

5. DISKUSSION:

5.1. Diskussion der transportphysiologischen Versuche:

5.1.1. Allgemeine Methodenkritik:

Das Psalterepithel zeichnet sich durch starke Variationen in I_{sc} , G_t und Fluxraten bestimmter Ionen [z.B.: Cl^- (Tiling, 1997); Na^+ (Ali, 2005; Martens, H. und Gäbel, 1988); HCO_3^- (Niebuhr, 2003); Ca^{2+} (Schultheiss, 1995)] zwischen den einzelnen Epithelien aus. Trotz dieser großen quantitativen Unterschiede konnten alle oben genannten Autoren im Wesentlichen einen stabilen zeitlichen Abfall der Parameter beobachten sowie eine einheitliche, reproduzierbare qualitative Reaktion auf die jeweiligen Behandlungen auslösen. Dies bedeutet, dass die Epithelien trotz Variationen immer in gleicher Art und Weise auf die Behandlung reagierten.

Um dieser Besonderheit zu begegnen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Schwankungen zwischen den Epithelien in der Weise aufgefangen, dass die Differenzen zwischen der ersten Fluxperiode (Flux 1) (Epithel immer ohne Behandlung) und jeweils der Fluxperiode 2 und 3 (Flux 2 und 3) (Epithel mit Behandlung oder Kontrolle) bestimmt wurden. So konnten die Behandlungseffekte wesentlich deutlicher dargestellt werden, ohne dass sie durch die starke individuelle Streuung verdeckt worden sind.

Weiterhin muss bei der Beurteilung der Ergebnisse darauf geachtet werden, dass sich Artefakte durch die speziellen Anforderungen der Methode ergeben können. Dies sind vor allem die HCO_3^- -Freiheit auf einer Seite sowie die Tatsache, dass es sich um ein ungepuffertes System handelt.

Auch die Interpretation von pH-Wert-Veränderungen in den alkalischen Bereich als HCO_3^- -Transport ist unter Umständen mit Fehlern behaftet. Zum einen wird nicht auf gleichzeitigen Säuretransport Rücksicht genommen, zum anderen würden auch andere Ionen (z.B. NH_3) als potenzielle Basen in Frage kommen. Doch wie auch in vergleichbaren Studien, die mit dieser Methode arbeiten (Sellin und Desoignie, 1989; Suzuki *et al.*, 1993; Vidyasagar *et al.*, 2005; Vidyasagar *et al.*, 2004; White und Imon, 1981; Winterhager *et al.*, 1986), wurde auch in dieser Arbeit durch die vorgegebenen Versuchsbedingungen ein Milieu geschaffen, dass vorwiegend den HCO_3^- -Transport begünstigt, so dass die Interpretation von Alkalisierung = HCO_3^- -Transport am wahrscheinlichsten erscheint.

Auch die auf beiden Seiten der Ussing-Kammer unterschiedliche Zusammensetzung der artifiziellen Nährlösungen stellt eine Quelle für Fehlinterpretationen dar. In dieser Arbeit sind dies vorwiegend Artefakte, die den I_{sc} betreffen, da ein Cl^- -Gradient (meist) nach mukosal vorgegeben ist. Da der Gradient für Cl^- jedoch (fast) immer gleich ist, ist dieses Artefakt als systematischer Fehler in allen Versuchen gleichermaßen ausgeprägt, so dass die

Interpretation der Ergebnisse nicht darunter leidet (Darstellung als *Delta* von vor und nach der Behandlung).

5.1.2. Variation der Elektrolytkonzentrationen:

Bei der Variation der Gradienten wurden bewusst die passiven Triebkräfte chemischer Gradienten für den Transport manipuliert. Dabei werden die Grenzen dessen, was *in vivo* an Gradienten vorkommt, ganz bewusst verlassen, da nur so festgestellt werden kann, welche Bedingungen (Gradienten) einzelne Transportmechanismen des Epithels für ihre Funktion benötigen.

5.1.2.1. Vergleich zwischen niedrigem (25 mmol·l⁻¹) und hohem (50 mmol·l⁻¹) HCO₃⁻ - Gradient mukosal:

Durch diese Versuche sollte näher charakterisiert werden, inwieweit sich der HCO₃⁻ -Transport im Psalter durch ein höheres Angebot an Substrat beeinflussen lässt. Die Ergebnisse bieten ein sehr variables Bild.

Es wurden zwei unterschiedliche Ansätze für die Beantwortung dieser Fragestellung herangezogen:

Zum einen wurde der HCO₃⁻ -Gradient während des Versuchs erhöht, was zu einer deutlich höheren Transportleistung führte (in Flux 3 signifikant). Dies spricht dafür, dass die Transportleistung von einzelnen Epithelien immer von ihrem Grundniveau aus erhöht werden kann, wenn mehr Substrat zur Verfügung steht (Effektivierung des Transportes). Allerdings wird für diese Erhöhung eine gewisse Adaptationszeit benötigt (Signifikanzniveau wurde erst in Flux 3 erreicht). Auch kann beobachtet werden, dass manche Epithelien bereits auf einem sehr hohem Niveau (bezogen auf ihre Transporterausstattung) sind, so dass der Betrag, um den der Transport erhöht werden kann, nicht immer gleichmäßig ist. Bei Betrachtung der Einzelergebnisse wird deutlich, dass ein niedriges Grundniveau dazu führt, dass sich der Transport nur wenig erhöht (meist um ca. 20-30% des Ausgangsniveaus), wohingegen Epithelien von einem ohnehin hohen Grundniveau sich meist deutlich steigern lassen (um ca. 50-100% des Ausgangsniveaus).

Zum anderen wurden in einem zusammenfassenden Vergleich jene Kontrollepithelien, die den gesamten Versuchszeitraum mit niedrigem bzw. hohem HCO₃⁻ -Gradienten inkubiert worden sind, gemeinsam betrachtet und diese größere Gruppe analysiert. Hierbei kommt es zwar auch zu einem im Mittel höheren Transport, jedoch nur noch in Flux 1 erreicht der Unterschied ein signifikantes Niveau. In Flux 2 und 3 dagegen gleichen sich die Transportraten im Mittel immer stärker aneinander an. Allerdings wird hier auch noch deutlicher als in den vorherigen Versuchen, wie groß die Varianz zwischen den einzelnen

Epithelien ist (Spannweite der Ergebnisse bei niedrigem Gradienten: Flux 1: 8,36; Flux 2: 8,53; Flux 3: 8,70 und bei hohem Gradienten: Flux 1: 18,93; Flux 2: 14,56; Flux 3: 14,75).

Insgesamt führen die Ergebnisse zu dem Schluss, dass der HCO_3^- -Gradient sehr wohl einen gewissen Einfluss auf die Transportleistung hat, dieser allein jedoch nicht immer zu einer absolut höheren Transportleistung führt, sondern diese vor allem von der Ausstattung des Gewebes mit Transportern abhängig ist.

Dies ist im Sinne der Annahme eines Anionenaustauschersystems durchaus nachvollziehbar, da eine gewisse Anzahl an Transportern zwar effektiver arbeiten kann, wenn mehr Substrat zur Verfügung steht, die absolute Transportrate jedoch sehr stark von der absoluten Anzahl an Transportern pro cm^2 abhängig, also innerhalb der Epithelien variabel und unter Umständen sättigbar ist.

5.1.2.2. Einfluss der Chloridreduktion serosal

Um den postulierten Anionenaustauscher weiter zu charakterisieren und um festzustellen, welchen Einfluss die ausreichende Konzentration von Cl^- auf der serosalen Seite hat, wurde der Cl^- -Gehalt serosal reduziert. Dieser von Niebuhr (2003) bereits nachgewiesene Zusammenhang sollte nochmals unter leicht veränderten Bedingungen bestätigt werden.

Dabei wurde eine starke Abhängigkeit des HCO_3^- -Transportes von dem Cl^- -Gradienten festgestellt. Der Transport sank um 22 – 23% im Vergleich zu den Kontrollepithelien ab.

Das basolaterale Transportsystem ist offensichtlich von einem Cl^- -Gradienten über die Membran abhängig, was einen Austauschmechanismus nahe legt. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass der HCO_3^- -Transport ebenso wie der Cl^- -Transport nicht zumindest teilweise auch über andere Mechanismen ermöglicht wird ($\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransport; Na^+/Cl^- -Cotransport, Kanäle)

Auch Tiling (1997) fand eine starke Korrelation des Cl^- -Transportes mit dem serosalen Cl^- -Angebot, und zwar für beiden Epithelseiten und für beide Transportrichtungen. Dies wurde als weiterer Beweis für einen Anionenaustauscher gesehen.

Eine Verringerung der serosalen Cl^- -Konzentration ist für die *in vivo*-Situation nicht relevant, da die Cl^- -Konzentration im Plasma sehr eng reguliert wird.

5.1.2.3. Einfluss der mukosalen Chloridkonzentration

Die Ergebnisse dieser Versuchseinheit waren sehr überraschend und widersprachen dem ursprünglich angenommenen Modell.

Bei einem rein passiven Anionenaustauschmechanismus müsste sich der Transport der beteiligten Ionen entsprechend der Gradienten verhalten, d.h. ein Anstieg der mukosalen Cl^- -Konzentration müsste die HCO_3^- -Aufnahme verringern, da ein Teil der Triebkraft fehlt. Dies konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Der HCO_3^- -Transport der

Allerdings zeigten die ursprünglichen Versuche am Psalter, dass ohne Cl^- -Gradient auch kein Cl^- -Nettotransport stattfindet (Martens, H. und Gäbel, 1988; Tiling, 1997). Somit ist noch nicht geklärt, wie der Cl^- -Transport unter diesen Bedingungen mit dem HCO_3^- -Transport gekoppelt ist. Es wäre möglich, dass das Mikromilieu und/oder der HCO_3^- -Gradient ausreichen, um auch den Cl^- -Transport aufrecht zu halten.

Beides muss noch durch weitere Versuche intensiver analysiert werden.

5.1.3. Hemmstoffe

Das Ziel eines Hemmstoffeinsatzes ist sowohl der Nachweis des gehemmten Transporters im Psalter als auch dessen Beteiligung am HCO_3^- -Transport. In dieser Arbeit kam bei einigen Versuchen zusätzlich noch die Fragestellung hinzu, ob sich der Stellenwert der Beteiligung durch die Futterumstellung prozentual verändert.

Allgemeine Probleme beim Einsatz von Hemmstoffen sind:

- ◇ Unspezifische Wechselwirkungen mit anderen Transportmechanismen, speziell in der verwendeten Konzentration.
- ◇ Unspezifische Wechselwirkungen des Transportes mit dem Lösungsmittel.

Diesen potenziellen Fehlerquellen wurde in dieser Arbeit dadurch begegnet, dass Hemmstoffe verwendet wurden, deren Wirkmechanismus und mögliche Nebenwirkungen (bezogen auf die eingesetzte Konzentration) bekannt sind [DIDS (Cabantchik und Greger, 1992); Amilorid (Benos, 1982); HTZ (Mertz und Schettler, 1959; Stokes, 1988); Ethoxzolamid (Chegwidden und Carter, 2000; Conroy und Maren, 1995)].

Weiterhin wurde, sobald das zugegebene Lösungsvolumen mehr als 50 μl betrug, auch zu den Kontrollkammern Lösungsmittel zugegeben, so dass Wirkungen des Lösungsmittels (DMSO) sowohl bei Kontrollen als auch bei den Versuchsepithelien stattfanden und somit keinen Einfluss auf die Ergebnisse hatten.

5.1.3.1. Hemmung des Anionenaustauschers durch DIDS:

Der DIDS-Einsatz erfolgte mukosal. Es konnte eine signifikante Reaktion (Reduktion) auf den DIDS-Einsatz festgestellt werden. Diese signifikante Reaktion erfolgte allerdings erst in der dritten Fluxperiode.

Ähnlich wie bei Niebuhr (2003) (serosale Zugabe), wurde auch in dieser Arbeit mukosal eine Hemmwirkung von ungefähr 40% festgestellt. Dies steht im Widerspruch zu Tiling (1997), die bei Cl^- eine leicht (nicht signifikant) stärkere Hemmwirkung von DIDS mukosal feststellen konnte, was sich u.U. durch den gleichzeitig vorhandenen $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter erklärt werden könnte, der nicht von DIDS beeinflusst wird.

Es ist kein qualitativer Wirkungsunterschied von DIDS zwischen Heu und KF gefütterten Tieren zu beobachten, was darauf hindeutet, dass der Anionenaustauscher immer im

gleichem Maße am Transport beteiligt ist und auch immer (unabhängig von der Fütterung) im gleichen Maße für DIDS sensibel ist. Dieses Ergebnis wird auch durch die Molekularbiologie bestätigt, bei der ebenfalls kein Anstieg der mRNA-Menge der untersuchten Transportproteine (AE2 und Dra) festgestellt werden konnte (siehe Kap.4.3.4.1 und Kap: 4.3.4.2).

Die beobachteten fütterungsabhängigen Veränderungen scheinen alle durch die vorhandenen Transporter und deren Aktivitätssteigerung oder Rekrutierung (Protein trafficking) erzeugt zu werden und nicht durch eine Genaktivierung und damit Vermehrung der Transportproteine. Ähnliche Phänomene werden auch am Pansen des Schafes für die Aktivitätssteigerung bei Umstellung auf KF-Fütterung verantwortlich gemacht (Uppal, S.K. *et al.*, 2003a; Zachos *et al.*, 2005)

Tab. 27 Die Tabelle zeigt die Wirkung von DIDS in anderen Arbeiten über den Schaf-Psalter. Es werden die Arbeit, die verwendete Konzentration und Zugabeseite von DIDS sowie die Ergebnisse und Schlussfolgerungen daraus angegeben.

Quelle	Konzentration	Ergebnis	Schlussfolgerung
Tiling (1997)	0,5 mmol·l ⁻¹ beidseits	Signifikante Reduktion der Cl ⁻ - Transportraten in beide Richtungen (keine Veränderung von J _{net})	Es gibt sowohl einen DIDS-sensiblen Transport apikal als auch basolateral. Apikal kommt es zu einer leicht (nicht sig.) stärkeren Reaktion auf DIDS.
Tiling (1997)	1 mmol·l ⁻¹ einseitig	Signifikante Reduktion der unidirektionalen Fluxraten und J _{net} sowohl bei apikaler als auch basolateraler Zugabe. Eine höhere DIDS-Konzentration führt auch zu einer stärkeren Hemmwirkung.	
Niebuhr (2003)	1 mmol·l ⁻¹ basolateral	Signifikante Hemmung des HCO ₃ ⁻ - Transportes (Reduktion ca 40%)	DIDS-sensibler Transportmechanismus für HCO ₃ ⁻ basolateral.
Ali (2005)	1 mmol·l ⁻¹ apikal	Keine signifikante Reaktion der Acetat-Fluxe auf die Zugabe von DIDS.	Kein SCFA ⁻ -Transport über Anionenaustauscher im Psalter.

Mit 1 mmol·l⁻¹ ist die verwendete Konzentration von DIDS sehr hoch. Da die Hemmung über Verdrängung von Cl⁻ aus dem aktiven Zentrum des Transporters erfolgt, muss die Konzentration jedoch hoch gewählt werden, um deutliche Effekte zu gewährleisten. Dennoch können unspezifische Reaktionen mit Membranproteinen, die die Reaktion irreversibel machen, nicht ausgeschlossen werden (Cabantchik und Greger, 1992; Hoffmann, 1986). Weiterhin muss bei der Interpretation bedacht werden, dass DIDS nicht alle Anionenaustauscher in gleichem Maße hemmt. AE1 wird z.B. stärker gehemmt als AE2, und bei Dra wird nur einer etwa 45%igen Hemmung erreicht (Lamprecht *et al.*, 2005). Auch kommt es zu einer pH-abhängigen Veränderung der Hemmwirkung (Eladari *et al.*, 1998), die jedoch in dieser Arbeit nicht weiter relevant ist, da immer mit dem gleichen pH-Wert (7,4) gearbeitet wurde.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass ein Anionenaustauscher in der apikalen Membran des Psalterepithel vorhanden ist und dass dieser zumindest teilweise durch DIDS hemmbar ist. Ebenso kann gefolgert werden, dass die Fütterung keinen Einfluss auf die Stärke der Hemmwirkung hat.

5.1.3.2. Hemmung des NHE durch Amilorid:

Ziel der Untersuchung war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen intrazellulärem pH (pHi) und dem HCO₃⁻-Transport näher zu charakterisieren und damit Wechselwirkungen zwischen Na⁺/H⁺- und Cl⁻/HCO₃⁻-Transport aufzuzeigen. Die von Tiling (1997) gemachten Versuche konnten keinen signifikanten Einfluss von Amilorid auf den Cl⁻-Transport feststellen. Sie deutete dies mit einer (bereits in anderen Epithelien nachgewiesenen) Entkoppelung von Cl⁻-und Na⁺-Transport unter bestimmten Umständen (Dagher *et al.*, 1996; Dagher *et al.*, 1993; Goldfarb *et al.*, 1988).

Tab. 28 Die Tabelle zeigt die Wirkung von Amilorid, wie sie von anderen Autoren am Schafpsalter beobachtet wurden. Es werden die Arbeit, die verwendete Konzentration und Zugabeseite von Amilorid sowie die Ergebnisse und Schlussfolgerungen daraus angegeben.

Quelle	Konzentration	Ergebnis	Schlussfolgerung
Tiling (1997)	1 mmol·l ⁻¹ apikal	Keine sig. Reaktion auf den Cl ⁻ -Transport.	Entkoppelung von Na ⁺ /H ⁺ -und Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ -Transport bzw. Cl ⁻ /Cl ⁻ -Selbstaustausch
Schultheiss (1995)	< 100 μmol·l ⁻¹ apikal	Kein Effekt auf den elektrogenen Na ⁺ -Transport.	Elektroneutraler Transport wird nicht gehemmt. Im Psalter befindet sich kein elektrogener, amilorid-sensibler Transporter.
Ali (2005)	1 mmol·l ⁻¹ apikal	Dosis-Wirkungs-Kurve, Hemmung des Na ⁺ /H ⁺ -Austauschers durch 1 mmol·l ⁻¹ Amilorid. 1,5 mmol·l ⁻¹ hatten keine stärkere Hemmwirkung mehr.	Residualer Na ⁺ -Transport hängt mit Cl ⁻ -Transport zusammen. (Cl ⁻ -Ersatz hemmt Na ⁺ -Fluxe)
Martens und Gäbel (1988)	1 mmol·l ⁻¹ apikal	Reduzierung der unidirektionalen Na ⁺ -Fluxe bei nur geringer Änderung des J _{net} .	

Absolut gesehen zeigen die Ergebnisse ein sehr heterogenes Bild. Qualitativ jedoch ist bei jedem Epithel eine deutliche Reduktion des Transportes zu sehen. Insgesamt beträgt diese Reduktion im Mittel ca. 20% des Vergleichstransportes. Dies deutet auf eine deutliche Koppelung zwischen pHi und HCO₃⁻-Transport.

Der apikale Cl⁻/HCO₃⁻-Austausch wird wahrscheinlich von der Hemmung des NHE nicht beeinflusst, da das HCO₃⁻ von außen stammt und der NHE keinen direkten Einfluss auf die intrazelluläre Cl⁻-Konzentration hat. Erst der basolaterale Cl⁻/HCO₃⁻-Austausch dürfte durch

den pH_i-Abfall beeinflusst werden, da hier der niedrigere HCO₃⁻-Spiegel in der Zelle infolge der Senkung des pH-Wertes Auswirkungen hat. Dies könnte auch eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen den eigenen Ergebnissen und den Ergebnissen von Tiling (1997) sein. Sollte der basolaterale Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher bei einer Abnahme der HCO₃⁻-Konzentration ersatzweise als Cl⁻/Cl⁻-Austauscher fungieren, könnte dies die von Amilorid unbeeinflussten Cl⁻-Transportraten erklären.

5.1.3.3. Hemmung der Carboanhydrase (CA) durch Ethoxazolamid:

Da HCO₃⁻ eines der wichtigsten Puffersysteme der Zelle ist, gibt es ein Enzymsystem, das die Umwandlung von HCO₃⁻ in CO₂ und H₂O und umgekehrt beschleunigt und so erst eine effektive Pufferung ermöglicht. Eine Hemmung der Carboanhydrase (CA) müsste den pH_i beeinflussen und damit auch den HCO₃⁻-Transport.

Die untersuchten Epithelien reagierten unterschiedlich je nach vorgegebener Bedingung.

Bei Heufütterung und niedrigem Gradienten kommt es zu einem hochsignifikanten Effekt durch Ethoxazolamid. Der gemessene HCO₃⁻-Transport wird um ca 22% (Flux 2) bzw. 43% (Flux 3) reduziert.

Bei Heufütterung und hohem HCO₃⁻-Gradienten kommt es zwar immer noch zu einem signifikanten Effekt von Ethoxazolamid, die Reduktion des Transportes beträgt jedoch nur 21% (Flux 2) bzw. 19 % (Flux 3). Dabei reagierten die Epithelien nicht mehr so einheitlich, was zu einer höheren Varianz und damit zu einer niedrigeren Signifikanz der Ergebnisse führte (Flux 2: p = 0,016 & Flux 3: p = 0,047).

Bei KF-Fütterung und hohem HCO₃⁻-Gradienten schließlich kommt es zu keiner signifikanten Reaktion mehr. Es muss bemerkt werden, dass bei einigen Epithelien eine ebenso starke (und in Einzelfällen sogar stärkere) Hemmwirkung beobachtet wurde. Diese Reaktion war nicht einheitlich reproduzierbar. Mögliche Ursachen für diese Varianz sind nicht bekannt.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss bedacht werden, dass die Reaktion von HCO₃⁻ zu CO₂ und H₂O auch spontan ablaufen kann, allerdings wesentlich langsamer (Conroy und Maren, 1995). Zum Anderen muss bedacht werden, dass die Hemmung durch Ethoxazolamid nicht absolut ist (Chegwidden und Carter, 2000; Conroy und Maren, 1995). Dennoch fügen sich die Ergebnisse in das generelle Bild sehr gut ein. Eine Beeinflussung des pH_i verändert den HCO₃⁻-Transport. Der fehlende Effekt der Hemmung der CA bei Epithelien von KF-Schafen könnte durch die Induktion weiterer, den pH_i regulierender Mechanismen infolge der erhöhten SCFA⁻-Transporte erklärt werden.

5.1.3.4. Hemmung des Na^+/Cl^- -Cotransporters durch Hydrochloridthiazid (HTZ):

Der Nachweis (Ali, 2005) des Na^+/Cl^- -Cotransporters apikal im Psalter eröffnete neue Erklärungsansätze für frühere Beobachtungen. Gleichzeitig stellt sich natürlich auch die Frage, warum zwei elektroneutrale Na^+ -importierende Mechanismen parallel geschaltet vorkommen. Ein Erklärungsversuch könnte sein, dass es zu einer physikalischen Nähe zwischen dem Na^+/Cl^- -Cotransporter und dem $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Austauscher kommt, die dafür Sorge trägt, dass auch bei hohem Cl^- -Gehalt im Lumen der HCO_3^- -Transport aufrechterhalten wird (siehe Kap. 5.1.2.3). Dies wäre eine physiologisch sinnvolle Koppelung, da die HCO_3^- -Resorption auf jeden Fall aufrechterhalten werden muss, weil das in den Labmagen fließende HCO_3^- eine erhöhte HCl-Sekretion erfordert und zur Freisetzung von CO_2 führt was wiederum eine Labmagenverlagerung begünstigen könnte (Dirksen, 1961; Engelhardt und Hauffe, 1975b; Martens, H, 1998).

Eine Wechselwirkung zwischen dem Na^+/Cl^- -Cotransport und dem HCO_3^- -Transport wurde nur beobachtet, wenn serosal die Cl^- -Konzentration abgesenkt wurde. Diese Situation ist *in vivo* nicht zu erwarten. Aus diesem Grund bleibt die Bedeutung des Na^+/Cl^- -Cotransportes für den HCO_3^- -Transport unklar.

Tiling (1997) konnte durch die beidseitige Reduktion von Na^+ den Cl^- -Transport signifikant reduzieren. Dabei beobachtete sie eine Abhängigkeit von der Na^+ -Konzentration. Ab $30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na^+ wurde $J_{\text{ms}}^{\text{Cl}^-}$ signifikant reduziert und ab $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ wurde sowohl $J_{\text{ms}}^{\text{Cl}^-}$ als auch $J_{\text{sm}}^{\text{Cl}^-}$ signifikant reduziert. Dies könnte schon früh ein Hinweis auf den Na^+/Cl^- -Cotransporter im Psalter gewesen sein, der neben dem Na^+/H^+ -Austauscher ebenfalls durch diese Manipulation beeinflusst wurde. Dies bedeutete, dass der Cl^- -Transport nicht nur durch die pHi-Absenkung und die damit verbundene Hemmung des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher reduziert worden ist, sondern auch durch das gestörte Mikromilieu und den reduzierten Eigentransport von Cl^- .

5.1.4. Umkehr der Gradienten für Cl^- und HCO_3^- :

Die bisher bekannten Anionenaustauscher werden nahezu alle durch die Gradienten ihrer Substrate angetrieben. Daher ist der Transport durch diese Gradienten manipulierbar (Tiling, 1997).

Durch entsprechende Versuche sollte im Psalterepithel eine Beeinflussung des HCO_3^- -Transportes nachgewiesen werden und damit ein weiterer Beweis für die postulierten Anionenaustauschersysteme erbracht werden.

Die Versuche zeigten eindeutig, dass sich der HCO_3^- -Transport im Psalter auch umkehren lässt. Die Höhe des umgekehrten Transportes (J_{sm}) ist vom HCO_3^- -Gradienten abhängig. Bei niedrigem Gradient ist sowohl der „physiologische“ (J_{ms}) als auch der umgekehrte Transport (J_{sm}) niedriger als bei hohem Gradienten. Dies relativiert sich jedoch, je länger die

Inkubationsdauer ist. J_{sm} fällt dabei immer geringer aus als J_{ms} unter den gleichen Transportbedingungen (Zeit und HCO_3^- -Gradient)

5.1.5. Einfluss der Fütterung:

Im Pansen sind die Vorgänge, die in der Adaptationszeit von energiearmen Rauhfutter auf energiereiches Konzentratfutter zum Tragen kommen, besser untersucht als im Psalter. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Vorgänge und Einflussgrößen deuten im Pansen ähnlich sind.

Die morphologische Adaptation des Pansens von Kühen ist laut Liebich et al. (1987) nach ca. sechs Wochen abgeschlossen. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die funktionelle sowie die Adaptation auf der molekularbiologischen Ebene schneller von statten gehen (Gäbel et al., 2002; Gäbel et al., 1991a; Gäbel et al., 1991b).

Einheitlich wird festgestellt das im Pansen die Adaptation an KF zu einer gesteigerten Resorption von Elektrolyten führt (Abdoun et al., 2003; Dirksen et al., 1984; Gäbel et al., 1991a; Gäbel et al., 1991b; Shen et al., 2004; Uppal, S.K. et al., 2003a; Uppal, S. K. et al., 2003b). Im Psalter wurde zumindest für den Na^+ - und SCFA^- -Transport ähnliches festgestellt (Ali, 2005). Weitere *in vitro*-Untersuchungen fehlen bisher.

Bei den eigenen Versuchen konnte für den HCO_3^- -Transport festgestellt werden, dass der Transport sich nur wenig verändert. Zwar zeigen einige Epithelien einen stärkeren Transport als Epithelien Heu gefütterter Tiere, dieser Eindruck lässt sich jedoch statistisch nicht bestätigen.

Bei der Beobachtung des HCO_3^- -Transportes im Verlauf der Adaptation an KF-Fütterung zeigt sich, dass der muk \rightarrow sero-Transport nur sehr undeutlich ansteigt. Viele Epithelien von Tieren die KF erhalten hatten, reagieren kaum anders als die Heutiere. Hier wird die individuelle Schwankungsbreite sehr deutlich.

Bei dem Transport in die umgekehrte Richtung (sero \rightarrow muk) werden die Unterschiede zwischen Heu und KF deutlicher. Allerdings verhindert die Individuelle Schwankungsbreite immer noch eine eindeutige statistische Aussage.

Der fehlende Effekt der Fütterung überrascht, weil die bisher untersuchten Transportmechanismen in Pansen- und Psalterepithel durch die Fütterung von KF erhöht werden. Eine mögliche Erklärung der fehlenden Unterschiede im HCO_3^- -Transport könnte die Tatsache sein, dass die Anzahl der Carrierproteine sehr hoch ist und bei der vorgegebenen HCO_3^- -Konzentration keine Sättigung vorlag. Eine Induktion von Carriern durch die Fütterung bliebe dann „unentdeckt“.

Tendenziell ist jedoch ein sich verstärkender Transport zu bemerken, der bis etwa zu zweiten Woche KF-Fütterung anhält, um danach wieder abzusinken. Diese Tendenz wird

von Ergebnisse von Prißnitz (Dissertation in Vorbereitung) unterstützt. In dieser Arbeit wurden Pansensaftproben nach der Fütterung entnommen. Dabei konnte eine Reduktion des (mittleren) pH-Wertes bis zur zweiten Woche KF-Fütterung festgestellt werden, die nach der zweiten Woche wieder langsam anstiegen.

5.2. Diskussion der molekularbiologischen Versuche:

5.2.1. Methodenkritik allgemein:

Die Versuche im Rahmen dieser Dissertation wurden ohne eigene Versuchstiere durchgeführt. Die Proben wurden im Rahmen anderer, ähnlich gelagerter Versuche entnommen (Prißnitz, Dissertation in Vorbereitung; Ali, 2005, siehe Kap. 3.1). Daher war die Wahl der Versuchsbedingungen und auch der Probenanzahl nicht frei, sondern musste sich den Gegebenheiten und Versuchsbedingungen der anderen Arbeitsgruppen anpassen. Hierdurch mussten in einigen Versuchsgruppen sehr geringe Probenumfänge in Kauf genommen werden (z.B. Fütterungsgruppe 2 Tage KF: nur 3 Tiere). Auf eine statistische Auswertung der molekularbiologischen Versuche wurde daher verzichtet.

In der Literatur wird zur Steigerung der Vergleichbarkeit einzelner PCR-Läufe häufig eine Poolung der Kontrollproben durchgeführt und dieser Pool als Referenz mit bekannter Menge (bekannter C_T -Wert) bei jedem neuen PCR-Lauf mitgeführt. Dadurch soll sichergestellt werden, dass sich PCR-inhibitorische Faktoren nicht unbemerkt auf die Effizienz von PCR-Läufen auswirken und diese somit eher miteinander verglichen werden können (Scheffé JH *et al.*, 2006).

In laborinternen Vorversuchen wurde jedoch festgestellt, dass die PCR-Läufe unter den gegebenen Bedingungen (Standard-qPCR-Protokoll) reproduzierbare Ergebnisse liefern, sodass auf eine Poolung der Kontrollproben (Heu-Gruppe) verzichtet wurde.

5.2.2. RNA-Isolierung und RNA-Qualitätskontrolle

RNA wird schnell durch weit verbreitet auftretende RNAsen abgebaut und ist daher eine besonders labile Molekülklasse (Hamasaki *et al.*, 2001). Für die Arbeit mit RNA sind daher besondere Vorsichtsmaßnahmen und Kontrollschritte notwendig (Schroeder *et al.*, 2006).

In der vorliegenden Arbeit erstreckten sich die genannten Vorsichtsmaßnahmen auf die Gewinnung und Lagerung von Gewebeproben und auf die RNA-Isolierung (siehe Kap. 3.9.2). Bei der Probengewinnung aus Gewebstücken, die direkt nach der Schlachtung der Versuchstiere gewonnen wurden, und der Probenlagerung wurde ein RNA-Stabilisationsmedium nach den Vorgaben des Herstellers eingesetzt (siehe Kap. 3.9.2.1)

Obwohl kontrovers diskutiert, bietet dieses Produkt nach Meinung einiger Autoren die Möglichkeit der sicheren und praktikablen Lagerung von Proben, aus welchen in der Folge RNA isoliert werden soll (Chowdary *et al.*, 2006; Micke *et al.*, 2006; Mutter *et al.*, 2004).

Die RNA-Isolierung erfolgte unter RNase-freien Bedingungen mit Einsatz von Puffern, welche chaotrope Salze enthalten (siehe Kap. 3.9.2.2). Diese Form der RNA-Isolierung gewährleistet nach Einschätzung vieler Autoren den Schutz der Proben-RNA vor Degradation (Bastard *et al.*, 2002; Bonham und Danielpour, 1996; Noonberg *et al.*, 1995; Sambrook *et al.*, 1989),

Die oben erwähnten Kontrollschritte zur Feststellung der RNA-Integrität erfolgten in der vorliegenden Arbeit durch kapillarelektrophoretische Analyse (siehe Kap. 3.9.2.4) der Proben-RNA. Da bei diesem Verfahren hauptsächlich die ribosomale RNA (rRNA) als Indikator für die Integrität der mRNA genutzt wird, bleibt die Zuverlässigkeit dieses Verfahrens Gegenstand kontroverser Diskussion (Schroeder *et al.*, 2006). Trotzdem sind einige Autoren der Meinung, dass die kapillarelektrophoretisch gemessene RNA-Integrität einen geeigneten Indikator für die Bewertung von Proben-RNA darstellt (Bastard *et al.*, 2002; Fleige und Pfaffl, 2006; Micke *et al.*, 2006; Schroeder *et al.*, 2006).

5.2.3. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Zur Erstellung von Genexpressionsprofilen durch qPCR ist die reverse Transkription der Proben-RNA in cDNA notwendig (siehe Kap. 3.9.3). Für die Erstellung biologisch präziser Daten ist für diesen Schritt notwendig, dass eine proportionale Abbildung der Kopienzahlen der in der Probe enthaltenen RNA-Sequenzen stattfindet (Bustin, 2002). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein kommerziell erhältliches System verwendet, für welches die Proportionalität dieser Abbildung angenommen werden konnte (Ginzinger, 2002).

5.2.4. Qualitativer Nachweis der Transporter mittels RT-kPCR:

Die reverse Transkription in Kombination mit einer konventionellen PCR wurde lange Zeit auch zur quantitativen Analyse von DNA- und RNA- Material herangezogen. Dabei wurde mittels Densometrie (Vergleich der Größe und Helligkeit einer Bande gegen eine Standardbande) die Menge an DNA im Gel bestimmt, die nach einer bestimmten Anzahl von Vermehrungszyklen vorhanden war. Diese Methode ist ungenauer (Bustin, 2000) als die RT mit anschließender qPCR und wurde daher in dieser Arbeit nicht angewendet. Allerdings ist die konventionelle PCR weniger störanfällig und bietet die Möglichkeit der Amplifikation längerer DNA-Teilsequenzen, sodass sie sich für eine erste Überprüfung eines Targets gut eignet und die Übereinstimmung mit der erwarteten Amplifikon-Länge relativ leicht mittels Gelelektrophorese überprüft werden kann. Daher diente in der vorliegenden Arbeit die konventionelle PCR dem qualitativen Nachweis der gesuchten Transporter im Psalter vom Schaf.

5.2.5. Quantitative PCR

5.2.5.1. Etablierungsverfahren:

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten qPCR-Assays wurde ein Standard-58°C-two step-qPCR-Protokoll (Annealing und Elongation bei 58°C, Denaturierung bei 95°C; siehe Kap.:3.9.5.6) verwendet, welches zwar zuvor für jedes GOI auf Anwendbarkeit geprüft wurde, primerspezifische optimale Annealingtemperaturen jedoch nicht berücksichtigte. Das Standardprotokoll ermöglichte die optimale Ausnutzung der Laborkapazitäten und gewährleistete die Minimierung des Risikos einer fehlerhaften Geräte-Programmierung. Ein weiterer Vorteil des Standardprotokolls lag darin, dass Primer verwendet werden konnten, die in früheren Arbeiten für die Spezies Schaf mit diesem Protokoll bereits etabliert worden waren.

5.2.5.2. Referenzgen (housekeeping gene)

Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit der Daten aus qPCR-Experimenten wurde in der vorliegenden Arbeit die Expressionsrate des Referenzgens β -Aktin bestimmt (siehe Kap. 3.9.5.2). Die C_T -Werte von β -Aktin lagen in allen Proben um die 20, was auf vergleichbare Ausgangskonzentrationen an cDNA schließen lässt. β -Aktin ist in vielen Untersuchungen erfolgreich als Referenzgen eingesetzt worden (Kreuzer *et al.*, 1999), allerdings bestehen auch Hinweise auf eine Regulation von β -Aktin in verschiedenen biologischen Systemen (Bustin, 2000). Daher wird es für nachfolgende Untersuchungen

sinnvoll sein, objektiv gewählte Kombinationen aus Referenzgenen einzusetzen (Vandesompele *et al.*, 2002).

5.2.5.3. Auswirkungen der Fütterung auf die Expression von mRNA:

Bei keinem der untersuchten Transporter ist eine eindeutige Genregulation erkennbar.

Die mit dieser Methode gewonnenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Fütterung sich nicht in der Expressionsrate der untersuchten Transporter niederschlägt, auch wenn die transportphysiologischen Versuche durchaus eine Erhöhung der Transportraten durch die Futterumstellung annehmen lassen.

Daher liegt nahe, dass andere Mechanismen für die transportphysiologischen Veränderungen verantwortlich sind. Ein möglicher Mechanismus ist ein Phänomen, welches als „protein trafficking“ bezeichnet wird. Dies bedeutet, dass die entsprechenden Transporter in Membranvesikeln subapikal gespeichert sind und bei Bedarf innerhalb von sehr kurzer Zeit an die apikale Membran inseriert werden können, um dort zum Transport herangezogen zu werden (Proteintranslokation) (Zachos *et al.*, 2005). Somit könnten höhere Transportraten erzielt werden, ohne dass eine aktive Expressionsregulation stattfindet. Der Nachweis dieses „protein trafficking“ wird das Ziel weiterer Untersuchungen sein.

Eine weitere mögliche Ursache für das Fehlen einer signifikanten Regulation könnte sein, dass die Futterumstellung allein nicht bei allen Tieren ausreichend Reize im Psaltergewebe setzte (der Pansen fängt die stärksten Abweichungen auf), so dass einige Tiere keine oder nur sehr geringe Expressionsänderungen *in vivo* zeigten. Es ist jedoch festzustellen, dass Ali (2005) im Psalter von KF gefütterten Schafen erhöhte Transportraten von Na⁺ und Acetat beobachtet hat, also zumindestens für Na⁺ und Acetat ein ausreichender Regulations-Reiz durch die Futterumstellung im Psalter gesetzt wird.

5.3. Schlussfolgerungen:

5.3.1. Transportphysiologische Ergebnisse:

Der HCO_3^- -Transport am Psalterepithel zeigt eine große Variation sowohl zwischen den Tieren als auch zwischen Epithelien gleicher Tiere. Trotz dieser großen Varianz des Transportes bestätigen die Ergebnisse eindeutig, dass

- ◇ es zu einer HCO_3^- -Absorption kommt,
- ◇ der HCO_3^- -Transport asymmetrisch umkehrbar ist,
- ◇ der HCO_3^- -Transport von mehreren Faktoren abhängt (apikale Aufnahme; intrazelluläre Bildung/ Verbrauch; basolaterale Abgabe).
- ◇ es einen starken Zusammenhang mit dem intrazellulären pH-Wert gibt,
- ◇ die Fütterung einen geringeren Einfluss hat, als vermutet wurde.

5.3.2. Molekularbiologische Ergebnisse:

Es konnte mRNA von fünf verschiedenen Transportern, die alle direkt oder indirekt mit dem HCO_3^- -Transport assoziiert sind, nachgewiesen werden.

Es konnte keine Expressionsregulation der untersuchten Transporter gezeigt werden.