

## 4. ERGEBNISSE:

### 4.1. Ergebnisse der Ussing-Kammer-Versuche:

#### 4.1.1. Zellmodell:

Grundlage der im weiteren Verlauf dieser Arbeit aufgestellten und überprüften Hypothesen über den  $\text{HCO}_3^-$ -Transport am Psalter des Schafes ist das in der Abb. 9 dargestellte Schema über die bisher im Psalterepithel vermuteten Transportproteine.

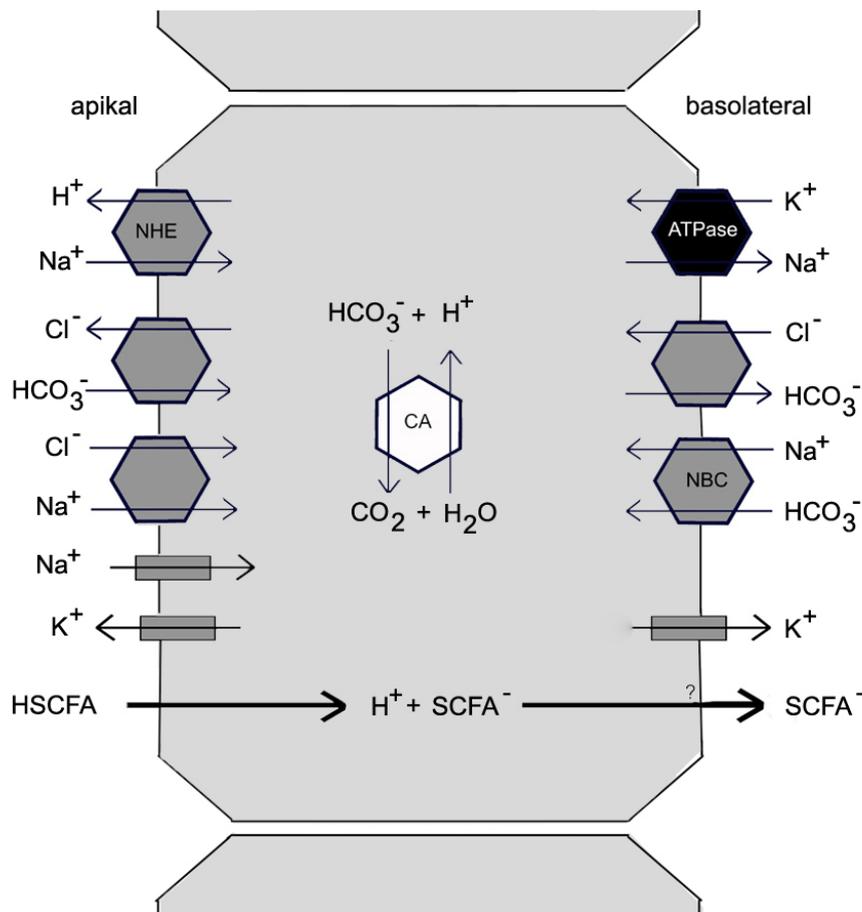


Abb. 9 Das Modell zeigt die bisher bekannten und vermutlich am Bikarbonat-Transport beteiligten Transporter und deren Zusammenhänge. Die grau unterlegten Sechsecke symbolisieren Carrierproteine, das schwarzgefüllte die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Die Zylinder geben Ionenkanäle wieder.

#### 4.1.2. Vorversuche: Zeitliche Stabilität der Parameter:

Zur weiteren Etablierung der Messmethode und um festzustellen, wie lange die Epithelien unter den gegebenen Versuchsbedingungen stabile Transportraten aufweisen, wurden mehrere Vorversuche durchgeführt. Dabei wurden die elektrischen Parameter und die Transportraten gemessen und zusammen in einem Diagramm gegen die Zeit aufgetragen.

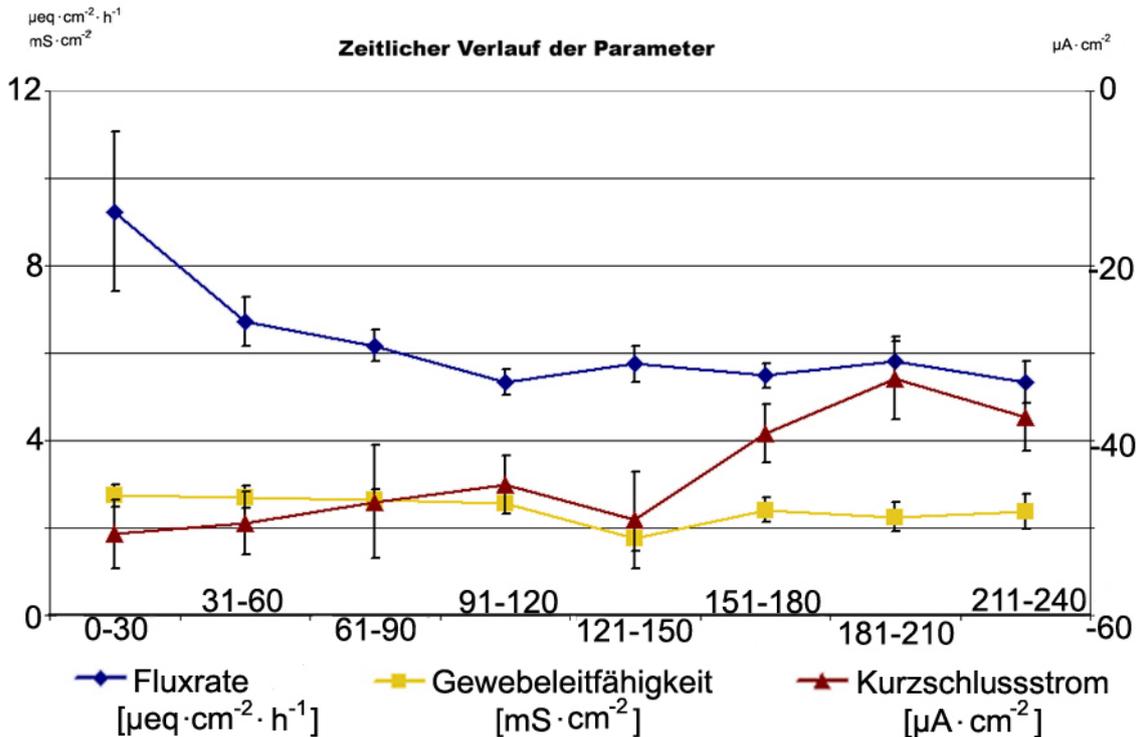


Abb. 10 Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf des Bikarbonat-Transports (jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM) in mukosal  $\rightarrow$  serosale Richtung, den zeitlichen Verlauf des  $I_{sc}$  sowie der Leitfähigkeit ( $G_t$ ). Es zeigt sich, dass der  $\text{HCO}_3^-$ -Transport in den ersten 30 - 60 Minuten stark abfällt und dann für die restliche Versuchszeit weitgehend konstante Transportraten aufweist. Die Gewebeleitfähigkeit ( $G_t$ ) verändert sich im gleichen Zeitraum kaum, der Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) verringert sich über die Zeit.

#### 4.1.3. Variation der Elektrolytkonzentrationen:

Der generelle Aufbau und die Durchführung der Versuche ist bei allen drei Ansätzen gleich und wurde im Kapitel 3.8.2 beschrieben.

##### 4.1.3.1. Vergleich $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{HCO}_3^-$ und $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{HCO}_3^-$ mukosal:

In dieser Versuchsserie wurde die Abhängigkeit des Transportes von der mukosal angebotenen  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration geprüft.

Alle Epithelien wurden in der ersten Fluxperiode mit mukosal  $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{HCO}_3^- / 25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{Cl}^-$  und serosal mit  $0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{HCO}_3^- / 100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{Cl}^-$  (Kontrollpuffer 1 + 2) inkubiert. Anschließend wurde ein Pufferwechsel bei allen Epithelien vorgenommen, wobei die Kontrollepithelien mit neuem Kontrollpuffer befüllt wurden und bei den Versuchsepithelien auf einen Puffer mit mukosal  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{HCO}_3^- / 25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{Cl}^-$  und serosal  $0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{HCO}_3^- / 100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{Cl}^-$  gewechselt wurde (Puffer 2 +3). Da sich bei höherer  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration und gleichem  $\text{CO}_2$ -Angebot der pH-Wert verändern würde, musste gleichzeitig auch das  $\text{CO}_2$ -Angebot verdoppelt werden. Dies wurde durch eine Umstellung auf 10% iges Carbogen erreicht.

Bei den Versuchsepithelien kam es zu einer Erhöhung des Transportes durch das höhere  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -Angebot auf  $127,19 \pm 14,38 \%$  in Flux 2 und auf  $161,60 \pm 15,63 \%$  in Flux 3 bezogen auf Flux 1 (siehe Tab. 12). Berücksichtigt man die zeitabhängige Verringerung des Transportes, kann man davon ausgehen, dass sich der Transport bei doppeltem Bikarbonat-Angebot in etwa verdoppelt.

Tab. 12 Effekte der Verdoppelung des  $\text{HCO}_3^-$  Gradienten (muk  $\rightarrow$  sero). Es werden die Mittelwerte und SEM der Differenzen von Flux 2 und 3 zu Flux 1 und der Prozentsatz von Flux 2 und 3 zu Flux 1 angegeben.

Heu + $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$	Tier (N) und Epithelanzahl (n)	Differenz zu Flux 1	% von Flux1
Kontrolle	N = 4 n = 6	F2-F1: $-0,86 \pm 0,34$	$77,21 \pm 7,66$
	N = 4 n = 6	F3-F1: $-1,15 \pm 0,59$	$74,84 \pm 9,45$
$50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$	N = 4 n = 6	F2-F1: $1,35 \pm 0,68$ (p= 0,069)	$127,19 \pm 14,38$
	N = 4 n = 6	F3-F1: $2,68 \pm 0,71^*$ (p=0,036)	$161,60 \pm 15,63$

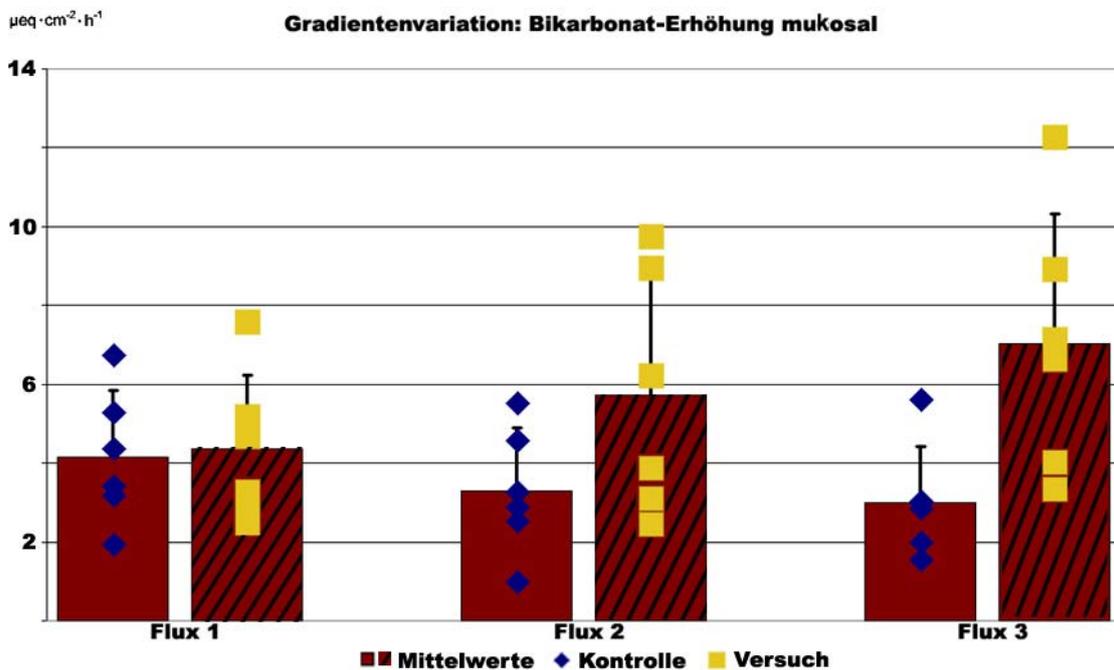


Abb. 11 Streudiagramm der Einzelergebnisse. Es werden die Fluxperioden jeweils getrennt dargestellt. Zu sehen ist, dass sich in den Kontrollen die mittleren Fluxraten über die Zeit verringern, die Fluxe der Versuchsepithelien dagegen beginnen wesentlich weiter zu streuen, steigen im Mittel jedoch an. (Wechsel der mukosalen  $\text{HCO}_3^-$  - Konzentration nach der 1. Fluxperiode)

Die Abbildung (Abb. 11) zeigt, dass es sich um eine heterogene Reaktion handelte und nicht alle Tiere gleich stark reagiert haben. Infolge der starken Streuung lässt sich in Flux 2 kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen berechnen ( $p=0,069$ ; siehe Tab. 12). Erst in Flux 3 wird die Steigerung des Transportes so deutlich, dass sich ein signifikanter Unterschied ergibt ( $p=0,036$ ; Tab. 12). Die Abb. 11 zeigt, dass die zeitabhängige Veränderung der Transportraten erst in der 3. Fluxperiode zu einer der Konzentration des  $\text{HCO}_3^-$ -Gradienten proportionalen Fluxrate führt.

Im Mittel steigen die Transportraten der Versuchsepithelien von  $4,35 \pm 0,77 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  in Flux 1 ( $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{HCO}_3^-$ ) auf  $5,71 \pm 1,26$  und  $7,04 \pm 1,34 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  in Flux 2 und 3 ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{HCO}_3^-$ ) an.

Da bei Epithelien von an Krafffutter (KF) adaptierten Tieren mit höheren Transportraten gerechnet wurde, wurden diese Versuche ausschließlich mit  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{HCO}_3^-$  durchgeführt. Entsprechend wurden Versuche, bei denen ein Vergleich zwischen den Fütterungen geprüft werden sollte, einheitlich mit  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{HCO}_3^-$  durchgeführt.

#### 4.1.3.2. Chloridreduktion serosal:

Um die in der Literatur beschriebene  $\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit des  $\text{HCO}_3^-$ -Transportes näher zu prüfen sowie um Chlorid als eine der treibenden Kräfte zu bestätigen, wurde bei diesem Versuchsansatz nach Flux 1 serosal die Konzentration von  $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf  $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{Cl}^-$  verringert (Puffer 6).  $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  entsprachen der mukosalen  $\text{Cl}^-$ -Konzentration, so dass nur noch der  $\text{HCO}_3^-$ -Gradient als treibende Kraft vorlag.

Wie der Tab. 13 und auch der Graphik (Abb. 12) zu entnehmen ist, kommt es durch die serosale Chloridreduktion zu einem hochsignifikanten Abfall der Transportraten von  $\text{HCO}_3^-$  von anfänglich  $6,09 \pm 0,69 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  auf  $2,91 \pm 0,81$  und  $2,42 \pm 0,52 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  nach dem Pufferwechsel. Dies entspricht einer relativen Reduktion von etwa 22 - 23 % im Vergleich zu den Kontrollepithelien und bestätigt die Abhängigkeit des  $\text{HCO}_3^-$ -Transportes von einem  $\text{Cl}^-$ -Gradienten mit Hilfe der Anionenaustauscher. Der signifikante Anstieg im Kurzschlussstrom von  $-72,93 \pm 7,11 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  auf  $-22,22 \pm 2,64$  und  $-16,51 \pm 2,99 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  ist auf die veränderten Gradienten für  $\text{Cl}^-$  zurückzuführen. Da  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  die Hauptträger des  $I_{\text{sc}}$  sind, reagiert dieser natürlich auch auf Veränderungen der (passiven) Gradienten.

Der verbleibende  $\text{HCO}_3^-$ -Transport nach der serosalen  $\text{Cl}^-$ -Reduktion und Aufhebung des transepithelialen  $\text{Cl}^-$ -Gradienten ( $\text{Cl}^-$  serosal =  $\text{Cl}^-$  mukosal) ist wahrscheinlich auf den immer noch vorhandenen und mit  $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  relativ großen Gradienten von  $\text{HCO}_3^-$  zurückzuführen.

Tab. 13 Es wird der Effekte der serosalen  $\text{Cl}^-$  Reduktion auf die  $\text{HCO}_3^-$  Fluxraten dargestellt, zu sehen sind die Differenzen von Flux 2 und 3 zu Flux 1 und der Prozentsatz von Flux 2 und 3 zu Flux 1.

Heu + 25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{HCO}_3^-$	Tier (N) und Epithelanzahl (n)	Differenz zu Flux 1	% von Flux1
Kontrolle	N = 4, n = 6	F2-F1: $-1,26 \pm 0,44$	$67,13 \pm 13,23$
	N = 4, n = 6	F3-F1: $-1,57 \pm 0,26$	$63,64 \pm 9,51$
$\text{Cl}^-$ -Reduktion	N = 4, n = 6	F2-F1: $-3,18 \pm 0,51^{**}$ ( $p=0,006$ )	$44,74 \pm 10,60$
	N = 4, n = 6	F3-F1: $-3,66 \pm 0,85^*$ ( $p=0,035$ )	$41,23 \pm 8,58$

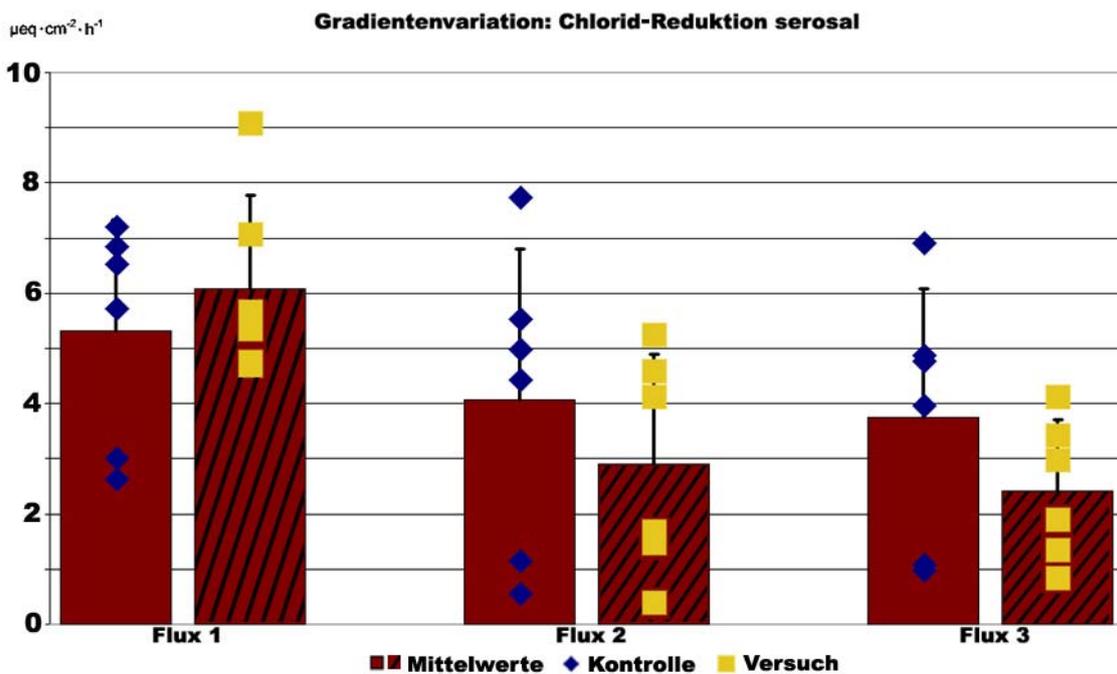


Abb. 12 Das Streudiagramm gibt eine Übersicht über die im Einzelnen gemessenen Transportraten, die Balken geben die Mittelwerte zusammen mit dem SEM wieder. Der Transport verringert sich signifikant von  $6,09 \pm 0,69 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  auf  $2,91 \pm 0,81$  und  $2,42 \pm 0,52 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ .

#### 4.1.3.3. Einfluss der mukosalen Chloridkonzentration:

In diesem Versuchsansatz sollte die Wirkung einer Erhöhung der mukosalen  $\text{Cl}^-$ -Konzentration simuliert und auf diese Weise geprüft werden, ob es zu einer Beeinflussung des  $\text{HCO}_3^-$ -Transportes kommt, wenn der  $\text{Cl}^-$ -Gradient auf der mukosalen Seite aufgehoben wird. Hierfür wurde nach Flux 1 der mukosale Puffer (Puffer 2,  $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$ ) gewechselt und bei den Versuchsepithelien gegen einen Puffer mit  $90 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$  ausgetauscht (Puffer 4+5; serosal =  $90 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$ ). Es ist zu sehen, dass die Erhöhung der mukosalen  $\text{Cl}^-$ -Konzentration auf  $90 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  unter den gegebenen Versuchsbedingungen keinen Effekt auf den  $\text{HCO}_3^-$ -Transport hatte. Der Transport wurde von  $8,60 \pm 0,98 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  in Flux 1 auf  $6,12 \pm 1,07$  und  $5,52 \pm 0,97 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  in den Fluxen 2 und 3 reduziert. Im Vergleich dazu haben sich die Fluxe der Kontrollepithelien in der gleichen Zeit von  $10,16 \pm 2,49$  auf  $7,04 \pm 1,48$  bzw.  $6,69 \pm 1,16 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  verringert. Dies ist mit Irrtumswahrscheinlichkeiten von  $p= 0,697$  (Flux 2) und  $p= 0,495$  (Flux 3) stärker durch die individuellen Unterschiede bedingt als durch die Behandlung ( $\text{Cl}^-$ -Erhöhung).

Tab. 14 Die Tabelle zeigt die Veränderungen, die durch die Aufhebung des mukosalen Gradienten für  $\text{Cl}^-$  hervorgerufen werden. Es werden die Mittelwerte und SEM der Differenzen von Flux 2 und 3 zu Flux 1 und der Prozentsatz von Flux 2 und 3 zu Flux 1 angegeben.

Heu + $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$	Tier (N) und Epithelanzahl (n)	Differenz zu Flux 1	% von Flux1
Kontrolle	N = 4 n = 5	F2-F1: $-3,12 \pm 1,22$	$71,26 \pm 4,72$
	N = 4 n = 5	F3-F1: $-3,48 \pm 1,47$	$71,47 \pm 6,45$
$\text{Cl}^-$ Erhöhung	N = 4 n = 6	F2-F1: $-2,48 \pm 0,55$ ( $p= 0,697$ )	$70,55 \pm 6,17$
	N = 4 n = 6	F3-F1: $-2,85 \pm 0,52$ ( $p= 0,495$ )	$68,34 \pm 5,23$

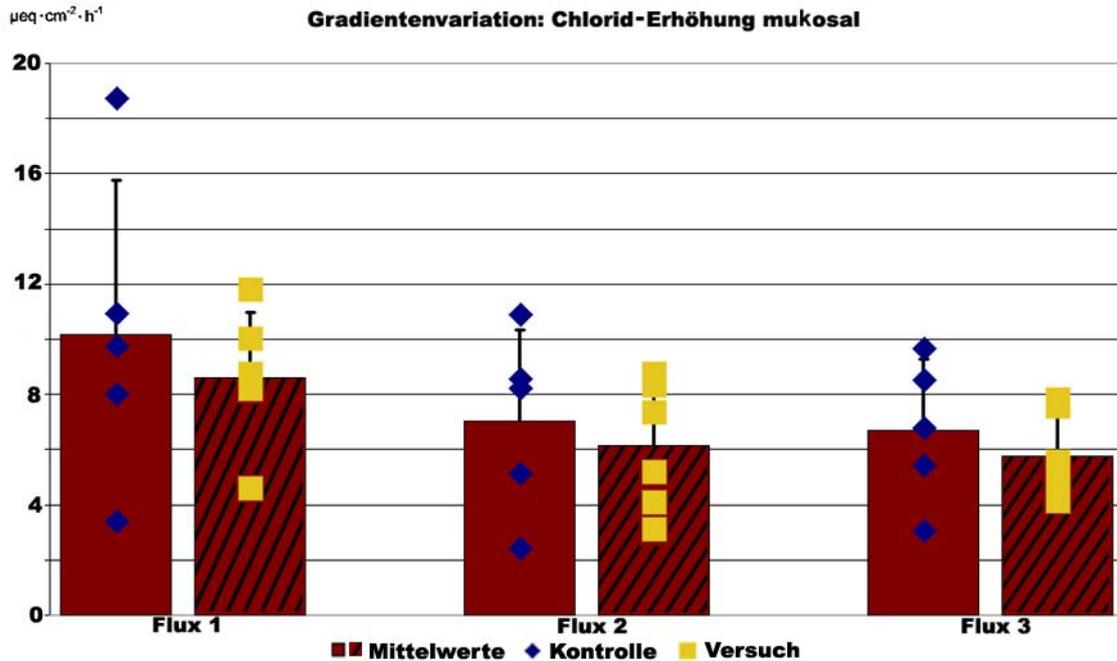


Abb. 13 In der Abbildung kann kein Einfluss, der Konzentrationserhöhung von  $\text{Cl}^-$  auf der mukosalen Seite auf die Transportraten von  $\text{HCO}_3^-$  gezeigt werden. Die Balken geben die Mittelwerte  $\pm$  SEM der  $\text{HCO}_3^-$ -Fluxe wieder, die Rauten und Vierecke stellen die Verteilung der einzelnen Transportraten dar.

#### 4.1.4. Hemmstoffe:

##### 4.1.4.1. Hemmung des Anionenaustauschers durch DIDS:

Sehr vielen aus der Literatur bekannten  $\text{Cl}^-$ /Anionenaustauschern ist gemeinsam, dass sie sich durch Stilbenderivate, z.B. DIDS, hemmen lassen. SLC4 und SLC26, die von ihren bisher bekannten Eigenschaften wahrscheinlichsten Familien der  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher, zeichnen sich durch zumindest teilweise Hemmbarkeit durch Stilbene aus. Die meisten dieser Austauscher haben ein Stilbenbindungsmotiv (Boron, 2001).

In diesem Versuchsansatz wurde unter Standardbedingungen (Puffer 2+3) inkubiert und vor Flux 2 DIDS in einer Konzentration von  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  zugegeben. Zeitgleich wurde die gleiche Menge an reinem Lösungsmittel (DMSO,  $100\mu\text{l}$ ) bei den Kontrollkammern zugegeben.

Um weiterhin einen Eindruck davon zu bekommen, ob der Anteil, der durch das Anionenaustauschersystem transportiert wird, durch unterschiedliche Fütterung beeinflusst wird, wurde dieser Versuch sowohl mit Epithelien von an Heufütterung adaptierten Tieren als auch mit an Kraftfutter adaptierten Tieren durchgeführt.

**Mit Heu gefütterte Tiere:**

Es zeigt sich eine deutliche Reduktion der Transportraten nach DIDS-Zugabe. Sie sinken von  $9,61 \pm 0,84$  auf  $6,42 \pm 1,07$  und  $4,81 \pm 0,95 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ . Dies entspricht einer Reduktion von 10,96% in Flux 2 und 21,77% in Flux 3. Allerdings scheint die volle Hemmung des Transportes erst in der 3. Fluxperiode ausgeprägt zu sein. Dies könnte daran liegen, dass DIDS eine kovalente Bindung innerhalb des aktiven Zentrums des Transportes eingeht (Cabantchik und Greger, 1992), dies und die relativ große Molekularmasse von 498,5M könnte dazu führen, dass DIDS u.U. länger benötigt, um einen messbaren Effekt auszulösen.

Tab. 15 Die Wirkung von DIDS bei Epithelien der mit Heu gefütterten Tieren. Es werden die Mittelwerte und SEM der Differenzen von Flux 2 und 3 zu Flux 1 und der Prozentsatz von Flux 2 und 3 zu Flux 1 angegeben.

Heu + 50 mmol·l <sup>-1</sup> HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Tier (N) und Epithelanzahl (n)	Differenz zu Flux 1	% von Flux1
Kontrolle	N = 4 n = 6	F2-F1: -2,60 ± 0,72	68,85 ± 3,68
	N = 4 n = 6	F3-F1: -3,31 ± 0,79	58,11 ± 3,55
DIDS	N = 4 n = 6	F2-F1: -3,20 ± 0,389 (p= 0,57)	57,89 ± 8,23
	N = 4 n = 6	F3-F1: -4,81 ± 0,72* (p=0,02)	36,34 ± 5,81

**Mit KF gefütterte Tiere:**

Obwohl die Transportraten insgesamt niedriger sind als bei den Heutieren, kann auch bei den KF-Tieren eine nicht ganz signifikante und in Flux 3 signifikante Reduktion der Transportraten nach DIDS-Zugabe beobachtet werden. Sie sinken von  $4,87 \pm 0,40$  auf  $3,00 \pm 0,36$  und  $2,83 \pm 0,35 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ . Dies entspricht einer Reduktion von 19,40% sowie 19,27% bei KF-Tieren. Auch hier kann festgestellt werden, dass die volle Hemmwirkung von DIDS erst später einsetzt, jedoch scheinbar etwas (nicht signifikant) früher als bei den mit Heu gefütterten Tieren.

Für die generell schlechteren Transportraten bei den KF-Tieren dieses Versuchs kommen zwei mögliche Erklärungen in Frage: entweder es kamen in dieser Versuchsreihe bei den KF gefütterten Tieren schlechter transportierende Epithelien zum Einsatz oder aber die KF-Tiere transportieren generell schlechter.

Tab. 16 Die Wirkung von DIDS bei Epithelien von KF gefütterten Tieren. Es werden die Mittelwerte und SEM der Differenzen von Flux 2 und 3 zu Flux 1 und der Prozentsatz von Flux 2 und 3 zu Flux 1 angegeben.

KF + 50 mmol·l <sup>-1</sup> HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Tier (N) und Epithelanzahl (n)	Differenz zu Flux 1	% von Flux1
Kontrolle	N = 4 n = 6	F2-F1: -0,97 ± 0,52	80,92 ± 11,21
	N = 4 n = 6	F3-F1: -1,02 ± 0,61	77,35 ± 11,71
DIDS	N = 4 n = 6	F2-F1: -1,86 ± 0,26 (p= 0,088)	61,52 ± 4,81
	N = 4 n = 6	F3-F1: -2.04 ± 0,26* (p= 0,035)	58,08 ± 4,39

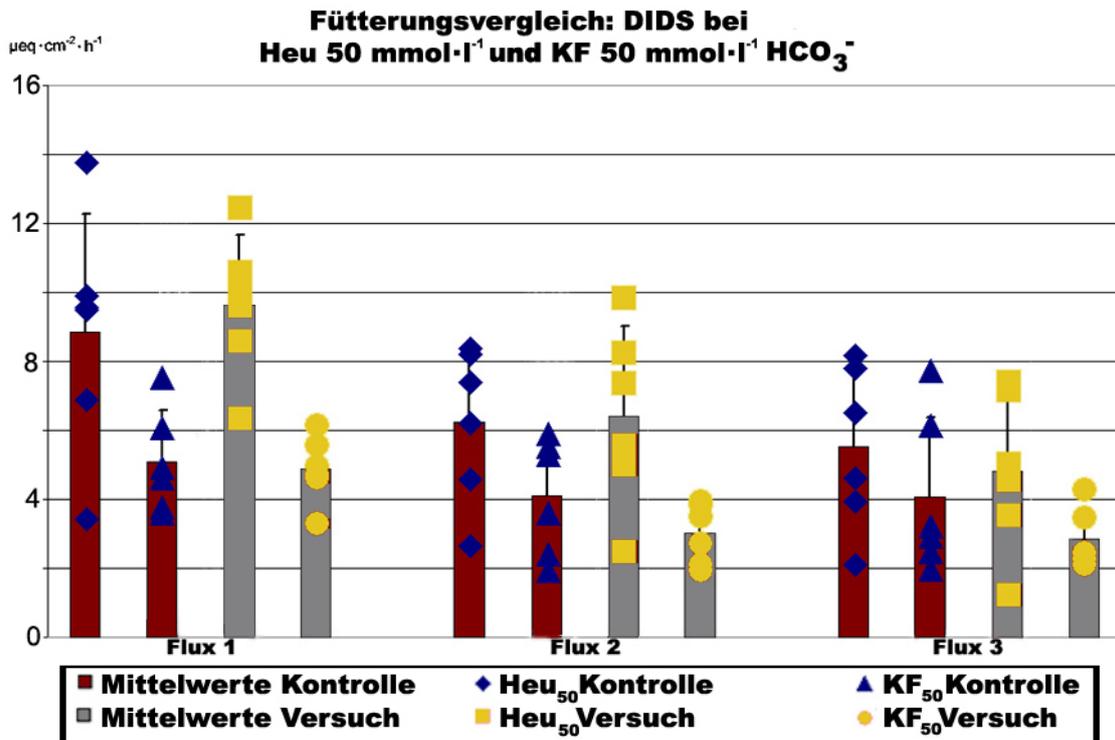


Abb. 14 Das Diagramm zeigt die Wirkung von DIDS im Vergleich Heu/KF getrennt nach Kontroll- und Versuchsepithelien (DIDS-Zugabe nach der 1. Flux). Dabei stellen die Balken und Fehlerindikatoren jeweils die Mittelwerte und SEM dar, die Punktwolken zeigen die Verteilung der einzelnen Epithelien.

#### 4.1.4.2. Hemmung des $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers (NHE) durch Amilorid:

Die Versuche erfolgten unter Standardbedingungen mit  $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$  mukosal (Puffer 1 + 2). Amilorid hemmt in der verwendeten Konzentration von  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  mukosal den in der apikalen Membran lokalisierten  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher mit der Folge, dass die  $\text{H}^+$  nicht aus der Zelle heraus transportiert werden und werden der pH-Wert in der Zelle (pHi) absinkt. Die Protonen reagieren zum Teil mit dem  $\text{HCO}_3^-$  und zu  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{CO}_2$  umgesetzt (Pufferung des Zellmilieus). Als Folge müsste sich eine Verringerung des  $\text{HCO}_3^-$ -Transportes ergeben.

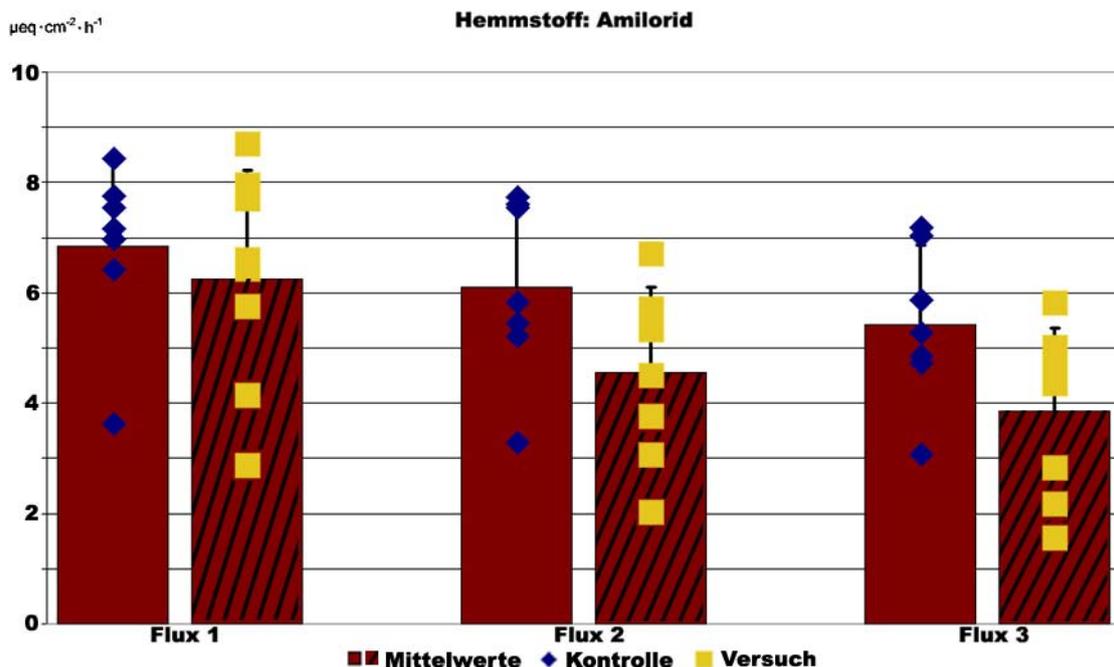


Abb. 15 Das Diagramm zeigt die Wirkung der Amilorid-Zugabe nach Flux 1 bei  $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$  auf der mukosalen Seite. Es werden jeweils die Einzelergebnisse als Streudiagramm sowie die Mittelwerte und SEM als Balkendiagramm, aufgeteilt nach Versuch und Kontrolle und getrennt nach Fluxperioden, dargestellt. Durch die mukosale Zugabe von Amilorid kommt es zu einer durchschnittlich 20%igen Verringerung der  $\text{HCO}_3^-$ -Transportrate.

Es ergab sich ein Transport von  $6,26 \pm 0,70 \text{ } \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  bei den Versuchsepithelien, der sich nach Amilorid-Zugabe auf  $4,56 \pm 0,54$  und  $3,89 \pm 0,53 \text{ } \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  reduzierte ( $p= 0,041$  &  $0,054$ , siehe Tab. 17).

Tab. 17 Inkubiert wurde mit  $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$  mukosal, die Amilorid-Zugabe erfolgte nach Flux 1. Es werden die Mittelwerte und SEM der Differenzen von Flux 2 und 3 zu Flux 1 und der Prozentsatz von Flux 2 und 3 zu Flux 1 angegeben.

Heu + $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$	Tier (N) und Epithelanzahl (n)	Differenz zu Flux 1	% von Flux1
Kontrolle	N = 5 n = 7	F2-F1: $-0,75 \pm 0,48$	$89,72 \pm 6,02$
	N = 5 n = 7	F3-F1: $-1,41 \pm 0,49$	$80,35 \pm 5,78$
Amilorid	N = 5 n = 8	F2-F1: $-1,70 \pm 0,29^*$ ( $p= 0,041$ )	$72,90 \pm 3,25$
	N = 5 n = 8	F3-F1: $-2,39 \pm 0,43^*$ ( $p=0,054$ )	$61,38 \pm 5,28$

#### 4.1.4.3. Hemmung der Carboanhydrase (CA) durch Ethoxzolamid:

Die Carboanhydrase ist ein phylogenetisch sehr altes Enzym, das ubiquitär vorkommt und für die Regulierung des intrazellulären pH-Wertes wichtig ist. Eine Hemmung des Enzyms führt je nach äußerer Belastung zur Alkalisierung (hohes Angebot an  $\text{HCO}_3^-$ ) oder zur Ansäuerung (hohes Angebot an Säuren, z.B.  $\text{CO}_2$  oder  $\text{H}^+$ ) des Zellinneren.

Wie in Kap. 4.1.4.2 bereits beschrieben, ist der  $\text{HCO}_3^-$ -Transport sehr stark mit dem intrazellulären pH-Wert gekoppelt. Bei diesem Versuchsansatz sollte geklärt werden, ob die CA am  $\text{HCO}_3^-$ -Transport beteiligt ist.

Dafür wurden die Epithelien unter Standardbedingungen (Puffer 2+3) inkubiert und vor Flux 2 wurde  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Ethoxzolamid mukosal zugegeben. Da das Lösungsvolumen sehr klein war ( $20\mu\text{l}$ ) und in früheren Versuchen keinerlei Reaktion auf DMSO zu erkennen war, wurde hier auf eine DMSO-Zugabe bei den Kontrollepithelien verzichtet.

Weiterhin sollte auch geklärt werden, ob sich die Bedeutung der CA bei hohem und niedrigem  $\text{HCO}_3^-$ -Gradienten und zwischen Heu- und KF-gefütterten Tieren unterscheidet.

In allen Fällen reduzierte sich der Transport nach Ethoxzolamid-Zugabe.

#### Inkubation mit $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$ ; Heu:

Bei den Versuchsepithelien der mit Heu gefütterten Tiere und geringem  $\text{HCO}_3^-$ -Angebot reduzierte sich der Transport von  $4,39 \pm 0,49 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  in Flux 1 auf  $2,41 \pm 0,30$  und  $1,86 \pm 0,32 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  in den Fluxen 2 und 3. Dies ist hochsignifikant ( $p= 0,018$  &  $0,001$ , siehe Tab. 18)

Tab. 18 Niedriger  $\text{HCO}_3^-$ -Gradient ( $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) und Ethoxyzolamid-Zugabe ( $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) nach der ersten Fluxperiode. Angegeben sind die Differenzen zu Flux 1 der Transportraten (Mean  $\pm$  SEM) sowie der prozentuale Anteil von Flux 1.

Heu $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$	Tier (N) und Epithelanzahl (n)	Differenz zu Flux 1	% von Flux1
Kontrolle	N = 4, n = 6	F2-F1 : $-1,24 \pm 0,39$	$77,92 \pm 3,20$
	N = 4, n = 6	F3-F1 : $-0,90 \pm 0,34$	$84,56 \pm 5,95$
Ethoxyzolamid	N = 4, n = 6	F2-F1 : $-1,98 \pm 0,35^{**}$ ( $p=0,018$ )	$55,58 \pm 6,11$
	N = 4, n = 6	F3-F1 : $-2,53 \pm 0,20^{**}$ ( $p=0,001$ )	$41,32 \pm 2,64$

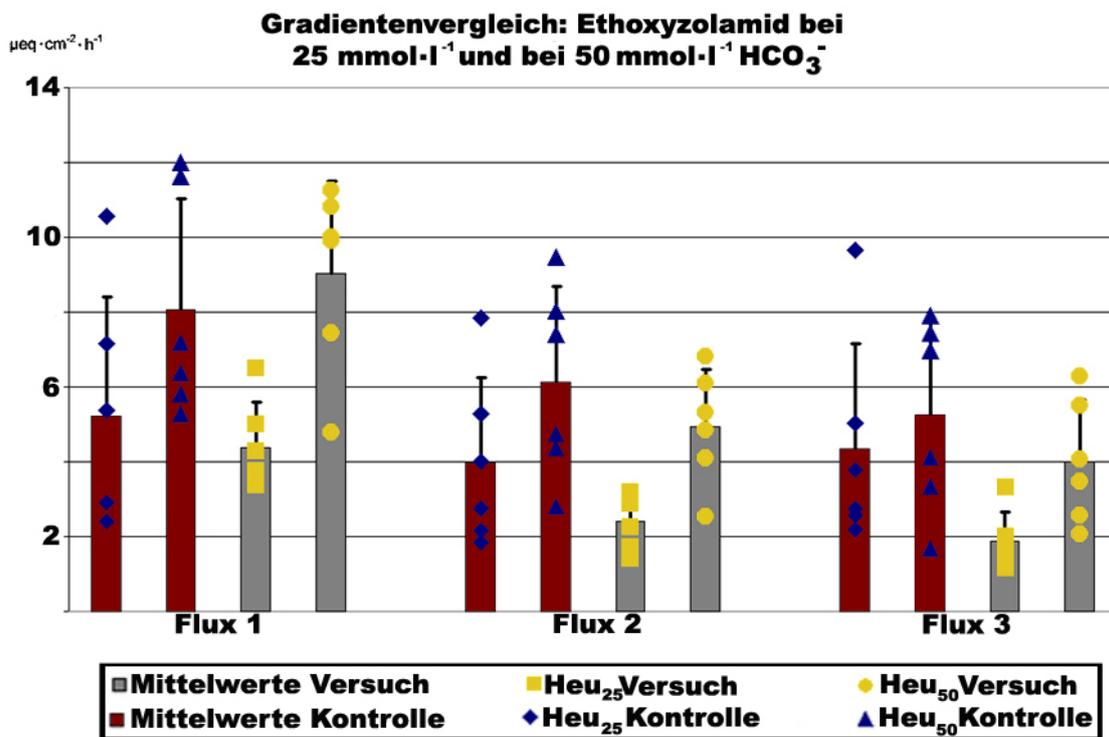


Abb. 16 Die Abbildung zeigt den direkten Vergleich zwischen niedrigem und hohem Bikarbonatgradient (jeweils Mittelwert  $\pm$  SEM). Die Zugabe von Ethoxyzolamid erfolgte ( $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; mukosal) nach Flux 1. Es ist zu erkennen, dass die Epithelien, die ein hohes  $\text{HCO}_3^-$ -Angebot hatten, weniger stark auf die Zugabe von Ethoxyzolamid reagieren.

**Inkubation mit  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$ ; Heu:**

Bei Heu und hohem  $\text{HCO}_3^-$ -Angebot reduziert sich der Transport nicht mehr ganz so drastisch, aber immer noch signifikant von  $9,03 \pm 1,01 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  in Flux 1 auf  $4,92 \pm 0,62$  und  $3,99 \pm 0,68 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  in den Fluxen 2 und 3 ( $p= 0,016$  &  $0,047$ ; siehe Tab. 19).

Tab. 19 Hoher  $\text{HCO}_3^-$ -Gradient ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) und Ethoxazolamid-Zugabe ( $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) nach der ersten Fluxperiode. Angegeben sind die Differenzen zu Flux 1 der Transportraten (Mean  $\pm$  SEM) sowie der prozentuale Anteil von Flux 1.

Heu $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$	Tier (N) und Epithelanzahl (n)	Differenz zu Flux 1	% von Flux1
Kontrolle	N = 4 n = 6	F2-F1 : $-1,91 \pm 0,54$	$75,71 \pm 6,79$
	N = 4 n = 6	F3-F1 : $-2,81 \pm 0,62$	$63,49 \pm 8,46$
Ethoxazolamid	N = 4 n = 6	F2-F1 : $-4,09 \pm 0,44^*$ ( $p= 0,016$ )	$54,40 \pm 1,59$
	N = 4 n = 6	F3-F1 : $-5,04 \pm 0,65^*$ ( $p= 0,047$ )	$43,85 \pm 4,22$

#### Inkubation mit $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$ ; KF:

Auch bei den Versuchsepithelien der mit KF gefütterten Tiere und hohem  $\text{HCO}_3^-$ -Angebot reduziert sich der Transport durch Ethoxazolamid-Zugabe. Allerdings ist diese Reduktion von  $6,41 \pm 1,37 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  in Flux 1 auf  $5,97 \pm 0,75$  und  $4,85 \pm 0,35 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  in den Fluxen 2 und 3 nicht mehr signifikant ( $p= 0,365$  &  $0,085$ ; siehe Tab. 20)

Tab. 20 Hoher  $\text{HCO}_3^-$ -Gradient ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) und Epithelien von KF-gefütterten Tieren und Ethoxazolamid-Zugabe ( $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) nach der ersten Fluxperiode. Angegeben sind die Differenzen zu Flux 1 der Transportraten (Mean  $\pm$  SEM) sowie der prozentuale Anteil von Flux 1.

KF $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$	Tier (N) und Epithelanzahl (n)	Differenz zu Flux 1	% von Flux1
Kontrolle	N = 4 n = 6	F2-F1 : $0,33 \pm 0,27$	$110,59 \pm 6,83$
	N = 4 n = 6	F3-F1: $0,60 \pm 0,49$	$118,39 \pm 11,50$
Ethoxazolamid	N = 4 n = 6	F2-F1 : $-0,44 \pm 1,34$ ( $p=0,365$ )	$79,56 \pm 8,32$
	N = 4 n = 6	F3-F1 : $-1,57 \pm 1,38$ ( $p=0,085$ )	$68,44 \pm 9,62$



Tab. 21 Auswirkungen einer mukosalen Zugabe von HTZ ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) auf den Transport von  $\text{HCO}_3^-$ . Die Differenzen der Fluxe 2 und 3 weichen bei den Versuchsepithelien zum Teil hochsignifikant von den Differenzen der Fluxe 2 und 3 der Kontrollepithelien ab ( $p < 0,005$ ).

Heu $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{HCO}_3^-$	Tier (N) und Epithelanzahl (n)	Differenz zu Flux 1	% von Flux1
Kontrolle	N = 4, n = 5	F2-F1: $-0,59 \pm 0,40$	$91,40 \pm 6,29$
	N = 4, n = 5	F3-F1: $-1,53 \pm 0,30$	$74,64 \pm 3,41$
HTZ	N = 4, n = 6	F2-F1: $-2,00 \pm 0,56^{**}$ ( $p = 0,001$ )	$65,95 \pm 9,32$
	N = 4, n = 6	F3-F1: $-2,32 \pm 0,47^*$ ( $p = 0,028$ )	$60,67 \pm 6,69$

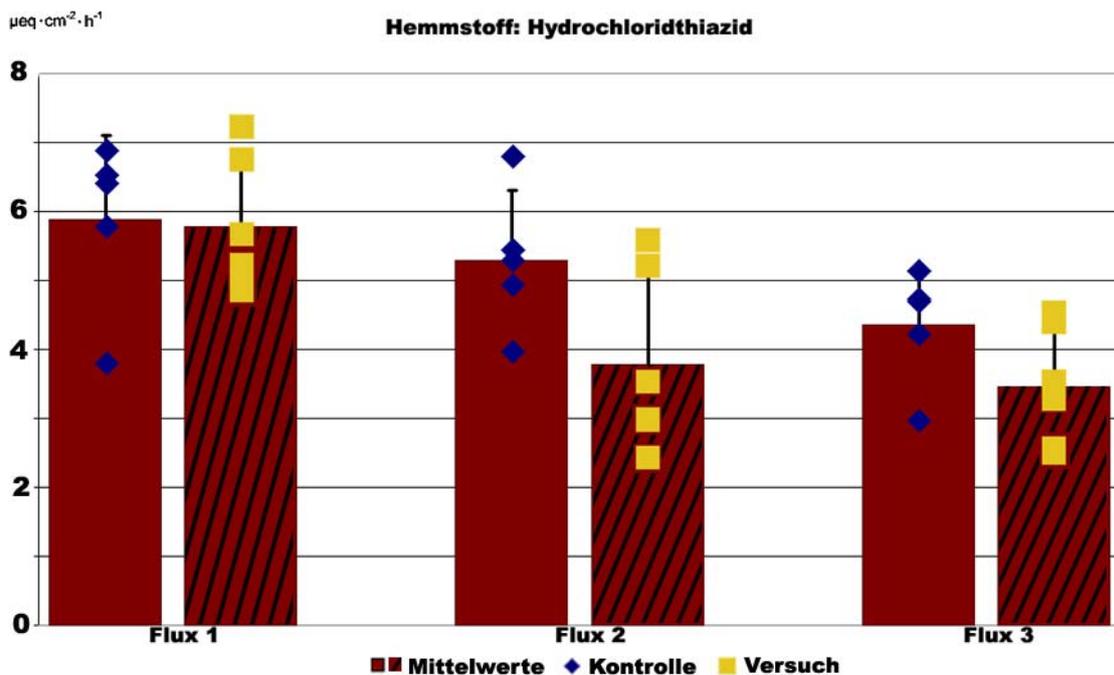


Abb. 18 Das Diagramm zeigt die Einzelergebnisse als Streudiagramm sowie die Mittelwerte und SEM als Balken mit Fehlerindikatoren, aufgeteilt nach Versuch und Kontrolle und getrennt nach Fluxperioden. Die Inkubation erfolgte mit  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{HCO}_3^-$ , und die HTZ-Zugabe ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  mukosal) erfolgte nach Flux 1.

Es kommt zu einer hochsignifikanten Reduktion des Transportes nach der Zugabe von HTZ (Flux1:  $5,78 \pm 0,40 \text{ µeq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ; Flux2:  $3,78 \pm 0,53 \text{ µeq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ; Flux3:  $3,56 \pm 0,35 \text{ µeq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Im Vergleich zur Kontrollgruppe wird der Transport um ca. 25% in Flux 2 und um ca. 14% in Flux 3 reduziert.

#### 4.1.5. Umkehr der Gradienten für $\text{Cl}^-$ und $\text{HCO}_3^-$ :

Die in der Abb. 9 vorgestellten Anionenaustauscher müssten prinzipiell den Transport von  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$  in beide Richtungen ermöglichen, wenn die Ionengradienten entsprechend eingesetzt werden. Dieser Versuchsansatz wurde mit einem Fütterungsversuch kombiniert.

Es sollte der  $\text{HCO}_3^-$ -Transport im Verlauf der Adaptation an eine energiereiche Diät protokolliert werden. Hierfür wurden die Tiere von Heu ad libitum auf eine Krafftutter/Heu-Mixdiät umgestellt. Untersucht wurden jeweils Tiere nach 0, 2, 4, 8, 14 und > 21 Tagen KF-Fütterung.

Es sollte untersucht werden, ob der Transport allein von den transepithelialen Gradienten abhängig ist und, wenn ja, ob er sich umkehren lässt, wenn die Gradienten entsprechend gewechselt werden. Ferner sollte geprüft werden, ob die absoluten Transportraten sich in Abhängigkeit von der Futterumstellung verändern (ansteigen).

Aus technischen Gründen (der Wechsel der Gradienten war an einem Epithel während des Versuches wegen der langen Äquilibrierungszeit nicht möglich) wurde von der üblichen Technik abgewichen und die Epithelien von Beginn an den Versuchsbedingungen ausgesetzt (Puffer 2 + 3; umgekehrtes Einspannen der Epithelien von Beginn an bei Beibehaltung aller anderen Parameter).

Dies führt zu einigen Besonderheiten bei der Auswertung, auf die jeweils hingewiesen wird.

Außerdem wurde geprüft, ob und wie sich der Gradientenwechsel bei niedrigem und hohem  $\text{HCO}_3^-$ -Gradienten auswirkt.

Bei dieser Versuchsreihe reagierten die Epithelien je nach Bedingung unterschiedlich auf die Versuchsdauer, daher werden jeweils die einzelnen Fluxperioden getrennt betrachtet.

Es werden jeweils der Mittelwert (Min, Max) in Prozent angegeben, wobei jeweils das Kontrollepithel als Basis (100%) dient.

Tab. 22 Die Tabelle zeigt die absoluten Transportraten muk  $\rightarrow$  sero und sero  $\rightarrow$  muk bei niedrigem und hohem  $\text{HCO}_3^-$ -Gradienten.

	25 mmol·l <sup>-1</sup> HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		50 mmol·l <sup>-1</sup> HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	muk $\rightarrow$ sero N = 4; n = 5	sero $\rightarrow$ muk N = 4; n = 6	muk $\rightarrow$ sero N = 4; n = 6	sero $\rightarrow$ muk N = 4; n = 6
Flux1	7,92 ± 1,04	3,90 ± 0,49	9,25 ± 2,66	6,62 ± 1,84
Flux2	7,08 ± 1,04	2,64 ± 0,51	7,15 ± 2,04	4,74 ± 1,50
Flux3	7,59 ± 0,49	3,47 ± 0,80	6,88 ± 2,02	3,84 ± 1,20

**Flux 1:**

Hier kann (wie schon in Kapitel 4.1.3.1) festgestellt werden, dass die Epithelien mit höherem  $\text{HCO}_3^-$ -Angebot im Mittel zwar einen höheren Transport aufweisen, jedoch auch eine wesentlich größere Streubreite haben als die Epithelien mit geringem  $\text{HCO}_3^-$ -Angebot. Dies wird bei umgekehrtem Gradienten deutlicher als bei physiologischem Gradienten.

Der prozentuale Anteil des serosal  $\rightarrow$  mukosalen (sero  $\rightarrow$  muk)-Transportes am physiologischen (mukosal  $\rightarrow$  serosal (muk  $\rightarrow$  sero)) beträgt bei niedrigem Gradienten nur 50,99% (22,18%; 81,22%), wohingegen dieser Prozentsatz bei hohem Gradienten 75,71% (27,74%; 134,41%) beträgt.

**Flux 2:**

Nach einer Stunde Inkubation sinken die Transportraten der sero  $\rightarrow$  muk Richtung im Vergleich zur Kontrolle (muk  $\rightarrow$  sero) bei den Epithelien mit hohem  $\text{HCO}_3^-$ -Angebot weniger stark ab als bei niedrigem  $\text{HCO}_3^-$ -Angebot.

Der prozentuale Anteil des sero  $\rightarrow$  muk-Transportes am physiologischen (muk  $\rightarrow$  sero) beträgt bei niedrigem Gradienten nur noch 34,35% (12,59%; 48,40%) (Reduktion um 16,64%), wohingegen dieser Prozentsatz bei hohem Gradienten nur auf 65,45% (16,99%; 80,85%) (Reduktion um 10,26%) abgesunken ist.

**Flux 3:**

Nach zwei Stunden Inkubation zeigt sich, dass die Epithelien mit geringem  $\text{HCO}_3^-$ -Transport konstantere Transportraten aufweisen als jene mit hohem  $\text{HCO}_3^-$ -Angebot. Dies zeigt sich sowohl bei physiologischer Transportrichtung (Absorption von  $\text{HCO}_3^-$ ) als auch bei unphysiologischer Transportrichtung (Sekretion von  $\text{HCO}_3^-$ )

Der prozentuale Anteil des sero  $\rightarrow$  muk-Transportes am muk  $\rightarrow$  sero steigt bei niedrigem Gradienten wieder auf 40,96% (21,75%; 84,81%) an (Reduktion um 10,03% im Vergleich zu Flux 1), wohingegen dieser Prozentsatz bei hohem Gradienten weiter abgesunken ist auf 54,20% (10,74%; 71,61%) (Reduktion um 21,50% im Vergleich zu Flux 1).

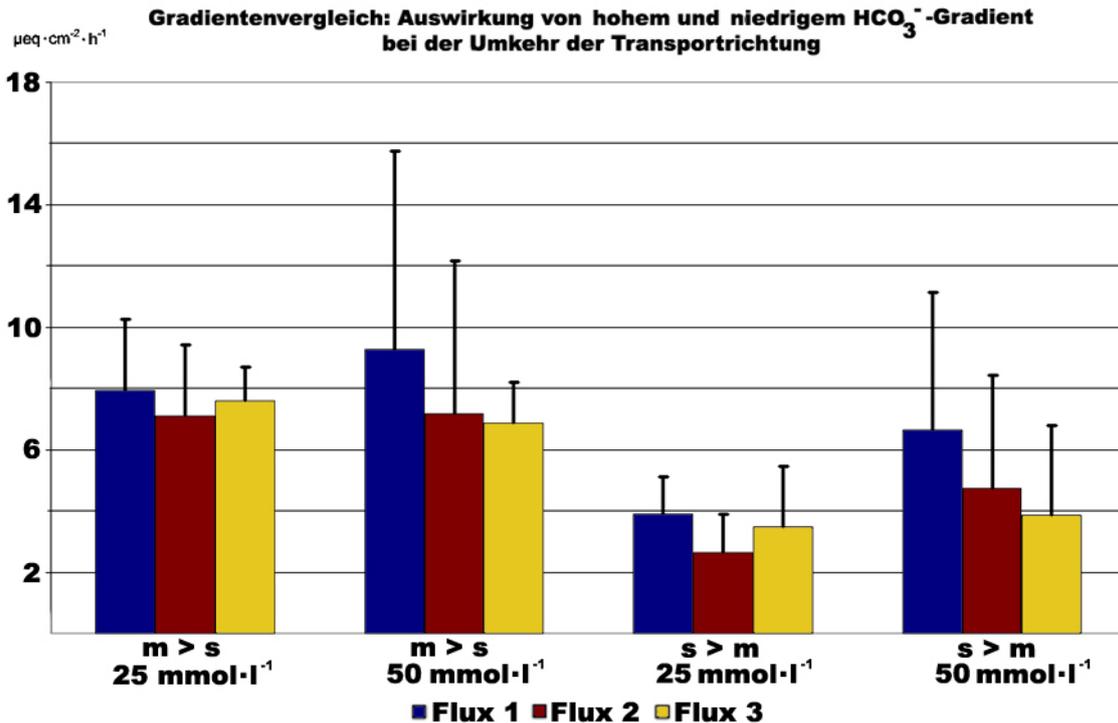


Abb. 19 Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Fluxraten von Heu-Tieren. Die ersten beiden Säulenkomplexe zeigen den physiologischen Transport bei niedrigem und hohem Gradienten, die hinteren beiden Säulenkomplexe zeigen den unphysiologischen Transport wiederum bei niedrigem und hohem Gradienten. Zu erkennen ist, dass der Transport bei niedrigem Gradienten über die Zeit stabiler ist als bei hohem Gradienten.

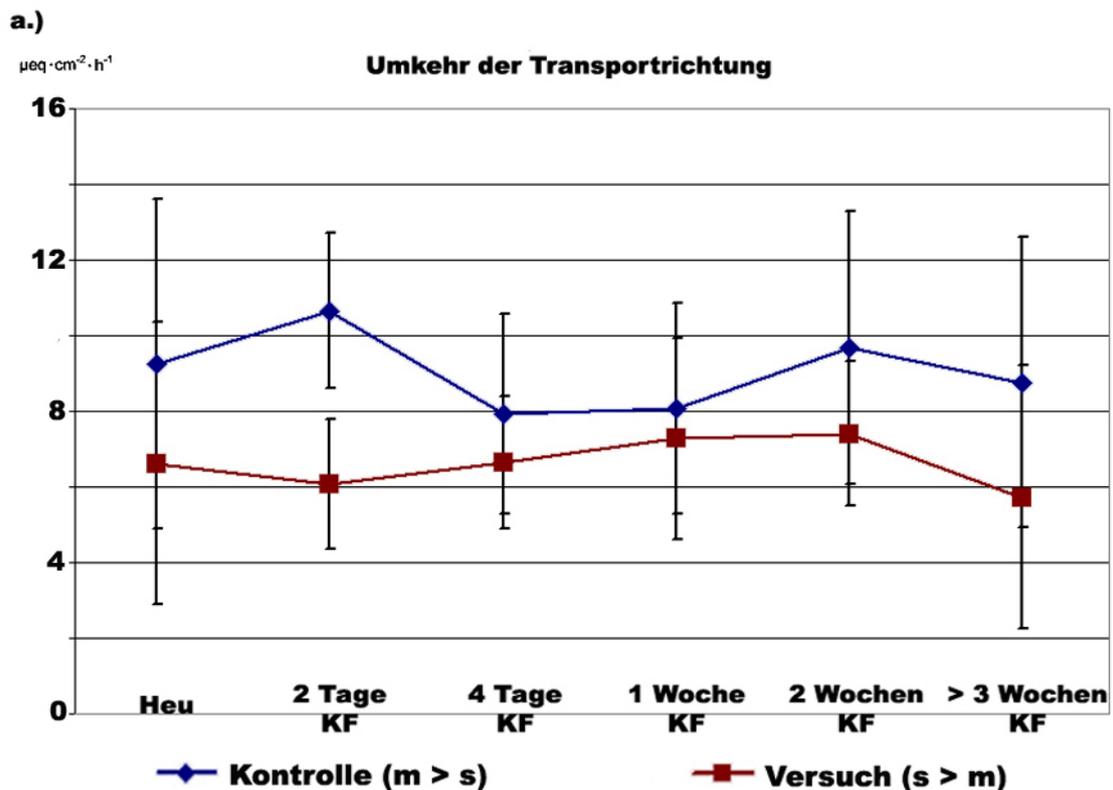
Tab. 23 Einfluss des umgekehrten Gradienten von  $\text{HCO}_3^-$  auf den  $\text{HCO}_3^-$ -Transport. Angegeben sind jeweils Mean  $\pm$  SEM des prozentualen Anteils des unphysiologischen (sero  $\rightarrow$  muk) Transportes am Kontrolltransport (muk  $\rightarrow$  sero).

Bedingung	%-tualer Anteil in Flux1	%-tualer Anteil in Flux2	%-tualer Anteil in Flux3
Heu + 50 mmol·l <sup>-1</sup> $\text{HCO}_3^-$	71,56 $\pm$ 4,5	66,29 $\pm$ 3,54	55,81 $\pm$ 3,22
2 Tage KF + 50 mmol·l <sup>-1</sup> $\text{HCO}_3^-$	56,99 $\pm$ 2,49	45,37 $\pm$ 1,81	43,87 $\pm$ 2,01
4 Tage KF + 50 mmol·l <sup>-1</sup> $\text{HCO}_3^-$	83,84 $\pm$ 2,46	74,92 $\pm$ 2,24	77,07 $\pm$ 2,19
8 Tage KF + 50 mmol·l <sup>-1</sup> $\text{HCO}_3^-$	90,32 $\pm$ 2,38	77,15 $\pm$ 2,34	72,63 $\pm$ 1,87
14 Tage KF + 50 mmol·l <sup>-1</sup> $\text{HCO}_3^-$	76,45 $\pm$ 2,48	86,33 $\pm$ 2,87	76,79 $\pm$ 2,19
KF + 50 mmol·l <sup>-1</sup> $\text{HCO}_3^-$	65,33 $\pm$ 4,45	53,25 $\pm$ 4,21	61,56 $\pm$ 3,12

Es zeigte sich, dass sich der Transport sehr wohl umkehren ließ. Allerdings ist keine 1:1-Umkehr möglich, sondern es bleibt eine physiologische Präferenz in die serosale Richtung. Außerdem wird deutlich, dass eine Adaptation an eine energiereiche Ration die Unterschiede zwischen unphysiologischem und physiologischem Transport erstmal verringert, allerdings wird der Unterschied nach der Adaptation an KF wieder deutlicher.

Die Abbildungen Abb. 20 (a-c) zeigen nochmals den jeweiligen Verlauf der Transportraten getrennt nach Fluxperioden.

Der Transport in muk  $\rightarrow$  sero Richtung schwankt zwar, bleibt aber im Mittel konstant über  $6 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ . Es ist nur eine undeutliche minimale Steigerung der Transportraten zu beobachten, die auch von der großen Streubreite der Einzelergebnisse verdeckt wird (statistisch nicht signifikant). Bei dem Transport in umgekehrter Richtung (sero  $\rightarrow$  muk) wird ein systematischer Anstieg bis zur zweiten Woche mit anschließendem Abfall der Transportraten auf das Ausgangsniveau wesentlich deutlicher. Doch auch hier verhindert die starke Streubreite der Ergebnisse eine signifikante Aussage.



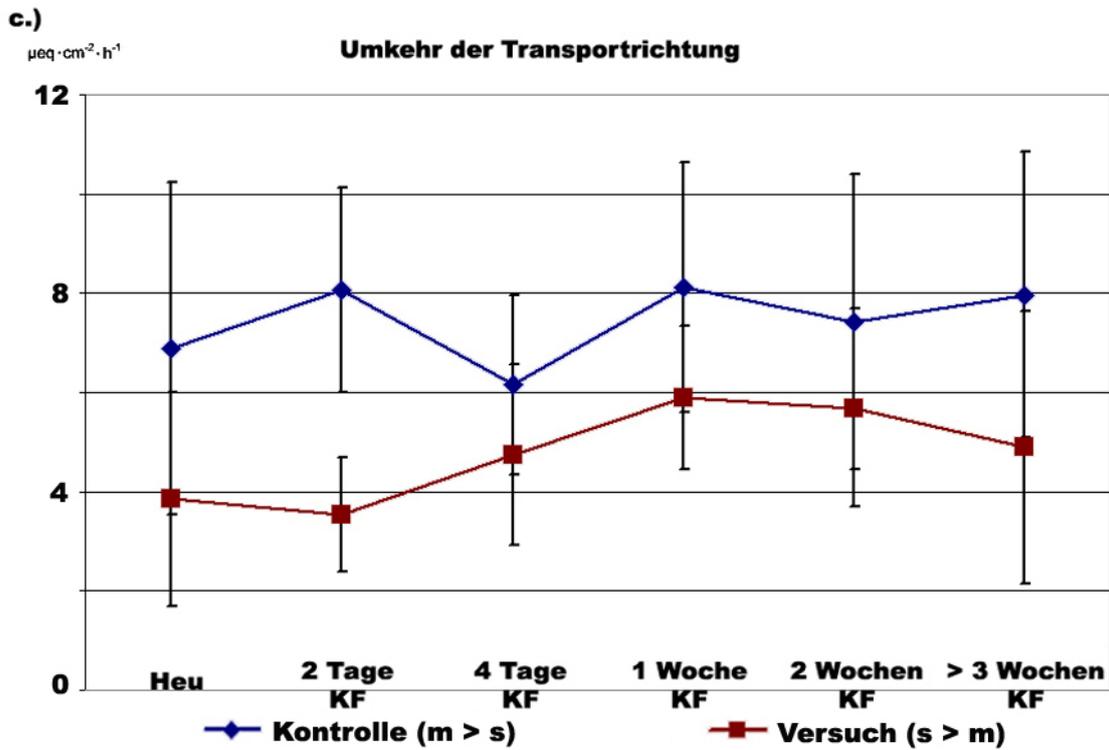
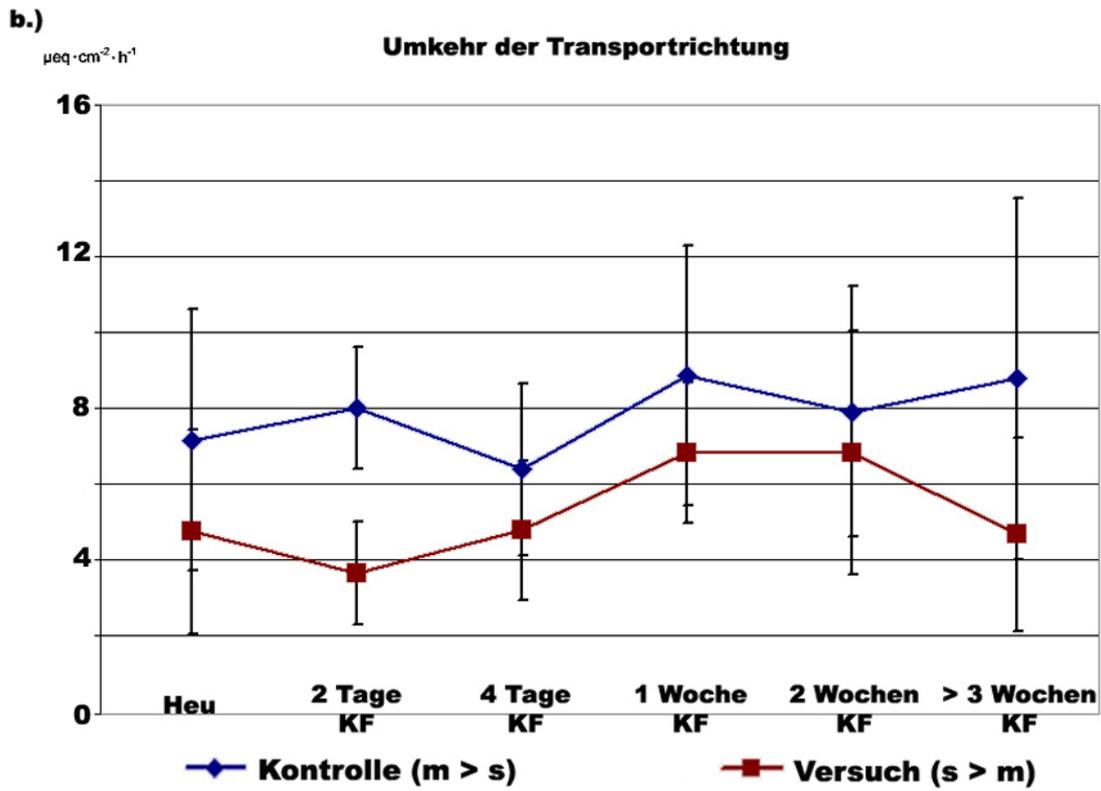


Abb. 20 (a-c) Zeigt den zeitlichen Verlauf der Fluxraten (Mean  $\pm$  SEM) im Vergleich zwischen den „physiologischem“ Gradienten (Kontrolle) und dem umgedrehten Gradienten (Versuch). a) in Flux 1, b) in Flux 2 und c) in Flux 3.

## 4.2. Zusammenfassender Vergleich:

In der vorherigen Versuchsserie (Gradientenumkehr) ist zu erkennen, dass sich die mittleren Fluxraten sowohl mit steigendem  $\text{HCO}_3^-$ -Gradienten als auch im Verlauf der KF-Fütterung erhöhen. Um dies an einer größeren Tierzahl zu überprüfen, wurden alle Kontrollepithelien, die mit Standardpuffer (Puffer 1-3) inkubiert worden sind, zusammengefasst und auf diese Fragestellungen hin geprüft.

Durch die Betrachtung einer größeren Epithelanzahl kann die statistische Aussage verbessert und präzisiert werden.

### 4.2.1. Vergleich der Fütterungen:

Durch die Zusammenfassung erhöhte sich die Zahl der Epithelien in den einzelnen Fütterungsgruppen auf durchschnittlich 20 oder mehr (Heu  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} = 28$  Epithelien, und KF  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{HCO}_3^- = 16$  Epithelien)

Es konnten gleiche Varianzen zwischen den Gruppen angenommen werden, und ein unabhängiger T-Test getrennt nach den Fluxperioden zeigte, dass sich die Mittelwerte zwischen den Fütterungsbedingungen nicht signifikant unterscheiden (Flux 1:  $p=0,149$ ; Flux 2:  $p= 0,997$ ; Flux 3:  $p=0,574$ ).

Tab. 24 Vergleich aller Kontrollen unter Standardbedingungen von Epithelien von Tieren die jeweils mit Heu ad libitum oder KF für mindestens 3 Wochen gefüttert worden sind. Angegeben sind die Mittelwerte + SEM.

Bedingung	Tier (N) und Epithelanzahl (n)	Flux 1 $\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	Flux 2 $\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	Flux 3 $\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$
Heu + $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{HCO}_3^-$	N= 18; n= 28	$8,46 \pm 0,81$	$6,39 \pm 0,57$	$5,75 \pm 0,56$
KF + $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{HCO}_3^-$	N= 10; n= 16	$6,55 \pm 0,84$	$6,31 \pm 0,91$	$6,19 \pm 0,73$

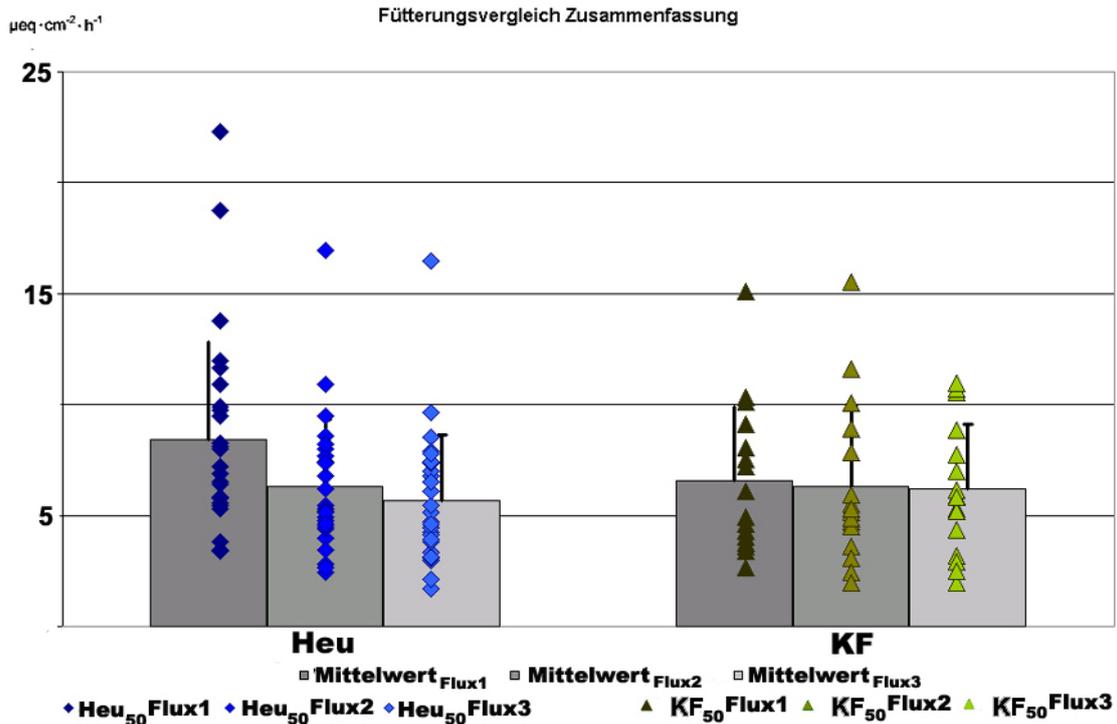


Abb. 21 Das Diagramm zeigt die Verteilung der Einzelergebnisse getrennt nach Fluxperioden und Fütterung. Durch die Darstellung wird deutlich, dass sich die Gruppen eher tierindividuell unterscheiden und große Unterschiede innerhalb der Gruppe existieren.

#### 4.2.2. Vergleich der $\text{HCO}_3^-$ Gradienten bei Heu-Tieren:

Wie bei der Fütterung erfolgte eine Zusammenfassung der Daten auch bei hohem und niedrigem  $\text{HCO}_3^-$ -Gradient. Alle Epithelien von Heu-Tieren, die mit Standardpuffer (Puffer 1-3) inkubiert wurden, wurden zusammengefasst und auf diese Fragestellung hin geprüft. Dadurch erhöhte sich die Zahl der Epithelien, die bei niedrigem Gradienten inkubiert wurden, auf 31 Epithelien, und bei der Inkubation mit hohem Gradienten auf 28 Epithelien.

Der durchgeführte unabhängige T-Test (getrennt nach Fluxperioden) zeigt, dass die mittlere Differenz der Mittelwerte in Flux 1 mit  $p = 0,013$  signifikant ist, bei Flux 2 und 3 dagegen mit  $p = 0,072$  und  $p = 0,266$  nicht mehr das Signifikanzniveau erreicht.

Dies bedeutet, dass nur in Flux 1 davon ausgegangen werden kann, dass der höhere Gradient auch zu einer höheren Fluxrate beiträgt, sich dieser Effekt jedoch über die Zeit verringert.

Tab. 25 Vergleich aller Kontrollen unter Standardbedingungen des jeweiligen Gradienten. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Bedingung	Tier (N) und Epithelanzahl (n)	Flux 1 $\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	Flux 2 $\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	Flux 3 $\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$
Heu + $25\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ HCO}_3^-$	N= 20; n= 31	$5,84 \pm 0,43$	$4,87 \pm 0,43$	$4,76 \pm 0,42$
Heu + $50\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ HCO}_3^-$	N= 18; n= 28	$8,46 \pm 0,81$	$6,39 \pm 0,57$	$5,75 \pm 0,56$

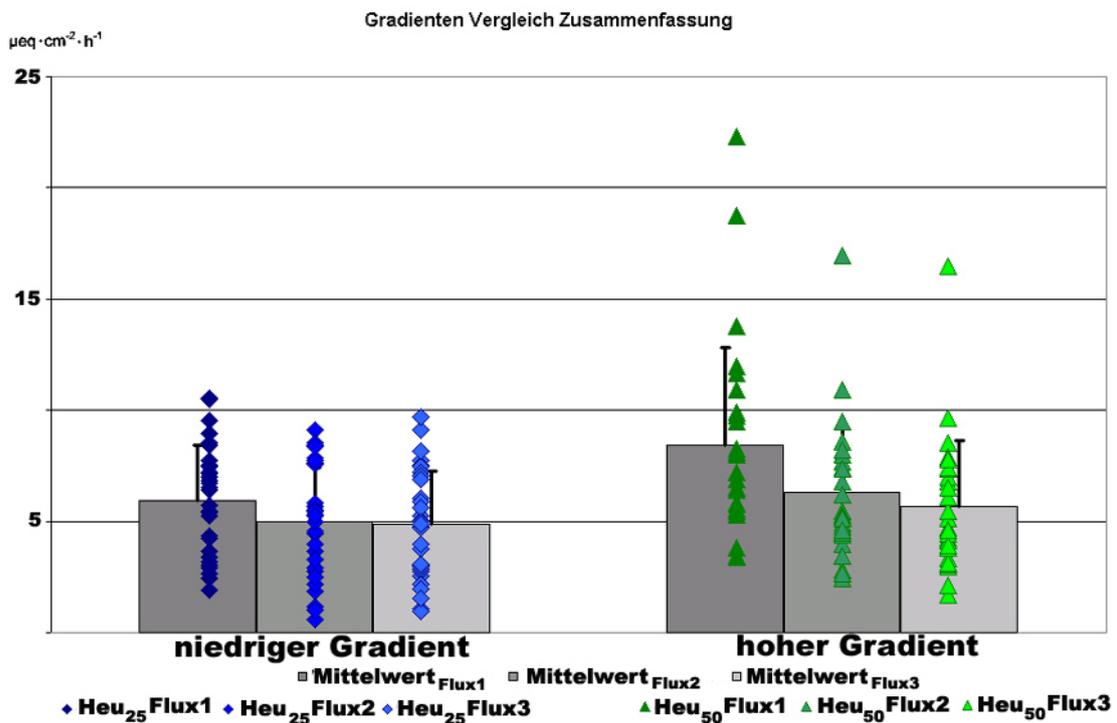


Abb. 22 Vergleich der Transportraten bei unterschiedlichen  $\text{HCO}_3^-$ -Gradienten ( $25$  gegen  $50\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ HCO}_3^-$ ). Es ist erkennbar, dass die Unterschiede in den Transportraten vorwiegend individueller Natur sind. Der niedrige und der hohe  $\text{HCO}_3^-$ -Gradient hat nur in Flux 1 einen signifikanten Einfluss.

### **4.3. Ergebnisse der molekularbiologischen Versuche:**

#### **4.3.1. RNA-Isolierung und RNA-Qualitätskontrolle:**

##### **4.3.1.1. RNA-Konzentration:**

Die isolierten RNA-Proben wiesen in der spektralphotometrischen Analyse (siehe Kap. 3.9.2.3) eine durchschnittliche Konzentration von  $2054 \pm 651$  ng /  $\mu$ l auf. 7 von 70 Proben zeigten maximale photometrische Extinktionswerte bei 230 oder 280 nm und mussten wiederholt isoliert werden.

##### **4.3.1.2. RNA-Integrität:**

In der Kapillarelektrophorese (siehe Kap. 3.9.2.4) wiesen die isolierten RNA-Proben eine durchschnittliche RNA-Integrität (RIN) von  $8,6 \pm 0,4$  auf. Bei 1 von 70 Proben wurde eine RIN von  $< 5$  festgestellt und die entsprechende Probe wurde von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Eine Tabelle mit den Einzelergebnissen der Integritätsuntersuchungen ist in Kap. 9.3 im Anhang zu finden.

##### **4.3.1.3. Kontrolle der RNA auf Verunreinigung mit genomischer DNA (NoRT-control)**

Zur Untersuchung der RNA-Proben auf Kontamination mit genomischer DNA wurde die relative Menge an  $\beta$ -Aktin-DNA in den RNA-Proben untersucht (siehe Kap. 3.9.5.3). Die relative Menge gDNA betrug durchschnittlich  $< 1$  %. 2 von 70 RNA-Proben wiesen im Vergleich zu den korrespondierenden cDNA-Proben  $> 4$  %  $\beta$ -Aktin-Kopien auf und wurden aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

#### **4.3.2. Qualitativer Nachweis der GOIs**

Im Rahmen der kPCR-Versuche zur vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob AE2 (Anion Exchanger 2), CA1 (Carboanhydrase 1), CA2 (Carboanhydrase 2), CFTR (Cystic Fibrosis Transmembraneconductance Regulator) und DRA (Down Regulated in Adenoma) im Psalter von Schafen exprimiert werden.

Dabei wurde festgestellt, dass die mRNA aller untersuchten Transportproteine im Psalter (siehe Abb. 23) eindeutig nachzuweisen waren.

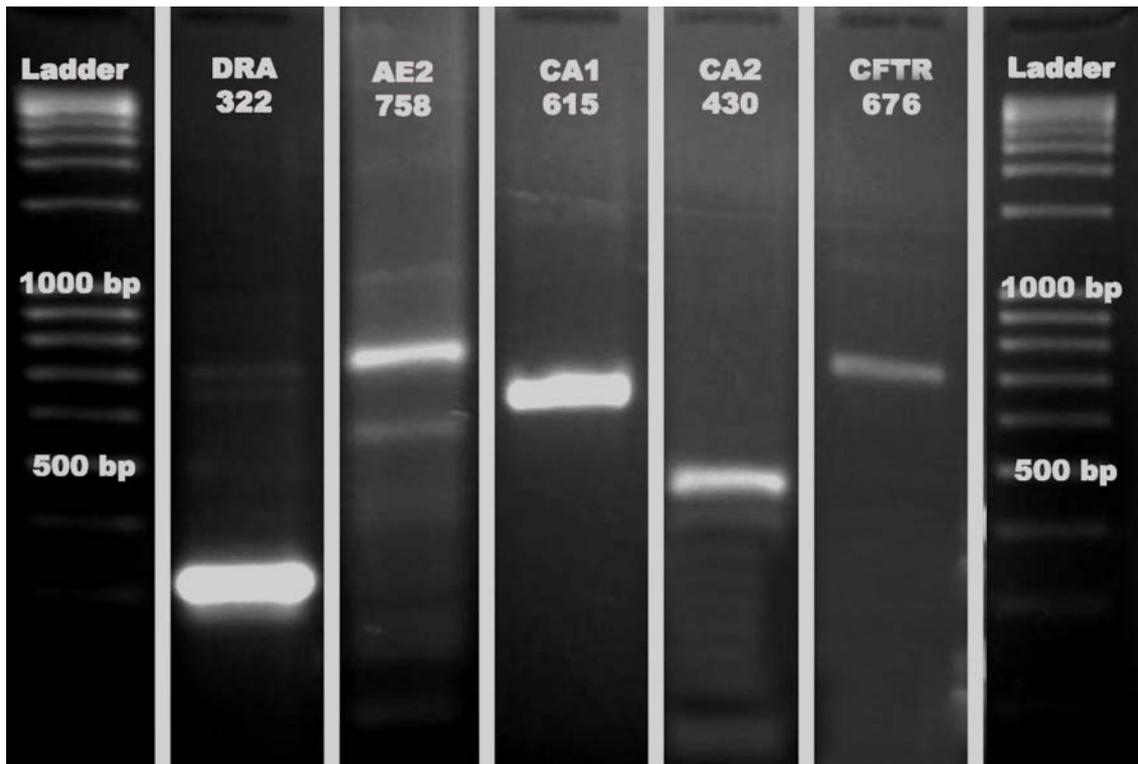


Abb. 23 Qualitativer Nachweis der GOIs mittels RT-PCR und elektrophoretischer Auftrennung. DRA (322 bp), AE2 (758 bp), CA1 (615 bp), CA2 (430 bp), CFTR (676 bp); 100 bp-Ladder.

#### 4.3.3. Quantitative PCR:

##### 4.3.3.1. qPCR Assay Etablierung:

Die qPCR-Untersuchungsmethoden zur relativen Quantifizierung für CA1, CA2, und AE2 waren bereits aus vorangegangenen Arbeiten etabliert (Prießnitz, 2006; Schulenburg, 2005) und wurden lediglich auf Ihre Funktionstüchtigkeit im Psalter getestet (Prüfung der Bande im Gel sowie Übereinstimmung des Schmelzpunktes mit den Werten der Etablierung).

Für DRA und CFTR mussten neue qPCR-Assays etabliert werden.

In den Versuchen zur Etablierung von DRA wurde eine Sensitivität von 1 fg, eine Effizienz von 100 % und ein Schmelzpunkt von 83,7 °C festgestellt. Weiterhin wurde festgestellt, dass bei 58 °C ein ausreichend differenziertes Ergebnis für Hybridisierung und Neustrangsynthese erreicht wurde.

Die Vorversuche zur Etablierung der qPCR-Untersuchungsmethode von CFTR ergaben eine Sensitivität des Verfahrens bis 1 fg, eine qPCR-Effizienz von 99,1 % und eine Schmelztemperatur von 78,5 °C. Auch hier wurde eine ausreichend spezifisches Ergebnis bei 58 °C für Hybridisierung und Neustrangsynthese festgestellt.

## Ergebnisse

```

DRA s : NCATGNTANTGNTGNCATNCNATCNTGATGGGGAAGAACATAAGAAGAAACAAAGACATCATAAGACCTTCT : 75
DRA Bov : gccagtgtatctc-tgcaaatgcttt-----tggggaagaccataagaagaacaaagacatcataagacgcttct : 69
          C  GT TA T  TGC  AT C  T      TGGGGAAGA  CATAAGAAGAAACAAAGACATCATAAGAC  CTTCT

DRA s : GGATCATCTCAAAAAGTTGTGCCGCTGTTCTGCNCAAAAGGCCAAGAAATTGCCTTCTGTCCTTCCCATAGC : 150
DRA Bov : ggatcatctcaaaaagttgtgcccgtgttctgcacaaaaggccaagaaattgccttctctcctctcccatagc : 144
          GGATCATCTCAAAAAGTTGTGCCGCTGTTCTGC  CAAA  GGCCAAGAA  ATTGCCTTCTC  TCCTTCCCATAGC

DRA s : ATCTTG : 156
DRA Bov : atcttg : 150
          ATCTTG

```

---

```

DRA bov : -----agccattgggaatcagtatgttgtggccaggcc-agtgtattctgcaaatgctttt : 56
DRA as : NNNNNNNNNNNNNNNNTTCAGCNCATTNCGGATCAGTACGTTGTGGCCAGGCCAGTGTATTCTGCAAATGCTTTT : 75
          AGC  CATT  G  ATCAGTA  GTTGTGGCCAGGCC  AGTGTATTCTGCAAATGCTTTT

DRA bov : ggggaagaccataagaagaacaaagacatcataagacgcttctggatcatctcaaaaagttgtgcccgtgttct : 131
DRA as : GGGGAAGAACATAAGAAGAAACAAAGACATCATAAGACCTTCTGGATCATCTCAAAAAGTTGTGCCGCTGTTCT : 150
          GGGGAAGA  CATAAGAAGAAACAAAGACATCATAAGAC  CTTCTGGATCATCTCAAAAAGTTGTGCCGCTGTTCT

DRA bov : gcacaaaggcccaagaaaattgccttctcc : 161
DRA as : -CACAAAACNC-AAGAAA--TGC-TTCTGG : 175
          CACAAA  G  C  AAGAAA  TGC  TTCT

```

Abb. 24 Beispiel einer Sequenzierung: Alignment zum grafischen Vergleich mit der Original-Sequenz (DRA). Der Sequenzvergleich erfolgte mittels der Software Gene Doc.

Tab. 26 Die Tabelle zeigt die Quelle und Spezies der Vergleichssequenz, die Länge des qPCR-Amplifikats sowie die Homologie in Prozent an. NIH = National Institute of Health; Acc No = Accession Number.

Transport-protein	Spezies der Vergleichs-sequenz	NIH Genebank Acc No	Länge des Amplifikats in Basenpaaren	Homologie in Prozent
AE2	Bos taurus	gi:76616144	103	94 %
CA1	Ovis aries	gi:57526335	73	99,5%
CA2	Bos taurus	gi:31340697	72	98,2%
CFTR	Ovis aries	gi:57526398	97	100%
DRA	Bos taurus	gi:76615149	162	96%

#### 4.3.4. Relative Expression:

##### 4.3.4.1. AE2:

Die  $C_T$ -Werte von AE2 veränderten sich in den einzelnen Fütterungsgruppen im Vergleich zu den Tieren der Heufütterungsgruppe kaum. Eine Regulation von AE2 durch die Futterumstellung konnte nicht beobachtet werden.

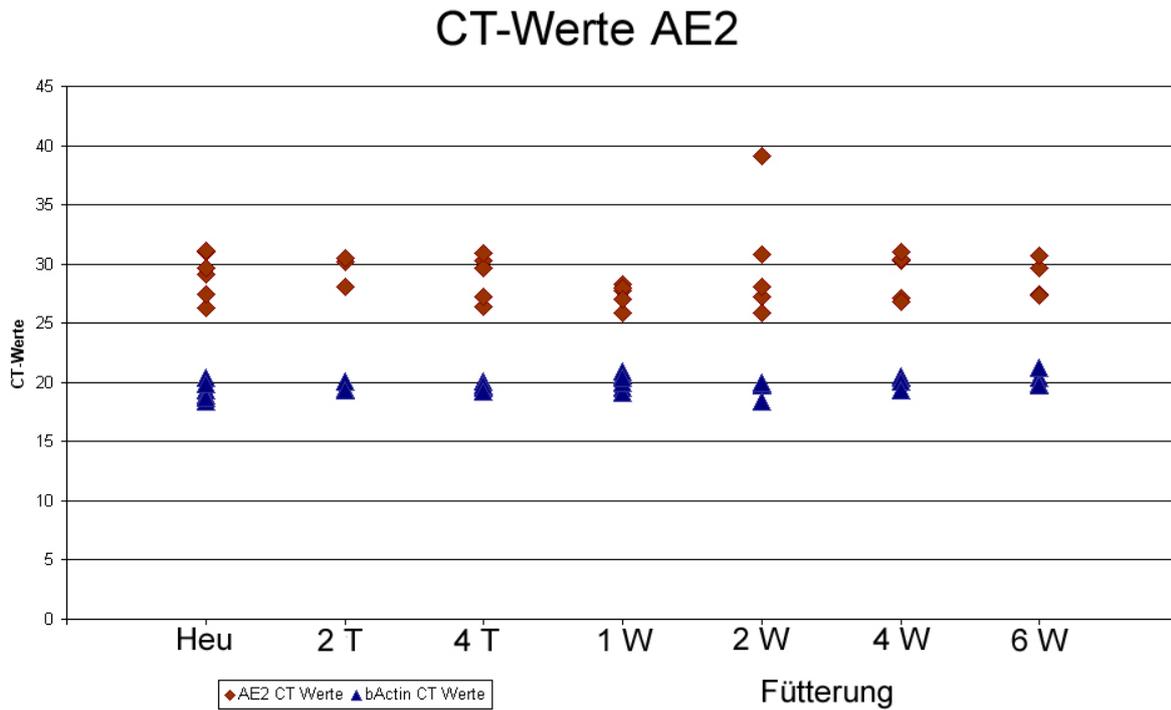


Abb. 25  $C_T$ -Werte der Einzeltiere für AE2 und  $\beta$ -Actin im Psalter. Die Transkriptionsrate von AE2 ist im Verlauf einer Futterumstellung kaum verändert. Rohdaten und gemittelte Werte für die Tiergruppen sind der Tabelle im Anhang (Kap.: 9.3.1 und Kap.:9.3.2) zu entnehmen.

#### 4.3.4.2. DRA:

DRA ist ein  $\text{HCO}_3^- / \text{Cl}^-$ -Transporter. Es sollte geprüft werden, ob DRA bei der Futterumstellung reguliert wird und somit für die z. T. höheren Transportraten von  $\text{HCO}_3^-$  bei den Kraffutter-Tieren verantwortlich sein könnte.

Auch bei DRA erscheint das Transkriptionsprofil sehr homogen. Es kann keine fütterungsspezifische Veränderung der Transkription festgestellt werden.

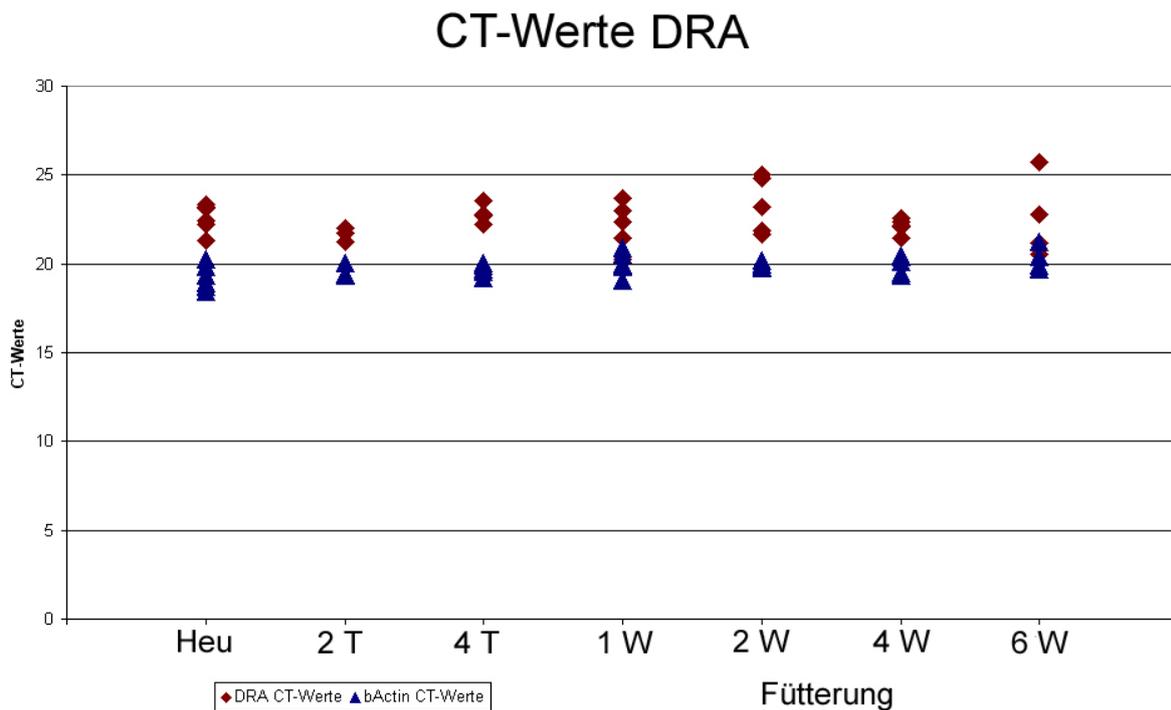


Abb. 26  $C_T$ -Werte der Einzeltiere für DRA und  $\beta$ -Actin im Psalter. Die Transkriptionsrate von DRA ist im Verlauf einer Futterumstellung kaum verändert. Rohdaten und gemittelte Werte für die Tiergruppen sind der Tabelle im Anhang (Kap.: 9.3.1 und Kap.:9.3.2) zu entnehmen.

#### 4.3.4.3. CFTR:

In der Literatur wird ein direkter Zusammenhang von DRA und CFTR angegeben, wobei CFTR als Vermittler zwischen DRA und CA2 wirkt (siehe Kap.:2.8.3). Daher sollte überprüft werden, ob auch eine Regulation von CFTR erfolgt.

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, kann für CFTR keine fütterungsbedingte Regulation festgestellt werden.

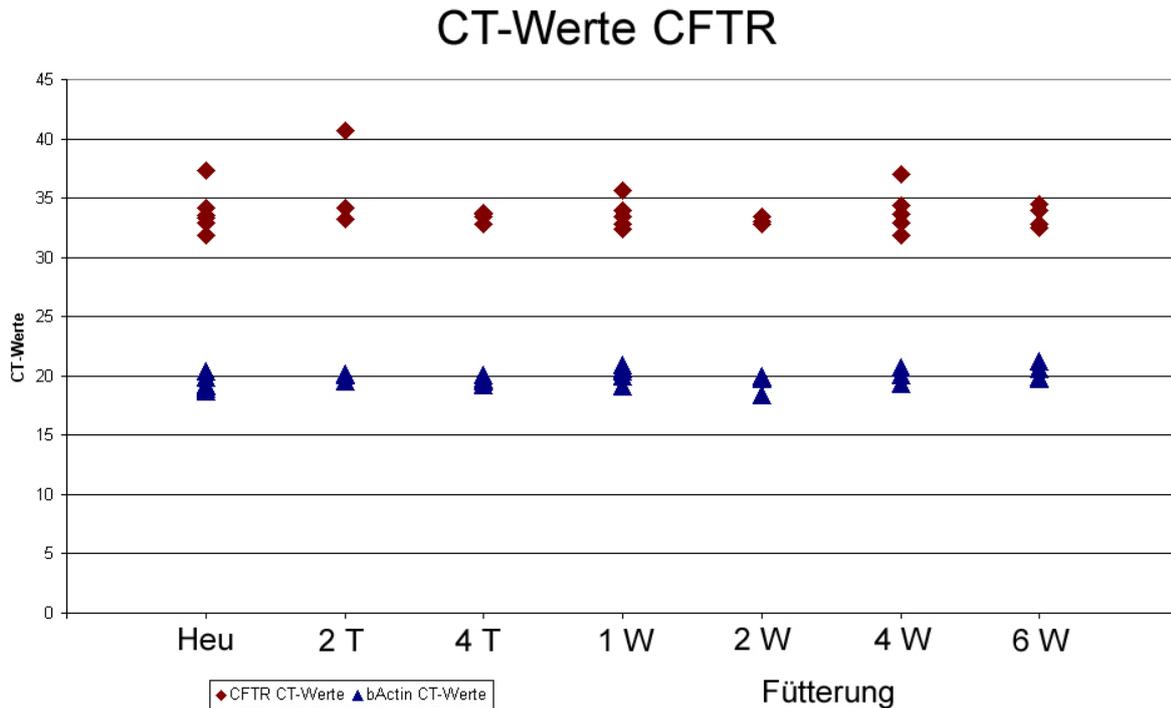


Abb. 27  $C_T$ -Werte der Einzeltiere für CFTR und  $\beta$ -Actin im Psalter. Die Transkriptionsrate von CFTR ist im Verlauf einer Futterumstellung kaum verändert. Rohdaten und gemittelte Werte für die Tiergruppen sind der Tabelle im Anhang (Kap.: 9.3.1 und Kap.:9.3.2) zu entnehmen.

#### 4.3.4.4. Carboanhydrase (CA):

$\text{HCO}_3^-$  ist an der Regulation des intrazellulären pH-Werts maßgeblich beteiligt. Daher sollte in diesem Versuch geprüft werden, ob das Epithel auf die stärkere Säurebelastung durch kurzkettige Fettsäuren infolge der Adaptation an KF-Fütterung reagiert und ob die entsprechenden Enzyme verstärkt exprimiert werden.

#### CA1:

Ähnlich wie die vorherigen Targets zeigen die  $C_T$ -Werte von CA1, dass keine systematische Regulation durch die Fütterung erfolgt.

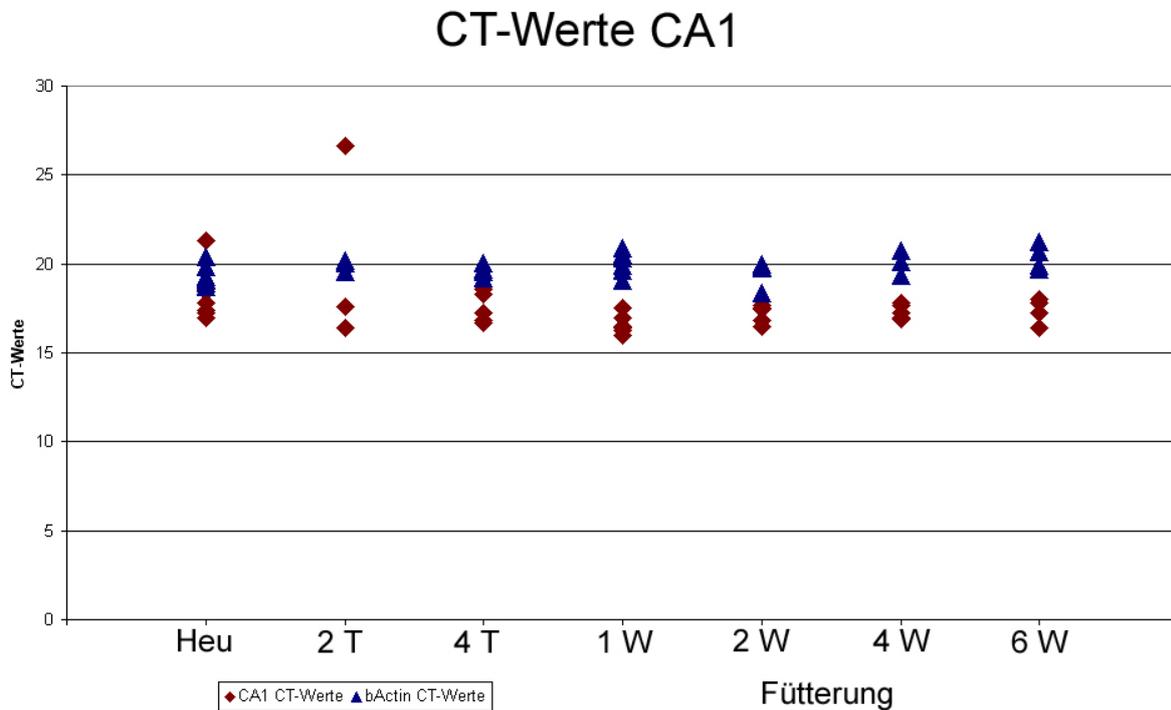


Abb. 28  $C_T$ -Werte der Einzeltiere für CA1 und  $\beta$ -Actin im Psalter. Die Transkriptionsrate von CA1 ist im Verlauf einer Futterumstellung kaum verändert. Rohdaten und gemittelte Werte für die Tiergruppen sind der Tabelle im Anhang (Kap.: 9.3.1 und Kap.:9.3.2) zu entnehmen.

**CA2:**

Die mittleren  $C_T$ -Werte von CA2 sinken nach 2 Tagen sowie im weiteren Verlauf (1. – 6. Woche) um durchschnittlich einen Zyklus im Vergleich zur Basis (Heu) ab. Von  $31,82 \pm 2,21$  bei Heufütterung auf  $30,73 \pm 1,26$  nach 2 Tagen KF und im weiteren Verlauf der KF-Fütterung auf  $30,50 \pm 1,20$  nach 6 Wochen KF. Jedoch ist diese Änderung zu gering um von einer Regulation zu sprechen.

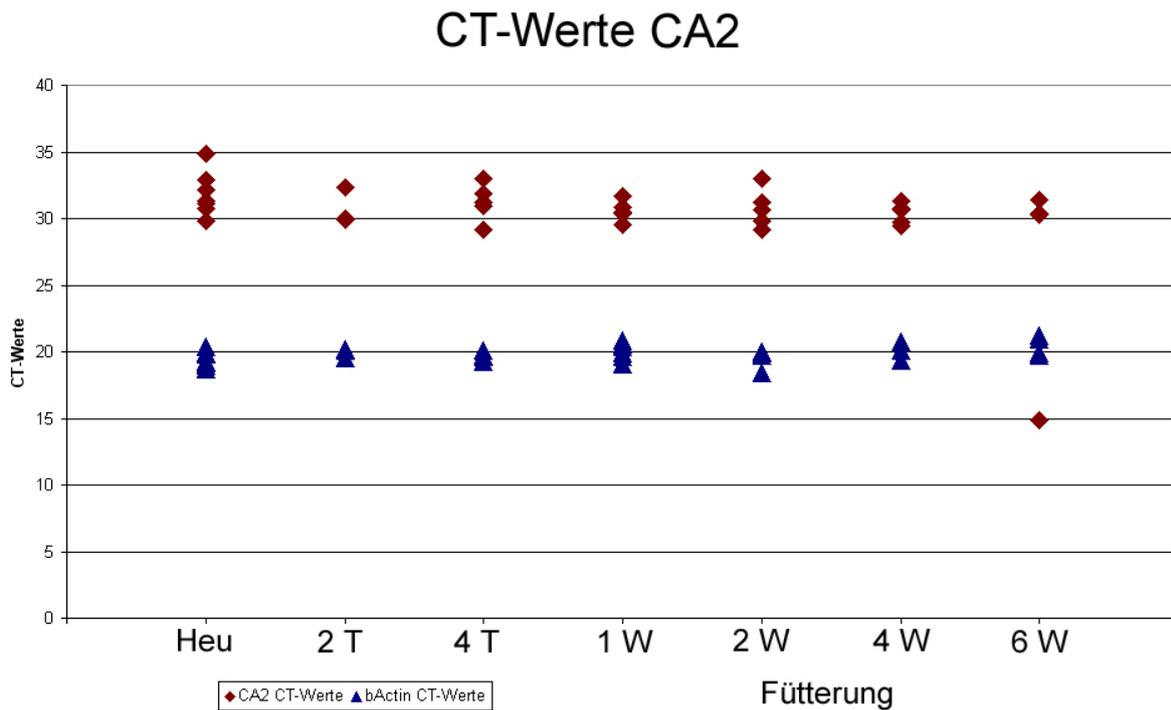


Abb. 29  $C_T$ -Werte der Einzeltiere für CA2 und  $\beta$ -Actin im Psalter. Die Transkriptionsrate von CA2 nimmt im Verlauf einer Futterumstellung leicht zu. Rohdaten und gemittelte Werte für die Tiergruppen sind der Tabelle im Anhang (Kap.: 9.3.1 und Kap.:9.3.2) zu entnehmen.

#### 4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse:

##### Transportphysiologische Ergebnisse:

- ◇ Der Transport von  $\text{HCO}_3^-$  ist maßgeblich von den zugrunde liegenden Gradienten für  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$  abhängig. Der  $\text{HCO}_3^-$ -Transport kann bei entsprechend vorgegebenen Gradienten in beide Richtungen erfolgen. Die Transportraten sind jedoch bei gleichen Gradienten nicht symmetrisch. Die bevorzugte Richtung des Transportes ist die Absorption von  $\text{HCO}_3^-$ .
- ◇ Der Transport ist zumindest teilweise DIDS-sensibel. Dies kann als weiterer Beweis für ein Anionenaustauschersystem betrachtet werden. Die Adaptation an KF verändert die Sensibilität für DIDS nicht.
- ◇ Es wurde ein starker Zusammenhang mit anderen Transportmechanismen nachgewiesen, deren gemeinsame Regelgröße der intrazelluläre pH-Wert ist (NHE,  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporter).
- ◇ Es wurde eine leichte, nicht signifikante fütterungsbedingte Steigerung der Transportraten gefunden, die jedoch sehr stark vom einzelnen Individuum abhängig ist und auch nur bis etwa drei Wochen nach KF-Fütterungsbeginn anhält. Danach sinken die Transportleistungen wieder ab.

##### Molekularbiologische Ergebnisse:

- ◇ In der qualitativen PCR konnten folgende Transporter nachgewiesen werden:
  - DRA (Down Regulated in Adenoma) – Anionenaustauscher
  - AE2 (Natrium independent Anion Exchanger) – Anionenaustauscher
  - CA1 (Carboanhydrase 1) – Intrazelluläres Enzym
  - CA2 (Carboanhydrase 2) – Intrazelluläres Enzym
  - CFTR (Cytic Fibrosis Transmembraneconductance Regulator) –  $\text{Cl}^-$ -Kanal und Regulator
- ◇ In der relativen Quantifizierung wurde keine Regulation der untersuchten Transporter im Vergleich zur Heu-Fütterung als Basis gefunden: