

3 ERGEBNISSE

Untersuchungen, die den morphologischen Adaptationsprozess des Pansenepithels von Wiederkäuern in Abhängigkeit vom Fütterungsregime beschreiben, liegen in erheblicher Anzahl vor. Es ist jedoch bislang unbekannt, ob die funktionelle Adaptation des Pansenepithels zeitgleich mit der morphologischen Adaptation stattfindet. Gemäß einer Veröffentlichung von DIRKSEN et al. (1984) gilt der Adaptationsprozess bei Kühen auf morphologischer Ebene nach etwa 6 Wochen als abgeschlossen (Dirksen et al., 1984). Um funktionelle Anpassungsprozesse zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Futterumstellung erfassen zu können, wurde Pansenepithel, unterschiedlich lang mit konzentratreichem Futtermittel gefütterter Schafe, in Ussing-Kammer-Experimenten untersucht (siehe 3.1). Hierbei wurde unter anderem festgestellt, daß die Natriumtransportraten konzentratreich gefütterter Tiere bereits nach Ablauf einer Woche einen Anstieg um etwa 75% gegenüber den Transportraten heugefütterter Tiere aufweisen. Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, wie es zur frühen funktionellen Adaptation kommt, bevor eine Oberflächenvergrößerung stattfindet. Da eine funktionelle Veränderung ohne Proliferation gleichbedeutend mit einer erhöhten Transportrate pro Zelle ist, wurde untersucht, wie es zu diesem Anstieg kommen kann. Da der Anstieg der Transportkapazität auf zellulärer Ebene eventuell auf genregulative Mechanismen zurückzuführen ist, wurde die Transkriptionsrate verschiedener Transportproteine im Pansenepithel untersucht. Aus diesem Grund wurde im Anschluss an die Ussing-Kammer-Experimente mittels konventioneller PCR zunächst der qualitative Nachweis verschiedener Transportproteine am Pansenepithel von Schafen erbracht (siehe 3.2) und durch Sequenzanalyse bestätigt. Anschließend wurde die Transkription der Transportproteine unter verschiedenen Versuchsbedingungen *in vitro* in Abhängigkeit von der Zeit mit Hilfe der Real-Time PCR quantifiziert. Dabei wurde festgestellt, daß sich die Transkriptionsraten verschiedener Transportproteine innerhalb weniger Stunden an veränderte Milieubedingungen anpassen (siehe 3.4).

3.1 ERGEBNISSE DER USSING-KAMMER-VERSUCHE

3.1.1 Tiere

Alle Versuchstiere befanden sich über die gesamte Dauer des Versuches in einem klinisch gesunden Zustand. Während der Heufütterungsperiode nahmen die Tiere etwa 1000 g Heu pro Tier und Tag auf. Für die Dauer der Konzentratfütterungsperiode (KFP) wurden etwa 800 g Heu und etwa 800 g Krafffutter pro Tier und Tag aufgenommen. Während der ersten Wochen der KFP war die Aufnahme von Heu und Krafffutter etwas vermindert (siehe Abbildung 9).

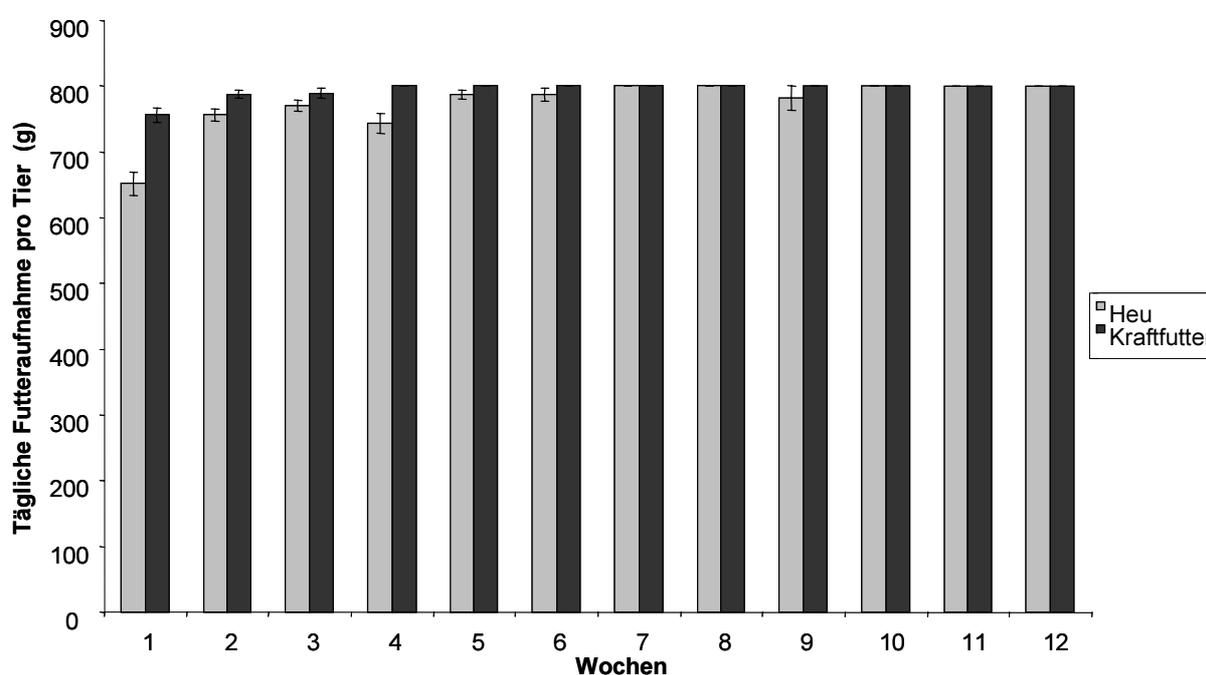


Abbildung 9 Futteraufnahme pro Tier und Tag während der Krafffutter-Periode

3.1.2 Elektrophysiologische Parameter

3.1.2.1 G_t -Werte (Gewebeleitfähigkeit)

Die Werte der Gewebeleitfähigkeit (G_t) liegen zwischen $2,10 \pm 0,10$ und $2,94 \pm 0,36$ mS · cm⁻² und haben einen Gesamtmittelwert von $2,54 \pm 0,07$ mS · cm⁻². Die G_t -Werte der Gruppen 2 und 5 sind gegenüber den G_t -Werten der Gruppe 1 (Kontrollgruppe) signifikant erhöht, während die G_t -Werte der Gruppe 6 keinen signifikanten Unterschied zu den G_t -Werten der Kontrollgruppe aufweisen. Ferner kann keine eindeutige Tendenz der G_t -Werte während des Verlaufs des Experimentes festgestellt werden (siehe Tabelle 5). Typische G_t -Verlaufskurven der einzelnen Fütterungsgruppen können der Abbildung 10 entnommen werden.

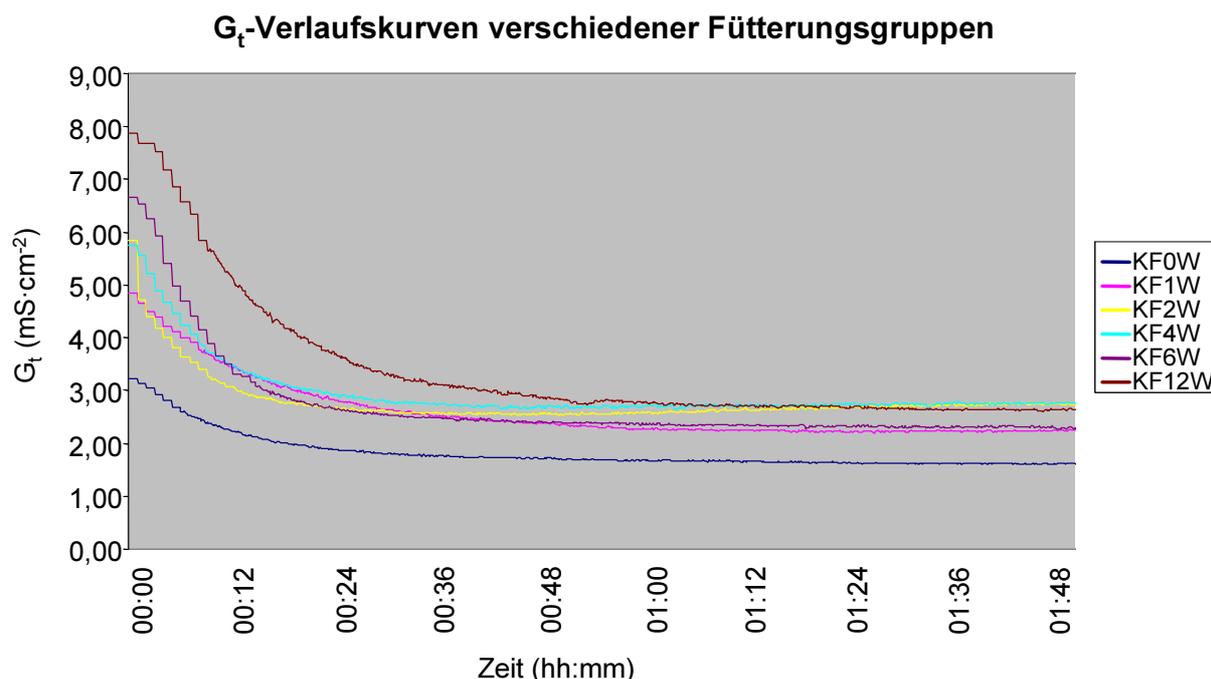


Abbildung 10 G_t -Verlaufskurven verschiedener Fütterungsgruppen. Tiere, die 0,1,2,4,6 oder 12 Wochen Konzentratfütterung erhielten sind mit KF0W, KF1W, KF2W, KF4W, KF6W beziehungsweise KF12W bezeichnet.

3.1.2.2 I_{sc} (Kurzschlussstrom)

Die Werte des Kurzschlussstromes weisen Abweichungen innerhalb der einzelnen Gruppen auf (zwischen $0,72 \pm 0,10$ und $1,81 \pm 0,09 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) und haben einen Gesamtmittelwert von $1,23 \pm 0,06 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. Die I_{sc} -Werte der Gruppen 2 und 3 waren gegenüber den Werten der Gruppe 1 (Kontrollgruppe) signifikant erhöht, während die Werte von Gruppe 5 und 6 gegenüber den Werten der Kontrollgruppe signifikant verringert waren (siehe Tabelle 5).

3.1.3 Gewebegewicht

Die inkubierten Gewebe (siehe 2.1.3) wurden nach Ablauf des Versuches getrocknet. Die geringsten Gewichte konnten in Gruppe 4 ermittelt werden, während die höchsten Gewichte in Gruppe 6 gemessen wurden. Die Werte des Gewebegewichtes differieren nicht signifikant zwischen den Versuchsgruppen.

Tabelle 5 Elektrophysiologische Parameter und Trockengewicht der Gewebe der Kontrollgruppe (Gruppe 1) und der Versuchsgruppen (Gruppe 2-6). Tiere der Kontrollgruppe wurden ausschließlich mit Heu gefüttert. Tiere der Versuchsgruppen erhielten neben Heu 1,2,4,6 oder 12 Wochen Konzentratfuttermittel. I_{sc} und G_t zeigen im Gegensatz zum Gewebegewicht in Abhängigkeit von der Fütterung signifikante Veränderungen (siehe 3.1.2.1, 3.1.2.2, 3.1.3). **P < 0,01, *P < 0,05.

	I_{sc} ($\mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	G_t ($\text{mS} \cdot \text{cm}^{-2}$)	Trockengewicht ($\text{mg} \cdot 3,14 \text{ cm}^{-2}$)
Gruppe 1	1,22 ± 0,07	2,1 ± 0,10	39,70 ± 1,99
Gruppe 2	1,68** ± 0,07	2,5** ± 0,09	39,28 ± 2,13
Gruppe 3	1,81** ± 0,09	2,94** ± 0,36	36,70 ± 2,39
Gruppe 4	1,24 ± 0,08	2,86** ± 0,15	35,26 ± 1,59
Gruppe 5	0,72** ± 0,10	2,78* ± 0,28	39,52 ± 1,80
Gruppe 6	0,72** ± 0,16	2,3 ± 0,12	45,20 ± 2,32

3.1.4 Natriumtransportraten

Die Natriumfluxraten von mukosal nach serosal ($J_{ms} \text{ Na}^+$) steigen von $3,57 \pm 0,12 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ bei den heugefütterten Tieren auf ein Maximum von $6,62 \pm 0,31 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ bei den konzentratreich gefütterten Tieren (4-Wochen-Gruppe) an, während der Gesamtmittelwert bei $5,43 \pm 0,16 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ liegt (siehe Tabelle 6). In allen Versuchsgruppen, in denen die Tiere mit KF gefüttert wurden, lagen die Werte der Natriumresorption signifikant über den Werten der Natriumresorption der Kontrollgruppe (heugefütterte Tiere). Für den Natriumtransport von serosal nach mukosal ($J_{sm} \text{ Na}^+$) lagen die Werte zwischen $1,41 \pm 0,13$ und $2,01 \pm 0,17 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, mit einem Minimalwert bei den heugefütterten Tieren, einem Maximalwert bei den Tieren, die 4 Wochen KF erhielten und einem Gesamtmittelwert von $1,69 \pm 0,06 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. Die Werte des $J_{sm} \text{ Na}^+$ der Gruppen 3 und 4 waren gegenüber den Werten der Gruppe 1 (Kontrollgruppe) signifikant erhöht. Dennoch konnte nur ein geringer Anstieg der J_{sm} -Werte zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen festgestellt werden (siehe Tabelle 6).

Der Natriumnettoflux ($J_{net} \text{ Na}^+$) berechnet sich aus der Differenz der unidirektionalen Fluxraten. Die $J_{net} \text{ Na}^+$ -Werte liegen zwischen $2,15 \pm 0,16$ und $4,55 \pm 0,18 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, mit einem Minimalwert bei der Kontrollgruppe (Gruppe 1) und einem Maximalwert bei der Versuchsgruppe, bei der die Tiere 4 Wochen KF erhielten. Der Gesamtmittelwert beträgt $3,72 \pm 0,13 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. Die Natrium-Nettoresorption zeigt innerhalb der Gruppen, die KF erhielten, einen signifikanten Anstieg. Etwa 75 % des Anstiegs tritt während der ersten Woche nach der Futterumstellung auf (siehe Tabelle 6).

Ergebnisse

Tabelle 6 Natriumfluxraten des Pansenepithels heugefütterter (Gruppe 1) und konzentratgefütterter (Gruppe 2-6) Schafe. Tiere der Gruppe 1 wurden ausschließlich mit Heu gefüttert, während Tiere der Gruppe 2-6 neben Heu 1, 2, 4, 6 oder 12 Wochen Konzentratfuttermittel erhielten.). **P < 0,01, *P < 0,05.

	$J_{ms} Na^+$ ($\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$)	$J_{sm} Na^+$ ($\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$)	$J_{net} Na^+$ ($\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$)
Gruppe 1	3,57 ± 0,12	1,41 ± 0,13	2,15 ± 0,16
Gruppe 2	5,37** ± 0,22	1,65 ± 0,13	3,73** ± 0,26
Gruppe 3	5,88** ± 0,30	1,98* ± 0,13	3,90** ± 0,34
Gruppe 4	6,62** ± 0,31	2,01* ± 0,17	4,55** ± 0,18
Gruppe 5	6,27** ± 0,29	1,71 ± 0,15	4,50** ± 0,26
Gruppe 6	5,32** ± 0,20	1,48 ± 0,11	3,92** ± 0,17

3.2 QUALITATIVER NACHWEIS DER TRANSPORTPROTEINE

Nach der Aufarbeitung von Gewebeproben aus der Pansenwand von Schafen und anschließender Isolierung der Gesamt-RNA (siehe 2.4) wurden anhand veröffentlichter homologer Sequenzen spezifische Primerpaare für die Amplifikation der mRNA-Sequenzen der Transportproteine NHE1 und 3 (Natrium-Protonen-Austauscher 1 und 3), AE2 (Anionen-Austauscher 2), NBC (Natrium-Bikarbonat-Kotransporter), vHATPase B und E (vakuoläre Protonen-ATPase B und E) ausgewählt (siehe 2.5.2) und in RT-PCR-Experimenten (siehe 2.5.3) eingesetzt. Die Sequenzen der hierfür verwendeten Primerpaare sind der Tabelle 24 zu entnehmen.

Für sämtliche Targets (NHE3, NHE1, AE2, NBC, vHB, vHE, β -Aktin) konnte der qualitative Nachweis der Transportproteine im Pansen mittels konventioneller PCR erbracht werden.

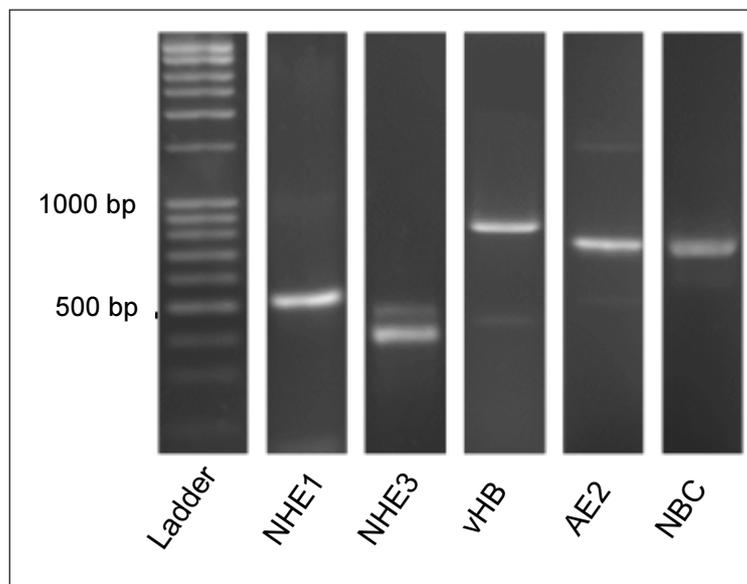


Abbildung 11 mRNA-Nachweis der Transportproteine nach elektrophoretischer Auftrennung. Durch den Vergleich mit dem Größenstandard (DNA-Ladder) konnte das Vorhandensein von NHE1 (543bp), NHE3 (539bp), vHB (808bp), AE2 (758bp) und NBC (674bp) nachgewiesen werden.

3.3 Klonierungs- und Sequenzierungsergebnisse

Die PCR-Produkte, an welche zunächst ein A-Überhang gekoppelt wurde (siehe 2.6.2), wurden jeweils in den Vektor pDrive ligiert (siehe 2.6.3). Nach der Transformation in kompetente Bakterien (siehe 2.6.4) und anschließender Vermehrung plasmidtragender Bakterien wurde der Klonierungserfolg in 24 monoklonalen Kolonien durch Präparation der Plasmid-DNA (siehe 2.6.5) bestätigt. Anschließend wurden die Plasmide auf das Vorhandensein des Inserts durch einen Restriktionsverdau untersucht (siehe 2.6.7). Die Klonierung der PCR-Produkte aus den konventionellen PCR-Experimenten (siehe 3.2) in Vektoren ergab folgende Plasmide:

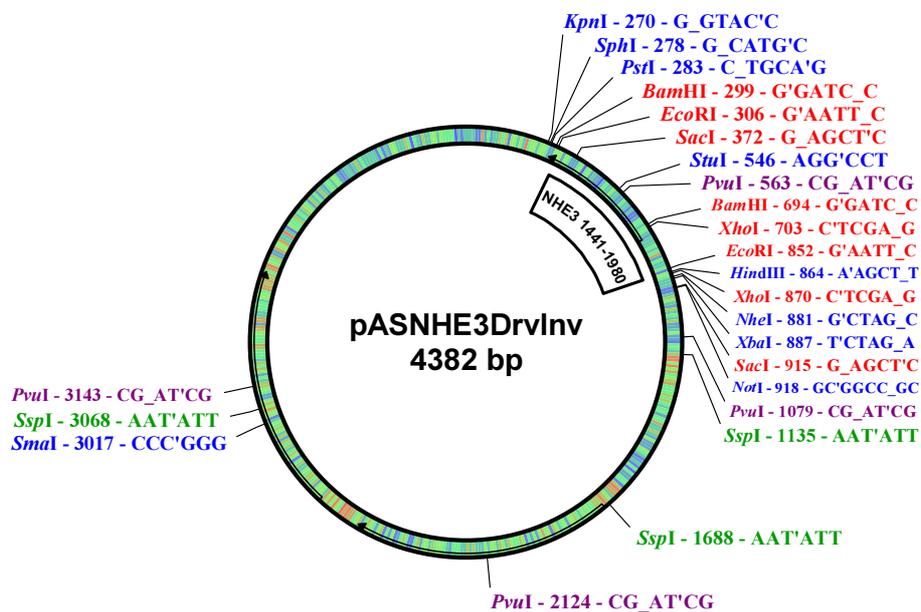


Abbildung 12 Restriktionskarte der Klonierung von NHE3. Ein Abschnitt der NHE3 mRNA wurde durch RT-PCR amplifiziert und in den Vektor pDrive kloniert. So entstand das Plasmid pASNHE3DrvInv.

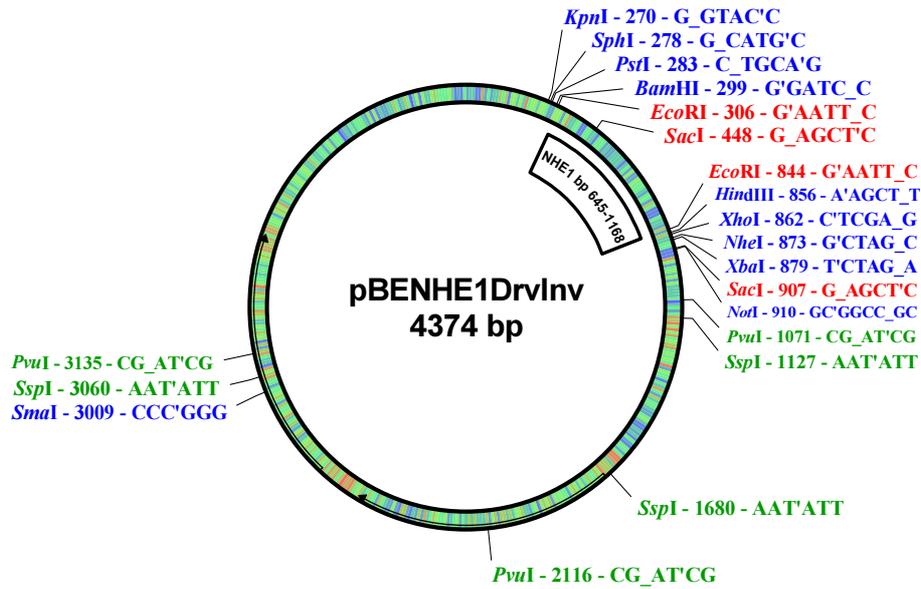


Abbildung 13 Restriktionskarte der Klonierung von NHE1. Ein Abschnitt der NHE1 mRNA wurde durch RT-PCR amplifiziert und in den Vektor pDrive kloniert. So entstand das Plasmid pBENHE1DrvInv.

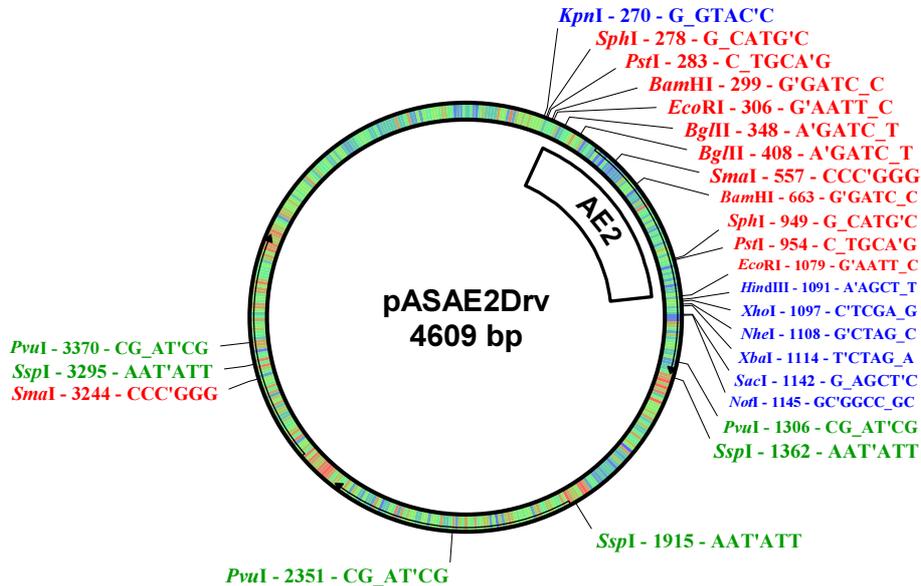


Abbildung 14 Restriktionskarte der Klonierung von AE2. Ein Abschnitt der AE2 mRNA wurde durch RT-PCR amplifiziert und in den Vektor pDrive kloniert. So entstand das Plasmid pASAE2DrvInv.

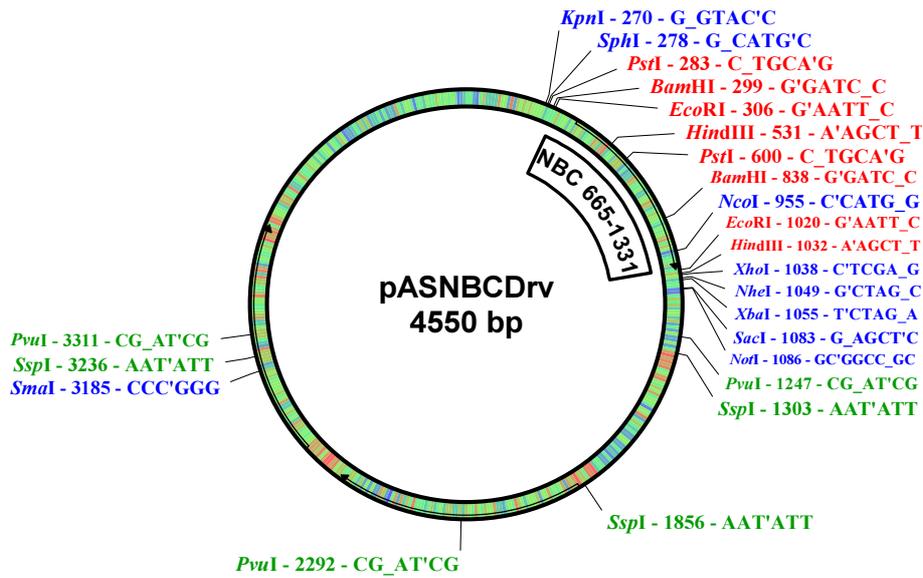


Abbildung 15 Restriktionskarte der Klonierung von NBC. Ein Abschnitt der NBC mRNA wurde durch RT-PCR amplifiziert und in den Vektor pDrive kloniert. So entstand das Plasmid pASNBCDrvInv.

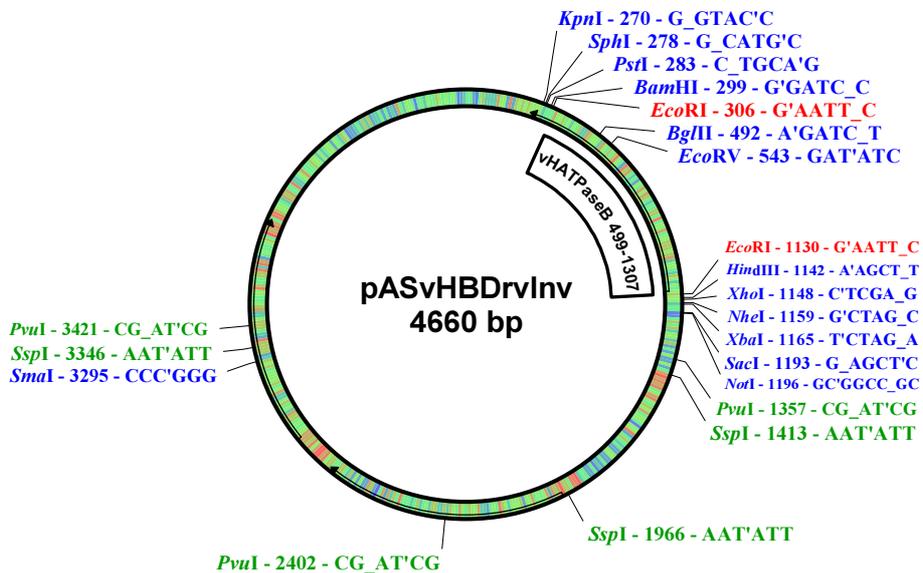


Abbildung 16 Restriktionskarte der Klonierung von vHB. Ein Abschnitt der vHB mRNA wurde durch RT-PCR amplifiziert und in den Vektor pDrive kloniert. So entstand das Plasmid pASvHBDrvInv.

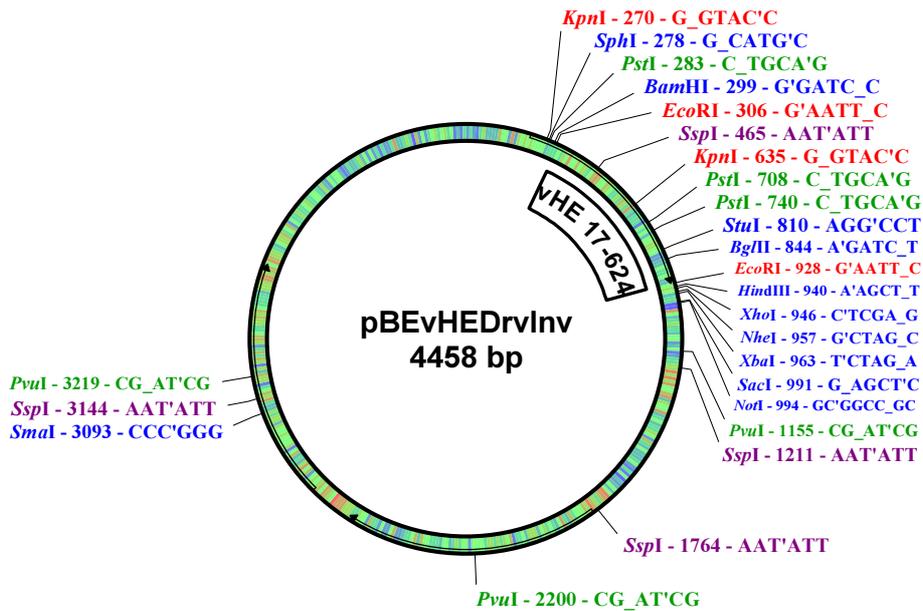


Abbildung 17 Restriktionskarte der Klonierung von vHE. Ein Abschnitt der vHE mRNA wurde durch RT-PCR amplifiziert und in den Vektor pDrive kloniert. So entstand das Plasmid pBEvHEDrvInv.

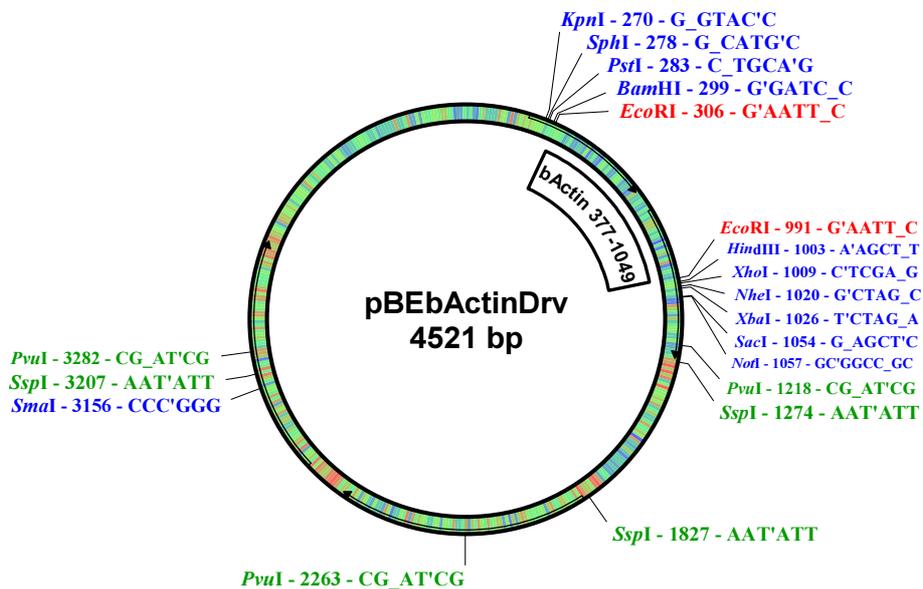


Abbildung 18 Restriktionskarte der Klonierung von β -Aktin. Ein Abschnitt der β -Aktin mRNA wurde durch RT-PCR amplifiziert und in den Vektor pDrive kloniert. So entstand das Plasmid pBEbAktinDrvInv.

Positive (inserttragende) Klone wurden nach Präparation im kleinen Maßstab durch Präparation der Plasmid-DNA aus mittelgroßen Bakterienpräparationen für Folgeuntersuchungen und die Sequenzierung vorbereitet. Es folgte die Sequenzierung des

Ergebnisse

Inserts im Kontext des Vektors (siehe:2.6.8). Die ermittelten Sequenzen wurden mit homologen Sequenzen des Rindes verglichen. Hierbei ergab sich für alle untersuchten Sequenzen eine Homologie von mehr als 90 %. Mit Hilfe der RT-PCR sowie der anschließenden Klonierung und Sequenzierung konnte der qualitative Nachweis für das Vorhandensein der mRNA der Transportproteine NHE3, NHE1, AE2, NBC, vHB und vHE im Pansen von Schafen erbracht werden. Die klonierten und sequenzierten PCR-Produkte wurden in Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) veröffentlicht (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7 Veröffentlichung ermittelter oviner cDNA-Sequenzen

Transportprotein	Genebank Accession Number
NHE3	AJ812230
NHE1	AJ812229
NBC	AJ829759
v H-ATPase B	AJ829758
v H-ATPase E	AJ829476
HSP 70.1	AJ812230

3.4 ERGEBNISSE DER RELATIVEN QUANTIFIZIERUNG

3.4.1 Etablierung der Assays mittels Regressionsanalyse

Bevor mittels „Real-Time-PCR“ die relative Quantifizierung vorgenommen werden kann, muss für jedes Target (NHE1, NHE3, AE2, NBC, vHATPase B und E, β -Aktin) die Etablierung des entsprechenden Assays vorgenommen werden (siehe 2.7.4).

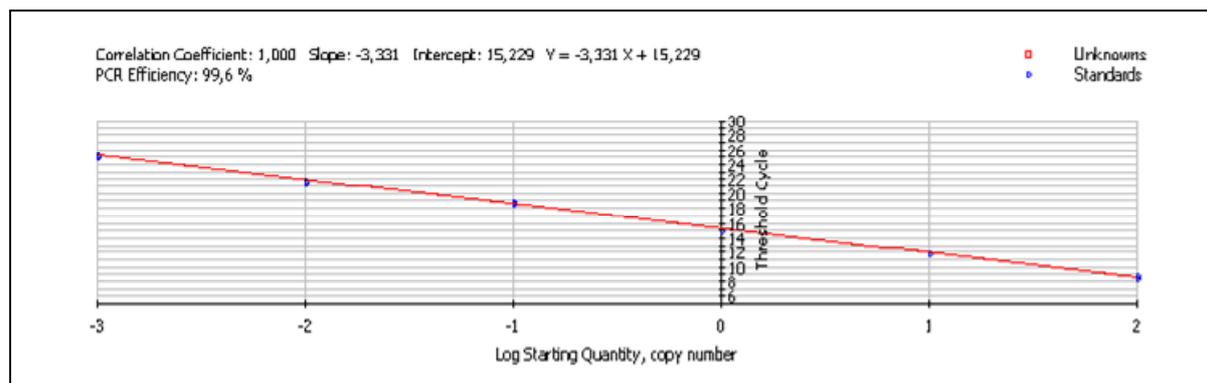


Abbildung 19 Graphische Darstellung der Regressionsanalyse von β -Aktin. Zur Bestimmung der PCR-Effizienz wird mittels Regressionsanalyse die Ausgangsmenge an Target-DNA gegen die Zykluszahl (C_T) in einer logarithmischen Funktion dargestellt. Bei einer Steigung (Slope) der Regressionsgeraden von $-3,333$ (absteigende Verdünnungsreihe) liegt die PCR-Effizienz bei 100%.

Mittels Regressionsanalyse kann die Effizienz der PCR-Reaktion überprüft werden. Hierbei wird die Ausgangsmenge an Target-DNA gegen die Zykluszahl in einer logarithmischen Funktion dargestellt. Die Steigung (Slope) der Regressionsgeraden gilt als Maß der realen Amplifikation und sollte zwischen 95-100% liegen (siehe 2.7.4.3).

Der Korrelationskoeffizient ist dabei ein Maß für die Linearität der PCR-Effizienz in variierenden Mengenbereichen der eingesetzten Kopienzahl. Die Etablierung wurde erfolgreich für alle oben genannten Transportproteine durchgeführt. Die transporterspezifischen Effizienzdaten können der Tabelle 8 entnommen werden.

Tabelle 8 Effizienzdaten der qPCR-assays

Transportprotein	Korrelationskoeffizienten	Slope	Effizienz
NHE1	0,999	-3,480	93,80%
NHE3	0,998	-3,337	99,40%
VHATPase B	0,999	-3,363	98,30%
vHATPase E	0,999	-3,353	98,70%
AE2	0,998	-3,342	99,20%
NBC	0,998	-3,369	98,10%
HSP	0,999	-3,359	98,50%
β -Aktin	1	-3,331	99,60%

3.4.2 Beurteilung und Berechnung der Ergebnisse

Die aus der „Real-Time-PCR“ gewonnenen Fluoreszenzdaten werden zunächst beurteilt (siehe 2.7.7). Die sich hieraus ergebenden Fluoreszenzmittelwerte werden zur relativen Quantifizierung verwendet (siehe 2.7.8). Die so berechneten FC-Werte geben Auskunft über die relative Expressionsrate des entsprechenden Targets unter definierten Bedingungen.

3.4.3 Relative Expressionsraten an Pansenepithelgeweben

Die relative Expression von NHE3 steigt mit zunehmender Dauer der Konzentratfütterungsperiode deutlich an und erreicht bei Tieren, die 4 Wochen konzentratreiches Futtermittel (KF4) erhielten, ein Maximum beim 12,64-fachen der Expressionsrate heugefütterter Tiere. Bei einer weiteren Verlängerung der Kraffutterfütterungsperiode auf 6 beziehungsweise 12 Wochen fällt der Wert wieder auf das 3,26-fache beziehungsweise 1,64-fache des Ausgangswertes ab. Eine Veränderung der relativen Expression von NHE1, vHATPase B, vHATPase E und AE2 in Abhängigkeit von der Diät konnte nicht beobachtet werden (Rohdaten siehe 8.18).

Eine graphische Darstellung der Ergebnisse kann der Abbildung 20 entnommen werden.

Ergebnisse

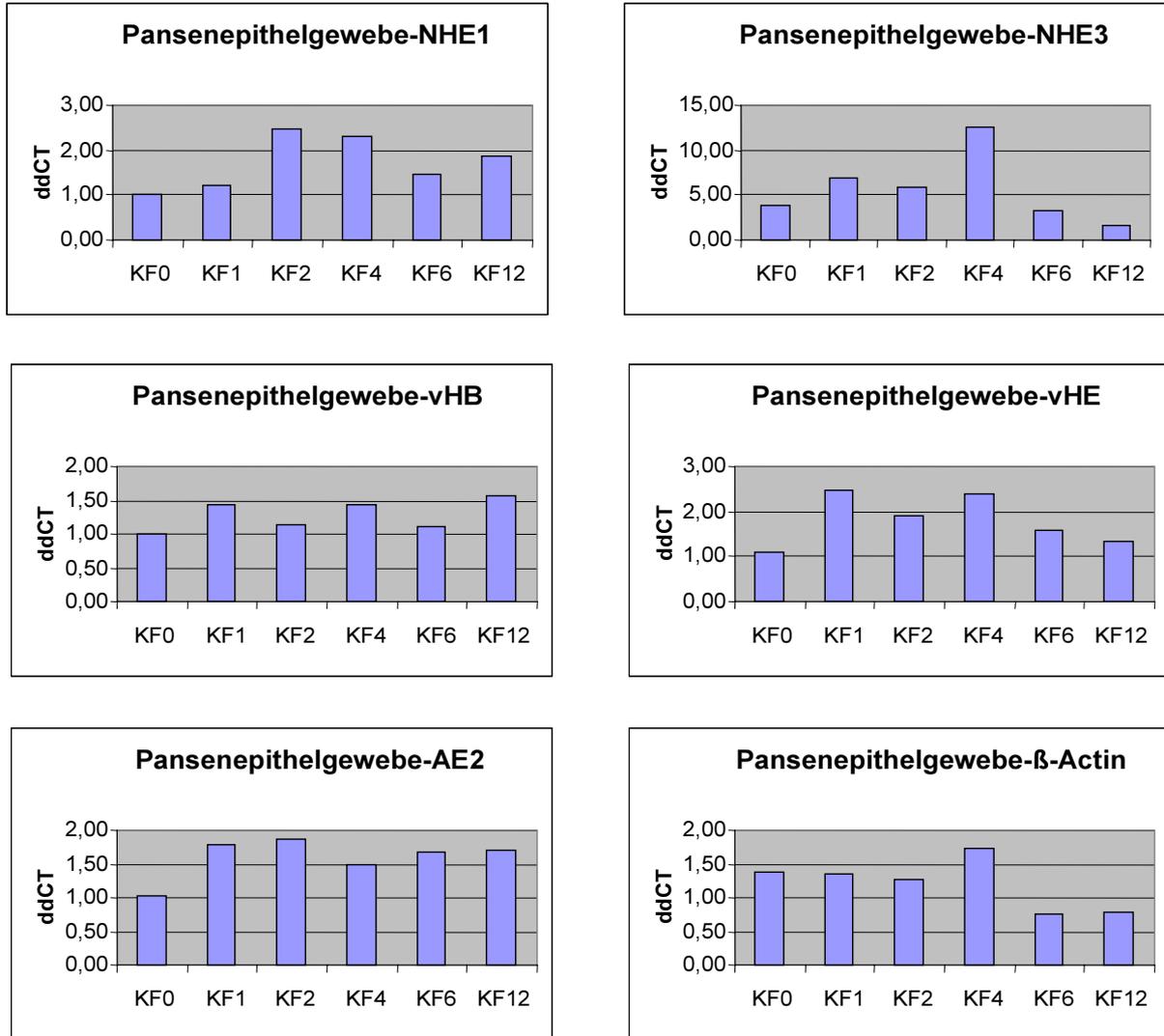


Abbildung 20 Relative Expressionsraten verschiedener Transportproteine (NHE1, NHE3, AE2, vHATPase B, vHATPase E) in Abhängigkeit von der Diät. Veränderung der mRNA-Menge verschiedener Transportproteine in Pansenepithelproben frisch geschlachteter Schafe nach Konzentratfütterung über eine variable Anzahl von Wochen. Mit zunehmender Dauer der Kraftfutterfütterungsperiode steigen die relativen Expressionsraten von NHE3 leicht an und erreichen bei einer Kraftfutterfütterungsdauer von 4 Wochen ihr Maximum. Nach 6 beziehungsweise 12 Wochen Kraftfutterdiät sinkt die Expression deutlich ab. Die Darstellungen haben unterschiedliche Maßstäbe.

3.4.4 Relative Expressionsraten nach Stimulationsversuchen an PEZ

3.4.4.1 Relative Expressionsraten nach Stimulation durch Butyrat

Die Expression von AE2, der vakuolären HATPase B und E und des HSP 70.1 steigt in Gegenwart von Butyrat in Konzentrationen zwischen 0,1 mM und 1,0 mM auf Werte bis zum 30,06-fachen der Ausgangsexpression an. Nach Entzug des Butyratzusatzes sinkt die Expression nahezu wieder auf die Ausgangswerte zurück. Allerdings ist bei keinem der untersuchten Transportproteine ein Zusammenhang zwischen der applizierten Butyratdosis und dem beobachteten Effekt (Dosis-Wirkungs-Beziehung) nachweisbar. Eine Stimulation der relativen Expression von NHE1 durch Butyrat an REC konnte nicht beobachtet werden (Rohdaten siehe 8.16).

Eine graphische Darstellung der Ergebnisse kann der Abbildung 21 entnommen werden.

Ergebnisse

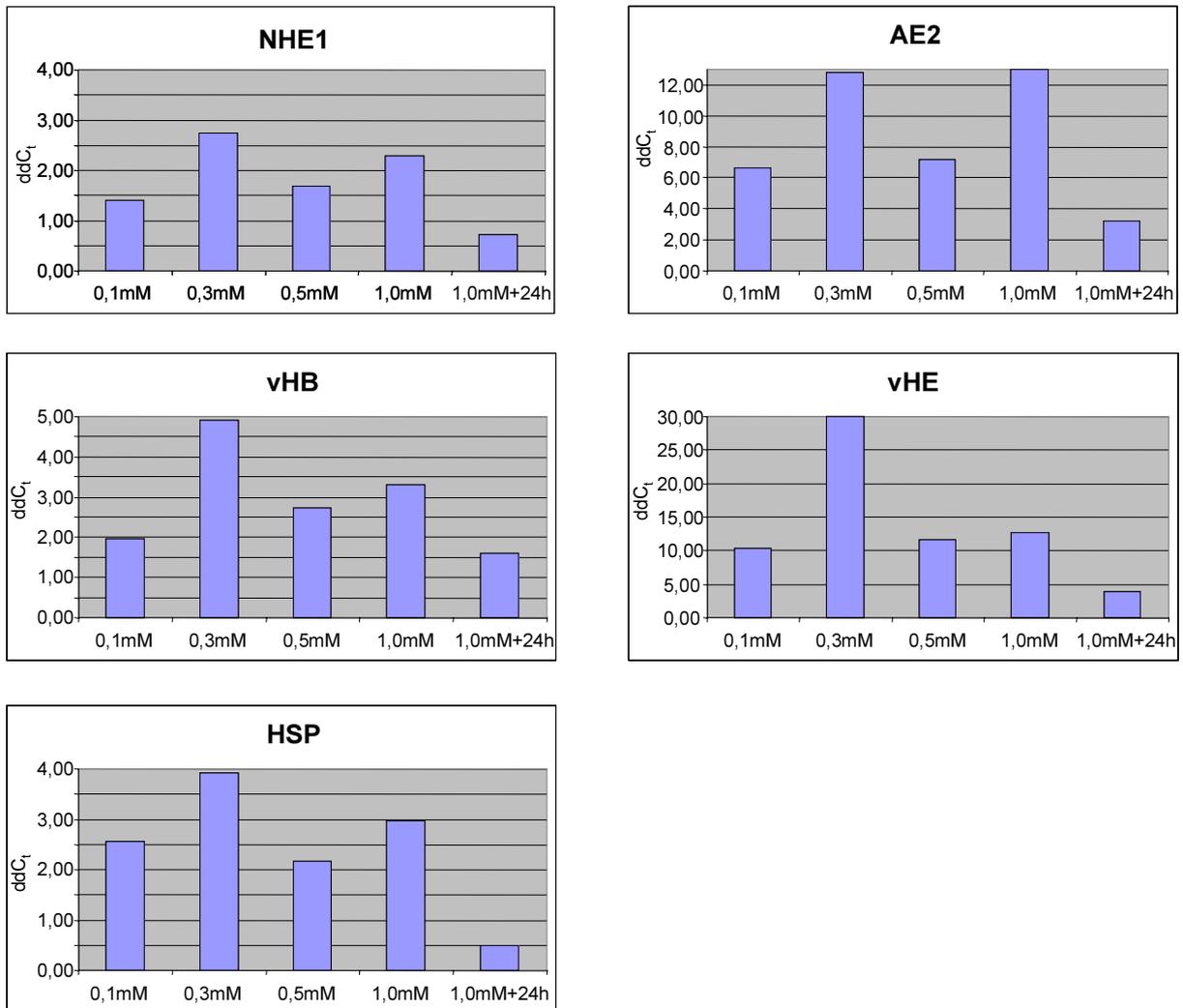


Abbildung 21 Relative Expressionsraten verschiedener Transportproteine (NHE1, AE2, vHATPase B, vHATPase E, HSP) nach Stimulation durch Butyrat. Veränderung der mRNA-Menge verschiedener Transportproteine in RNA-Präparationen von Pansenepithelzellen, die vorher mit Butyrat inkubiert wurden. Die relative Expression der untersuchten Transportproteine zeigt teilweise eine Aufregulation durch Zugabe von Butyrat. Die Darstellungen haben unterschiedliche Maßstäbe.

3.4.4.2 Relative Expressionsraten nach Stimulation durch Laktat

Die Expression von AE2, der vakuolären HATPase B und des HSP 70.1 steigt bei Zugabe von Laktat in Konzentrationen zwischen 0,1 mM und 1,0 mM auf Werte bis etwa zum 7,84-fachen der Expression ohne Zusatz an. Nach Entzug des Zusatzes sinkt die Expression wieder und sinkt dabei teilweise deutlich unter die Ausgangswerte. Auch die relative Expression der vakuolären HATPase E zeigt in diesem Versuch eine konzentrationsabhängige Veränderung. Bei einer Konzentration von 0,1 mM Laktat steigt die Expression auf das 5,24-fache des Ausgangswertes an. Bei 0,3 mM Laktat steigert sich dieser Wert weiter auf das 9,92-fache und erreicht bei einer Laktatkonzentration von 0,5 mM ein Maximum beim 11,39-fachen der Expressionsrate ohne Laktat. Bei einer Laktatkonzentration von 1,0 fällt der Wert wieder auf das 5,58-fache des Ausgangswertes ab. Nach Entzug des Laktats zeigen Zellen, die vorher über 24 Stunden mit 1,0 mM Laktat inkubiert wurden, einen Rückgang der Expression auf das 2,31-fache des Kontrollwertes. Eine Stimulation der relativen Expression von NHE1 durch Laktat konnte auch hier nicht beobachtet werden (Rohdaten siehe 8.17).

Eine graphische Darstellung der Ergebnisse kann der Abbildung 22 entnommen werden.

Ergebnisse

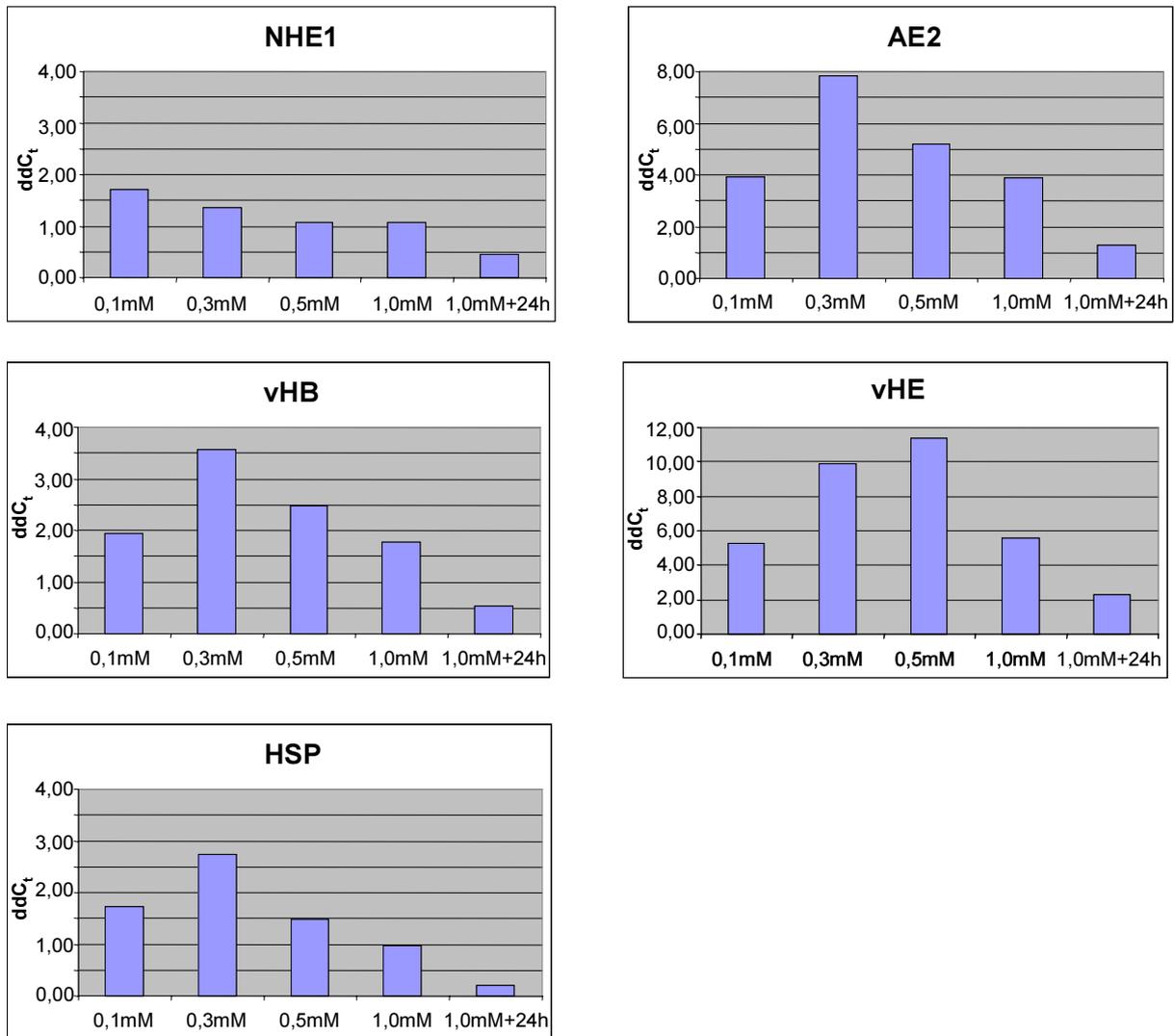


Abbildung 22 Relative Expressionsraten verschiedener Transportproteine (NHE1, AE2, vHATPase B, vHATPase E, HSP) nach Stimulation durch Laktat. Veränderung der mRNA-Menge verschiedener Transportproteine in RNA-Präparationen von Pansenepithelzellen, die vorher mit Laktat inkubiert wurden. Nach Stimulation durch Laktat kann bis zu einer Konzentration von 0,3 mM ein deutlicher Anstieg der Expressionsraten der vakuolären HATPase B sowie des AE2 festgestellt werden. Bei Konzentrationen von 0,5 mM und mehr sinkt die Expression wieder deutlich ab. Die Expressionsraten der vakuolären HATPase E zeigen einen ähnlichen Verlauf. Sie erreichen jedoch ihren Maximalwert erst bei einer Konzentration von 0,5 mM Laktat. Die Darstellungen haben unterschiedliche Maßstäbe.

3.4.4.3 Relative Expressionsraten nach Stimulation durch CO₂

Die FC-Werte von AE2 und der vakuolären HATPase B und E steigen mit zunehmender Inkubationsdauer kontinuierlich an. Nach einer Inkubationsdauer von 6 h CO₂ steigen die FC-Werte auf Werte von maximal 3,75 an. Nach einer Verlängerung der Inkubationsdauer auf 12 h beziehungsweise 24 h steigen die FC-Werte auf Werte bis 6,87 und 17,88 weiter an. Zellen, welche 24 h bei 7,5% CO₂ inkubiert wurden, zeigen nach Reduktion des CO₂-Gehaltes auf 5% Expressionsraten von bis zum 41,93-fachen der Kontrollwerte für AE2 und die vakuolären HATPasen. Eine Stimulation der relativen Expression von NHE1 und HSP durch CO₂ wurde an REC nicht beobachtet (Rohdaten siehe 8.11).

Eine graphische Darstellung der Ergebnisse kann der Abbildung 23 entnommen werden.

Ergebnisse

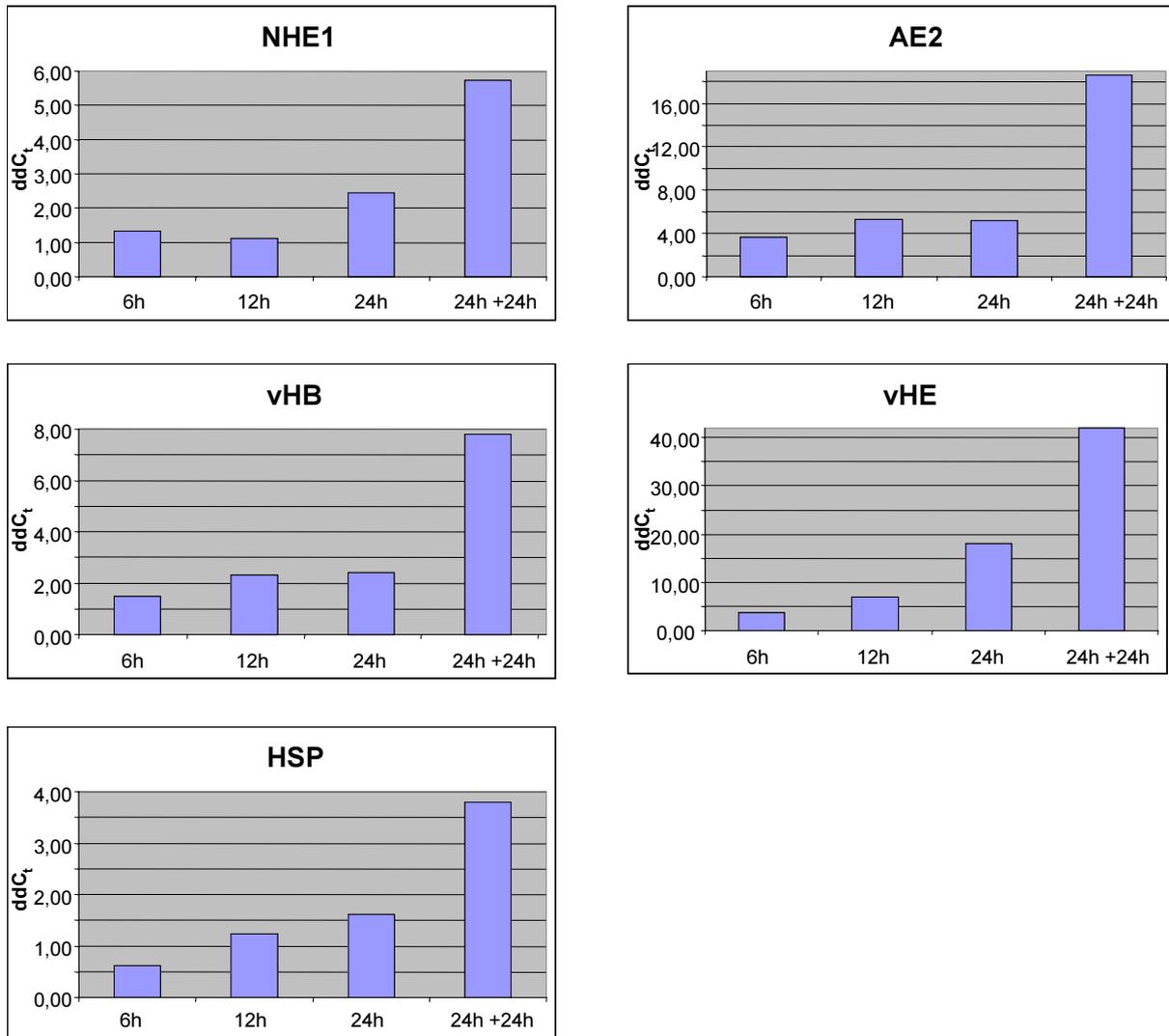


Abbildung 23 Relative Expressionsraten verschiedener Transportproteine (NHE1, AE2, vHATPase B, vHATPase E, HSP) nach Stimulation durch CO₂. Pansenepithelzellen werden in der Regel unter definierten physiologischen Verhältnissen gehalten. Hierzu zählt unter anderem, daß dem Inkubator ein Gasgemisch zugeführt wird, daß 5,0 % CO₂ enthält. In den durchgeführten Stimulationsversuchen konnte durch die Zufuhr von 7,5 % CO₂ ein deutlicher Anstieg der relativen Expression der vakuolären HATPase B und E sowie des AE2 festgestellt werden, der auch nachdem der CO₂-Gehalt anschließend erneut auf 5 % reduziert wurde, anhielt. Die Darstellungen haben unterschiedliche Maßstäbe.

3.4.4.4 Relative Expressionsraten nach Stimulation durch IGF1

Nach einer Inkubationsdauer von 6 h mit 2 ng / ml IGF1 steigen die FC-Werte von vHE auf einen Maximalwert von 5,24 an, während für die anderen Transporter hier keine deutliche Aufregulation zu beobachten ist. Nach einer Verlängerung der Inkubationsdauer auf 12 h beziehungsweise 24 h steigen die FC-Werte von AE2 weiter bis auf Werte von 11,55 beziehungsweise 17,27 an. Zellen, denen nach einer Inkubationsdauer von 24 h der IGF1-Zusatz entzogen wurde, zeigen einen Rückgang der Expressionsraten bis auf das 5,03-fache für AE2; für die vakuoläre HATPase E auf das 2,03-fache des Kontrollwertes. Eine Stimulation der relativen Expression von NHE1, HSP sowie der vakuolären HATPase B wurde an REC nicht beobachtet (Rohdaten siehe 8.12).

Eine graphische Darstellung der Ergebnisse kann der Abbildung 24 entnommen werden.

Ergebnisse

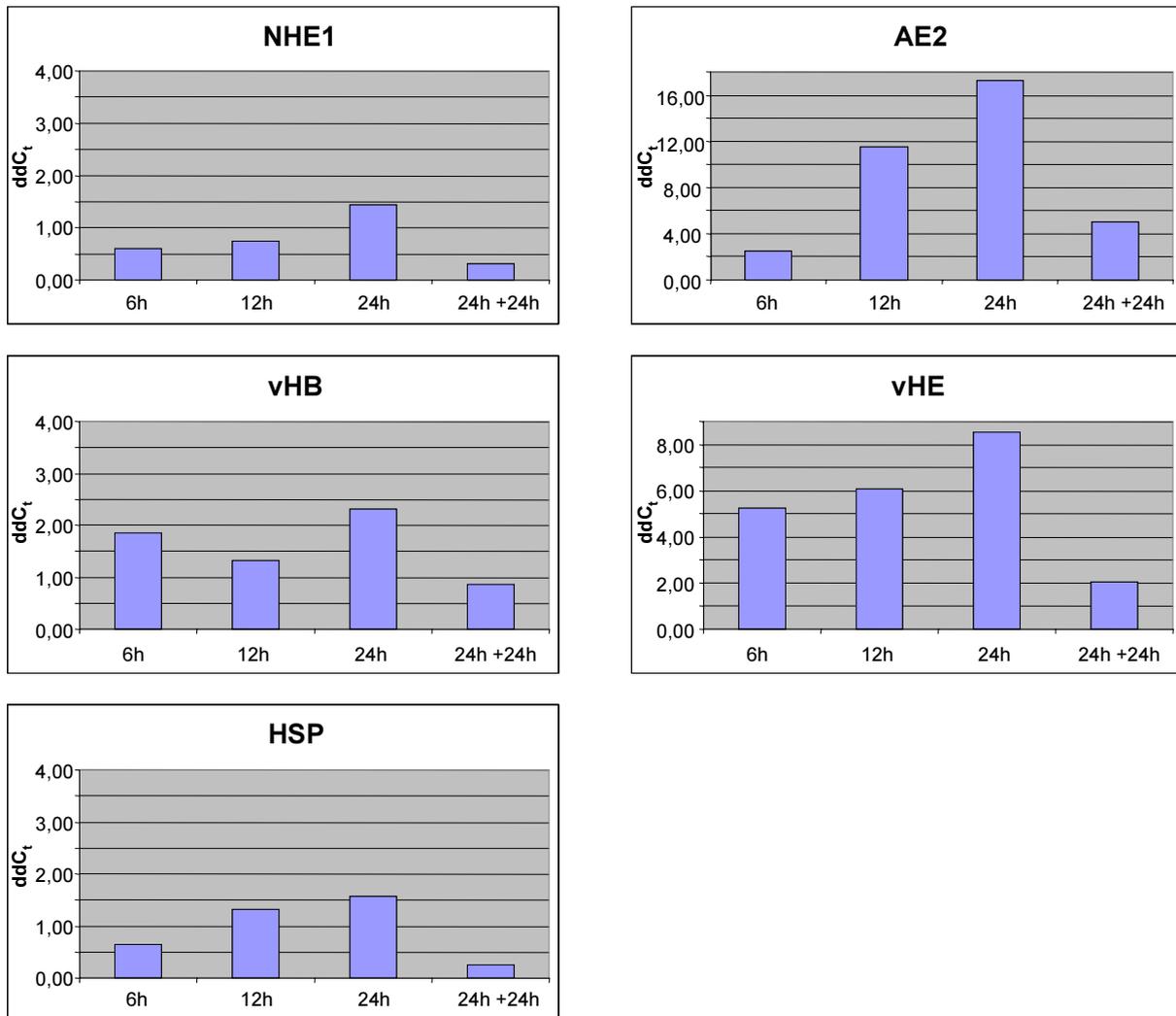


Abbildung 24 Relative Expressionsraten verschiedener Transportproteine (NHE1, AE2, vHATPase B, vHATPase E, HSP) nach Stimulation durch 2 ng / ml IGF1. Veränderung der mRNA-Menge verschiedener Transportproteine in RNA-Präparationen von Pansenepithelzellen nach Inkubation mit IGF1. Durch die Zugabe von IGF1 konnte ein kontinuierlicher Anstieg der relativen Expression von AE2 und der vakuolären HATPase E mit zunehmender Inkubationsdauer beobachtet werden. Nach Entzug des Zusatzes sinkt die Expression zum Teil unter die Ausgangswerte. Die Darstellungen haben unterschiedliche Maßstäbe.

3.4.4.5 Relative Expressionsraten nach Stimulation durch EGF

Die Expression der vakuolären HATPase E steigt bei Zugabe von 2 ng / ml EGF für 6 h, 12 h beziehungsweise 24 h deutlich bis etwa zum 36,5-fachen der Expression ohne Zusatz an. Nach Entzug des Zusatzes sinkt die Expression deutlich unter die Ausgangswerte. Einen nahezu identischen Verlauf der Expressionsraten kann bei der vakuolären HATPase B beobachtet werden, wobei hier die inkubationsdauerabhängigen Schwankungen quantitativ deutlich schwächer ausgebildet sind. Die relative Expression von AE2 zeigt in diesem Versuch eine schwache, konzentrationsabhängige Veränderung. Bei einer Inkubationsdauer von 12 h erreicht die Expression mit einem Anstieg auf das 3,73-fache des Ausgangswertes ihren Maximalwert. Nach Entzug des Zusatzes sinkt die Expression unter den Ausgangswert. Eine Veränderung der Expressionsraten von NHE1 sowie von HSP durch EGF konnte hingegen nicht beobachtet werden (Rohdaten siehe 8.13).

Eine graphische Darstellung der Ergebnisse kann der Abbildung 25 entnommen werden.

Ergebnisse

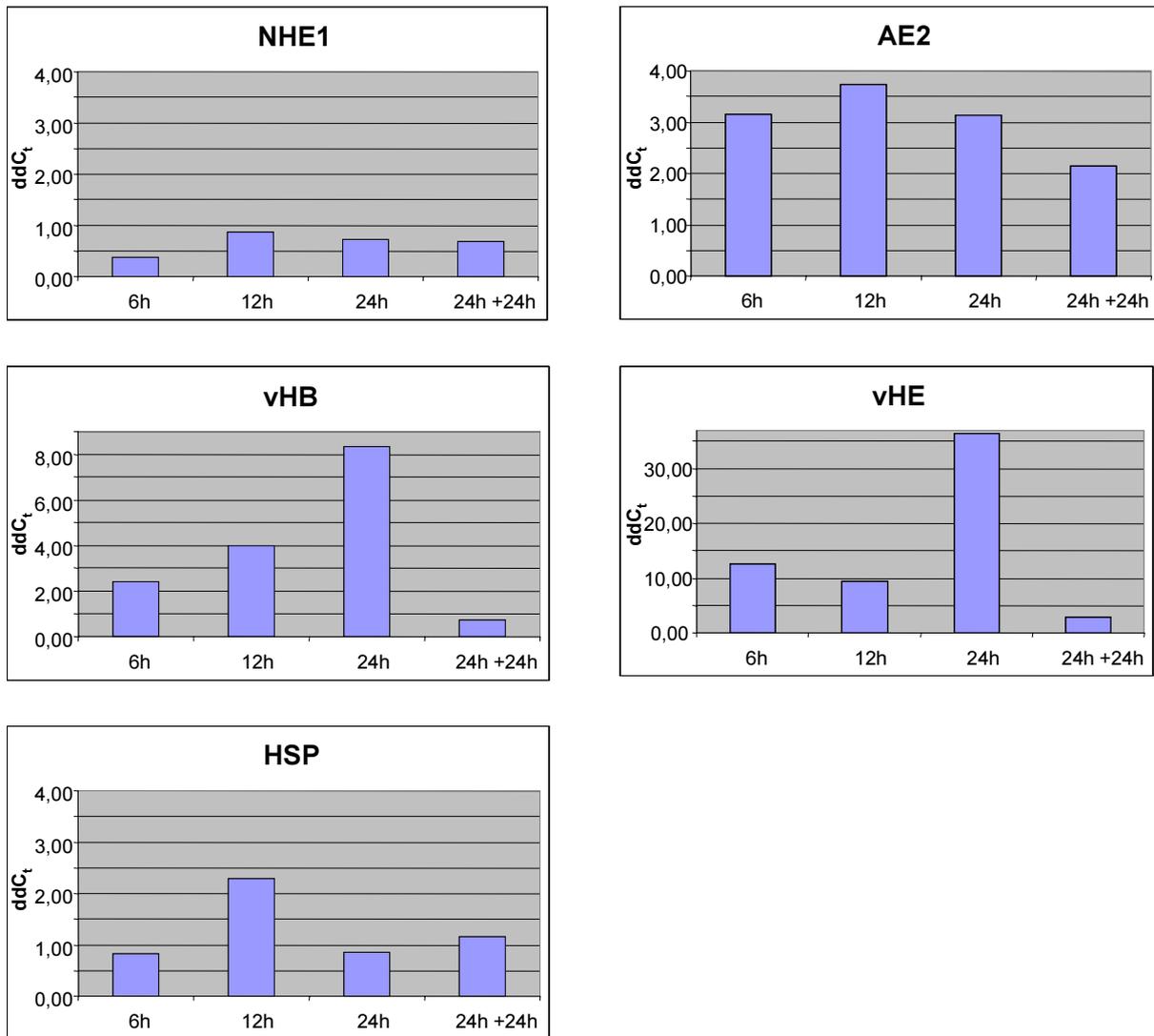


Abbildung 25 Relative Expressionsraten verschiedener Transportproteine (NHE1, AE2, vHATPase B, vHATPase E, HSP) nach Stimulation durch 2 ng / ml EGF. Veränderung der mRNA-Menge verschiedener Transportproteine in RNA-Präparationen von Pansenepithelzellen nach Inkubation mit EGF. Durch die Zugabe von EGF konnte ein deutlicher Anstieg der relativen Expression der vakuolären HATPase B und E bei einer Inkubationsdauer von 24 h beobachtet werden. Nach Entzug des Zusatzes sinkt die Expression teilweise bis unter die Ausgangswerte. Die Expressionsrate von AE2 steigt bereits nach einer Inkubationsdauer von 6 h an und bleibt bei einer Verlängerung der Inkubationsdauer nahezu konstant. Erst nachdem dem Medium der EGF-Zusatz entzogen wurde, sinkt die Expressionsrate geringfügig ab. Die Darstellungen haben unterschiedliche Maßstäbe.

3.4.4.6 Relative Expressionsraten nach Stimulation durch cAMP

Die Expression des Anionenaustauschers 2 sowie der vakuolären HATPase B steigt zunächst bei einer Konzentration von 25 μM auf Werte bis zum 9,19-fachen der Ausgangsexpression an. Bei einer Konzentrationserhöhung auf 50 μM fällt die relative Expression bis zum 1,83-fachen des Ausgangswertes ab, steigt jedoch bei weiterer Erhöhung der Konzentration auf 75 μM und 100 μM auf FC-Werte bis zum 11-fachen des Ausgangswertes an. Nach Entzug des cAMP-Zusatzes sinkt die Expression deutlich unter die Ausgangswerte zurück. Auch die relative Expression der vakuolären HATPase E zeigt konzentrationsabhängige Veränderungen. Nachdem die Expression bei einer Konzentration von 25 μM auf das 16,45-fache des Ausgangswertes ansteigt, fallen anschließend mit steigender Konzentration die FC-Werte kontinuierlich ab. Nach Entzug des cAMP-Zusatzes sinkt die Expression wieder deutlich ab. Eine Stimulation der relativen Expression von NHE1 und HSP durch cAMP konnte an REC nicht beobachtet werden (Rohdaten siehe 8.14). Eine graphische Darstellung der Ergebnisse kann der Abbildung 26 entnommen werden.

Ergebnisse

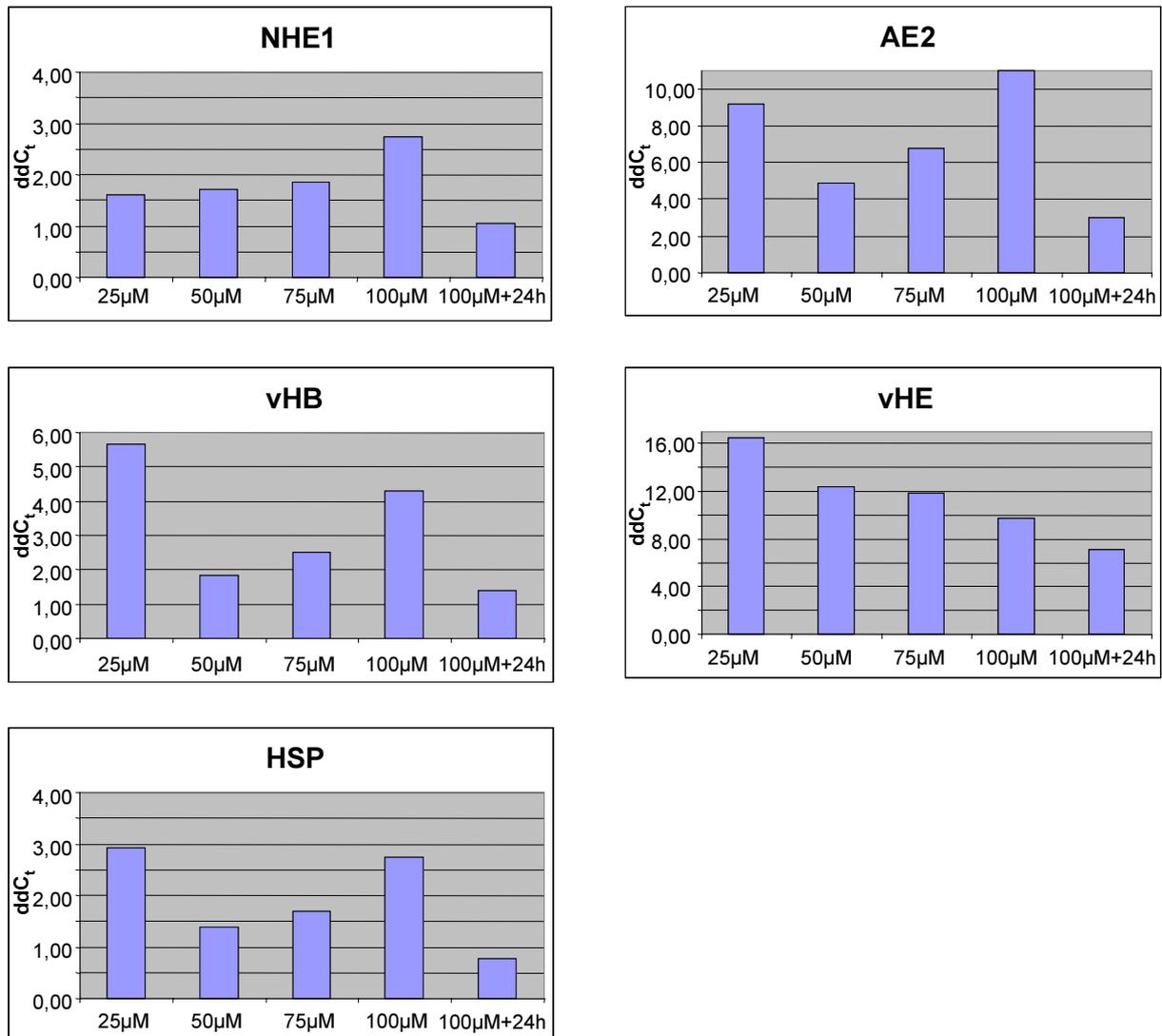


Abbildung 26 Relative Expressionsraten verschiedener Transportproteine (NHE1, AE2, vHATPase B, vHATPase E, HSP) nach Stimulation durch cAMP. Veränderung der mRNA-Menge verschiedener Transportproteine in RNA-Präparationen von Pansenepithelzellen, nach Inkubation mit cAMP. Die relativen Expressionsraten von vHB und AE2 zeigen bei einer Konzentration von 25 μM cAMP einen deutlichen Anstieg der Expressionsraten, die nach weiterer Erhöhung der Konzentration auf 50 μM cAMP zunächst abfallen, anschließend jedoch kontinuierlich bis zu einer Konzentration von 100 μM cAMP ansteigen. Nachdem der cAMP-Zusatz entzogen wurde, sinken die relativen Expressionsraten deutlich unter die Ausgangswerte. Die relative Expression der vHE steigt ebenfalls bereits bei einer Konzentration von 25 μM cAMP deutlich an, fällt jedoch mit steigender cAMP-Konzentration kontinuierlich ab. Nachdem der Zusatz entzogen wurde, erreicht die Expressionsrate ihren Minimalwert. Die Darstellungen haben unterschiedliche Maßstäbe.

3.4.4.7 Relative Expressionsraten nach Stimulation durch PGE2

Die relative Expression der vakuolären HATPase E sowie des AE2 steigt nach einer Inkubationsdauer von 6 h mit 100 mM PGE2 auf Werte bis zum 21,26-fachen der Ausgangsexpression an. Anschließend sinkt die Expression mit steigender Inkubationsdauer kontinuierlich ab und erreicht nach Entzug des PGE2-Zusatzes ein Minimum beim 6,32-fachen der Expressionsrate ohne PGE2. Die FC-Werte von NHE1 steigen mit zunehmender Inkubationsdauer kontinuierlich an. Nach einer Inkubationsdauer von 6 h steigt der FC-Wert auf einen Wert von 2,97 an. Nach einer Verlängerung der Inkubationsdauer auf 12 h beziehungsweise 24 h steigen die FC-Werte weiter auf Werte bis 4,08 und 4,35 an. Zellen, welchen nach einer 24-stündigen Inkubationsdauer der PGE2-Zusatz entzogen wurde, zeigen eine auf das 2,33 des Kontrollwerts verminderte Expressionsrate. Die Expression der vakuolären HATPase B steigt in Gegenwart von PGE2 bei einer Inkubationsdauer von 6 h bis auf das 4,23-fache der Ausgangsexpression an und bleibt bei Verlängerung der Inkubationsdauer nahezu konstant. Nach Entzug des PGE2-Zusatzes sinkt die Expression auf etwa das 2,3-fache des Kontrollwerts. Die Expression des HSP 70.1 steigt in Gegenwart von PGE2 während einer Inkubationsdauer zwischen 6 h und 24 h auf Werte bis zum 5,31-fachen der Ausgangsexpression an. Nach Entzug des PGE2-Zusatzes sinkt die Expression fast auf den Ausgangswert ab (Rohdaten siehe 8.14).

Eine graphische Darstellung der Ergebnisse kann der Abbildung 27 entnommen werden.

Ergebnisse

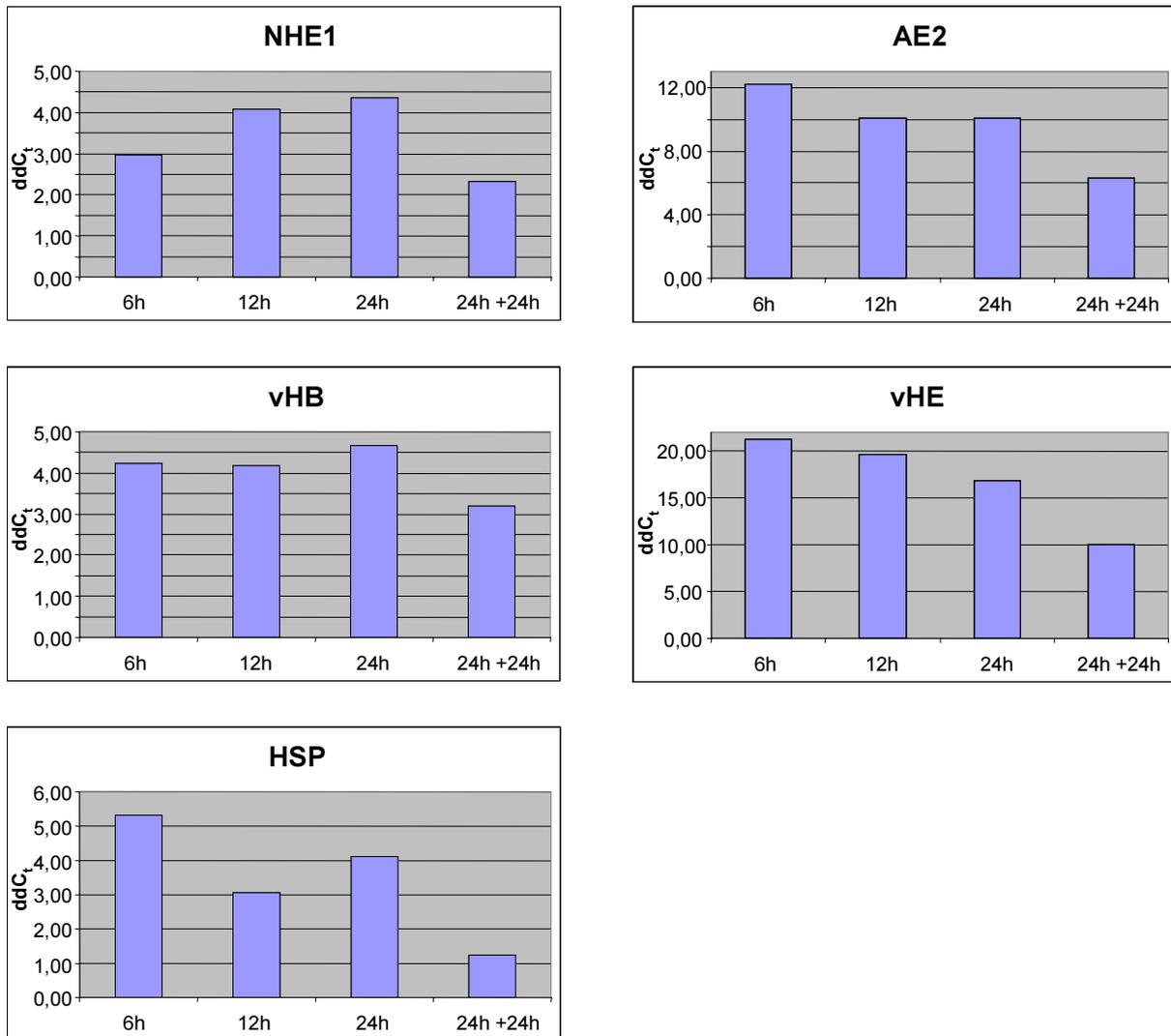


Abbildung 27 Relative Expressionsraten verschiedener Transportproteine (NHE1, AE2, vHATPase B, vHATPase E, HSP) nach Stimulation durch 100 mM PGE₂. Veränderung der mRNA-Menge verschiedener Transportproteine in RNA-Präparationen von Pansenepithelzellen, nach Inkubation mit PGE₂. Eine Veränderung der Expressionsraten von NHE1 in REC kann ausschließlich nach Stimulation durch PGE₂ beobachtet werden. Durch die Zugabe von PGE₂ kann ein kontinuierlicher Anstieg der relativen Expression von NHE1 mit zunehmender Inkubationsdauer beobachtet werden. Nach Entzug des Zusatzes sinkt die Expression wieder. Die Expression von AE2 sowie der vakuolären HATPase E steigt nach Stimulation durch PGE₂ bei einer Inkubationsdauer von 6 h deutlich an. Es zeigt sich jedoch bei weiterer Verlängerung der Inkubationsdauer ein kontinuierlicher Rückgang der Expressionsraten. Nach Entzug des PGE₂-Zusatzes sinkt die Expression wieder ab, bleibt aber deutlich über dem Ausgangswert. Bei den relativen Expressionsraten der vakuolären HATPase B ist kein Zusammenhang zwischen der applizierten PGE₂-Dosis und dem beobachteten Effekt (Dosis-Wirkungs-Beziehung) nachweisbar. PGE₂ induziert in REC eine reversible Steigerung der HSP-Transkription bis auf das fünffache des Kontrollwertes. Die Darstellungen haben unterschiedliche Maßstäbe.

3.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der relativen Quantifizierung

3.4.5.1 Zusammenfassung Geneexpressionsprofile von Pansenepithelproben

Eine Abhängigkeit der relativen Expression von der Diät wurde ausschließlich für NHE3 beobachtet. Mit zunehmender Dauer der Konzentratfütterungsperiode steigen die relativen Expressionsraten von NHE3 leicht an und erreichen bei einer Konzentratfütterungsdauer von 4 Wochen ihr Maximum. Nach 6 beziehungsweise 12 Wochen Krafffutterdiät sinkt die Expression wieder deutlich ab.

3.4.5.2 Zusammenfassung der Genexpressionsprofile nach Stimulationsversuchen an REC

Nach Stimulation der Pansenepithelzellen (PEZ) durch Butyrat kann eine Aufregulation verschiedener Transportproteine beobachtet werden. Dabei besteht keine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung. Es kann jedoch in einer gewissen Regelmäßigkeit eine Aufregulation auf den zehnfachen Wert des Ausgangswertes bei einer Konzentration von 0,3 mM beobachtet werden.

Nach Stimulation von PEZ durch Laktat wurde bei einer Konzentration von 0,3 mM eine Aufregulation der relativen Expression von AE2 sowie der vakuolären HATPase B auf den zehnfachen Wert des Ausgangswertes festgestellt. Bei Konzentrationen von 0,5 mM Laktat und mehr sinkt die Expression deutlich unter die Ausgangswerte. Die Expressionsraten der vakuolären HATPase E zeigen einen nahezu identischen Verlauf. Sie erreichen jedoch ihren Maximalwert erst bei einer Konzentration von 0,5 mM Laktat.

Unter erhöhter Zufuhr von CO₂ (7,5 %) wurde ein variabel ausgeprägter Anstieg der relativen Expression der vakuolären HATPase B und E sowie von AE2 festgestellt. Nachdem der CO₂-Gehalt anschließend erneut auf 5 % reduziert wurde, steigt die relative Expression der genannten Transportproteine weiterhin auf Werte bis zum 40-fachen der Ausgangswerte an. Die Aufregulation von AE2 und der vakuolären HATPase E nach Stimulation durch IGF1 zeigt eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung. Mit zunehmender Versuchsdauer lässt sich ein kontinuierlicher Anstieg der relativen Expression beobachten. Nach Entzug des Zusatzes sinkt die Expression wieder deutlich ab.

Durch die Zugabe von EGF konnte bei einer Inkubationsdauer von 24 h ein Anstieg der relativen Expression der vakuolären HATPase B und E auf Werte bis zum 35-fachen des Ausgangswertes beobachtet werden. Nach Entzug des Zusatzes sinkt die Expression wieder ab. Die Expressionsrate von AE2 steigt bereits nach einer Inkubationsdauer von 6 h deutlich an und bleibt anschließend inkubationsdauerunabhängig nahezu konstant. Erst nachdem dem Medium der EGF-Zusatz entzogen wurde, sinkt die Expressionsrate geringfügig ab.

Die relativen Expressionsraten von vHB und AE2 zeigen nach Stimulation durch cAMP eine Aufregulation ohne deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung. Weiterhin konnte durch die Zugabe

von 25 μM cAMP eine Aufregulation der Expressionsrate von vHE beobachtet werden. Die relative Expression fällt anschließend mit steigender cAMP-Konzentration in geringem Maße, jedoch kontinuierlich ab. Nachdem der Zusatz entzogen wurde, erreicht die Expressionsrate der vakuolären HATPase E ihren Minimalwert.

Eine Stimulation der relativen Expression von NHE1 kann ausschließlich nach Inkubation mit PGE2 beobachtet werden. Mit zunehmender Inkubationsdauer steigen die relativen Expressionsraten kontinuierlich an. Erst nach Entzug des Zusatzes sinkt die Expression wieder ab. Die Expression von AE2 sowie der vakuolären HATPase E steigt bereits nach einer Inkubationsdauer von 6 h auf Werte bis zum 20-fachen der Ausgangswerte an; bei weiterer Verlängerung der Inkubationsdauer zeigt sich jedoch ein kontinuierlicher Rückgang der Expressionsraten. Nach Entzug des PGE2-Zusatzes sinkt die Expression wieder ab. Bei den relativen Expressionsraten der vakuolären HATPase B sowie des HSP ist kein Zusammenhang zwischen der applizierten PGE2-Dosis und dem beobachteten Effekt (Dosis-Wirkungs-Beziehung) nachweisbar.