selbst deuten weiterhin darauf hin, dass die Steigerung der Transportkapazitäten von MCT 1 und 4 und auch PAT 1 über diese Signalwege vermittelt wird.

**Schlussfolgerungen:** Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmals der Transport von SCFA über die basolaterale Membran des Pansenepithels näher charakterisiert werden, sodass es nun möglich ist, zusammen mit den bereits vorliegenden Befunden für die apikale Membran ein komplettes Modell dafür zu erstellen. Auch wurden Erkenntnisse zu regulativen Einflüssen auf diesen Transport gewonnen, die es zukünftig ermöglichen könnten, die Resorption der SCFA aus dem Pansen nutritiv oder eventuell pharmakologisch zu beeinflussen.

## 6 Summary

Franziska Dengler

Transport of short chain fatty acids across the basolateral membrane of ovine ruminal epithelium: mechanisms and regulation on gene level

Institute of Physiology  
Faculty of Veterinary Medicine  
University of Leipzig

Submitted in August 2014

Bibliography:

79 pages, 2 publications, 3 figures, 184 references

**Keywords:** short chain fatty acids, monocarboxylate transporter, mRNA-expression, rumen epithelium, putative anion transporter, protein expression, Ussing chamber

**Introduction:** The main energy source for ruminants are short chain fatty acids (SCFA). Considering the ever increasing energy requirements of cattle due to increasing milk yield and meat production, it is crucial to identify the mechanisms for the resorption of these energy sources as well as possibilities to influence these transport mechanisms. This knowledge could help support the animals' energy uptake or even making it more efficient.

**Aim:** Thus, the aim of the present study was to characterise mechanisms for the resorption of SCFA focusing on their transport from the epithelial cells into the blood. In particular, since – compared to the research findings on the uptake of SCFA from ruminal lumen into the cells – so far only very little was known regarding this side of the epithelium. In a second step, the study aimed to elucidate whether the mechanisms observed are subject to regulatory processes and which signalling pathways are involved.

**Materials and methods:** To characterise the transport mechanisms involved, epithelial pieces from the ventral sac of ovine rumen were mounted in Ussing chambers. Using radioactively labelled acetate, butyrate and L-lactate, the transport of these substrates was investigated under different conditions and by applying different inhibitors for potential SCFA transport proteins. To characterise regulatory influences, epithelial pieces were

incubated with butyrate for six and 24 hours, respectively. Subsequently, total RNA and protein were extracted to detect changes in mRNA and protein expression using quantitative real time PCR and western blot, respectively.

**Results:** The present study could show that transport of SCFA across the basolateral membrane of rumen epithelium is mainly realised by protein-mediated mechanisms. A significant participation of lipophilic diffusion, i.e. a passive transport, can almost entirely be excluded. The active transport could be divided into a bicarbonate-dependent and a bicarbonate-independent part. The experiments with inhibitors of different transport proteins showed clear evidence of an involvement of monocarboxylate transporter (MCT) 1 in the bicarbonate-dependent transport of acetate and non-metabolised SCFA in general. This evidence was supported by the finding that the expression of MCT 1 but also of the apically and intracellularly localised MCT 4 was increased significantly on both mRNA- and protein-level after long-term incubation of the epithelium with butyrate. This can be interpreted as an adaptation to a substrate accumulation. Additionally, butyrate incubation led to an increased mRNA expression of putative anion transporter (PAT) 1, which makes an involvement of this transport protein in SCFA transport across ruminal epithelium likely as well. However, in contrast to MCT 1 the localisation of PAT 1 in the basolateral membrane is still questionable. The increased expression of target genes of nuclear factor  $\kappa$ B and peroxisome-proliferator activated receptor  $\alpha$  as well as of hypoxia inducible factor strongly point to an involvement of these pathways in the increased expression of MCT 1 and 4 as well as PAT 1.

**Conclusions:** In summary, this study could characterise the transport of SCFA across the basolateral membrane of ruminal epithelium in detail for the first time. This enables us to draw a complete model of ruminal SCFA transport. Also, evidence for regulatory influence on this transport processes was found, perhaps making it possible to influence resorption of SCFA from rumen by nutritive or pharmacological means in the future.

## 7 Literaturverzeichnis

Abrahamse SL, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells. *Carcinogenesis*. 1999;20(4):629-34.

Adam E, Quivy V, Bex F, Chariot A, Collette Y, Vanhulle C et al. Potentiation of tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation by deacetylase inhibitors is associated with a delayed cytoplasmic reappearance of I kappa B alpha. *Mol Cell Biol*. 2003;23(17):6200-9.

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(5):477-87.

Alper SL, Chernova MN, Stewart AK. Regulation of Na<sup>+</sup>-independent Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchangers by pH. *JOP*. 2001;2(4 Suppl):171-5.

Alper SL, Chernova MN, Stewart AK. How pH regulates a pH regulator: a regulatory hot spot in the N-terminal cytoplasmic domain of the AE2 anion exchanger. *Cell Biochem Biophys*. 2002;36(2-3):123-36.

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(4):592-9.

Aschenbach JR, Bilk S, Tadesse G, Stumpff F, Gäbel G. Bicarbonate-dependent and bicarbonate-independent mechanisms contribute to nondiffusive uptake of acetate in the ruminal epithelium of sheep. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296(5):G1098-G1107.

Aschenbach JR, Penner GB, Stumpff F, Gäbel G. Ruminant Nutrition Symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *J Anim Sci*. 2011;89(4):1092-107.

Baldwin RL, Jesse BW. Developmental changes in glucose and butyrate metabolism by isolated sheep ruminal cells. *J Nutr*. 1992;122(5):1149-53.

Baldwin RL, Wu S, Li W, Li C, Bequette BJ, Li RW. Quantification of Transcriptome Responses of the Rumen Epithelium to Butyrate Infusion using RNA-seq Technology. *Gene Regul Syst Bio.* 2012;6:67-80.

Barcroft J, McAnally RA, Phillipson AT. Absorption of volatile fatty acids from the alimentary tract of the sheep and other animals. *J Exp Biol.* 1944;20:120-9.

Benesch F, Honscha KU, Urbansky I, Gäbel G. Regulatory influences on monocarboxylate transporter 1 (MCT1) in ovine ruminal epithelial cells. *Genes and Nutrition.* 2012;6:57.

Berger J, Hardt M, Clauss WG, Fronius M. Basolateral Cl<sup>-</sup> uptake mechanisms in *Xenopus laevis* lung epithelium. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;299(1):R92-100.

Bergman EN. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev.* 1990;70(2):567-90.

Bergman EN, Reid RS, Murray MG, Brockway JM, Whitelaw FG. Interconversions and production of volatile fatty acids in the sheep rumen. *Biochem J.* 1965;97(1):53-8.

Bilk S. Mechanismen der anionischen SCFA-Resorption im Pansen des Schafes [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2007.

Bilk S, Huhn K, Honscha KU, Pfannkuche H, Gäbel G. Bicarbonate exporting transporters in the ovine ruminal epithelium. *J Comp Physiol B.* 2005;175(5):365-74.

Blottiere HM, Buecher B, Galmiche JP, Cherbut C. Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. *Proc Nutr Soc.* 2003;62(1):101-6.

Boidot R, Vegran F, Meulle A, Le BA, Dessy C, Sonveaux P et al. Regulation of monocarboxylate transporter MCT1 expression by p53 mediates inward and outward lactate fluxes in tumors. *Cancer Res.* 2012;72(4):939-48.

Borthakur A, Priyamvada S, Kumar A, Natarajan AA, Gill RK, Alrefai WA et al. A novel nutrient sensing mechanism underlies substrate-induced regulation of monocarboxylate transporter-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;303(10):G1126-G1133.

Borthakur A, Saksena S, Gill RK, Alrefai WA, Ramaswamy K, Dudeja PK. Regulation of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) promoter by butyrate in human intestinal epithelial cells: involvement of NF-kappaB pathway. *J Cell Biochem.* 2008;103(5):1452-63.

- Breves G, Leonhard-Marek S. Verdauungsvorgänge in den Vormägen. In: von Engelhardt W, Hrsg. Physiologie der Haustiere. 3. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag; 2010. S.380-9.
- Britton R, Krehbiel C. Nutrient metabolism by gut tissues. *J Dairy Sci.* 1993;76(7):2125-31.
- Bugaut M. Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. *Comp Biochem Physiol B.* 1987;86(3):439-72.
- Byeon MK, Westerman MA, Maroulakou IG, Henderson KW, Suster S, Zhang XK et al. The down-regulated in adenoma (DRA) gene encodes an intestine-specific membrane glycoprotein. *Oncogene.* 1996;12(2):387-96.
- Canani RB, Costanzo MD, Leone L, Pedata M, Meli R, Calignano A. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World J Gastroenterol.* 2011;17(12):1519-28.
- Carter MJ. The carbonic anhydrase in the rumen epithelial tissue of the ox. *Biochim Biophys Acta.* 1971;235(1):222-36.
- Chernova MN, Jiang L, Friedman DJ, Darman RB, Lohi H, Kere J et al. Functional comparison of mouse *slc26a6* anion exchanger with human *SLC26A6* polypeptide variants: differences in anion selectivity, regulation, and electrogenicity. *J Biol Chem.* 2005;280(9):8564-80.
- Chien WJ, Stevens CE. Coupled active transport of Na and Cl across forestomach epithelium. *Am J Physiol.* 1972;223(4):997-1003.
- Cistola DP, Small DM, Hamilton JA. Ionization behavior of aqueous short-chain carboxylic acids: a carbon-13 NMR study. *J Lipid Res.* 1982;23(5):795-9.
- Comalada M, Bailon E, de Hara O, Lara-Villoslada F, Xaus J, Zarzuelo A et al. The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2006;132(8):487-97.
- Connor EE, Baldwin RL, Li CJ, Li RW, Chung H. Gene expression in bovine rumen epithelium during weaning identifies molecular regulators of rumen development and growth. *Funct Integr Genomics.* 2013;13(1):133-42.

- Connor EE, Li RW, Baldwin RL, Li C. Gene expression in the digestive tissues of ruminants and their relationships with feeding and digestive processes. *Animal*. 2010;4(7):993-1007.
- Cuff MA, Lambert DW, Shirazi-Beechey SP. Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *J Physiol*. 2002;539(Pt 2):361-71.
- Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F et al. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I $\kappa$ B kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NF $\kappa$ B activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(48):18154-9.
- Cummins EP, Taylor CT. Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflügers Arch*. 2005;450(6):363-71.
- Danielli JF, Hitchcock MW. The mechanism of absorption from the rumen as exemplified by the behaviour of acetic, propionic and butyric acids. *J Exp Biol*. 1945;22:75-84.
- de Oliveira AT, Pinheiro C, Longatto-Filho A, Brito MJ, Martinho O, Matos D et al. Co-expression of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) and its chaperone (CD147) is associated with low survival in patients with gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *J Bioenerg Biomembr*. 2012;44(1):171-8.
- DeFrain JM, Hippen AR, Kalscheur KF, Schingoethe DJ. Feeding lactose increases ruminal butyrate and plasma beta-hydroxybutyrate in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*. 2004;87(8):2486-94.
- Deuticke B. Monocarboxylate transport in erythrocytes. *J Membr Biol*. 1982;70(2):89-103.
- Di Sabatino A, Morera R, Ciccocioppo R, Cazzola P, Gotti S, Tinozzi FP et al. Oral butyrate for mildly to moderately active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;22(9):789-94.
- Diernæs L, Sehested J, Møller 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(5):755-62.
- Dijkstra J, Boer H, Van BJ, 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(2):385-96.

Dirksen G, Ahrens F, Schon J, Mayer E, Liebich HG. Preparatory feeding of the dry stage cow in regard to nutritional condition and the status of the rumen mucosa and rumen flora at calving. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 1992;105(1):1-4.

Dirksen G, Liebich HG, Brosi G, Hagemeister H, Mayer E. Morphology of the rumen mucosa and fatty acid absorption in cattle--important factors for health and production. *Zentralbl Veterinärmed A.* 1984;31(6):414-30.

Dudeja PK, Ramaswamy K. Intestinal anion absorption. In: Johnson LR, Hrsg. *Physiology of the Gastrointestinal Tract* 2. 4. Aufl. Oxford: Academic press; 2006. p. 1881-1916.

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.

Emanovic D, Harrison FA, Keynes RD, Rankin JC. The effect of acetazolamide on ion transport across isolated sheep rumen epithelium. *J Physiol.* 1976;254(3):803-12.

Frizzell RA, Koch MJ, Schultz SG. Ion transport by rabbit colon. I. Active and passive components. *J Membr Biol.* 1976;27(3):297-316.

Gäbel G, Aschenbach JR, Müller F. Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: implications and limitations. *Anim Health Res Rev.* 2002;3(1):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.* 1991;38(7):523-9.

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(3):215-21.

Gäbel G, Sehested J. SCFA transport in the forestomach of ruminants. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* 1997;118(2):367-74.

Gäbel G, Vogler S, Martens H. Short-chain fatty acids and CO<sub>2</sub> as regulators of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> absorption in isolated sheep rumen mucosa. *J Comp Physiol B.* 1991;161(4):419-26.

Galfi P, Neogrady S, Kutas F. The inhibitory action of sodium butyrate on the growth of KB, MMT and RPMI cells. *Vet Res Commun.* 1991;15(4):261-9.

Ganapathy V, Thangaraju M, Prasad PD. Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacol Ther.* 2009;121(1):29-40.

Gawenis LR, Bradford EM, Alper SL, Prasad V, Shull GE. AE2  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger is required for normal cAMP-stimulated anion secretion in murine proximal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;298(4):G493-G503.

Georgi MI. Charakterisierung eines nicht selektiven Anionenkanals an kultivierten Pansen- und Psalterepithelzellen des Schafes [Dissertation med. vet]. Berlin: Freie Univ. Berlin; 2010.

Gopal E, Fei YJ, Sugawara M, Miyauchi S, Zhuang L, Martin P et al. Expression of slc5a8 in kidney and its role in  $\text{Na}^+$ -coupled transport of lactate. *J Biol Chem.* 2004;279(43):44522-32.

Gorka P, Kowalski ZM, Pietrzak P, Kotunia A, Kiljanczyk R, Flaga J et al. Effect of sodium butyrate supplementation in milk replacer and starter diet on rumen development in calves. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60 Suppl 3:47-53.

Graham C, Gatherer I, Haslam I, Glanville M, Simmons NL. Expression and localization of monocarboxylate transporters and sodium/proton exchangers in bovine rumen epithelium. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;292(2):R997-R1007.

Graham C, Simmons NL. Functional organization of the bovine rumen epithelium. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288(1):R173-R181.

Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature.* 1997;389(6649):349-52.

Gupta N, Martin PM, Prasad PD, Ganapathy V. SLC5A8 (SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter. *Life Sci.* 2006;78(21):2419-25.

Hadjiagapiou C, Borthakur A, Dahdal RY, Gill RK, Malakooti J, Ramaswamy K et al. Role of USF1 and USF2 as potential repressor proteins for human intestinal monocarboxylate transporter 1 promoter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288(6):G1118-G1126.

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(4):G775-G780.

Halestrap AP, Meredith D. The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflügers Arch.* 2004;447(5):619-28.

Halestrap AP, Price NT. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J.* 1999;343 Pt 2:281-99.

Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;27(2):104-19.

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(3 Pt 1):G415-G422.

Harris T, Eliyahu G, Frydman L, Degani H. Kinetics of hyperpolarized  $^{13}\text{C}$ -pyruvate transport and metabolism in living human breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(43):18131-6.

Haßtdenteufel E, Schneider M. Säure-Basen-Haushalt. In: Moritz H, Hrsg. *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.* 5. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2014. S. 355-65.

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(4):C912-C921.

Inan MS, Rasoulpour RJ, Yin L, Hubbard AK, Rosenberg DW, Giardina C. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology.* 2000a;118(4):724-34.

Inan MS, Tolmacheva V, Wang QS, Rosenberg DW, Giardina C. Transcription factor NF-kappaB participates in regulation of epithelial cell turnover in the colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000b;279(6):G1282-G1291.

Jacob P, Rossmann H, Lamprecht G, Kretz A, Neff C, Lin-Wu E et al. Down-regulated in adenoma mediates apical  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchange in rabbit, rat, and human duodenum. *Gastroenterology.* 2002;122(3):709-24.

Jons T, Drenckhahn D. Anion exchanger 2 (AE2) binds to erythrocyte ankyrin and is colocalized with ankyrin along the basolateral plasma membrane of human gastric parietal cells. *Eur J Cell Biol.* 1998;75(3):232-6.

Juel C, Halestrap AP. Lactate transport in skeletal muscle - role and regulation of the monocarboxylate transporter. *J Physiol.* 1999;517(Pt 3):633-42.

Kern C. Modulation des NF- $\kappa$ B-Signalwegs in primären Maushepatozyten. [Dissertation rer. nat.]. Freiburg: Albert-Ludwigs-Univ. Freiburg; 2007.

Kirat D, Inoue H, Iwano H, Hirayama K, Yokota H, Taniyama H et al. Monocarboxylate transporter 1 gene expression in the ovine gastrointestinal tract. *Vet J.* 2006a;171(3):462-7.

Kirat D, Kato S. Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) mediates transport of short-chain fatty acids in bovine caecum. *Exp Physiol.* 2006;91(5):835-44.

Kirat D, Masuoka J, Hayashi H, Iwano H, Yokota H, Taniyama H et al. Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) plays a direct role in short-chain fatty acids absorption in caprine rumen. *J Physiol.* 2006b;576(Pt 2):635-47.

Kirat D, Matsuda Y, Yamashiki N, Hayashi H, Kato S. Expression, cellular localization, and functional role of monocarboxylate transporter 4 (MCT4) in the gastrointestinal tract of ruminants. *Gene.* 2007;391(1-2):140-9.

Kirat D, Sallam KI, Kato S. Expression and cellular localization of monocarboxylate transporters (MCT2, MCT7, and MCT8) along the cattle gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res.* 2013;352(3):585-98.

Kliwer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature.* 1992;358(6389):771-4.

Ko SB, Shcheynikov N, Choi JY, Luo X, Ishibashi K, Thomas PJ et al. A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in cystic fibrosis. *EMBO J.* 2002;21(21):5662-72.

- König B, Fischer S, Schlotte S, Wen G, Eder K, Stangl GI. Monocarboxylate transporter 1 and CD147 are up-regulated by natural and synthetic peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists in livers of rodents and pigs. *Mol Nutr Food Res.* 2010;54(9):1248-56.
- König B, Koch A, Giggel K, Dordschbal B, Eder K, Stangl GI. Monocarboxylate transporter (MCT)-1 is up-regulated by PPARalpha. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1780(6):899-904.
- Kouraklis G, Theocharis S. Histone deacetylase inhibitors: a novel target of anticancer therapy (review). *Oncol Rep.* 2006;15(2):489-94.
- 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(4):262-9.
- Krehbiel CR, Harmon DL, Schneider JE. Effect of increasing ruminal butyrate on portal and hepatic nutrient flux in steers. *J Anim Sci.* 1992;70(3):904-14.
- Kristensen NB, Danfær A, Agergaard N. Absorption and metabolism of short-chain fatty acids in ruminants. *Arch Tierernähr.* 1998;51(2-3):165-75.
- Kristensen NB, Gäbel G, Pierzynowski SG, Danfær A. Portal recovery of short-chain fatty acids infused into the temporarily-isolated and washed reticulo-rumen of sheep. *Br J Nutr.* 2000a;84(4):477-82.
- Kristensen NB, Pierzynowski SG, Danfær 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(5):1372-9.
- Laarman AH, Sugino T, Oba M. Effects of starch content of calf starter on growth and rumen pH in Holstein calves during the weaning transition. *J Dairy Sci.* 2012;95(8):4478-87.
- Lacorn M, Goerke M, Claus R. Inulin-coated butyrate increases ileal MCT1 expression and affects mucosal morphology in the porcine ileum by reduced apoptosis. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2010;94(5):670-6.

Lamprecht G, Heil A, Baisch S, Lin-Wu E, Yun CC, Kalbacher H et al. 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  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchange to  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange. *Biochemistry*. 2002;41(41):12336-42.

Leonhard-Marek S, Stumpff F, Martens H. Transport of cations and anions across forestomach epithelia: conclusions from in vitro studies. *Animal*. 2010;4(7):1037-56.

Li H, Myeroff L, Smiraglia D, Romero MF, Pretlow TP, Kasturi L et al. 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(14):8412-7.

Lopez S, Hovell FD, Dijkstra J, France J. Effects of volatile fatty acid supply on their absorption and on water kinetics in the rumen of sheep sustained by intragastric infusions. *J Anim Sci*. 2003;81(10):2609-16.

Malhi M, Gui H, Yao L, Aschenbach JR, Gäbel G, Shen Z. Increased papillae growth and enhanced short-chain fatty acid absorption in the rumen of goats are associated with transient increases in cyclin D1 expression after ruminal butyrate infusion. *J Dairy Sci*. 2013;96(12):7603-16.

Mandard S, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(4):393-416.

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.

Marshall RA, Phillipson AT. The production and absorption of the volatile acids in the rumen. *Proc Nutr Soc*. 1945;3:238-43.

Martens H, Gäbel G, Strozyk B. Mechanism of electrically silent Na and Cl transport across the rumen epithelium of sheep. *Exp Physiol*. 1991;76(1):103-14.

Martin C, Kristensen NB, Huhtanen P. Comparison of non-tracer and tracer methods for determination of volatile fatty acid production rate in the rumen of sheep fed on two levels of intake. *Br J Nutr*. 2001;86(3):331-40.

Martinov V, Rizvi SM, Weiseth SA, Sagave J, Bergersen LH, Valen G. Increased expression of monocarboxylate transporter 1 after acute ischemia of isolated, perfused mouse hearts. *Life Sci.* 2009;85(9-10):379-85.

Masson MJ, Phillipson AT. The absorption of acetate, propionate and butyrate from the rumen of sheep. *J Physiol.* 1951;113(2-3):189-206.

Melvin JE, Park K, Richardson L, Schultheis PJ, Shull GE. Mouse down-regulated in adenoma (DRA) is an intestinal Cl(-)/HCO<sub>3</sub>(-) exchanger and is up-regulated in colon of mice lacking the NHE3 Na(+)/H(+) exchanger. *J Biol Chem.* 1999;274(32):22855-61.

Meredith D, Christian HC. The SLC16 monocarboxylate transporter family. *Xenobiotica.* 2008;38(7-8):1072-106.

Michelberger T. Propionsäure-Transport über das isolierte Pansenepithel des Schafes [Dissertation med. vet]. Berlin: Freie Univ. Berlin; 1994.

Mishra A, Chaudhary A, Sethi S. Oxidized omega-3 fatty acids inhibit NF-kappaB activation via a PPARalpha-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(9):1621-7.

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(14):13293-6.

Moreira TJ, Pierre K, Maekawa F, Repond C, Cebere A, Liljequist S et al. Enhanced cerebral expression of MCT1 and MCT2 in a rat ischemia model occurs in activated microglial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(7):1273-83.

Müller F, Aschenbach JR, Gäbel G. Role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in pH<sub>i</sub> recovery from intracellular acid load in cultured epithelial cells of sheep rumen. *J Comp Physiol B.* 2000;170(4):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(5):G1139-G1146.

Naeem A, Drackley JK, Stamey J, Looor JJ. Role of metabolic and cellular proliferation genes in ruminal development in response to enhanced plane of nutrition in neonatal Holstein calves. *J Dairy Sci.* 2012;95(4):1807-20.

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(2):97-104.

Noziere P, Martin C, Remond D, Kristensen NB, Bernard R, Doreau M. Effect of composition of ruminally-infused short-chain fatty acids on net fluxes of nutrients across portal-drained viscera in underfed ewes. *Br J Nutr.* 2000;83(5):521-31.

Obrador G, Yuan H, Shih TM, Wang YH, Shia MA, Alexander EA et al. Characterization of anion exchangers in an inner medullary collecting duct cell line. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9(5):746-54.

Ord JJ, Streeter EH, Roberts IS, Cranston D, Harris AL. Comparison of hypoxia transcriptome in vitro with in vivo gene expression in human bladder cancer. *Br J Cancer.* 2005;93(3):346-54.

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(6):1033-42.

Paroder V, Spencer SR, Paroder M, Arango D, Schwartz S Jr, Mariadason JM et al. Na(+)/monocarboxylate transport (SMCT) protein expression correlates with survival in colon cancer: molecular characterization of SMCT. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(19):7270-5.

Penner GB, Aschenbach JR, Gäbel G, Rackwitz R, Oba M. Epithelial capacity for apical uptake of short chain fatty acids is a key determinant for intraruminal pH and the susceptibility to subacute ruminal acidosis in sheep. *J Nutr.* 2009a;139(9):1714-20.

Penner GB, Steele MA, Aschenbach JR, McBride BW. Ruminant Nutrition Symposium: Molecular adaptation of ruminal epithelia to highly fermentable diets. *J Anim Sci.* 2011;89(4):1108-19.

Penner GB, Taniguchi M, Guan LL, Beauchemin KA, Oba M. Effect of dietary forage to concentrate ratio on volatile fatty acid absorption and the expression of genes related to volatile fatty acid absorption and metabolism in ruminal tissue. *J Dairy Sci.* 2009b;92(6):2767-81.

Perez de Heredia F, Wood IS, Trayhurn P. Hypoxia stimulates lactate release and modulates monocarboxylate transporter (MCT1, MCT2, and MCT4) expression in human adipocytes. *Pflügers Arch.* 2010;459(3):509-18.

Petrovic S, Wang Z, Ma L, Seidler U, Forte JG, Shull GE et al. Colocalization of the apical Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger PAT1 and gastric H-K-ATPase in stomach parietal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;283(5):G1207-G1216.

Pinheiro C, Sousa B, Albergaria A, Paredes J, Dufloth R, Vieira D et al. GLUT1 and CAIX expression profiles in breast cancer correlate with adverse prognostic factors and MCT1 overexpression. *Histol Histopathol.* 2011;26(10):1279-86.

Plöger S, Stumpff F, Penner GB, Schulzke JD, Gäbel G, Martens H et al. Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1258(1):52-9.

Poole RC, Halestrap AP. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol.* 1993;264(4 Pt 1):C761-C782.

Queiros O, Preto A, Pacheco A, Pinheiro C, Zevedo-Silva J, Moreira R et al. Butyrate activates the monocarboxylate transporter MCT4 expression in breast cancer cells and enhances the antitumor activity of 3-bromopyruvate. *J Bioenerg Biomembr.* 2012;44(1):141-53.

Rackwitz R. Elektrogene Mechanismen der Permeation kurzkettiger Fettsäuren über das Pansenepithel [Dissertation rer. nat]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2011.

Rackwitz R, Philipp P, Schmidt-Mähne A, Gäbel G. Permeation of short-chain fatty acids (SCFA) across rumen epithelium: electrogenic pathways. Proceedings of the Society of Nutrition Physiology; 2011 Mar 15-17; Göttingen, Germany. Frankfurt/Main: DLG Verlag; 2011.

Rademakers SE, Lok J, van der Kogel AJ, Bussink J, Kaanders JH. Metabolic markers in relation to hypoxia; staining patterns and colocalization of pimonidazole, HIF-1alpha, CAIX, LDH-5, GLUT-1, MCT1 and MCT4. *BMC Cancer*. 2011;11:167.

Rajendran VM, Binder HJ. Characterization and molecular localization of anion transporters in colonic epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;915:15-29.

Rajendran VM, Black J, Ardito TA, Sangan P, Alper SL, Schweinfest C et al. Regulation of DRA and AE1 in rat colon by dietary Na depletion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279(5):G931-G942.

Rechkemmer G, Gäbel G, Diernæs L, Sehested J, Møller PD, von Engelhardt W. Transport of Short Chain Fatty Acids in the Forestomach and Hindgut. In: von Engelhardt W, Hrsg. *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction. Proceedings of the Eighth International Symposium on Ruminant Physiology*. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag; 1995. S. 95-116.

Rémond D, Ortigues I, Jouany JP. Energy substrates for the rumen epithelium. *Proc Nutr Soc*. 1995;54(1):95-105.

Reynolds CK, Huntington GB, Tyrrell HF, Reynolds PJ. Net metabolism of volatile fatty acids, D-beta-hydroxybutyrate, nonesterified fatty acids, and blood gasses by portal-drained viscera and liver of lactating Holstein cows. *J Dairy Sci*. 1988;71(9):2395-405.

Reynolds DA, Rajendran VM, Binder HJ. Bicarbonate-stimulated [<sup>14</sup>C]butyrate uptake in basolateral membrane vesicles of rat distal colon. *Gastroenterology*. 1993;105(3):725-32.

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(Pt 3):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(Pt 3):719-32.

Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature*. 2008;453(7196):807-11.

Robinson AM, Williamson DH. Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol Rev.* 1980;60(1):143-87.

Rothenpieler P. Untersuchungen zum Benzoessäuretransport über das isolierte Pansenepithel von Schafen: Hinweise für eine Interaktion mit dem Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher [Dissertation med. vet]. Hannover: Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; 1991.

Sakata T, Tamate H. Rumen epithelial cell proliferation accelerated by rapid increase in intraruminal butyrate. *J Dairy Sci.* 1978;61(8):1109-13.

Scheppach W, Bartram P, Richter A, Richter F, Liepold H, Dusel G et al. Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1992;16(1):43-8.

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1302(2):93-109.

Schröder O, Hess S, Caspary WF, Stein J. Mediation of differentiating effects of butyrate on the intestinal cell line Caco-2 by transforming growth factor-beta 1. *Eur J Nutr.* 1999;38(1):45-50.

Schultz SG. The role of paracellular pathways in isotonic fluid transport. *Yale J Biol Med.* 1977;50(2):99-113.

Schweigel M, Freyer M, Leclercq S, Etschmann B, Lodemann U, Böttcher A et al. Luminal hyperosmolarity decreases Na transport and impairs barrier function of sheep rumen epithelium. *J Comp Physiol B.* 2005;175(8):575-91.

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 U S A.* 1993;90(9):4166-70.

Sehested J, Basse A, Andersen JB, Diernæs L, Møller PD, Skadhauge E et al. Feed-induced changes in transport across the rumen epithelium. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* 1997;118(2):385-6.

Sehested J, Diernæs L, Møller 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(4):359-68.

Sehested J, Diernæs L, Møller 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(4):399-408.

Seifter JL, Aronson PS. Cl<sup>-</sup> transport via anion exchange in *Necturus* renal microvillus membranes. *Am J Physiol*. 1984;247(6 Pt 2):F888-F895.

Shen Z, Kuhla S, Zitnan R, Seyfert HM, Schneider F, Hagemeister H et al. Intraruminal infusion of n-butyric acid induces an increase of ruminal papillae size independent of IGF-1 system in castrated bulls. *Arch Anim Nutr*. 2005;59(4):213-25.

Shen Z, Seyfert HM, Lohrke B, Schneider F, Zitnan R, Chudy A et al. An energy-rich diet causes rumen papillae proliferation associated with more IGF type 1 receptors and increased plasma IGF-1 concentrations in young goats. *J Nutr*. 2004;134(1):11-7.

Siciliano-Jones J, Murphy MR. Production of volatile fatty acids in the rumen and cecum-colon of steers as affected by forage:concentrate and forage physical form. *J Dairy Sci*. 1989;72(2):485-92.

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(20):11897-902.

Steele MA, Dionissopoulos L, Al Zahal O, Doelman J, McBride BW. Rumen epithelial adaptation to ruminal acidosis in lactating cattle involves the coordinated expression of insulin-like growth factor-binding proteins and a cholesterolgenic enzyme. *J Dairy Sci*. 2012;95(1):318-27.

Steven DH, Marshall AB. Organization of the rumen epithelium. In: Phillipson AT, Hrsg. *Physiology of digestion and metabolism in the ruminant*. Newcastle-upon-Tyne: Oriol Press;1970. p. 88–100.

Stevens CE, Stettler BK. Factors affecting the transport of volatile fatty acids across rumen epithelium. *Am J Physiol.* 1966a;210(2):365-72.

Stevens CE, Stettler BK. Transport of fatty acid mixtures across rumen epithelium. *Am J Physiol.* 1966b;211(1):264-71.

Stevens CE, Stettler BK. Evidence for active transport of acetate across bovine rumen epithelium. *Am J Physiol.* 1967;213(5):1335-9.

Storm AC, Kristensen NB. Effects of particle size and dry matter content of a total mixed ration on intraruminal equilibration and net portal flux of volatile fatty acids in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 2010;93(9):4223-38.

Stumpff F, Martens H, Bilk S, Aschenbach JR, Gäbel G. Cultured ruminal epithelial cells express a large-conductance channel permeable to chloride, bicarbonate, and acetate. *Pflügers Arch.* 2009;457(5):1003-22.

Suarez BJ, Van Reenen CG, Gerrits WJ, Stockhofe N, van Vuuren AM, Dijkstra J. Effects of supplementing concentrates differing in carbohydrate composition in veal calf diets: II. Rumen development. *J Dairy Sci.* 2006;89(11):4376-86.

Tamai I, Takanaga H, Maeda H, Sai Y, Ogihara T, Higashida H et al. Participation of a proton-cotransporter, MCT1, in the intestinal transport of monocarboxylic acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;214(2):482-9.

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(4):G676-G682.

Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 $\alpha$ -dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2006;281(14):9030-7.

Ullrich KJ, Fromter E, Murer H. Principles of epithelial transport in the kidney and intestines. *Klin Wochenschr.* 1979;57(19):977-91.

Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist.* 2004;9 Suppl 5:10-7.

Velazquez OC, Lederer HM, Rombeau JL. Butyrate and the colonocyte. Implications for neoplasia. *Dig Dis Sci.* 1996;41(4):727-39.

Velazquez OC, Lederer HM, Rombeau JL. Butyrate and the colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol.* 1997;427:123-34.

Walter A, Gutknecht J. Permeability of small nonelectrolytes through lipid bilayer membranes. *J Membr Biol.* 1986;90(3):207-17.

Wang Z, Petrovic S, Mann E, Soleimani M. Identification of an apical Cl(-)/HCO<sub>3</sub>(-) exchanger in the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;282(3):G573-G579.

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(5):589-97.

Weigand E, Young JW, McGilliard AD. Extent of propionate metabolism during absorption from the bovine ruminoreticulum. *Biochem J.* 1972b;126(1):201-9.

Wiese BI, Gorka P, Mutsvangwa T, Okine E, Penner GB. Short communication: Interrelationship between butyrate and glucose supply on butyrate and glucose oxidation by ruminal epithelial preparations. *J Dairy Sci.* 2013;96(9):5914-8.

Wright EM, Diamond JM. Anion selectivity in biological systems. *Physiol Rev.* 1977;57(1):109-56.

Würmli R, Wolfram S, Scharrer E. Inhibition of chloride absorption from the sheep rumen by nitrate. *Zentralbl Veterinärmed A.* 1987;34(6):476-9.

Yang W, Shen Z, Martens H. An energy-rich diet enhances expression of Na(+)/H(+) exchanger isoform 1 and 3 messenger RNA in rumen epithelium of goat. *J Anim Sci.* 2012;90(1):307-17.

### Danksagung

Mein Dank gilt **Prof. Dr. Gotthold Gäbel** für die Überlassung des Themas, seine unermüdliche Unterstützung bei allen Hoch- und vor allem Tiefpunkten und seine Fähigkeit, nie den Humor zu verlieren anstatt an den Daten - oder mir? - zu verzweifeln.

**PD Dr. Helga Pfannkuche** danke ich für ihre Anteilnahme an allen kleinen und großen Problemen und das richtige Wort zur richtigen Zeit. **Dr. Reiko Rackwitz** war mir ein einzigartiger Doktoronkel und hat mich mehr als einmal wieder aufgemuntert. Ihm gebührt besonders Dank für fast fünf Jahre ununterbrochenes „Schuldsein“ und „Immer-für-mich-da-sein“.

Unser „Goldstück“ **Anke Schmidt-Mähne** und Frühaufsteherin **Petra Philipp** waren für mich nicht nur die guten Geister in der Ussingkammer und drumherum, sondern auch unersetzliche Freundinnen in jeder Lebenslage - danke dafür! Vielen Dank auch an **Ines Urbansky**, die nicht müde wurde, zu zweifeln, zu optimieren und zu erklären. **Jana Kirchner** hatte immer ein offenes Ohr und ein liebes Wort - eine bessere „Chefin“ kann man sich nicht wünschen!

Ein weiteres Dankeschön gebührt **Carsten Benson** für seine ständige Sorge um unsere Schafe, seine ungebrochene Begeisterung bei allen Behandlungen und so mancher Überstunde. Dazu natürlich auch ein Dank an unsere Fistelschafe sowie etliche Versuchsschafe, die für diese Versuche ihr Leben gegeben haben. Schließlich seien auch **Ralf Reiche** und **Wolfgang Schilbach** nicht vergessen, die alle unsere „kaputten“ Kabel „repariert“, Extrawünsche in Rekordzeit erfüllt und auch mal eben ein Fahrrad in Ordnung gebracht haben.

Für's Wohlfühlen, den vielen Spaß, anregende Diskussionen und die durchweg positive Stimmung im Institut möchte ich mich auch bei meinen Mitdotoranden **Anja Mauksch, Bastian Kaiser, Carola Petto, Feras Taifour, Franziska Benesch, Franziska Masur, Szilvia Lesko, Thomas Otto** und **Ahmed Omer Alameen** bedanken.

Ein dickes Dankeschön möchte ich auch dem gesamten **Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut** für die gute Zusammenarbeit am Rotor Gene und besonders **Dr. Jutta Gottschalk, Gisela Lochmann** und **Susanne Tätzner** für die Ermöglichung all der radioaktiven Versuche aussprechen.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, **Monika und Karl-Heinz Dengler**, die mich stets klaglos dabei unterstützt haben, meine Träume zu verwirklichen, mir Mut machten und mit Rat und Tat zur Seite standen - danke!

Meiner großen Schwester **Bettina Dengler** gilt ein großes Dankeschön für sehr spontanes Korrekturlesen und „Immer-an-mich-Glauben“ - we can do it!

Besonderer Dank gebührt meinem Freund **Jürgen Saalfrank**, der nicht nur die Entfernung, sondern auch meine Launen aushielt und so manchen Sonntagnachmittag beim Pufferrühren, im Stall oder in der Ussingkammer verbrachte oder sich wegen meiner Computerproblemchen Nächte um die Ohren schlug - ohne Dich hätte ich nicht durchgehalten!