

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

**Modulation pH-regulativer Transportproteine durch Fettsäurerezeptoren im  
Pansenepithel des Schafes**

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

eingereicht von  
Lisa Baaske  
aus Berlin

Leipzig, 2021

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Gotthold Gäbel

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

Prof. Dr. Martin Diener,  
Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie, Fachbereich  
Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Verteidigung: 26. Oktober 2021

All den Schafen, die für diese Arbeit ihr Leben ließen



Inhaltsverzeichnis	Seite
1 Einleitung .....	1
2 Literaturübersicht .....	3
2.1 Bedeutung kurzkettiger Fettsäuren für den Wiederkäuer .....	3
2.2 Transport kurzkettiger Fettsäuren über das Pansenepithel .....	3
2.2.1 Apikale Aufnahme in das Pansenepithel .....	4
2.2.2 Basolaterale Ausschleusung in den Blutstrom .....	6
2.3 Metabolisierung kurzkettiger Fettsäuren im Pansenepithel .....	8
2.4 pH-Homöostase.....	9
2.4.1 pH-Regulation des Pansenlumens .....	9
2.4.2 pH-Regulation des Pansenepithels .....	10
2.5 Anpassungsmechanismen des Pansenepithels .....	12
2.6 Rolle des Butyrats.....	15
2.7 Fettsäurerezeptoren .....	16
2.7.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren .....	17
2.7.2 GPRs für SCFAs .....	17
2.7.2.1 FFAR2 .....	17
2.7.2.2 FFAR3 .....	18
2.7.2.3 GPR109A .....	19
2.7.3 FFARs im Wiederkäuerorganismus.....	20
2.8 Monocarboxylattransporter .....	22
2.8.1 Die Familie der MCTs.....	22
2.8.2 Regulation der MCTs.....	23
2.8.3 MCTs im Pansenepithel .....	24
2.9 Natrium-Protonen-Austauscher .....	26
2.9.1 Die Familie der NHEs .....	26
2.9.2 Regulation der NHEs.....	27
2.9.3 NHEs im Pansenepithel.....	28
2.10 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit .....	30
3 Publikationen .....	32
3.1 Publikation 1 .....	32

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2	Publikation 2.....	41
3.2.1	Supporting Information.....	56
4	Diskussion .....	57
4.1	Nachweis von FFARs im Pansenepithel .....	57
4.1.1	Regulation intrazellulärer Signalwege durch FFARs .....	59
4.1.2	GPR109A als potenzieller Butyrat-Rezeptor im Pansenepithel .....	62
4.1.3	FFAR2 als potenzieller Rezeptor für Butyrat.....	63
4.2	Seitenabhängigkeit der Butyrat-Effekte .....	64
4.3	pH-Abhängigkeit der cAMP-Spiegel.....	66
4.4	Einfluss von cAMP auf die Aktivität der MCTs .....	68
4.5	Einfluss von cAMP auf die NHE-Aktivität .....	70
4.6	Schlussfolgerungen.....	73
5	Zusammenfassung .....	75
6	Summary .....	77
7	Literaturverzeichnis .....	79
8	Anhang .....	101
8.1	Im Rahmen dieser Dissertation gehaltene Präsentationen .....	101
	Danksagung.....	103

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACs	Adenylylzyklen (engl. adenylyl cyclases)
AE2	Anionenaustauscher 2 (engl. anion exchanger 2)
$\beta$ -HB	$\beta$ -Hydroxybutyrat
Br-cAMP	Brom-cAMP
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (engl. cyclic adenosine monophosphate)
CHC	Cyanohydroxizimtsäure (engl. cyano-hydroxycinnamic acid)
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonsäure
DRA	Down-regulated in Adenoma
EIPA	5-N-Ethyl-N-Isopropyl Amilorid
FFAR2	Freier Fettsäurerezeptor 2 (engl. free fatty acid receptor 2)
FFARs	Freie Fettsäurerezeptoren (engl. free fatty acid receptors)
Fig.	Abbildung (engl. figure)
GLP-1	Glukagon-ähnliches Peptid 1 (engl. glucagon-like peptide 1)
GPR109A	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 109A
GPRs	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
H <sup>+</sup>	Protonen
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bikarbonat
HSCFA	Protonierte Form der Fettsäure
MCTs	Monocarboxylattransporter
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. messenger ribonucleic acid)
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Faktor $\kappa$ B
NH <sub>3</sub> / NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammoniak/ Ammoniumionen
NHEs	Natrium-Protonen-Austauscher (engl. Na <sup>+</sup> / H <sup>+</sup> exchangers)
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
PAT1	Putativer Anionentransporter 1
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
pHMB	p-Hydroxymercuribenzoessäure
pH <sub>i</sub>	intrazellulärer pH-Wert
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
pK <sub>s</sub>	Säurekonstante
PPAR $\alpha$	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\alpha$
PYY	Peptidhormon YY
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR

## Abkürzungsverzeichnis

---

SARA	subakute Pansenazidose ( <i>engl.</i> subacute ruminal acidosis)
SCFA <sup>-</sup>	Anion der dissoziierten Fettsäure
SCFAs	Kurzkettige Fettsäuren ( <i>engl.</i> short chain fatty acids)
SMCT1	Natrium-gekoppelter Monocarboxylattransporter 1
vH <sup>+</sup> -ATPase	Vakuoläre H <sup>+</sup> -Adenosintriphosphatase

## 1 Einleitung

Wiederkäuer besitzen ein ausgeprägtes Vormagensystem, das eine besondere evolutionäre Anpassung an ihre rohfaserreiche Kost darstellt. Mithilfe der Mikroorganismen in diesen Vormägen sind Wiederkäuer in der Lage, ansonsten unverdauliche Pflanzenbestandteile effizient aufzuspalten und in Form von kurzkettigen Fettsäuren (*engl.* short chain fatty acids, SCFAs) aufzunehmen (NAGARAJA. 2016). Diese SCFAs dienen den Tieren als Hauptenergiequelle und können bis zu 75 % des Energiebedarfs für den Gesamtorganismus liefern (BERGMAN et al. 1965, BUGAUT. 1987). Dabei wird der Großteil der im Vormagen produzierten SCFAs direkt über das Pansenepithel aufgenommen (ASCHEBACH et al. 2011). In den letzten Jahrzehnten wurde eine Vielzahl an unterschiedlichen Resorptionsmechanismen für SCFAs nachgewiesen: Neben der Aufnahme von protonierten Fettsäuren über lipophile Diffusion wurden auch zunehmend Proteinvermittelte Aufnahmewege sowie elektrogene Resorptionswege über Kanäle beschrieben (GÄBEL et al. 2002, GEORGI et al. 2014). Dabei werden z. T. auch Bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) oder Protonen ( $\text{H}^+$ ) transportiert, sodass der SCFA-Transport auch mit der pH-Homöostase verknüpft ist (ASCHEBACH et al. 2011). Zu den ruminalen Transportproteinen, die in der pH-Homöostase eine entscheidende Rolle spielen, gehören u. a. die Familie der Natrium-Protonen-Austauscher (*engl.*  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers, NHEs) sowie die Monocarboxylattransporter (MCTs; ASCHEBACH et al. 2011).

Die verschiedenen, parallel arbeitenden Aufnahmemechanismen für SCFAs dienen vermutlich der Sicherstellung einer effizienten Resorption der Nährstoffe, insbesondere dann, wenn die Verfügbarkeit der Substrate Schwankungen unterliegt. So sind die Rationen für Hauswiederkäuer in moderner Nutztierhaltung immer mehr auf eine erhöhte Leistung (sowohl im Sinne der Milch- als auch der Fleischproduktion) ausgelegt. Dies führt häufig zu dem vermehrtem Einsatz eines stärkereichen Konzentrates im Futter, infolgedessen wiederum die SCFA-Konzentration im Pansenlumen steigt (GIGER-REVERDIN et al. 2014), da Getreide ruminal leichter und schneller aufgeschlossen wird als Rohfaser (PLAIZIER et al. 2008). In der Vergangenheit wurden wiederholt Anpassungsreaktionen des Pansenepithels an gesteigerte Energiemengen des Futters beobachtet. So konnte neben einer erhöhten Elektrolyt- und SCFA-Resorption auch eine Zunahme der Papillengröße oder des Gesamtgewichtes der Vormägen festgestellt werden (SEHESTED et al. 1997, ETSCHMANN et al. 2009, GORKA et al. 2009). Die genaue Kenntnis des Ablaufs dieser Adaptationsmechanismen ist nicht nur von entscheidender Bedeutung für unser Verständnis der physiologischen Vorgänge im Pansenepithel, sondern könnte auch für eine leistungsgerechte Fütterung, die den physiologischen Bedürfnissen des

Wiederkäuers entspricht, von Relevanz sein, um möglichen Stoffwechselentgleisungen wie der Pansenazidose vorzubeugen.

Einige der erwähnten Anpassungsreaktionen des Pansenepithels werden vermutlich durch das vermehrte Anfluten von SCFAs ausgelöst. Dies setzt allerdings voraus, dass das Gewebe in der Lage ist, die aktuelle SCFA-Konzentration im Pansenlumen bzw. -epithel zu erfassen. Im Gastrointestinaltrakt sowie in weiteren Geweben von Monogastriern wurden in letzter Zeit zunehmend sogenannte Freie Fettsäurerezeptoren (*engl.* free fatty acid receptors, FFARs) detektiert, die als Sensoren z. B. SCFAs wahrnehmen und verschiedene Signalketten in Gang setzen. Dabei konnte u. a. ein Einfluss auf intestinale Sekretionsprozesse, aber auch auf den Energiestoffwechsel des Gesamtorganismus entsprechend der aktuellen Energieversorgung bei Nagetieren festgestellt werden (HARA et al. 2014).

Es ist denkbar, dass auch im Wiederkäuervormagen FFARs an der Rezeption von Fettsäuren beteiligt sind und über die Bindung von SCFAs an diese Rezeptoren Adaptationsmechanismen im Vormagenepithel initiiert werden. Diese Vermutung wird gestützt durch Befunde von WANG et al. (2012a). Die Autoren konnten bereits die Expression von einem Vertreter der FFARs (FFAR2) im bovinen Pansenepithel immunhistochemisch nachweisen. Ob die am bovinen Vormagen erhobenen Befunde auch auf das ovine Pansenepithel übertragen werden können und ob hier noch weitere Isoformen der FFARs exprimiert werden, wird im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit untersucht.

Da die FFARs, die SCFAs als Liganden akzeptieren, alle u. a. über inhibitorische G $\alpha$ -Untereinheiten an den transmembranären Rezeptorteil gekoppelt sind, können sie ähnliche intrazelluläre Signalkaskaden auslösen (PRIYADARSHINI et al. 2018). Daher wird im zweiten Teil der Arbeit untersucht, ob SCFAs als Liganden der FFARs in der Lage sind, die intrazellulären Spiegel des Signalmoleküls zyklisches Adenosinmonophosphat (*engl.* cyclic adenosine monophosphate, cAMP) zu modulieren.

Aus anderen Geweben und teilweise auch aus dem Pansen ist bekannt, dass cAMP Einfluss auf Transportproteine nehmen kann, die den pH-Wert der Zellen regulieren (GÄBEL et al. 1999, KRISHNAN et al. 2003, BORTHAKUR et al. 2012). Deshalb wird im letzten Abschnitt die Möglichkeit der Aktivitätsmodulation von NHEs und MCTs durch das intrazelluläre Signalmolekül cAMP evaluiert.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Bedeutung kurzkettiger Fettsäuren für den Wiederkäuer

Wiederkäuer sind herbivore Lebewesen, deren Hauptnahrungsmittel sogenannte Strukturkohlenhydrate in zellulose-, hemizellulose- und pektinreichen Pflanzen darstellen. Ihr ausgeprägtes Vormagensystem, in dem die größte Fermentationskammer, der Pansen, mit der kranial gelegenen Haube eine funktionelle Einheit als Retikulorumen bildet, ermöglicht ihnen im Kontrast zu Organismen mit einhöhligen Magen, rohfaserreiche Nahrung effizient mikrobiell aufzuschließen und daraus den Hauptteil der benötigten Energie zu ziehen (NAGARAJA. 2016).

Modernes Milchkuhfutter, das zu etwa 65 % des Trockenmasseanteils aus Kohlenhydraten besteht, wird bis zu 90 % im Retikulorumen abgebaut (CHIBISA et al. 2016). Die durch mikrobielle Fermentation entstehenden Hauptabbauprodukte der Nahrung sind SCFAs (Azetat, Propionat und Butyrat), Methan, H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> (BUGAUT. 1987, NOZIÈRE et al. 2011). So werden nach ASCHENBACH et al. (2011) bei der Fütterung von 90 % der *ad libitum* Ration im Vormagen von Schafen (ca. 70 kg) schätzungsweise 15 M/d SCFAs produziert, während bei Rindern unter moderater Fütterung (13 kg/d Trockenmasse) 80-90 M/d SCFAs anfluten können. Dabei unterscheiden sich die Verhältnisse der einzelnen Fettsäuren im Panseninhalt zueinander in Abhängigkeit vom Futter: Bei niedrigem Krafftfutteranteil liegt das Konzentrationsverhältnis für Azetat, Propionat und Butyrat prozentual bei ca. 70:20:10. Es kann durch Erhöhung des Krafftfutteranteils bis auf 55:30:15 verschoben werden (PENNER et al. 2009b, NOZIÈRE et al. 2011).

SCFAs können bis zu 75 % des Energiebedarfs eines adulten Schafes liefern, sind aber auch Hauptenergiequelle für das Vormagenepithel (BERGMAN et al. 1965, BUGAUT. 1987, BRITTON und KREHBIEL. 1993). Der überwiegende Teil der im Vormagen produzierten SCFAs wird dafür direkt über das Pansenepithel absorbiert und nur ein geringerer Teil gelangt über den Labmagen in den Darm (ASCHENBACH et al. 2011). Um der großen Menge anflutender SCFAs gerecht zu werden, bedarf es effizienter Resorptionsmechanismen im Pansenepithel, welche im Folgenden vorgestellt werden sollen.

### 2.2 Transport kurzkettiger Fettsäuren über das Pansenepithel

Das Pansenepithel muss zum einen Nährstoffe aus dem Pansenlumen aufnehmen und teilweise verstoffwechseln und zum anderen unerwünschte Stoffe am Übertritt ins Körperinnere hindern. Dabei trägt die strukturelle Beschaffenheit des Epithels bereits einen wesentlichen Teil zur Erfüllung dieser Aufgaben bei: In den äußeren Schichten zwischen dem *Stratum corneum* und dem *Stratum granulosum* sind v. a. abdichtende

Strukturen in Form von Tight-Junctions zu finden, die einen parazellulären Transport vieler Substrate verhindern (GRAHAM und SIMMONS. 2005, STUMPF et al. 2011). Um dennoch große Stoffmengen in die Blutbahn aufnehmen zu können, erleichtern sogenannte Gap-Junctions (Zell-Zell-Kanäle) den Transport von SCFAs und weiteren Substraten durch das Zytosol der Epithelzellen (transzellulär) von apikal nach basolateral (GRAHAM und SIMMONS. 2005). In diesem Sinne bildet das Pansenepithel ein funktionelles Synzytium, dessen apikale (zum Lumen orientierte) und basolaterale (zum Blut orientierte) Membranen besondere Hindernisse für die Resorption der Substrate darstellen.

Die Aufnahme von SCFAs wurde lange Zeit überwiegend als passiver Transport angesehen, der vorrangig elektroneutral abläuft und ausschließlich vom Konzentrationsgradienten getrieben wird (RECHKEMMER et al. 1995). Der Konzentrationsgradient ist vom Pansenlumen ins Blut gerichtet, wobei die luminale SCFA-Konzentration Schwankungen zwischen ca. 70 bis 150 mM unterliegt (NIKKHAH. 2012, VAN LINGEN et al. 2017). Nach BERGMAN (1990) erreicht die SCFA-Konzentration im Blut hingegen Werte zwischen 1 bis 2 mM. Diese Konzentrationsunterschiede zwischen Pansenlumen und Blut bilden die Grundlage der starken Triebkraft für die SCFA-Resorption aus dem Pansenlumen.

Die Aufnahme der SCFAs in die Epithelzellen und die Abgabe ins Blut kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen: Mittels parazellulärer Permeation, transzellulär durch lipophile Diffusion und unter Zuhilfenahme von Transportproteinen und Kanälen.

Die parazelluläre Permeation scheint allerdings eine geringe Rolle zu spielen. Das liegt darin begründet, dass die oben beschriebenen Tight-Junctions eine sehr effiziente Abdichtung zwischen den Epithelzellen gewährleisten, was den parazellulären Übertritt von Substraten erschwert. Auch experimentelle Daten sprechen gegen einen parazellulären Übertritt: Da die SCFAs im Pansenlumen zum großen Teil als Anionen vorliegen (siehe unten) wäre ein parazellulärer Transport elektrogen. Dieser müsste folglich durch eine Änderung der transepithelialen Potenzialdifferenz beeinflusst werden können. Eine deutliche parazelluläre elektrogene Permeation macht jedoch nur einen vernachlässigbaren Teil der gesamten SCFA-Permeation aus (SEHESTED et al. 1999b, RACKWITZ. 2012).

### **2.2.1 Apikale Aufnahme in das Pansenepithel**

Lange Zeit wurde die passive Aufnahme von protonierten SCFAs (HSCFAs) als Hauptmechanismus für die apikale Resorption angesehen. Der Umfang dieser wird allerdings zunehmend in Frage gestellt: Rechnerisch nimmt mit zunehmender Kettenlänge der Fettsäuren (Azetat < Propionat < Butyrat) aufgrund der gesteigerten Lipophilie deren Permeabilität zu (WALTER und GUTKNECHT. 1986). *In vivo*

(DIJKSTRA et al. 1993) und *in vitro* (SEHESTED et al. 1999a) konnte eine entsprechende Zunahme der Absorptionsraten der drei SCFAs jedoch nur in viel geringerer Ausprägung als rechnerisch ermittelt beobachtet werden (WALTER und GUTKNECHT. 1986, GÄBEL et al. 2002). Zweifel an einer vorrangig lipophilen Diffusion der SCFAs werden auch durch eine geringe Abhängigkeit der SCFA-Resorption vom pH-Wert verstärkt: Eine Abnahme des pH-Wertes verschiebt das Verhältnis von HSCFA:SCFA<sup>-</sup> gemäß der Henderson-Hasselbalch-Gleichung

$$pH = pK_s + \log_{10} \frac{SCFA^-}{HSCFA}$$

zugunsten der protonierten Fettsäuren, wodurch sich wiederum die Aufnahme über lipophile Diffusion erhöhen sollte. Im Bereich des physiologischen pH-Wertes des Schafpannsens von 5,5 bis 7,0 (VON ENGELHARDT et al. 2015) liegen die SCFAs, deren pK<sub>s</sub>-Wert ~4,8 beträgt (CISTOLA et al. 1982), v. a. als dissoziierte Säuren (SCFA<sup>-</sup>) vor (ASCHEBACH et al. 2011). Eine experimentelle Senkung des pH-Wertes führte zwar zu einer Steigerung der Transportrate für SCFAs, jedoch auch hier weitaus geringer als rechnerisch nach obenstehender Gleichung vorausgesagt (KRAMER et al. 1996, SEHESTED et al. 1999a). Schließlich konnte nach einer Erhöhung der luminalen SCFA-Konzentration eine stetige, lineare Zunahme der Transportkapazitäten für Azetat, jedoch nicht für Butyrat und Propionat festgestellt werden (DIJKSTRA et al. 1993, SEHESTED et al. 1999b). Dies spricht im Fall von Butyrat und Propionat gegen eine überwiegende Aufnahme per Diffusion.

All diese Untersuchungen weisen zwar auf eine Beteiligung einer lipophilen Diffusion von HSCFAs hin, zeigen jedoch auf, dass dies nicht der alleinige Aufnahmemechanismus für Fettsäuren aus dem Pansenlumen sein kann. Die Resorption über Protein-vermittelte Mechanismen scheint ein weiterer Weg zu sein. So fanden RECHKEMMER et al. (1995) und auch KRAMER et al. (1996) frühzeitig Hinweise auf einen apikalen Anionenaustauscher im Pansenepithel. In diversen *in vitro*-Studien wurde der SCFA-Transport als sensitiv gegenüber Inhibitoren von Anionenaustauschern (4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonsäure (DIDS) sowie Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) und Cl<sup>-</sup> charakterisiert (RECHKEMMER et al. 1995, KRAMER et al. 1996, ASCHEBACH et al. 2009). Überdies wurde eine teilweise Abhängigkeit von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> belegt (SEHESTED et al. 1999b, ASCHEBACH et al. 2009). Diese Untersuchungen deuten auf einen Austauschmechanismus mit HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> hin. Mögliche Kandidaten für diese Antiporter wurden v. a. auf Ebene der Genexpression detektiert: Sowohl der Anionenaustauscher 2 (*engl.* anion exchanger 2, AE2) als auch Down-regulated in Adenoma (DRA) und der Putative Anionentransporter 1 (PAT1) konnten als Botenribonukleinsäure (*engl.* messenger ribonucleic acid, mRNA) im Pansenepithel nachgewiesen werden (BILK et al. 2005). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Genexpression dieser Transporter hochreguliert wird, wenn der luminal pH-Wert vermindert oder die luminal SCFA-Konzentration im Pansenlumen erhöht wird (YAN

et al. 2014). Dies könnte als eine Adaptation der Resorptionsvorgänge an schwankende luminale Konditionen interpretiert werden und somit für eine Beteiligung genannter Antiporter an der SCFA-Resorption sprechen. Es fehlen bislang jedoch funktionelle Untersuchungen, die die Beteiligung dieser SCFA<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher an der SCFA-Resorption eindeutig belegen.

Neben der Beteiligung von Anionenaustauschern an der luminalen Aufnahme von SCFAs wird auch die Beteiligung eines MCT bzw. eines Na<sup>+</sup>-gekoppelten MCT (SMCT) diskutiert. Von dem MCT wird angenommen, dass er SCFA<sup>-</sup> im Symport mit H<sup>+</sup> über die apikale Membran des Pansenepithels transportieren könnte. Die MCT4-Isoform wurde immunhistochemisch in den apikalen Schichten des Pansenepithels nachgewiesen (KIRAT et al. 2007). Funktionelle Untersuchungen des Transporters sind bislang zwar teilweise widersprüchlich, deuten aber darauf hin, dass dessen quantitative Rolle an der Gesamt-SCFA-Aufnahme vermutlich gering ist (KIRAT et al. 2006b, ASCHENBACH et al. 2009). Untersuchungen von RACKWITZ et al. (2012) lassen auf die Beteiligung eines SMCT1 schließen, der anstelle von H<sup>+</sup> (wie beim MCT4) Na<sup>+</sup>-Ionen im Symport mit SCFA<sup>-</sup> transportiert.

Abgesehen von den bisher erläuterten elektroneutralen Aufnahmemechanismen liegen auch Hinweise für einen teilweise elektrogenen SCFA-Transport vor. Elektrophysiologische Untersuchungen an kultivierten Pansenepithelzellen sowie isolierten Pansenepithelien unterstützen die Annahme eines Anionenkanals, der für Azetat (evtl. auch Butyrat und Propionat) passierbar ist (SEHESTED et al. 1999b, STUMPF et al. 2009, GEORGI et al. 2014, RACKWITZ und GÄBEL. 2018).

Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass sich die relativen Anteile der bisher beschriebenen Transportvorgänge an der Resorption von SCFAs in das Pansenepithel bislang nicht eindeutig abgrenzen lassen, da sie zum einen von äußeren Einflüssen (z. B. der Fütterung) abhängig sind (CHIBISA et al. 2015), aber sich vermutlich auch für die einzelnen SCFAs uneinheitlich gestalten. So postuliert PENNER (2014) in einem Review, dass die verschiedenen SCFAs unterschiedliche Aufnahmewege bevorzugen, sodass z. B. Azetat v. a. auf HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-abhängige Weise resorbiert wird, wohingegen Butyrat eher HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-unabhängig aufgenommen wird. Die Bedeutung des elektrogenen Transportes an der Gesamtresorption von SCFAs im Pansenepithel ist bislang ungeklärt, scheint aber insgesamt unbedeutend zu sein (RACKWITZ und GÄBEL. 2018).

### **2.2.2 Basolaterale Ausschleusung in den Blutstrom**

Betrachtet man die basolaterale Abgabe der Fettsäuren und derer durch Katabolismus im Epithel entstandenen Metaboliten (siehe 2.3 *Metabolisierung kurzkettiger Fettsäuren im Pansenepithel*), so erscheint eine lipophile Diffusion auf der Blutseite

als vernachlässigbar: Zunächst liegen bei einem intrazellulären pH-Wert von ca. 7,4 nahezu alle SCFAs dissoziiert vor (MÜLLER et al. 2000). Diese SCFA<sup>-</sup> wie auch die im Katabolismus entstehenden Ketonkörper sind wenig lipophil und passieren somit schlecht die Zellmembran (LEO et al. 1971). Da auch der pH-Wert im Blut ca. 7,4 beträgt (SINET et al. 1985), liegt gemäß der oben beschriebenen Henderson-Hasselbalch-Gleichung unter physiologischen Bedingungen kein oder nur ein geringer HSCFA-SCFA-Gradient vor, sodass auch der Antrieb für die passive Diffusion aus dem Zytosol in Richtung Blut wegfällt.

Daher ist anzunehmen und auch untersetzt, dass auch basolateral Proteine maßgeblich an der Abgabe von SCFAs in das Blut beteiligt sind. Gemäß *in vitro*-Untersuchungen wird ein beträchtlicher Teil des SCFA-Transportes durch basolaterale Anionenaustauscher vermittelt (DENGLER et al. 2014). Die obengenannten Genexpressionsanalysen von BILK et al. (2005) legen nahe, dass HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher wie AE2, DRA und PAT1 an diesem Transport über das Pansenepithel beteiligt sind. Allerdings konnte bislang lediglich PAT1 immunhistochemisch in den basolateralen Zellschichten des Pansenepithels nachgewiesen werden (ALAMEEN OMER et al. 2014). Neben diesen klassischen HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauschern spielt auch der MCT1 für den Efflux in den Blutstrom eine entscheidende Rolle: Nachdem die Expression des Proteins besonders markant in den Zellen des *Stratum basale* dargestellt werden konnte (MÜLLER et al. 2002, GRAHAM et al. 2007), wurde er als Transporter für SCFA-Metaboliten (v. a. Laktat,  $\beta$ -Hydroxybutyrat ( $\beta$ -HB) sowie Azetoazetat) als auch SCFA<sup>-</sup> selbst charakterisiert, die sowohl im Symport mit H<sup>+</sup> als auch im Antiport mit HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transportiert werden können (MÜLLER et al. 2002, KIRAT et al. 2006b, DENGLER et al. 2014).

Ähnlich der apikalen Aufnahme wird auch ein elektrogener Efflux der SCFA<sup>-</sup> in das Blut diskutiert: STUMPPFF et al. (2009) und GEORGI et al. (2014) fanden an kultivierten Pansenepithelzellen eine Anionen-Leitfähigkeit für SCFAs und verorten diese als Maxi-Anionen-Kanal in der basalen Zellmembran des Pansenepithels. Die Bedeutung des Kanals ist *in vivo* jedoch noch nicht ermittelt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bereits eine Vielzahl an Transportvorgängen zur apikalen Aufnahme der SCFAs aus dem Pansenlumen wie auch zur basolateralen Abgabe in den Blutkreislauf charakterisiert sind. Diese Vorgänge laufen vermutlich parallel und bilden dadurch ein redundantes System, sodass der Transport von SCFAs unter vielen Bedingungen sichergestellt ist. Dabei scheinen hauptsächlich elektroneutrale Prozesse stattzufinden, die überwiegend durch Proteine vermittelt werden.

Die SCFA-Resorption sichert nicht nur die nutritive Versorgung des gesamten Organismus, sondern ist auch für das Epithel selbst von fundamentaler Bedeutung.

Deshalb soll im nächsten Kapitel der intraepitheliale Metabolismus eingehend vorgestellt werden.

### **2.3 Metabolisierung kurzkettiger Fettsäuren im Pansenepithel**

SCFAs werden im Pansenepithel in unterschiedlichem Ausmaß katabolisiert. Dies dient zunächst der Ernährung des Epithels selbst, das im Gegensatz zu vielen weiteren Geweben SCFAs anstatt Glucose oder Glutamin als wesentliche Energiequelle nutzt (BRITTON und KREHBIEL. 1993). Daneben fördert der intraepitheliale Abbau der SCFAs auch den Erhalt des SCFA-Konzentrationsgradienten über die apikale Membran, wodurch die Fettsäuren leichter aufgenommen werden können (GÄBEL et al. 2001). Ein weiterer Vorteil des Katabolismus ist die Produktion der Ketonkörper selbst, die in den peripheren Geweben als Energielieferanten bzw. im Euter zur Milchfettsynthese genutzt werden können (REYNOLDS et al. 1988, GÄBEL et al. 2002). Schließlich kann durch den Abbau der SCFAs eine mögliche Schädigung durch übermäßige SCFA-Anflutung, v. a. durch Butyrat, vermieden werden. Auf diese wird im Kapitel 2.6 *Rolle des Butyrats* bzw. noch genauer in Publikation 1, *Catabolism of SCFA in the ruminal epithelium and its advantages* eingegangen.

Zum Ausmaß des intraepithelialen Katabolismus bestehen unterschiedliche Angaben, sodass die Metabolisierungsraten für Azetat, Propionat bzw. Butyrat zwischen 30 %, 50 % bzw. 90 % der intraruminal produzierten SCFAs (BERGMAN. 1990) bis zu 16 %, 33 % respektive 70 % der intraruminal infundierten SCFAs (NOZIÈRE et al. 2000) angegeben werden. KRISTENSEN et al. (2000a) postulieren, dass die Azetat-Metabolisierung schwer abzuschätzen sei und möglicherweise unterschätzt werde, da diese Fettsäure durch Interkonversion aus Butyrat, Isovalerat oder Valerat metabolisiert werden könnte (SEHESTED et al. 1999a). Unabhängig vom genauen Ausmaß sind sich alle Autoren jedoch einig, dass Butyrat am stärksten verstoffwechselt wird, wobei neben CO<sub>2</sub> insbesondere  $\beta$ -HB und Azetoazetat als Metaboliten entstehen (WEIGAND et al. 1975, SEHESTED et al. 1999a, KRISTENSEN und HARMON. 2004b). Das anfallende CO<sub>2</sub> reagiert mithilfe der zytosolischen Carboanhydrase (BOND et al. 2019) über H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zu HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> und H<sup>+</sup>. Dies liefert die Substrate sowohl für die apikalen oder basolateralen HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Anionenaustauscher (BILK et al. 2005, ASCHENBACH et al. 2009) als auch für die NHEs oder MCTs (MÜLLER et al. 2000, MÜLLER et al. 2002, RABBANI et al. 2011). Die Metabolisierung dient also nicht nur der Ernährung des Epithels, sondern verstärkt durch die Substratbereitstellung auch die Resorption der SCFAs, während zeitgleich der intrazelluläre pH-Wert reguliert wird (siehe 2.4.2 *pH-Regulation des Pansenlumens*). Das unterschiedliche Ausmaß der Metabolisierung der einzelnen SCFAs kann sowohl auf verschiedene Abbauege der SCFAs (LANE et al. 2002,

KRISTENSEN und HARMON. 2004b, NOZIÈRE et al. 2010) als auch auf unterschiedliche (sich gegenseitig hemmende) aktivierende Azy-CoA-Synthetasen (LEIGHTON et al. 1983, HARMON et al. 1991, BOND et al. 2019) zurückgeführt werden. Da die Ketogenese vorrangig mitochondrial assoziiert ist (LEIGHTON et al. 1983), verorten PENNER et al. (2011) diese v. a. in den basalen Schichten des Pansenepithels, da dort die meisten Mitochondrien nachgewiesen wurden (GRAHAM und SIMMONS. 2005).

Untersuchungen von PENNER et al. (2009b) weisen darauf hin, dass sich die intraepitheliale Metabolisierung an zunehmende SCFA-Konzentrationen anpasst. So konnte in einem Fütterungsversuch an Rindern eine positive Korrelation zwischen der ruminalen Butyrat- und Propionatproduktion und der Plasmakonzentration von  $\beta$ -HB (als Marker der intraepithelialen SCFA-Verstoffwechslung) festgestellt werden. Bei künstlich erhöhter Butyrat-Zufuhr nimmt die  $\beta$ -HB-Konzentration in der Portalvene jedoch nicht adäquat zu (KRISTENSEN und HARMON. 2004a). Es ist also davon auszugehen, dass das Pansenepithel durchaus in der Lage ist, in gewissem Ausmaß seine katabolen Prozesse an veränderte Fütterungsbedingungen anzupassen, es hier aber auch Grenzen gibt.

Es muss folglich festgestellt werden, dass Butyrat für die im Pansenepithel entstehenden Ketonkörper als wichtigstes Substrat dient, das nach momentanem Kenntnisstand vorwiegend in den basalen Bereichen des Epithels abgebaut wird. Das Ausmaß des Abbaus kann vermutlich durch erhöhte Krafffuttergabe in gewissem Rahmen gesteigert werden. Die Regulation dieser Anpassung ist bislang noch unklar.

## **2.4 pH-Homöostase**

### **2.4.1 pH-Regulation des Pansenlumens**

Da wie bereits dargelegt im Vormagensystem große Mengen an SCFAs anfluten, führen die hierdurch anfallenden  $H^+$  auch zu einer Beeinflussung des luminalen pH-Wertes. Während BERGMAN (1990) für Schafe eine physiologische Spanne des intraruminalen pH-Wertes von 5,8-6,8 vermerkt, verweisen ASCHENBACH et al. (2011) auf inhomogene pH-Werte in verschiedenen Bereichen des Retikulumens, die teilweise Abweichungen bis zu 0,73 pH-Einheiten aufweisen (DUFFIELD et al. 2004, ZEBELI et al. 2008). Wird vom Pansen-pH-Wert im Allgemeinen gesprochen, so ist meist der pH-Wert im Bereich des ventralen Pansensacks gemeint (ASCHENBACH et al. 2011).

Nach der Fütterung kommt es zu einer Erhöhung der SCFA-Konzentration und einem parallelen Absinken des pH-Wertes im Pansenlumen (ALLEN. 1997). Die verstärkte Freisetzung von Säureäquivalenten (v. a. SCFAs), mit der das Absinken des pH-Wertes (im physiologischen Bereich) einhergeht, provoziert eine zunehmende

Speichelsekretion, die dem Pansenlumen vermehrt puffernde Substanzen wie  $\text{HCO}_3^-$  zuführt (ALLEN. 1997). Die  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion über das Pansenepithel im Zuge der oben beschriebenen Transportvorgänge wirkt hierbei mehr als unterstützend. Sie kann in ähnlichen quantitativen Bereichen liegen wie die Bereitstellung von  $\text{HCO}_3^-$  aus dem Speichel (ALLEN. 1997). Somit gibt das Pansenepithel nicht nur  $\text{HCO}_3^-$  als Puffer an das Lumen ab, sondern verringert zusätzlich die luminale Säurelast durch Resorption der SCFAs. Neben der Abpufferung durch den Speichel und die Pansenwand, dienen auch das Futter sowie dessen Futterabbauprodukte zur Neutralisierung der Säuren (ALLEN. 1997). Die allgemein vorherrschenden Puffersysteme sind neben dem offenen Bikarbonatpuffer Phosphate, SCFAs selbst, Laktat, Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) sowie Proteine und Aminosäuren (ASCHENBACH et al. 2011). Trotz dieser zahlreichen Puffersysteme kann eine sehr krafftutterreiche Fütterung das Säure-Basen-Gleichgewicht des Vormagens stark gefährden, was sich in Untersuchungen an Schafen von PENNER et al. (2009b) in einer deutlichen Verminderung des durchschnittlichen als auch niedrigsten pH-Wertes sowie langandauernden Perioden mit pH-Werten unter 5,8 äußerte. Wenngleich das Vormagensystem also Anpassungen an verschiedene Fütterungsregimes durch eine Erhöhung des Speichelflusses, eine vermehrte SCFA-Resorption oder eine verstärkte Sekretion puffernder Substanzen vornehmen kann, ist dies doch begrenzt und muss zur Gesunderhaltung der Hauswiederkäuer besonders beachtet werden.

Neben den bereits erwähnten  $\text{HCO}_3^-$ -Austauschern in den apikalen Zellschichten des Pansenepithels spielen auch NHEs eine Rolle in der Regulation des pH-Wertes im Pansenlumen: In den lumenseitigen Zellschichten des Pansenepithels wurden bislang NHE1 und NHE3 immunhistochemisch nachgewiesen (GRAHAM et al. 2007, RABBANI et al. 2011), welche  $\text{H}^+$  aus dem Zytosol im Austausch mit  $\text{Na}^+$  in das Pansenlumen abgeben können und dementsprechend zur Ansäuerung des Lumens beitragen.

Obgleich ein möglichst konstantes pH-Milieu im Pansenlumen für die Arbeitsweise der vorhandenen Mikroben wünschenswert ist, so ist dies doch stets mit der Regulation des pH-Wertes im Inneren der Epithelzellen verbunden. Daher soll im Folgenden auf diese genauer eingegangen werden.

### **2.4.2 pH-Regulation des Pansenepithels**

Unter physiologischen Bedingungen ist das Pansenepithel aufgrund der Fermentationsprozesse im Lumen sowie seiner Resorptionsmechanismen für SCFAs einer permanenten Ansäuerung ausgesetzt: Zunächst wirken die apikal aufgenommenen SCFAs selbst als schwache Säuren, da sie einen  $\text{pK}_s$ -Wert von  $\sim 4,8$  aufweisen (CISTOLA et al. 1982). Wie bereits erläutert, werden diese Fettsäuren sowohl im Anionenaustausch mit  $\text{HCO}_3^-$  als auch als HSCFA (welche dann wiederum

im Zytosol dissoziieren) resorbiert (DIJKSTRA et al. 1993, PENNER et al. 2009a), sodass in beiden Fällen eine Verminderung des intrazellulären pH-Wertes erfolgt. Schließlich kommt es zur Resorption (ASH und DOBSON. 1963) des stark lipophilen Säureäquivalentes  $\text{CO}_2$  (Abbauprodukt der mikrobiellen Fermentation, aus der  $\text{HCO}_3^-$ -Umsetzung sowie der intrazellulären Decarboxylierung der SCFAs; BERGMAN. 1990, MÜLLER et al. 2000). Zum Ausgleich dieser anfallenden Säureäquivalente bzw. der verringerten  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration bedarf es folglich effizienter gegenregulatorischer Mechanismen der Epithelzellen, um eine Azidifizierung des Zytosols zu vermeiden.

Laut CHAO et al. (2018) herrschen in Säugetierzellen hauptsächlich vier Typen der Regulation des intrazellulären pH-Wertes ( $\text{pH}_i$ ) vor: Neben intrazellulären Puffersystemen (z. B. Proteine oder Bikarbonatpuffer) existieren Transporter, die entweder Säureäquivalente ausschleusen (z. B. NHEs) oder ansäuernd wirken (z. B.  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Anionenaustauscher). Die Familie der MCTs wirkt als vierter Typ der  $\text{pH}_i$ -Regulation je nach Konzentrationsgradient der Substrate als Protonen-Aufnehmer oder -Ausschleuser (CHAO et al. 2018).

Diese für Säugetierzellen im Allgemeinen gültigen Regulationstypen des  $\text{pH}_i$  spielen auch im Pansenepithel eine wesentliche Rolle: So konnten in epithelialen Plasmamembranen einerseits z. B. NHEs als Säureäquivalent-Ausschleuser und der MCT1 als ambivalenter Transporter, aber andererseits auch die zytosolische Carboanhydrase als Katalysator im  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystem nachgewiesen werden (BOND et al. 2019). Zu den wichtigsten Anionenaustauschern im Pansen gehören vermutlich die von BILK et al. (2005) auf mRNA-Ebene nachgewiesenen  $\text{HCO}_3^-$ -Transporter PAT1, DRA und AE2. Der von HUHN et al. (2003) entdeckte und basolateral vermutete Natrium- $\text{HCO}_3^-$ -Ko-Transporter führt ebenfalls zu einer  $\text{HCO}_3^-$ -Aufnahme aus dem Blut.

Bezüglich der Säureäquivalent-Ausschleuser ist anzunehmen, dass sowohl der NHE3 als auch der NHE1 apikal an der Homöostase des Epithels beteiligt sind, da beide Isotypen immunhistochemisch im Pansen des Rindes und z. T. auch des Schafes in den apikalen Epithelschichten nachgewiesen werden konnten (GRAHAM et al. 2007, RABBANI et al. 2011). Im Zuge einer verstärkten epithelialen Ansäuerung konnte eine Zunahme der Aktivität der NHEs in Pansenepithelzellen nachgewiesen werden (MÜLLER et al. 2000, PENNER et al. 2011), was deren Bedeutung in der Anpassung an variierende pH-Werte aufzeigt. Während der NHE3 auch funktionell im Epithel des Schafpansens nachgewiesen wurde (RABBANI et al. 2011), ist dies für den NHE1 bislang noch nicht weiter untersucht. Neben den NHEs konnten ETSCHMANN et al. (2006) einer  $\text{vH}^+$ -ATPase (Vakuoläre  $\text{H}^+$ -Adenosintri-phosphatase) eine zentrale Rolle in der  $\text{H}^+$ -Ausschleusung in kultivierten Pansenepithelzellen zuschreiben.

MCTs sind – wie in anderen Säugetierzellen – auch im Pansen von entscheidender Bedeutung. Der luminal orientierte MCT4 könnte SCFAs aus dem Pansenlumen im Symport mit  $H^+$  aufnehmen (KIRAT et al. 2007, HALESTRAP. 2013). Vermutlich spielt dies jedoch unter physiologischen Bedingungen nur eine geringe Rolle (ASCHENBACH et al. 2009). MCT2 wie auch MCT4 konnten basal des *Stratum corneum* als schwaches, diffus intrazelluläres Signal immunhistochemisch nachgewiesen werden (GRAHAM et al. 2007, KIRAT et al. 2007). Diese zwei Isoformen könnten daher an der pH-Regulation sowie dem Monocarboxylattransport zwischen intrazellulären Organellen und dem Zytosol beteiligt sein (KIRAT et al. 2007). Dies würde die Stabilisierung des pH-Wertes im Zytosol unterstützen und könnte die Zelle vor metabolischen Entgleisungen bewahren. MCT1 hingegen ist entscheidend an der basolateralen Ausschleusung sowohl von SCFAs und deren Metaboliten als auch an der Alkalisierung des Epithels durch den Symport mit  $H^+$  bzw. den Antiport mit  $HCO_3^-$  beteiligt (MÜLLER et al. 2002, DENGLER et al. 2014). Sofern der apikale MCT4 *in vivo* von quantitativer Bedeutung sein sollte, trägt dieser also im Gegensatz zu MCT1 und den intrazellulären MCTs immer zu einer Azidifizierung des Zytosols bei, während MCT1 stets mit einer Alkalisierung des Epithels verbunden ist. Die MCTs in den Membranen der Zellorganellen könnten hingegen Schwankungen des pH-Wertes in beide Richtungen ausgleichen.

## 2.5 Anpassungsmechanismen des Pansenepithels

Fütterungsstudien mit zum Teil starken Änderungen der Ration zeigten wiederholt eine große Anpassungsfähigkeit des Pansenepithels an variierende Bedingungen (KLEVENHUSEN et al. 2013, SCHURMANN et al. 2014). Die zugrundeliegenden Signalwege zur Verstärkung oder Verminderung der Aktivität von Transportproteinen der pH-Regulation sind bislang jedoch nur unzureichend untersucht und von großem Interesse für die vorliegende Arbeit. Ein besseres Verständnis dieser Mechanismen könnte letztlich auch zur Minderung des Risikos einer fütterungsbedingten Pansenazidose der Wiederkäuer beitragen und ist daher sowohl im Sinne des Tierwohls als auch ökonomisch relevant.

Da Wiederkäuer im Rahmen der Nutztierhaltung in Industrienationen einer wesentlich kraftfutterreicheren Diät ausgesetzt sind als dies evolutionär bedingt in ihren natürlichen Habitaten vorkommt (HACKMANN und SPAIN. 2010, KLEVENHUSEN et al. 2013), wurden in den vergangenen Jahrzehnten auch vermehrt die Anpassungsmöglichkeiten des Pansenepithels an unterschiedliche Fütterungsbedingungen untersucht. Dabei trat eine Vielzahl bemerkenswerter Adaptationen zutage:

Bei einer starken Futterreduktion bzw. einem vollständigen Futterentzug wurde bei Schafen innerhalb weniger Tage eine verminderte SCFA-Konzentration im Pansen,

die mit einer verringerten SCFA-Resorption und dem Auftreten eines alkalischen intraruminalen pH-Wertes einherging, beobachtet (GÄBEL et al. 1993, ALBORNOZ et al. 2013). Dabei fiel z. T. eine tendenziell verminderte Azetat-Aufnahme auf, wohingegen die Aufnahme von Propionat und Butyrat verhältnismäßig unbeeinflusst blieb (ZHANG et al. 2013). Die Autoren mutmaßten, dass dies an einer verminderten Aktivität epithelialer Zellen bzw. einer Herunterregulation von Transportproteinen für die Azetat-Resorption liegen könnte (ZHANG et al. 2013). Die Reduktion der Fütterungsmenge beeinflusst also die SCFA-Resorption und in diesem Zuge sowohl die pH-Regulation des Pansenlumens als auch das Milieu der Epithelzellen.

Eine substratabhängige Anpassung der Transportvorgänge sowohl für SCFAs als auch für regulierende Puffersubstanzen an aktuelle Konditionen im Pansenlumen wäre aber nicht nur für restriktive Fütterungsregimes sinnvoll. Tatsächlich treten auch bei Zunahme der Fütterungsmenge bzw. der Energiedichte Veränderungen auf funktioneller und später auch morphologischer Ebene auf. So kommt es bei verstärkter Krafftuttergabe zu einer Erhöhung der SCFA-Absorptionsraten (GÄBEL et al. 1991a). Solche Anpassungen an veränderte Fütterungsregimes konnten häufig bereits auf funktioneller Ebene wahrgenommen werden, obwohl morphologisch noch keine Adaptationen, wie eine Erhöhung der Gesamtoberfläche oder der Anzahl der Zellschichten des Epithels, feststellbar waren: Beispielsweise führte die Fütterung mit gesteigerter Krafftuttermenge in der Ration wiederholt zu einer vermehrten Na<sup>+</sup>- als auch SCFA-Aufnahme in das Pansenepithel, während morphologische Veränderungen im Sinne einer vergrößerten Oberfläche oder histologisch sichtbarer Änderungen der Struktur des Pansenepithels ausblieben bzw. erst nach Wochen zu beobachten waren (SEHESTED et al. 1997, ETSCHMANN et al. 2009, SCHURMANN et al. 2014). SEHESTED et al. (1997) und ETSCHMANN et al. (2009) mutmaßten, dass Änderungen der Membranzusammensetzung bzw. der Einbau von Transportproteinen in die Zellmembran ursächlich für die erhöhte Resorption sein könnten. Dies wird unterstützt durch neuere Studien, die eine vermehrte mRNA-Expression von Transportern, die in die SCFA-Aufnahme (DRA, AE2, MCT1) und pH-Homöostase des Pansenepithels (NHEs) involviert sind, nach verstärkter Krafftuttergabe registrierten (YAN et al. 2014). KLEVENHUSEN et al. (2013) und SCHURMANN et al. (2014) konnten zeigen, dass im Anschluss an Fütterungsversuche mit erhöhtem Krafftutteranteil eine allgemein gesteigerte Permeabilität des Pansenepithels auftrat. Mehrere Untersuchungen deuten dabei darauf hin, dass eine Umstellung des Futters eine Änderung der quantitativen Bedeutung der einzelnen Absorptionswege für die verschiedenen SCFAs hervorruft (SCHURMANN et al. 2014, CHIBISA et al. 2015).

Neben diesen funktionellen Anpassungen kommt es langfristig auch zu morphologischen Veränderungen des Epithels, welche laut einer frühen Untersuchung

an laktierenden Rindern am deutlichsten sechs Wochen nach Fütterungsumstellung von rohfaserreichem auf konzentratreiches Futter sichtbar werden (LIEBICH et al. 1987). Dabei reagiert das Epithel oftmals mit einer Anpassung der Gesamtoberfläche sowie der Zellanzahl der einzelnen Epithelschichten an ein variierendes Nahrungsangebot (KAUFFOLD et al. 1975, DIRKSEN et al. 1984, GÄBEL et al. 1987).

Auch in pathologischen Situationen zeigt das Pansenepithel große Adaptationsfähigkeiten: STEELE et al. (2011) konnten bei erhöhter Krafftutergabe bei Rindern eine sogenannte „subakute Pansenazidose“ (*engl.* subacute ruminal acidosis, SARA) induzieren, die innerhalb der ersten Woche eine verminderte Integrität des Epithels hervorrief. Diese äußerte sich in mikroskopisch sichtbaren Läsionen und verminderten Tight-Junction-Proteinen (STEELE et al. 2011). Anschließend kam es zu Anpassungsreaktionen der Mukosa, sodass die Schichtdicke des Epithels und die Integrität der Epithelzellen wieder zunahm (STEELE et al. 2011). Untersuchungen von PENNER et al. (2009a) an Schafen weisen jedoch darauf hin, dass diese Anpassungsreaktionen nicht immer gleichartig ablaufen: So konnten nach der oralen Applikation von Glucose die Versuchstiere entsprechend ihres Pansen-pH-Wertes in SARA-sensible (d. h. der pH-Wert lag für mehr als 20 Minuten unter 5,8) und nicht-reaktive Tiere eingeteilt werden. In anschließenden Untersuchungen in Ussing-Kammern wiesen die Epithelien der nicht-reaktiven Tiere signifikant höhere Absorptionsraten von Azetat und Butyrat auf (PENNER et al. 2009a). Es scheinen folglich tierindividuelle Kapazitäten für die Anpassung an Fütterungsveränderungen vorzuliegen, deren geringe Ausprägung bei einigen Individuen zu pathologischen Erscheinungen wie SARA führen könnten.

Abschließend lässt sich also feststellen, dass als Reaktion auf ein verändertes Fütterungsregime sowohl morphologische Veränderungen im Rahmen des gesamten Epithels als auch funktionelle Änderungen der einzelnen Zellen auftreten. Die unter *2.2 Transport kurzkettiger Fettsäuren über das Pansenepithel* dargelegte Vielzahl an SCFA-Transportwegen beruht auf einer Redundanz von v. a. Protein-vermittelten Aufnahmemechanismen. Hinter den hier beschriebenen funktionellen, zellulären Anpassungen des Pansenepithels wird oftmals eine Änderung der Dichte dieser Transportproteine oder deren Aktivität vermutet. Eine Anpassung der quantitativen Anteile der einzelnen Transportwege an das Substratangebot wäre für den Organismus günstig, um nicht alle Transportprozesse unter hohem Energieaufwand permanent gleichermaßen aktiv zu halten. Dies würde jedoch bedeuten, dass das Epithel die veränderten luminalen Verhältnisse detektieren kann und dementsprechend beständig geringgradige Adaptationen der Vorgänge im Epithel vornehmen muss. Die möglichen epithelialen Sensoren sowie die Regulation der darauf folgenden Anpassungsprozesse, insbesondere der Steuerung für pH-regulative Transporter, sind bislang jedoch noch nicht genauer geklärt.

## 2.6 Rolle des Butyrats

Unter den im Vormagen produzierten SCFAs kommt Butyrat eine besondere Rolle zu, denn sowohl für den Darm als auch für den Vormagen gibt es Hinweise auf lokale, d. h. am Ort der Freisetzung wirkende, protektive und proliferative wie auch genomische Effekte dieser Fettsäure. In einem Review heben STILLING et al. (2016) die zahlreichen Auswirkungen von Butyrat im Gastrointestinaltrakt hervor, wobei der SCFA neben der Entzündungshemmung auch Einflüsse auf das Immunsystem und die Ausbildung von Tight-Junction-Proteinen zugewiesen werden. Die antiinflammatorischen Eigenschaften werden dabei v. a. auf die Inhibition des Nukleärer Faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-Signalweges und die Hemmung proinflammatorischer Zytokine zurückgeführt (BAILÓN et al. 2010, STILLING et al. 2016). Genomische Effekte wie die Hoch- und Herunterregulation verschiedener Tight-Junction-Proteine zur Stabilisierung der Darmbarriere werden dabei laut PLÖGER et al. (2012) oft über eine veränderte Histon-Azetylierung vermittelt.

Während Untersuchungen im Darm vor allem auf die Rolle des Butyrats in Entzündungsprozessen abzielen, deuteten bereits frühe Untersuchungen im Vormagen von Wiederkäuern auf dessen positive Effekte für die Entwicklung des Pansens: Während bei neugeborenen Wiederkäuern das Pansenepithel Butyrat und Glucose in ähnlichem Ausmaß metabolisiert, stellt die Fettsäure das bevorzugte Substrat des Epithels im adulten Tier dar (BALDWIN und JESSE. 1992, BRITTON und KREHBIEL. 1993). Bereits 1959 gelangen SANDER et al. der Nachweis des positiven Einflusses von Propionat und Butyrat auf das Papillenwachstum des Pansens. Vor allem eine schnelle und starke Erhöhung der Butyrat-Konzentration scheint eine verstärkte Proliferation des ovinen Pansenepithels zu provozieren (SAKATA und TAMATE. 1978), was auf eine verstärkte Mitose und eine verminderte Apoptose (im Vergleich zu Propionat) zurückzuführen sein könnte (MENTSCHHEL et al. 2001). Neben diesem stimulierenden Einfluss auf die Pansenpapillen scheint Butyrat auch auf die Pansenentwicklung im Allgemeinen einen positiven Einfluss zu haben. So zeigte sich eine verstärkte Zunahme des Vormagengewichtes (im Verhältnis zum Labmagen) von mit Na-Butyrat-supplementierten Bullenkälbern und Ziegen im Vergleich zu Kontrolltieren ohne Butyrat-Gabe (GORKA et al. 2009, MALHI et al. 2013).

Die positive Wirkung auf das Vormagensystem konnte allerdings nicht nur bei Jungtieren beobachtet werden. In adulten Ziegen führte eine fünfmonatige Supplementierung von Butyrat in krafftutterreicher Fütterung zu einer verminderten Toxin-Konzentration im Pansenlumen sowie einer antiinflammatorischen Stoffwechsellage des Pansenepithels im Vergleich zur Kontrollgruppe, was eine verbesserte Epithelintegrität und Barrierefunktion des Vormagensystems hervorrief (DAI et al. 2017).

Neben diesen positiven Effekten auf die morphologische Entwicklung liefern Untersuchungen zum Einfluss von Butyrat auf funktionelle Parameter wie die ruminalen Transportproteine teilweise kontroverse Ergebnisse: *In vitro*-Untersuchungen des isolierten Pansenepithels deuten auf eine Hochregulation der SCFA-Transportproteine MCT1 und MCT4 auf Gen- und Proteinebene (DENGLER et al. 2015), während *in vivo* sowohl nur MCT1 (LAARMAN et al. 2012, LIU et al. 2019) als auch ausschließlich MCT4 (MALHI et al. 2013) durch Butyrat-Infusionen hochreguliert werden konnten.

Im Gegensatz zu *in vivo*-Studien zeigten Untersuchungen in der Zellkultur für Propionat und Butyrat bereits in niedrigen Konzentrationen antiproliferative Effekte, die jedoch zum Teil durch die Applikation von Wachstumshormonen aufgehoben bzw. abgeschwächt werden konnten (NEOGRÁDY et al. 1989, BALDWIN. 1999). Die hemmenden Effekte *in vitro* deuten darauf hin, dass eine übermäßige Anflutung von unmetabolisiertem Butyrat sowohl im Vormagenepithel als auch im gesamten Wiederkäuerorganismus schädigende Effekte hervorrufen könnte, denen der Organismus zum einen durch den effektiven Abbau innerhalb des Pansenepithels und zum anderen durch die Freisetzung von modulierenden Hormonen und Kofaktoren entgegenwirkt (GÄBEL et al. 2001, PENNER et al. 2011, PLÖGER et al. 2012).

Butyrat zeigt also im Pansenepithel analog zu anderen Geweben des Magendarmtraktes verschiedener Spezies positive Effekte auf die morphologische Entwicklung des Vormagensystems. Die Diskrepanz zwischen proliferativen *in vivo*-Effekten und antiproliferativer Wirkung *in vitro* könnte (neben systemischen Wirkungen des Butyrats) möglicherweise auf eine vermehrte Metabolisierung von Butyrat innerhalb des Epithels zurückzuführen sein, sodass die *in vivo* nachgewiesenen Effekte eventuell nicht direkt durch Butyrat, sondern vielmehr durch dessen Metaboliten  $\beta$ -HB und Azetoazetat vermittelt werden. Zudem scheint Butyrat zumindest teilweise stimulierend für die vermehrte Ausprägung von (SCFA-) Transportproteinen der Vormagenschleimhaut zu sein. Der vorausgehende Signalweg ist bislang v. a. im Pansenepithel noch nicht weiter geklärt. Mögliche Kandidaten zur Detektion der vorhandenen SCFAs und damit der Initiierung von Signalkaskaden stellen sogenannte Fettsäurerezeptoren dar. Auf diese soll im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden.

## 2.7 Fettsäurerezeptoren

Sämtliche bislang untersuchten FFARs gehören zur Gruppe der G-Proteingekoppelten Rezeptoren, deren allgemeine speziesübergreifende Eigenschaften zunächst erläutert werden sollen.

### **2.7.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren**

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPRs) gehören der heptahelikalen Transmembranprotein-Superfamilie an (ALEXANDER et al. 2019). Etwa die Hälfte der bekannten GPRs dienen der sensorischen Wahrnehmung von Gerüchen, Licht, Hormonen und Nährstoffen (ALEXANDER et al. 2019). Im Zellinneren sind diese Transmembranproteine gekoppelt an GTP-Bindungsproteine (G-Proteine), die aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit bestehen (ALEXANDER et al. 2011). Die Wirkung wird durch die katalytische  $\alpha$ -Untereinheit bzw. den regulatorischen Komplex aus  $\beta\gamma$ -Untereinheiten vermittelt (ALEXANDER et al. 2011). Die Aktivierung der Untereinheiten geschieht infolge einer Konformationsänderung nach Bindung des Liganden am Rezeptor (WEATHERBURN. 2015). Dabei gibt die  $\alpha$ -Untereinheit Aufschluss über den Komplex an Signalkaskaden, der aktiviert werden kann (ALEXANDER et al. 2011).

### **2.7.2 GPRs für SCFAs**

Zu den Rezeptoren, die kurzkettige Fettsäuren als Liganden haben, zählen der Freie Fettsäurerezeptor 2 (FFAR2), FFAR3 sowie GPR109A (PRIYADARSHINI et al. 2018). FFARs spielen u. a. eine wichtige Rolle in der Modulation des Immunsystems im Sinne einer schnelleren Erregerabwehr (HARA et al. 2014), wirken sich positiv auf Adipositas und die Darmgesundheit aus (KASUBUCHI et al. 2015) und modulieren das sympathische Nervensystem (ULVEN. 2012). Diese Rezeptoren wurden bisher v. a. in Nagern und im Menschen untersucht, sodass zunächst Erkenntnisse dieser Studien dargestellt werden. Weil den FFARs in verschiedenen Geweben eine wesentliche Rolle in der Wahrnehmung der Energieversorgung und der metabolischen Lage des Organismus zugewiesen wird, könnten sie auch in Wiederkäuern entscheidende Sensoren der SCFA-Produktion im Pansen darstellen. Daher folgt im Anschluss der aktuelle Kenntnisstand zu FFARs in Wiederkäuern.

#### **2.7.2.1 FFAR2**

Der FFAR2 wurde – wie auch der FFAR3 – vor allem im Ileum und Kolon der Ratte und des Menschen untersucht (GUILLOTEAU et al. 2010), wobei FFAR2-Proteine besonders in den Enterozyten der Villi als auch in enteroendokrinen Zellen der Krypten sowohl zytoplasmatisch als z. T. auch membranär angefärbt wurden (KARAKI et al. 2008).

Der FFAR2 ist sowohl mit einer  $G\alpha_q$ -Untereinheit als auch mit einer  $G\alpha_i$ -Untereinheit verknüpft, wodurch die Signalantwort abhängig vom Liganden unterschiedlich ausfallen kann und somit ein breiteres Anpassungsspektrum ermöglicht (PRIYADARSHINI et al. 2018). Die Aktivierung des Rezeptors kann dabei z. B. zu einer Steigerung der Inositol-3-Phosphat-Bildung, einer Erhöhung der intrazellulären

Ca<sup>2+</sup>-Konzentration oder der Verminderung intrazellulärer cAMP-Spiegel führen (LE POUL et al. 2003, HIRASAWA et al. 2008, HARA et al. 2014). In Bezug auf die verschiedenen Liganden des humanen FFAR2 postulierten BROWN et al. (2003) gleichwertige Affinitäten für Azetat, Propionat und Butyrat. In einem Review stellte ULVEN (2012) hingegen für Azetat und Propionat eine stärkere Bindungsaffinität als bei längerkettigen SCFAs (wie Butyrat) fest. Weitere Untersuchungen zeigten speziesspezifische Unterschiede zwischen dem Bindungsverhalten der einzelnen SCFAs in den Rezeptorvarianten von Mensch, Maus und Rind (HUDSON et al. 2012).

Bisherige Untersuchungen ergaben für FFAR2 verschiedene Funktionen: So konnte neben der Inhibition der adipozytären Fettakkumulation eine verstärkte Sekretion des Glukagon-ähnlichen Peptids 1 (*engl.* glucagon-like peptide 1, GLP-1) im Kolon und dadurch auch ein Einfluss auf die Insulin-Sekretion und die systemische Insulin-Sensitivität festgestellt werden (KASUBUCHI et al. 2015, MIYAMOTO et al. 2016). In verschiedenen experimentellen Ansätzen (Zellkultur, isoliertes Gewebe und Knockout-Mausmodell) wurde die SCFA-induzierte intestinale GLP-1-Sekretion auf eine Aktivierung des FFAR2 und dessen G $\alpha_q$ -Untereinheit zurückgeführt (TOLHURST et al. 2012, KAJI et al. 2014).

Auch die Immunantwort im Darm scheint wesentlich über FFAR2 moduliert zu werden, was durch die Abwesenheit des Rezeptors zutage trat: FFAR2- und FFAR3-Knockout-Mäuse zeigten im Kolon einerseits eine geringere Infiltration mit neutrophilen Zellen und weniger initiale Entzündungsreaktionen, langfristig wiesen diese Tiere jedoch sowohl im Kolon als auch systemisch eine höhere Pathogenlast auf (KIM et al. 2013). Der Rezeptor-Knockout wirkte sich also negativ auf die zellulären Abwehrreaktionen, demzufolge aber begünstigend auf das Milieu für pathogene Erreger aus. GANAPATHY et al. (2013) schlussfolgern, dass die Aktivierung von FFAR2 eine Unterdrückung des Immunsystems gegen ‚nützliche‘ Bakterien hervorruft, während es das Immunsystem gegen Pathogene aktiviert.

### 2.7.2.2 FFAR3

Bislang wurde FFAR3 im Fettgewebe, Darm und peripheren Nervensystem detektiert, wobei der Rezeptor dort in die Regulation der systemischen Energiebereitstellung involviert zu sein scheint, indem er die intestinale Gluconeogenese und die sympathische Aktivität reguliert (KASUBUCHI et al. 2015, MIYAMOTO et al. 2016). Untersuchungen deuten auf verschiedene Funktionen des Rezeptors abhängig vom jeweiligen Liganden hin: Während Propionat als Agonist eine katabole Stoffwechsellage stimuliert, fungiert  $\beta$ -HB im Rahmen der Ketogenese reduzierend auf die Energieausgaben des Organismus (MIYAMOTO et al. 2016).

Im Gegensatz zu FFAR2 ist FFAR3 nur an eine  $G\alpha_i$ -Untereinheit gekoppelt (LE POUL et al. 2003). Dementsprechend führt eine FFAR3-Aktivierung wie bei FFAR2 u. a. zu einer Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration oder verminderten cAMP-Spiegeln (LE POUL et al. 2003, HIRASAWA et al. 2008, HARA et al. 2014). Die humane Rezeptorvariante wird von Propionat und Butyrat gleichermaßen aktiviert, wohingegen Azetat eine geringere Affinität aufweist (BROWN et al. 2003, HIRASAWA et al. 2008).

Ähnlich dem FFAR2 scheint auch der FFAR3 in Sekretionsprozessen im Darm involviert zu sein. In verschiedenen Ansätzen wurde eine Beteiligung des Rezeptors an der Peptidhormon YY (PYY)- und GLP-1-Sekretion beobachtet (TOLHURST et al. 2012, HARA et al. 2014, KAJI et al. 2014). Im Gegensatz zu Untersuchungen an Nagern und am Menschen konnte die stimulierende Wirkung von SCFAs auf die intestinale GLP-1- und PYY-Sekretion im Gewebe vom Schwein nicht bestätigt werden, was möglicherweise auf ein speziesspezifisches Bindungsverhalten der FFARs zurückzuführen ist (KAJI et al. 2014). Inwiefern derartige Abweichungen von den Erkenntnissen in Nagern und Mensch auch beim Wiederkäuern auftreten, ist größtenteils noch nicht weiter untersucht.

Die Untersuchungen in Nicht-Wiederkäuerspezies räumen FFAR2 wie auch FFAR3 zunehmend eine Rolle in der Vermittlung von intestinalen Sekretions- und Modulationsprozessen ein, die vermutlich durch im Darmlumen anflutende SCFAs initiiert werden. Da auch im Pansenlumen große Mengen an Fettsäuren vorkommen, stellen diese FFARs mögliche Kandidaten zur Wirkungsvermittlung von nicht-nutritiven Effekten der SCFAs (insbesondere Butyrat) dar.

### 2.7.2.3 GPR109A

Bislang konnte GPR109A sowohl in Immunzellen als auch in Adipozyten und im Pankreas nachgewiesen werden (PRIYADARSHINI et al. 2018). Zudem zeigten immunhistochemische Analysen eine Rezeptorexpression in den apikalen Membranen der Epithelien des distalen Dün- und des Dickdarms auf (THANGARAJU et al. 2009).

Ebenso wie die zwei zuvor genannten FFARs für SCFAs ist auch der GPR109A an eine  $G\alpha_i$ -Untereinheit gekoppelt, sodass dessen Aktivierung ebenfalls mit verminderten cAMP-Spiegeln einhergeht (TUNARU et al. 2003). Zudem kann durch den regulatorischen  $\beta\gamma$ -Komplex eine Stimulation der Phospholipase C oder der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase- $\gamma$  (PI3K- $\gamma$ ) erfolgen (GILLE et al. 2008). GPR109A ist auch als Niacin-Rezeptor bekannt, was auf der Aktivierung des Rezeptors *in vitro* durch das B-Vitamin Niacin beruht (TUNARU et al. 2003). Allerdings liegen die physiologischen Wirkspiegel des Vitamins im Organismus zu niedrig, um eine Rezeptoraktivierung zu erzielen, sodass es wahrscheinlich nicht als natürlicher Ligand

fungiert (TUNARU et al. 2003). Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit ist, dass neben Niacin auch der Ketonkörper  $\beta$ -HB (als Butyrat-Metabolit) als Agonist ausgemacht werden konnte, wohingegen Azetoazetat und Azeton ohne Wirkung auf intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel blieben (TAGGART et al. 2005). Von den im Pansen vorkommenden SCFAs zeigte Butyrat im Vergleich zu Azetat und Propionat eine höhere Affinität in der humanen Rezeptorvariante (TAGGART et al. 2005, THANGARAJU et al. 2009).

Während dem GPR109A in Adipozyten sowie aktivierten Fettgewebs-Makrophagen eine Rolle im Energiestoffwechsel – v. a. durch seine antilipolytische Wirkung – zugeschrieben wird (TUNARU et al. 2003, TAGGART et al. 2005, KASUBUCHI et al. 2015, AGRAWAL et al. 2017), deuten Untersuchungen im Gastrointestinaltrakt auf verschiedene Funktionen hin: So konnte im murinen Kolon eine positive Korrelation zwischen der Expression von GPR109A-Proteinen und der mikrobiellen Besiedlung des Lumens festgestellt werden (KASUBUCHI et al. 2015). Dieser positive Effekt könnte möglicherweise mit dem Butyrat-induzierten, über GPR109A-vermittelten hemmenden Einfluss auf Entzündungs- und Tumorgeschehen des Darmes einhergehen (KASUBUCHI et al. 2015, AGRAWAL et al. 2017). Des Weiteren zeigten BORTHAKUR et al. (2012) in Enterozyten-Zelllinien (C2BBe1 und IEC-6) eine Expression des Rezeptors und dessen Aktivierung durch Butyrat. Ferner konnten sie eine cAMP-abhängige Regulierung des MCT1 durch Butyrat und Niacin feststellen (BORTHAKUR et al. 2012). Letztere wird vermutlich durch eine GPR109A-Aktivierung vermittelt. Dieser Befund ist insofern für die vorliegende Arbeit von großer Bedeutung, da hier erstmals ein Zusammenhang zwischen der SCFA-Konzentration, der Aktivierung eines FFAR sowie der Aktivität von Transportproteinen aufgezeigt wurde, was auch im Pansen im Rahmen der pH-Regulation in ähnlicher Art und Weise vonstattengehen könnte.

### **2.7.3 FFARs im Wiederkäuerorganismus**

Wenngleich im Vormagensystem der Wiederkäuer große Mengen an SCFAs anfluten, so wurde den FFARs in Wiederkäuern erst im Laufe des letzten Jahrzehntes zunehmende Aufmerksamkeit zuteil. Die ersten Nachweise von FFARs für SCFAs in Wiederkäuerspezies veröffentlichten YONEZAWA et al. (2009), die mRNA von FFAR2 und FFAR3 im bovinen laktierenden Euter nachweisen und in einer bovinen Euterzelllinie die Aktivierung von FFAR-Signalwegen durch SCFAs darstellen konnten.

WANG et al. (2009) detektierten mRNA, die FFAR2 und FFAR3 codiert, im bovinen Pansen sowie in vielen weiteren Geweben (Leber, Herz, Niere, Muskel, Lunge, Pankreas, Darm) des Rindes und bestätigten in einem Zellmodell (an einer Chinese-Hamster-Ovary-Zelllinie) mit überexprimierten bovinen FFARs deren Signalwege via  $\text{G}\alpha_i$ -Proteine. Auch im Fettgewebe von Schafen konnte FFAR3-mRNA nachgewiesen

werden (LEMOR et al. 2010). Da die Funktion der Rezeptoren nur durch erfolgreiche Translation der mRNA gesichert ist, sind Nachweise auf Proteinebene wesentliche Voraussetzung für funktionelle Untersuchungen. Folgt man diesen Nachweisen, konnte die Genexpression des FFAR2 z. B. nicht im bovinen Pankreas bestätigt werden, jedoch wurde der FFAR2 immunhistochemisch im Pansenepithel lokalisiert (WANG et al. 2012a). Dies unterstützt die Annahme der vorliegenden Arbeit, dass ruminale FFARs als Signalvermittler von SCFAs im Vormagen dienen könnten. Bezüglich des GPR109A konnte mRNA sowohl im Muskel-, Nerven- und Fettgewebe als auch in Immunzellen von Rindern nachgewiesen werden (TITGEMEYER et al. 2011, AGRAWAL et al. 2017). TITGEMEYER et al. (2011) gelang zudem der erste Nachweis von GPR109A-Protein in bovinem Lebergewebe.

Untersuchungen zu Liganden der FFARs in verschiedenen Spezies ergaben, dass die bovine FFAR2-Variante längerkettige SCFAs bevorzugt, sodass sich bezüglich der Affinitäten folgende Reihenfolge ergibt: Butyrat > Propionat > Azetat (HUDSON et al. 2012). Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen des humanen Rezeptor-Orthologs, das v. a. durch Azetat und Propionat aktiviert wird (HUDSON et al. 2012). Dabei weisen die humane und bovine Variante eine Homologie von ca. 75 % auf (WANG et al. 2009). Diese speziesspezifischen Affinitäten der Rezeptoren könnten Erkenntnisse aus Studien an murinen und humanen Modellen als nur bedingt für das Studiendesign der vorliegenden Arbeit nutzbar erscheinen lassen.

Bislang liegen nur wenige Information aus funktionellen Untersuchungen der FFARs in Wiederkäuern vor. GPR109A zeigt wie in anderen Spezies einen modulierenden Einfluss auf den Fettstoffwechsel, der im Zellkulturmodell mit bovinen Adipozyten nachgewiesen werden konnte (KOPP et al. 2014). Daneben wurde auch eine verminderte Lipolyse *ex vivo* durch Inkubation mit Niacin und höheren Dosen an  $\beta$ -HB in bovinem Fettgewebe ausgelöst (KENÉZ et al. 2014), was auf eine Vermittlung durch eine Aktivierung des GPR109A hinweist. Studien zum ovinen bzw. bovinen FFAR2 beschränken sich auf das Immunsystem, in dem der Rezeptor in die Aktivierung boviner neutrophiler Zellen involviert zu sein scheint (CARRETTA et al. 2013). Neuere Transkriptom-Untersuchungen zum Immunsystem des Pansenepithels an bovinen Pansenepithelzellen liefern Hinweise auf einen positiven Einfluss von SCFAs auf die epitheliale Immunantwort sowie die epitheliale Barriere, die laut den Autoren durch FFAR3 vermittelt wird (ZHAN et al. 2019).

Wenngleich die Funktion der Rezeptoren in den unterschiedlichen Geweben teilweise aktuell noch ungeklärt ist, so wurde doch in mehreren Studien der Einfluss verschiedener Parameter auf die Expression der ovinen, caprinen bzw. bovinen FFARs untersucht. Dabei traten Veränderungen der FFAR-Genexpression im Fettgewebe wie auch in Pansenpapillen in Abhängigkeit vom Konzentratgehalt des

Futters (bei dessen Erhöhung durch vermehrte Fermentation indirekt auch die SCFA-Konzentration im Pansen steigt; PLAIZIER et al. 2008) sowie direkt vom SCFA-Spiegel im Pansenum zutage (FRIEDRICHS et al. 2016, DIAS et al. 2018). LU et al. (2015) verzeichneten überdies eine positive Korrelation der SCFA-Konzentration im Pansenum und der FFAR3-Proteinexpression im Pansenepithel der Ziege. Ähnliches konnte für die  $\beta$ -HB-Level im Plasma und die FFAR2-Proteinkonzentration im Lebergewebe von Milchrindern festgestellt werden (AGUINAGA CASAÑAS et al. 2017). Diese Befunde deuten auf eine modulierte Expression der Rezeptoren entsprechend der Verfügbarkeit ihrer Liganden (SCFAs und Ketonkörper). Für das Pansenepithel scheint folglich eine fütterungsbedingt höhere Verfügbarkeit an SCFAs mit einer vermehrten FFAR-Ausbildung einherzugehen (LU et al. 2015, DIAS et al. 2018). Welche weiteren sogenannten Downstream-Prozesse dieser möglichen Rezeptoraktivierung durch anflutende SCFAs folgt, ist im Pansen abgesehen von Hinweisen auf die Modulation des Immunsystems durch FFAR3 zurzeit unbekannt. Möglich wäre eine Anpassung der epithelialen Transportproteine, die in die Regulation des pH-Wertes der Pansenwand involviert sind, da die vermehrte SCFA-Resorption auch mit höheren Anforderungen an die Mechanismen der pH-Homöostase einhergeht. Daher sollen die Familien der MCTs und NHEs als pH-regulierende Transporter im Folgenden nun näher erläutert werden.

## **2.8 Monocarboxylattransporter**

### **2.8.1 Die Familie der MCTs**

MCTs gehören zur Familie der Solute Carrier Proteine 16, in der bisher 14 Isoformen nachgewiesen wurden (HALESTRAP. 2013). Vier dieser Membranproteine (MCT1-4) dienen dem Transport von Monocarboxylaten wie Pyruvat, Laktat und Ketonkörpern (HALESTRAP. 2013). Während MCT1 in sämtlichen Organen des Organismus vorkommt, konnte MCT2 v. a. in Hirn und Nieren sowie im Gastrointestinaltrakt des Rindes (KIRAT et al. 2013), MCT3 in der Retina sowie im Plexus choroideus und in geringem Maße auch im Rindereuter (KIRAT und KATO. 2009) und MCT4 neben Skelettmuskel, Herz und Lunge auch in Chondrozyten, Leukozyten und Geschlechtsorganen detektiert werden (HALESTRAP und MEREDITH. 2004). Die Transporter MCT1 und MCT4 benötigen das Glykoprotein Basigin für ihre Verankerung in der Zellmembran und ihre Funktionalität (WILSON et al. 2005, HALESTRAP. 2012).

Nachdem zunächst ein reiner Austausch von Monocarboxylaten über die MCTs propagiert wurde, konnte bei Vorliegen eines Konzentrationsgradienten für Monocarboxylate an einer biologischen Membran eine 1:1-Stöchiometrie des Transportes von Monocarboxylaten mit  $H^+$  gezeigt werden (POOLE und HALESTRAP. 1993). Die Kopplung des Monocarboxylattransportes an die Ausschleusung von  $H^+$

dient der effektiven pH-Regulation (HALESTRAP und PRICE. 1999, MÜLLER et al. 2002). An isolierten Membranvesikeln des Kolonepithels des Schweins, im Duodenalepithel der Ratte sowie im ovinen Pansenepithel fungiert der MCT1 neben dem H<sup>+</sup>-Symport auch als Anionenaustauscher, u. a. von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> und SCFAs (RITZHAUPT et al. 1998, DENGLER et al. 2014, AKIBA et al. 2015).

### 2.8.2 Regulation der MCTs

Neben einem positiven Einfluss einer pektinreichen Fütterung auf die MCT1-Expression (KIRAT et al. 2009) konnte in mehreren Zellkulturmodellen eine Regulation der Transporterexpression und -aktivität durch Stoffwechselmetaboliten (z. B. Laktat, Butyrat, Pyruvat) sowie H<sup>+</sup> für verschiedene MCT-Isoformen nachgewiesen werden (DUBINSKY und RACKER. 1978, HASHIMOTO et al. 2007, LIU et al. 2019). Das verstärkte Angebot an Substraten (H<sup>+</sup> wie auch Monocarboxylate, die im Rahmen der Futtermitteldigestion anfallen) führt also zu einer erhöhten Aktivität des MCT1 in den untersuchten Zellen. Des Weiteren zeigten Hormone (Katecholamine, Sexualhormone) und auch Transkriptionsfaktoren (u. a. Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), NF- $\kappa$ B) in verschiedenen Geweben Einfluss auf die Transporterexpression (CHENAL und PELLERIN. 2007, BORTHAKUR et al. 2008, KÖNIG et al. 2008, CAO et al. 2017).

*In vitro*-Untersuchungen zeigten inhibitorische Eigenschaften auf die MCT-Transportaktivität von substituierten aromatischen Monocarboxylaten wie Cyanohydroxyzimtsäure (*engl.* cyano-hydroxycinnamic acid, CHC), von Hemmstoffen des Anionentransportes wie DIDS, von Bioflavonoiden wie Phloretin sowie von weiteren Substanzen wie z. B. p-Chloromercuribenzensulfonat, wobei jedoch keiner dieser Hemmstoffe als MCT-spezifisch betrachtet werden kann (HALESTRAP und PRICE. 1999, HOSOI et al. 2009). Außer der Inhibition durch genannte Hemmstoffe, konnte auch eine Verminderung der MCT-Aktivität durch erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel nachgewiesen werden. Dabei wurden verschiedene Zellmodelle sowohl mit Brom-cAMP (Br-cAMP), Dibutyryl-cAMP als auch Forskolin (zur Stimulation der cAMP-synthetisierenden Adenylylzyklasen; *engl.* adenylyl cyclases, ACs) behandelt (SMITH und DREWES. 2006, NARUMI et al. 2010).

BORTHAKUR et al. (2012) konnten in einer Enterozyten-Zelllinie sowohl eine Substrat-induzierte Stimulation der MCT1-Expression und -Aktivität als auch eine damit einhergehende Erniedrigung der intrazellulären cAMP-Spiegel feststellen. In dieser Studie führte eine Erhöhung der cAMP-Spiegel infolge einer Inkubation mit Forskolin oder die Gabe von Br-cAMP ebenfalls zu einer verminderten MCT1-Aktivität (BORTHAKUR et al. 2012). SMITH et al. (2012) postulierten, dass die verminderte MCT1-Funktion nach cAMP-Stimulation auf Dephosphorylierungs- und Internalisierungsprozesse zurückzuführen sei. Dies wird unterstützt durch

Untersuchungen in Endothelzellen des Rattengehirns, die eine starke Clusterbildung der Transportproteine nach Erhöhung des cAMP-Spiegels entdeckten (UHERNIK et al. 2014).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Expression und Aktivität von MCTs in vielen Geweben bzw. daraus hervorgegangenen Zelllinien in Nicht-Wiederkäuerspezies durch Umwelteinflüsse wie die Fütterung und ein damit einhergehendes verändertes Substratangebot, aber auch Hormone und Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden. In der Signaltransduktion scheint cAMP dabei eine zentrale Rolle zu spielen. Ob diese v. a. für die Skelettmuskulatur und das Gehirn untersuchten Mechanismen auch für das Pansenepithel gelten, ist bisher größtenteils unbekannt. Daher soll zunächst der aktuelle Kenntnisstand zu MCTs im Pansenepithel erläutert werden.

### **2.8.3 MCTs im Pansenepithel**

Bislang konnten im Pansenepithel drei Isoformen der MCTs immunhistochemisch bzw. vier Isoformen durch Polymerase-Kettenreaktion (*engl.* polymerase chain reaction, PCR)-Untersuchungen nachgewiesen werden: Zunächst wurde MCT1 sehr prominent in der Basalmembran des *Stratum basale* sowie als diffuse Färbung im *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum* des ovinen bzw. bovinen Pansenepithels lokalisiert (MÜLLER et al. 2002, KIRAT et al. 2006a, GRAHAM et al. 2007). Zusätzlich konnte eine Ko-Lokalisation von MCT1 mit Basigin festgestellt werden (KIRAT et al. 2006b, GRAHAM et al. 2007). Da bereits in anderen Spezies die essenzielle Bedeutung von Basigin für die Funktionsweise des MCT1 gezeigt wurde (HALESTRAP. 2013), deutet dies auf das Vorhandensein von funktionellen Transportproteinen, v. a. in den basalen Zellschichten des Pansenepithels.

Die genaue Lokalisation von MCT2 ist im Pansenepithel bislang noch fraglich, da uneindeutige Ergebnisse zum Proteinnachweis vorliegen: KIRAT et al. (2013) konnten die Transporter-Isoform in basaleren Abschnitten detektieren (v. a. Zellgrenzen im *Stratum spinosum* und *Stratum basale*), wohingegen GRAHAM et al. (2007) nur ein schwaches und diffuses immunhistochemisches Signal intrazellulär in allen Zellschichten unterhalb des *Stratum corneum* feststellen konnten. MCT4 konnte apikal im *Stratum granulosum* aber auch als diffuse Färbung im gesamten *Stratum spinosum* des Rindes immunhistochemisch nachgewiesen werden (KIRAT et al. 2007). Der Nachweis des MCT3 gelang im Pansenepithel bislang nur auf mRNA-Ebene; immunhistochemisch war dieser nicht nachweisbar (GRAHAM et al. 2007, KIRAT et al. 2013).

Um die ruminalen MCTs funktionell zu charakterisieren, wurde zunächst – analog zu Studien in Nicht-Wiederkäuerspezies – der Transport von epithelialen Stoffwechsel-

metaboliten wie L-Laktat,  $\beta$ -HB sowie Azetoazetat in kultivierten Pansenepithelzellen untersucht. Dabei konnte in Hemmstoffstudien ein Symport von  $H^+$  und den im Pansenepithel anfallenden Stoffwechselprodukten mithilfe von MCTs festgestellt werden (MÜLLER et al. 2002). MÜLLER et al. (2002) wiesen diese dem von ihnen in basalen Zellschichten angefärbten MCT1 zu. Neben genannten Metaboliten permeieren auch Pyruvat sowie Azetat und vermutlich Butyrat durch das Pansenepithel mithilfe von MCTs (STUMPF. 2018). Wie unter 2.2 *Transport kurzkettiger Fettsäuren über das Pansenepithel* erwähnt, unterstützen *in vitro*- als auch *in vivo*-Untersuchungen die Hypothese von MÜLLER et al. (2002), da in diesen Studien der Azetat-Transport und z. T. auch die Propionat- und  $\beta$ -HB-Resorption v. a. durch serosale MCT-Hemmstoffgabe vermindert werden konnte (KIRAT et al. 2006b, DENGLER et al. 2014). Zusätzlich zum  $H^+$ -Symport wurde auch der Antiport von SCFAs mit  $HCO_3^-$  über den MCT1 nachgewiesen (DENGLER et al. 2014).

Die Funktion des MCT2 im Pansenepithel ist bis dato weitestgehend unerforscht. KIRAT et al. (2007) vermuteten, dass die in tieferen Zellschichten membranär lokalisierten Transporter ebenfalls dem Transport von SCFAs aus apikalen Gewebsschichten in weiter basolateral gelegene Zellen des Pansenepithels dienen. Funktionelle Studien, die dies untermauern, fehlen jedoch bislang.

Im Kapitel 2.2 *Transport kurzkettiger Fettsäuren über das Pansenepithel* wurde bereits auf die Rolle des MCT4 in Transportvorgängen von SCFAs über das Pansenepithel eingegangen. Während die Ergebnisse von KIRAT et al. (2006b) und ASCHENBACH et al. (2009) zu einer Beteiligung des apikalen MCT4 am Azetat-Transport über das Pansenepithel kontrovers sind, unterstützt die von ASCHENBACH et al. (2009) beobachtete Hemmung einer apikalen Laktat-Aufnahme mithilfe von MCT-Inhibitoren die funktionelle Expression von MCT4 in den lumenseitigen Zellschichten des Pansenepithels. Dennoch scheint dieser Transporter quantitativ von untergeordneter Rolle bei der SCFA-Resorption zu sein.

Ungeachtet ihrer bislang teilweise ungeklärten Auswirkungen auf die Gesamtmenge an SCFAs, die über das Pansenepithel permeieren, transportieren alle nachgewiesenen MCTs neben Monocarboxylaten und SCFAs immer auch  $H^+$  und/oder  $HCO_3^-$ . Damit geht eine Aktivität der Transporter wie unter 2.4.2 *pH-Regulation des Pansenepithels* erläutert stets mit einer Veränderung des intrazellulären pH-Wertes einher und muss daher zur Aufrechterhaltung der zytosolischen pH-Homöostase reguliert werden. Einzelne Modulatoren dieser Regulation wurden bereits genauer untersucht: An isolierten Pansenepithelzellen konnte eine Hochregulierung des MCT1, nicht jedoch des MCT4 durch den Transkriptionsfaktor PPAR $\alpha$  hervorgerufen werden (BENESCH et al. 2014). Ebenso konnte der stimulierende Effekt von Butyrat auf die MCT1-Expression auf mRNA- und

Proteinebene (siehe 2.8.2 *Regulation der MCTs*) im Pansenepithel auch an Schafen gezeigt werden (DENGLER et al. 2015). Untersuchungen zur Butyrat-Supplementierung *in vivo* konnten z. T. eine Hochregulierung des MCT1, nicht jedoch des MCT4 (LAARMAN et al. 2012, LIU et al. 2019) bzw. *vice versa* (MALHI et al. 2013) beobachten. Die konträren Ergebnisse könnten mit der Komplexität der Prozesse *in vivo* erklärt werden, da neben der Spezies auch Alter, Gesundheitszustand, Pansenflora sowie zahlreiche Umwelteinflüsse (Klima etc.) und nicht zuletzt das Studiendesign einen Einfluss auf die Verdauungsvorgänge im Pansen haben und somit verschiedene SCFA-Konzentrationen im Pansenlumen vorherrschen können.

Der genaue Wirkmechanismus der Stimulation durch Butyrat und eventuell auch weitere SCFAs ist aktuell im Pansenepithel nicht bekannt. Auch ist noch unklar, ob cAMP wie in vielen weiteren Geweben bei der Regulation der MCTs eine Rolle spielt. Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb u. a. eine genauere Betrachtung der Regulation des epithelialen cAMP-Spiegels durch SCFAs und dessen Bedeutung für die Aktivität der MCTs im Pansenepithel.

## **2.9 Natrium-Protonen-Austauscher**

### **2.9.1 Die Familie der NHEs**

Die Familie der Natrium-Protonen-Austauscher umfasst Plasmamembranproteine, die in Säugetierzellen sowohl in die Regulierung des intrazellulären pH-Wertes als auch in die Homöostase des Zellvolumens und die Absorption von Elektrolyten involviert sind (ORLOWSKI et al. 1992).

Strukturell handelt es sich bei den NHE-Isoformen um Proteine mit 12 Transmembrandomänen (ALEXANDER und GRINSTEIN. 2009). Während der transmembranäre Bereich für den Ionenaustausch verantwortlich gemacht wird, spricht man der zytosolischen Domäne die Regulation der Aktivität sowie die Interaktion mit dem Zytoskelett zu (ALEXANDER und GRINSTEIN. 2009). Die NHE3-Isoform tauscht extrazelluläres Na<sup>+</sup> gegen intrazelluläre H<sup>+</sup> in einer 1:1 Stöchiometrie (ALEXANDER und GRINSTEIN. 2009). ALEXANDER et al. (2005) vermuteten, dass in polarisierten Epithelzellen der Transport durch NHEs bei Bedarf stark erhöht werden kann, da 25 % der Population an Antiportern erforderlichenfalls aus dem Zytosol in die Zellmembran rekrutiert werden können, während zumeist ca. 50 % der NHEs permanent in der apikalen Zellmembran eingebaut sind. Weitere 25 % können demnach entweder nur langsam oder gar nicht aus dem endomembranären Pool rekrutiert werden (ALEXANDER et al. 2005).

mRNA-Verteilungsanalysen konnten NHE1 bisher in sämtlichen untersuchten Organen detektieren, wohingegen NHE2, NHE3 und NHE4 v. a. in Epithelien des Magendarmtraktes, aber auch in denen des Urogenitaltraktes sowie Hirn und Muskel

exprimiert werden (ORLOWSKI et al. 1992, NOEL und POUYSSEGUR. 1995). NHE1 wird dabei basolateral verortet und die Rolle des sogenannten  $\text{pH}_i$ -housekeeping, d. h. die Kontrolle der  $\text{pH}_i$ -Homöostase, zugeschrieben (CHOW et al. 1999). Untersuchungen des NHE2 und des NHE3 hingegen weisen diesen Isoformen großen Einfluss auf die epitheliale  $\text{Na}^+$ -Resorption zu (CHOW et al. 1999). So konnte u. a. am Hundedarm gezeigt werden, dass die Isoform NHE3 apikal in der ilialen Bürstensaummembran exprimiert wird und v. a. für die basale und fütterungs-stimulierte  $\text{Na}^+$ -Aufnahme zuständig ist (MAHER et al. 1996).

### 2.9.2 Regulation der NHEs

Während das Aktivitätsverhalten des NHE1 auf ein Zwei-Zustände-Modell hinweist, in dem der Transporter  $\text{pH}_i$ -abhängig von einem inaktiven in einen aktiven Zustand wechselt, lässt sich das Verhalten des NHE3 eher mit drei Zuständen erklären (ALEXANDER et al. 2007): Dabei kommt es zum Wechsel zwischen zwei inaktiven Zuständen, an die sich der aktive Zustand anschließt. Das Maximum an Transportaktivität findet daher laut ALEXANDER et al. (2007) etwa 30 bis 60 Sekunden nach Veränderung des  $\text{pH}_i$  statt.

Als etablierte Inhibitoren zur Untersuchung der NHEs zählen Amilorid als unspezifischer Hemmstoff für die NHE-Isoformen 1, 2 und 3, aber auch das Amilorid-Derivat 5-N-Ethyl-N-Isopropyl Amilorid (EIPA), welches dosis-abhängig NHE1 und NHE3 hemmt (BENOS. 1982, NOEL und POUYSSEGUR. 1995). Cariporid wurde als spezifischer Hemmstoff für NHE1 etabliert, während S3226 zur Blockade des NHE3 genutzt wird (SCHWARK et al. 1998).

Die physiologische Regulation der Transportaktivität wurde bei den unterschiedlichen Isoformen bisher in verschiedener Intensität erforscht. Durch Parathormon erhöhte cAMP-Spiegel führten in Osteoblasten zu einer Stimulation der NHE1-Transportaktivität (AZARANI et al. 1995, NOEL und POUYSSEGUR. 1995). Untersuchungen des NHE2 lieferten kontroverse Ergebnisse, sodass sowohl eine Hemmung (SUBRAMANYA et al. 2007, MUSCH et al. 2009) als auch eine Stimulation der Aktivität (KANDASAMY et al. 1995, BACHMANN et al. 2004) durch erhöhte cAMP-Spiegel beobachtet werden konnte. KRISHNAN et al. (2003) konnten eine NHE2-Aktivitätserhöhung sowohl durch cAMP als auch Butyrat auslösen.

Im Gegensatz zu den Isoformen 1 und 2 weisen bisherige Studien einstimmig auf eine Aktivitätsminderung des NHE3 durch erhöhte cAMP-Spiegel (CABADO et al. 1996, COLLAZO et al. 2000, KRISHNAN et al. 2003). Ein Einfluss auf den intrazellulären cAMP-Spiegel in verschiedenen Zelllinien wurde u. a. durch die Applikation von Forskolin als Stimulator der ACs (CABADO et al. 1996), aber auch hormonell durch Parathormon oder Dopamin beobachtet (COLLAZO et al. 2000, GOMES und

SOARES-DA-SILVA. 2004, PEDROSA et al. 2004). Dabei kommt es u. a. zu einer Proteinkinase A- und Proteinkinase C-vermittelten verstärkten Phosphorylierung des Transportproteins (GOMES und SOARES-DA-SILVA. 2004, PEDROSA et al. 2004), das infolgedessen durch Endozytose internalisiert wird und somit dem  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch über die Zellmembran vorübergehend nicht zur Verfügung steht (CHOW et al. 1999, COLLAZO et al. 2000). Eine Stimulation der Transportaktivität konnte durch  $\text{HCO}_3^-$  und Butyrat hervorgerufen werden (KRISHNAN et al. 2003).

Zusammenfassend deuten somit zahlreiche Studien auf eine Arbeitsteilung der verschiedenen NHE-Isoformen in Nicht-Wiederkäuerspezies, dergestalt, dass bei polarisierten Zellen der basolateral lokalisierte NHE1 für die Homöostase des intrazellulären pH-Wertes verantwortlich ist, während v. a. der apikale NHE3, aber auch der NHE2 vorrangig in die  $\text{Na}^+$ -Resorption involviert sind. Dabei fällt bei der Regulation der Transportaktivität eine Gegensätzlichkeit zwischen NHE1 und NHE3 auf, sodass erhöhte cAMP-Spiegel vermutlich steigernd auf NHE1 (sowie evtl. NHE2) und hemmend auf NHE3 wirken. Butyrat hingegen scheint die Transportaktivität sowohl von NHE2 aber auch NHE3 zu stimulieren. Inwiefern diese Erkenntnisse über NHEs aus Nicht-Wiederkäuerspezies auch auf das Pansenepithel anwendbar sind, soll im folgenden Abschnitt dargelegt werden.

### 2.9.3 NHEs im Pansenepithel

Bislang konnten die Isoformen 1 bis 3 und 8 der NHE-Familie auf mRNA-Ebene im Pansenepithel nachgewiesen werden (GRAHAM et al. 2007). Immunhistochemisch wurde NHE1 im bovinen Pansenepithel verstärkt in der apikalen Seite des *Stratum granulosum* und NHE2 v. a. im *Stratum basale* und *Stratum spinosum* dargestellt (GRAHAM et al. 2007), jedoch konnte im ovinen Pansenepithel von AHMED et al. (2014) kein erfolgreicher Nachweis des NHE1 erzielt werden. Im ovinen Pansenepithel ließ sich dagegen NHE3 v. a. in apikalen Zellschichten wie dem *Stratum granulosum* und *Stratum spinosum* anfärben (RABBANI et al. 2011, AHMED et al. 2014).

Hinsichtlich der Funktionalität konnten bereits frühe *in vitro*-Untersuchungen an intakten, isolierten Pansenepithelien und kultivierten Pansenepithelzellen eine Beteiligung der NHEs an der elektroneutralen  $\text{Na}^+$ -Resorption nachweisen (MARTENS et al. 1991, GÄBEL et al. 1996, GÁLFI et al. 2002).

Die NHEs im Pansenepithel sind durch SCFAs modifizierbar. So konnte in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus Zelllinien anderer Spezies im intakten Pansenepithel und auch in kultivierten ovinen Pansenepithelzellen wiederholt eine Stimulation der Amilorid-sensitiven  $\text{Na}^+$ -Aufnahme durch Butyrat beobachtet werden (GÄBEL et al. 1991b, SEHESTED et al. 1996, GÁLFI et al. 2002). Dies beruht vermutlich auf einer indirekten Stimulation der NHEs durch eine intrazelluläre

Ansäuerung infolge der vermehrten Butyrat-Resorption (GÄBEL et al. 1996, MÜLLER et al. 2000). SCHWEIGEL et al. (2005) wiesen mit spezifischen Hemmstoffen die Beteiligung von NHE1 und auch NHE3 an der erfolgten pH-Gegenregulation in Zellkultur nach. Dahingegen fanden RABBANI et al. (2011) nur Hinweise auf eine Beteiligung des NHE3, nicht jedoch des NHE1 an der durch SCFA-stimulierten, elektroneutralen Na<sup>+</sup>-Resorption im isolierten Pansenepithel. Die Ergebnisse von RABBANI et al. (2011) sind im Einklang mit der Theorie der Arbeitsteilung zwischen NHE1 und NHE3 in anderen Spezies. Untersuchungen zur Beteiligung dieser beiden Isoformen an der pH<sub>i</sub>-Regulation in Zellkultur unterstützen zudem die Rolle des ruminalen NHE1 in der Funktion des pH<sub>i</sub>-housekeepers, der weitaus stärker in die H<sup>+</sup>-Extrusion involviert zu sein scheint als der NHE3 (ETSCHMANN et al. 2006).

Zusätzlich zu der direkten Wirkung der SCFAs auf die Transportaktivität der NHEs konnte aber auch ein positiver Einfluss auf deren Genexpression festgestellt werden: Sowohl die Gabe konzentratreichen Futters als auch das Ansäuern des Milieus bzw. eine erhöhte SCFA-Konzentration im Versuchsmedium konnten in caprinem, intakten Epithelgewebe respektive in kultivierten Epithelzellen die mRNA-Expression von NHE1 und NHE3 erhöhen (YANG et al. 2012). Bei Kälbern wurde nach Verabreichung einer Starter-Fütterung (wodurch indirekt mehr SCFAs entstehen) eine verminderte Genexpression von NHE3 detektiert, während die NHE1-Expression im Pansenepithel unbeeinflusst blieb (LAARMAN et al. 2012).

Neben der Regulation durch Butyrat und einer damit einhergehenden Modulation des H<sup>+</sup>-Angebotes, konnte auch im Pansen bereits ein Einfluss von cAMP auf die Aktivität der NHEs gezeigt werden: Die Applikation von Forskolin und Theophyllin (ein Inhibitor der Phosphodiesterase, welche cAMP abbaut) hemmte an isolierten Pansenepithelien die Na<sup>+</sup>-Resorption (GÄBEL et al. 1999). Auffällig dabei ist, dass eine zeitgleiche Inkubation mit SCFAs diesen Effekt zumindest teilweise aufheben konnte (GÄBEL et al. 1999). Der hemmende Einfluss von cAMP auf die epitheliale Na<sup>+</sup>-Resorption bzw. die NHE-Aktivität wurde ebenfalls in kultivierten primären Pansenepithelzellen bestätigt (SCHWEIGEL et al. 2000, SCHWEIGEL et al. 2005).

Weiterhin konnte in einer Studie sowohl die Na<sup>+</sup>-Aufnahme im intakten Gewebe als auch der pH<sub>i</sub>-Ausgleich in isolierten Zellen durch den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor 1 (*engl.* insulin-like growth factor 1) verbessert werden, sodass neben SCFAs und niedrigen cAMP-Spiegeln auch Wachstumsfaktoren eine stimulierende Wirkung auf NHEs zu haben scheinen (SHEN et al. 2012).

Es liegen also bereits Hinweise vor, dass die Aktivität der NHEs gemäß den Bedingungen im Pansenlumen sowie im Zytosol der Epithelzellen moduliert werden kann. Da nach aktuellem Kenntnisstand sowohl Butyrat als auch cAMP eine entscheidende Rolle in dieser Regulation im Pansenepithel zuteilwird, sind eine

mögliche Verknüpfung der beiden Regulatoren sowie die zugrundeliegenden Mechanismen von großem Interesse für das Verständnis der substrat-induzierten Regulation der Transportaktivität.

## 2.10 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

Die vorangegangenen Ausführungen legen nahe, dass sich das Pansenepithel an variierende Konzentrationen von SCFAs im Pansenum anpassen kann. Zunächst sollte daher in einer Übersichtsarbeit die herausragende Rolle des Pansenepithels für die Gesundheit des Organs sowie des Gesamtorganismus herausgearbeitet werden. So konnte geschlussfolgert werden, dass das Epithel sowohl die Nährstoffversorgung sichert, die pH-Homöostase stabilisiert als auch eine fundamentale Barriere gegen Pathogene und Toxine bildet. Um das Überleben der Wiederkäuer zu sichern, muss das Epithel folglich in der Lage sein, die Resorptionsrate für die einzelnen Fettsäuren an das aktuelle Angebot anzupassen und auch die Aktivität von Transportproteinen für die Stabilisierung des pH-Wertes (sowohl im Pansenum als auch im -epithel) zu regulieren. Um diese Adaptationen zu initiieren, ist es zunächst essenziell, dass das Epithel Schwankungen der SCFA-Konzentration detektieren kann. Analog zum Dickdarm von Monogastriern, in dem ebenfalls große Mengen an SCFAs anfluten, sind Fettsäurerezeptoren Kandidaten für eine derartige Sensorik (PRIYADARSHINI et al. 2018). Daher ergaben sich für den experimentellen Teil zunächst folgende Fragestellungen:

- *Werden FFARs im Pansenepithel des Schafes auf mRNA-Ebene exprimiert?*
- *Werden die exprimierten FFARs auch als Proteine exprimiert? Wo sind diese im Pansenepithel lokalisiert?*

Im ersten experimentellen Teil der Arbeit konnten zwei Vertreter der FFARs immunhistochemisch im Pansenepithel detektiert werden. Dabei wurde einer v. a. in oberflächlicheren Zellschichten angefärbt, während der zweite FFAR v. a. im basolateralen Bereich detektiert wurde. Deshalb sollte im Folgenden die aus der FFAR-Aktivierung resultierende Signaltransduktion untersucht werden. Da die untersuchten FFARs SCFAs als Liganden akzeptieren, wurde der Effekt einer Inkubation mit SCFAs auf die intraepithelialen cAMP-Spiegel betrachtet. Es sollte folgender Fragestellung nachgegangen werden:

- *Kann eine Inkubation mit Azetat oder Butyrat die cAMP-Spiegel im Pansenepithel beeinflussen?*

Da vor allem Butyrat zu einer verminderten cAMP-Konzentration im Epithel führte, wurde anschließend stärker eingegrenzten Fragestellungen nachgegangen:

- *Kann eine Beteiligung des GPR109A an der Vermittlung dieses Einflusses von Butyrat bestätigt werden?*
- *Gibt es Unterschiede, wenn Butyrat serosal oder mukosal anflutet?*

Schließlich sollte die funktionelle Relevanz dieser Signalkette betrachtet werden. Verschiedene Untersuchungen an Monogastriern offenbarten bereits eine Aktivitätsmodulation von NHEs und MCTs durch cAMP (NOEL und POUYSSEGUR. 1995, BORTHAKUR et al. 2012). Es lag die Vermutung nahe, dass diese Transporter, deren Funktion für den Erhalt eines stabilen pH-Milieus im Pansenepithel essenziell sind, auch im Pansen ähnlich reguliert werden. Deshalb sollte im letzten Teil den Fragen nach den Downstream-Mechanismen infolge einer cAMP-Induktion nachgegangen werden:

- *Wird die Transportaktivität der MCTs im isolierten Pansenepithel durch veränderte cAMP-Spiegel beeinflusst?*
- *Wird die Transportaktivität der NHEs in kultivierten Pansenepithelzellen durch variierende cAMP-Spiegel moduliert?*

### **3 Publikationen**

#### **3.1 Publikation 1**

##### **Ruminal epithelium: a checkpoint for cattle health**

**Lisa Baaske**, Gotthold Gäbel und Franziska Dengler

J Dairy Res. 2020;87(3):322-329.

DOI: 10.1017/S0022029920000369

Die folgende Publikation ist als Übersichtsarbeit im Rahmen des DFG-Projektes GA329/8-1 entstanden. Sie dient als Grundlage für die inhaltliche Einordnung der experimentellen Ergebnisse aus Publikation 2 in die physiologischen Prozesse im Pansen des Wiederkäuers.

Das Manuskript inklusive Abbildungen wurde dabei von mir, Lisa Baaske, entworfen. Prof. Dr. G. Gäbel sowie Ass.-Prof. Dr. F. Dengler wirkten an der Überarbeitung des Manuskriptes mit und akzeptierten dessen endgültige Version.

# Ruminal epithelium: a checkpoint for cattle health

Lisa Baaske, Gotthold Gäbel and Franziska Dengler

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

## Invited Review

**Cite this article:** Baaske L, Gäbel G and Dengler F. Ruminal epithelium: a checkpoint for cattle health. *Journal of Dairy Research* <https://doi.org/10.1017/S0022029920000369>

Received: 11 October 2019

Revised: 4 April 2020

Accepted: 8 April 2020

### Keywords:

Detoxification; epithelial acidosis; ruminal epithelium; SCFA absorption

### Author for correspondence:

Franziska Dengler,

Email: [franziska.dengler@vetmed.uni-leipzig.de](mailto:franziska.dengler@vetmed.uni-leipzig.de)

## Abstract

The reticulorumen, as the main fermentation site of ruminants, delivers energy in the form of short-chain fatty acids (SCFA) for both the animal as well as the ruminal wall. By absorbing these SCFA, the ruminal epithelium plays a major role in the maintenance of intraruminal and intraepithelial acid–base homeostasis as well as the balance of osmolarity. It takes up SCFA *via* several pathways which additionally lead to either a reduction of protons in the ruminal lumen or the secretion of bicarbonate, ultimately buffering the ruminal content effectively. Nutrition of the epithelium itself is achieved by catabolism of the SCFA, especially butyrate. Catabolism of SCFA also helps to maintain a concentration gradient across the epithelium to ensure efficient SCFA uptake and stability of the epithelial osmolarity. Furthermore, the ruminal epithelium forms a tight barrier against pathogens, endotoxins or biogenic amines, which may emerge from ruminal microorganisms and feed. Under physiological conditions, it reduces toxin uptake to a minimum. Moreover, the epithelium seems to have the ability to degrade biogenic amines like histamine. Nonetheless, in high performance production animals like dairy cattle, the reticulorumen is confronted with large amounts of rapidly fermentable carbohydrates. This may push the epithelium to its limits, even though it possesses a great capacity to adapt to varying feeding conditions. If the epithelial limit is exceeded, increasing amounts of SCFA lead to an acidotic imbalance that provokes epithelial damage and thereby elevates the entrance of pathogens and other potentially harmful substances into the animal's body. Hence, the ruminal epithelium lays the foundation for the animal's health, and in order to ensure longevity and high performance of ruminant farm animals, it should never be overburdened.

## Introduction

The reticulorumen offers a perfect environment for anaerobic bacteria, protozoa, and fungi to break down plant fibre carbohydrates to short-chain fatty acids (SCFA) (Nagaraja, 2016), the major energy source for ruminants (Bergman, 1990). The SCFA produced are mainly acetate, propionate and butyrate, in proportions of roughly 70:20:10, respectively (Dieho *et al.*, 2016). Around 50–85% of the SCFA produced intraruminally are directly absorbed across the ruminal wall, i.e. the ruminal epithelium (Aschenbach *et al.*, 2011). This illustrates the fundamental role of the epithelium for ruminal SCFA absorption in order to maintain health and energy balance of the animal. In addition, epithelial absorption of nutrients is also an important factor in preserving the delicate balance between SCFA as an energy source and their detrimental acidifying effects.

Besides its central role in nutrient absorption, another principal task of the reticuloruminal epithelium is sustaining the barrier against potential noxious substances in the lumen. As the forestomach system is one of the most proximal parts of the ruminant gastrointestinal tract, it is in contact not only with valuable nutrients, but also with harmful substances like bacterial toxins, amines derived from silages or excessive amounts of SCFA (Phuntsok *et al.*, 1998; Aschenbach *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2017). To prevent damage of the whole organism, the microorganisms in the lumen as well as the epithelium itself exert certain mechanisms to render these substances innocuous.

Thus, the ruminal epithelium is a lynchpin for the preservation of ruminants' health and productivity. Effective transport of fermentation products is fundamental to maintain ruminal homeostasis and thereby prevent acidosis, ruminal epithelial damage and thus intoxication of the whole animal. The current state of knowledge on these crucial functions will be reviewed.

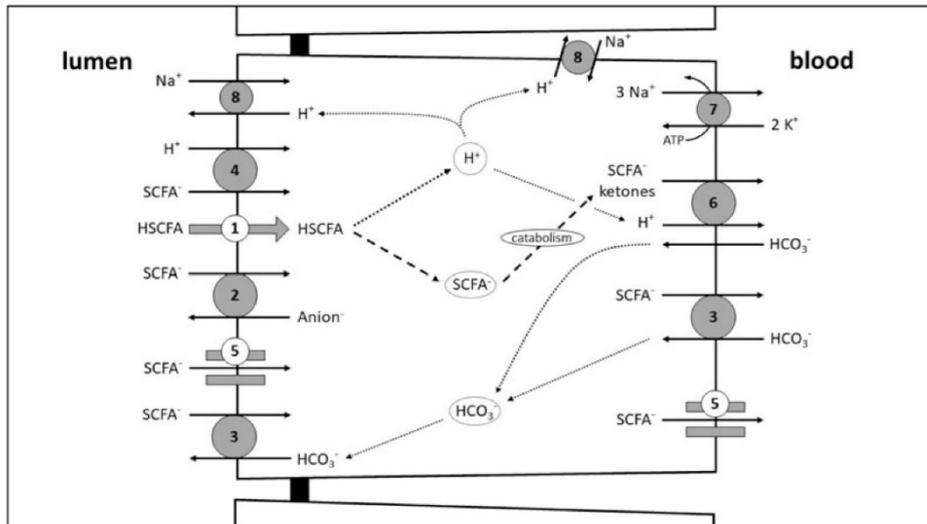
## Transport of SCFA across the epithelium

In order to balance pH on the one hand and to absorb the emerging products of microbial fermentation on the other hand, efficient mechanisms for SCFA transport are crucial for intraruminal as well as epithelial health, as shown in Figure 1. Due to the pK of ~4.8, 90–99% of SCFA are dissociated and thereby present as SCFA-anions (SCFA<sup>-</sup>) and H<sup>+</sup>,

© The Author(s), 2020. Published by Cambridge University Press on behalf of Hannah Dairy Research Foundation.



CAMBRIDGE  
UNIVERSITY PRESS



**Fig. 1.** Transport processes across the ruminal epithelium. By the current state of knowledge, SCFA are absorbed from the lumen *via* a number of different routes: ① passive diffusion, ② nitrate-sensitive anion exchangers, ③  $\text{HCO}_3^-$ -exchangers, ④ MCT4, and an ⑤ anion channel. Their basolateral efflux is mediated by ⑥ MCT1, ⑦  $\text{HCO}_3^-$ -exchangers, as well as an ⑧ anion channel. The latter may be driven by the ⑨  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Occurring  $\text{H}^+$  can be extruded *via* ⑩ NHE and MCT1, while  $\text{HCO}_3^-$ -exchangers on the apical and basolateral side ensure buffer supply to the epithelium and lumen. For clarity only one cell layer is depicted, but this represents the multi-layered, stratified squamous epithelium.

while only 1–10% are undissociated (HSCFA) at a physiological ruminal pH of 5.8–6.8 (Bergman, 1990). HSCFA may diffuse passively through the lipid bilayers along their concentration gradient (Fig. 1, route ①). However, not only because of the low amount of HSCFA, the significance of lipophilic transfer has to be questioned. Gäbel *et al.* (2002) and Aschenbach *et al.* (2009) described no or only a minor influence of chain length, i.e. lipophilicity, on SCFA disappearance, thus contradicting a significant diffusion of HSCFA. A decline in pH, i.e. increasing [HSCFA], resulted in higher absorption rates of SCFA, but the effect was inconsistent and smaller than predicted by the Henderson–Hasselbalch equation (Dijkstra *et al.*, 1993; Sehested *et al.*, 1999a; Gäbel *et al.*, 2002). At the basolateral side, lipophilic diffusion seems even less likely, as almost 100% of SCFA are dissociated at a cytosolic pH of 7.4.

All these results point to the existence of other, protein-mediated transport mechanisms for SCFA<sup>-</sup>. Several findings suggested anion exchangers as a promising group of proteins to transfer SCFA<sup>-</sup> across the apical membrane of the epithelium in an electroneutral manner. Uptake of acetate and especially propionate (butyrate to a smaller degree) has been shown to correlate negatively with the disappearance of chloride from the mucosal side and to be reduced by mucosal addition of nitrate under different incubation conditions (Fig. 1, route ②) (Aschenbach *et al.*, 2009). The same study revealed that acetate uptake is essentially driven in a  $\text{HCO}_3^-$ -dependent manner (Fig. 1, route ③). An increase in acetate concentration resulted in an increased acetate uptake, especially in  $\text{HCO}_3^-$ -containing solutions, indicating that the exchange of  $\text{HCO}_3^-$  and acetate is driven by the concentration gradient for acetate and might even counteract opposing  $\text{HCO}_3^-$  concentration gradients due to a higher impact of the acetate concentration gradient on transport activities (Aschenbach *et al.*, 2009). The authors hypothesized that, at lower ruminal pH, the increase of acetate uptake is not due to an increase of HSCFA,

but to an additional driving force for  $\text{HCO}_3^-$  into the ruminal lumen. Net butyrate absorption was also proven to be  $\text{HCO}_3^-$ -dependent (Sehested *et al.*, 1999b). An early study by Gäbel *et al.* (1991) already demonstrated a great stimulatory impact of SCFA present in the lumen on  $\text{HCO}_3^-$  secretion, while the absence of SCFA reversed  $\text{HCO}_3^-$  movement to a net absorption. Regarding the basolateral extrusion of SCFA, the existence of anion exchangers is supported by Ussing chamber studies that detected a large part of the SCFA transport from the blood to the lumen to be sensitive to a serosal addition of nitrate (Dengler *et al.*, 2014).

Thus, anion exchange mechanisms seem to play a role both for the uptake of SCFA into the epithelium as well as the extrusion into the blood. For these anion exchange mechanisms, several proteins have to be taken into account: Bilk *et al.* (2005) demonstrated the expression of anion exchanger 2 (AE2), downregulated-in-adenoma (DRA) and putative anion exchanger 1 (PAT1) as potential candidates for a SCFA-anion-exchange across the ruminal epithelium on mRNA level. Stumpff (2018) proposed DRA and PAT1 to be located in the apical, and AE2 and  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -cotransporter (NBC) in the basolateral ruminal membrane. However, in immunohistochemical analyses, PAT1 could be detected in the basolateral layers of the ruminal epithelium (Omer, 2016). However, even though several studies detected a significant influence of ruminal parameters like pH and SCFA concentration on gene expression of PAT1, AE2 and DRA (Yan *et al.*, 2014; Dengler *et al.*, 2015), functional evidence that clearly shows the specific role of the various candidates in SCFA transport and their side-specificity is still lacking.

Another protein that was detected in the basolateral membrane immunohistochemically is the monocarboxylate transporter 1 (MCT1, Fig. 1, route ⑥), which works as a symporter with  $\text{H}^+$  and/or as an antiporter with  $\text{HCO}_3^-$  (Kirat *et al.*, 2006; Dengler *et al.*, 2014). It has been shown to transport

SCFA-metabolites like lactate,  $\beta$ -hydroxybutyrate and acetoacetate (Müller *et al.*, 2002), but also SCFA themselves, especially acetate and propionate (Kirat *et al.*, 2006; Dengler *et al.*, 2014). By doing so, it not only assures maintenance of intracellular osmolarity, but also alkalizes the cytosol and prevents epithelial acidosis. Kirat *et al.* (2006) also detected a reduction of acetate transport from the lumen to the blood side, when they applied an MCT inhibitor to the mucosal buffer solution *in vitro*, but less pronounced compared to the serosal addition of the inhibitor. In a follow-up study, they demonstrated MCT4 (Fig. 1, route ④) in the apical membrane of the ruminal epithelium by immunofluorescence staining and postulated that it takes up SCFA<sup>-</sup> from the lumen in symport with H<sup>+</sup> (Kirat *et al.*, 2007). In contrast to these findings, Aschenbach *et al.* (2009) did not find an influence of MCT inhibitors on the apical uptake of acetate. If MCT4 contributed substantially to apical SCFA<sup>-</sup> uptake, it would thereby also lead to an increase of luminal pH, while the concentration of H<sup>+</sup> in the epithelium would rise. A similar transport, but without direct influence on pH, was postulated by Rackwitz (2012) who detected functional evidence for an involvement of Na<sup>+</sup>-coupled MCT1 (SMCT1) in SCFA transport, especially of propionate and butyrate.

Whilst all of these pathways (except SMCT1) mediate an electroneutral SCFA uptake, a minor part of SCFA seems to be transported electrogenically (Fig. 1, route ⑤). Sehested *et al.* (1999b) could show in Ussing chamber studies that 30% of the butyrate transport from the lumen to the blood side was voltage dependent, ergo electrogenic. The authors concluded that an anion channel may be involved which might not play a quantitative role *in vivo*. In addition, both in cultured ruminal epithelial cells and in intact ruminal epithelial tissue, an acetate conductance (and in the case of cultured cells also a propionate and butyrate conductance) was detected (Stumpff *et al.*, 2009; Georgi *et al.*, 2014; Rackwitz and Gäbel, 2018). Whereas Rackwitz and Gäbel (2018) found evidence for an apical localization of this channel, Georgi *et al.* (2014) postulate a basolateral occurrence of this anion conductance. Besides maxi-anion channels (Georgi *et al.*, 2014), Rackwitz (2012) also proposed an involvement of outwardly rectified Cl<sup>-</sup> channels. Regardless of its contribution *in vivo*, an apical localization of this channel would lead to an uptake of SCFA<sup>-</sup> while epithelial pH is not influenced. This may serve as an epithelial protection mechanism under lumenally acidotic conditions (Rackwitz and Gäbel, 2018). Basolateral electrogenic anion transport in contrast could keep up electroneutrality of the epithelium and may be driven by the electrical gradient established by the basolateral Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Fig. 1, route ⑥).

All the mechanisms described above (except SMCT1 and electrogenic uptake of SCFA<sup>-</sup>) significantly contribute to an alkalization of the ruminal content either due to coupling of SCFA absorption with HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion or concomitant disappearance of H<sup>+</sup>. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion across the ruminal wall becomes even more important as more and more SCFA are produced. In high production dairy cows, the HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion across the ruminal wall induced by SCFA uptake roughly equals salivary HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> delivery (approx. 30 M/d) (Allen, 1997). Although SCFA<sup>-</sup> uptake both by anion exchange mechanisms or by MCT and HSCFA absorption leads to an alkalization of the ruminal lumen, it strongly acidifies the epithelial cytosol either due to a loss of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> or uptake of H<sup>+</sup>. Thus, a plethora of alkalizing mechanisms were detected in the ruminal epithelium. Intracellular acidification can be neutralized either by HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake on the basolateral side or by H<sup>+</sup> extrusion *via* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchangers

(NHE, Fig. 1, route ⑦) or MCT1 at the basolateral membrane (Müller *et al.*, 2002; Penner *et al.*, 2011). Basolateral anion exchangers could provide the HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> supply from the blood to deliver buffer not only to the epithelial cytosol but also for anion exchange mechanisms in the apical membrane. The extrusion of SCFA to the blood stream delivers nutrients to the organism whilst osmotic destabilization of the ruminal epithelium is prevented, thus it is equally important as their apical uptake. However, whereas the apical uptake of SCFA has been studied intensively, basolateral efflux is not yet understood to the same degree.

Summing up the findings on ruminal SCFA transport, the last decades have given further insight into different uptake pathways for SCFA, illustrating a broad set of diverse absorptive functions. This variety of transporters probably works redundantly, and their specific role *in vivo* is still not completely clear. Yet, it is likely that several mechanisms still need to be identified.

#### Catabolism of SCFA in the ruminal epithelium and its advantages

Intraepithelial break-down of SCFA serves several purposes: first of all, it guarantees the alimentation of the epithelium itself, which in contrast to most other tissues prefers SCFA, especially butyrate, as an energy source instead of glucose or glutamine (Britton and Krehbiel, 1993; Kristensen and Harmon, 2004a). Secondly, it maintains the concentration gradient for SCFA across the epithelium to ensure luminal uptake, while the produced metabolites (mainly ketones) also serve as energy fuels for peripheral tissues (Gäbel *et al.*, 2002). Moreover, these metabolites may be exported *via* additional extrusion pathways to keep intracellular osmolarity stable, thus preventing an influx of water and consequently cell death by osmotic rupture. Finally, the catabolism of these acids prevents possibly harmful effects of excessive SCFA accumulation, in particular butyrate, as described at the end of this section.

As shown by Nozière *et al.* (2000) in portal recovery experiments, SCFA break-down in ovine ruminal epithelium comprises up to 16, 33 and 70% of the acetate, propionate and butyrate, respectively, taken up on the luminal side. Kristensen and Harmon (2004b) assumed an even smaller proportion for propionate catabolism in studies in sheep. They also hypothesized that acetate might additionally derive from metabolism of butyrate and valerate, thus even more acetate might be metabolized than postulated by Nozière *et al.* (2000). This is in agreement with earlier studies, indicating an endogenous production of acetate, as *in vitro* transport studies show that (if chemically measured) it appears in a much higher degree on the blood side than the tracer-marked acetate applied on the lumen side (Sehested *et al.*, 1999a). The same study revealed a high degree of metabolism of propionate and butyrate.

The differences in metabolism rates of the SCFA are based on the one hand presumably on different activating acyl-CoA-enzymes for the individual SCFA and their metabolites (Bond *et al.*, 2019), and on the other hand on different pathways for the diverse SCFA: while acetate and butyrate enter the Krebs cycle to be oxidized to CO<sub>2</sub> (acetate) or ketones *via*  $\beta$ -oxidation and acetoacetyl-CoA (butyrate), propionate may be metabolized completely in Krebs cycle to CO<sub>2</sub> or *via* malate to pyruvate and lactate. As a consequence of the different metabolic pathways, the metabolites produced differ between the three SCFA. Regarding the anaerobic pathways, propionate was

shown to be degraded mostly to lactate, while butyrate delivers primarily ketones like  $\beta$ -hydroxybutyrate and acetoacetate (Kristensen and Harmon, 2004b). Concerning the aerobic pathways, a large production of  $\text{CO}_2$  by SCFA metabolism was detected for all three major SCFA when applied on the mucosal side (Sehested *et al.*, 1999a). Penner *et al.* (2011) postulated that ketogenesis predominantly takes place in the basal layers, as most of the mitochondria were detected in these structures (Graham and Simmons, 2005).

As mentioned above, deficiency of this SCFA catabolism might provoke epithelial damage due to changes in intracellular pH and osmolarity. In the case of butyrate, additional effects must be expected, since butyrate has both systemic and local genomic effects. *In vivo* experiments delivered evidence for an induction of cell proliferation by a rapid butyrate administration (Sakata and Tamate, 1978). In cell culture experiments, butyrate provoked increased apoptosis in epithelial ruminal cells (Neogrády *et al.*, 1989). Additionally, even though positive effects on papillae growth could be induced in feeding trials with butyrate supplementation (Malhi *et al.*, 2013), increased parakeratosis is found under acidotic conditions (Plaizier *et al.*, 2018) which might be caused by increased butyrate concentrations. In the case of an overproduction of n-butyric acid by the ruminal microorganisms, the epithelial capacity to metabolize butyrate efficiently seems to be reduced (Kristensen *et al.*, 2000), presumably leading to the proliferative alterations observed. Thus, a balanced ruminal SCFA production from feed in line with the epithelial catabolic capacities is pivotal to ruminal health.

#### Acidosis and ruminal epithelium

These functions of the ruminal epithelium in absorption and catabolism of the SCFA as well as buffer secretion underline its crucial role in the prevention of homeostatic imbalances in the rumen. When the SCFA production exceeds their absorption and catabolism and/or the aboral efflux of the acids as well as the buffering *via* saliva and epithelial  $\text{HCO}_3^-$  secretion, acidotic conditions occur (Humer *et al.*, 2018). As explained above, the epithelium alkalizes the ruminal lumen by absorbing  $\text{H}^+$  (via HSCFA or MCT) as well as secreting  $\text{HCO}_3^-$ . With increasing SCFA concentration, the epithelium also turns acidic due to the enhanced loss of  $\text{HCO}_3^-$  and uptake of  $\text{H}^+$  (Müller *et al.*, 2000). This leads to severe damage of the epithelial lining and development of ruminitis (Steele *et al.*, 2016). In extreme situations, it is no longer able to fulfil its role in alkalization of the ruminal lumen, as well as the catabolism of absorbed SCFA and detoxification of potential noxious substances (Aschenbach *et al.*, 2000; Kristensen *et al.*, 2000). As a result of missing luminal alkalization, the microbial composition shifts, leading to elevated levels of D-lactate, which is not taken up in exchange for  $\text{HCO}_3^-$  and hardly metabolized in the ruminal epithelium where it accumulates (Gäbel *et al.*, 1991; Allen, 1997; Snyder and Credille, 2017). This provokes a vicious circle as the lumen turns even more acidotic and osmotic balance of the lumen and the epithelium is endangered. The fatal combination of corrosive lactate accumulation and the osmotic disbalance due to an increase of SCFA and their metabolites in the ruminal epithelium finally leads to a disruption of the epithelium (Snyder and Credille, 2017) aggravating the situation and leading to clinical acidosis. While exact limits of physiological rumen pH cannot be defined due to differences according to the sampling site and individual susceptibility, acute clinical acidosis often becomes manifest

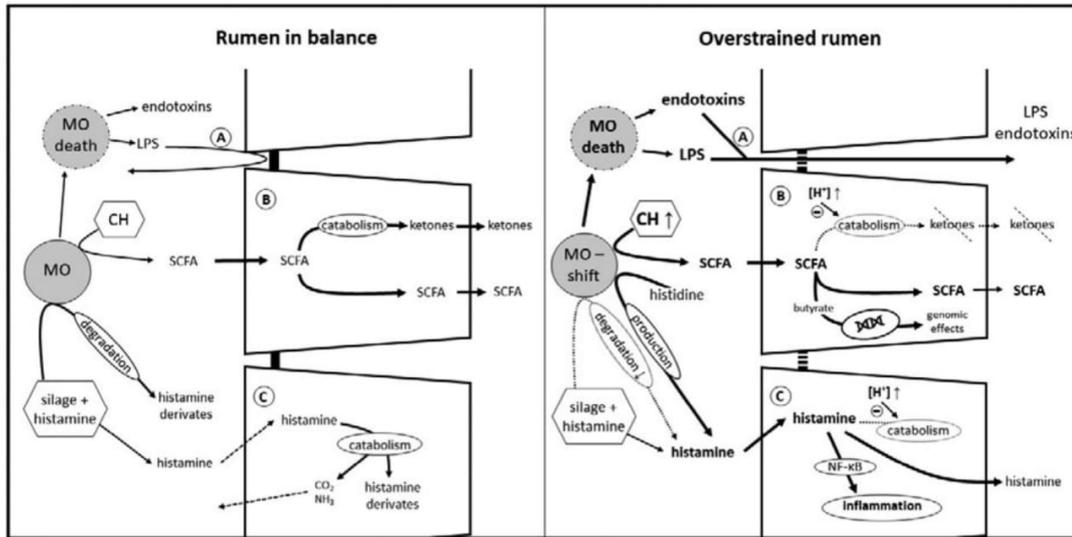
when ruminal pH drops below a certain threshold due to the aforementioned accumulation of D-lactate, involving symptoms like a distended rumen, diarrhoea, anorexia, neurologic symptoms etc. (Snyder and Credille, 2017).

Far more common than acute clinical acidosis and often undiscovered clinically, is the condition known as subacute ruminal acidosis (SARA). According to Humer *et al.* (2018), SARA can be defined as a drop of pH below approximately 5.5–5.8 for several hours per day, with elevated levels of SCFA and a rise in luminal osmolarity while the physical examination is inconspicuous. Humer *et al.* (2018) reported that 11–26% of dairy cattle are considered to suffer from this form of acidosis, but it might often be undiscovered, especially in early lactation. However, SARA leads to pain and discomfort in the animals and, economically important, to a depression of milk yield (Humer *et al.*, 2018). To prevent acidotic digestive disorders, specific precautions should be exercised when calculating feed rations for high producing animals, but not all individuals will respond to the same diet similarly, as indicated by a large spectrum of pH responsiveness to excessive amounts of rapidly fermentable carbohydrates detected in sheep (Penner *et al.*, 2009). Even though the mechanisms of this individual susceptibility still need to be elucidated, the impact of SCFA absorption across the ruminal epithelium on rumen health and likewise on maintenance of the animal's health can be derived from this study: sheep with a higher SCFA absorption capacity were found to be less likely to suffer from an artificially induced SARA than sheep with a lower absorption rate (Penner *et al.*, 2009) which again emphasizes the role of ruminal epithelium in the prevention of systemic illness and will be discussed in the next section.

#### Adaptation capacities of the ruminal epithelium

Dairy cattle diets often involve feeding highly fermentable carbohydrates to ensure animal performance. In the young calf, this requires the development of the monogastric digestive system into a mature forestomach system. Changes of the microbiota, as well as structural and functional transformation of the ruminal wall induced by solid feed intake instead of milk, lead to an increased rumen size of growing calves (Steele *et al.*, 2016; Yohe *et al.*, 2019) accompanied by higher, wider and also denser ruminal papillae (Warner *et al.*, 1956; Tamate *et al.*, 1962). Increased particle size, often modulated by inclusion of forage into the diet early in life, enhances total rumen growth and muscularization (Warner *et al.*, 1956; Mirzaei *et al.*, 2015). Additionally, the chemical composition of feed (usually concentrate in starter diets) seems to be crucial for the growth of ruminal papillae and epithelium (Warner *et al.*, 1956; Sander *et al.*, 1959). SCFA, and primarily butyrate and propionate, have been shown to stimulate neonatal papillae growth, including an increased epithelial cell proliferation leading to a thicker epithelial layer (Sander *et al.*, 1959; Yohe *et al.*, 2019).

This plasticity of the ruminal epithelium is still observable in adult ruminants under different feeding conditions. However, even though the well-developed adult ruminal epithelium can adjust to a great extent, a change of diet that is introduced too rapidly or too drastically might still overburden this adaptive ability. Various studies *in vivo* as well as *in vitro* indicate a high potential of the ruminal wall to adjust to different feeding situations: whereas a reduction or deprivation of feed leads to a dramatically diminished SCFA absorption across the epithelium already within 2 to 5 d (Gäbel *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2013), adjustment to



**Fig. 2.** Detoxification in the rumen and within the ruminal epithelium. Left picture: transport mechanisms as shown in Figure 1 work in a coordinated fashion. The production and absorption of SCFA is in balance, ruminal pH and osmolarity are within the physiological range. Moderate amounts of endotoxin, LPS and histamine produced by the microorganisms or taken up with the diet cannot cross the epithelial barrier. Right picture: increased amounts of easily fermentable carbohydrates lead to an increased production of SCFA. The absorptive and buffer capacity of the ruminal epithelium is overstrained, leading to epithelial acidosis and a shift in microorganisms. Toxins can cross the epithelial wall and the ruminal epithelium is confronted with larger amounts of histamine permeating the cell membrane. (A) toxin absorption, (B) SCFA transport and catabolism, (C) histamine absorption and catabolism. MO, microorganisms; LPS, lipopolysaccharides; CH, carbohydrates. For clarity only one cell layer is depicted, but this represents the multi-layered, stratified squamous epithelium.

increased amounts of feed or changes in feed composition seems to occur on the cellular as well as on the epithelial level. Within one week, changes of absorptive capacities for electrolytes and SCFA are detected without noticeable differences in epithelial morphology like epithelial surface area (Etschmann *et al.*, 2009; Schurmann *et al.*, 2014). This is particularly apparent when high concentrate is fed once daily in comparison to constant feeding during the day (Sehested *et al.*, 1997). Changes in electrophysiological properties and the permeability of the ruminal wall indicate that enhanced  $\text{HCO}_3^-$ -dependent uptake is the main mechanism of this early functional adaptation for SCFA absorption, while increased passive diffusion was also observed (Klevenhusen *et al.*, 2013; Schurmann *et al.*, 2014).

Besides these functional alterations (presumably at the cellular level) without detectable variations of epithelial structure, more conspicuous morphological modifications may also take place. These are usually seen later on and reach peak levels roughly 6 weeks after the change of diet (Etschmann *et al.*, 2009). Similar to the development in calves, but probably less complex concerning their morphological and functional impact, the increased intake of easily fermentable carbohydrates leads to an increase of papillae growth and total surface area in adult ruminants (Gäbel *et al.*, 1987). An elevated mRNA expression of transporters for SCFA absorption and pH homeostasis as well as changes in membrane composition (and thereby increasing epithelial permeability) occurred after several weeks of moderate concentrate diet or a supplementation with saturated lipids, respectively (Yan *et al.*, 2014; Verdugo, 2016). Additionally, a modification of uptake pathways rather than increasing total SCFA absorption 4 weeks after the alterations in feed composition were noticed (Chibisa *et al.*, 2015). Finally, increases in splanchnic blood flow, SCFA absorption and subsequently

liver metabolism can be induced by elevating the SCFA concentration in the rumen due to dietary changes during transition (Reynolds *et al.*, 2003; Storm *et al.*, 2011). When fed moderate concentrate diets, the rapid expansion of the epithelial uptake capacity of SCFA, both *via* passive diffusion and an increase in  $\text{HCO}_3^-$ -dependent pathways, shows that the ruminal epithelium is perfectly able to prevent the occurrence of SARA: it not only reduces the concentration of SCFA in the lumen and thereby removes acids as well as stabilizes ruminal osmolarity, but also leads to higher secretion of  $\text{HCO}_3^-$ , additionally helping to alkalize luminal pH. Morphological adaptations help to ensure high energy input while osmotic and acid-base homeostasis are maintained.

Nonetheless, there seems to be a distinct individual variety of absorptive capability: sheep that were not susceptible to an induction of SARA were found to have a greater uptake of acetate and butyrate in comparison to sheep whose ruminal pH was below 5.8 for more than 20 min after a glucose drench (Penner *et al.*, 2009). This could be attributed to an increase of the  $\text{HCO}_3^-$ -dependent as well as the  $\text{HCO}_3^-$ -independent anion-exchange pathway for acetate and to an increase of  $\text{HCO}_3^-$ -independent transport of butyrate (Penner *et al.*, 2009; Chibisa *et al.*, 2015). This individual predisposition to SARA is not well understood yet, but is of major importance for modern livestock feeding recommendations, as some animals will not be able to cope with an uncontrolled SCFA accumulation as easily as others, even though they are fed the same feed under the exact same conditions. In addition to dietary adaptation, the rumen and its epithelium must also be able to adapt to other environmental challenges such as water and salt stress. This has recently been reviewed by Giger-Reverdin *et al.* (2020) and will not be considered further here.

### Detoxification capacity of the ruminal epithelium

Besides providing valuable nutrients for the epithelium as well as the whole organism, the ruminal epithelium serves as an important barrier to potentially harmful substances like toxins and pathogens in the ruminal fluid as demonstrated in Figure 2. As the ruminal mucosa consists of a squamous, stratified multi-layered epithelium, its histological structure already lays the foundation for this protective task: tight-junction proteins between cells of the outer non-keratinized layers (i.e. the *stratum granulosum* on the interface with *stratum corneum*) seal up the apical layers to stop potential hazards from permeating the ruminal wall *via* the paracellular route, while substrates like SCFA can easily pass transcellularly through the medium layers to basal layers with the help of gap junctions in *stratum granulosum* to *stratum spinosum* (Graham and Simmons, 2005).

As described above, high grain diets lead to an increase of luminal SCFA and potentially a higher fraction of butyrate (Dieho *et al.*, 2016). Degradation of butyrate nourishes the epithelium and decreases the levels of acid that might provoke parakeratosis and other harmful effects on the epithelium (Fig. 2B). However, increasing the concentrate ratio is not only associated with a destabilization of ruminal pH, it also leads to increased metabolites in rumen fluid derived from methylated amines and lipopolysaccharides (LPS, released upon death of gram-negative bacteria) such as endotoxins, methylamine and others (Fig. 2A). Moreover, these associated toxins were found to translocate more easily across the ruminal wall at an acidic mucosal pH, leading to an aggravation of the ruminal imbalance induced by pH decompensation (Plaizier *et al.*, 2018). When SARA was artificially induced by high-concentrate diets, increased levels of LPS were detected in the portal and hepatic veins. Simultaneously, liver inflammation could be observed, as blood chemistry, phosphorylation patterns and histopathology of the liver indicated an injury by ruminally derived LPS (Guo *et al.*, 2017). In contrast, Klevenhusen *et al.* (2013) observed increased LPS concentrations in serum after a feeding trial with low barley diet, but no signs of systemic inflammation.

In addition to LPS and butyrate, histamine is another substance emerging in the rumen fluid that has the potential to endanger the animal's health (Fig. 2C). In cultured ruminal epithelial cells, an activation of inflammatory processes *via* the NF- $\kappa$ B pathway by histamine has been shown (Sun *et al.*, 2017). Early pioneer studies by Kay and Sjaastad (1974) already showed that the organism prevents excessive uptake of the biogenic amine: a certain amount of administered histamine is degraded within the forestomach and exhaled as CO<sub>2</sub> or excreted with urine within 48 h. Studies that investigated adaptation mechanisms to diets with high amounts of biogenic amines detected a degradation of all biogenic amines examined, whereof histamine was the amine with the highest breakdown, followed by tyramine and putrescine. Degradation was much higher (70 v. 25%) in adapted animals than in non-adapted. This is most likely achieved by an increase of amine-degrading microorganisms in the rumen (van Os *et al.*, 1995). It is not only the ruminal microorganisms that prevent damage by amines, the epithelium itself also plays a major part. Ussing chamber experiments indicate that only a small portion of histamine is absorbed by the healthy epithelium (Aschenbach *et al.*, 2000), and of the histamine that is absorbed, more than 90% is efficiently catabolized within the epithelium under physiological conditions. Electrophysiological experiments even hint at a secretion of histamine, supporting

the detoxification function of the ruminal epithelium (Aschenbach *et al.*, 2000). Nonetheless, when high concentrate rations are fed, histamine-producing microbes proliferate, especially *Allisonella histaminiformans* (Snyder and Credille, 2017). When changes of the microbiome and the accumulation of SCFA and H<sup>+</sup> in the lumen exceed the ruminal adaptation capacity, this often escalates in a vicious circle: the epithelium becomes acidotic and epithelial uptake of histamine increases due to an elevation of its general permeability (Aschenbach *et al.*, 2000). *In vitro* experiments suggest reduced histamine catabolism in acidotic epithelia which finally leads to an aggravation of the clinical symptoms (Aschenbach *et al.*, 2000; Snyder and Credille, 2017). One study evaluated the impact of additional HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> administration to high-grain adapted ruminal fluid in an *in vitro* approach, discovering an increase in pH, gas production and total SCFA concentration while the production of biogenic amines was decreased (Mao *et al.*, 2017). Nonetheless, LPS concentrations were even more elevated in this study, making it difficult to give an undifferentiated recommendation to supplement HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in high-concentrate diets.

As the mechanisms within the ruminal epithelium supporting its function as a healthy barrier are not widely understood to date, future research should focus on these defence pathways to gain a better understanding and to adapt livestock farming accordingly.

### Conclusion

Modern ruminant husbandry demands a delicate balance between high energy input to ensure performance and a diet which guarantees that the ruminal microorganisms can ferment the ingested nutrients and that the epithelial uptake and metabolization capacities are not exceeded. By absorbing SCFA *via* passive diffusion and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange, the ruminal epithelium holds an outstanding position in maintenance of luminal osmolarity as well as acid-base homeostasis. Furthermore, it ensures the delivery of nutrients for the epithelium itself and the whole organism while keeping track of the intraepithelial pH and osmolarity as well. Finally, it plays a decisive role in preserving the animal's health by exclusion, degradation and detoxification of potentially harmful substances.

Nonetheless, to warrant these beneficial functions, the epithelium must not be overburdened with excessive amounts of highly fermentable carbohydrates or a large number of toxins, as the physiological properties are limited even though the epithelium largely adapts to dietary challenges. Further research needs to be conducted to identify the individual factors that make some animals more prone to pH decompensation than others, and to determine how these factors can be modified.

### References

- Allen MS (1997) Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *Journal of Dairy Science* **80**, 1447–1462.
- Aschenbach JR, Oswald R and Gäbel G (2000) Transport, catabolism and release of histamine in the ruminal epithelium of sheep. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* **440**, 171–178.
- Aschenbach JR, Bilk S, Tadesse G, Stumpff F and Gäbel G (2009) Bicarbonate-dependent and bicarbonate-independent mechanisms contribute to nondiffusive uptake of acetate in the ruminal epithelium of sheep. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **296**, 1098–1107.

- Aschenbach JR, Penner GB, Stumpff F and Gäbel G (2011) Ruminant nutrition symposium: role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *Journal of Animal Science* **89**, 1092–1107.
- Bergman EN (1990) Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews* **70**, 567–590.
- Bilk S, Huhn K, Honscha KU, Pfannkuche H and Gäbel G (2005) Bicarbonate exporting transporters in the ovine ruminal epithelium. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* **175**, 365–374.
- Bond JJ, Donaldson AJ, Coumans JVF, Austin K, Ebert D, Wheeler D and Oddy VH (2019) Protein profiles of enzymatically isolated rumen epithelium in sheep fed a fibrous diet. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **10**, 5.
- Britton R and Krehbiel C (1993) Nutrient metabolism by gut tissues. *Journal of Dairy Science* **76**, 2125–2131.
- Chibisa GE, Gorka P, Penner GB, Berthiaume R and Mutsvangwa T (2015) Effects of partial replacement of dietary starch from barley or corn with lactose on ruminal function, short-chain fatty acid absorption, nitrogen utilization, and production performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science* **98**, 2627–2640.
- Dengler F, Rackwitz R, Benesch F, Pfannkuche H and Gäbel G (2014) Bicarbonate-dependent transport of acetate and butyrate across the basolateral membrane of sheep rumen epithelium. *Acta Physiologica (Oxford, England)* **210**, 403–414.
- Dengler F, Rackwitz R, Benesch F, Pfannkuche H and Gäbel G (2015) Both butyrate incubation and hypoxia upregulate genes involved in the ruminal transport of SCFA and their metabolites. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **99**, 379–390.
- Dieho K, Dijkstra J, Schonewille JT and Bannink A (2016) Changes in ruminal volatile fatty acid production and absorption rate during the dry period and early lactation as affected by rate of increase of concentrate allowance. *Journal of Dairy Science* **99**, 5370–5384.
- Dijkstra J, Boer H, van Bruchem J, Bruining M and Tamminga S (1993) Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. *British Journal of Nutrition* **69**, 385.
- Etschmann B, Suplie A and Martens H (2009) Change of ruminal sodium transport in sheep during dietary adaptation. *Archives of Animal Nutrition* **63**, 26–38.
- Gäbel G, Bestmann M and Martens H (1991) Influences of diet, short-chain fatty acids, lactate and chloride on bicarbonate movement across the reticulo-rumen wall of sheep. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine* **38**, 523–529.
- Gäbel G, Marek M and Martens H (1993) Influence of food deprivation on SCFA and electrolyte transport across sheep reticulorumen. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine* **40**, 339–344.
- Gäbel G, Martens H, Sündermann M and Gálfi P (1987) The effect of diet, intraruminal pH and osmolarity on sodium, chloride and magnesium absorption from the temporarily isolated and washed reticulo-rumen of sheep. *Quarterly Journal of Experimental Physiology (Cambridge, England)* **72**, 501–511.
- Gäbel G, Aschenbach JR and Müller F (2002) Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium. *Animal Health Research Reviews* **3**, 15–30.
- Georgi MI, Rosendahl J, Ernst F, Günzel D, Aschenbach JR, Martens H and Stumpff F (2014) Epithelia of the ovine and bovine forestomach express basolateral maxi-anion channels permeable to the anions of short-chain fatty acids. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* **466**, 1689–1712.
- Giger-Reverdin S, Domange C, Broudicou LP, Sauvart D and Berthelot V (2020) Rumen function in goats, an example of adaptive capacity. *Journal of Dairy Research* **87**, 45–51.
- Graham C and Simmons NL (2005) Functional organization of the bovine rumen epithelium. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **288**, R173–R181.
- Guo J, Chang G, Zhang K, Xu L, Jin D, Bilal MS and Shen X (2017) Rumen-derived lipopolysaccharide provoked inflammatory injury in the liver of dairy cows fed a high-concentrate diet. *Oncotarget* **8**, 46769–46780.
- Humer E, Aschenbach JR, Neubauer V, Kröger I, Khiaosa-Ard R, Baumgartner W and Zebeli Q (2018) Signals for identifying cows at risk of subacute ruminal acidosis in dairy veterinary practice. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **102**, 380–392.
- Kay RNB and Sjaastad OV (1974) Absorption and catabolism of histamine in sheep. *The Journal of Physiology* **243**, 79–99.
- Kirat D, Masuoka J, Hayashi H, Iwano H, Yokota H, Taniyama H and 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 and Kato S (2007) Expression, cellular localization, and functional role of monocarboxylate transporter 4 (MCT4) in the gastrointestinal tract of ruminants. *Gene* **391**, 140–149.
- Klevenhusen F, Hollmann M, Podstatzky-Lichtenstein L, Krametter-Frötscher R, Aschenbach JR and Zebeli Q (2013) Feeding barley grain-rich diets altered electrophysiological properties and permeability of the ruminal wall in a goat model. *Journal of Dairy Science* **96**, 2293–2302.
- Kristensen NB and Harmon DL (2004a) 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 NB and Harmon DL (2004b) Splanchnic metabolism of volatile fatty acids absorbed from the washed reticulorumen of steers. *Journal of Animal Science* **82**, 2033–2042.
- Kristensen NB, Pierzynowski SG and Danfaer A (2000) Net portal appearance of volatile fatty acids in sheep intraruminally infused with mixtures of acetate, propionate, isobutyrate, butyrate, and valerate. *Journal of Animal Science* **78**, 1372–1379.
- Malhi M, Gui H, Yao L, Aschenbach JR, Gäbel G and 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.
- Mao S, Huo W, Liu J, Zhang R and Zhu W (2017) In vitro effects of sodium bicarbonate buffer on rumen fermentation, levels of lipopolysaccharide and biogenic amine, and composition of rumen microbiota. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **97**, 1276–1285.
- Mirzaei M, Khorvash M, Ghorbani GR, Kazemi-Bonchenari M, Riasi A, Nabipour A and van den Borne JJGC (2015) Effects of supplementation level and particle size of alfalfa hay on growth characteristics and rumen development in dairy calves. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **99**, 553–564.
- Müller F, Aschenbach JR and 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. *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* **170**, 337–343.
- Müller F, Huber K, Pfannkuche H, Aschenbach JR, Breves G and 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.
- Nagaraja TG (2016) Microbiology of the rumen. In Millen DD, de Beni Arrigoni M and Lauritano Pacheco RD (eds), *Rumenology*. Cham: Springer International Publishing, pp. 39–61.
- Neogrady S, Gálfi P, Kutas F and Sakata T (1989) The effects of butyrate and glucagon on the proliferation of ruminal epithelial cells in culture. *Veterinary Research Communications* **13**, 27–29.
- Nozière P, Martin C, Rémond D, Kristensen NB, Bernard R and Doreau M (2000) Effect of composition of ruminally-infused short-chain fatty acids on net fluxes of nutrients across portal-drained viscera in underfed ewes. *British Journal of Nutrition* **83**, 521–531.
- Omer AOA (2016) *Involvement of the putative anion transporter1 (SLC26A6) in permeation of short chain fatty acids and their metabolites across the basolateral membrane of ovine ruminal epithelium* (Thesis Leipziger Blaue Hefte), Leipzig.
- Penner GB, Aschenbach JR, Gäbel G, Rackwitz R and 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. *Journal of Nutrition* **139**, 1714–1720.

- Penner GB, Steele MA, Aschenbach JR and McBride BW** (2011) Molecular adaptation of ruminal epithelia to highly fermentable diets. *Journal of Animal Science* **89**, 1108–1119.
- Phuntsok T, Froetschel MA, Amos HE, Zheng M and Huang YW** (1998) Biogenic amines in silage, apparent postruminal passage, and the relationship between biogenic amines and digestive function and intake by steers. *Journal of Dairy Science* **81**, 2193–2203.
- Plaizier JC, Danesh Mesgaran M, Derakhshani H, Golder H, Khafipour E, Kleen JL, Lean I, Looor J, Penner G and Zebeli Q** (2018) Review: enhancing gastrointestinal health in dairy cows. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience* **12**, s399–s418.
- Rackwitz R** (2012) *Electrogenic Mechanisms of Short Chain Fatty Acid Permeation across the Rumen Epithelium*. (Thesis Leipziger Blaue Hefte). Leipzig.
- Rackwitz R and Gäbel G** (2018) Permeation of acetate across sheep ruminal epithelium is partly mediated by an anion channel. *Research in Veterinary Science* **117**, 10–17.
- Reynolds CK, Aikman PC, Lupoli B, Humphries DJ and Beever DE** (2003) Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *Journal of Dairy Science* **86**, 1201–1217.
- Sakata T and Tamate H** (1978) Rumen epithelial cell proliferation accelerated by rapid increase in intraruminal butyrate. *Journal of Dairy Science* **61**, 1109–1113.
- Sander EG, Warner RG, Harrison HN and Loosli JK** (1959) The stimulatory effect of sodium butyrate and sodium propionate on the development of rumen mucosa in the young calf. *Journal of Dairy Science* **42**, 1600–1605.
- Schurmann BL, Walpole ME, Górká P, Ching JCH, Loewen ME and Penner GB** (2014) Short-term adaptation of the ruminal epithelium involves abrupt changes in sodium and short-chain fatty acid transport. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **307**, R802–R816.
- Sehested J, Basse A, Andersen JB, Diernæs L, Møller PD, Skadhauge E and Aaes O** (1997) Feed-Induced changes in transport across the rumen epithelium. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology* **118**, 385–386.
- Sehested J, Diernæs L, Møller PD and Skadhauge E** (1999a) Ruminal transport and metabolism of short-chain fatty acids (SCFA) in vitro: effect of SCFA chain length and pH. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology* **123**, 359–368.
- Sehested J, Diernæs L, Møller PD and Skadhauge E** (1999b) Transport of butyrate across the isolated bovine rumen epithelium – interaction with sodium, chloride and bicarbonate. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology* **123**, 399–408.
- Snyder E and Credille B** (2017) Diagnosis and treatment of clinical rumen acidosis. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* **33**, 451–461.
- Steele MA, Penner GB, Chaucheyras-Durand F and Le Guan L** (2016) Development and physiology of the rumen and the lower gut: targets for improving gut health. *Journal of Dairy Science* **99**, 4955–4966.
- Storm AC, Hanigan MD and Kristensen NB** (2011) Effects of ruminal ammonia and butyrate concentrations on reticuloruminal epithelial blood flow and volatile fatty acid absorption kinetics under washed reticuloruminal conditions in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **94**, 3980–3994.
- Stumpff F** (2018) A look at the smelly side of physiology. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* **470**, 571–598.
- Stumpff F, Martens H, Bilk S, Aschenbach JR and Gäbel G** (2009) Cultured ruminal epithelial cells express a large-conductance channel permeable to chloride, bicarbonate, and acetate. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* **457**, 1003–1022.
- Sun X, Yuan X, Chen L, Wang T, Wang Z, Sun G, Li X, Li X and Liu G** (2017) Histamine induces bovine rumen epithelial cell inflammatory response via NF- $\kappa$ B Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* **42**, 1109–1119.
- Tamate H, McGilliard AD, Jacobson NL and Getty R** (1962) Effect of various dietaries on the anatomical development of the stomach in the calf. *Journal of Dairy Science* **45**, 408–420.
- van Os M, Lassalas B, Toillon S and Jouany JP** (1995) In vitro degradation of amines by rumen micro-organisms. *The Journal of Agricultural Science* **125**, 299–305.
- Verdugo AC** (2016) *Effect of Lipid Supplementation on Ruminal Epithelial Membrane Fatty Acid Composition and Short-Chain Fatty Acid Absorption*. (Thesis). Saskatoon.
- Warner RG, Flatt WP and Loosli JK** (1956) Ruminant nutrition, dietary factors influencing development of ruminant stomach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **4**, 788–792.
- Yan L, Zhang B and Shen Z** (2014) Dietary modulation of the expression of genes involved in short-chain fatty acid absorption in the rumen epithelium is related to short-chain fatty acid concentration and pH in the rumen of goats. *Journal of Dairy Science* **97**, 5668–5675.
- Yohe TT, Schramm H, Parsons CLM, Tucker HLM, Enger BD, Hardy NR and Daniels KM** (2019) Form of calf diet and the rumen. I: impact on growth and development. *Journal of Dairy Science* **102**, 8486–8501.
- Zhang S, Alborno RI, Aschenbach JR, Barreda DR and Penner GB** (2013) Short-term feed restriction impairs the absorptive function of the reticulo-rumen and total tract barrier function in beef cattle. *Journal of Animal Science* **91**, 1685–1695.

### 3.2 Publikation 2

#### **Possible influence of free fatty acid receptors on pH regulation in the ruminal epithelium of sheep**

**Lisa Baaske**, Franziska Masur, Franziska Dengler, Reiko Rackwitz, Bastian Kaiser, Helga Pfannkuche und Gotthold Gäbel

J Anim Physiol Anim Nutr. 2020;104:776–789.  
DOI: 10.1111/jpn.13308

Die vorliegende Arbeit ist im Rahmen des DFG-Projektes GA329/8-1 entstanden. Dabei waren die mRNA- und Immunhistochemie-Experimente (Fig. 1 und Fig. 2) bereits Teil des Projektantrages und wurden von Dr. Franziska Kaiser (geb. Masur) erarbeitet. Im Zuge der Publikation dieser Arbeit wurden jedoch die Reverse-Transkriptase-PCR (*engl.* reverse transcription PCR, RT-PCR) für FFAR2 und FFAR3 entsprechend neuester Erkenntnisse (neue Primer-Sequenzen verfügbar) erneut durch Bastian Kaiser (Primer-Design), Ines Urbansky (Laborarbeit) und mich (Auswertung, Erstellung der Abbildungen) vorgenommen.

Des Weiteren wurden alle folgenden Arbeiten von mir persönlich durchgeführt:

- Erarbeitung der Versuchsprotokolle für alle Ussing-Kammer-Studien sowie Zellkulturexperimente
- Euthanasie der Tiere und Entnahme des Gewebes für Versuche in Ussing-Kammern sowie zur Isolation in Zellkultur
- Durchführung, Datenanalyse und -interpretation der Experimente an intaktem Epithelverband in Ussing-Kammern
- Durchführung, Datenanalyse und -interpretation der cAMP-Messungen
- Überarbeitung des Protokolls für die Kultivierung der Pansenepithelzellen
- Gewinnung sowie Kultivierung der Pansenepithelzellen
- Durchführung, Datenanalyse und -interpretation der spektrofluorimetrischen Messungen
- Erstellung des Manuskriptes inklusive Abbildungen

Die Leitung des Projektes hatte Prof. Dr. G. Gäbel inne. Dr. F. Kaiser und Prof. Dr. G. Gäbel unterstützten mich bei dem Design der Experimente. In der Durchführung assistierten Dr. F. Kaiser, Ass.-Prof. Dr. F. Dengler, Dr. R. Rackwitz und B. Kaiser. Dr. F. Kaiser war ebenfalls an der Datenanalyse der Expressionsuntersuchungen sowie der cAMP-Vorversuche beteiligt. Bei der Interpretation der erhobenen Daten wurde ich von sämtlichen Autoren unterstützt. Alle beteiligten Autoren haben an der Korrektur des Manuskriptes mitgearbeitet und die endgültige Version des Manuskriptes gelesen und akzeptiert.



# Possible influence of free fatty acid receptors on pH regulation in the ruminal epithelium of sheep

Lisa Baaske | Franziska Masur | Franziska Dengler | Reiko Rackwitz | Bastian Kaiser | Helga Pfannkuche | Gotthold Gäbel

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

## Correspondence

Lisa Baaske, Institute of Veterinary Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University, An den Tierkliniken 7, 04103 Leipzig, Germany.  
Email: lisa.baaske@vetmed.uni-leipzig.de

## Funding information

Deutsche Forschungsgemeinschaft, Grant/Award Number: GA329/8-1

## Abstract

High amounts of short-chain fatty acids (SCFAs) occur in the ovine rumen and constitute the animal's main energy source. However, they lead to an acidification of the ruminal epithelium. Therefore, effective intracellular pH ( $pH_i$ ) regulation by transport proteins like monocarboxylate transporter 1 (MCT1) and  $Na^+/H^+$  exchangers (NHEs) is pivotal to ruminants to avoid epithelial damage. SCFAs might function not only as nutrients but also as signalling molecules by activating free fatty acid receptors (FFARs) in the ruminal epithelium and thus influence  $pH_i$  regulation. FFARs work as nutrient sensors, transducing their information by modulating cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels. We hypothesized that (FFAR-modulated) decreases in cAMP levels stimulate the activity of MCT1 and NHEs in the ruminal epithelium of sheep. We detected two FFARs (GPR109A and FFAR2) immunohistochemically in the ovine ruminal epithelium. Administration of 10 mM butyrate to Ussing chamber-mounted epithelia provoked a significant reduction in intraepithelial cAMP levels. However, application of the GPR109A agonist niacin did not affect cAMP levels. MCT1 activity was analysed by measuring transepithelial  $^{14}C$ -acetate fluxes, which were not inhibited by forskolin-induced increased cAMP levels. The recovery of  $pH_i$  after acidification was assessed as an indicator of NHE activity in primary cultured ruminal epithelial cells. Recovery was significantly reduced when cells with increased cAMP levels were subjected to the NHE inhibitor 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride (10  $\mu$ M). Nonetheless, with augmented cAMP levels alone, NHE activity tended to decline. We hypothesize that modulation of cAMP levels by butyrate is accomplished by FFAR2 activation, regulating NHE activity for  $pH_i$  homeostasis at least in part.

## KEYWORDS

cAMP, free fatty acid receptors, monocarboxylate transporter 1,  $Na^+/H^+$  exchangers,  $pH_i$  regulation, physiology, ruminants

## 1 | INTRODUCTION

In ruminants, short-chain fatty acids (SCFAs), mainly acetate, propionate and butyrate, are produced by microbial fermentation of

carbohydrates in the forestomach system and may constitute up to 75% of the daily energy expenditure (Bergman, 1990). Due to long grazing hours and rumination, the total SCFA concentration in the ruminal lumen of sheep ranges between 60 and 150 mM undergoing

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* published by Blackwell Verlag GmbH

large diurnal changes (van Lingen et al., 2017). In addition to ensuring the energy supply of the whole organism, SCFAs (esp. butyrate) also serve as the main energy source of the ruminal epithelium itself (Stumpff, 2018).

Luminal pH of the rumen ranges from 5.8 to 6.8 under physiological conditions (Bergman, 1990). SCFAs in the rumen content occur in an equilibrium between their protonated form (HSCFA) and SCFA anions (SCFA<sup>-</sup>) accompanied by protons (H<sup>+</sup>) (Allen, 1997). As the cytosolic pH is 6.8–7.4 (Müller, Aschenbach, & Gäbel, 2000), HSCFAs rapidly dissociate once they enter the cells (Müller et al., 2002) and deliver SCFA<sup>-</sup> and H<sup>+</sup> intracellularly. As reviewed by Stumpff (2018), several pathways for SCFA transport across the ruminal epithelium have already been detected, of which not only the permeation of protonated acids via lipophilic diffusion (Gäbel, Vogler, & Martens, 1991) acidifies the intracellular pH (pH<sub>i</sub>), but also the exchange of SCFA<sup>-</sup> for HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Aschenbach, Bilk, Tadesse, Stumpff, & Gäbel, 2009) and their H<sup>+</sup>-coupled import (Kirat et al., 2006). Furthermore, a certain proportion of SCFAs is metabolized to ketone bodies and lactate within the epithelium (Sehested, Diernæs, Møller, & Skadhauge, 1999). These processes lead to both an intracellular acidification (Müller et al., 2002) and an accumulation of metabolites (Sehested et al., 1999). To avoid damage of the ruminal wall by epithelial acidosis, SCFAs and H<sup>+</sup> but also ketone bodies and lactate need to be transported into the blood. Basolateral extrusion of these substrates has been demonstrated to be mainly mediated by the monocarboxylate transporter 1 (MCT1), which works as a symporter of SCFA<sup>-</sup> and their metabolites with H<sup>+</sup> (Müller et al., 2002) as well as an antiporter with HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Dengler, Rackwitz, Benesch, Pfannkuche, & Gäbel, 2014). Besides MCT1, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers (NHEs) are also involved in pH<sub>i</sub> maintenance (Müller et al., 2000). Functional NHE3 could be detected in apical layers of the ruminal epithelium and extrudes H<sup>+</sup> back into the ruminal lumen while taking up Na<sup>+</sup> (Rabbani, Siegling-Vlitakis, Noci, & Martens, 2011). NHE1 was found immunohistochemically in the lumen-facing layers of the bovine rumen epithelium as well (Graham, Gatherer, Haslam, Glanville, & Simmons, 2007).

Adjustment of these absorptive and pH regulative processes to different dietary conditions is fundamental for ruminal health. Certain feeding effects already indicate the existence of adaptation mechanisms in the ruminal epithelium: several studies found evidence for SCFA sensing, as absorption of SCFAs and electrolytes increased after feeding trials with high-concentrate diets (Gäbel, Bestmann, & Martens, 1991; Sehested et al., 1997), and morphological changes occurred, that is, increases in surface area and papilla diameter (Gäbel, Martens, Sündermann, & Gálfi, 1987). Some functional alterations were observed without or much earlier than detectable changes of morphology (Etschmann, Suplie, & Martens, 2009; Gäbel, Marek, & Martens, 1993), supporting the idea of rapid cellular adaptation processes in contrast to delayed adjustment of the whole epithelium by proliferation. Nonetheless, the molecular mechanisms that initiate these adaptations are unknown to date.

SCFAs themselves may act not only as energy sources but also as signalling molecules, allowing the epithelium to sense

the luminal content and thus to keep pH<sub>i</sub> under control. Studies in intact tissues and cell culture models of the intestine of monogastric species suggest regulatory effects of SCFAs, in terms of protective immunity, adaptation of transporters for nutrients and secretion processes (Borthakur et al., 2012; Tolhurst et al., 2012). It is presumed that SCFAs activate so-called free fatty acid receptors (FFARs), which, in turn, modulate intracellular pathways (Kasubuchi, Hasegawa, Hiramatsu, Ichimura, & Kimura, 2015). FFARs for SCFAs such as GPR109A, FFAR2 and FFAR3 are coupled to G<sub>αi</sub>- and/or G<sub>αq</sub>-proteins, transducing their information by reduction in intracellular levels of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and by elevating intracellular Ca<sup>2+</sup>-levels (Le Poul et al., 2003; Tunaru et al., 2003). cAMP is regulated by adenylyl cyclases (ACs). Most of the AC isoforms are coupled to G-proteins (transmembrane ACs, tACs) and are stimulated by forskolin. On the other hand, the soluble AC (sAC) is located in the cytosol and stimulated by increased intracellular concentrations of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and Ca<sup>2+</sup>, while it is insensitive to forskolin (Bitterman, Ramos-Espiritu, Diaz, Levin, & Buck, 2013). In the bovine rumen, FFAR2 has already been detected immunohistochemically (Wang, Akers, & Jiang, 2012).

The present study aimed to elucidate the role of FFARs in ovine ruminal epithelium. Thus, we investigated the expression and localization of FFAR isoforms, their responsiveness to SCFAs as well as downstream mechanisms modulated by them in ovine ruminal epithelium. We hypothesized that cAMP levels in the ruminal epithelium of sheep are downregulated by FFARs and lead to an increase in the activity of essential proteins for the pH homeostasis of the epithelium, such as NHEs and MCT1.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Animals and tissue sampling

Adult sheep (*Ovis aries*, Merino breed) of both sexes were fed with hay and water ad libitum for at least 2 weeks prior to experiments. On the day of the experiment, sheep were slaughtered by captive-bolt stunning and subsequent exsanguination. The abdominal cavity was opened, and the forestomach system was removed. For RT-PCR experiments, ruminal papillae were excised from several locations (reticulum, ruminal atrium, ventral and dorsal sac, omasum). The tissues were washed in Ca<sup>2+</sup>- and Mg<sup>2+</sup>-free Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) and thereafter snap-frozen in liquid N<sub>2</sub>. Samples were stored at -80°C until further analysis. Immunohistochemistry was performed with ruminal papillae fixed in 4% formaldehyde. For Ussing chamber experiments, the dissected fine-villous part of the ventral sac (approx. 400 cm<sup>2</sup>) was rinsed with warm buffer solution (see below). The epithelium was peeled off the muscle layers and immediately transported to the laboratory in 38°C warm, gassed buffer solution. For cell culture experiments, tissue from the ventral sac was rinsed in ice-cold 0.9% NaCl solution. Thereafter, pieces of 5 × 5 cm were kept in PBS supplemented with 400 U/ml penicillin, 0.4 mg/ml streptomycin and 180 U/ml nystatin at 4°C for 1 hr until further processing.

The experiments were in accordance with German legislation on the protection of animals as well as the EU directive 2010/63/EU and were reported to and approved by the regional council of Leipzig as T 43/16.

## 2.2 | Buffer solutions and chemicals

The buffer solutions were prepared with chemicals obtained from Sigma-Aldrich, Roche Diagnostics or VWR if not stated otherwise. The gasses were procured from Air Liquide Healthcare. Buffer recipes are described separately in each section.

## 2.3 | Reverse transcription PCR

The RNA was purified using the RNeasy Micro Kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol. Sample purity and nucleic acid concentration were measured spectrophotometrically after dilution (Biophotometer™, Eppendorf), and RNA degradation of each specimen was controlled by electrophoresis. Immediately thereafter, 1 µg of total RNA was transcribed to cDNA in a 20 µl reaction volume using the GoScript™ Reverse Transcription System (Promega) according to the manufacturer's protocol. To exclude contamination by genomic DNA, controls with no reverse transcriptase (no-RT) in the reaction mix were run in parallel to each sample. Primers for FFAR2, FFAR3 and GPR109A (Table 1) were designed based on predicted sheep sequences obtained from the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using their primer-BLAST tool and synthesized by Eurofins MWG Operon. Primer specificity was checked by sequencing the obtained products and validation against the database entries at NCBI. The AccuPrime™ Taq DNA polymerase high-fidelity kit (Life Technologies) was used to conduct PCR reactions according to the manufacturer's protocol. The following protocol was run in an MJ Research PTC-200 Peltier thermal cycler (Biozym Scientific): 1 min at 94°C for denaturation, followed by 35 cycles of 20 s at 94°C, 30 s at a primer specific elongation temperature (see Table 1), 68°C for 30–45 s, depending on the product length, and eventually 1 min at 68°C as a final elongation step. Gel electrophoresis was performed on a 1% agarose gel for 35 min at 220 V to separate the products, and gels were visualized with a Bio Doc Analyze gel documentation system (Biometra). A no template control (containing DNase-free water) was used for each primer pair. The Quick-Load™ Purple 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs) was used to mark the molecular weight.

## 2.4 | Immunohistochemistry

Formaldehyde-fixed ruminal papillae were embedded in paraffin, and 1-µm-thick slices were prepared with a microtome, deparaffinized and rehydrated before antigen retrieval with boiling citrate buffer was accomplished. Subsequently, sections were preincubated

for 60 min with PBS containing 4% horse serum and 0.5% Triton X-100. Thereafter, samples were incubated overnight at room temperature with primary antibodies (Table 2). Furthermore, sections were incubated with primary antibodies preincubated for 24 hr with the respective blocking peptide (Table 2) to ensure specific binding. Visualization of the staining was accomplished by incubation with a secondary antibody coupled to a fluorophore (Table 2). Nuclei were stained with 0.2 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Carl Roth) in PBS for 1 min. Controls with secondary antibody only were examined in each experiment. An epifluorescence microscope (IX50, Olympus) with a black and white video camera (F-view, Olympus), which is attached to an image analysis system (cell^F, Olympus), was used to analyse the specimens.

## 2.5 | cAMP measurement

The AlphaScreen™ cAMP assay kit (PerkinElmer Life Science) was used to determine cAMP levels according to the manufacturer's protocol. cAMP standard dilutions were prepared with radioimmuno-precipitation assay (RIPA) buffer (see Ussing chamber experiments). Samples were analysed in 384-well white opaque microplates (PerkinElmer Life Science) in triplicate. Microplates were read with a Fusion™ multilabel reader (PerkinElmer Life Science).

## 2.6 | Protein analysis

Total protein was analysed to normalize cAMP levels of Ussing chamber samples. The bicinchoninic acid method (Smith et al., 1985) was used with a Tecan Spectra Rainbow microplate reader (Tecan Deutschland).

## 2.7 | Ussing chamber experiments

4 × 4 cm pieces of isolated ruminal epithelium were mounted in Ussing chambers with an exposed area of 3.14 cm<sup>2</sup> and incubated with 15 ml oxygenated and 38°C warm buffer solution on both the mucosal and serosal sides. All experiments were conducted under short circuit conditions as described by Gäbel, Vogler, et al. (1991) with a computer-controlled voltage clamp device (Ingenieurbüro für Mess- und Datentechnik, Dipl.-Ing. Mußler). Experiments were initiated after an equilibration period of approximately 25 min.

### 2.7.1 | cAMP experiments of intact epithelia

For cAMP experiments, isolated epithelia were incubated as follows: 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), a non-selective inhibitor of phosphodiesterase (PDE, [Beavo et al., 1970]), was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and added to the mucosal and serosal buffer solution in each chamber to a final concentration of 0.5 mM and incubated for 30 min to stabilize cAMP levels and exclude influence of potential

**TABLE 1** Oligonucleotide primers used for RT-PCR

Gene	Forward and reverse primers	Size (bp)	T <sub>a</sub> (°C)	t <sub>e</sub> (s)	GenBank accession no.
FFAR2	5'-AGGAGAGGAAAACAGGACAGC-3' 5'-GCCGAATGGGGCAGCAATATC-3'	560	59	45	XM_012190178.3
FFAR3	5'-GTCTCAAAGCAGCAGTGGC-3' 5'-GGGAGGAGTCCCCTGAGAAT-3'	498	59	45	XM_027977432.1
GPR109A	5'-GCCGTGGATAGGTACTTCCG-3' 5'-GGACATCAAAGCCTCGGGAA-3'	678	59	30	XM_004023416.4

Abbreviations: bp, base pairs; T<sub>a</sub>, annealing temperature; t<sub>e</sub>, elongation time.

**TABLE 2** Antibodies for immunohistochemistry

	Target	Concentration	Supplier	Cat. no.	RRID
Primary antibody	Rabbit anti-FFAR2	4 µg/ml	Acris antibodies	SP4226P	AB_1001554
	Rabbit anti-GPR109A	1 µg/ml	Acris antibodies	AP52875PU-N	AB_11149697
Secondary antibody	Alexa Fluor 488-donkey anti-rabbit IgG	2 µg/ml	Dianova	711-545-152	AB_2313584
Peptide	Anti-FFAR2 antibody	28 µg/ml	Acris antibodies	SP4226CP	
	Anti-GPR109A antibody	100 µg/ml	Acris antibodies	AP52875CP-N	

Abbreviation: RRID, Research Resource Identifier.

FFAR agonists on cAMP degradation. Thereafter, 10 µM forskolin (activator of tACs (Seamon, Padgett, & Daly, 1981), dissolved in DMSO), was added for an incubation period of 30 min to both sides to raise cAMP levels. Different potential FFAR agonists (possibly lowering cAMP levels) were added subsequently for 60 min. After incubation, tissues were dismantled, and the epithelium was scraped off the sub-epithelial layers with a scalpel, transferred to RIPA buffer and kept on ice for 1 hr. RIPA buffer solution contained: 50 mM Tris base, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Na-deoxycholate, 1% Triton X-100, 0.25 mM IBMX (pH 7.4). Samples were then homogenized for 1 min and spun at 53,000 g for 4 min. The supernatant was stored at -20°C for cAMP determination and at -80°C for protein analysis (see above).

Buffer solutions used for cAMP studies contained the following (mM): 120 NaCl, 5.5 KCl, 1.25 CaCl<sub>2</sub>, 1.25 MgCl<sub>2</sub>, 0.6 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.4 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 L-glutamine, 10 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), 10 glucose, 10 mannitol. The pH was adjusted to 7.4 or 6.5 by adding 1 N NaOH or 1 N HCl depending on the experimental set-up. Osmolality was adjusted to 280–290 mOsmol/kg by adding mannitol if necessary. Except for the washing buffer, 10 µM indomethacin solved in ethanol was added to avoid formation of cAMP during the preparation of the epithelium.

### 2.7.2 | Influence of potential FFAR agonists on cAMP levels in isolated ruminal epithelia

The epithelia were incubated as described above. After incubation with 0.5 mM IBMX and 10 µM forskolin, either 2, 10 or 20 mM Na-butyrate or 0.5 or 1 mM niacin, a GPR109A agonist (Tunaru et al., 2003), were added to both sides of the epithelia (both dissolved in distilled water).

Control groups were treated by adding the respective solvents only and NaCl. Further tissue preparation is described above.

### 2.7.3 | Side dependency of butyrate application

To elucidate whether butyrate exposure of the luminal or serosal side has a higher impact on receptor activation, Na-butyrate (10 mM) was added either to the mucosal or serosal buffer solution after incubation with IBMX and forskolin as previously mentioned. In order to maintain equal osmolality on both sides of the epithelia, 10 mM NaCl (dissolved in distilled water) was added to the contralateral buffer solution. Control tissues obtained only solvents and NaCl.

### 2.7.4 | Influence of pH on cAMP levels

Twelve chambers were incubated with a buffer solution adjusted to pH 6.5 at the mucosal reservoir in comparison to 12 chambers incubated at pH 7.4. The serosal buffer solution was set to pH 7.4. IBMX, forskolin, 10 mM Na-butyrate (mucosally) or 1 mM niacin (mucosally) was added following the scheme outlined above. Solvents and NaCl were added to control tissues.

### 2.7.5 | Acetate flux studies

Buffer solutions used for acetate flux studies contained the following (mM): 85 NaCl, 5.5 KCl, 1.25 CaCl<sub>2</sub>, 1.25 MgCl<sub>2</sub>, 0.6 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

2.4 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 L-glutamine, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 10 4-morpholinepropanesulfonic acid, 10 glucose, 15 mannitol, 10 Na-gluconate, 0.01 indomethacin. Mucosal buffer solutions were preset at pH 6.5 and serosal solutions at 7.4 by adding 1 N NaOH. Osmolality was examined and adjusted to 280–290 mOsmol/kg as described above. Solutions were gassed with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> and kept at 38°C.

To determine the influence of forskolin on MCT1 activity, unidirectional flux rates of <sup>14</sup>C-acetate were measured in Ussing chamber-mounted epithelia. Acetate has been shown to be a substrate of the basolateral MCT1 and is hardly metabolized in the ruminal epithelium in contrast to butyrate (Dengler et al., 2014; Kristensen, Gäbel, Pierzynowski, & Danfaer, 2000). To yield a higher transport rate, acetate concentration gradients across the epithelium were applied. For mucosal-to-serosal acetate fluxes ( $J_{ms}^{acetate}$ ), buffer solutions contained 10 mM Na-acetate on the mucosal side and 1 mM Na-acetate on the serosal side and vice versa for reversed fluxes ( $J_{sm}^{acetate}$ ). Thirty minutes after mounting, <sup>14</sup>C-labelled acetate (Hartmann Analytic) was added to the mucosal (for  $J_{ms}^{acetate}$ ) or serosal side ( $J_{sm}^{acetate}$ ) ('hot' side). Beginning 30 min after the addition of labelled acetate, 0.8 ml samples were taken every 30 min from the unlabelled side. The removed solution was replaced by 0.8 ml of the respective buffer solution and amended when calculating flux ratios. Samples (0.1 ml each) from the hot side were taken at the start and end of the experiment. Radioactivity was measured in a liquid scintillation counter (Tri-Carb, PerkinElmer Life Science). The corresponding amount of acetate was calculated using a simple ratio equation as described before (Dengler et al., 2014).

1.5 hr after the application of labelled acetate, 50 µM forskolin and 0.5 mM IBMX were added to both sides. 15 min later, 1.5 mM p-hydroxymercuribenzoic acid (pHMB, dissolved in 1 N NaOH) or 5 mM α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHC, dissolved in DMSO) was added on both sides to inhibit MCT1 (Dengler et al., 2014). For control tissues, equivalent amounts of the respective solvent were added. Samples were taken for another 1.5 hr as described earlier. To estimate the influence of forskolin and the applied inhibitors, the difference ΔJ was calculated by subtracting the first flux rate from the flux period after addition of the respective treatment. Flux without MCT1 inhibitors was interpreted as total acetate transport, whereas flux inhibitable by pHMB or CHC was taken as MCT-mediated flux.

## 2.8 | Cell culture

### 2.8.1 | Isolation of cells

Epithelial cells from the ventral ruminal sac were obtained by dispase digestion as described by Kitano and Okada (1983). Briefly, the tissue samples were cut into strips of approx. 0.3 × 3 cm and placed in Hank's balanced salt solution (HBSS) containing 1 U/ml dispase for overnight incubation at 4°C. Next, the epithelium was separated mechanically from subepithelial layers, and a cell suspension was obtained by dissociating the epithelial strips in HBSS with trypsin (2.5 mg/ml) on a shaker for 30 min. Solutions were run twice in a gentleMACS™ C tube

using the intestine setting of the tissue dissociation instrument gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi BioTec). Isolated ruminal epithelial cells (RECs) were suspended in M199 containing 15% foetal calf serum (FCS), 20 mM HEPES, 50 µg/ml gentamicin, 100 U/ml nystatin, 0.8 mM L-glutamine, 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF), and 0.4 µg/ml hydrocortisone (HC) and seeded at a density of  $1.2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> in collagenated cell culture flasks (25 cm<sup>2</sup>). Cells were incubated in a humidified 5% CO<sub>2</sub> air atmosphere and maintained at 37°C. Medium was replaced every 3 days. After 5 days, the medium was changed to minimum essential Eagle's nutrient medium (MEM) supplemented with 10% FCS, 20 mM HEPES, 50 µg/ml gentamicin, 2 mM L-glutamine, 20 ng/ml EGF and 0.4 µg/ml HC. Experiments were conducted with the first passage (P1) grown on collagenated coverslips or in 96-well plates, obtained by detachment with TrypLE Express™ (Thermo Fisher Scientific). 24 hr prior to the experiments, RECs were transferred to MEM without FCS and antibiotics.

### 2.8.2 | Assessment of intracellular cAMP levels in RECs

P1 cells were grown to confluency in 96-well plates. After rinsing with PBS, cells were incubated with Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 1 mM IBMX for 5 min. Subsequently, the medium was removed and premixed DMEM containing 1 mM IBMX and either 10 µM forskolin or DMSO were added and incubated for another 15 min. Thereafter, the medium was removed rapidly and thoroughly, and the plates were placed on ice. Chilled lysis buffer (5 mM HEPES, 0.3% TWEEN 20, 0.1% bovine serum albumin, 1 mM IBMX) was added, and plates were stored at -20°C. Further cAMP analysis was performed as described under cAMP measurement.

### 2.8.3 | Measurement of pH<sub>i</sub>

pH<sub>i</sub> experiments were performed under bicarbonate-free conditions in the presence or absence of 20 mM NH<sub>4</sub>Cl. The HEPES-buffered solution contained (mM): 110 NaCl, 5.4 KCl, 0.6 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 0.6 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.4 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 glucose, 20 Na-HEPES. For the NH<sub>4</sub>Cl solution, 20 mM NaCl was replaced with 20 mM NH<sub>4</sub>Cl. Solutions were equilibrated with 100% O<sub>2</sub> and adjusted to pH 7.2. Calibration buffer contained (mM): 121.5 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 Na-HEPES, 10 glucose and 0.01 nigericin.

To measure pH<sub>i</sub>, coverslips with epithelial cells were mounted in an angled holder, washed in HEPES-buffered solution and transferred to a glass cuvette (10 × 10 mm; HELMA). The holder was incubated in HEPES buffer supplemented with 10 µM 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester for 30 min at 37°C to allow the pH-sensitive fluorescent dye to enter the cells. For deesterification, cells were washed in HEPES-buffered solution and kept in the dark for another 30 min at 37°C. Measurement of fluorescence was performed in a fluorescence spectrometer (LS 50B fluorescence spectrometer, PerkinElmer Life Science) at 37°C. The emission at 530 nm

was recorded after alternating excitation at 495 and 440 nm. The 495/440 nm ratio was calculated by the associated computer device and represented the quantity of free protons in RECs.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -prepulse method as described in the following was used to analyse recovery of the cells after acidification. After incubation for 5 min in HEPES-buffered solution, the holder was transferred to  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution for 3 min and then back to fresh HEPES-buffered solution to assess the counter-regulation after intracellular acidification. For the first cycle HEPES- $\text{NH}_4\text{Cl}$ -HEPES, only solvents were added to acquire the specific ability to regulate acidification of each coverslip. Subsequently, the procedure was repeated with either (a) 10  $\mu\text{M}$  forskolin only, (b) 10  $\mu\text{M}$  forskolin plus 10  $\mu\text{M}$  5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride (EIPA, a non-specific NHE inhibitor [Brant, Yun, Donowitz, & Tse, 1995] solved in methanol) or (c) solvents only. The high  $\text{K}^+$ -nigericin method (Müller et al., 2000) was used for calculation of  $\text{pH}_i$  with calibration buffer ranging from 6.96 to 8.01. The resulting data were correlated with the respective buffer pH as a linear calibration curve, and the corresponding  $\text{pH}_i$  was calculated. The slope of the  $\text{pH}_i$  curve was calculated starting 15 s after retransfer to HEPES buffer and considering the next 2 min. The slope of the second  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pulse recovery was normalized on the first pulse. Slope ratios were used for statistical analyses.

## 2.9 | Statistics

Statistical analyses were conducted based on biological replicates ( $N$ ). The data for technical replicates ( $n$ ), that is, epithelia or cells of each sheep treated identically but separately, were pooled for statistical analyses. For cAMP analyses, data from sheep were not included when forskolin stimulation failed to raise cAMP levels by a factor of two compared to unstimulated tissues. Outliers were excluded after performing an Iglewicz and Hoaglin's robust test for multiple outliers with a modified Z score set at  $\geq 3.5$  (cAMP analyses for different butyrate concentrations:  $N = 3$  excluded).

Data sets were tested for normality using the Kolmogorov–Smirnov test. For cAMP level analyses, the Friedman test followed by Dunn's test (testing against the forskolin group) was performed. Two-way randomized block (RB)-ANOVA and a subsequent Bonferroni post hoc test were performed to assess statistical differences between groups incubated at different pH (factor one) and different treatment (factor two). Flux and  $\text{pH}_i$  measurements were analysed using one-way RB-ANOVA followed by Tukey's test. A paired Student's  $t$  test was used to compare cAMP levels in RECs. Differences were considered significant at  $p < .05$ . Data are indicated as median (text) and shown as boxes and

whiskers (line marks median, box marks upper and lower quartile, whiskers mark minimum to maximum).

The tests were performed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software).

## 3 | RESULTS

### 3.1 | RT-PCR of FFARs

mRNA expression of GPR109A (Figure 1a) as well as FFAR2 (Figure 1b) could be detected in all forestomach regions examined. FFAR3 was only detected in the atrium ruminis (Figure S1).

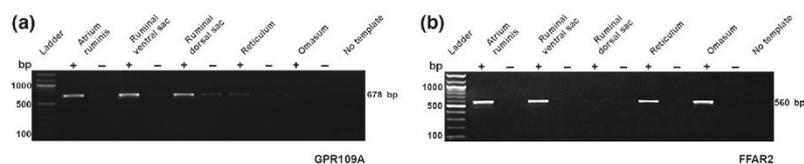
### 3.2 | Immunohistochemical staining of FFARs

The two receptors GPR109A and FFAR2 revealed by RT-PCR in the ruminal ventral sac could also be detected at the protein level at the same location, as demonstrated in Figure 2. GPR109A was found to be mainly expressed in medium to upper layers of the ruminal epithelium, that is, the stratum spinosum and stratum granulosum (Figure 2, top row, A + B). FFAR2 immunostaining was most intense in the stratum basale and stratum spinosum, thus more basal layers (Figure 2, bottom row, A + B). Preincubation of the primary antibody with the corresponding peptide clearly reduced the fluorescent signal, demonstrating specific antibody binding (Figure 2, both rows, C). Incubation with the secondary antibody only did not reveal any fluorescent staining (data not shown).

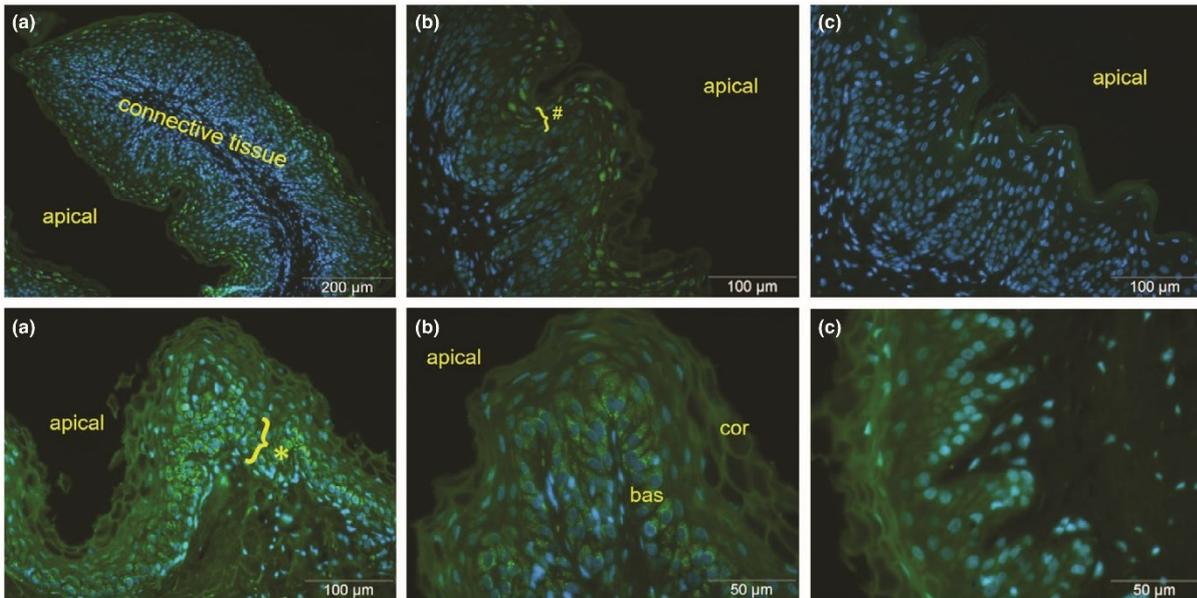
### 3.3 | Effect of butyrate on cAMP levels in intact ruminal epithelia

FFARs are known to be coupled to  $G_{\alpha_i}$ - and/or  $G_{\alpha_q}$ -proteins and transduce their information amongst others via downregulation of cAMP (Le Poul et al., 2003). We incubated epithelia with forskolin (to activate tACs and thereby raise cAMP levels) and different butyrate concentrations to evaluate the impact of butyrate on intraepithelial cAMP levels.

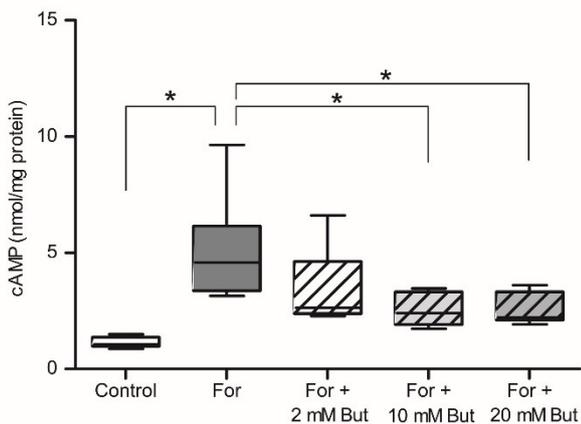
Incubation with 10  $\mu\text{M}$  forskolin led to a significant increase in cAMP levels in comparison to the solvent control (Figure 3). The combined bilateral application of forskolin and 2 mM Na-butyrate led to a slight diminution of cAMP levels. cAMP levels were significantly



**FIGURE 1** RT-PCR of FFARs in forestomach-epithelia: In parallel to each sample (+), a control containing no reverse transcriptase (-) was run. A 'no template' control containing DNase-free water instead of cDNA was performed for each primer pair. (a) GPR109A; (b) FFAR2. FFAR, free fatty acid receptors



**FIGURE 2** Immunohistochemistry of FFARs in ovine ruminal papillae sections. Top row: GPR109A (green) is mainly located in stratum granulosum and stratum spinosum (marked by #). Bottom row: FFAR2 staining (green) detected the receptor in rather basal cell layers of ruminal epithelium (\* stratum spinosum and stratum basale). C: Preincubation of the primary antibody with the respective peptide clearly lowered the fluorescent signal. Nuclei are stained in blue with DAPI. bas, stratum basale; cor, stratum corneum; FFAR, free fatty acid receptors [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



**FIGURE 3** cAMP levels after bilateral application of forskolin and butyrate. Intact ruminal epithelia were incubated in Ussing chambers with 10  $\mu$ M forskolin for 30 min and subsequently either 10 mM NaCl ('For') or 2/10/20 mM butyrate ('For + But') for 60 min. Boxplots mark median, upper and lower quartiles, minimum to maximum. Friedman test + Dunn's multiple comparisons test against the forskolin group,  $N = 6$ ,  $n = 24$  ('For' + 'For + But') and  $N = 6$ ,  $n = 12$  ('Control'), \* $p < .05$ . But, butyrate; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; For, forskolin

reduced when Na-butyrate was administered bilaterally to forskolin-stimulated tissues at concentrations of 10 mM as well as 20 mM, decreasing the cAMP levels to 52% and 48%, respectively, of the forskolin-stimulated epithelia.

### 3.4 | Effect of mucosal versus serosal presence of butyrate on cAMP levels

The first Ussing chamber experiment outlined above was performed by application of potential receptor agonists bilaterally. Given that staining of FFARs revealed a polarized expression (Figure 2), we wanted to investigate whether luminal accumulation of SCFAs plays a more or less important role than their serosal appearance. Hence, 10 mM butyrate was administered to either one side or the other. Whereas serosal application of butyrate induced no reduction in cAMP levels compared to exclusively forskolin-stimulated tissues, butyrate led to a significant decline of cAMP levels when applied mucosally (Figure 4).

### 3.5 | Niacin effect on intraepithelial cAMP levels

As shown in Figure 5, administration of 0.5 and 1 mM niacin, a natural agonist of GPR109A (Tunaru et al., 2003), showed hardly any effect on cAMP levels when applied for 60 min after 30 min of forskolin incubation.

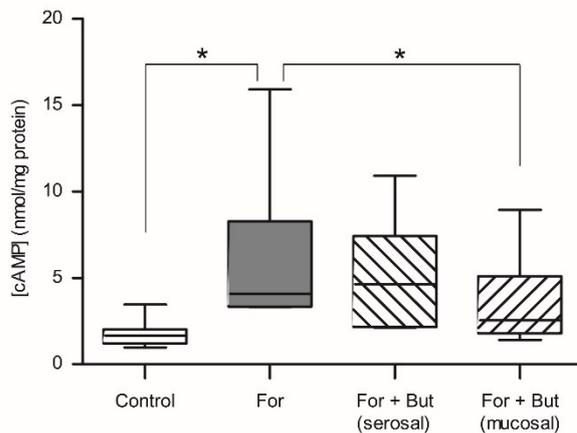
### 3.6 | Effect of pH on cAMP levels

Luminal pH in ovine rumen is physiologically more acidic than blood, ranging from pH 5.8 to 6.8 (Bergman, 1990). On the basis of our previous findings of more pronounced effects when butyrate is applied

mucosally, we wanted to investigate the effect of mucosal pH on cAMP levels in combination with the mucosal presence of butyrate. The results are shown in Figure 6. At a mucosal pH of 6.5, incubation with forskolin and mucosal butyrate provoked a pronounced and significant reduction in cAMP compared to forskolin alone. However, the previously observed reduction in cAMP levels by mucosal butyrate administration at pH 7.4 was not detected in this experimental series. This might be attributed to the varying responsiveness of the individual epithelia to forskolin. In combination with niacin application, no pH effect could be found, which is consistent with our former experiments at pH 7.4.

### 3.7 | MCT1 transport activity after stimulation with forskolin

Studies by Narumi et al. (2010) and Borthakur et al. (2012) point to an inhibition of MCT1 transport activity in skeletal muscle cells and Caco-2 cells, respectively, when exposed to the cAMP analogue Br-cAMP. To investigate whether ruminal MCT1 is similarly influenced by cAMP, we assessed SCFA fluxes after forskolin preincubation. As acetate is effectively transported via MCT1 and hardly metabolized in the ruminal epithelium (Dengler et al., 2014; Kristensen et al., 2000), we decided to study MCT1 activity using <sup>14</sup>C-acetate. To quantify the influence of treatments, the difference in the flux rates ( $\Delta J$ ) was calculated (see Materials and Methods). Whereas forskolin seemed to have no influence on  $J_{ms}^{acetate}$  ( $\Delta J = -0.06 \mu M cm^{-2} h^{-1}$ ; control  $\Delta J = -0.05 \mu M cm^{-2} h^{-1}$ , Figure 7), pHMB, an MCT1 inhibitor could significantly reduce  $J_{ms}^{acetate}$  ( $\Delta J = -0.33 \mu M cm^{-2} h^{-1}$ ). A noticeable but not significant diminution was also observed when epithelia were incubated with the MCT1 inhibitor CHC or the combination of forskolin and the particular inhibitor. Yet, the combination of forskolin and inhibitors did not lead to an additional enhancement of the inhibitor effect.



**FIGURE 4** cAMP levels in intact ruminal epithelium under the influence of bilateral application of 10  $\mu M$  forskolin and 10 mM butyrate administered either serosally or mucosally. Friedman test + Dunn's multiple comparisons test against the forskolin group.  $N = 8, n = 24, *p < .05$ . But, butyrate; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; For, forskolin

$J_{sm}^{acetate}$  also showed no effect of forskolin incubation ( $\Delta J = -0.05 \mu M cm^{-2} h^{-1}$ ). Compared to control ( $\Delta J = -0.07 \mu M cm^{-2} h^{-1}$ ) and forskolin-incubated tissues, a significant reduction of  $J_{sm}^{acetate}$  after the application of pHMB ( $\Delta J = -0.33 \mu M cm^{-2} h^{-1}$ ) and CHC ( $\Delta J = -0.28 \mu M cm^{-2} h^{-1}$ ) was noted. The combination of forskolin and CHC also significantly decreased the flux rate. When forskolin was administered with pHMB, the flux rate was nominally lower as well. Again, no additional effect was observed when forskolin was added together with the inhibitors.

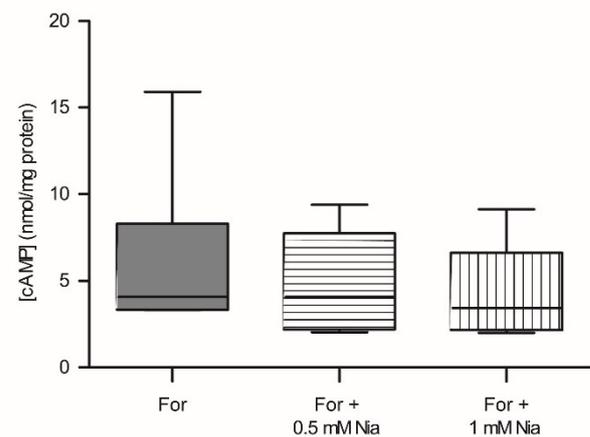
These results support the assumption that acetate transport across rumen epithelium is substantially mediated by MCT1 but is not influenced by cAMP.

### 3.8 | Elevation of cAMP levels in RECs

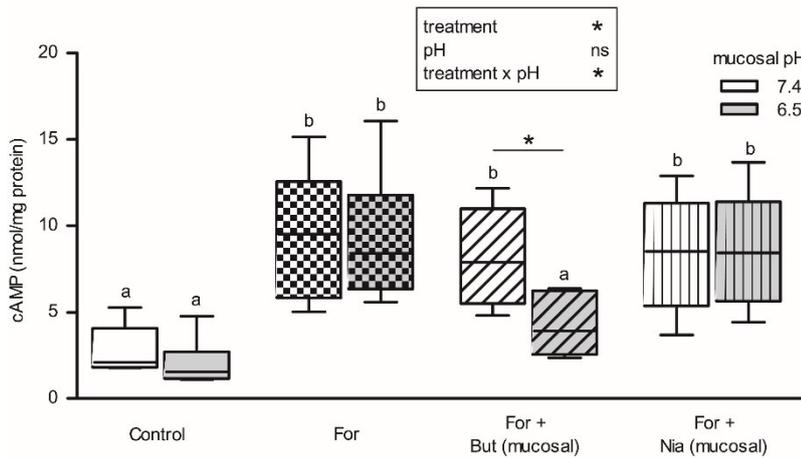
To ensure susceptibility of ovine cultured RECs to forskolin, we stimulated cells grown in 96-well plates with 10  $\mu M$  forskolin. RECs were much more sensitive to forskolin stimulation than intact ruminal epithelium, with forskolin raising the cAMP levels by a factor of 112 compared to control cells (Figure 8). This may be due to a higher accessibility of forskolin in the cells in culture in contrast to the intact epithelium, where several layers need to be overcome to enter all cells in the ruminal epithelium.

### 3.9 | Regulation of intracellular pH via NHEs

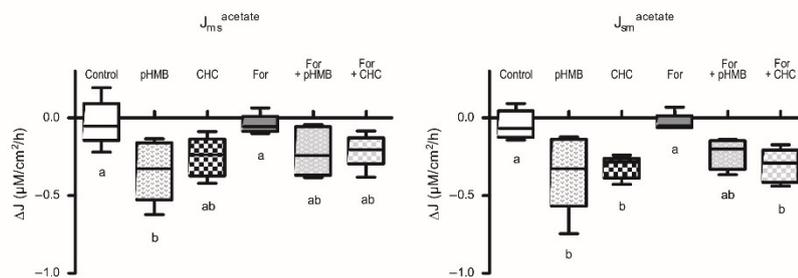
The influence of cAMP on  $Na^+$ -transport via NHEs has already been demonstrated in ruminal epithelium (Gäbel, Butter, & Martens, 1999). To evaluate whether cAMP-dependent modulation of NHEs may influence  $pH_i$ , we assessed  $pH_i$  with the  $NH_4Cl$  prepulse method in RECs incubated with either forskolin only or



**FIGURE 5** Effect of bilateral application of 10  $\mu M$  forskolin followed by either 0.5 or 1 mM niacin on cAMP levels in intact ovine ruminal epithelium. Friedman test + Dunn's multiple comparisons test against the forskolin group.  $N = 8, n = 24$ . cAMP, cyclic adenosine monophosphate; For, forskolin; Nia, niacin



**FIGURE 6** Impact of different mucosal pH and treatment on cAMP levels in intact ovine ruminal epithelium. The mucosal buffer solution was set to either pH 6.5 or pH 7.4. Bilateral application of 10  $\mu$ M forskolin was followed by mucosal application of 10 mM butyrate or 1 mM niacin. Two-way RB-ANOVA + Bonferroni's post hoc test.  $N = 6, n = 18; p < .05$ , asterisk marks differences between pH, distinct letters mark statistically significant differences within pH groups. But, butyrate; For, forskolin; Nia, niacin

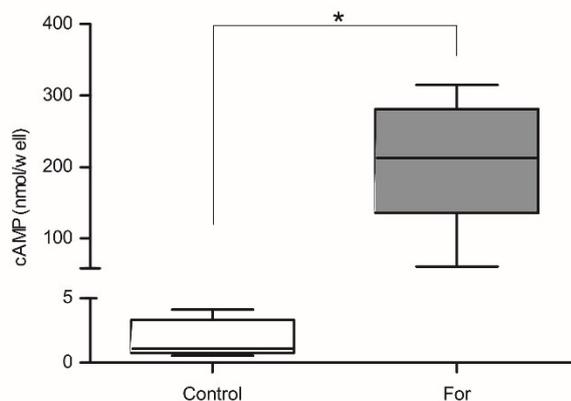


**FIGURE 7** Differences in  $^{14}$ C-acetate fluxes under the influence of forskolin and MCT1 inhibitors. Flux studies were performed in Ussing chambers for 3 hr, consisting of 1.5 hr without treatment and 1.5 hr of incubation with either 10  $\mu$ M forskolin and/or 1.5 mM pHMB or 5 mM CHC bilaterally.  $J_{ms}^{acetate}$ : mucosal-to-serosal flux.  $J_{sm}^{acetate}$ : serosal-to-mucosal flux.  $\Delta J$ : difference in fluxes (see Materials and Methods). One-way RB-ANOVA + Tukey's multiple comparisons test.  $N = 5, n = 10$ , distinct letters mark statistically significant differences,  $p < .05$ . For, forskolin; MCT1, monocarboxylate transporter 1; pHMB, p-hydroxymercuribenzoic acid; CHC,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid

forskolin plus EIPA, an inhibitor known to block NHE1 and NHE3 (Brant et al., 1995). A first prepulse without treatment was taken as a coverslip-specific reference, and the ratio of the treatment slope to the reference slope was calculated (see Materials and Methods). Administration of EIPA led to a significant reduction in the counter-regulation capacity (slope ratio = 0.44) compared to cells incubated twice with solvents only (slope ratio = 0.67), indicating NHE activity. The effectiveness of counter-regulation also tended to be reduced (slope ratio = 0.59) after incubation with forskolin alone ( $p = .09$ ).

#### 4 | DISCUSSION

As the rumen is exposed to high levels of SCFAs, we were curious to investigate whether the signalling properties of these fatty acids could be found in ruminants, similar to those assumed in the intestines of rodents (Kim, Kang, Park, Yanagisawa, & Kim, 2013; Tolhurst et al., 2012). We demonstrated that FFAR2 and GPR109A are expressed in the ovine ruminal epithelium both at the mRNA (Figure 1) and at the protein level (Figure 2). This is in accordance with previous studies which also detected FFAR2 protein in the rumen of cattle



**FIGURE 8** cAMP levels in RECs after stimulation with forskolin. Cells grown in 96-well plates were incubated for 15 min with either DMSO or 10  $\mu$ M forskolin. Paired Student's  $t$  test,  $N = 5, n = 15, *p < .05$ . cAMP, cyclic adenosine monophosphate; For, forskolin; RECs, ruminal epithelial cells

and goats (Ran et al., 2019; Wang, Si, Liu, & Jiang, 2012). Our study is the first prove of GPR109A in the ruminal epithelium on protein level. In contrast to the observations of Lu et al. (2015) in caprine

rumen, we were not able to detect FFAR3 on mRNA level in ruminal epithelium of sheep except for the atrium ruminis (Figure S1).

In the intestines of humans and rodents, FFAR2 and GPR109A are associated with the sensing of SCFAs and modulation of secretion processes induced by SCFAs (Borthakur et al., 2012; Tolhurst et al., 2012). Underlying signalling mechanisms include the down-regulation of cAMP by the  $G_{\text{qi}}$ -subunit as well as the elevation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -levels by the  $G_{\text{aq}}$ -subunit of the transmembrane receptor (Le Poul et al., 2003; Tunaru et al., 2003). Several SCFAs and their derivatives have been found to be ligands of these receptors with varying potencies (Le Poul et al., 2003; Taggart et al., 2005). Butyrate has been shown to act as a potent ligand of GPR109A as well as FFAR2 in previous studies (Hudson et al., 2012; Taggart et al., 2005). In accordance with this, we could detect a diminution of forskolin-induced elevated cAMP levels in ruminal epithelium after incubation with forskolin and butyrate (Figure 3).

Physiological concentrations of butyrate in the ovine rumen roughly range from 10 to 15 mM (Bergman, 1990). The administration of concentrations as low as 2 mM already provoked a slight decrease in cAMP levels, which was exceeded by the application of 10 and 20 mM butyrate (Figure 3). This indicates that an influence on the signalling molecule cAMP can be achieved under physiological concentrations of butyrate, accenting its relevance as a prospective activator of FFARs.

Several studies investigating the effect of butyrate on cAMP levels revealed various, partly contradictory results: in contrast to our observations, elevated levels of cAMP were observed after butyrate incubation in neuroblastoma cells (Prasad & Sinha, 1976) and in Caco-2 cells (Wang, Si, et al., 2012). In accordance with our findings, however, an inhibitory effect of butyrate via  $G_{\text{qi}}$ -subunits was detected in immune cells and intestinal epithelium (Le Poul et al., 2003; Yonezawa et al., 2013).

Because SCFAs occur in large quantities within the rumen (Bergman, 1990) and FFARs showed a polarized expression in immunostaining (Figure 2), we wondered whether luminal wash-in has a higher impact on the intraepithelial cAMP level than serosal occurrence from the blood stream. While concentrations of butyrate in the ruminal lumen can reach up to 15 mM, levels in the bloodstream range from 4  $\mu\text{M}$  (arterial) to 32  $\mu\text{M}$  (portal vein, [Bergman, 1990]). In our experiments, application of 10 mM Na-butyrate to the mucosal side after forskolin incubation provoked a strong diminution of cAMP levels, whereas serosal application showed no influence on cAMP levels (Figure 4). This effect might be accomplished by the activation of GPR109A in the apical layers. On the other hand, a stimulation of FFAR2 in the basal compartment of the epithelium might be achieved when butyrate is transported to the basolateral side. Several pathways have already been detected for the transport of luminal SCFAs across the ruminal epithelium: Besides protein-mediated transport mechanisms (reviewed by Stumpff 2018), transmembrane diffusion of the undissociated acid is favoured by butyrate's high lipophilicity (Gäbel, Vogler, et al., 1991; Sehested et al., 1999). According to the Henderson-Hasselbalch equation, the reduction in mucosal pH from 7.4 to 6.5 increases the proportion of HSCFAs by

a factor of  $\sim 8$ , facilitating their luminal uptake via lipophilic diffusion. Thus, a higher proportion of butyrate can enter the epithelium easily at lower acidic pH and activate FFARs. This goes along with the significantly decreased cAMP levels after forskolin and mucosal butyrate administration at a mucosal pH of 6.5 (Figure 6).

As the pH of the epithelial cytosol is near neutral (approx. 7.4 [Müller et al., 2000]), HSCFAs ( $\text{pK} = 4.8$ ) will rapidly dissociate inside the cells, leading to an intracellular acidification (Müller et al., 2000). Consequently, the decrease in cAMP levels at low mucosal pH in the presence of butyrate might be due to butyric acid working as a transmembrane  $\text{H}^+$  shuttle. An influence of  $\text{pH}_i$  is described for cAMP production by the G-protein-independent sAC, but this AC's activity is not affected by forskolin (Bitterman et al., 2013), so its involvement is rather unlikely in our experimental set-up. To date, no impact of  $\text{H}^+$  on the G-protein coupled tAC has been recorded (El Kebir, Oliveira Lima Dos Santos, Mansouri, Sekheri, & Filep, 2017). Thus, the butyrate-induced decrease in cAMP levels at low mucosal pH is probably due to an elevated transepithelial butyrate transfer and not caused by cytosolic acidification as a result of butyrate dissociation.

During transport, butyrate not only dissociates but is also broken down to mainly ketone bodies (especially acetoacetate and  $\beta$ -hydroxybutyrate, [Weigand, Young, & McGilliard, 1975]). In the stratum basale, we detected the most prominent immunostaining against FFAR2, but the receptor was also present in stratum spinosum with decreasing intensity towards the lumen (Figure 2, bottom row), which corresponds to the deeper location of the metabolic epithelial layer as suggested by Graham and Simmons (2005). Thus, butyrate and its metabolites might be FFAR2 ligands. Hudson et al. (2012) revealed different potency rank orders for the bovine and human FFAR2: While the human orthologue is activated with modest potency by acetate and propionate, butyrate has no stimulatory effect. On the other hand, fatty acids of longer chain length, like butyrate, are more potent ligands than propionate and acetate of bovine FFAR2. This supports the assumption that the ovine FFAR2 might be potently activated by butyrate as well. Kristensen and Harmon (2004) detected the concentrations of butyrate and  $\beta$ -hydroxybutyrate to be in the  $\mu\text{M}$ -range in the serosal compartment of the epithelium, which is in agreement with EC50 values detected by Hudson et al. (2012) for bovine FFAR2. Corresponding to this, higher levels of SCFA metabolites occur near FFAR2 when butyrate is taken up into the epithelium from the mucosal rather than the serosal side as fewer metabolites will already occur there solely by space restriction (Sehested et al., 1999). This is in accordance with the strong decrease in the cAMP levels observed in our experiments after mucosal butyrate application (Figure 4), supporting an activation of FFAR2 by butyrate metabolites.

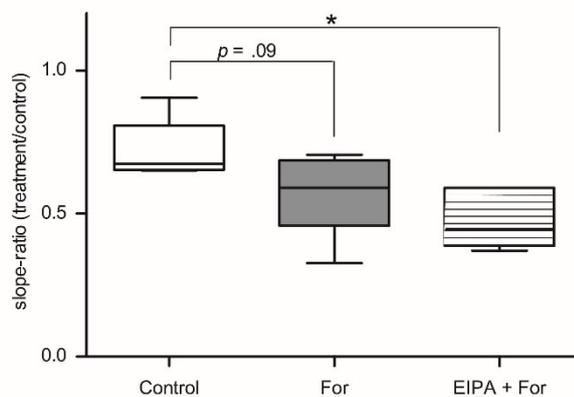
Concerning GPR109A, Borthakur et al. (2012) also registered a reduction in cAMP levels after application of butyrate as well as niacin concomitant with an increased MCT1 activity in a Caco-2 subclone. The effects of niacin indicate an involvement of GPR109A which is activated by pharmacological doses of niacin and concentrations of butyrate that occur physiologically in the hindgut lumen of monogastric animals (Tunaru et al., 2003). Although we also observed decreased

levels of cAMP after butyrate application—especially when applied on the mucosal side, suggesting an activation of GPR109A—we could not observe similar effects when applying 1 mM niacin (Figure 5). Hence, an involvement of GPR109A in the decrease in intraepithelial cAMP is unlikely although we proved its expression in ovine rumen epithelium. One might speculate that the ovine GPR109A is either not sensitive to niacin, expressed in an inactive form or stored in vesicles, being transferred and released to the membrane on demand. Whatever situation might provoke this activation is unclear and cannot be deduced from our experiments. Therefore, the observed effects might rather be mediated by FFAR2. However, whether the side dependency of the butyrate effect is mediated by butyrate directly or its metabolites remain to be elucidated further with the help of FFAR2 antagonists. The agonist potential of  $\beta$ -hydroxybutyrate has been shown for GPR109A (Taggart et al., 2005) as well as for FFAR3 (Won, van Lu, Puhl, & Ikeda, 2013). Nonetheless, to our knowledge, no receptor studies have been conducted to date that would clarify the effect of  $\beta$ -hydroxybutyrate on FFAR2. As FFAR2 agonists or antagonists were not available at the time of our experiments, no further conclusions can be drawn from this so far. Examinations with newly developed chemicals will give deeper insight into this (Hansen et al., 2018).

To elucidate the functional consequences of cAMP modulation by butyrate(-metabolites), we focused on transport proteins involved in  $\text{pH}_i$  regulation. As illustrated above,  $\text{pH}_i$  is strongly affected by an increased accumulation of SCFAs entering the cells via lipophilic diffusion. Thus, activating counter-regulatory proteins would be an important target of SCFA-sensing pathways. MCT1 is one of the main transporters for SCFAs and their metabolites on the basolateral side of the ruminal epithelium (Dengler et al., 2014; Kirat et al., 2006), and it also plays a major role in the efflux of  $\text{H}^+$  from the epithelial cells, hence protecting them from acidosis (Müller et al., 2002). It has been shown in isolated ruminal epithelium that high butyrate concentrations influence MCT1 expression by upregulating mRNA and protein levels (Dengler, Rackwitz, Benesch, Pfannkuche, & Gäbel, 2015). In vitro studies in human skeletal muscle and rat brain revealed a downregulation of MCT1 activity by stimulation of cAMP release or application of its analogues (Narumi et al., 2010; Smith, Uhernik, Li, Liu, & Drewes, 2012). Borthakur et al. (2012) provoked a cAMP-dependent modulation of MCT1 activity by butyrate incubation in human and rat intestinal cells via GPR109A. Therefore, we wanted to investigate whether modulation of cAMP leads to altered activity of MCT1 in the ruminal epithelium similarly to enterocytes. Surprisingly, we could neither observe an effect of high cAMP levels on the MCT1-mediated acetate flux (indicated by inhibitor-sensitivity) nor on the total transepithelial acetate flux rates (indicated by flux without inhibitors). However, our findings are congruent with studies performed by Gäbel et al. (1999), who found no influence of high forskolin administration on transruminal propionate flux. We conclude that ruminal MCT1 is not regulated by cAMP in our experimental setting at least.

Another potential downstream target of butyrate (-metabolite)-induced cAMP modulation is the NHE family. It became evident over the last years that NHEs are present in the ruminal wall, both morphologically (positive immunostaining for NHE1, NHE2 and NHE3 [Graham et

al., 2007; Rabbani et al., 2011]) and functionally (Gäbel, Vogler, et al., 1991; Martens & Gäbel, 1988). It is known for several cell types and organs that NHE activity can be modulated by cAMP, exhibiting an upregulation of NHE1 activity (Jacob et al., 2000), while NHE3 activity is downregulated by elevated cAMP levels (Cabado et al., 1996). In intact epithelia, cAMP-mediated downregulation of NHE3 has been shown for the rat colon (Krishnan, Rajendran, & Binder, 2003), and downregulation of amiloride-sensitive  $\text{Na}^+$ -transport (a non-specific NHE inhibitor [Brant et al., 1995]) in ruminal tissue was provoked by forskolin application (Gäbel et al., 1999). The expression of NHEs in RECs has already been verified in previous studies (Müller et al., 2000; Schweigel, Vormann, & Martens, 2000). Our data (Figures 8 and 9) point to a slight impairment of  $\text{pH}_i$  recovery after acidification due to elevated levels of cAMP in RECs, that is, a decreased activity of NHEs. This is consistent with findings of Schweigel et al. (2000) in RECs, where application of the cAMP agonist Br-cAMP led to a slight diminution of  $\text{pH}_i$  recovery as well. It needs to be noted that Schweigel et al. (2005) observed an initial reduction in  $\text{pH}_i$  followed by a delayed recovery upon application of theophylline (an inhibitor of PDE [Beavo et al., 1970]), which they attributed to NHE3 inhibition first, followed by an elevation of NHE1 activity. Job sharing has been proposed for these isotypes in various tissues, such that apical NHE3, on the one hand, is responsible for  $\text{Na}^+$ -uptake into the epithelium (Lu et al., 2016), which can be stimulated by SCFAs (Gäbel, Vogler, et al., 1991; Sehested, Diernaes, Moller, & Skadhauge, 1996). This, in turn, is concordant with lower levels of cAMP after SCFA application, as shown in this study, while high cAMP levels were proven to inhibit NHE3 activity. On the other hand, NHE1 might be located in more basal layers of the epithelium, as it has been observed in the basolateral membrane of intestinal tissues (Jacob et al., 2000), predominantly mediating  $\text{pH}_i$  homeostasis. Whether this basolateral transport in rumen is influenced by cAMP remains to be elucidated.



**FIGURE 9**  $\text{pH}_i$  recovery of RECs. Cells were grown on coverslips, and  $\text{pH}_i$  was measured. Cells were acidified by the  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -pulse technique, and the following counter-regulation was analysed. The slope under treatment was related to the initial control slope. One-way RB-ANOVA + Tukey's test.  $N = 6$ ,  $n = 18$  (Control);  $N = 6$ ,  $n = 15$  (For),  $N = 6$ ,  $n = 14$  (EIPA + For); \* $p < .05$ . For, forskolin; RECs, ruminal epithelial cells; EIPA, 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride

In conclusion, we found evidence for the expression of GPR109A and FFAR2 in the ovine ruminal epithelium. Functional downregulation of the intracellular messenger cAMP was observed after butyrate application, with more pronounced effects when applied mucosally at lower pH. The missing effect of the GPR109 agonist niacin, the side specificity of the butyrate response and the receptor localization let us propose an activation of FFAR2 by butyrate and/or its metabolites. In this study, the epithelia of hay-fed sheep were susceptible to butyrate in terms of cAMP modulation, supporting the hypothesis that, under physiological conditions, the control of pH, homeostasis via NHEs is at least in part mediated by SCFA(-metabolite) sensing of FFAR2. cAMP modulation does not regulate MCT1 in ovine rumen epithelium. Nonetheless, a varied feeding regime might reveal different regulation mechanisms, as an increase in carbohydrates in the diet provoked an upregulation of FFAR3 in caprine rumen (Lu et al., 2015), whereas reduced feed intake after calving led to an induced gene expression of FFAR2 in bovine adipocytes (Friedrichs et al., 2016).

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We give special thanks to Anke Schmidt-Mähne, Petra Klaußner and Ines Urbansky for their excellent technical assistance. We also gratefully acknowledge the kind support and the provision of laboratory facilities by the Institute for Physiology and Cell Biology at the University of Veterinary Medicine Hannover (Prof. Dr. G. Breves). We would like to thank Dr. T. Hermsdorf and A. Schulze (Rudolf Schönheimer Institute of Biochemistry, Leipzig) for kindly providing the cAMP measurement facilities as well as excellent technical support. This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG: GA329/8-1).

#### CONFLICT OF INTEREST

No conflicts of interest, financial or otherwise are declared by the authors.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.B., F.M. and G.G. conceived and designed research; L.B., F.M., F.D., B.K. and R.R. performed experiments; L.B. and F.M. analysed data; L.B., F.M., F.D., B.K., R.R., H.P. and G.G. interpreted results of experiments; L.B. prepared figures; L.B. drafted manuscript; F.M., F.D., R.R., B.K., H.P. and G.G. edited and revised manuscript; L.B., F.M., F.D., B.K., R.R., H.P. and G.G. approved final version of manuscript.

#### ANIMAL WELFARE STATEMENT

The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to and the appropriate ethical review committee approval has been received. The authors confirm that they have followed EU standards for the protection of animals used for scientific purposes.

#### ORCID

Lisa Baaske  <https://orcid.org/0000-0001-9081-6975>

Reiko Rackwitz  <https://orcid.org/0000-0001-7337-6525>

#### REFERENCES

- Allen, M. S. (1997). Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *Journal of Dairy Science*, 80, 1447–1462. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76074-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76074-0)
- Aschenbach, J. R., Bilk, S., Tadesse, G., Stumpff, F., & Gäbel, G. (2009). Bicarbonate-dependent and bicarbonate-independent mechanisms contribute to nondiffusive uptake of acetate in the ruminal epithelium of sheep. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296, 1098–1107. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90442.2008>
- Beavo, J. A., Rogers, N. L., Crofford, O. B., Hardman, J. G., Sutherland, E. W., & Newman, E. V. (1970). Effects of xanthine derivatives on lipolysis and on adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity. *Molecular Pharmacology*, 6, 597–603.
- Bergman, E. N. (1990). Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*, 70, 567–590. <https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.2.567>
- Bitterman, J. L., Ramos-Espiritu, L., Diaz, A., Levin, L. R., & Buck, J. (2013). Pharmacological distinction between soluble and transmembrane adenylyl cyclases. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 347, 589–598. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.208496>
- Borthakur, A., Priyamvada, S., Kumar, A., Natarajan, A. A., Gill, R. K., Alrefai, W. A., & Dudeja, P. K. (2012). A novel nutrient sensing mechanism underlies substrate-induced regulation of monocarboxylate transporter-1. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 303, G1126–G1133. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00308.2012>
- Brant, S. R., Yun, C. H. C., Donowitz, M., & Tse, C.-M. (1995). Cloning, tissue distribution, and functional analysis of the human Na<sup>+</sup>/N<sup>+</sup> exchanger isoform, NHE3. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 38, 198–206. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.269.1.C198>
- Cabado, A. G., Yu, F. H., Kapus, A., Lukacs, G., Grinstein, S., & Orłowski, J. (1996). Distinct structural domains confer cAMP sensitivity and ATP dependence to the Na/H exchanger NHE3 isoform. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 3590–3599. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.7.3590>
- Dengler, F., Rackwitz, R., Benesch, F., Pfannkuche, H., & Gäbel, G. (2014). Bicarbonate-dependent transport of acetate and butyrate across the basolateral membrane of sheep rumen epithelium. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 210, 403–414. <https://doi.org/10.1111/apha.12155>
- Dengler, F., Rackwitz, R., Benesch, F., Pfannkuche, H., & Gäbel, G. (2015). Both butyrate incubation and hypoxia upregulate genes involved in the ruminal transport of SCFA and their metabolites. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99, 379–390. <https://doi.org/10.1111/jpn.12201>
- El Kebir, D., de Oliveira Lima Dos Santos, E., Mansouri, S., Sekheri, M., & Filep, J. G. (2017). Mild acidosis delays neutrophil apoptosis via multiple signaling pathways and acts in concert with inflammatory mediators. *Journal of Leukocyte Biology*, 102, 1389–1400. <https://doi.org/10.1189/jlb.3A0117-041R>
- Etschmann, B., Suplie, A., & Martens, H. (2009). Change of ruminal sodium transport in sheep during dietary adaptation. *Archives of Animal Nutrition*, 63, 26–38. <https://doi.org/10.1080/17450390802506885>
- Friedrichs, P., Sauerwein, H., Huber, K., Locher, L. F., Rehage, J., Meyer, U., ... Mielenz, M. (2016). Expression of metabolic sensing receptors in adipose tissues of periparturient dairy cows with differing extent of negative energy balance. *Animal*, 10, 623–632. <https://doi.org/10.1017/S175173111500227X>

- Gäbel, G., Bestmann, M., & Martens, H. (1991). Influences of Diet, short-chain fatty acids, lactate and chloride on bicarbonate movement across the reticulo-rumen wall of sheep. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 38, 523–529. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1991.tb01043.x>
- Gäbel, G., Butter, H., & Martens, H. (1999). Regulatory role of cAMP in transport of Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> and short-chain fatty acids across sheep ruminal epithelium. *Experimental Physiology*, 84, 333–345. <https://doi.org/10.1111/j.1469-445X.1999.01758.x>
- Gäbel, G., Marek, M., & Martens, H. (1993). Influence of food deprivation on SCFA and electrolyte transport across sheep reticulorumen. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 40, 339–344. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1993.tb00637.x>
- Gäbel, G., Martens, H., Sündermann, M., & Gálfi, P. (1987). The effect of diet, intraruminal pH and osmolarity on sodium, chloride and magnesium absorption from the temporarily isolated and washed reticulo-rumen of sheep. *Quarterly Journal of Experimental Physiology (Cambridge, England)*, 72, 501–511. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1987.sp003092>
- 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, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 161, 419–426. <https://doi.org/10.1007/BF00260803>
- Graham, C., Gatherer, I., Haslam, I., Glanville, M., & Simmons, N. L. (2007). Expression and localization of monocarboxylate transporters and sodium/proton exchangers in bovine rumen epithelium. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 292, R997–R1007. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00343.2006>
- Graham, C., & Simmons, N. L. (2005). Functional organization of the bovine rumen epithelium. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288, R173–R181. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00425.2004>
- Hansen, A. H., Sergeev, E., Bolognini, D., Sprenger, R. R., Ekberg, J. H., Ejsing, C. S., ... Ulven, T. (2018). Discovery of a potent thiazolidine free fatty acid receptor 2 agonist with favorable pharmacokinetic properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61, 9534–9550. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00855>
- Hudson, B. D., Christiansen, E., Tikhonova, I. G., Grundmann, M., Kostenis, E., Adams, D. R., ... Milligan, G. (2012). Chemically engineering ligand selectivity at the free fatty acid receptor 2 based on pharmacological variation between species orthologs. *FASEB Journal*, 26, 4951–4965. <https://doi.org/10.1096/fj.12-213314>
- Jacob, P., Christiani, S., Rossmann, H., Lamprecht, G., Vieillard-Baron, D., Müller, R., ... Seidler, U. (2000). Role of Na<sup>+</sup>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter NBC1, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1, and carbonic anhydrase in rabbit duodenal bicarbonate secretion. *Gastroenterology*, 119, 406–419. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.9358>
- Kasubuchi, M., Hasegawa, S., Hiramatsu, T., Ichimura, A., & Kimura, I. (2015). Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients*, 7, 2839–2849. <https://doi.org/10.3390/nu7042839>
- Kim, M. H., Kang, S. G., Park, J. H., Yanagisawa, M., & Kim, C. H. (2013). Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology*, 145, 396–406. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.04.056>
- 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. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.115931>
- Kitano, Y., & Okada, N. (1983). Separation of the epidermal sheet by dispase. *The British Journal of Dermatology*, 108, 555–560. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1983.tb01056.x>
- Krishnan, S., Rajendran, V. M., & Binder, H. J. (2003). Apical NHE isoforms differentially regulate butyrate-stimulated Na absorption in rat distal colon. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 285, C1246–C1254. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00598.2002>
- Kristensen, N. B., Gäbel, G., Pierzynowski, S. G., & Danfaer, A. (2000). Portal recovery of short-chain fatty acids infused into the temporarily-isolated and washed reticulo-rumen of sheep. *The British Journal of Nutrition*, 84, 477–482. <https://doi.org/10.1017/S000711450001781>
- 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. <https://doi.org/10.2527/2004.82123549x>
- Le Poul, E., Loison, C., Struyf, S., Springael, J.-Y., Lannoy, V., Decobecq, M.-E., ... Detheux, M. (2003). Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 25481–25489. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301403200>
- Lu, Z., Gui, H., Yao, L., Yan, L., Martens, H., Aschenbach, J. R., & Shen, Z. (2015). Short-chain fatty acids and acidic pH up-regulate UT B, GPR41, and GPR4 in rumen epithelial cells of goats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 308, R283–R293. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00323.2014>
- Lu, Z., Yao, L., Jiang, Z., Aschenbach, J. R., Martens, H., & Shen, Z. (2016). Acidic pH and short-chain fatty acids activate Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms 1, 2, and 3 in omasal epithelium. *Journal of Dairy Science*, 99, 733–745. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9605>
- Martens, H., & Gäbel, G. (1988). Transport of Na and Cl across the epithelium of ruminant forestomachs: Rumen and omasum. A review. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 90, 569–575. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(88\)90669-X](https://doi.org/10.1016/0300-9629(88)90669-X)
- 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 recovery from intracellular acid load in cultured epithelial cells of sheep rumen. *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 170, 337–343. <https://doi.org/10.1007/s003600000107>
- 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. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00268.2001>
- Narumi, K., Furugen, A., Kobayashi, M., Otake, S., Itagaki, S., & Iseki, K. (2010). Regulation of monocarboxylate transporter 1 in skeletal muscle cells by intracellular signaling pathways. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 33, 1568–1573. <https://doi.org/10.1248/bpb.33.1568>
- Prasad, K. N., & Sinha, P. K. (1976). Effect of sodium butyrate on mammalian cells in culture: A review. *In Vitro*, 12, 125–132. <https://doi.org/10.1007/BF02796360>
- Rabbani, I., Siegling-Vlitakis, C., Noci, B., & Martens, H. (2011). Evidence for NHE3-mediated Na transport in sheep and bovine forestomach. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 301, R313–R319. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00580.2010>
- Ran, T., Liu, Y., Jiao, J. Z., Zhou, C. S., Tang, S. X., Wang, M., ... Beauchemin, K. A. (2019). Postnatal differential expression of chemoreceptors of free fatty acids along the gastrointestinal tract of supplemental feeding v. grazing kid goats. *Animal*, 13, 509–517. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001581>
- 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. *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 175, 575–591. <https://doi.org/10.1007/s00360-005-0021-3>
- Schweigel, M., Vormann, J., & Martens, H. (2000). Mechanisms of Mg<sup>2+</sup> transport in cultured ruminal epithelial cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 278, G400–G408. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.278.3.G400>
- Seamon, K. B., Padgett, W., & Daly, J. W. (1981). Forskolin: Unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 3363–3367. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.6.3363>
- Sehested, J., Basse, A., Andersen, J. B., Diernæs, L., Møller, P. D., Skadhauge, E., & Aaes, O. (1997). Feed-induced changes in transport across the rumen epithelium. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 118, 385–386. [https://doi.org/10.1016/S0300-9629\(96\)00324-6](https://doi.org/10.1016/S0300-9629(96)00324-6)
- Sehested, J., Diernaes, L., Møller, P. D., & Skadhauge, E. (1996). Transport of sodium across the isolated bovine rumen epithelium: Interaction with short-chain fatty acids, chloride and bicarbonate. *Experimental Physiology*, 81, 79–94. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1996.sp003920>
- Sehested, J., Diernæs, L., Møller, P. D., & Skadhauge, E. (1999). Ruminal transport and metabolism of short-chain fatty acids (SCFA) in vitro: Effect of SCFA chain length and pH. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 123, 359–368. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(99\)00074-4](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00074-4)
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., ... Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Smith, J. P., Uhernik, A. L., Li, L., Liu, Z., & Drewes, L. R. (2012). Regulation of Mct1 by cAMP-dependent internalization in rat brain endothelial cells. *Brain Research*, 1480, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.08.026>
- Stumpff, F. (2018). A look at the smelly side of physiology: Transport of short chain fatty acids. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 470, 571–598. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-2105-9>
- Taggart, A. K. P., Kero, J., Gan, X., Cai, T.-Q., Cheng, K., Ippolito, M., ... Waters, M. G. (2005). (D)-beta-hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 26649–26652. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500213200>
- Tolhurst, G., Heffron, H., Lam, Y. S., Parker, H. E., Habib, A. M., Diakogiannaki, E., ... Gribble, F. M. (2012). Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes*, 61, 364–371. <https://doi.org/10.2337/db11-1019>
- Tunaru, S., Kero, J., Schaub, A., Wufka, C., Blaukat, A., Pfeffer, K., & Offermanns, S. (2003). PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. *Nature Medicine*, 9, 352–355. <https://doi.org/10.1038/nm824>
- van Lingen, H. J., Edwards, J. E., Vaidya, J. D., van Gastelen, S., Saccenti, E., van den Bogert, B., ... Dijkstra, J. (2017). Diurnal dynamics of gaseous and dissolved metabolites and microbiota composition in the bovine rumen. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00425>
- Wang, A., Akers, R. M., & Jiang, H. (2012). Short communication: Presence of G protein-coupled receptor 43 in rumen epithelium but not in the islets of Langerhans in cattle. *Journal of Dairy Science*, 95, 1371–1375. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4886>
- Wang, A., Si, H., Liu, D., & Jiang, H. (2012). Butyrate activates the cAMP-protein kinase A-cAMP response element-binding protein signaling pathway in Caco-2 cells. *The Journal of Nutrition*, 142, 1–6. <https://doi.org/10.3945/jn.111.148155>
- Weigand, E., Young, J. W., & McGilliard, A. D. (1975). Volatile fatty acid metabolism by rumen mucosa from cattle fed hay or grain. *Journal of Dairy Science*, 58, 1294–1300. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(75\)84709-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(75)84709-6)
- Won, Y.-J., van Lu, B., Puhl, H. L., & Ikeda, S. R. (2013).  $\beta$ -Hydroxybutyrate modulates N-type calcium channels in rat sympathetic neurons by acting as an agonist for the G-protein-coupled receptor FFA3. *The Journal of Neuroscience*, 33, 19314–19325. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3102-13.2013>
- Yonezawa, T., Kurata, R., Yoshida, K., Murayama, M., Cui, X., & Hasegawa, A. (2013). Free fatty acids-sensing G protein-coupled receptors in drug targeting and therapeutics. *Current Medicinal Chemistry*, 20, 3855–3871. <https://doi.org/10.2174/09298673113209990168>

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** Baaske L, Masur F, Dengler F, et al. Possible influence of free fatty acid receptors on pH regulation in the ruminal epithelium of sheep. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2020;104:776–789. <https://doi.org/10.1111/jpn.13308>

### 3.2.1 Supporting Information

**Baaske L**, Masur F, Dengler F, Rackwitz R, Kaiser B, Pfannkuche H, Gäbel G. Possible influence of free fatty acid receptors on pH regulation in the ruminal epithelium of sheep.

J Anim Physiol Anim Nutr. 2020;104(3):776-789. doi: 10.1111/jpn.13308

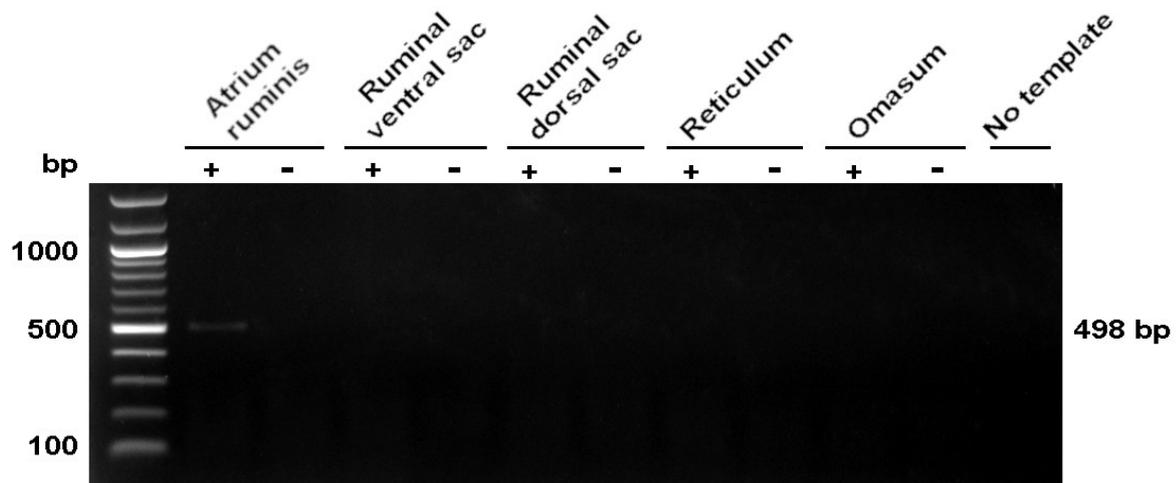


Figure S1. RT-PCR of FFAR3 in forestomach-epithelia: In parallel to each sample (+), a control containing no reverse transcriptase (-) was run. A 'no template' control containing DNase-free water instead of cDNA was performed.

## 4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von rezeptiven Mechanismen des ovinen Pansenepithels zur Modulation von Transportprozessen, die in die Regulation des pH-Wertes involviert sind. Zwei Rezeptortypen für kurzkettige Fettsäuren konnten dabei im Epithel nachgewiesen werden. Zudem ließ sich eine Modulation intrazellulärer Signalwege durch die Applikation von Butyrat beobachten. Rückschlüsse auf eine anschließende Beeinflussung von Transportprozessen, die auf den intrazellulären und den luminalen pH-Wert Einfluss nehmen, können jedoch lediglich indirekt abgeleitet werden. Die Ergebnisse werden im Folgenden eingehender diskutiert.

### 4.1 Nachweis von FFARs im Pansenepithel

Da die Nahrungsaufnahme von Wiederkäuern (v. a. in Industrienationen) sowohl einer täglichen Rhythmik (entsprechend der Fütterungsintervalle) als auch einem schwankenden Nahrungsangebot (z. B. beim Transport der Tiere) unterliegt, ist das Pansenepithel mit variierenden Konzentrationen an Nährstoffen im Pansenumen konfrontiert (NIKKHAH. 2012, VAN LINGEN et al. 2017). Um dennoch die Energie- und Nährstoffversorgung des Organismus sicherzustellen, muss das Epithel die Transportprozesse entsprechend des jeweiligen Bedarfs anpassen können. Hierbei muss es aber zudem eine stabile Barriere gegen Pathogene bilden und die Gesundheit des Organs selbst als auch des Gesamtorganismus gewährleisten. Die dafür notwendigen, bisher bekannten ruminalen Mechanismen sind in Publikation 1, Fig. 2 zusammengefasst.

Die Anpassung an das Nährstoffangebot setzt zunächst eine Rezeption der aktuellen Nährstoffsituation voraus. Bei Wiederkäuern stellen hinsichtlich der Energieversorgung SCFAs die wesentlichen Substrate dar. Daher wurde zu Beginn der vorliegenden Arbeit in nativem Material, d. h. direkt nach der Schlachtung entnommenen, unbehandelten Gewebeproben, die mRNA-Expression der Fettsäurerezeptoren FFAR2, FFAR3 sowie GPR109A untersucht, da diese in anderen Spezies SCFAs als natürliche Liganden aufweisen (PRIYADARSHINI et al. 2018) und u. a. der Wahrnehmung und Regulierung der Nährstoffversorgung dienen (KASUBUCHI et al. 2015). Dabei konnte mittels RT-PCR eine Expression von FFAR2 und GPR109A in sämtlichen untersuchten Lokalisationen des Pansens festgestellt werden (Publikation 2, Fig. 1). Es ist zu beachten, dass dies ein qualitativer Nachweis ist und die unterschiedlich starke Ausprägung der Banden auf dem Elektrophorese-Gel als nicht relevant für die Interpretation anzunehmen ist. Vermutlich beruhen die Unterschiede sowohl auf verschiedenen Versuchsansätzen; der unterschiedlichen

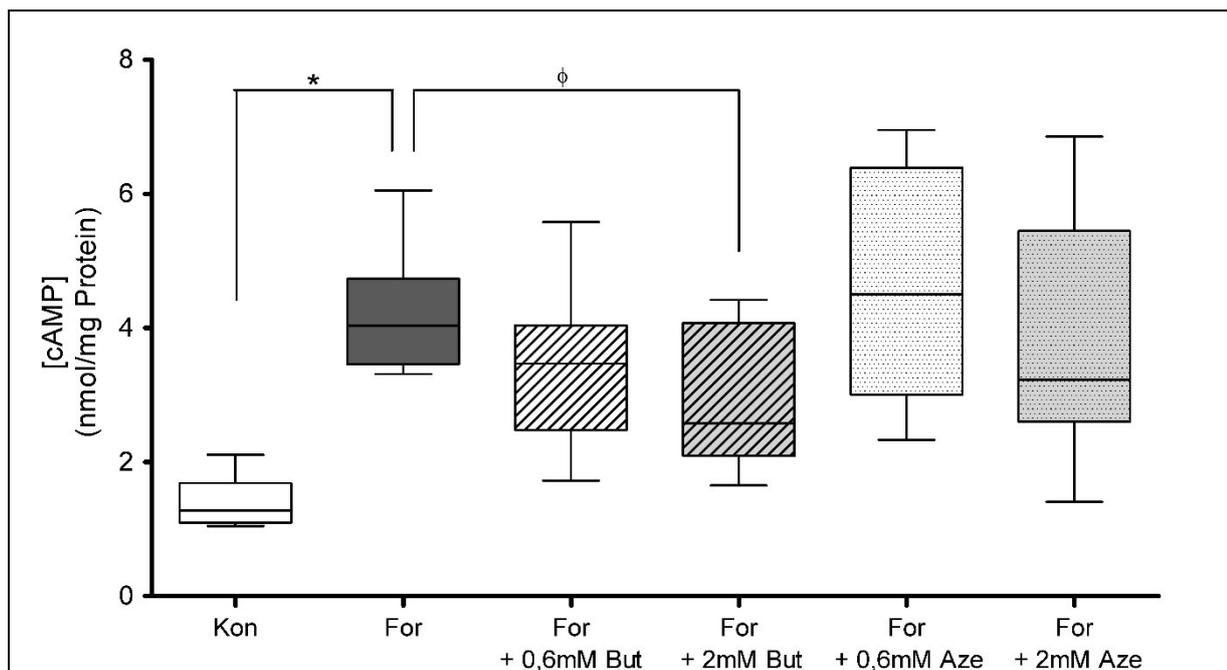
Aufreinigung der einzelnen Pansenbereiche; der trotz größter Sorgfalt bei der Entnahme eventuell auftretenden Variationen der Schnelligkeit, in der die Proben der Lagerung in flüssigem Stickstoff zugeführt wurden als auch einer verschieden starken Expression. Nichtsdestotrotz zeigte sich jeweils für die korrespondierende No-RT-Kontrolle (die der Abschätzung der Verunreinigung der Probe mit genomischer DNA dient) ein wesentlich geringeres Signal, sodass ein positiver mRNA-Nachweis von FFAR2 und GPR109A festgestellt werden konnte. Im Gegensatz zum Nachweis dieser beiden Rezeptoren wies die RT-PCR des FFAR3 lediglich für den Vorhof ein von der respektiven No-RT-Kontrolle unterschiedliches Signal auf. Da demzufolge FFAR3 in den von uns untersuchten ovinen Proben nur im Vorhof auf Genebene exprimiert wird, wurden weitere Untersuchungen auf Proteinebene mittels Immunhistochemie bzw. weiterführende Agonistenstudien für FFAR3 unterlassen und nur für die zwei erstgenannten FFARs durchgeführt. In den folgenden immunhistochemischen Untersuchungen konnte eine spezifische Verteilung von FFAR2 und GPR109A im Pansenepithel festgestellt werden. Dabei wurde GPR109A vor allem in den Gewebeschichten des *Stratum granulosum* und in den äußeren Lagen des *Stratum spinosum* angefärbt, während FFAR2 eher basal im Bereich der *Strata spinosum* und *basale* detektiert wurde (Publikation 2, Fig. 2). Auch WANG et al. (2012a) konnten FFAR2 im bovinen Pansenepithel immunhistochemisch detektieren, während GPR109A bisher lediglich in der Leber und im Fettgewebe von Rindern auf Genebene (AGRAWAL et al. 2017) sowie auch auf Proteinebene in boviner Leber und Skelettmuskulatur (TITGEMEYER et al. 2011) nachgewiesen wurde. Somit stellen die vorliegenden Untersuchungen den ersten positiven Nachweis von GPR109A-Protein im Pansenepithel des Schafes dar. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, die keinen schlüssigen Nachweis für FFAR3 erbrachte, konnten LU et al. (2015) im Pansenepithel von Ziegen FFAR3 sowohl auf Gen- als auch Proteinebene detektieren. Neuere Untersuchungen an wachsenden Ziegen konnten zudem eine mit zunehmendem Alter (0 bis 70 Tage postnatal) stetig steigende Proteinkonzentration von FFAR2 und FFAR3 entlang des Gastrointestinaltraktes feststellen, wobei im Pansen, Labmagen und Zäkum numerisch die höchsten Konzentrationen gemessen wurden (RAN et al. 2019). Diese unterschiedliche Expression des FFAR3 in Ziegen und Schafen könnte zum einen mit der verschiedenartigen Futterauswahl (Ziege als Nahrungsselektierer vs. Schaf als Grasfresser; HOFMANN. 1989) zusammenhängen. Außerdem ist es möglich, dass rassespezifische Unterschiede bzw. die Fütterung auch ganz individuell Einfluss auf die Expression der Einzeltiere haben. Die Ursache für diese kontroversen Befunde ist allerdings aus den vorliegenden Untersuchungen nicht endgültig ableitbar.

#### 4.1.1 Regulation intrazellulärer Signalwege durch FFARs

Im Darmepithel von Monogastriern wie Nagetieren oder dem Menschen werden den FFARs sowohl die Rezeption von SCFAs im Darmlumen als auch die Modulation von Sekretionsprozessen zugeschrieben (BORTHAKUR et al. 2012, TOLHURST et al. 2012, AKIBA et al. 2015). Die Wirkungsvermittlung erfolgt dabei vor allem durch eine Verminderung des Spiegels intrazellulärer Botenstoffe wie cAMP, wenn die Rezeptoren an eine  $G_{\alpha i}$ -Untereinheit gekoppelt sind. Auch eine Erhöhung intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Spiegel ist nachgewiesen (LE POUL et al. 2003, TUNARU et al. 2003, TOLHURST et al. 2012; vgl. 2.7.2 *G-Protein-gekoppelte Rezeptoren*). Studien an verschiedenen Nicht-Wiederkäuer-spezies konnten SCFAs als Liganden der FFARs aufzeigen (BROWN et al. 2003, LE POUL et al. 2003, TAGGART et al. 2005).

Somit lag in der vorliegenden Studie nach erfolgreicher immunhistochemischer Lokalisation des FFAR2 und des GPR109A die Vermutung nahe, dass diese – analog zu anderen Spezies – auch im Pansenepithel durch SCFAs aktiviert werden können.

Daher wurde in Voruntersuchungen zunächst an isoliertem, intaktem Pansenepithel der Effekt einer Inkubation mit geringen SCFA-Konzentrationen auf die intraepithelialen cAMP-Spiegel untersucht. Um sowohl den Einfluss einer wenig als auch einer stark metabolisierbaren SCFA abzubilden, wurden Azetat und Butyrat vergleichend eingesetzt (Abb. 1, unveröffentlichte Ergebnisse). Dabei zeigte sich nach mukosaler und serosaler Zugabe von Azetat im Gegensatz zur Inkubation mit Butyrat keine Verminderung der intraepithelialen cAMP-Spiegel. Dies schließt jedoch eine Aktivierung der ruminalen FFARs durch Azetat nicht aus. Der beobachtete geringe Einfluss auf die cAMP-Spiegel könnte möglicherweise allein auf einer geringeren Affinität des Rezeptors bzw. der Rezeptoren für Azetat im Vergleich zu Butyrat liegen. Zudem ist es möglich, dass Azetat andere Signalwege beeinflusst wie zum Beispiel die Modulation intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Spiegel oder über die regulierende  $\beta\gamma$ -Untereinheit die PI3K-Aktivität. Dies wurde in der vorliegenden Studie allerdings nicht weiter untersucht.



**Abb. 1: cAMP-Spiegel in Panseneithelien nach Inkubation in Ussing-Kammern.**

Die Epithelien wurden beidseits für 30 Minuten mit Forskolin (oder Lösungsmittel) und anschließend einer SCFA (Butyrat oder Azetat) bzw. Lösungsmitteln (Kontroll- und Forskolin-Gruppe) für weitere 60 Minuten inkubiert. Die Bestimmung der cAMP-Spiegel erfolgte wie in Publikation 2; 2.7.1 *cAMP experiments of intact epithelia* beschrieben. Die Box stellt das 25 %-Quantil bis 75 %-Quantil dar, die Linie markiert den Median, die Antennen kennzeichnen Minimum bis Maximum. Zur statistischen Analyse wurde ein Friedman-Test mit anschließendem Dunn-Test gegen die Forskolin-Gruppe durchgeführt (N = 8 Schafe, n = 32 Epithelien für Epithelien der Kontroll- und Forskolin-Gruppe; N = 8, n = 16 für mit SCFA-behandelte Epithelien); GraphPad Prism 5 Software. \* markiert signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ );  $\phi$  markiert statistische Tendenzen ( $p < 0,1$ ). Kon = Kontrolle, For = Forskolin, But = Butyrat, Aze = Azetat. Unveröffentlichte Ergebnisse.

Aufgrund der Wirkung bereits geringer Butyrat-Konzentrationen (2 mM,  $p < 0,1$ , Abb. 1) auf die epithelialen cAMP-Spiegel, wurden alle nachfolgenden Studien ausschließlich mit Butyrat als repräsentativer SCFA durchgeführt. Letztendlich konnte eine signifikante Senkung der cAMP-Spiegel erzielt werden, wenn die Butyrat-Konzentrationen beidseits des Epithels im Bereich der physiologischen Level des Panseninhaltes lagen (Publikation 2, Fig. 3). Je nach Fütterung werden Butyrat-Konzentrationen im ovinen Pansen zwischen 10 mM und 15 mM detektiert (BERGMAN. 1990, SUÁREZ et al. 2007, LAARMAN et al. 2012). Die Senkung des cAMP-Spiegels weist auf eine Aktivierung von FFARs hin, die mit physiologischen

Butyrat-Konzentrationen erzielt werden kann und somit diese SCFA als potenziellen Rezeptor-Agonisten ausweist.

In anderen Geweben wurden widersprüchliche Effekte von Butyrat auf die intrazellulären cAMP-Spiegel beobachtet: Sowohl in Neuroblastomzellen als auch den aus einem Kolonkarzinom hervorgegangenen CaCo-2-Zellen konnten nach Butyrat-Gabe erhöhte cAMP-Spiegel festgestellt werden (PRASAD und SINHA. 1976, WANG et al. 2012b). Zur Erklärung dieser Befunde ist zu bedenken, dass ein stimulierender Einfluss auf die cAMP-Konzentration sowohl durch eine verstärkte Syntheseleistung mithilfe der ACs als auch durch einen verminderten Abbau mittels der Phosphodiesterase vermittelt werden kann. In den von WANG et al. (2012b) eingesetzten CaCo-2-Zellen konnte kein Einfluss von Butyrat auf transmembranäre ACs, wie sie in der Regel von FFARs aktiviert werden, festgestellt werden. Überdies fehlte in diesen Untersuchungen auch die Beteiligung der Phosphodiesterase (WANG et al. 2012b). Die Autoren schlossen daraufhin, dass die festgestellte Erhöhung der cAMP-Spiegel nach Butyrat-Inkubation durch eine Aktivierung der löslichen AC hervorgerufen worden sein könnte. Dieses Enzym wiederum liegt zytosolisch vor und wird nicht durch Forskolin, sondern erhöhte Spiegel an  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert (RAHMAN et al. 2013). Es ist also anzunehmen, dass die Stimulation der cAMP-Spiegel durch Butyrat in den genannten Zellmodellen nicht durch eine Aktivierung von FFARs hervorgerufen wurde.

Sieht man von den Untersuchungen von WANG et al. (2012b) sowie PRASAD und SINHA (1976) ab, konnten in verschiedenen Zellen und Geweben mit den vorliegenden Befunden übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden: So wurden in transfizierten Zellen der Chinese-Hamster-Ovary-Zelllinie verminderte cAMP-Level nach Butyrat-Inkubation beobachtet, die auf eine Aktivierung von  $\text{G}\alpha_i$ -Untereinheiten zurückgeführt werden konnten (BROWN et al. 2003, LE POUL et al. 2003, YONEZAWA et al. 2013). Im Gegensatz zu WANG et al. (2012b) provozierten BORTHAKUR et al. (2012) nach einer Butyrat-Inkubation im gleichen Zellmodell, den CaCo-2-Zellen, sowohl verminderte cAMP-Spiegel als auch eine damit einhergehende erhöhte MCT1-Aktivität. Zusätzlich konnten in der Untersuchung von BORTHAKUR et al. (2012) die gleichen Effekte auch durch Applikation von Niacin erzielt werden, was auf eine Beteiligung des GPR109A hindeutet, da dieser von pharmakologischen Niacin-Konzentrationen stimuliert wird (TUNARU et al. 2003). Auch Butyrat-Konzentrationen, wie sie im Dickdarm von Monogastriern auftreten, konnten bereits als Rezeptor-aktivierend vermerkt werden (TUNARU et al. 2003, THANGARAJU et al. 2009).

Da in der vorliegenden Untersuchung FFAR2 und GPR109A erfolgreich im ovinen Pansenepithel nachgewiesen und zudem eine hemmende Wirkung von Butyrat auf

intraepitheliale cAMP-Spiegel beobachtet wurde, kann angenommen werden, dass im Pansenepithel der Einfluss von Butyrat auf intrazelluläre Signalwege über eine Aktivierung der Fettsäurerezeptoren vermittelt wird. Dabei könnte sowohl GPR109A als auch FFAR2 involviert sein. Dies soll im Folgenden näher diskutiert werden.

#### **4.1.2 GPR109A als potenzieller Butyrat-Rezeptor im Pansenepithel**

Das GPR109A-Protein konnte besonders in den lumennahen Epithelschichten des *Stratum granulosum* sowie des *Stratum spinosum* angefärbt werden, während FFAR2 v. a. in den tieferen Ebenen des *Stratum spinosum* und des *Stratum basale* lokalisiert wurde (Publikation 2, Fig. 2). Dieses spezielle Verteilungsmuster legte zunächst den Verdacht nahe, dass v. a. der weiter apikal gelegene (d. h. zuerst mit den aufgenommenen SCFAs in Kontakt kommende) GPR109A zur Detektion der aus dem Lumen resorbierten SCFAs fungiert. Dementsprechend könnte dem FFAR2 eine Rolle in der Rezeption von im Blutkreislauf zirkulierenden SCFAs zuteilwerden.

Trotz der Verminderung der cAMP-Spiegel infolge einer Inkubation mit physiologischen Butyrat-Spiegeln konnte im vorliegenden Fall an isolierten Pansenepithelien kein Effekt nach der Applikation von Niacin beobachtet werden (Publikation 2, Fig. 5). Dieses Vitamin wurde schon vielfach als pharmakologischer Agonist des Rezeptors GPR109A beschrieben (TUNARU et al. 2003, GILLE et al. 2008, KENÉZ et al. 2014, PRIYADARSHINI et al. 2018), weshalb wir auch im Pansenepithel eine Reduktion der cAMP-Spiegel nach entsprechender Inkubation erwartet hatten. Da eine Niacin-Gabe jedoch unter unseren experimentellen Umständen ohne Wirkung auf die cAMP-Level blieb, erscheint eine Beteiligung des GPR109A an den hier hervorgerufenen Effekten durch Butyrat als unwahrscheinlich.

Gleichwohl konnte GPR109A sowohl via RT-PCR als auch immunhistochemisch im Pansenepithel des Schafes nachgewiesen werden, was die Frage nach dessen potenzieller Rolle offenlässt: Eventuell könnte der Rezeptor in einer inaktiven Form vorliegen oder aber auch in intrazellulären Vesikeln gespeichert sein, wobei jedoch in beiden Fällen unklar ist, durch welche Prozesse die Rezeptormoleküle in die Zellmembran integriert bzw. aktiviert würden. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die ovine (*Ovis gmelini aries*) Rezeptorvariante im Kontrast zum GPR109A anderer Spezies nicht durch Niacin aktiviert wird. Die Rezeptorhomologien liegen sowohl für die Nucleotid- als auch die Proteinsequenz entsprechend der NCBI-Datenbank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) bei ca. 80 % Identität zur gut untersuchten humanen (*Homo sapiens*) Variante. Dies könnte dafür sprechen, dass im Falle des Schafes andere Liganden den Rezeptor aktivieren, wenngleich auch zwischen der Maus (*Mus musculus*, die ebenfalls Grundlage zahlreicher Studien zum Niacin-Rezeptor GPR109A ist) und *Homo sapiens* ähnliche Übereinstimmungen vorliegen (wie zwischen Schaf und Mensch), ohne funktionelle Unterschiede

aufzuzeigen. Betrachtet man *Bovidae* insgesamt, so wurde der GPR109A bislang nur sehr unzureichend funktionell untersucht (N. B.: Grundsätzlich liegen für den GPR109A wenig Daten aus Wiederkäuer-Spezies vor). Lediglich in kultivierten bovinen Adipozyten konnte eine Niacin-induzierte Sekretion von Adiponektin hervorgerufen werden, die Pertussis-Toxin-sensitiv war (KOPP et al. 2014). Pertussis-Toxin wiederum hemmt Rezeptoren, die (wie z. B. GPR109A) an eine  $G\alpha_i$ -Untereinheit gekoppelt sind (ABALO et al. 2004). Dies deutet daraufhin, dass zumindest die bovine Variante sehr wohl Niacin als Agonisten eines  $G\alpha_i$ -gekoppelten FFARs wie den GPR109A aufweist. Dass der ovine Rezeptor nicht auf Niacin reagiert, scheint auf Basis dieser Erkenntnisse unwahrscheinlich, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

#### **4.1.3 FFAR2 als potenzieller Rezeptor für Butyrat**

Neben der Vermittlung durch FFARs könnte der hemmende Einfluss des Butyrats auf den cAMP-Spiegel auch direkt über eine Hemmung von dessen Synthese vermittelt werden: Wie unter 4.1.1 *Regulation intrazellulärer Signalwege durch FFARs* ausgeführt, konnten WANG et al. (2012b) erhöhte cAMP-Spiegel nach Butyrat-Gabe beobachten, die sie in Zusammenhang mit einer erhöhten Aktivität der löslichen AC gebracht haben. In der vorliegenden Untersuchung ist eine Beteiligung ebenjenes Enzyms allerdings eher fraglich. Einerseits wird die lösliche AC zwar durch einen saureren pH-Wert, wie er durch die Aufnahme von Butyrat ins Zytosol der Pansenepithelzellen vorliegt (vgl. Publikation 1, Fig. 1 sowie 2.2.1 *Apikale Aufnahme in das Pansenepithel*), gehemmt (RAHMAN et al. 2013). Andererseits führt eine Forskolin-Applikation nicht zur Stimulation dieses Enzyms, d. h. Forskolin hätte in diesem Fall keinen Einfluss auf die cAMP-Spiegel (RAHMAN et al. 2013). Die vorliegenden Untersuchungen zum Effekt einer reinen Forskolin-Inkubation zeigten jedoch eindeutig signifikant erhöhte cAMP-Spiegel (Publikation 2, Fig. 3).

Da also im Pansenepithel die Wirkungsvermittlung von Butyrat sowohl über GPR109A als auch ausschließlich über die lösliche AC zweifelhaft scheint, könnten die Effekte dieser SCFA im Pansenepithel auf den intraepithelialen cAMP-Spiegel durch Aktivierung des FFAR2 erklärt werden. Dafür spricht eine Studie von HUDSON et al. (2012), die verschiedene Affinitäten für die einzelnen SCFAs bei unterschiedlichen Spezies darlegt: So wird die humane Rezeptorvariante sowohl von Azetat als auch Propionat gleichermaßen aktiviert, während Butyrat wirkungslos schien. Andererseits konnte der bovine FFAR2 insbesondere durch länger-kettige SCFAs wie Butyrat aktiviert werden. Somit könnte also auch im Schaf eine Aktivierung von FFAR2 durch Butyrat möglich sein. Dennoch müssen FFAR2-Agonisten- bzw. Antagonistenstudien durchgeführt werden, um darüber Gewissheit zu erlangen. Zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen waren kommerzielle Rezeptoragonisten und -antagonisten leider

nicht verfügbar, doch Experimente mit den mittlerweile erhältlichen Analoga sollten darüber neue Aufschlüsse geben können (HANSEN et al. 2018).

## 4.2 Seitenabhängigkeit der Butyrat-Effekte

Sowohl die klare Unterscheidung nach immunhistochemischer Lokalisation von GPR109A und FFAR2, d. h. ersterer in oberflächlicheren Epithelschichten und letzterer in den tiefen, basalen Ebenen (Publikation 2, Fig. 2), als auch die Charakteristika der SCFA-Produktion im Pansenlumen, deren Konzentration bei weitem die im blutseitigen Kompartiment übertreffen, warfen die Frage nach seitenspezifischen Effekten der Butyrat-Applikation auf. Während im Lumen des Schafpansens Gesamtkonzentrationen von SCFAs in Höhe von ca. 100 mM auftreten können, bewegen sich diese im Blut zwischen 1 mM (arteriell) und 2 mM (in der Portalvene; BERGMAN. 1990). Entgegen unserer anfänglichen Vermutung erscheint eine Aktivierung des GPR109A durch mukosal anflutende SCFAs eher unwahrscheinlich, da der Niacin-Stimulus - wie oben ausgeführt - keinen Effekt auf die intraepithelialen cAMP-Spiegel zeigte. Dennoch blieb die Frage offen, ob im Blutkreislauf zirkulierende SCFAs den basolateralen FFAR2 aktivieren können.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden daher isolierte Pansenepithelien nach Forskolin-Stimulation vergleichend nur mukosal oder nur serosal gegenüber Butyrat exponiert. Es konnten signifikant niedrigere cAMP-Spiegel nach mukosaler Butyrat-Inkubation im Vergleich zu rein Forskolin-stimulierten Epithelien festgestellt werden, während eine serosale Gabe der gleichen Butyrat-Konzentration keinerlei Wirkung zeigte (Publikation 2, Fig. 4). Zur Beurteilung dieses Sachverhaltes, ist es notwendig, sich den unter 2.2 *Transport kurzkettiger Fettsäuren über das Pansenepithel* bereits erläuterten strukturellen Aufbau und die damit verbundenen Konsequenzen für den Transport von SCFAs über das Pansenepithel vor Augen zu führen (vgl. Publikation 1, Fig. 1 sowie 2.2.1 *Apikale Aufnahme in das Pansenepithel*): GRAHAM und SIMMONS (2005) stellten das Pansenepithel als funktionelles Synzytium dar, in dem die SCFAs nach apikaler Aufnahme durch Diffusion über Gap-Junctions von apikal nach basolateral transportiert werden und letztlich durch verschiedene unter 2.2.2 *Basolaterale Ausschleusung in den Blutstrom* erwähnte Mechanismen in das Blut abgegeben werden.

Der Transport von serosal nach mukosal (d. h. die Sekretion in das Pansenlumen aus dem Blutstrom) spielt unter physiologischen Bedingungen nahezu keine Rolle infolge der oben geschilderten Gegebenheiten der SCFA-Konzentrationen und Transportereigenschaften. Aber selbst bei Vorlage eines unphysiologischen Butyrat-Konzentrationsgradienten von serosal nach mukosal konnten SEHESTED et al. (1999a) lediglich die Hälfte der SCFA-Absorptionsrate aus dem Lumen ins Blut

detektieren (mit inversem Konzentrationsgradienten), wenn sie den Flux von serosal nach mukosal betrachteten. Auch DENGLER et al. (2014) bestätigten bei Vorlage identischer SCFA-Konzentrationen beidseits des Epithels eine ausgeprägte Seitenabhängigkeit der Butyrat-Ausschleusung auf der serosalen im Kontrast zur mukosalen Epithelseite des Schafpansens. Der beobachtete geringe Einfluss auf den cAMP-Spiegel nach serosaler Zugabe von Butyrat (Publikation 2, Fig. 4) ließe sich also damit erklären, dass die Transportvorgänge über die basolaterale Membran des Pansenepithels hauptsächlich der SCFA-Extrusion und weniger der Aufnahme in das Epithel dienen, wodurch diese auch nicht zur intraepithelialen Rezeptor-Aktivierung zur Verfügung stehen.

Das Pansenepithel ist folglich darauf spezialisiert, einen gerichteten Transport von mukosal nach basolateral zu gewährleisten, sodass auch die von uns beobachteten Effekte nach mukosaler Butyrat-Applikation auf die physiologischen Transportvorgänge zurückzuführen sein könnten. Da Untersuchungen mit dem FFAR-Agonisten Niacin (TUNARU et al. 2003) den GPR109A als potenziellen Vermittler der cAMP-Effekte als unwahrscheinlich erscheinen lassen, könnte eine Aktivierung des FFAR2 in den basalen Epithelschichten erfolgen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass SCFAs, und insbesondere Butyrat (siehe Publikation 1, *Catabolism of SCFA in the ruminal epithelium and its advantages* und 2.3 *Metabolisierung kurzkettiger Fettsäuren im Pansenepithel*) intensiv im Epithel metabolisiert werden (KRISTENSEN und HARMON. 2004b). Dies eröffnet eine weitere Perspektive der FFAR-Aktivierung: Weil sich der FFAR2 v. a. in den metabolisch aktiven Epithellagen des *Stratum spinosum* und *Stratum basale* anfärben lässt (GRAHAM und SIMMONS. 2005), dem Bereich, in dem vermutlich die stärkste Ketogenese stattfindet (PENNER et al. 2011), könnten also direkt die Ketonkörper (v. a.  $\beta$ -HB) als Liganden für den FFAR2 agieren. Entsprechend der oben erläuterten Transportvorgänge über das Pansenepithel scheint auch die Metabolisierungsrate von Butyrat seitenabhängig unterschiedlich stark ausgeprägt: Während beim Transport vom Pansenlumen ins Blut ca. 95 % des applizierten Butyrats metabolisiert auf der serosalen Seite erschienen, galt dies im umgekehrten Fall für lediglich 38 % (SEHESTED et al. 1999a). Butyrat, das physiologisch luminal aufgenommen wird, wurde in diesem Fall folglich nahezu vollständig metabolisiert, wohingegen aus dem serosalen Reservoir (*in vitro*) aufgenommenes Butyrat in deutlich geringerem Ausmaß zu Ketonkörpern abgebaut wurde (SEHESTED et al. 1999a). Analog lägen also im vorliegenden Fall für die Aktivierung des FFAR2 nach mukosaler Butyrat-Applikation wesentlich höhere Konzentrationen an Ketonkörpern vor als nach serosaler Gabe. Zudem ist eine unmittelbare Ausschleusung der serosal aufgenommenen SCFA<sup>-</sup> in den basalen Epithelschichten durch zuvor beschriebene Transporter wie HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher und den MCT1 nicht auszuschließen (siehe auch Publikation 1, Fig. 1). Dadurch würden

die Fettsäuren rezyklieren und sofort der Metabolisierung entzogen werden und folglich weniger potenzielles Substrat für den FFAR2 zur Verfügung stellen.

Die Annahme einer Aktivierung von FFAR2 durch Butyrat-Metaboliten wird unterstützt durch Untersuchungen in murinen Adipozyten und in sympathischen Neuronen, in denen eine Aktivierung von GPR109A bzw. FFAR3 durch  $\beta$ -HB gezeigt werden konnte (TAGGART et al. 2005, WON et al. 2013). Bislang wurde ein ähnlicher Sachverhalt jedoch noch nicht für den FFAR2 gezeigt. Daher sind anschließende Studien mit verschiedenen Ketonkörpern und deren Effekte auf die cAMP-Spiegel in Kombination mit FFAR2-Agonisten und -Antagonisten wünschenswert, um eine Beteiligung des Rezeptors sowie die Bedeutung der SCFA-Metaboliten einzugrenzen.

### 4.3 pH-Abhängigkeit der cAMP-Spiegel

Die unter 4.1.1 *Regulation intrazellulärer Signalwege durch FFARs* sowie 4.2 *Seitenabhängigkeit der Butyrat-Effekte* diskutierten Ergebnisse wurden alle an intakten Pansenepithelien erhoben, die in Ussing-Kammern inkubiert und beidseits mit einer Pufferlösung umspült wurden, deren pH-Wert 7,4 betrug. Mit diesen Inkubationsbedingungen sollten ‚Nebeneffekte‘ infolge eines pH-Gradienten ausgeschlossen werden. Nachdem nun jedoch beobachtet wurde, dass v. a. mukosal anflutende SCFAs zu signifikant verminderten cAMP-Spiegeln führten, sollte der Einfluss eines physiologischen (ergo leicht sauren) pH-Wertes im mukosalen Pufferreservoir auf den cAMP-Spiegel im Epithel untersucht werden.

Publikation 2, Fig. 6 zeigt den Einfluss des pH-Wertes auf die cAMP-Level nach mukosaler Inkubation der Epithelien in einer Pufferlösung mit einem pH-Wert von 7,4 oder 6,5. Es fällt auf, dass sich die Versuchsgruppen mit der gleichen Wirkstoffinkubation im Hinblick auf den pH-Wert nur im Falle der Butyrat-Behandlung unterscheiden. In den zuvor betrachteten Ansätzen führte eine mukosale Butyrat-Applikation im leicht alkalischen Milieu von 7,4 beidseits des Epithels zu signifikant verminderten cAMP-Spiegeln. Das konnte allerdings im unter 2.7.4 *Influence of pH on cAMP levels* der Publikation 2 besprochenen Versuchsansatz nicht reproduziert werden. Dies könnte auf einer stets vorliegenden, relativ hohen Streuung der Forskolin-Antwort der unterschiedlichen Epithelien beruhen. Zwar wurde bei der Auswahl der verwendeten Epithelien eines Versuchs ein großes Augenmerk auf eine größtmögliche makroskopische Homogenität der einzelnen Gewebestücke gelegt, trotzdem reagierten diese nicht immer konstant auf die Forskolin-Stimuli. Im vorliegenden Fall könnten also die Epithelien, die mit Forskolin und Butyrat behandelt wurden, sehr stark auf eine cAMP-Stimulation reagiert haben, während die rein Forskolin-behandelten Gewebe vergleichsweise milde cAMP-Anstiege verzeichneten.

Zudem sind auch individuelle Effekte der Einzeltiere nicht auszuschließen, jedoch anhand der vorliegenden Daten nicht ableitbar.

Im Vergleich der unterschiedlichen Inkubationsbedingungen hinsichtlich des pH-Wertes konnte in den Kontrollansätzen, in denen lediglich Lösungsmittel oder Forskolin hinzugegeben wurde, kein Unterschied zwischen den verschiedenen Grundbedingungen (pH 7,5 vs. 6,5) festgestellt werden. Somit scheint der pH-Wert per se keinen Einfluss auf die Synthese bzw. den Abbau von cAMP zu haben. Betrachtet man jedoch die Effekte einer mukosalen Butyrat-Zugabe zu Pufferlösungen unter den Bedingungen eines „physiologischen“ pH-Wertes (6,5), so fällt auf, dass die cAMP-Spiegel stark vermindert sind, sowohl im Vergleich zu Forskolin-stimulierten Epithelien als auch zur Vergleichsgruppe mit Inkubation bei pH 7,4 (siehe Publikation 2, Fig. 6). Die Spiegel sind sogar derartig niedrig, dass sie sich nicht signifikant von den Kontrollepithelien mit Lösungsmitteln unterscheiden. Dies bedeutet, dass Butyrat unter den Bedingungen eines leicht sauren Milieus einer Stimulation der cAMP-Bildung durch Forskolin sehr effektiv entgegenwirken kann. Dem könnten mehrere Ursachen zugrunde liegen:

Wie in Publikation 1, Fig. 1 bzw. *Transport of SCFA across the epithelium* dargestellt, können in einem saureren Milieu SCFAs sowohl über lipophile Diffusion als auch mithilfe von  $\text{HCO}_3^-$ -Austauschern vermehrt in das Epithel aufgenommen werden. Da der pH-Wert im Zytosol der Pansenepithelzellen bei etwa 7,4 liegt (BENESCH et al. 2014), kommt es nach Aufnahme von HSCFAs schnell zur Dissoziation im Zellinneren aufgrund des  $\text{pK}_s$ -Wertes von 4,8 (CISTOLA et al. 1982). Somit führt also sowohl die Resorption über lipophile Diffusion als auch im Austausch mit  $\text{HCO}_3^-$  zu einer Ansäuerung des Zytosols. Die beobachtete Modulation der intrazellulären Signalwege könnte zunächst in einem direkten Einfluss des pH-Wertes auf die cAMP-Spiegel begründet sein: So ist für die lösliche AC bekannt, dass eine Ansäuerung zur Aktivitätsminderung führt (RAHMAN et al. 2013), doch sollte in diesem Fall kein Effekt durch Forskolin hervorruftbar sein. Wie bereits oben erläutert, ist in unseren Untersuchungen also nicht davon auszugehen, dass die lösliche AC eine Rolle spielt. Im Gegensatz zu diesem Enzym ist bei transmembranären ACs, wie sie bei Kopplung an G-Proteine vorkommen (also auch bei FFARs), bislang kein hemmender Einfluss von  $\text{H}^+$  auf deren Aktivität beschrieben (DESSAUER et al. 2017). EL KEBIR et al. (2017) konnten in neutrophilen Zellen sogar eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel durch extrazelluläre Ansäuerung (von pH 7,4 auf pH 6,5) hervorrufen. Zudem zeigte sich in der vorliegenden Arbeit in allen weiteren Behandlungen (Kontrolle, Forskolin und Forskolin + Niacin) kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden pH-Gruppen. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die vorliegende Verminderung des cAMP-Spiegels nicht durch eine Azidifizierung des mukosalen Reservoirs bzw.

nachfolgend (Butyrat-vermittelt) des Zytosols verursacht wurde, sondern vielmehr durch Butyrat selbst. Dabei könnten wie bereits in 4.2 *Seitenabhängigkeit der Butyrat-Effekte* ausgeführt nicht nur Butyrat, sondern v. a. auch dessen Metaboliten Azetoazetat und  $\beta$ -HB (WEIGAND et al. 1975) eine Aktivierung des FFAR2 hervorrufen. Die verstärkte cAMP-Reduktion im sauren Milieu beruht damit vermutlich auf einer erhöhten Substratbereitstellung für den FFAR2.

Auch wenn der genaue Wirkmechanismus von unseren Befunden bislang nicht eindeutig abgeleitet werden kann, stellt sich die Frage nach den Auswirkungen der durch Butyrat modulierten Signalwege im Pansenepithel. Wie eingangs beschrieben und in Publikation 1, *Acidosis and ruminal epithelium* erläutert, stellen steigende SCFA-Konzentrationen im Pansenlumen eine große Herausforderung an die epitheliale pH-Homöostase dar. Zusätzlich zur epithelialen Azidifizierung weisen sowohl die dissoziierten SCFAs als auch die (aus dem intraepithelialen SCFA-Katabolismus entstehenden) Ketonkörper im Vergleich zu HSCFAs eine (teilweise wesentlich) geringere Lipophilie auf (LEO et al. 1971), sodass diese Substrate Proteinstrukturen zur Überwindung der basolateralen Zellmembran benötigen. Eine effektive Ausschleusung ist wiederum notwendig, um eine toxische Akkumulation im Zytosol zu verhindern (siehe Publikation 1, Fig. 2). Ein vielversprechender Vertreter dieser basolateralen SCFA(-Metaboliten)-Transporter ist der im *Stratum basale* verortete MCT1 (MÜLLER et al. 2002, KIRAT et al. 2006a, GRAHAM et al. 2007), der zudem eine wesentliche Rolle für die intrazelluläre pH-Homöostase zu spielen scheint (KIM GARCIA et al. 1994, DENGLER et al. 2014, AKIBA et al. 2015). Daher wurde im Anschluss der Einfluss verschiedener cAMP-Spiegel auf die Aktivität der MCTs im ovinen Pansenepithel betrachtet.

#### **4.4 Einfluss von cAMP auf die Aktivität der MCTs**

Wie unter 2.8.2 *Regulation der MCTs* beschrieben, deuten Befunde aus Studien an Nicht-Wiederkäuerspezies darauf hin, dass die MCT-Aktivität bzw. die MCT-Expression in der Zellmembran durch variierende cAMP-Spiegel moduliert werden kann. Nachdem wir einen hemmenden Effekt von Butyrat auf die intraepithelialen cAMP-Level im Schafpansen festgestellt haben, lag nun der Gedanke nahe, dass – ähnlich dem Mechanismus in anderen Geweben – die ruminalen MCTs ebenfalls durch erhöhte cAMP-Spiegel gehemmt bzw. durch verminderte Spiegel aktiviert würden. Dies würde bedeuten, dass bei einem starken Anfluten von SCFAs (wie zum Beispiel bei einer kraftfutterreichen Mahlzeit) vermehrt SCFAs resorbiert werden, die im folgenden FFARs aktivieren. Die daraufhin erniedrigten cAMP-Spiegel könnten dann wiederum zu einer gesteigerten MCT-Aktivität führen und somit die epitheliale Homöostase durch einen schnelleren Abtransport von SCFAs, deren Metaboliten

sowie den H<sup>+</sup> unterstützen. Daher folgten Azetat-Fluxstudien in Kombination mit MCT-Hemmstoffen und z. T. unter Einsatz von Forskolin.

Da bis dato keine spezifischen Hemmstoffe bekannt sind, die nur MCTs hemmen (HALESTRAP und PRICE. 1999), nutzten wir zwei verschiedene Hemmstoffe (CHC und p-Hydroxymercuribenzoessäure (pHMB), letzteres hemmt im Falle von MCT1 und MCT4 das essenzielle Glykoprotein Basigin; WILSON et al. 2005), die häufig zur Inhibition dieser Transporter genutzt werden. Diese wurden beidseits des Epithels appliziert, wodurch prinzipiell sowohl MCT4 apikal als auch MCT1 basolateral und eventuell ebenso MCT2 im Inneren des Epithels (im Falle von CHC, nicht jedoch von pHMB; vgl. 2.8.2 *Regulation der MCTs*) gehemmt werden könnten. Bisherige Transport-Studien weisen darauf hin, dass v. a. der MCT1 für die Permeation von SCFAs über das Pansenepithel von quantitativer Bedeutung ist (KIRAT et al. 2006b, ASCHENBACH et al. 2009), sodass die im Folgenden diskutierten Ergebnisse v. a. diesem zugeschrieben werden. Dennoch ist anzunehmen, dass auch MCT4 einen geringen Anteil am Transportgeschehen über das Pansenepithel in unseren Untersuchungen hat. Jedoch liegen keine Hinweise vor, dass dieser im vorliegenden Fall gegensätzlich zu MCT1 reguliert wird.

Im Kontrast zu den bisherigen Experimenten wurde dieser Ansatz mit Azetat als eingesetzter SCFA durchgeführt, um eine Fettsäure zu nutzen, die sicher mithilfe des MCT1 in die Blutbahn ausgeschleust (DENGLER et al. 2014) und im Gegensatz zu Butyrat kaum metabolisiert wird (KRISTENSEN et al. 2000b).

Wie in Publikation 2, Fig. 7 ersichtlich, konnten wir anhand der festgestellten Veränderungen in der Azetat-Permeation entgegen unserer Vermutung keinerlei hemmenden Einfluss hoher cAMP-Spiegel auf den MCT1 feststellen. Zwar wurde der Azetat-Transport signifikant durch die Anwendung der Hemmstoffe reduziert (was auf einen Transport der SCFA mittels MCT1 hindeutet), jedoch ließ sich kein Effekt durch eine reine Forskolin-Zugabe geschweige denn eine additive Hemmung von Forskolin in Kombination mit CHC oder pHMB erzielen. Dies ist in Übereinstimmung mit einer Studie von GÄBEL et al. (1999), in der eine Forskolin-Zugabe auch auf den Propionat-Transport keinen Einfluss hatte. Somit scheint die von DENGLER et al. (2015) beobachtete Hochregulierung des MCT1 im Pansenepithel des Schafes infolge hoher Butyrat-Konzentrationen nicht auf veränderten cAMP-Spiegeln zu beruhen und wird daher vermutlich nicht durch FFAR2 vermittelt.

Unsere Ergebnisse stehen im Gegensatz zu *in vitro*-Befunden der humanen Skelettmuskulatur sowie des zerebralen Endothels der Ratte, in denen hohe cAMP-Spiegel bzw. dessen Analoga zu einer Hemmung der MCT1-Aktivität führten (SMITH und DREWES. 2006, NARUMI et al. 2010, SMITH et al. 2012). Dies konnte auf eine

Abnahme der Proteinexpression (NARUMI et al. 2010) bzw. eine Internalisierung der Transporter und Cluster-Bildung im Zytosol zurückgeführt werden (SMITH et al. 2012, UHERNIK et al. 2014). Im intestinalen Darmzellmodell (C2BB<sub>e</sub>1-Zellen sowie IEC-6-Zellen) konnten BORTHAKUR et al. (2012) sogar eine Stimulation der MCT1-Aktivität bei gleichzeitig geringen cAMP-Spiegeln infolge einer FFAR-Aktivierung nachweisen. Da im Schafpansen nach den vorliegenden Daten kein Einfluss von cAMP auf die MCT1-Aktivität abgeleitet werden kann, wurden keine weiteren Untersuchungen der Transporterexpression vorgenommen.

Nachdem in kultivierten Pansenepithelzellen unter Stimulation von PPAR $\alpha$  trotz Veränderung auf mRNA-Ebene keine funktionelle Hochregulierung des MCT1 festgestellt werden konnte, äußerten BENESCH et al. (2014) die Vermutung, dass MCT1 im Pansenepithel bereits unter physiologischen ‚Normalbedingungen‘ hohe Transportraten erzielt, sodass eine Steigerung nur bedingt möglich ist. Dies wird auch durch die ausgeprägte Transporterexpression in den Schichten des *Stratum basale* sowie *Stratum spinosum* unterstützt (MÜLLER et al. 2002, KIRAT et al. 2006b, GRAHAM et al. 2007). Da aufgrund der relativ hohen Verweildauer der SCFAs im Lumen des Pansens im Vergleich zum Kolonlumen des Monogastriers (VON ENGELHARDT et al. 2015) die SCFA-Konzentrationen im Pansenlumen trotz kurzzeitiger Fütterungsschwankungen stets als moderat bis hoch einzustufen sind, könnte MCT1 in der meisten Zeit bereits auf hohem Niveau arbeiten und somit nur wenig Regulationsbedarf aufweisen. Unsere ursprüngliche Arbeitshypothese, der zufolge MCT1 als entscheidendes pH-regulatives Transportprotein mittels FFAR-modulierter cAMP-Spiegel kurz- und mittelfristig reguliert wird, ließ sich somit nicht bestätigen. Möglicherweise erfolgt die Regulation des MCT1 im Pansenepithel aber durchaus auch über cAMP, allerdings nur unter langandauernden, speziellen Bedingungen wie etwa in Zeiten der negativen Energiebilanz postpartaler Rinder. Dies ist jedoch auf Grundlage dieser Studie rein spekulativ und müsste mithilfe von Langzeitstudien überprüft werden.

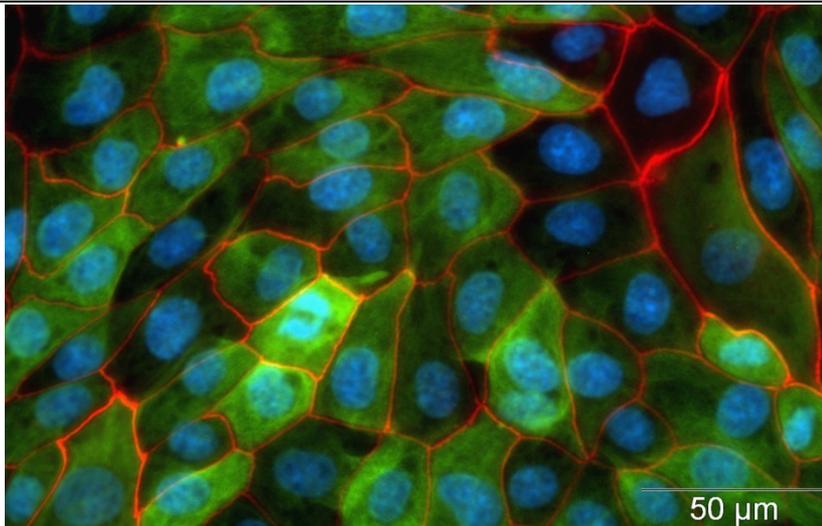
### **4.5 Einfluss von cAMP auf die NHE-Aktivität**

Neben MCTs spielt auch die Familie der NHEs eine wesentliche Rolle in der pH-Stabilisierung des Pansenepithels. So liegen schon seit geraumer Zeit Erkenntnisse vor, die die Existenz dieser Transporter in der Pansenwand nahelegen: Zum einen konnten mehrere Studien einen Amilorid-sensitiven Na<sup>+</sup>-Transport im Pansenepithel nachweisen (MARTENS und GÄBEL. 1988, GÄBEL et al. 1991b), zum anderen wurden verschiedene Isotypen bereits immunhistochemisch lokalisiert (GRAHAM et al. 2007, RABBANI et al. 2011, AHMED et al. 2014; vgl. 2.9.3 *NHEs im Pansenepithel*). Dabei wurde NHE3 verstärkt in den apikalen Schichten des Epithels angefärbt, wohingegen die Untersuchungen zu NHE1 bislang uneindeutig sind. GRAHAM et al.

(2007) konnten diesen im bovinen Pansene­pithel ebenfalls in den apikalen Lagen verorten.

Betrachtet man die Regulation der NHEs, zeigen sich gewisse Überschneidungen mit den MCTs (siehe 2.9.2 *Regulation der NHEs*). Dabei konnte in verschiedenen Studien an Nicht-Wiederkäuerspezies eine Beeinflussung der NHE-Aktivität durch cAMP beobachtet werden, die z. T. auf veränderten Phosphorylierungen der Transporter beruht (AZARANI et al. 1995, CABADO et al. 1996). Während hohe cAMP-Spiegel NHE1 stimulieren (AZARANI et al. 1995, JACOB et al. 2000), wird NHE3 dadurch gehemmt (COLLAZO et al. 2000).

Im abschließenden Teil der vorliegenden Arbeit sollte daher geklärt werden, inwiefern die durch Butyrat bzw. eventuell dessen Metaboliten hervorgerufenen Änderungen des cAMP-Spiegels Einfluss auf die ruminalen NHEs haben. Deren Aktivität wurde indirekt mithilfe von pH<sub>i</sub>-Messungen an kultivierten Pansene­pithelzellen erhoben, da diese im Gegensatz zum gesamten intakten Epithelverband zur Betrachtung von Regulationsmechanismen weniger Störfaktoren ausgesetzt sind und somit die einzelnen Komponenten deutlicher abgegrenzt werden können. Das bereits in der Arbeitsgruppe genutzte Protokoll zur Gewinnung von primärkultivierten Pansene­pithelzellen wurde erweitert, um eine Verunreinigung mit subepitheliale­m Bindegewebe (v. a. Fibroblasten) weiter zu minimieren. Dies erfolgte in Anlehnung an die Gewinnung von humanen Keratinozyten aus der Haut (KITANO und OKADA. 1983; siehe Publikation 2; 2.8.1 *Isolation of cells*). Dabei wurde das Pansene­pithel über Nacht in Dispase inkubiert und anschließend der dadurch leicht ablösbare Epithelverband mithilfe einer enzymatisch-mechanischen Aufarbeitung aufgelöst, um die Einzelzellen zu gewinnen. Die Subkultivierung entsprach dem bereits im Institut etablierten Protokoll (siehe Publikation 2; 2.8.1 *Isolation of cells*). Eine immunzytochemische Fluoreszenzfärbung mit Pankeratin-Antikörper sowie Zonula-Occludens 1-Antikörper diente dem Nachweis des überwiegend epithelialen Charakters der Zellkultur. Abbildung 2 zeigt beispielhaft nach oben beschriebener Methode subkultivierte (P1) Pansene­pithelzellen des Schafes.



**Abb. 2: Nachweis von Pankeratin (grün) und Zonula-Occludens 1 (rot) in subkultivierten Pansenepithelzellen.** Nach Präinkubation mit Ziegen Serum und Triton X-100 wurden die fixierten Zellen für 24 Stunden mit Primärantikörpern gegen Pankeratin sowie Zonula-Occludens 1 inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit sekundären, fluoreszierenden Antikörpern. Die Zellkerne sind mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (blau) markiert. Unveröffentlicht.

Um nun die NHE-Aktivität der kultivierten Epithelzellen zu beurteilen, wurden diese zweimalig einer Ansäuerung mittels  $\text{NH}_3/\text{NH}_4$ -Präpuls unterzogen und die darauffolgende Gegenregulation betrachtet. Die erste Reaktion wurde stets als ‚individuelle‘ Referenz genutzt, um in der zweiten Ansäuerung den Einfluss eines NHE-Hemmstoffes (EIPA) und/oder hoher cAMP-Spiegel (durch Forskolin-Inkubation) zu erheben. Die vorliegenden Daten weisen auf eine leicht verminderte Kapazität der Zellen zur Gegenregulation hin, wenn die Inkubation bei hohen intrazellulären cAMP-Spiegeln stattfand (siehe Publikation 2, Fig. 9). Dies könnte auf eine Hemmung des NHE3 zurückzuführen sein, dessen Aktivität durch die Applikation von EIPA (die eine signifikante Hemmung der Alkalisierung hervorrief) nachgewiesen wurde (Publikation 2, Fig. 9). SCHWEIGEL et al. (2000, 2005) konnten an isolierten Pansenepithelzellen ebenfalls eine verminderte  $\text{pH}_i$ -Gegenregulation feststellen, nachdem sie hohe cAMP-Spiegel durch ein Analogon bzw. einen gehemmten Abbau simulierten. Dabei kam es nach einer initialen Azidifizierung, welche die Autoren einer NHE3-Hemmung zuschrieben, zur Alkalisierung, die Ausdruck einer gesteigerten NHE1-Aktivität sein könnte (SCHWEIGEL et al. 2005). Zudem zeigte diese Arbeitsgruppe auch, dass neben NHEs auch die  $\text{vH}^+$ -ATPase maßgeblich an der  $\text{pH}_i$ -Regulation oviner Pansenepithelzellen beteiligt ist (ETSCHMANN et al. 2006). Eine Regulation dieses Transportproteins durch cAMP ist bislang jedoch nicht bekannt. Da durch die Applikation von EIPA, das sowohl NHE1 als auch NHE3 hemmt, eine Unterscheidung der beiden Isotypen im vorliegenden Fall nicht möglich ist, könnte auch in unserem

Fall eine Aktivitätshemmung des NHE3 durch die gegenteilige Regulation von NHE1 zumindest teilweise kaschiert worden sein. Zudem ist für den NHE3 bekannt, dass der Transporter infolge von Phosphorylierungen internalisiert wird und somit der pH-Regulation mit dem Interstitium/Medium vorübergehend nicht mehr zur Verfügung steht (ZHAO et al. 1999). Es könnte daher in den eigenen Studien eine zu kurze Inkubation stattgefunden haben, um diese Internalisierungsprozesse abzubilden. Die verhältnismäßig schnellen Wechsel des Mediums (drei bzw. fünf Minuten) wurden jedoch angewendet bzw. waren nötig, um das Aktivitätsmaximum der NHEs (30 bis 60 Sekunden nach Wechsel; ALEXANDER et al. 2007) bis zur anschließenden Plateauphase zu analysieren. Um den Einfluss von cAMP sowohl auf NHE1 als auch NHE3 im Pansenepithel zu erheben, sind zukünftige Folgestudien mit spezifischen Hemmstoffen wünschenswert.

RABBANI et al. (2011) konnten im intakten Epithelverband hauptsächlich NHE3 als apikalen Vermittler der Na<sup>+</sup>-Resorption ausmachen, während NHE1 in diesen Untersuchungen keinerlei Einfluss auf den Natriumtransport zeigte. Somit könnte auch im Pansenepithel eine Arbeitsteilung gemäß weiteren Geweben (wie v. a. am Darm untersucht) auftreten, derartig, dass NHE1 hauptsächlich für die basolateral lokalisierte pH-Regulation zuständig ist (MAHER et al. 1996), während NHE3 v. a. in die apikale Na<sup>+</sup>-Aufnahme involviert ist (NOEL und POUYSSEGUR. 1995). Dies wird unterstützt durch eine Studie von LU et al. (2016), die ebenfalls eine starke Abhängigkeit der mukosalen Na<sup>+</sup>-Aufnahme von NHE3 detektierten. Es wurde wiederholt gezeigt, dass die transruminale Na<sup>+</sup>-Resorption durch SCFAs stimuliert wird (GÄBEL et al. 1991b, SEHESTED et al. 1996). Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, führt die Applikation von Butyrat zu verminderten cAMP-Spiegeln, welche wiederum stimulierend auf die NHE3-Aktivität wirken könnten. Somit könnte auch der von GÄBEL et al. (1991b) sowie SEHESTED et al. (1996) festgestellte positive Effekt von SCFAs auf die Na<sup>+</sup>-Aufnahme auf einer Stimulation von FFAR2 und damit einhergehenden verminderten cAMP-Spiegeln beruhen, welche daraufhin den apikalen NHE3 aktivieren. Eine zusätzliche Stimulation durch eine vermehrte zytosolische Akkumulation von H<sup>+</sup> ist natürlich ebenfalls möglich. Dennoch muss v. a. die Rolle des NHE1 im Pansenepithel eingehender mithilfe von spezifischen Hemmstoffen untersucht werden.

### **4.6 Schlussfolgerungen**

Abschließend ist festzustellen, dass die vorliegende Arbeit FFAR2 und GPR109A erfolgreich im ovinen Pansenepithel verorten konnte. Zudem konnte mithilfe von Butyrat eine Modulation der intrazellulären Signalwege über cAMP provoziert werden. Während eine Beteiligung von GPR109A an dieser Regulation anhand einer Agonisten-Untersuchung als unwahrscheinlich eingestuft werden kann, scheint

FFAR2 hier eine mögliche Rolle zu spielen. Dabei sprechen dessen Lokalisation in den basalen Epithelschichten sowie der Einsatz des stark metabolisierbaren Butyrats für eine potenzielle FFAR2-Aktivierung mithilfe von SCFA-Metaboliten wie  $\beta$ -HB.

Entgegen der Charakteristika in anderen Spezies deuten die Daten der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass MCTs im ovinen Pansenepithel nicht über cAMP in ihrer Aktivität moduliert werden. Auch NHEs als weitere Vertreter von  $\text{pH}_i$ -regulativen Transportern werden vermutlich nicht sehr stark durch variierende cAMP-Spiegel beeinflusst. Somit scheint eine Beteiligung von FFARs als Sensoren der Säurelast entgegen unserer Ausgangshypothese nicht der Anpassung von  $\text{pH}_i$ -regulativen Transportern im Pansenepithel zu dienen. Dennoch sollte die Rolle der NHEs in der Vermittlung von FFAR-Aktivierungen mithilfe von spezifischen Hemmstoffen für die einzelnen Subtypen noch näher untersucht werden. Möglicherweise kann auch im Pansenepithel eine simultane Hochregulation der NHE1-Aktivität mit einer Herunterregulation der NHE3-Aktivität einhergehen.

Sollte dem nicht so sein, könnte dies an einer ohnehin hohen Transportleistung sowohl der MCT- als auch der NHE-Familie im Bereich der physiologischen Säurekonzentration bzw. des SCFA-Angebotes liegen. Es wäre folglich möglich, dass diese Transporter nur im Rahmen besonderer Umstände, in denen mehrere Ko-Faktoren zusammenwirken (WON et al. 2013), durch cAMP-Spiegel infolge einer SCFA-Metaboliten-induzierten FFAR2-Aktivierung moduliert werden. Dies könnte zum Beispiel bei Kühen in der Früh-laktation der Fall sein, bei denen aufgrund der hohen Leistung und verminderten Nahrungsaufnahme eine vermehrte Neigung zur Lipolyse auftritt (FRIEDRICHS et al. 2016).

Die vorliegende Arbeit liefert daher den Nachweis von zwei FFAR-Vertretern im Pansenepithel. Jedoch bleibt deren physiologische Rolle, insbesondere des GPR109A, weiterhin spekulativ. Zudem konnte für die Regulation der MCTs kein Einfluss von cAMP festgestellt werden, während die Regulation der NHE-Subtypen durch cAMP noch eingehender untersucht werden muss. Somit muss unsere ursprüngliche Hypothese, dass Fettsäurerezeptoren im ovinen Pansenepithel eine wesentliche Rolle in der cAMP-abhängigen Anpassung  $\text{pH}$ -regulativer Transportprozesse an die epithelial vorherrschende SCFA- und  $\text{H}^+$ -Konzentration spielen, abgelehnt werden.

## 5 Zusammenfassung

Lisa Baaske

Modulation pH-regulativer Transportproteine durch Fettsäurerezeptoren im Pansenepithel des Schafes

Veterinär-Physiologisches Institut, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im Juni 2021

Bibliografische Angaben: 78 Seiten, 2 Abbildungen, 205 Literaturangaben, Anhang

Schlüsselwörter: Freie Fettsäurerezeptoren, Kurzkettige Fettsäuren, Monocarboxylattransporter,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher, Pansenepithel, pH-Regulation

Einleitung: Ruminale Futterpflanzen werden zu kurzkettigen Fettsäuren (SCFAs) abgebaut. Diese bilden die Hauptenergiequelle für den Wiederkäuerorganismus. Da diese Fettsäuren jedoch auch maßgeblich die pH-Homöostase der Vormagenschleimhaut beeinflussen, muss das Pansenepithel in der Lage sein, Änderungen im Substrat- und Protonenangebot festzustellen und anschließend regulative Prozesse anzupassen, um Stoffwechsellagestörungen und so auch einer Pansenazidose vorzubeugen. In anderen Spezies erwiesen sich sogenannte „Freie Fettsäurerezeptoren“ (FFARs) als potenzielle Sensoren veränderter SCFA-Mengen im Darmlumen, die u. a. durch Modulation der intrazellulären Spiegel an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) ihre Wirkung vermitteln.

Ziele der Untersuchungen: Es sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob FFARs im Pansenepithel des Schafes vorkommen und durch SCFAs aktiviert sowie intrazelluläre Signalwege über cAMP moduliert werden können. Im Anschluss sollte erarbeitet werden, inwiefern der nachgewiesene Einfluss von Butyrat auf die epithelialen cAMP-Spiegel Auswirkungen auf die epitheliale pH-Modulation infolge einer veränderten Aktivität von Monocarboxylattransportern (MCTs) und  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschern (NHEs) hat.

Tiere, Material und Methoden: Sämtliche Untersuchungen wurden an Geweben des Vormagens von Schafen (*Ovis gmelini aries*) durchgeführt. Mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und immunhistochemischer Färbungen wurde das Vorliegen verschiedener FFARs in nativem Pansengewebe untersucht. Zur funktionellen Charakterisierung wurden Epithelstücke aus dem ventralen Pansensack in Ussing-Kammern inkubiert und anschließend die cAMP-Spiegel im Epithel mittels einer quantitativen, kompetitiven Analyse bestimmt. Dabei wurde der Einfluss von Forskolin (ein Stimulator der cAMP-synthetisierenden Adenylzyklen), von Butyrat sowie von Niacin (ein FFAR-Agonist) betrachtet. Mithilfe von radioaktiv markiertem Azetat wurde der Effekt variierender cAMP-Spiegel

auf die Transportaktivität von MCTs unter Zuhilfenahme von zwei verschiedenen MCT-Hemmstoffen (Cyanohydroxyzimtsäure und p-Hydroxymercuribenzoessäure) in Ussing-Kammern evaluiert. Die Aktivität der NHEs wurde an kultivierten Pansenepithelzellen durch Messung des intrazellulären pH-Wertes mittels Spektrofluorometrie unter Einfluss des NHE-Inhibitors 5-N-Ethyl-N-Isopropyl Amilorid ermittelt. Auch hierbei wurden in den Zellen unterschiedliche cAMP-Spiegel durch Forskolin-Applikation induziert. Die Daten der verschiedenen Untersuchungen wurden an 5-8 Tieren je Versuchsansatz erhoben. Die Normalverteilung wurde mittels Kolmogorov–Smirnov-Test ermittelt. Ein Friedman-Test mit anschließendem Dunn-Test wurde für die Analyse der cAMP-Experimente genutzt. MCT und NHE Experimente wurden mithilfe einer einfachen, geblockten Varianzanalyse und anschließendem Tukey-Test ausgewertet.

Ergebnisse: Die FFARs GPR109A und FFAR2 konnten an allen untersuchten Lokalisationen (Netzmagen, Pansenvorhof, dorsaler und ventraler Pansensack, Psalter) über RT-PCR bzw. im ventralen Pansensack auch über die immunhistochemischen Färbungen detektiert werden, wohingegen FFAR3 lediglich als mRNA im Vorhof nachweisbar war. Dies lässt die beiden Rezeptoren GPR109A und FFAR2 als mögliche Strukturen zur Detektion von SCFAs im Pansenepithel erscheinen. Die Analyse der intrazellulären cAMP-Spiegel in Epithelien aus dem ventralen Pansensack konnte einen hemmenden Einfluss von Butyrat auf diesen Botenstoff darlegen, was auf eine Beteiligung der genannten FFARs hindeutet. Die Applikation des GPR109A-Agonisten Niacin hatte jedoch keinen Effekt auf die cAMP-Spiegel, sodass eine Wirkungsvermittlung von Butyrat über diesen Rezeptor unwahrscheinlich scheint. Mit Blick auf die funktionellen Auswirkungen dieser cAMP-Modulation hatten variierende cAMP-Level im Kontrast zu Erkenntnissen aus Nicht-Wiederkäuerspezies keinen Einfluss auf die Transportaktivität des ruminalen MCT1 unter den gewählten *in vitro*-Versuchsbedingungen. Andererseits konnte die Regulation des intrazellulären pH-Wertes von kultivierten Pansenepithelzellen tendenziell durch erhöhte cAMP-Spiegel gehemmt werden, was auf einer Hemmung von NHEs durch den second messenger beruhen könnte.

Schlussfolgerungen: Die Expression von GPR109A und FFAR2 lassen diese zwei FFARs als potenzielle Sensoren der intraruminalen bzw. intraepithelialen Nährstoffkonditionen erscheinen. Dabei deuten die vorliegenden Untersuchungen auf eine Aktivierung des FFAR2 durch Butyrat und dessen Metaboliten in den basalen Schichten des Pansenepithels hin. Infolge der Rezeptoraktivierung kommt es vermutlich zu einer Verminderung der intraepithelialen cAMP-Spiegel, welche wiederum einen (schwachen) Einfluss auf die Regulation des intrazellulären pH-Wertes mithilfe von NHEs zu haben scheinen. Entgegen unserer Ausgangshypothese scheinen aber die FFARs des ovinen Pansenepithels die pH-Homöostase des Epithels nur geringfügig zu beeinflussen. Ihre genaue physiologische Bedeutung – insbesondere des GPR109A – bleibt somit noch spekulativ.

## 6 Summary

Lisa Baaske

Modulation of pH-regulating transport proteins by free fatty acid receptors in the ovine ruminal epithelium

Institute of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University

Submitted in June 2021

Bibliography: 78 pages, 2 figures, 205 references, appendix

keywords: free fatty acid receptors, short chain fatty acids, monocarboxylate transporter,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -exchanger, ruminal epithelium, pH-regulation

Introduction: Forage plants are ruminally degraded to short chain fatty acids (SCFAs). These serve as the main energy source for ruminants. As SCFAs also influence the pH-homeostasis of the ruminal mucosa, the epithelium must be able to detect changes of both substrate and proton accumulation and adapt transport processes accordingly, in order to prevent metabolic dysfunction and thus the risk of ruminal acidosis. Studies in non-ruminant species detected so-called 'free fatty acid receptors' (FFARs) as potential SCFA-sensors in the gut lumen. It has been shown that these receptors transduce their information by modulation of intracellular levels of cyclic adenosine monophosphate (cAMP).

Aim: This study intended to investigate if FFARs are located in the ovine ruminal epithelium. It should further be evaluated if FFARs can be stimulated by SCFAs leading to a modulation of intracellular pathways via cAMP. Finally, the study aimed to elucidate the influence of low epithelial cAMP-levels after butyrate application on the regulation of pH-homeostasis in the ruminal epithelium by modulating the activity of transport proteins such as monocarboxylate transporters (MCTs) and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers (NHEs).

Animals, material, and methods: All experiments were conducted with ovine (*Ovis aries*) ruminal tissues. The expression of different FFARs was investigated in native tissues using a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemical staining. For functional analysis, epithelial cAMP levels were determined by a quantitative and competitive assay after incubation of epithelia of the ruminal ventral sac in Ussing chambers. The influence of forskolin (a stimulator of the adenylyl cyclases), butyrate, as well as niacin (an FFAR agonist) was evaluated. Further, the effect of varying cAMP levels on transport activity of MCTs was characterised on Ussing chamber-mounted epithelia with radioactively labelled acetate and two MCT inhibitors (cyano-hydroxycinnamic acid and p-hydroxymercuribenzoic acid). Finally, the activity of NHEs was assessed in cultured ruminal epithelial cells.

The intracellular pH was evaluated by spectrofluorometry while the cells were incubated with forskolin (to modify intracellular cAMP levels) or the NHE inhibitor 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride.

The data for the different set-ups were acquired from 5-8 animals each. Kolmogorov–Smirnov test was used for testing normality. For cAMP level analyses, the Friedman test followed by Dunn's test was performed. MCT and NHE measurements were analysed using one-way randomized block analysis of variance followed by Tukey's test.

Results: GPR109A and FFAR2 were detected in all ovine ruminal epithelia examined (reticulum, *atrium ruminis*, ruminal ventral and dorsal sac, omasum) by RT-PCR and in ruminal ventral sac also by immunohistochemical staining. FFAR3, however, was detected solely on mRNA level in tissues of the ovine *atrium ruminis*. Thus, the two immunohistochemically detected receptors may serve as potential sensors for SCFAs in the ruminal epithelium. The analysis of intraepithelial cAMP levels revealed an inhibiting influence of butyrate application on cAMP pointing to an activation of FFARs by this SCFA. Nonetheless, the incubation with the GPR109A agonist niacin did not show any effect on cAMP levels. This finding contradicts the theory of an activation of GPR109A by butyrate. Looking at functional consequences of varying cAMP levels, in contrast to studies on non-ruminant species ruminal MCT1 activity was not influenced by different cAMP levels, at least under the conditions chosen in this *in vitro* study. However, regulation of intracellular pH in cultured ruminal epithelial cells tended to decrease with augmented cAMP levels. This might be mediated by an inhibition of NHEs.

Conclusions: The expression of GPR109A and FFAR2 points at a participation of these receptors in sensing intraruminal and intraepithelial energy status. The present data hint at an activation of FFAR2 by butyrate or its metabolites in the basal layers of the epithelium. Activation of the receptor leads to decreased cAMP levels. This in turn seems to slightly modify the regulation of intracellular pH via NHEs. Contradicting our initial hypothesis, ovine ruminal FFARs seem to play only a minor role in modulation of epithelial pH homeostasis. The main physiological role of ruminal FFARs – especially of GPR109A – remains to be clarified.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abalo R, Goicoechea C, Martín MI. Blockade of Gi/o proteins modifies electrical activity of S-myenteric neurons from guinea-pig ileum. *Neurosci Lett.* 2004;356(3):175–8.
- Agrawal A, Alharthi A, Vailati-Riboni M, Zhou Z, Loor JJ. Expression of fatty acid sensing G-protein coupled receptors in peripartal Holstein cows. *J Anim Sci Biotechnol.* 2017;8:1–10.
- Aguinaga Casañas MA, Schäff CT, Albrecht E, Hammon HM, Kuhla B, Röntgen M, Nürnberg G, Mielenz M. Short communication: Free fatty acid receptors FFAR1 and FFAR2 during the peripartal period in liver of dairy cows grouped by their postpartum plasma  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations. *J Dairy Sci.* 2017;100(4):3287–92.
- Ahmed RS, Martens H, Mülling C. Diet-dependent rumen epithelial NHE1 and NHE3 expression in sheep. *AVS.* 2014;2(6):208–12.
- Akiba Y, Inoue T, Kaji I, Higashiyama M, Narimatsu K, Iwamoto K, Watanabe M, Guth PH, Engel E, Kuwahara A, Kaunitz JD. Short-chain fatty acid sensing in rat duodenum. *J Physiol.* 2015;593(3):585–99.
- Alameen Omer AO, Rackwitz R, Gäbel G. Anion exchanger proteins: participation in extrusion of SCFA and their metabolites across basolateral membrane of ruminal epithelia. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology.* 68. Jahrestagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie; 18.-20.03.2012. Göttingen, Deutschland. Frankfurt am Main: DLG-Verlag; 2014. p. 79.
- Albornoz RI, Aschenbach JR, Barreda DR, Penner GB. Feed restriction reduces short-chain fatty acid absorption across the reticulorumen of beef cattle independent of diet. *J Anim Sci.* 2013;91(10):4730–8.
- Alexander RT, Furuya W, Szaszi K, Orłowski J, Grinstein S. Rho GTPases dictate the mobility of the Na/H exchanger NHE3 in epithelia: Role in apical retention and targeting. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(34):12253–8.
- Alexander RT, Grinstein S. Tethering, recycling and activation of the epithelial sodium-proton exchanger, NHE3. *J Exp Biol.* 2009;212(Pt 11):1630–7.

- Alexander RT, Malevanets A, Durkan AM, Kocinsky HS, Aronson PS, Orlowski J, Grinstein S. Membrane curvature alters the activation kinetics of the epithelial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, NHE3. *J Biol Chem.* 2007;282(10):7376–84.
- Alexander SPH, Christopoulos A, Davenport AP, Kelly E, Mathie A, Peters JA, Veale EL, Armstrong JF, Faccenda E, Harding SD, Pawson AJ, Sharman JL, Southan C, Davies JA. The concise guide to pharmacology 2019/20: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol.* 2019;176(Suppl 1):S21-S141.
- Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. Guide to receptors and channels (GRAC): 5th edn. *Br J Pharmacol.* 2011;164(Suppl 1):S1–S324.
- Allen MS. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *J Dairy Sci.* 1997;80(7):1447–62.
- 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):1098-1107.
- 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.
- Ash RW, Dobson A. The effect of absorption on the acidity of rumen contents. *J Physiol.* 1963;169:39–61.
- Azarani A, Orlowski J, Goltzman D. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide activate the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE-1 isoform in osteoblastic cells (UMR-106) via a cAMP-dependent pathway. *J Biol Chem.* 1995;270(39):23166–72.
- Bachmann O, Riederer B, Rossmann H, Groos S, Schultheis PJ, Shull GE, Gregor M, Manns MP, Seidler U. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 2 is the predominant NHE isoform in murine colonic crypts and its lack causes NHE3 upregulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;287(1):G125-33.
- Bailón E, Cueto-Sola M, Utrilla P, Rodríguez-Cabezas ME, Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Xaus J, Gálvez J, Comalada M. Butyrate in vitro immune-modulatory effects

might be mediated through a proliferation-related induction of apoptosis. *Immunobiology*. 2010;215(11):863–73.

Baldwin RL. The proliferative actions of insulin, insulin-like growth factor-I, epidermal growth factor, butyrate and propionate on ruminal epithelial cells in vitro. *Small Rumin Res*. 1999;32(3):261–8.

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

Benesch F, Dengler F, Masur F, Pfannkuche H, Gäbel G. Monocarboxylate transporters 1 and 4: Expression and regulation by PPAR $\alpha$  in ovine ruminal epithelial cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014;307(12):R1428-R1437.

Benos DJ. Amiloride: A molecular probe of sodium transport in tissues and cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1982;242(3):C131-C145.

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, 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.

Bond JJ, Donaldson AJ, Coumans JVF, Austin K, Ebert D, Wheeler D, Oddy VH. Protein profiles of enzymatically isolated rumen epithelium in sheep fed a fibrous diet. *J Anim Sci Biotechnol*. 2019;10:5.

Borthakur A, Priyamvada S, Kumar A, Natarajan AA, Gill RK, Alrefai WA, Dudeja PK. 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- $\kappa$ B pathway. *J Cell Biochem.* 2008;103(5):1452–63.

Britton R, Krehbiel C. Nutrient metabolism by gut tissues. *J Dairy Sci.* 1993;76(7):2125–31.

Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, Muir AI, Wigglesworth MJ, Kinghorn I, Fraser NJ, Pike NB, Strum JC, Steplewski KM, Murdock PR, Holder JC, Marshall FH, Szekeres PG, Wilson S, Ignar DM, Foord SM, Wise A, Dowell SJ. The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem.* 2003;278(13):11312–9.

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.

Cabado AG, Yu FH, Kapus A, Lukacs G, Grinstein S, Orlowski J. Distinct structural domains confer cAMP sensitivity and ATP dependence to the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3 isoform. *J Biol Chem.* 1996;271(7):3590–9.

Cao J, Ng M, Felmlee MA. Sex hormones regulate rat hepatic monocarboxylate transporter expression and membrane trafficking. *J Pharm Pharm Sci.* 2017;20(1):435–44.

Carretta MD, Conejeros I, Hidalgo MA, Burgos RA. Propionate induces the release of granules from bovine neutrophils. *J Dairy Sci.* 2013;96(4):2507–20.

Chao S-C, Wu G-J, Huang S-F, Dai N-T, Huang H-K, Chou M-F, Tsai Y-T, Lee S-P, Loh S-H. Functional and molecular mechanism of intracellular pH regulation in human inducible pluripotent stem cells. *World J Stem Cells.* 2018;10(12):196–211.

Chenal J, Pellerin L. Noradrenaline enhances the expression of the neuronal monocarboxylate transporter MCT2 by translational activation via stimulation of PI3K/Akt and the mTOR/S6K pathway. *J Neurochem.* 2007;102(2):389–97.

Chibisa GE, Beauchemin KA, Penner GB. Relative contribution of ruminal buffering systems to pH regulation in feedlot cattle fed either low- or high-forage diets. *Animal.* 2016;10(7):1164–72.

- Chibisa GE, Gorka P, Penner GB, Berthiaume R, Mutsvangwa T. Effects of partial replacement of dietary starch from barley or corn with lactose on ruminal function, short-chain fatty acid absorption, nitrogen utilization, and production performance of dairy cows. *J Dairy Sci.* 2015;98(4):2627–40.
- Chow C-W, Khurana S, Woodside M, Grinstein S, Orłowski J. The epithelial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, NHE3, is internalized through a clathrin-mediated pathway. *J Biol Chem.* 1999;274(53):37551–8.
- 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.
- Collazo R, Fan L, Hu MC, Zhao H, Wiederkehr MR, Moe OW. Acute regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3 by parathyroid hormone via NHE3 phosphorylation and dynamin-dependent endocytosis. *J Biol Chem.* 2000;275(41):31601–8.
- Dai H, Liu X, Yan J, Aabdin ZU, Bilal MS, Shen X. Sodium butyrate ameliorates high-concentrate diet-induced inflammation in the rumen epithelium of dairy goats. *J Agric Food Chem.* 2017;65(3):596–604.
- Dengler F, Rackwitz R, Benesch F, Pfannkuche H, Gäbel G. Bicarbonate-dependent transport of acetate and butyrate across the basolateral membrane of sheep rumen epithelium. *Acta Physiol (Oxf).* 2014;210(2):403–14.
- Dengler F, Rackwitz R, Benesch F, Pfannkuche H, Gäbel G. Both butyrate incubation and hypoxia upregulate genes involved in the ruminal transport of SCFA and their metabolites. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2015;99(2):379–90.
- Dessauer CW, Watts VJ, Ostrom RS, Conti M, Dove S, Seifert R. International union of basic and clinical pharmacology. Cl. Structures and small molecule modulators of mammalian adenylyl cyclases. *Pharmacol Rev.* 2017;69(2):93–139.
- Dias ALG, Freitas JA, Micaí B, Azevedo RA, Greco LF, Santos JEP. Effect of supplemental yeast culture and dietary starch content on rumen fermentation and digestion in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2018;101(1):201–21.
- Dijkstra J, Boer H, van Bruchem J, Bruining M, Tamminga S. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. *BJN.* 1993;69(02):385.

- Dirksen G, Liebich HG, Brosi G, Hagemeister H, Mayer E. Morphologie der Pansenschleimhaut und Fettsäureresorption beim Rind - bedeutende Faktoren für Gesundheit und Leistung. *Zentralbl Veterinarmed A*. 1984;31(6):414–30.
- Dubinsky WP, Racker E. The mechanism of lactate transport in human erythrocytes. *J Membr Biol*. 1978;44(1):25–36.
- Duffield T, Plaizier JC, Fairfield A, Bagg R, Vessie G, Dick P, Wilson J, Aramini J, McBride B. Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*. 2004;87(1):59–66.
- El Kebir D, Oliveira Lima Dos Santos E de, Mansouri S, Sekheri M, Filep JG. Mild acidosis delays neutrophil apoptosis via multiple signaling pathways and acts in concert with inflammatory mediators. *J Leukoc Biol*. 2017;102(6):1389–400.
- Etschmann B, Heipertz KS, Schulenburg A von der, Schweigel M. A vH<sup>+</sup>-ATPase is present in cultured sheep ruminal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;291(6):G1171-9.
- Etschmann B, Suplie A, Martens H. Change of ruminal sodium transport in sheep during dietary adaptation. *Arch Anim Nutr*. 2009;63(1):26–38.
- Friedrichs P, Sauerwein H, Huber K, Locher LF, Rehage J, Meyer U, Dänicke S, Kuhla B, Mielenz M. Expression of metabolic sensing receptors in adipose tissues of periparturient dairy cows with differing extent of negative energy balance. *Animal*. 2016;10(4):623–32.
- Gäbel G, Aschenbach JR, Müller F. Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: Implications and limitations. *Anim Health Res Rev*. 2002;3(01):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 Veterinarmed A*. 1991a;38:523–9.
- Gäbel G, Butter H, Martens H. Regulatory role of cAMP in transport of Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> and short-chain fatty acids across sheep ruminal epithelium. *Exp Physiol*. 1999;84:333–45.

- Gäbel G, Gálfi P, Neogrády S, Martens H. Characterization of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in sheep rumen epithelial cells kept in primary culture. *Zentralbl Veterinarmed A*. 1996;43(1-10):365–75.
- Gäbel G, Marek M, Martens H. Influence of food deprivation on SCFA and electrolyte transport across sheep reticulorumen. *Zentralbl Veterinarmed A*. 1993;40(5):339–44.
- Gäbel G, Martens H, Sündermann M, Gálfi P. The effect of diet, intraruminal pH and osmolarity on sodium, chloride and magnesium absorption from the temporarily isolated and washed reticulo-rumen of sheep. *Q J Exp Physiol*. 1987;72:501–11.
- 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, 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*. 1991b;161(4):419–26.
- Gálfi P, Neogrády S, Gäbel G. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in primary, secondary and n-butyrate-treated cultures of ruminal epithelial cells: short communication. *Acta Vet Hung*. 2002;50(2):211–5.
- Ganapathy V, Thangaraju M, Prasad PD, Martin PM, Singh N. Transporters and receptors for short-chain fatty acids as the molecular link between colonic bacteria and the host. *Curr Opin Pharmacol*. 2013;13(6):869–74.
- Georgi MI, Rosendahl J, Ernst F, Günzel D, Aschenbach JR, Martens H, Stumpff F. Epithelia of the ovine and bovine forestomach express basolateral maxi-anion channels permeable to the anions of short-chain fatty acids. *Pflugers Arch*. 2014;466:1689–712.
- Giger-Reverdin S, Rigalma K, Desnoyers M, Sauvant D, Duvaux-Ponter C. Effect of concentrate level on feeding behavior and rumen and blood parameters in dairy goats: relationships between behavioral and physiological parameters and effect of between-animal variability. *J Dairy Sci*. 2014;97(7):4367–78.
- Gille A, Bodor ET, Ahmed K, Offermanns S. Nicotinic acid: Pharmacological effects and mechanisms of action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:79–106.

- Gomes P, Soares-da-Silva P. Dopamine acutely decreases type 3 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activity in renal OK cells through the activation of protein kinases A and C signalling cascades. *Eur J Pharmacol.* 2004;488(1-3):51–9.
- Gorka P, Kowalski ZM, Pietrzak P, Kotunia, A., Kiljanczyk, R., Flaga J, Holst JJ, Guilloteau P, Zabielski R. Effect of sodium butyrate supplementation in milk replacer and starter diet on rumen development in calves. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60(3):47–53.
- Graham C, Gatherar 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.
- Guilloteau P, Martin L, Eeckhaut V, Ducatelle R, Zabielski R, van Immerseel F. From the gut to the peripheral tissues: The multiple effects of butyrate. *Nutr Res Rev.* 2010;23(2):366–84.
- Hackmann TJ, Spain JN. Invited review: Ruminant ecology and evolution: Perspectives useful to ruminant livestock research and production. *J Dairy Sci.* 2010;93(4):1320–34.
- Halestrap AP. The monocarboxylate transporter family - structure and functional characterization. *IUBMB Life.* 2012;64(1):1–9.
- Halestrap AP. The SLC16 gene family - structure, role and regulation in health and disease. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2-3):337–49.
- Halestrap AP, Meredith D. The SLC16 gene family - from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers 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(2):281–99.
- Hansen AH, Sergeev E, Bolognini D, Sprenger RR, Ekberg JH, Ejsing CS, McKenzie CJ, Rexen Ulven E, Milligan G, Ulven T. Discovery of a potent thiazolidine free

fatty acid receptor 2 agonist with favorable pharmacokinetic properties. *J Med Chem.* 2018;61(21):9534–50.

Hara T, Kashihara D, Ichimura A, Kimura I, Tsujimoto G, Hirasawa A. Role of free fatty acid receptors in the regulation of energy metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1841(9):1292–300.

Harmon DL, Gross KL, Krehbiel CR, Kreikemeier KK, Bauer ML, Britton RA. Influence of dietary forage and energy intake on metabolism and acyl-CoA synthetase activity in bovine ruminal epithelial tissue. *J Anim Sci.* 1991;69(10):4117–27.

Hashimoto T, Hussien R, Oommen S, Gohil K, Brooks GA. Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: Activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *FASEB J.* 2007;21(10):2602–12.

Hirasawa A, Hara T, Katsuma S, Adachi T, Tsujimoto G. Free fatty acid receptors and drug discovery. *Biol Pharm Bull.* 2008;31(10):1847–51.

Hofmann RR. Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: A comparative view of their digestive system. *Oecologia.* 1989;78(4):443–57.

Hosoi R, Matsuyama Y, Hirose S, Koyama Y, Matsuda T, Gee A, Inoue O. Characterization of <sup>14</sup>C-acetate uptake in cultured rat astrocytes. *Brain Res.* 2009;1253:69–73.

Hudson BD, Christiansen E, Tikhonova IG, Grundmann M, Kostenis E, Adams DR, Ulven T, Milligan G. Chemically engineering ligand selectivity at the free fatty acid receptor 2 based on pharmacological variation between species orthologs. *FASEB J.* 2012;26(12):4951–65.

Huhn K, Müller F, Honscha KU, Pfannkuche H, Gäbel G. Molecular and functional evidence for a Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-cotransporter in sheep ruminal epithelium. *J Comp Physiol B.* 2003;173(4):277–84.

Jacob P, Christiani S, Rossmann H, Lamprecht G, Vieillard-Baron D, Müller R, Gregor M, Seidler U. Role of Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-cotransporter NBC1, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1, and carbonic anhydrase in rabbit duodenal bicarbonate secretion. *Gastroenterology.* 2000;119(2):406–19.

- Kaji I, Karaki S, Kuwahara A. Short-chain fatty acid receptor and its contribution to glucagon-like peptide-1 release. *Digestion*. 2014;89(1):31–6.
- Kandasamy RA, Yu FH, Harris R, Boucher A, Hanrahan JW, Orłowski J. Plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms (NHE-1, -2, and -3) are differentially responsive to second messenger agonists of the protein kinase A and C pathways. *J Biol Chem*. 1995;270(49):29209–16.
- Karaki S, Tazoe H, Hayashi H, Kashiwabara H, Tooyama K, Suzuki Y, Kuwahara A. Expression of the short-chain fatty acid receptor, GPR43, in the human colon. *J Mol Histol*. 2008;39(2):135–42.
- Kasubuchi M, Hasegawa S, Hiramatsu T, Ichimura A, Kimura I. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients*. 2015;7(4):2839–49.
- Kauffold P, Voigt J, Piatkowski B. Untersuchungen über den Einfluss von Ernährungsfaktoren auf die Pansenschleimhaut. 1. Mitteilung Strukturen und Funktionen nach Fütterung extremer Rationen und plötzlichen Futterwechsel. *Arch Tierernahr*. 1975;25(4):247–56.
- Kenéz A, Locher L, Rehage J, Dänicke S, Huber K. Agonists of the G protein-coupled receptor 109A-mediated pathway promote antilipolysis by reducing serine residue 563 phosphorylation of hormone-sensitive lipase in bovine adipose tissue explants. *J Dairy Sci*. 2014;97(6):3626–34.
- Kim MH, Kang SG, Park JH, Yanagisawa M, Kim CH. Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology*. 2013;145(2):396–406.
- Kim Garcia C, Goldstein JL, Pathak RK, Anderson RGW, Brown MS. Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: Implications for the cori cycle. *Cell*. 1994;76:865–73.
- Kirat D, Inoue H, Iwano H, Hirayama K, Yokota H, Taniyama H, Kato S. Monocarboxylate transporter 1 gene expression in the ovine gastrointestinal tract. *Vet J*. 2006a;171(3):462–7.
- Kirat D, Kato S. Monocarboxylate transporter genes in the mammary gland of lactating cows. *Histochem Cell Biol*. 2009;132(4):447–55.

- Kirat D, Kondo K, Shimada R, Kato S. Dietary pectin up-regulates monocarboxylate transporter 1 in the rat gastrointestinal tract. *Exp Physiol*. 2009;94(4):422–33.
- Kirat D, Masuoka J, Hayashi H, Iwano H, Yokota H, Taniyama H, Kato S. Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) plays a direct role in short-chain fatty acids absorption in caprine rumen. *J Physiol*. 2006b;576(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;391:140–9.
- 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.
- Kitano Y, Okada N. Separation of the epidermal sheet by dispase. *Br J Dermatol*. 1983;108(5):555–60.
- Klevenhusen F, Hollmann M, Podstatzky-Lichtenstein L, Krametter-Frötscher R, Aschenbach JR, Zebeli Q. Feeding barley grain-rich diets altered electrophysiological properties and permeability of the ruminal wall in a goat model. *J Dairy Sci*. 2013;96(4):2293–302.
- König B, Koch A, Giggel K, Dordschbal B, Eder K, Stangl GI. Monocarboxylate transporter (MCT)-1 is up-regulated by PPAR $\alpha$ . *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780(6):899–904.
- Kopp C, Hosseini A, Singh SP, Regenhard P, Khalilvandi-Behroozyar H, Sauerwein H, Mielenz M. Nicotinic acid increases adiponectin secretion from differentiated bovine preadipocytes through G-protein coupled receptor signaling. *Int J Mol Sci*. 2014;15(11):21401–18.
- 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.
- Krishnan S, Rajendran VM, Binder HJ. Apical NHE isoforms differentially regulate butyrate-stimulated Na<sup>+</sup> absorption in rat distal colon. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;285(5):C1246-C1254.

- Kristensen NB, Gäbel G, Pierzynowski SG, Danfaer A. Portal recovery of short-chain fatty acids infused into the temporarily-isolated and washed reticulo-rumen of sheep. *Br J Nutr.* 2000a;84:477–82.
- Kristensen NB, Harmon DL. Effect of increasing ruminal butyrate absorption on splanchnic metabolism of volatile fatty acids absorbed from the washed reticulorumen of steers. *J Anim Sci.* 2004a;82(12):3549–59.
- Kristensen NB, Harmon DL. Splanchnic metabolism of volatile fatty acids absorbed from the washed reticulorumen of steers. *J Anim Sci.* 2004b;82(7):2033–42.
- Kristensen NB, Pierzynowski SG, Danfaer A. Net portal appearance of volatile fatty acids in sheep intraruminally infused with mixtures of acetate, propionate, isobutyrate, butyrate, and valerate. *J Anim Sci.* 2000b;78(5):1372–9.
- Laarman AH, Ruiz-Sanchez AL, Sugino T, Guan LL, Oba M. Effects of feeding a calf starter on molecular adaptations in the ruminal epithelium and liver of Holstein dairy calves. *J Dairy Sci.* 2012;95(5):2585–94.
- Lane MA, Baldwin RL, Jesse BW. Developmental changes in ketogenic enzyme gene expression during sheep rumen development. *J Anim Sci.* 2002;80(6):1538–44.
- Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael J-Y, Lannoy V, Decobecq M-E, Brezillon S, Dupriez V, Vassart G, van Damme J, Parmentier M, Detheux M. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem.* 2003;278(28):25481–9.
- Leighton B, Nicholas AR, Pogson CI. The pathway of ketogenesis in rumen epithelium of the sheep. *Biochem J.* 1983;216(3):769–72.
- Lemor A, Mielenz M, Altmann M, Borell E von, Sauerwein H. mRNA abundance of adiponectin and its receptors, leptin and visfatin and of G-protein coupled receptor 41 in five different fat depots from sheep. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2010;94(5):e96-101.
- Leo A, Hansch C, Elkins D. Partition coefficients and their uses. *Chem Rev.* 1971;71(6):525–616.

- Liebich HG, Dirksen G, Arbel A, Dori S, Mayer E. Fütterungsabhängige Veränderungen der Pansenschleimhaut von Hochleistungskühen im Zeitraum von der Trockenstellung bis acht Wochen post partum. *Zentralbl Veterinarmed A*. 1987;34(9):661–72.
- Liu L, Sun D, Mao S, Zhu W, Liu J. Infusion of sodium butyrate promotes rumen papillae growth and enhances expression of genes related to rumen epithelial VFA uptake and metabolism in neonatal twin lambs. *J Anim Sci*. 2019;97(2):909–21.
- Lu Z, Gui H, Yao L, Yan L, Martens H, Aschenbach JR, Shen Z. Short-chain fatty acids and acidic pH up-regulate UT-B, GPR41, and GPR4 in rumen epithelial cells of goats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015;308:R283-R293.
- Lu Z, Yao L, Jiang Z, Aschenbach JR, Martens H, Shen Z. Acidic pH and short-chain fatty acids activate Na<sup>+</sup> transport but differentially modulate expression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms 1, 2, and 3 in omasal epithelium. *J Dairy Sci*. 2016;99(1):733–45.
- Maher MM, Gontarek JD, Jimenez RE, Donowitz M, Yeo CJ. Role of brush border Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in canine ileal absorption. *Dig Dis Sci*. 1996;41(4):651–9.
- 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.
- Martens H, Gäbel G. Transport of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> across the epithelium of ruminant forestomachs: Rumen and omasum. A review. *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 1988;90(4):569–75.
- Martens H, Gäbel G, Strozyk B. Mechanism of electrically silent Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> transport across the rumen epithelium of sheep. *Exp Physiol*. 1991;76(1):103–14.
- Mentschel J, Leiser R, Mülling C, Pfarrer C, Claus R. Butyric acid stimulates rumen mucosa development in the calf mainly by a reduction of apoptosis. *Arch Tierernahr*. 2001;55(2):85–102.
- Miyamoto J, Hasegawa S, Kasubuchi M, Ichimura A, Nakajima A, Kimura I. Nutritional signaling via free fatty acid receptors. *Int J Mol Sci*. 2016;17(4):450.

- 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.
- Musch MW, Arvans DL, Paris H, Chang EB. α<sub>2</sub>-adrenergic receptors attenuate secretagogue-induced endocytosis and promote exocytosis of intestinal NHE2 and NHE3. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;330(3):818–25.
- Nagaraja TG. Microbiology of the rumen. In: Millen DD, Beni Arrigoni M de, Lauritano Pacheco RD, Hrsg. *Rumenology*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 39–61.
- Narumi K, Furugen A, Kobayashi M, Otake S, Itagaki S, Iseki K. Regulation of monocarboxylate transporter 1 in skeletal muscle cells by intracellular signaling pathways. *Biol Pharm Bull*. 2010;33(9):1568–73.
- Neogrády S, Gálfi P, Kutas F, Sakata T. The effects of butyrate and glucagon on the proliferation of ruminal epithelial cells in culture. *Vet Res Commun*. 1989;13(1):27–9.
- Nikkhah A. Eating time modulations of physiology and health: Life lessons from human and ruminant models. *Iran J Basic Med Sci*. 2012;15(4):891–9.
- Noel J, Pouyssegur J. Hormonal regulation, pharmacology, and membrane sorting of vertebrate Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1995;37:283–96.
- Nozière P, Glasser F, Sauvant D. In vivo production and molar percentages of volatile fatty acids in the rumen: A quantitative review by an empirical approach. *Animal*. 2011;5(3):403–14.
- Nozière P, Martin C, Rémond 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.

- Nozière P, Ortigues-Marty I, Loncke C, Sauvant D. Carbohydrate quantitative digestion and absorption in ruminants: From feed starch and fibre to nutrients available for tissues. *Animal*. 2010;4(7):1057–74.
- Orlowski J, Kandasamy RA, Shull GE. Molecular cloning of putative members of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. *J Biol Chem*. 1992;267(13):9331–9.
- Pedrosa R, Gomes P, Hopfer U, Jose PA, Soares-da-Silva P. G<sub>i</sub>α3 protein-coupled dopamine D3 receptor-mediated inhibition of renal NHE3 activity in SHR proximal tubular cells is a PLC-PKC-mediated event. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;287(5):F1059-66.
- Penner GB. Mechanisms of volatile fatty acid absorption and metabolism and maintenance of a stable rumen environment. Proceedings of the 25th Florida Ruminant Nutrition Symposium; 04.02.2014. Gainesville, USA; 2014. p. 92–107.
- 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. 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.
- Plaizier JC, Krause DO, Gozho GN, McBride BW. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *Vet J*. 2008;176(1):21–31.
- Plöger S, Stumpff F, Penner GB, Schulzke J-D, Gäbel G, Martens H, Shen Z, Günzel D, Aschenbach JR. Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1258:52–9.

- Poole RC, Halestrap AP. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1993;264(4):C761-82.
- Prasad KN, Sinha PK. Effect of sodium butyrate on mammalian cells in culture: A review. *In Vitro.* 1976;12(2):125–32.
- Priyadarshini M, Kotlo KU, Dudeja PK, Layden BT. Role of short chain fatty acid receptors in intestinal physiology and pathophysiology. *Compr Physiol.* 2018;8(3):1091–115.
- Rabbani I, Siegling-Vlitakis C, Noci B, Martens H. Evidence for NHE3-mediated Na<sup>+</sup> transport in sheep and bovine forestomach. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;301(2):R313-R319.
- Rackwitz R. Elektrogene Mechanismen der Permeation kurzkettiger Fettsäuren über das Pansenepithel [Dissertation rer. nat]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2012.
- Rackwitz R, Bilk S, Schmidt-Mähne A, Dengler F, Gäbel G. Transport kurzkettiger Fettsäuren (SCFA) über das Pansenepithel durch den natriumgekoppelten Monocarboxylattransporter 1 (SMCT1). Proceedings of the Society of Nutrition Physiology. 66. Jahrestagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie; 20.-22.03.2012. Göttingen, Deutschland. Frankfurt am Main: DLG-Verlag; 2012. p. 54.
- Rackwitz R, Gäbel G. Permeation of acetate across sheep ruminal epithelium is partly mediated by an anion channel. *Res Vet Sci.* 2018;117:10–7.
- Rahman N, Buck J, Levin LR. pH sensing via bicarbonate-regulated "soluble" adenylyl cyclase (sAC). *Front Physiol.* 2013;4(343):1–5.
- Ran T, Liu Y, Jiao JZ, Zhou CS, Tang SX, Wang M, He ZX, Tan ZL, Yang WZ, Beauchemin KA. Postnatal differential expression of chemoreceptors of free fatty acids along the gastrointestinal tract of supplemental feeding v. grazing kid goats. *Animal.* 2019;13(3):509–17.
- 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. p. 95–116.

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.

Ritzhaupt A, Ellis A, Hosie KB, Shirazi-Beechey SP. The characterization of butyrate transport across pig and human colonic luminal membrane. *J Physiol.* 1998;507(3):819–30.

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

Sander EG, Warner RG, Harrison HN, Loosli JK. The stimulatory effect of sodium butyrate and sodium propionate on the development of rumen mucosa in the young calf. *J Dairy Sci.* 1959;42(9):1600–5.

Schurmann BL, Walpole ME, Górká P, Ching JCH, Loewen ME, Penner GB. Short-term adaptation of the ruminal epithelium involves abrupt changes in sodium and short-chain fatty acid transport. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2014;307(7):R802-16.

Schwark JR, Jansen HW, Lang HJ, Krick W, Burckhardt G, Hropot M. S3226, a novel inhibitor of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger subtype 3 in various cell types. *Pflugers Arch.* 1998;436(5):797–800.

Schweigel M, Freyer M, Leclercq S, Etschmann B, Lodemann U, Böttcher A, Martens H. Luminal hyperosmolarity decreases Na<sup>+</sup> transport and impairs barrier function of sheep rumen epithelium. *J Comp Physiol B.* 2005;175(8):575–91.

Schweigel M, Vormann J, Martens H. Mechanisms of Mg<sup>2+</sup> transport in cultured ruminal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;278:G400-G408.

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

- Sehested J, Diernaes L, Møller PD, Skadhauge E. Transport of sodium across the isolated bovine rumen epithelium: Interaction with short-chain fatty acids, chloride and bicarbonate. *Exp Physiol.* 1996;81(1):79–94.
- 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 Part A Mol Integr Physiol.* 1999b;123(4):399–408.
- Shen Z, Martens H, Schweigel-Röntgen M. Na<sup>+</sup> transport across rumen epithelium of hay-fed sheep is acutely stimulated by the peptide IGF-1 in vitro. *Exp Physiol.* 2012;97(4):497–505.
- Sinet M, Muffat-Joly M, Bendaace T, Pocidal JJ. Maintaining blood pH at 7.4 during hypothermia has no significant effect on work of the isolated rat heart. *Anesthesiology.* 1985;62(5):582–7.
- Smith JP, Drewes LR. Modulation of monocarboxylic acid transporter-1 kinetic function by the cAMP signaling pathway in rat brain endothelial cells. *J Biol Chem.* 2006;281(4):2053–60.
- Smith JP, Uhernik AL, Li L, Liu Z, Drewes LR. Regulation of MCT1 by cAMP-dependent internalization in rat brain endothelial cells. *Brain Res.* 2012;1480:1–11.
- Steele MA, Croom J, Kahler M, AlZahal O, Hook SE, Plaizier K, McBride BW. Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptations during grain-induced subacute ruminal acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;300(6):R1515-23.
- Stilling RM, van de Wouw M, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? *Neurochem Int.* 2016;99:110–32.
- Stumpff F. A look at the smelly side of physiology: Transport of short chain fatty acids. *Pflugers Arch.* 2018;470(4):571–98.

- Stumpff F, Georgi M-I, Mundhenk L, Rabbani I, Fromm M, Martens H, Günzel D. Sheep rumen and omasum primary cultures and source epithelia: Barrier function aligns with expression of tight junction proteins. *J Exp Biol.* 2011;214(Pt 17):2871–82.
- 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. *Pflugers Arch.* 2009;457(5):1003–22.
- Suárez BJ, van Reenen CG, Stockhofe N, Dijkstra J, Gerrits WJJ. Effect of roughage source and roughage to concentrate ratio on animal performance and rumen development in veal calves. *J Dairy Sci.* 2007;90(5):2390–403.
- Subramanya SB, Rajendran VM, Srinivasan P, Nanda Kumar NS, Ramakrishna BS, Binder HJ. Differential regulation of cholera toxin-inhibited Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange isoforms by butyrate in rat ileum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293(4):G857-63.
- Taggart AKP, Kero J, Gan X, Cai T-Q, Cheng K, Ippolito M, Ren N, Kaplan R, Wu K, Wu T-J, Jin L, Liaw C, Chen R, Richman J, Connolly D, Offermanns S, Wright SD, Waters MG. (D)- $\beta$ -Hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G. *J Biol Chem.* 2005;280(29):26649–52.
- Thangaraju M, Cresci GA, Liu K, Ananth S, Gnanaprakasam JP, Browning DD, Mellinger JD, Smith SB, Digby GJ, Lambert NA, Prasad PD, Ganapathy V. GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon. *Cancer Res.* 2009;69(7):2826–32.
- Titgemeyer EC, Mamedova LK, Spivey KS, Farney JK, Bradford BJ. An unusual distribution of the niacin receptor in cattle. *J Dairy Sci.* 2011;94(10):4962–7.
- Tolhurst G, Heffron H, Lam YS, Parker HE, Habib AM, Diakogiannaki E, Cameron J, Grosse J, Reimann F, Gribble FM. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes.* 2012;61(2):364–71.
- Tunaru S, Kero J, Schaub A, Wufka C, Blaukat A, Pfeffer K, Offermanns S. PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. *Nat Med.* 2003;9(3):352–5.

- Uhernik AL, Li L, LaVoy N, Velasquez MJ, Smith JP. Regulation of monocarboxylic acid transporter-1 by cAMP dependent vesicular trafficking in brain microvascular endothelial cells. *PLoS One*. 2014;9(1):1-11.
- Ulven T. Short-chain free fatty acid receptors FFA2/GPR43 and FFA3/GPR41 as new potential therapeutic targets. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3(111):1–9.
- van Lingen HJ, Edwards JE, Vaidya JD, van Gastelen S, Saccenti E, van den Bogert B, Bannink A, Smidt H, Plugge CM, Dijkstra J. Diurnal dynamics of gaseous and dissolved metabolites and microbiota composition in the bovine rumen. *Front Microbiol*. 2017;8(425):1–15.
- von Engelhardt W, Breves G, Diener M, Gäbel G. *Physiologie der Haustiere*. 5. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2015.
- Walter A, Gutknecht J. Permeability of small nonelectrolytes through lipid bilayer membranes. *J Membr Biol*. 1986;90(3):207–17.
- Wang A, Akers RM, Jiang H. Short communication: Presence of G protein-coupled receptor 43 in rumen epithelium but not in the islets of Langerhans in cattle. *J Dairy Sci*. 2012a;95(3):1371–5.
- Wang A, Gu Z, Heid B, Akers RM, Jiang H. Identification and characterization of the bovine G protein-coupled receptor GPR41 and GPR43 genes. *J Dairy Sci*. 2009;92(6):2696–705.
- Wang A, Si H, Liu D, Jiang H. Butyrate activates the cAMP-protein kinase A-cAMP response element-binding protein signaling pathway in Caco-2 cells. *J Nutr*. 2012b;142(1):1–6.
- Weatherburn DH. Role of short chain fatty acid receptors in the gastrointestinal tract and their potential involvement in appetite control [Dissertation PhD]. Liverpool: Univ. Liverpool; 2015.
- Weigand E, Young JW, McGilliard AD. Volatile fatty acid metabolism by rumen mucosa from cattle fed hay or grain. *J Dairy Sci*. 1975;58(9):1294–300.
- Wilson MC, Meredith D, Fox JEM, Manoharan C, Davies AJ, Halestrap AP. Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate

- transporter isoforms 1 and 4: The ancillary protein for the insensitive MCT2 is EMBIGIN (gp70). *J Biol Chem.* 2005;280(29):27213–21.
- Won Y-J, van Lu B, Puhl HL, Ikeda SR.  $\beta$ -Hydroxybutyrate modulates N-type calcium channels in rat sympathetic neurons by acting as an agonist for the G-protein-coupled receptor FFA3. *J Neurosci.* 2013;33(49):19314–25.
- Yan L, Zhang B, Shen Z. Dietary modulation of the expression of genes involved in short-chain fatty acid absorption in the rumen epithelium is related to short-chain fatty acid concentration and pH in the rumen of goats. *J Dairy Sci.* 2014;97(9):5668–75.
- Yang W, Shen Z, Martens H. An energy-rich diet enhances expression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 and 3 messenger RNA in rumen epithelium of goat. *J Anim Sci.* 2012;90(1):307–17.
- Yonezawa T, Haga S, Kobayashi Y, Kato K, Obara Y. Short-chain fatty acid signaling pathways in bovine mammary epithelial cells. *Regul Pept.* 2009;153(1-3):30–6.
- Yonezawa T, Kurata R, Yoshida K, Murayama M, Cui X, Hasegawa A. Free fatty acids-sensing G protein-coupled receptors in drug targeting and therapeutics. *Curr Med Chem.* 2013;20(31):3855–71.
- Zebeli Q, Tafaj M, Weber I, Steingass H, Drochner W. Effects of dietary forage particle size and concentrate level on fermentation profile, in vitro degradation characteristics and concentration of liquid- or solid-associated bacterial mass in the rumen of dairy cows. *Anim Feed Sci Technol.* 2008;140(3-4):307–25.
- Zhan K, Gong X, Chen Y, Jiang M, Yang T, Zhao G. Short-chain fatty acids regulate the immune responses via G protein-coupled receptor 41 in bovine rumen epithelial cells. *Front Immunol.* 2019;10:2042.
- Zhang S, Albornoz RI, Aschenbach JR, Barreda DR, Penner GB. Short-term feed restriction impairs the absorptive function of the reticulo-rumen and total tract barrier function in beef cattle. *J Anim Sci.* 2013;91(4):1685–95.
- Zhao H, Wiederkehr MR, Fan L, Collazo RL, Crowder LA, Moe OW. Acute inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE-3 by cAMP: Role of protein kinase a and NHE-3 phosphoserines 552 and 605. *J Biol Chem.* 1999;274(7):3978–87.



## 8 Anhang

### 8.1 Im Rahmen dieser Dissertation gehaltene Präsentationen

- 03/2016 Postervorstellung *'Effects of short chain fatty acids on cAMP level as indicator of G-Protein activity in sheep ruminal epithelium'*  
70. Jahrestreffen der Deutschen Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (Hannover)
- 04/2016 Postervorstellung *'Free fatty acid receptors as potential targets for nutrient dependent modulation of intracellular pathways in ovine ruminal epithelium'*  
Tagung der DVG Fachgruppe Physiologie und Biochemie (Berlin)
- 08/2016 Vortrag *'Einfluss kurzkettiger Fettsäuren auf Rezeptor-vermittelte Signalwege im ovinen Pansenepithel'*  
Jährliches Treffen der Arbeitsgruppen Physiologie und Biochemie der VMF Leipzig und der TiHo Hannover (Leipzig)
- 09/2016 Postervorstellung *'Free fatty acid receptors as potential targets for nutrient dependent modulation of intracellular pathways in ovine ruminal epithelium'*  
5. Symposium der Jungen Physiologen (Jülich)
- 01/2017 Vortrag *'Fettsäurerezeptoren im ovinen Pansenepithel'*  
Interdisziplinäres Kolloquium des Zentrums für Grundlagenwissenschaften der VMF Leipzig (Leipzig)
- 02/2017 Vortrag *'Modulation intrazellulärer Signalwege im ovinen Pansenepithel durch Aktivierung inhibitorischer G-Proteine mithilfe von kurzkettigen Fettsäuren'*  
5. Leipziger Doktorandenforum (Leipzig)
- 03/2017 Posterpräsentation *'Modulation of cyclic adenosine monophosphate in sheep ruminal epithelium by short chain fatty acids and G-protein coupled receptor agonists'*  
71. Jahrestreffen der Deutschen Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (Göttingen)
- 02/2018 Vortrag *'Butyrat – Regulator intrazellulärer Signalwege im Schafpansen?'*  
Tagung der DVG Fachgruppe Biochemie und Physiologie (Wien)

- 03/2019 Vortrag '*Regulation of free fatty acid transporters in ovine rumen*'  
7. Symposium der Jungen Physiologen (Nürnberg)
- 09/2019 Vortrag '*Role of fatty acid receptors in the regulation of transporters for short chain fatty acids and pH homeostasis in sheep rumen*'  
13. Internationales Symposium der Wiederkäuer-Physiologie (Leipzig)

## Danksagung

Allen voran möchte ich **Prof. Dr. Gotthold Gäbel** danken, für die Möglichkeit mein Thema aus verschiedenen Bereichen wählen zu können. So hat er mich mit seiner Leidenschaft für den Vormagen begeistert und ich habe es nicht bereut. Außerdem ist er ein großes Vorbild, das beweist, dass man sich auch bis zum Renteneintritt trotz langsam mahlender Mühlen immer noch einen grenzenlosen Optimismus bewahren kann. Vielen Dank für Ihr Vertrauen trotz aller Rechenfehler. Und lieben Dank für Ihre stetige Erinnerung daran.

Der **Deutschen Forschungsgemeinschaft** danke ich für die Finanzierung des Projektes Ga 329/8.

Ein besonderer Dank gilt sämtlichen Kolleg\*innen im Institut. Allen voran **Reiko**, der seit Beginn meiner ersten Schritte in der Physio alle Fragen (egal welcher Qualität) zu Gott, der Ussing-Kammer und sonstigen Doktorandenproblemen immer humorvoll und engelsgleich beantwortet hat und dessen Tür im Wohnhaus in den heißen Sommern nicht nur sprichwörtlich immer offen stand – Großraumbüro mit Rückzugsmöglichkeit. Danke!

Mein Dank gilt **Helga** für die fachliche und zwischenmenschliche Hilfe in jeder Lage. Und für das Zurechtrücken des eigenen Erscheinungsbildes als rüstige Doktorandin. Vielleicht hab' ich deshalb ja ein klein wenig schneller geschrieben, um nicht als Greisin abzugeben.

**Prof. Dr. Cermak** danke ich für all die Infos rund um die Promotion, aber auch alle fachlichen Hinweise zu den verschiedenen Untersuchungen. Und nicht zuletzt für die mittelfristige Absicherung meiner wissenschaftlichen Zukunft. Dankeschön.

Mein Dank gebührt **Franzi D.**, die mich in die Physio gelockt und mich in die Mysterien der Ussing-Kammer eingeweiht hat. Fachliche Fragen und Ideen haben hier stets neuen Input gekriegt. Vielen Dank dafür.

Lieben Dank an die Labormädels, ohne euch wären die längsten Tage nie zu Ende gegangen. Liebe **Petra**, danke, dass du gaaanz früh morgens immer schon pfeifend gute Laune in den heiligen Hallen verbreitet und mich die Kunst der luftigen Tütenentfaltung gelehrt hast. Ganz besonderer Dank auch für deine Unterstützung bei unserer durchgeplanten Hannover-Woche. Ohne dich wäre das alles in die Hose gegangen und ich hätte ratlos inmitten des radioaktiven Abfalls gestanden. Liebe **Ines**, vielen Dank für die schönen Stunden in der Zellkultur und Moli. Ich habe viel gelacht und viel gelernt. Liebe **Anke**, ein großes Dankeschön für deine Hilfe an allen Ecken

und Enden. Du bist wirklich immer für uns da und hast sowieso schon alles vorbereitet, was man eventuell braucht.

Besonders dankbar bin ich für die tolle Büro-Gesellschaft der letzten Jahre. **Franzi** und **Basti**, die mich anfangs unter ihre Doktorandenfittiche genommen haben. **Tine**, **Anika**, **Luise** und **Steffi**, die nicht nur Kolleginnen, sondern auch Freundinnen sind und die gemeinsamen Durststrecken und verzweifelten Zeiten im Labor und am PC leichter gemacht haben. Und das strenge Anglizismen-Verbot, das für reichlichen Teenachschub sorgte.

**Jana**, die immer und überall auf alles und jedes vorbereitet ist, hat mir dadurch schon in vielen Lagen aus der Klemme geholfen. Ein großer Dank an die heimliche Finanzministerin der Physio, die mich immer mit guter Laune, Tee, kühlenden Salben, notwendigen Formularen und jeder Menge Tipps versorgt hat.

Schließlich auch ein Dank an die Jungs im Keller: **Carsten** danke ich, dass er nicht nur die alten Opis mit liebevoller Fürsorge, sondern auch alle Versuchsschafe mit Hingabe umsorgt. Und für die schön laute Mist-Musik und Gänge über den Campus mit viel schallendem Gelächter. **Ralf** half immer und hatte viele Ideen, wie man das ein oder andere Laborproblem mit Hammer und Stanze unterstützen könnte. **Martin** wurde nicht müde, DoBra-Tickets und entnervte Mails zu schreiben. Auch wenn diese Zeilen leider immer noch nicht auf dem langersehnten Laptop entstanden - lieben Dank für eure Unterstützung.

Ohne den Back-Up aus dem persönlichen Umfeld klappt natürlich alles nicht. Ich möchte meiner **Familie**, insbesondere **meinen Eltern**, danken, dass ihr mich immer unterstützt habt und mir das Gefühl vermittelt habt, dass ich alles aus meinem Leben machen kann, was ich möchte. Ohne die **vielen tollen Freunde** in meinem Leben wäre meine Zeit in Leipzig aber dennoch ein Trauerspiel geworden – auf viele weitere Leipzig-isst-Abende und viele Paddeltouren in Brandenburg. Ein Extra-Dankeschön geht noch an **Janine** für das spontane, schnelle und doch so gründliche Gegenlesen und alle Orga-Tipps so kurz vor knapp.

Last but not least möchte ich meinem wunderbaren Freund und Vater unseres Lachsacks danken. **Stefan**, Du gibst mir den Freiraum auszufliegen, wenn die Hummeln im Hintern Überhand nehmen, und die Geborgenheit, jederzeit wieder wohlbehütet anzukommen. Danke, dass du mich so wunderbar ergänzt und immer wieder geraderückst, wenn die Prioritäten ein bisschen auf die schiefe Ebene geraten. **Ole** danke ich für jeden einzelnen Moment, in dem du mich lehrst, dass das Leben unglaublich kostbar ist und es weitaus wichtigere Dinge als die (Doktor-)Arbeit gibt.