

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Funktionelle und molekularbiologische Untersuchungen
zum Glukosetransport am proximalen Jejunum des
Schweins**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Kristina Schenke, geb. Steglich
Tierärztin
aus Dresden

Berlin, 2013

Journal-Nr.: 3678

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jörg R. Aschenbach
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

glucose, absorption, jejunum, epithelium, pigs, transporters, endocytosis, glycolysis,
gluconeogenesis, messenger RNA, polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 25.09.2014

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
<u>1. EINLEITUNG.....</u>	1
<u>2. LITERATUR.....</u>	2
2.1 ALLGEMEINE BEDEUTUNG DER GLUKOSERESORPTION BEIM SCHWEIN.....	2
2.2 BEDEUTUNG DER GLUKOSERESORPTION BEI PATHOLOGISCHEN ZUSTÄNDEN.....	2
2.2.1 Bedeutung bei Durchfallerkrankungen des Schweins.....	2
2.2.2 Bedeutung für Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels des Menschen.....	2
2.3 FUTTERAUFNAHME UND VERDAUUNG.....	3
2.4 MECHANISMEN DER GLUKOSERESORPTION.....	3
2.4.1 Das klassische Modell der Glukoseresorption.....	3
2.4.2 Alternative Mechanismen der Glukoseresorption.....	4
2.4.3 Parazellulärer Massenflux (Pappenheimer-Hypothese).....	5
2.4.4 Transzellulärer Massenflux über in Reihe geschaltete GLUT2 (Kellett-Hypothese).....	5
2.4.5 Endo- und Exozytose.....	6
2.5 MOLEKULARE ÄQUIVALENTE DER GLUKOSERESORPTION.....	8
2.5.1 Mitglieder der SLC5A-Genfamilie.....	8
2.5.2 Mitglieder der SLC2A-Genfamilie.....	9
2.6 GLUKOSESTOFFWECHSEL IN DER DARMEPITHELZELLE.....	13
2.6.1 Glykolyse.....	13
2.6.2 Gluconeogenese.....	14
2.7 BEDEUTUNG DER LITERATUR FÜR DIE EIGENE FRAGESTELLUNG.....	14
2.7.1 Funktionelle Studien.....	14
2.7.2 Molekularbiologische Studien.....	15
<u>3. MATERIAL UND METHODEN.....</u>	16
3.1 <i>IN-VITRO</i> -UNTERSUCHUNGEN MIT DER USSING-KAMMER-TECHNIK.....	16
3.1.1 Versuchstiere.....	16
3.1.2 Gewinnung und Präparation des Dünndarmes.....	16
3.1.3 Ussing-Kammer-Technik.....	16
3.1.4 Elektrophysiologische Messverfahren.....	18
3.1.5 Gruppierung der Epithelien.....	19
3.1.6 Bestimmung des Glukose- und Mannit-Uptakes.....	19
3.1.7 Übersicht über die Versuchsanordnungen der Ussing-Kammer-Versuche.....	20
3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	24
3.2.1 Probennahme und Probenlagerung.....	24
3.2.2 Extraktion der Gesamt-RNA.....	24
3.2.3 Isolierung der PolyA ⁺ -mRNA mittels Oligotex [®] mRNA Kit.....	25
3.2.4 DNA-Verdauung mit RQ1 RNase-Free DNase.....	25
3.2.5 Zweischnitt-RT-PCR.....	26
3.2.6 Sequenzierreaktion.....	28
3.3 STATISTIK UND DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE.....	29
<u>4. ERGEBNISSE.....</u>	30
4.1 GLUKOSEAUFNAHME IN DAS DARMEPITHEL.....	30

4.1.1	Der Einfluss der Verfügbarkeit von Glukose auf die GLUT- und SGLT1-vermittelte Glukoseaufnahme.....	30
4.1.2	Die Bedeutung der Endozytose bei der Glukose- bzw. Mannitaufnahme in das Epithel.....	33
4.1.3	Zeitabhängigkeit der Glukoseaufnahme und deren Vergleich mit der Mannitaufnahme.....	38
4.1.4	Einfluss verschiedener Substanzen in hohen Konzentrationen auf die nicht SGLT1- und GLUT-vermittelte Glukose- und Mannitaufnahme.....	41
4.2	EINFLUSS DER ZELLULÄREN GLUKOSEKONZENTRATION AUF DIE INTRAEPITHELIALE GLUKOSEAUFNAHME.....	47
4.2.1	Der Einfluss des serosalen Effluxes und der intrazellulären Verstoffwechslung auf die Glukoseaufnahme.....	47
4.2.2	Der Einfluss der Anwesenheit von Laktat und der Laktatbildung auf die Glukoseaufnahme.....	50
4.2.3	Der Einfluss der Glukoneogenese auf die Glukoseaufnahme.....	51
4.3	MOLEKULARBIOLOGISCHER NACHWEIS DER mRNA DES SGLT1 UND VERSCHIEDENER PASSIVER GLUKOSETRANSPORTER (GLUT).....	53
4.3.1	SGLT1.....	53
4.3.2	Passive Glukosetransporter (GLUT).....	54
<u>5. DISKUSSION.....</u>		59
5.1	GLUKOSETRANSPORT ÜBER SGLT1 UND GLUT.....	59
5.1.1	Apikale Glukoseaufnahme über SGLT1 und GLUT.....	59
5.1.2	Hinweise auf eine clathrinabhängige Insertion des apikalen GLUT.....	60
5.1.3	Bedeutung der intrazellulären Glukoseverstoffwechslung und Laktatakkumulation für die SGLT1- und GLUT-abhängige Glukoseaufnahme.....	61
5.1.4	Glukoneogenetische Aktivität im Darmepithel und deren Einfluss auf die apikale Glukoseaufnahme.....	63
5.1.5	Bedeutung des basolateralen Glukoseeffluxes für die apikale Glukoseaufnahme über SGLT1 und GLUT.....	63
5.2	GLUKOSEAUFNAHME ÜBER ENDOZYTÖSE.....	64
5.3	PARAZELLULÄRER GLUKOSETRANSPORT.....	65
5.4	GLUKOSEAUFNAHME ÜBER „ALTERNATIVE“ MECHANISMEN.....	67
5.5	MÖGLICHE BEDEUTUNG DER mRNA-VORKOMMEN VERSCHIEDENER PASSIVER GLUKOSETRANSPORTER SOWIE DES SGLT1 IM PROXIMALEN JEJUNUM UND ANDEREN FÜR DEN GLUKOSEMETABOLISMUS BEDEUTENDEN ORGANEN.....	68
5.5.1	mRNA-Vorkommen verschiedener Glukosetransporter im proximalen Jejunum.....	68
5.5.2	mRNA-Vorkommen verschiedener Glukosetransporter in der Leber.....	70
5.5.3	mRNA-Vorkommen verschiedener Glukosetransporter in der Niere.....	71
5.5.4	mRNA-Vorkommen verschiedener Glukosetransporter in der Skelettmuskulatur...71	
5.5.5	Zusammenfassende Wertung der mRNA-Vorkommen.....	72
<u>6. ZUSAMMENFASSUNG.....</u>		73
<u>7. SUMMARY.....</u>		75
<u>8. LITERATURVERZEICHNIS.....</u>		77
<u>9. ANLAGEN.....</u>		97
9.1	ZUSAMMENSETZUNG DER PUFFERLÖSUNGEN.....	97

9.1.1	Pufferlösungen der Versuchsserie „4.1.1 Einfluss der Glukoseverfügbarkeit auf die SGLT1- und GLUT-vermittelte Glukoseaufnahme“.....	97
9.1.2	Pufferlösung der Versuchsserien „4.1.2 Die Bedeutung der Endozytose bei der Glukose- bzw. Mannitaufnahme in das Epithel“ und „4.1.3 Zeitabhängigkeit der Glukoseaufnahme und deren Vergleich mit der Mannitaufnahme“.....	97
9.1.3	Pufferlösungen der Versuchsserie „4.1.4 Einfluss verschiedener Substanzen in hohen Konzentrationen auf die nicht transportervermittelte Glukose- und Mannitaufnahme“.....	98
9.1.4	Pufferlösungen der Versuchsserie „4.2.1 Der Einfluss der intrazellulären Verstoffwechslung und des serosalen Effluxes auf die Glukoseaufnahme“.....	99
9.1.5	Pufferlösungen der Versuchsserie „4.2.2 Der Einfluss der Anwesenheit von Laktat und der Laktatbildung auf die Glukoseaufnahme“ und „4.2.3 Der Einfluss der Glukoneogenese auf die Glukoseaufnahme“.....	99
9.2	VERWENDETE CHEMIKALIEN.....	100
9.3	DATENANHANG.....	101
9.3.1	Elektrophysiologische Daten zu Kapitel 4.1.4.....	101
9.3.2	Elektrophysiologische Daten zu Kapitel 4.2.1.....	103
9.3.3	Primerbereinigte veröffentlichte Gensequenzen.....	105
<u>10. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....</u>		107
<u>11. DANKSAGUNG.....</u>		109
<u>12. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....</u>		110

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser (Aqua bidestillata)
Aqua dest.	Destilliertes Wasser (Aqua destillata)
BBM	Bürstensaummembran (brush border membrane)
bp	Basenpaare
Cyt B	Cytochalasin B
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	deoxy Ribonucleosid-5'-triphosphat
DOG	Desoxyglukose
Eq	Equivalent (Einheit des Kurzschlussstroms); Strom, welcher dem Transport von 1 mol einfach positiv geladener Ionen entspricht
g	Erdbeschleunigung: $9,81 \text{ m/s}^2$
GLUT	Glukosetransporter
G_t	Gewebeleitfähigkeit
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-Piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
I _{sc}	Kurzschlussstrom
Kap.	Kapitel
K _d	Dissoziationskonstante
K _i	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
lat.	lateinisch
MAP(-Kinase)	mitogen-activated protein (-Kinase)
MDCK	Zellkultur-Linie aus caniner Niere (Madin-Darby canine kidney cells)
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase (myosin light chain kinase)
3-MPA	3-Mercaptopicolinsäure-Hydrochlorid
mRNA	messenger RNA
n	Stichprobenanzahl
N	Anzahl der verwendeten Versuchstiere für n Beobachtungen
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEM	N-Ethylmaleimid
P _d	transepitheliale Potentialdifferenz
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of mean)
SGLT1	Na ⁺ /Glukose-Kotransporter vom Typ 1 (sodium-dependent glucose transporter 1)
SNP	single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismen); Variationen einzelner Basenpaare in einem DNA-Strang
Tab.	Tabelle
u.	und

1. Einleitung

Schweine decken ihren Energiebedarf über sehr stärke- und zuckerreiche Mahlzeiten. Dies erfordert hocheffiziente Mechanismen der Glukoseresorption im Dünndarm. Letztere sind beim Menschen auch an pathologischen Entgleisungen des Energiestoffwechsels wie z.B. Adipositas und Diabetes mellitus beteiligt (BASU et al. 2000; STOLIC et al. 2002). Untersuchungen über die Glukoseresorption des Schweins sind somit (1) aus tierernährerischer sowie ökonomischer Sicht und (2) als Modellstudien für Zivilisationskrankheiten des Menschen interessant.

Es gibt jedoch beim Schwein bisher kaum Kenntnisse zu den Mechanismen. Bei Labornagern sind diese wesentlich besser erforscht, obwohl auch hier strittig ist, wie der Hauptanteil der Glukose aus dem Darm resorbiert wird. Als erwiesen gilt, dass der SGLT1 aktiv und natriumabhängig entgegen eines Konzentrationsgefälles Glukose in die Darmepithelzellen transportiert (THORENS 1996; WRIGHT et al. 2007). Allerdings gelangt dieser Transporter bei höheren Glukosekonzentrationen schnell in seine Sättigung (WRIGHT et al. 2007). Wie unter diesen Bedingungen der Massenstrom an Glukose über das Epithel erfolgt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Die sogenannte *Kellett*-Hypothese propagiert einen vorwiegend transzellulären Flux, bei dem neben dem Na⁺-gekoppelten Glukosetransport (SGLT-1) auch passive Glukosetransportproteine (GLUT2) in der lumenseitigen Zellmembran rekrutiert werden (LETURQUE et al. 2005; KELLETT et al. 2008). Im Gegensatz dazu propagiert die *Pappenheimer*-Hypothese einen parazellulären Massenflux der Glukose (PAPPENHEIMER 1993).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels *In-vitro*-Studien am „vitalen“ Darmgewebe die Mechanismen der Glukoseresorption im proximalen Jejunum des Schweins zu identifizieren und zu charakterisieren.

Mögliche Wechselwirkungen mit anderen zellulären Stoffwechselwegen sowie Substraten von Glukosetransportproteinen sollten überprüft werden. Neben der transporterermittelten Resorption sollte auch die Möglichkeit einer parazellulären Resorption sowie die mögliche Beteiligung eines weiteren potentiellen Resorptionsweges, der Endozytose, an der Glukoseresorption überprüft werden.

Weiterhin sollte im Rahmen dieser Arbeit der molekularbiologische Nachweis verschiedener Glukosetransportproteine auf mRNA-Ebene im proximalen Jejunum sowie weiterer für die Glukose-Homöostase wichtiger Organe erbracht werden.

2. Literatur

2.1 ALLGEMEINE BEDEUTUNG DER GLUKOSERESORPTION BEIM SCHWEIN

Glukose ist eine essentielle Substanz für den Körper und ein zentrales Substrat für den Intermediärstoffwechsel. Sie liefert den Kohlenstoff für zahlreiche Verbindungen die der Organismus zu synthetisieren imstande ist.

Das Schwein nimmt Glukose vorrangig in Form von Stärke auf (NAFIKOV u. BEITZ 2007). Bei Stärke handelt es sich um glykosidisch gebundene D-Glukose. Sie besteht zum einen aus Amylose, d.h. linearen Ketten, die durch α -1,4-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind, sowie aus Amylopektin, d.h. stark verzweigten Ketten, die durch α -1,4- und α -1,6-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind (GALLANT et al. 1992).

Die Mechanismen der Glukoseresorption und deren Regulation beim Schwein sind aus mehreren Gesichtspunkten von praktischer Relevanz. Glukose stellt den Hauptenergieträger für das Schwein dar. Die Verdauung der verfütterten Kohlenhydrate und die anschließende Resorption der Glukosemonomere im Dünndarm sind dadurch entscheidende Determinanten der Energieverwertung (BOUDRY et al. 2003). Die Effizienz der Kohlenhydratverdauung und Glukoseresorption im Schweinedünndarm ist dabei insgesamt sehr hoch. Innerhalb von 8 Stunden nach Fütterung erscheinen 76 bis 92 % der verfütterten Glukose im Portalvenenblut (BACH KNUDSEN et al. 2000). Diese hohe Effizienz der Glukoseresorption ist neben dem Schwein auch für den Menschen typisch (COGGAN u. COYLE 1988).

2.2 BEDEUTUNG DER GLUKOSERESORPTION BEI PATHOLOGISCHEN ZUSTÄNDEN

2.2.1 Bedeutung bei Durchfallerkrankungen des Schweins

Die pathophysiologische Bedeutung einer insuffizienten Glukoseresorption zeigt sich beim Schwein vor allem im Zusammenhang mit Durchfallerkrankungen. So führt die transmissible Gastroenteritis (TGE) ausgelöst durch Viren aus der Gruppe der Coronaviren zu einer verringerten Netto-Glukoseresorption infolge einer Atrophie der Dünndarmzotten (KELJO et al. 1985). Diese Atrophie der Dünndarmzotten führt dazu, dass nach der TGE-Infektion nur noch ein Glukosetransportsystem aktiv ist, während es bei nicht infizierten Tieren zwei Transportsysteme zu geben scheint (KELJO et al. 1985).

Weiterhin spielen in der Schweinemast auch ökonomische Gesichtspunkte eine wichtige Rolle. So interferieren einige Pflanzeninhaltsstoffe mit der intestinalen Glukoseresorption und führen zu einer Hemmung der Glukoseaufnahme im Dünndarm des Schweins (KWON et al. 2007; CERMAK et al. 2004; SHIMIZU et al. 1997), was sich wiederum negativ auf die Mastleistung auswirken kann.

2.2.2 Bedeutung für Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels des Menschen

Bisherige Studien zur Untersuchung jener pathologischen Entgleisungen des Energiestoffwechsels, die beim Menschen häufig auftreten, wurden vorwiegend an Ratte und Maus durchgeführt. Allerdings zeigen diese als Nagetiere in der evolutionär geprägten Futterauswahl und im Futteraufnahmeverhalten eine große Divergenz zum Menschen. Im Gegensatz dazu weist das Schwein als omnivores Tier deutlich mehr physiologische Gemeinsamkeiten mit dem Menschen auf und ist somit für die Grundlagenforschung besser geeignet (NAFIKOV u. BEITZ 2007; PUIMAN u. STOLL 2008). Um das Schwein als

Modelltier für den Menschen zu etablieren, ist zunächst eine umfangreiche Charakterisierung der Glukoseaufnahmemechanismen nötig.

Störungen der Glukoseaufnahme im Jejunum sind mit vielen wichtigen Erkrankungen vergesellschaftet. So ist bekannt, dass die Mechanismen der Glukoseresorption bei Diabetes mellitus Typ 2 in der apikalen und basolateralen Membran des Dünndarmepithels hochreguliert werden (DEBNAM et al. 1990; MIYAMOTO et al. 1991; BURANT et al. 1991; FUJITA et al. 1998). Im Gegensatz dazu unterscheidet sich die enterale Glukoseaufnahme bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 nicht von der gesunder Menschen (GEORG et al. 2002). Weitere Erkrankungen des Menschen wie das metabolische Syndrom und Adipositas gehen mit einer erhöhten Glukoseaufnahme im Jejunum sowie mit verändertem Uptake in anderen für den Glukosestoffwechsel wichtigen Organen einher (GOGIA u. AGARWAL 2006; MARTYN et al. 2008).

Wichtige angeborene Störungen im Glukosestoffwechsel des Menschen sind das Glukose-Galaktose-Malabsorptions-Syndrom, hervorgerufen durch eine Mutation des SGLT1, sowie das Fanconi-Bickel-Syndrom, hervorgerufen durch eine Mutation des GLUT2 (PASCUAL et al. 2004). Auch für die Erforschung dieser Erkrankungen könnte das Schwein als Modelltier dienen.

2.3 FUTTERAUFNAHME UND VERDAUUNG

Für omnivore Tiere wie Schweine stellen Kohlenhydrate den wichtigsten energieliefernden Nahrungsbestandteil dar. Sie dienen in erster Linie der Deckung des Energiebedarfes, daneben auch als Ausgangspunkt für die Biosynthese einer großen Zahl von Verbindungen wie Lipiden und nicht essentiellen Aminosäuren (ZHAO u. KEATING 2007). In der konventionellen Schweinefütterung wird der größte Teil der mit der Nahrung zugeführten Kohlenhydrate in Form von Stärke verabreicht (NAFIKOV u. BEITZ 2007). In Getreide, Kartoffeln und einigen anderen Pflanzenprodukten stellt Stärke das Hauptkohlenhydrat dar. Bei Stärke handelt es sich um ein Polysaccharid, welches aus Amylose und Amylopektin zusammengesetzt ist (GALLANT et al. 1992). Die Verdauung der Stärke beginnt bereits in Maulhöhle und Magen, da das Schwein, wenn auch in geringerem Maße als der Mensch, schon mit dem Mundspeichel eine Amylase sezerniert (ZEBROWSKA et al. 1983). Diese Amylase kann v.a. in den oral gelegenen Anteilen des Magens den Abbau der Stärke einleiten. Sie wirkt allerdings nur so lange, bis der pH-Wert in den sauren Bereich absinkt. Da Schweine einen zusammengesetzten Magen aufweisen, ist in dem Bereich der kutanen drüsenlosen Schleimhaut noch in geringem Maße eine Aktivität der Amylase möglich. Aus quantitativer Sicht spielt dieser Kohlenhydratabbau allerdings nur eine untergeordnete Rolle (ZEBROWSKA et al. 1983).

Den Hauptort der Kohlenhydratverdauung durch körpereigene Enzyme stellt der Dünndarm dar (NOAH et al. 1999). Hier erfolgt der Abbau der Stärke durch die α -Amylase des Pankreas. Die Spaltung der Moleküle erfolgt über verschiedene Dextrine u.a. zu Maltose, einem Disaccharid aus zwei Glukosemolekülen. Diese nicht absorbierbare Form wird, wie auch andere Disaccharide (Saccharose, Laktose) durch Enzyme des Darmsaftes und durch solche der Darmzotten zu resorptionsfähigen Monosacchariden aufgespalten (ZHAO u. KEATING 2007).

2.4 MECHANISMEN DER GLUKOSERESORPTION

2.4.1 Das klassische Modell der Glukoseresorption

Das klassische Modell der Glukoseresorption geht von der Dominanz einer (sekundär) aktiven, transzytosolischen Glukoseresorption im Darm aus. Nach diesem Modell wird

Glukose im ersten Schritt über einen natriumabhängigen Kotransporter, den SGLT1, in die Epithelzellen aufgenommen und dort angereichert. Der für diesen ersten Schritt notwendige Natriumgradient wird durch die basolateral lokalisierte Na^+/K^+ -ATPase aufrechterhalten (SCHULTZ u. CURRAN 1970; CRANE 1977; SEMENZA et al. 1984). Die in der Folge erhöhte intrazelluläre Glukosekonzentration begünstigt anschließend die passive, erleichterte Diffusion der Glukose in das Blut über einen GLUT-Carrier in der basolateralen Membran (WOOD u. TRAYHURN 2003; WRIGHT et al. 2003). Die Isoform des basolateralen GLUT ist speziesübergreifend der niederaffine GLUT2 (THORENS 1996; WRIGHT et al. 2003). In der apikalen Membran existieren neben dem SGLT1 auch zwei konstitutiv exprimierte GLUT-Isoformen. Zum einen handelt es sich dabei um den GLUT5, der vorwiegend im vorderen Dünndarm vorhanden ist und zum anderen um den GLUT7, der vorwiegend im Ileum vorkommt (LI et al. 2004). Beide Isoformen vermitteln bei *in vitro*-Expressionen in *Xenopus-laevis*-Oozyten den Transport von Fruktose und Glukose. Der GLUT5 nimmt aber beispielsweise *in vivo* nur am Fruktose- und nicht am Glukosetransport teil (CORPE et al. 1996; LI et al. 2004).

2.4.2 Alternative Mechanismen der Glukoseresorption

Im klassischen Modell der Glukoseresorption ist der SGLT1 der einzige apikale Transporter für Glukose und bestimmt die Gesamteffizienz der Resorption. Es ist jedoch fraglich, ob dies in allen Situationen zutrifft. Gegen die Allgemeingültigkeit dieses einfachen Transportmodells sprechen mehrere Gründe. Ein Grund ist die Transportkinetik des SGLT1 (AU et al. 2002). Der SGLT1 hat bei den meisten Spezies eine halbmaximale Sättigungskonstante (Michaelis-Menten-Konstante) von etwa 100-700 μM . WOLFFRAM et al. (1986) geben für das Schwein eine Michaelis-Menten-Konstante von 690 μM *in vitro* an. Er ist dementsprechend ein hochaffiner Transporter mit geringer Transportkapazität. Über ernährungsphysiologisch relevante luminale Glukosekonzentrationen liegen bislang nur wenige gesicherte Daten vor. Laut FERRARIS et al. (1990) treten bei Ratte, Kaninchen und Hund maximale Glukosekonzentrationen von 48 mM auf. Für die Ratte werden auch luminale Glukosekonzentrationen von 100 mM beschrieben (AU et al. 2002). Dabei ist aber zu beachten, dass Glukose die Bürstensaummembran meist in Form von Dissacchariden wie Sucrose und Maltose erreicht. Die relevante Glukosekonzentration für die Absorption wird somit erst nach Spaltung der Disaccharide durch membranständige hydrolytische Enzyme der Microvilli erreicht. Diese übersteigt somit die Konzentration der freien Glukose im Chymus. Berechnungen ergaben, dass die effektive luminale Glukosekonzentration bis zu 300 mM betragen kann (PAPPENHEIMER 1993). Für das Schwein gibt es bisher keine Angaben zu luminalen Glukosekonzentrationen im Dünndarm. Allerdings sind aufgrund der hochkonzentrierten und kohlenhydratreichen Fütterung und der niedrigen Fütterungsfrequenz kurzzeitig sehr hohe Glukosekonzentrationen im Bereich der Bürstensaummembran zu erwarten.

Entsprechend der Transportkinetik des SGLT1 gelangt dieser somit bei ernährungsphysiologisch relevanten Konzentrationen schnell in die Sättigung. Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Michaelis-Menten-Konstante für die Glukoseabsorption im Darm des Menschen bei etwa 100 mM und mehr liegt und bis zu einer Konzentration von 280 mM ein annähernd linearer Anstieg der Absorption erfolgt (HOLDSWORTH u. DAWSON 1964; PARSONS u. PRICHARD 1966).

Darüber hinaus wäre eine Natrium-Limitierung des Transportes bei maximalen Transportraten zu erwarten. Geht man z.B. beim Mensch von maximalen Resorptionsraten von ca. 500 $\text{mmol}\cdot\text{h}^{-1}$ aus (COGGAN u. COYLE 1988), so würde das obige Transportmodell implizieren, dass gleichzeitig ca. 1 $\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$ Natrium mit resorbiert würde. Letzteres entspräche

in etwa dem Natriumumsatz beider Nieren (angenommene glomeruläre Filtrationsrate: $100 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; LUIPPOLD et al. 2001) und erscheint physiologisch nicht realisierbar.

Es muss also mindestens noch eine zweite Komponente geben, die an der Glukoseaufnahme in das Darmepithel, vor allem bei hohen luminalen Glukosekonzentrationen, beteiligt ist. Diese zweite Komponente wird als passiver Mechanismus beschrieben. Möglicherweise handelt es sich um einfache Diffusion, da sie linear verläuft und auch bei Glukosekonzentrationen von 100 mM und mehr noch nicht in die Sättigung gelangt (MANOME u. KURIAKI 1961; DEBNAM u. LEVIN 1975; LOSTAO et al. 1991). Bei höheren luminalen Glukosekonzentrationen transportiert die passive Komponente 3 bis 5 mal mehr Glukose als der aktive Transportmechanismus über den SGLT1 und stellt somit den Hauptweg der Glukoseresorption dar.

Es gibt zurzeit zwei alternative Modelle, den Massenflux über das Darmepithel bei hohen Glukosekonzentrationen zu beschreiben: die Pappenheimer- und die Kellett-Hypothese.

2.4.3 Parazellulärer Massenflux (Pappenheimer-Hypothese)

Entsprechend der Pappenheimer-Hypothese erfolgt der Massenflux von Glukose bei hohen luminalen Konzentrationen als parazelluläre Diffusion (PAPPENHEIMER u. REISS 1987). PAPPENHEIMER (1993) geht davon aus, dass durch Na^+ -gekoppelten Transport aus dem Lumen in den Interzellularräumen Glukosekonzentrationen bis 425 mM entstehen, welche dann osmotisch Wasser nach sich ziehen. Mit dem Wasser wird wiederum eine große Menge Glukose im sogenannten „solvent drag“ mitresorbiert. Im Jahr 1987 konnten MADARA u. PAPPENHEIMER zeigen, dass der Glukosetransport über den SGLT1 zu einer Kontraktion des perijunctionalen Aktomyosinringes führt und somit die Erweiterung der interzellulären tight junctions hervorruft. Allerdings kann die Pappenheimer-Hypothese nicht erklären, warum es bei sinkenden Glukosekonzentrationen im Darmlumen nicht zu einem Rückfluss von Glukose in das Lumen kommt. Eine quantitative Abschätzung des parazellulären Glukoseflusses an nicht narkotisierten Hunden ergab zudem, dass dieser wahrscheinlich maximal 2 bis 7 % der Gesamtresorption ausmacht (LANE et al. 1999).

2.4.4 Transzellulärer Massenflux über in Reihe geschaltete GLUT2 (Kellett-Hypothese)

Entsprechend der Zweifel an der Pappenheimer-Hypothese erscheint gegenwärtig vor allem die Kellett-Hypothese geeignet, die hocheffiziente intestinale Glukoseresorption bei starker Glukoseanflutung zu erklären. Laut der Kellett-Hypothese wird bei hohen luminalen Glukosekonzentrationen der GLUT2 auch in die apikale Zellmembran eingebaut. Dieser Mechanismus wird durch den SGLT1 induziert und ist glukoseabhängig. Bei hohen Glukosekonzentrationen im Darmlumen kommt es zu einer SGLT1-abhängigen Aktivierung der Proteinkinase C β II (PKC β II). Über einen intrazellulären Signalweg erfolgt dann die Verlagerung von GLUT2-haltigen Vesikeln an die apikale Zellmembran und der schnelle Einbau von GLUT2 in diese. Die Anzahl an SGLT1-Molekülen in der apikalen Membran bleibt dabei konstant. Der Glukose-Einstrom und der Glukoseausstrom in Richtung Blut erfolgen dann passiv über in Reihe geschaltete GLUT2 (HELLIWELL et al. 2000a,b; KELLETT u. HELLIWELL 2000; KELLETT 2001; GOUYON et al. 2003). Die Glukoseresorption ist nun um ein mehrfaches höher als die alleinige Resorption durch den SGLT1. Sinkt die Glukosekonzentration im Darmlumen, wird der GLUT2 innerhalb kürzester Zeit aus der apikalen Membran wieder ausgebaut, um einen Glukoseverlust in das Darmlumen zu vermeiden. Zahlreiche Untersuchungen deuten darauf hin, dass dieser Weg der Glukoseaufnahme existiert und auch funktionell relevant ist (HELLIWELL et al. 2000a,b;

KELLETT u. HELLIWELL 2000; KELLETT 2001; KELLETT u. BROT-LAROCHE 2005; SCOW et al. 2011).

AU et al. (2002) sowie AFFLECK et al. (2003) gelang der immunhistochemische Nachweis des GLUT2 in der intestinalen apikalen Membran der Ratte. Lange Zeit war es nicht möglich, die apikale Translokation des GLUT2 nachzuweisen. Die Ursache für den schwierigen Nachweis dieses Effektes bestand darin, dass das Level des GLUT2 in der apikalen Membran *in vivo* um ein mehrfaches höher ist als *in vitro*. Ein Grund dafür sind die außerhalb des lebenden Organismus fehlenden notwendigen Hormone, um die PKC β II zu aktivieren. Entfernt man das Jejunum aus dem Tier, wird innerhalb weniger Minuten ein Teil des GLUT2 aus der apikalen Membran ausgebaut (HELLIWELL u. KELLETT 2002). Ein weiterer Faktor, der den Einbau des GLUT2 in die apikale Membran beeinflusst, ist die mechanische Dehnung des Gewebes während der Präparation. Diese führt dazu, dass der GLUT2 gar nicht oder in deutlich geringerem Umfang in die apikale Membran rekrutiert wird (HELLIWELL u. KELLETT 2002).

Auch psychischer Stress der Versuchstiere und die damit verbundene Ausschüttung von Glukokortikoiden führt zu einer Hemmung der GLUT2-Komponente und somit zu einer Hemmung der Glukoseresorption. Metyrapon, eine Verbindung welche die 11- β -Hydroxylase und somit die Kortisol-Synthese hemmt, ist in der Lage, diesen Effekt zu vermeiden (SHEPHERD et al. 2004).

Mehrere Untersuchungen belegen, dass die Insertion des GLUT2 in die apikale Membran der Enterozyten durch mehrere Faktoren reguliert und kontrolliert wird. Eine wichtige Rolle spielt die Calciumaufnahme in die Zelle. Diese erfolgt nach Depolarisation der Zellmembran durch den SGLT1 über den Calciumkanal CA $_v$ 1.3, welcher eine wichtige Route für die Calciumabsorption darstellt (MORGAN et al. 2007). Ein Calciumanstieg in der Zelle aktiviert die Kontraktion des perijunctionalen Actomyosin-Ringes sowie eine Verschiebung des Cytoskeletts und ermöglicht somit die Rekrutierung des GLUT2 in die apikale Zellmembran (MACE et al. 2007b; KELLETT et al. 2008).

Ein weiterer wichtiger Faktor in der Regulierung des GLUT2 ist die Phosphorylierung des Myosin II, welche durch die Myosin-light-chain-kinase (MLCK) katalysiert wird. Auch dieser Vorgang ist Voraussetzung für die Neuordnung des Cytoskeletts (BERGLUND et al. 2001; CLAYBURGH et al. 2004; MACE et al. 2007b).

Zusätzlich sind an der Regulation auch darmständige Geschmacksrezeptoren für süß (T1R2 + T1R3) beteiligt, welche durch hohe Zuckerkonzentrationen aktiviert werden und über einen komplexen Signalweg die Insertion des GLUT2 aktivieren (MACE et al. 2007a).

2.4.5 Endo- und Exozytose

Als alternativer Weg für die Ausschleusung von Glukose aus der Zelle wurde Exozytose propagiert (STÜMPEL et al. 2001; SANTER et al. 2003). Dieser Exportweg steht jedoch prinzipiell nur für metabolisierbare Zucker zur Verfügung. Das heißt, der Zucker muss nach 6-Phosphorylierung durch die Glukose-6-Phosphat-Translokase zunächst in das endoplasmatische Retikulum überführt werden, um anschließend via Exozytose die Zelle verlassen zu können (STÜMPEL et al. 2001; WRIGHT et al. 2003).

Bisher gibt es allerdings keine Hinweise darauf, dass Glukose über Endozytose in die Darmepithelzellen aufgenommen werden kann. Einzig bei neugeborenen Ferkeln ist in den ersten Stunden nach der Geburt eine endozytotische Nährstoffaufnahme in Form von Pinozytose möglich (BROUGHTON u. LECCE 1970). Glukoselösungen und Kolostrum stimulieren zunächst die Pinozytose. Anschließend kommt es zu einem Verschluss der Darmbarriere, was dazu führt, dass keine Makromoleküle mehr über diesen Aufnahmemechanismus in die Zelle gelangen können (BROUGHTON u. LECCE 1970).

Beim adulten Tier ist diese Form der Kohlenhydrataufnahme im Darm bisher nicht beschrieben worden.

Bei der Exozytose werden die zu sezernierenden Verbindungen am endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, im Golgi-Apparat modifiziert und in sekretorische Granula verpackt, welche später mit der Plasmamembran fusionieren. Im Fall der basolateralen Ausschleusung der Glukose aus dem Enterozyten wird diese nach Phosphorylierung durch die Glukose-6-Phosphat-Translokase aus dem Cytosol in das endoplasmatische Retikulum aufgenommen. Dort erfolgt im Anschluss an die Dephosphorylierung der Glukose die Verpackung in die sekretorischen Vesikel. Diese gelangen dann direkt zur basolateralen Membran der Zellen (STÜMPEL et al. 2001).

Der gegensätzliche Prozess, bei dem die Zelle Materie (von Molekülen bis einzelligen Organismen) aufnimmt, wird Endozytose genannt. Dabei umfließt die Membran das Material und schließt es in Vesikel (Endosomen) ein. Der klassische endozytotische Weg ist ein relativ selektiver Transport und verläuft über „Clathrin-coated“-Vesikel, endosomales Kompartiment und Lysosomen (MAXFIELD u. MCGRAW 2004). Bei dieser rezeptorvermittelten Endozytose wird Clathrin in die intrazelluläre Membranschicht eingelagert, wobei eine „coated pit“ (ummantelte Vertiefung) entsteht. Aus letzterer schnürt sich dann ein „Clathrin-coated“-Vesikel ab (SCHMID 1997; MUKHERJEE et al. 1997). Diese Form der Endozytose ist in der Lage, Moleküle bis zu einer Größe von 120 nm zu transportieren (CONNER u. SCHMID 2003).

Ein Hemmstoff der Clathrin-vermittelten Endozytose ist Chlorpromazin (BLANCHARD et al. 2006). Chlorpromazin verhindert die Ansammlung von Clathrin an der endosomalen Membran und somit gleichzeitig die Bildung der „coated pits“ an der Plasmamembran (WANG et al. 1993). In verschiedenen Studien wurde Chlorpromazin zur Hemmung der Endozytose in Konzentrationen zwischen 15 und 20 μM eingesetzt (NEMEROW u. COOPER 1984; CHATTERJEE et al. 2003; TYTECA et al. 2005).

Eine weitere Art der Endozytose ist die Clathrin-unabhängige Endozytose durch Caveolen (lat. Caveolae), welche in der Lage sind, Moleküle bis 60 nm zu transportieren (CONNER u. SCHMID 2003). Caveolen sind als spezielle Form der „lipid rafts“ definiert und bestehen aus cholesterol- und glycosphingolipidreichen Membrandomänen. Diese Form der Endozytose spielt v.a. eine Rolle bei der Signalübertragung, der Transzytose sowie dem Transport zwischen dem Golgi-Apparat und dem endoplasmatischen Retikulum (ANDERSON 1998). Auch bei der Internalisierung von Membrankomponenten, extrazellulären Liganden, Toxinen und Viren ist diese Form der Endozytose beteiligt (FITTIPALDI et al. 2003; HANSEN et al. 2009).

Bei intrazellulären Fusionen von Organellen und Vesikeln sind unter anderem auch Proteine der Familie der SNAREs (soluble N-ethylmaleimid-sensitive factor (NSF) attachment protein receptor) involviert. Verschiedene Mitglieder dieser SNARE-Familie fungieren als Fusionsproteine bei sekretorischen und endozytotischen Funktionswegen (GUO et al. 2000; PELHAM 2001).

Bei der Analyse verschiedener Fusionsprozesse hat sich herausgestellt, dass diese im Prinzip sehr ähnlich ablaufen und zwar nicht nur während der Endozytose, sondern auch bei anderen vesikulären Transportvorgängen. Ein am intra-Golgi-Transport beteiligtes Protein, das NSF (N-ethylmaleimid sensitiver Faktor) (BALCH et al. 1984), wurde auch als essentieller Faktor bei Fusionsvorgängen zwischen endoplasmatischem Retikulum und dem Golgi-Apparat, bei Endosomenfusionen und der Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran identifiziert (BECKERS et al. 1989; DIAZ et al. 1989).

N-Ethylmaleimid (NEM) ist ein Sulfhydryl-Reagenz, das aufgrund seiner Eigenschaft, Cysteinreste chemisch zu modifizieren, in der Lage ist, eine Vesikel-Vesikel oder Vesikel-Plasmamembran-Fusion zu verhindern (VOGEL u. ZIMMERBERG 1992; SCHNITZER et al. 1995). Im Hinblick auf die Fähigkeit mit Thiol-Gruppen zu reagieren, kann NEM aber

auch zahlreiche Enzyme inaktivieren und zeigt eine starke Inhibition der Endo- und Exozytose (SINGH u. LIU 2000). Durch dieses zell-penetrierende Sulfhydryl-Reagenz wird die Glykolyse, der Glukose-Transport und der Aufbau von Mikrotubuli inhibiert, hingegen die Zellpermeabilität erhöht (TSAN et al. 1976; OLIVER et al. 1976). In Studien zur Endo- und Exozytosehemmung wird es typischerweise in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt (BARBIERI et al. 1994; WARD et al. 1997; MARINO et al. 2003; VAN DER WIJK et al. 2003).

Auch in die Regulation der bereits bekannten intestinalen Glukoseaufnahmemechanismen sind endo- und exozytotische Vorgänge involviert. So spielen diese Vorgänge eine wichtige Rolle bei der Regulation des Na⁺/Glukose Kotransporters SGLT1. WRIGHT et al. (1997) und KHOURSANDI et al. (2004) konnten zeigen, dass eine beachtliche Anzahl des SGLT1 in intrazellulären Kompartimenten bzw. Vesikeln lokalisiert ist. Unter verschiedenen Stimuli ist es möglich, den Einbau dieser Transporter in die apikale Zellmembran zu initialisieren oder auch zu vermeiden und somit die Netto-Glukoseabsorption zu steigern oder zu senken (VEYHL et al. 2006).

Auch der GLUT2 ist in intrazellulären Vesikeln gespeichert und wird bei Bedarf in die apikale Zellmembran rekrutiert (KELLETT u. HELLIWELL 2000; KELLETT 2001; KELLETT u. BROT-LAROCHE 2005).

2.5 MOLEKULARE ÄQUIVALENTE DER GLUKOSERESORPTION

2.5.1 Mitglieder der SLC5A-Genfamilie

Trotz ihres Namens (SGLT; sodium-dependent glucose transporter) sind nicht alle Transporter aus der SLC5A-Genfamilie in der Lage, Glukose zu transportieren. Das bekannteste Mitglied dieser Familie ist der *SGLT1*, welcher u.a. für die aktive Aufnahme von Glukose und Galaktose über die Bürstensaummembran des Dünndarms verantwortlich ist (DIEZ-SAMPEDRO et al. 2001). Eine wichtige Rolle bei der Rückresorption der Glukose im proximalen Tubulus der Niere spielt der *SGLT2* (WRIGHT; 2001). Der *SGLT3* agiert als glukose-sensitiver Ionenkanal, der *SGLT4* transportiert v.a. Mannose und Glukose (TAZAWA et al. 2005) und der *SGLT6* ist ein Inositol- und Multivitamintransporter (COADY et al. 2002; BALAMURUGAN et al. 2003), der mit niedriger Affinität auch Glukose transportieren kann (WRIGHT et al. 2007). Über die Funktion des SGLT4-6 ist nur wenig bekannt, außer dass der SGLT4 und SGLT6 in einer Vielzahl von Geweben exprimiert werden, während sich die Expression des *SGLT5* auf die Niere beschränkt (WRIGHT u. TURK 2004).

Die Sekundärstruktur dieser Transporter besteht aus 14 membranüberspannenden α -Helices, wobei sowohl das N-terminale als auch das C-terminale Ende der extrazellulären Seite zugewandt sind (TURK u. WRIGHT 1997).

Die Glukoseresorption im Dünndarm und die Rückresorption im proximalen Tubulus via SGLT1 und SGLT2 ist durch Phlorizin (Phloretin-2'- β -Glukosid), einem pflanzlichen Glukosid aus der Rinde des Apfelbaumes, hemmbar (GERARDI-LAFFIN et al. 1993).

Im Folgenden soll der SGLT1, der bei der Glukoseaufnahme im Dünndarm die wichtigste Rolle spielt, näher beleuchtet werden.

SGLT1

Der SGLT1 (sodium-dependent glucose transporter 1) wird im Dünndarm ausschließlich in der apikalen Membran exprimiert. Er realisiert mit hoher Affinität und niedriger Kapazität den aktiven Glukosetransport ($k_m \sim 0,4$ mM) (HIRAYAMA et al. 1996). Mit niedrigerer Affinität ist er auch am Galaktosetransport beteiligt (SCHEEPERS et al. 2004). Bei diesem

Transportprozess handelt es sich um einen Kotransport von Glukosemolekülen und Natriumionen in einem Verhältnis von 1:2 (WRIGHT 2001). Die Energie für diesen sekundär aktiven Transportmechanismus liefern der Natrium-Konzentrationsgradient und das Membranpotential. Das mit der Glukose in die Zelle transportierte Natrium wird im Anschluss durch die basolateral lokalisierte Na^+/K^+ -ATPase wieder aus der Zelle ausgeschleust und somit der Na^+ -Konzentrationsgradient aufrecht erhalten. Die Glukose kann so auch entgegen des eigenen Konzentrationsgradienten in die Zelle transportiert werden (ZHAO u. KEATING 2007).

Erst nach Anlagerung zweier Natriumionen an extrazelluläre Bindungsstellen des SGLT1, kommt es zu einer Konformationsänderung, welche die Bindung von Glukose ermöglicht (HIRAYAMA et al. 2007). Das Glukosemolekül und die zwei Natriumionen werden dann durch die Zellmembran auf die intrazelluläre Seite des SGLT1 transportiert, wo sie aufgrund der niedrigen intrazellulären Natriumkonzentration dissoziieren. Die nun leeren Bindungsstellen verlagern sich wieder zur extrazellulären Membranseite und vervollständigen somit den Kreislauf (PARENT et al. 1992; MACKENZIE et al. 1998; MEINILD et al. 2002; LOO et al. 2006). Dieser Vorgang ist in Abhängigkeit von der Höhe und der Richtung des Natriumgradienten vollständig reversibel (QUICK et al. 2003; ESKANDARI et al. 2005).

Phlorizin ist ein kompetitiver Hemmstoff des Na^+ /Glukose-Kotransportes, der an den SGLT1 bindet aber durch diesen nicht transportiert wird. Phlorizin ist an der externen Seite der Zellmembran ein deutlich potenterer Hemmstoff als an der inneren Seite. Exprimiert wird der SGLT1 vorrangig in Dünndarm, Herz, Gehirn und im proximalen Tubulus der Niere (ZHOU et al. 2003). ZHAO et al. (2005) konnten die mRNA des SGLT1 beim Rind in niedrigeren Konzentrationen auch in der Milchdrüse, Leber und Lunge nachweisen. Außerdem ist die mRNA des SGLT1 in hohen Konzentrationen auch im Pansen und Caecum des Rindes zu finden (ZHAO et al. 1998). Im Jejunum des Schweines wird der SGLT1 zahlreicher exprimiert als im Ileum, während die Glukoseresorption im Ileum effizienter als im Jejunum ist. Es wird vermutet, dass eine direkte oder indirekte Modulation der SGLT1 Aktivität stattfindet (HERRMANN et al. 2012).

Die porcine Sequenz der mRNA des SGLT1 ist bekannt und beim „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) veröffentlicht (NM_001164021).

2.5.2 Mitglieder der SLC2A-Genfamilie

Es existieren 14 verschiedene Glukosetransportproteine (GLUT), die alle der SLC2A-Genfamilie zugerechnet werden. Trotz des Namens der Transporter besitzen nicht alle auch die Fähigkeit, Glukose zu transportieren.

Basierend auf Sequenzvergleichen dieser Proteine lassen sich die Glukosetransporter in 3 Klassen einteilen. Klasse I enthält die GLUT1 - GLUT4 und den GLUT14, Klasse II enthält die Fruktosetransporter GLUT5, 7, 9 und 11 und der Klasse III sind der GLUT6, sowie die GLUT8, 10, 12 und der GLUT13/HMIT1 zugeteilt (SCHEEPERS et al. 2004; Augustin 2010). Bis auf den GLUT13, welcher myo-Inositol transportiert, bewirken alle Mitglieder der SLC2A-Genfamilie einen erleichterten, nicht-sättigbaren Transport verschiedener Hexosen über die Zellmembranen in Richtung des chemischen Gradienten. Glukosetransporter werden in jeder Zelle des Organismus exprimiert, was wiederum verdeutlicht, welche wichtige Rolle Glukose im Metabolismus spielt. Alle GLUT besitzen 12 Transmembrandomänen mit einem amino- und einem carboxyterminalen Ende an der cytosolischen Seite der Zellmembran (ULDRY u. THORENS 2004).

Der *GLUT1* kommt in fast allen Geweben vor, wobei die Expression in unterschiedlichen Zelltypen sehr stark variiert und vom zellulären Glukosemetabolismus abhängt (ULDRY u. THORENS 2004). Er ist vor allem als erythrozytärer Glukosetransporter bekannt, kommt

aber auch in sämtlichen Blut-Gewebe-Schranken des Körpers vor. So wird der GLUT1 v.a. in den Endothelzellen, welche die Blut-Hirn-Schranke bilden, sehr stark exprimiert (MAHER et al. 1994). Moderate Level des GLUT1 wurden auch im Fettgewebe, im Muskel, im Herz und in der Leber gefunden (GOULD u. HOLMAN 1993; WOOD u. TRAYHURN 2003; AERNI-FLESSNER et al. 2012). In Ratten konnte der GLUT 1 auch in der basolateralen Membran des Dünndarmepithels nachgewiesen werden. BOYER et al. (1996) konnten zeigen, dass in Ratten, bei denen experimentell Diabetes mellitus ausgelöst wurde, der GLUT1 auch in der Bürstensaummembran exprimiert wird. Neben Glukose, welche mit einer K_m von ca. 3 mM transportiert wird, stellen Galaktose, Mannose und Glukosamine weitere Substrate für den GLUT1 dar (ULDRY et al. 2002). Hemmbar ist die Glukosetransportaktivität des GLUT1 durch Cytochalasin B (IC_{50} ~0,52 μ M bei 0,1 mM D-Glukose), Forskolin und Phloretin (IC_{50} ~61 μ M bei 0,1 mM D-Glukose) (BALDWIN u. LIENHARD 1989; MORRIS et al. 1991; KASAHARA u. KASAHARA 1996). KASAHARA u. KASAHARA (1996) beschreiben zwar auch Phlorizin als Hemmstoff des GLUT1, allerdings zeigte Phlorizin in diesen Untersuchungen erst in sehr hohen Konzentrationen eine hemmende Wirkung (IC_{50} ~528 μ M bei 0,1 mM D-Glukose).

Die mRNA-Sequenz des porzinen GLUT1 ist bekannt und beim NCBI veröffentlicht (X17058.1). Die veröffentlichte Sequenz wurde in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke bestimmt.

Der **GLUT2** ist in den Zellen der Leber, den β -Zellen des Pankreas, sowie in der basolateralen Membran von Epithelzellen des Darmes und der Niere lokalisiert. Funktionelle Studien haben gezeigt, dass der GLUT2 auch in anderen Zellen vorkommt und am Glukose-Sensing beteiligt ist. So kommt er z.B. in der Portalvene, im Hypothalamus und im Hirnstamm vor, wo er u.a. in die Regulierung der Futteraufnahme involviert ist (BURCELIN et al. 2000; BURCELIN u. THORENS 2001). Auch in den Hoden von Ratten und Mäusen konnte der GLUT2 nachgewiesen werden (KOKK et al. 2004).

Der GLUT2 transportiert mit niedriger Affinität (K_m ~17 mM) aber hoher Kapazität Glukose (JOHNSON et al. 1990). Weitere Substrate stellen Galaktose, Mannose und Fruktose dar. Außerdem ist der GLUT2 auch in der Lage, 3-OMG und 2-Deoxyglukose (2-DOG) (LIENHARD et al. 1992, GOULD u. HOLMAN 1993; STÜMPEL et al. 2001) sowie Glukosamine zu befördern (ULDRY et al. 2002).

Nach der Hypothese von KELLETT et al. (2001) wird der GLUT2 bei hohen intraluminalen Glukosekonzentrationen in die apikalen Membranen des Rattendarmes eingebaut (vgl. Kap. 2.4.4). Auch beim Rind konnte der GLUT2 in der Bürstensaummembran von Vesikelpräparationen des Darmes nachgewiesen werden (RODRIGUEZ et al. 2004).

Reguliert wird der GLUT2 v.a. durch die vorhandenen Substrate. Im Darm spielt die Glukosekonzentration im Darmlumen eine entscheidende Rolle. So führen die Substrate des GLUT2 zu einem Anstieg der mRNA-Gehalte in den Epithelzellen (CUI et al. 2003). GOUYON et al. (2003) waren in der Lage, den Nachweis der Substratinduzierbarkeit des GLUT2 in BBM-Vesikeln auch auf Proteinebene zu erbringen.

Ein Anstieg des Fruktosetransportes über den GLUT2 resultiert aus der Aktivierung der PKC β II, welche mit dem Einbau des GLUT2 in die Bürstensaummembran korreliert. Somit besteht die Möglichkeit, dass über den PKC-abhängigen Signalweg eine Beeinflussung des Fruktosetransportes durch Insulin oder Aminosäuren erfolgt (HELLIWELL et al. 2003). Weitere Signaltransduktionswege, wie der MAP-Kinase-Weg und der PI3-Kinase-Signalweg sind an der Regulation des GLUT2 beteiligt (HELLIWELL et al. 2000a,b).

Hemmstoffe des GLUT2 stellen Cytochalasin B (IC_{50} ~1,9 μ M) und Phloretin dar (CORPE et al. 1996; ULDRY u. THORENS 2004). Phloretin wird in Glukosetransportstudien in Abhängigkeit von der verwendeten Substratmenge eingesetzt. Die üblicherweise verwendete Konzentration beträgt 0,2 mM Phloretin pro 10 mM Glukose (KELLETT u. HELLIWELL

2000; HELLIWELL u. KELLETT 2002). Indirekt ist der apikale GLUT2 auch durch den SGLT1-Hemmstoff Phlorizin hemmbar, da eine Hemmung des SGLT1 den Einbau des GLUT2 in die apikale Membran des Darmepithels verhindert (HELLIWELL et al. 2000a,b; AFFLECK et al. 2003).

Die vollständige Sequenzierung des GLUT2 aus dem Schweinedarm erfolgte 2006 durch HUANG et al. (EF140874).

Die mRNA des **GLUT3** ist nahezu ubiquitär vorhanden, das Protein wird allerdings beim Menschen nur im Gehirn, im Hoden, in Spermien, im Embryo, in der Plazenta und in zirkulierenden weißen Blutzellen exprimiert (HABER et al. 1993; SIMPSON et al. 2008; BROWN et al. 2011), während es bei der Maus auch in der Skelettmuskulatur nachgewiesen wurde (STUART et al. 1999). Auch in verschiedenen Tumoren konnte der GLUT3 nachgewiesen werden (NELSON u. FALK 1993a,b; KOKK et al. 2004; KRZESLAK et al. 2012). Eine wichtige Funktion hat der GLUT3 für die energetische Versorgung von Thrombozyten (HEIJNEN et al. 1997).

Substrate für den GLUT3 stellen neben Glukose ($K_m \sim 1,4$ mM) auch Galaktose, Mannose, Maltose, Xylose und Dehydroascorbinsäure dar. Zusätzlich fungiert er auch als Wasserkanal (TOMIOKA 2012).

Hemmstoffe sind ebenfalls Cytochalasin B ($K_i \sim 0,4$ μ M), Phloretin und Phlorizin (NELSON u. FALK 1993a; ULDRY u. THORENS 2004).

Bisher war nur eine Teilsequenz von 313 bp des porzinen GLUT3 bekannt, allerdings wurde er von zahlreichen anderen Spezies bereits vollständig sequenziert. Im Jahr 2011 wurde die komplette porcine mRNA-Sequenz anhand genomischer Daten vorhergesagt.

Der **GLUT4** ist ein insulinabhängiger Glukosetransporter ($K_m \sim 5$ mM). Neben Glukose transportiert er auch Dehydroascorbinsäure und Glukosamine. Der GLUT4 ist der wichtigste Glukosetransporter im braunen und weißen Fettgewebe sowie in der Skelett- und Herzmuskulatur (ULDRY u. THORENS 2004). Bindet Insulin (oder auch andere Hormone; PERRINI et al. 2004) an seinen Rezeptor auf der Zelloberfläche, so führt das zu einer schnellen Translokation von GLUT4-haltigen Vesikeln an die Zelloberfläche. Der anschließende Einbau der Transporter in die Zellmembran führt wiederum zu einer erhöhten zellulären Glukosetransportaktivität. Die Fähigkeit des Insulins die Glukoseaufnahme zu stimulieren beruht auf einer komplexen Signalkaskade und ist nicht komplett bekannt (SALTIEL u. PESSIN 2002). Ein Defekt in der Fähigkeit des Insulins diesen metabolischen Schritt zu regulieren ist ein Grund für die Entstehung eines Typ 2-Diabetes (STRALFORS 2012).

Sowohl Cytochalasin B ($IC_{50} \sim 0,33$ μ M bei 0,1 mM D-Glukose) als auch Phloretin ($IC_{50} \sim 9,4$ μ M bei 0,1 mM D-Glukose) hemmen den GLUT4 und auch Phlorizin zeigt, allerdings erst in sehr hohen Konzentrationen ($IC_{50} \sim 140$ μ M bei 0,1 mM D-Glukose), eine hemmende Wirkung (KASAHARA u. KASAHARA 1997).

Der **GLUT5** wurde bisher aus den Darmepithelzellen des Menschen (KAYANO et al. 1990) sowie einiger anderer Spezies wie der Ratte und dem Kaninchen isoliert (RAND et al. 1993; MIYAMOTO et al. 1994). Exprimiert wird der GLUT5 in jejunalen Epithelzellen. Seine RNA wurde allerdings auch in der Niere, im Skelettmuskel (STUART et al. 2006) und in Fettzellen (HAJDUCH et al. 1998) nachgewiesen. Im Gehirn war die RNA auch in Mikroglia-Zellen sowie in der Blut-Hirn-Schranke zu finden (MANTYCH et al. 1993). Der GLUT5 spielt eine wichtige Rolle bei der Fruktoseresorption des Dünndarmes. Er ist vorrangig in der apikalen Membran der Epithelzellen lokalisiert. Allerdings wurde auch beschrieben, dass er in der basolateralen Membran des humanen Dünndarmes vorkommt (BLAKEMORE et al. 1995).

Eine Glukosetransportaktivität des GLUT5 konnte im intakten Darmgewebe nicht nachgewiesen werden. Er transportiert v.a. Fruktose mit einer K_m von etwa 6 mM. Die Fruktosetransportaktivität ist weder durch Cytochalasin B, noch durch Phloretin oder Phlorizin hemmbar (CORPE et al. 1996; MATE et al. 2001). Die Isoform des GLUT5 der Ratte ist auch in der Lage, in geringem Umfang Glukose zu transportieren. Diese Glukosetransportaktivität ist durch Cytochalasin B hemmbar (RAND et al. 1993). In GLUT2-negativen Mäusen wird der GLUT5 verstärkt exprimiert (STÜMPEL et al. 2001), ebenso nach der Fütterung fruktosereicher Diäten (GOUYON et al. 2003).

Die Transportaktivität des **GLUT6** *in vitro* tritt erst ab einer Substratkonzentration von 5 mM Glukose in Erscheinung. Er besitzt nur eine sehr geringe Cytochalasin B-Bindungsaffinität (DOEGE et al. 2000b). Die mRNA kommt im Gehirn, in der Milz und in Leukozyten vor (ULDRY u. THORENS 2004), das Protein wurde bisher nur im Gehirn nachgewiesen (STUART et al. 2011).

Dem GLUT5 sehr ähnlich in seiner Struktur ist der **GLUT7**. Weiterhin zeigt der GLUT7 bei der Ratte 68 % Übereinstimmung mit der Sequenz des GLUT2 (WADDELL et al. 1992; MUECKLER 1994). Der GLUT7 wird vorrangig im Dünndarm und im Colon exprimiert (CHEESEMAN 2008). Die mRNA konnte allerdings auch in den Hoden und der Prostata des Menschen nachgewiesen werden (SCHEEPERS et al. 2004). Im Dünndarm scheint das Protein vorrangig in der Bürstensaummembran lokalisiert zu sein. Allerdings wird er im Ileum stärker exprimiert als im Jejunum. In *Xenopus-laevis*-Oocyten transportiert der GLUT7 mit hoher Affinität Glukose und Fruktose ($K_m \sim 0,2$ mM). Diese beiden Substrate hemmen sich gegenseitig kompetitiv (LI et al. 2004; MANOLESCU et al. 2005). Andere Substrate des GLUT7 sind nicht bekannt (THORENS u. MUECKLER 2010). Phloretin und Cytochalasin B haben keine hemmende Wirkung auf die Glukosetransportaktivität des GLUT7 in *Xenopus-laevis*-Oocyten (LI et al. 2004).

Ein weiterer hormonell regulierbarer, hochaffiner Glukosetransporter ist der **GLUT8** ($K_m \sim 2$ mM). Er wird in vielen Geweben exprimiert, z. B. in Hoden, Skelettmuskulatur, Herz, Dünndarm, Gehirn (DOEGE et al. 2000a; IBBERSON et al. 2000; IBBERSON et al. 2002; AERNI-FLESSNER et al. 2012; DeBOSCH et al. 2012), Milchdrüse und Niere (ZHAO et al. 2004; SCHIFFER et al. 2005; ZHAO u. KEATING 2007). In Blastozysten transloziert der GLUT8 in Abhängigkeit von Insulin an die Zelloberfläche, was zu einer anschließenden Stimulation der Glukoseaufnahme führt (CARAYANNOPOULOS et al. 2000). In Neuronen ist der GLUT8 in zytoplasmatischen Vesikeln enthalten, allerdings transloziert er hier nach einem Insulinstimulus nicht in die äußere Zellmembran (SHIN et al. 2004). Weitere Substrate für den GLUT8 sind Fruktose und Galaktose. Er bindet außerdem Cytochalasin B ($K_d \sim 56$ nM) (DOEGE et al. 2000a).

Über die Zuckertransportaktivität des **GLUT9** ist bisher wenig bekannt. Der GLUT9 weist eine große Ähnlichkeit mit dem GLUT5 auf, so dass die Annahme besteht, dass es sich auch um einen Fruktosetransporter handelt. Verschiedene Untersuchungen beweisen, dass es sich bei dem GLUT9 um einen hochkapazitären Uratransporter ($K_m = 365$ μ M) handelt (CAULFIELD et al. 2008; ANZAI et al. 2008). Die mRNA des GLUT9 befindet sich vorrangig in der Leber und in der Niere. Geringere Mengen wurden auch im Dünndarm, Plazenta, Lunge und Leukozyten gefunden (PHAY et al. 2000).

CARAYANNOPOULOS et al. (2004) wiesen den GLUT9 im Mäuseembryo in einem sehr frühem Stadium nach. Dabei identifizierten sie 3 Isoformen, von denen 2 in *Xenopus-laevis*-Oocyten eine geringe Glukosetransportaktivität aufwiesen.

In polarisierten MDCK-Zellen und in epithelialen Zellen der Nierentubuli ist er basolateral lokalisiert und niedrigaffin für 2-DOG. Er wird nicht durch Cytochalasin B gehemmt (AUGUSTIN et al. 2004).

Der **GLUT10** ist ein hochaffiner Transporter für 2-DOG ($K_m \sim 0,3$ mM). D-Glukose und D-Galaktose konkurrieren mit 2-DOG. Die Hemmung der Transportaktivität ist durch Phloretin möglich. Die mRNA des GLUT10 findet sich in Herz, Lunge, Gehirn, Leber, Niere, Pankreas, Plazenta, Skelettmuskulatur und Blutgefäßen (DAWSON et al. 2001; MCVIE-WYLIE et al. 2001; PYLA et al. 2013).

Aufgrund seiner Chromosomenlokalisierung in einem Bereich der mit Typ 2-Diabetes assoziiert ist, wurde vermutet, dass der Transporter in dieses Krankheitsgeschehen involviert ist (ULDRY u. THORENS 2004; JIANG et al. 2010). Dieser Zusammenhang konnte allerdings nicht bestätigt werden (BENTO et al. 2005; ROSE et al. 2005; LIN et al. 2006).

Der **GLUT11** zeigt eine niedrige Affinität für Glukose und Cytochalasin B (DOEGE et al. 2001). Die Transportaktivität für Glukose ist kompetitiv durch Fruktose hemmbar. Es existieren 3 Isoformen des Transporters, die sich in ihrer funktionellen Charakteristik nicht unterscheiden (SASAKI et al. 2001). Allerdings werden sie in einer gewebespezifischen Verteilung exprimiert. So kommt der GLUT11-A in Herz, Skelettmuskulatur und Niere, der GLUT11-B in Niere, Fettgewebe und Plazenta und der GLUT11-C in Fettgewebe, Herz, Skelettmuskulatur und Pankreas vor (SCHEEPERS et al. 2005).

Der **GLUT12** wird vorrangig im Herz und in der Prostata exprimiert. Außerdem wurde er in Skelettmuskulatur, braunem Fettgewebe, Milchdrüse und auch im Dünndarm gefunden (ROGERS et al. 2002; WOOD et al. 2003; ZHAO u. KEATING 2007). Beim Rind konnte die mRNA des Transporters außerdem auch in Milz, Niere, Hoden sowie Leber und Lunge lokalisiert werden (MILLER et al. 2005).

Er zeigt in *Xenopus-laevis*-Oozyten eine Glukosetransportaktivität, welche durch Galaktose und Fruktose kompetitiv hemmbar ist (ROGERS et al. 2003). Im Herzen fungiert er als Insulin-unabhängiger Glukose-Transporter (WALLER et al. 2013).

Ein weiterer Transporter dieser SLC2A-Familie ist der **GLUT13**. Dieser ist ein H^+ -gekoppelter Myoinositol-Transporter und wird auch als **HMIT** bezeichnet. Er wird vorrangig im Gehirn exprimiert und ist durch Phloretin, Phlorizin und Cytochalasin B hemmbar (ULDRY et al. 2001; ULDRY u. THORENS 2004; CURA u. CARRUTHERS 2012).

Auch ein **GLUT14** wurde beschrieben, welcher mit seiner Aminosäuresequenz dem GLUT3 sehr ähnlich ist und im Hoden exprimiert wird (WU u. FREEZE 2002). Zu seiner Transportaktivität und Funktion ist bisher wenig bekannt. Allerdings steht der GLUT14 in Verdacht, an der Entstehung der Alzheimer-Krankheit beteiligt zu sein (SHULMAN et al. 2011; WANG et al. 2012).

2.6 GLUKOSESTOFFWECHSEL IN DER DARMEPITHELZELLE

2.6.1 Glykolyse

Sowohl bei neugeborenen als auch bei älteren Schweinen sind Enterozyten in der Lage, Glukose mittels Glykolyse zu verstoffwechseln (VAUGELADE et al. 1994; DARCY-VRILLON et al. 1994). Diese Form der Glukoseverstoffwechslung, bei der Laktat, Pyruvat und CO_2 entstehen, stellt den Hauptweg im Enterozyten des Schweins dar (WU et al. 1995). Kurz nach der Geburt vollzieht der Darm des Schweins eine kurze Reifung, bei der sich die

glykolytische Kapazität noch einmal erhöht (DARCY-VRILLON et al. 1994). Allerdings ist bei der Glykolysekapazität ein Gradient von oral nach aboral feststellbar (CHERBUY et al. 1997).

Ein Schlüsselenzym der Glykolyse stellt die Hexokinase dar, welche die Phosphorylierung der Glukose zu Glukose-6-Phosphat katalysiert (POSHO et al. 1994). Die Hexokinase ist experimentell durch N-Acetyl-D-Glukosamin in einer Konzentration von 20 mM hemmbar (SUKALSKI u. NORDLIE 1986).

2.6.2 Glukoneogenese

Lange ging man davon aus, dass die Glukoneogenese im Dünndarm nur während des Wachstums stattfindet, da die entsprechenden Enzyme verstärkt bei Jungtieren exprimiert werden (GIRARD et al. 1992; ASINS et al. 1996; CHATELAIN et al. 1998). Ein Schlüsselenzym der Glukoneogenese, welches die Umwandlung des Oxalazetates zu Phosphoenolpyruvat katalysiert, ist die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK). Dieses Enzym wird vorwiegend in Leber und Niere exprimiert, konnte allerdings auch im Dünndarmepithel von adulten Ratten und Menschen sowie laktierenden Kühen nachgewiesen werden (ANDERSON 1970; HAHN u. SMALE 1982; RAJAS et al. 2000; LOHRENZ et al. 2011). Ein weiteres wichtiges Enzym der Glukoneogenese, die Glukose-6-Phosphatase, konnte auch bei erwachsenen Menschen, Ratten und laktierenden Kühen im Darm nachgewiesen werden (RAJAS et al. 1999; LOHRENZ et al. 2011). Beide Enzyme wurden immunhistochemisch an der Spitze der Darmzotten lokalisiert (RAJAS et al. 2007).

Zahlreiche hormonelle und diätetische Faktoren sind an der Regulation der PEPCK in Leber und Niere beteiligt. So wirken in der Leber cAMP, Glukokortikoide und Schilddrüsenhormone als Stimulatoren der PEPCK, während Insulin die Genexpression vermindert (HANSON u. RESHEF 1997). Obwohl die hormonelle Regulation der PEPCK im Dünndarm bisher nicht untersucht wurde, gibt es Anzeichen, dass diese ähnlich der in Leber und Niere ist (SHORT et al. 1992). Zur Verteilung der PEPCK sowie der Glukose-6-Phosphatase im Jejunum des Schweines liegen keine Erkenntnisse vor.

Glutamin stellt das wichtigste Substrat der Glukoneogenese im Dünndarm dar (MITHIEUX 2001).

2.7 BEDEUTUNG DER LITERATUR FÜR DIE EIGENE FRAGESTELLUNG

2.7.1 Funktionelle Studien

Die Untersuchungen sollten abklären, welche Mechanismen am Glukosetransport über das porcine Dünndarmepithel beteiligt sind. Angesichts stärkereicher Mahlzeiten und oft nur zweimal täglicher Fütterung war insbesondere von Interesse, wie das Schwein den apikalen Glukoseimport bei hohen luminalen Konzentrationen realisiert.

Die erste generelle Frage war, ob es unter *in-vitro*-Bedingungen möglich ist, die Glukoseaufnahme in das Dünndarmepithel zu messen. Folgende Punkte sollten dabei beleuchtet werden:

- Kann die Glukoseaufnahme in das Epithel durch den Einsatz spezifischer Hemmstoffe bestimmten Transportproteinen zugeordnet werden?
- Welchen Einfluss hat die Anwesenheit von Glukose über einen längeren Zeitraum auf die Glukoseaufnahme?
- Wie wird die Glukoseaufnahme über einen längeren Zeitraum realisiert?
- Sind alternative Mechanismen an der Glukoseaufnahme beteiligt und können diese nachgewiesen werden?

Die zweite Frage war, welchen Einfluss eine intrazelluläre Glukoseakkumulation auf die apikale Glukoseaufnahme ausübt. Dabei sollten folgende Punkte näher betrachtet werden:

- Welchen Einfluss hat die intrazelluläre Glykolyse mit folgender Laktatbildung auf die Glukoseaufnahme?
- Spielt der serosale Glukoseefflux eine Rolle?
- Erfolgt in der Epithelzelle eine Glukosebildung durch Glukoneogenese und hat diese einen Einfluss auf die apikale Glukoseaufnahme?

2.7.2 Molekularbiologische Studien

Das vorhandene Wissen über die Verteilung der verschiedenen Glukosetransportsysteme in verschiedenen Organen wurde bisher vorrangig durch Studien an Menschen oder Nagern gewonnen. Dagegen existieren nur wenige Untersuchungen, welche eine mögliche Identität und potentielle Heterogenität der Glukosetransporter in Schlüsselorganen der Glukoseaufnahme beim Schwein aufzeigen, obwohl diese Spezies sehr stark an stärkereiche Nahrung adaptiert ist. Da das Schwein als omnivores Tier sehr viele physiologische Gemeinsamkeiten mit dem Menschen aufweist, könnte es der Grundlagenforschung als sehr nützlich Tiermodell dienen. Ziel der molekularen Studien war es, ein systematisches Screening auf Glukosetransporter-mRNA in porzinen Jejunum, Leber, Niere und Skelettmuskulatur durchzuführen.

3. Material und Methoden

Die *in vitro* Untersuchungen wurden am isolierten proximalen Jejunum des Schweins mittels der Ussing-Kammer-Technik durchgeführt. Die Bestimmung der Transportraten der Glukose und des als parazellulärem Markermolekül eingesetzten Mannits erfolgte mit Hilfe radioaktiv markierter Substrate.

Die Beschreibung der Durchführung der einzelnen Untersuchungen beschränkt sich hier weitgehend auf grundlegende Angaben zur Apparatur und dem Versuchsansatz. Detaillierte Beschreibungen der Versuche sind den jeweiligen Ergebnissen im Kapitel 4 vorangestellt. Eine Auflistung der Pufferrezepturen befindet sich im Anhang.

3.1 IN VITRO-UNTERSUCHUNGEN MIT DER USSING-KAMMER-TECHNIK

3.1.1 Versuchstiere

Die verwendeten Schweine stammten aus dem Bestand des Lehr- und Versuchsgutes Oberholz der Universität Leipzig und der Agrargenossenschaft Störmthal. Dabei handelte es sich um Masthybriden beiderlei Geschlechts mit einem Lebendgewicht zwischen 20 und 30 kg. Für die Versuche wurden insgesamt 47 Schweine verwendet. Die Tiere erhielten die letzten Tage vor der Schlachtung handelsübliches Schweinefutter *ad libitum*. Eine letzte Fütterung erfolgte circa 1 Stunde vor der Schlachtung. Die Schweine wurden im Präparationsraum des Veterinär-Anatomischen Instituts der Universität Leipzig getötet.

Dafür wurden die Tiere zunächst durch eine intramuskuläre Injektion von Ketamin (15 mg/kg; Ursotamin[®]; Serumwerk Bernburg, Bernburg) und Xylazin (3 mg/kg; Xylazin 2 %[®]; Serumwerk Bernburg) aus der Mischspritze möglichst stressarm anästhesiert. Nach etwa 10minütiger Wartezeit erfolgte mittels eines Venenkatheters (Surflo[®]-W, 20G; Terumo, Frankfurt am Main) eine intravenöse Injektion von Thiopental (5 mg/kg; Trapanal[®]; Altana Pharma, Konstanz) über eine Ohrvene. Die Tötung der Tiere wurde anschließend durch Blutentzug vorgenommen.

3.1.2 Gewinnung und Präparation des Dünndarmes

Die Exenteration des Jejunums erfolgte innerhalb weniger Minuten nach der Tötung des Tieres. Für die Untersuchungen wurde das Gewebe beginnend etwa 60 cm distal der *Flexura duodenojejunalis* entnommen. Das Jejunum wurde zunächst vom Mesenterium getrennt und auf der mesenterialen Seite eröffnet. Dann erfolgte vorsichtig eine mehrmalige Spülung des Gewebes in 1-2 Liter 38°C warmer und mit Sauerstoff begaster glukosehaltiger Pufferlösung, um grobe Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurde die *Tunica serosa*, die *Lamina muscularis longitudinalis* sowie die *Lamina muscularis circularis* vorsichtig manuell von dem Darm abgetrennt. Die noch verbleibende Gewebeschicht wird im Folgenden als **Epithel** bezeichnet. Der Transport des Epithels in das Labor erfolgte zügig in warmer sauerstoffbegaster Pufferlösung. Die Wasch- und Transportpufferlösungen sind in Tab. 1 zusammengefasst und deren Rezepturen im Anhang aufgeführt. Vor dem Einspannen in die Ussing-Kammern wurde der Darm in entsprechend kleine Stücke geschnitten.

3.1.3 Ussing-Kammer-Technik

Die Ussing-Kammer-Technik ist eine *in vitro*-Inkubationstechnik zur Untersuchung von Transportvorgängen an Epithelgeweben. Die Apparatur besteht aus einer teilbaren Kammer

(Abb. 1), zwischen die das Epithel eingespannt wurde. Um Quetschungen im Randbereich des Epithels zu vermeiden, wurde das Gewebe durch untergelegte Silikonringe geschützt. Beide Seiten des Epithels hatten auf einer Fläche von $3,14 \text{ cm}^2$ Kontakt zu separaten Pufferlösungen. Das Pufferreservoir, mit dem jede Kammerhälfte verbunden war, betrug jeweils 15 ml. Vereinbarungsgemäß bezeichnet man die im Tier dem Darmlumen zugewandte Seite als mukosale Seite und die im Tier dem Blut zugewandte Seite als serosale Epithelseite.

Die das Epithel umspülenden Pufferlösungen waren mit einer doppelwandigen Glassäule, einer sogenannten Gasliftapparatur, verbunden. In diese Gasliftapparatur wurde über eine dünne Glassäule Sauerstoff eingeleitet, welcher eine Strömung in der Pufferlösung erzeugte. Diese wiederum gewährleistete eine permanente Umwälzung der epithelnahen Flüssigkeitsschichten. Im äußeren Mantel der Apparatur befand sich auf 38°C erwärmtes Wasser, welches eine konstante Temperatur der Pufferlösung sicherstellte.

Jedes Pufferreservoir war von oben zugänglich, was neben der Zugabe von Substanzen auch die Entnahme von Proben erlaubte. Eine Ablassöffnung an der tiefsten Stelle jeder Kammerhälfte machte ein vollständiges Ablassen der Pufferlösungen während des Experimentes möglich.

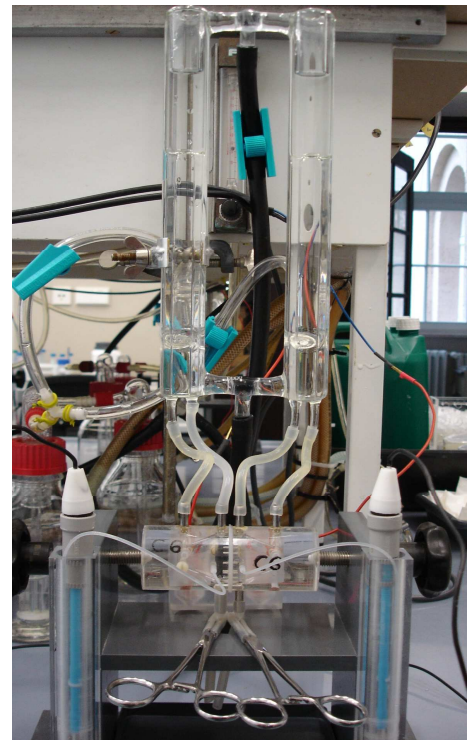
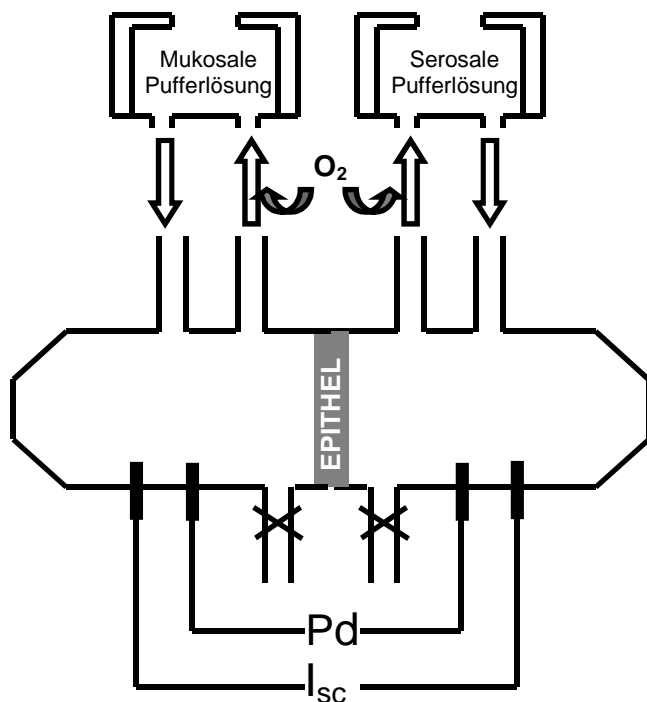


Abb. 1: Schematische Abbildung einer Ussing-Kammer

Durch eine Gasliftapparatur wurde eine ständige Umwälzung der Pufferlösungen zwischen Kammerhälfte und Pufferreservoir gewährleistet. Das sich in der doppelwandigen Glassäule befindliche, auf 38°C erwärmte Wasserbad sorgte für eine konstante Temperatur der Pufferlösungen in der Glassäule. Zwei Ablassöffnungen am tiefsten Punkt der Kammerhälften ermöglichten ein vollständiges Ablassen der Pufferlösungen während des Experimentes. Durch zwei gewebe-nahe Agarbrücken wurde die Potentialdifferenz (P_d) zwischen den beiden Kammerhälften abgegriffen. Über zwei gewebe-ferne Agarbrücken war die Applikation von Strom (I) möglich.

In Tab. 1 sind die Vorinkubations- und Inkubationsbedingungen aller Ussing-Kammer-Versuche zusammenfassend dargestellt. Die Zahlen geben die Kapitelnummern an, in denen die Ergebnisse bzw. die Pufferrezepturen dargestellt sind.

Tab. 1: Zusammenfassung der Vorinkubations- und Inkubationsbedingungen

	Wasch- und Transportpufferlösung	Mukosale Inkubationspufferlösung	Serosale Inkubationspufferlösung	Mukosale Uptakepufferlösung
GLUT- und SGLT1-vermittelte Glukoseaufnahme 4.1.1	9.1.1b	9.1.1a	9.1.1b	9.1.1a +10mM Glukose
Einfluss der Endozytose 4.1.2	9.1.2 +1mM Glukose	9.1.2	9.1.2	9.1.2 +20mM Glukose
Zeitabhängigkeit und Mannit-Uptake 4.1.3	9.1.2 +1mM Glukose	9.1.2	9.1.2	9.1.2 +20mM Glukose
Einfluss von Kohlenhydraten 4.1.4	9.1.3a + 1mM Glukose	9.1.3a	9.1.3a	9.1.3b
Einfluss des serosalen Effluxes 4.2.1	9.1.4a	9.1.4b	9.1.4b	9.1.4b +20mM Glukose
Einfluss der intrazellulären Verstoffwechslung 4.2.1	9.1.4a	9.1.4c	9.1.4c	9.1.4c +20mM Glukose
Einfluss von Laktat 4.2.2	9.1.5a	9.1.5b } + 9.1.5c } 6mM 9.1.5d } Glukose	9.1.5b } + 9.1.5c } 6mM 9.1.5d } Mannit	9.1.5b } + 9.1.5c } 6mM 9.1.5d } Glukose
Einfluss der Glukoneogenese 4.2.3	9.1.5a	9.1.5b + 6mM Glukose	9.1.5b + 6mM Mannit	9.1.5b +6mM Glukose

3.1.4 Elektrophysiologische Messverfahren

Die Ussing-Kammer war an eine computergesteuerte Mess- und Recheneinheit (Voltage-clamp-Anlage, Fa. Ingenieurbüro für Mess- und Datentechnik, Mußler, Aachen, Deutschland) angeschlossen, mit der kontinuierlich elektrophysiologische Daten erfasst werden konnten sowie eine Applikation von Strom erfolgte.

Alle elektrophysiologischen Daten wurden von der Voltage-Clamp-Anlage automatisch um das Eigenpotential und den Eigenwiderstand der Versuchsanordnung korrigiert. Beide Werte wurden vor dem Einspannen der Epithelien in die Ussing-Kammern ermittelt.

Folgende elektrophysiologische Daten wurden während des Versuchsablaufes kontinuierlich erfasst:

- **Kurzschlussstrom (I_{sc}):** als Ausdruck des Nettoladungstransportes durch das Epithel;
- **Gewebeleitfähigkeit (G_t):** gibt die passive Durchlässigkeit des Gewebes für Ionen an;
- **Transepitheliales Potential (dPO):** als Maß für die elektrische Triebkraft zwischen mukosaler und serosaler Epithelseite.

Kurzschlussstrom und transepitheliales Potential

Die Ussing-Kammer war über zwei Paar Agarbrücken an die Messapparatur angeschlossen. Über ein gewebe nah (Abstand zur Oberfläche des Gewebes <3 mm) angebrachtes KCl-Agarbrückenpaar (3 M KCl-Lösung) wurde mit Argenthal[®]-Elektroden, die vollständig in 3 M KCl-Lösung getaucht waren, die Potentialdifferenz zwischen den beiden Epithelseiten abgegriffen. Unter Kurzschlussstrombedingungen (**short circuit**) wurde die gemessene Potentialdifferenz durch einen extern eingespeisten Strom (er entsprach im Betrag dem Kurzschlussstrom) auf 0 mV gegengeregelt. Dieser Strom wurde durch Ag-AgCl-Elektroden, die mit zwei gewebefernen (Abstand >20 mm vom Gewebe) NaCl-Agarbrücken (0,9 % NaCl-Lösung) verbunden waren, auf das Gewebe übertragen.

Somit wird als Kurzschlussstrom der Strom bezeichnet, der aufgrund des Ladungstransportes durch das Epithel hindurch entsteht. Er entspricht der Summe aller elektrogen transportierten Ionen. Ist das Epithel kurzgeschlossen, d.h. der Strom ist kompensiert, so bestehen keine passiven elektrisch treibenden Kräfte über dem Gewebe. Befinden sich zudem auf beiden Seiten des Gewebes identische Pufferlösungen, so ist auch der chemische Gradient aufgehoben. Die dann noch auftretenden Ionenbewegungen sind auf aktive Transportprozesse zurückzuführen.

Alle Versuche wurden unter *short circuit*-Bedingungen durchgeführt.

Gewebeleitfähigkeit

Zur Bestimmung der Gewebeleitfähigkeit wurde das Gewebe im Abstand von 60 s für eine definierte Dauer (300 ms) einem definierten bipolaren Stromimpuls (100 μ A) ausgesetzt. Mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes: $R = \Delta Pd * \Delta I^{-1}$ (Ω) wurde aus der gemessenen kurzzeitigen Potentialänderung (ΔPd) und dem zugeführten Strom (I) der Gewebewiderstand berechnet. Der reziproke Wert des Gewebewiderstandes entspricht der Gewebeleitfähigkeit.

3.1.5 Gruppierung der Epithelien

Die Einteilung der Epithelien in die Versuchsgruppen erfolgte etwa 30 Minuten nach dem Einspannen der Epithelien in die Ussing-Kammern anhand der zu diesem Zeitpunkt bestehenden Gewebeleitfähigkeiten. Um möglichst vergleichbare Epithelien in direkt zu vergleichenden Ansätzen einzusetzen, wurden hierfür Epithelien mit ähnlicher Gewebeleitfähigkeit eingeteilt. Die Einteilung der gruppierten Versuchsansätze erfolgte dann wiederum derart rotierend so, dass am Ende einer Versuchsserie der Mittelwert der initialen Gewebeleitfähigkeiten bei allen Versuchsgruppen möglichst gleich war.

3.1.6 Bestimmung des Glukose- und Mannit-Uptakes

Die Bestimmung der unidirektionalen Substrataufnahme von Glukose bzw. Mannit erfolgte mit den radioaktiv markierten Substanzen ¹⁴C-D-Glukose (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig) und ³H-Mannit (PerkinElmer, Boston, USA). Dabei kamen in der Regel 55 kBq ¹⁴C-D-Glukose bzw. 100 kBq ³H-Mannit pro Kammer zum Einsatz.

Nach dem Einspannen der Gewebe wurde das Epithel auf der mukosalen und serosalen Seite mit den laut Versuchsplan entsprechenden Pufferlösungen (Tab. 1) mindestens eine halbe Stunde vorinkubiert. Die Zugabe der Hemmstoffe erfolgte je nach Versuchsplan in der Regel auf der mukosalen Seite. Nach Zugabe der Hemmstoffe erfolgte die Substitution der radioaktiv markierten Glukose bzw. des radioaktiv markierten Mannits auf der mukosalen Seite. Etwa 20 Sekunden nach deren Zugabe wurden aus der Säule der mukosalen Seite zweimal 100 μ l der sogenannten „heißen Probe“ entnommen. Nach entsprechenden Aufnahmezeiten, die abhängig vom Versuchsplan zwischen 30 Sekunden und 30 Minuten

betrogen, wurde die Aufnahme der radioaktiv markierten Substanz durch Entfernen der Pufferlösung und dreimaligen Spülen mit eisgekühlter, glukosefreier Pufferlösung beendet. Anschließend wurde das Epithel aus der Ussing-Kammer ausgespannt. In einem Zylinder wurde das Epithel auf einer Fläche von 0,95 cm² durch Überschichtung mit 6 ml 0,2 n NaOH für 3 Minuten lysiert. Das gewonnene Lysat wurde anschließend bei 4°C und 4400 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. 2 mal 600 µl des Lysats wurden entnommen und mit 4 ml eines Flüssigszintillators (Aquasafe[®]300 Plus, Fa. Zinsser, Frankfurt, Deutschland) versetzt. Im Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut wurde der Gehalt der radioaktiv markierten Substanzen im Lysat mittels Flüssigszintillationszählung (Wallac 1409 LSC; Fa. Berthold, Wildbad, Deutschland) ermittelt. Die Messung erfolgte fotooptisch in counts per minute (cpm).

Durch folgende Verhältnisgleichung konnte die Aufnahme der Glukose und des Mannits in das Epithel errechnet werden:

$$\text{Uptake (nmol)} = [\text{S}] \cdot [\text{K}] \cdot [\text{H}]^{-1}$$

Direkt nach der mukosalen Zugabe von radioaktiv markierter Glukose bzw. radioaktiv markiertem Mannit wurden aus der Pufferlösung Bezugsproben zur Extrapolation der in der Inkubationslösung insgesamt befindlichen Radioaktivität ($[\text{H}]$) entnommen. Die Proben zur Bestimmung der in das Epithel insgesamt aufgenommenen Aktivität ($[\text{K}]$) wurden nach der Lyse des Epithels aus dem Lysat gewonnen. Weiterhin wurden Leerwerte unmarkierter Pufferlösung ohne Radioaktivität zur Korrektur von $[\text{K}]$ und $[\text{H}]$ bestimmt. Die Berechnung der Glukose- bzw. Mannitaufnahme erfolgte anhand der mukosal zugegebenen Menge des Substrates ($[\text{S}]$) während der Aufnahmeperiode und dem Quotienten von $[\text{K}]$ und $[\text{H}]$. Es ergab sich vereinfacht (nach Korrektur um die jeweiligen Leerwerte) die oben angegebene Formel.

3.1.7 Übersicht über die Versuchsanordnungen der Ussing-Kammer-Versuche

Die Vorinkubations- und Inkubationsbedingungen sind in Tab. 1 dargestellt.

Die Zugabe von Hemmstoffen sowie die chronologischen Abläufe der Versuche sind in Tab. 2 zusammengefasst. Die in der Tabelle angegebene Kapitelnummer entspricht der zugehörigen Darstellung im Ergebnisteil.

Erläuterungen zu Tabelle 2:

Cel(100)	100 mM Cellobiose mukosal
CytB(0,1)	0,1 mM CytochalasinB mukosal
CP(0,02)	20 µM Chlorpromazin mukosal und serosal
EtOH	Ethanol in äquivalenter Menge zur Hemmstoffgabe (Kontrolle)
G(6)	6 mM Glukose mukosal
G(10)	10 mM Glukose mukosal
G(20)	20 mM Glukose mukosal
M(20)	20 mM Mannit mukosal
Man(100)	100 mM Mannose mukosal
MPA(0,2)	0,2 mM 3-Mercaptopicolinsäure beidseitig
NAc(100)	100 mM N-Acetyl-D-Glukosamin mukosal
NEM(1)	1 mM N-Ethylmaleimid mukosal und serosal
Raf(100)	100 mM Raffinose mukosal
Ret(0,2)	0,2 mM Phloretin mukosal
Ret(0,5)	0,5 mM Phloretin mukosal
Ret(1,0)	1 mM Phloretin mukosal
Ret _s (0,2)	0,2 mM Phloretin serosal
Riz(0,1)	0,1 mM Phlorizin mukosal
Riz(0,5)	0,5 mM Phlorizin mukosal
Ser(100)	100 mM Serin mukosal
Sor(100)	100 mM Sorbitol mukosal
U _G (1)	Messung des Glukose-Uptakes über 1 Minute
U _G (3)	Messung des Glukose-Uptakes über 3 Minuten
U _G (10)	Messung des Glukose-Uptakes über 10 Minuten
U _G (20)	Messung des Glukose-Uptakes über 20 Minuten
U _G (0,5+1+3+5+7+10+15+20)	Messung des Glukose-Uptakes über ½, 1, 3, 5, 7, 10, 15 und 20 Minuten
U _M (10)	Messung des Mannit-Uptakes über 10 Minuten
U _M (20)	Messung des Mannit-Uptakes über 20 Minuten
U _M (0,5+1+3+5+7+10+15+20)	Messung des Mannit-Uptakes über ½, 1, 3, 5, 7, 10, 15 und 20 Minuten

Tab. 2: Chronologische Darstellung der Ussing-Kammer-Versuche

Kap.	Zeit	-20	-10	-5	-1	0
4.1.1					+ EtOH & G(10) / + Riz(0,1) & G(10) / + Ret(0,2) & G(10) / + CytB(0,1) & G(10)	U_G(1)
				+G(10)	+ EtOH / + Riz(0,1) / + Ret(0,2) / + CytB(0,1)	U_G(1)
			+G(10)		+ EtOH / + Riz(0,1) / + Ret(0,2) / + CytB(0,1)	U_G(1)
		+G(10)			+ EtOH / + Riz(0,1) / + Ret(0,2) / + CytB(0,1)	U_G(1)
Kap.	Zeit	-15		-1		0
4.1.2		+ EtOH		+ EtOH / + Ret(1,0) / + Riz(0,5) & Ret(1,0)		+ G(20) : U_G(10) & U_M(10)
		+ CP(0,02)		+ EtOH / + Ret(1,0) / + Riz(0,5) & Ret(1,0)		+ G(20) : U_G(10) & U_M(10)
		+ NEM(1)		+ EtOH / + Ret(1,0) / + Riz(0,5) & Ret(1,0)		+ G(20) : U_G(10) & U_M(10)
Kap.	Zeit	-1		0		
4.1.3		+ EtOH		+ G(20) : U_G(0,5+1+3+5+7+10+15+20)		
		+ Riz(0,5) & Ret(0,5)		+ G(20) : U_G(0,5+1+3+5+7+10+15+20) & U_M(0,5+1+3+5+7+10+15+20)		
Kap.	Zeit	0				
4.1.4		+ Ser(100) & Riz(0,5) & Ret(0,5) & G(20) & M(20) : U_G(20) & U_M(20)				
		+ NAc(100) & Riz(0,5) & Ret(0,5) & G(20) & M(20) : U_G(20) & U_M(20)				
		+ Man(100) & Riz(0,5) & Ret(0,5) & G(20) & M(20) : U_G(20) & U_M(20)				
		+ Cel(100) & Riz(0,5) & Ret(0,5) & G(20) & M(20) : U_G(20) & U_M(20)				
		+ Sor(100) & Riz(0,5) & Ret(0,5) & G(20) & M(20) : U_G(20) & U_M(20)				
		+ Raf(100) & Riz(0,5) & Ret(0,5) & G(20) & M(20) : U_G(20) & U_M(20)				

Kap.	Zeit	-1		0
4.2.1		+ EtOH / + Riz (0,5)		+ G(20) : UG(1)
		+ EtOH & Ret _S (0,2) / + Riz(0,5) & Ret _S (0,2)		+ G(20) : UG(1)
		+ EtOH / + Riz(0,5)		+ G(20) : UG(3)
		+ EtOH & Ret _S (0,2) / + Riz(0,5) & Ret _S (0,2)		+ G(20) : UG(3)
Kap.	Zeit	-180	-1	0
4.2.2		+ G(6)	+ EtOH / + Riz(0,1) / + Ret(0,2)	UG(1)
Kap.	Zeit	-180	-1	0
4.2.3		+ MPA(0,2) & G(6)	+ EtOH / + Riz(0,1) / + Ret(0,2)	UG(1)

Alternative Zugaben sind durch „/“ gekennzeichnet

3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

3.2.1 Probennahme und Probenlagerung

Die Entnahme der molekularbiologischen Proben erfolgte bei 5 Schweinen unmittelbar nach der Tötung der Tiere (siehe Kapitel 3.1.1). Unter sterilen Bedingungen wurden dem Tier folgende Proben entnommen:

- quergestreifte Muskulatur aus dem Bereich des lateralen Oberschenkels (Musculus biceps femoris)
- Leber
- Niere (Nierenrinde und Nierenmark)
- proximales Jejunum

Bei der Gewinnung der Proben des proximalen Jejunums wurde nach Eröffnung des Darmes mittels eines Objektträgers die Mukosa abgetragen, um auszuschließen, dass die Probe andere Schichten der Darmwand enthält. Die Konservierung erfolgte entweder in Cryo.S-Röhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen), welche unmittelbar nach der Probennahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert wurden oder in 3 ml RNAlater in Narrow-Mouth-Bottles (Nalgene). Diese Proben wurden 24 Stunden bei 4°C aufbewahrt und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

3.2.2 Extraktion der Gesamt-RNA

Die Proben wurden unmittelbar vor der Verarbeitung abgewogen, um das exakte Probengewicht zu ermitteln. Die Gewebe wurden in vorgekühlten Porzellanmörsern unter ständiger Kühlung mittels flüssigen Stickstoffs pulverisiert und die Gesamt-RNA anschließend mittels Trizol[®] Reagent (Invitrogen) isoliert.

Die Homogenisierung erfolgte nach der Pulverisierung und nach Zugabe von 1 ml Trizol[®] Reagent pro 50 bis 100 mg Gewebe in einem konischen Glashomogenisator. Trizol[®] Reagent, welches eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat darstellt, gewährleistet während der Homogenisierung die Unversehrtheit der Gesamt-RNA.

Anschließend wurde das Homogenisat in 1,5 ml Safe-Lock-Reaktionsgefäßen (Eppendorf) überführt und 10 Minuten bei 4°C und 12000 g zentrifugiert. Der Überstand, welcher RNA und DNA enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die nachfolgende Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro 1 ml Trizol, gründlicher Durchmischung, 3-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und 15 Minuten Zentrifugation bei 4°C und 12000 g erfolgte die Auftrennung der Lösung in eine wässrige Phase und in eine organische Phase. Die RNA befindet sich dabei ausschließlich in der wässrigen Phase. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die sich in der wässrigen Phase befindliche RNA wurde durch Zugabe von 0,5 ml 2-Propanol ausgefällt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und 10 Minuten Zentrifugation bei 4°C und 12000 g konnte ein gelartiges RNA-Pellet gewonnen werden. Dieses Pellet wurde anschließend in 70 % Ethanol gewaschen und zentrifugiert (5 Minuten, 4°C, 7500 g). Die Trocknung erfolgte bei Raumtemperatur. Abhängig von der Größe des Pellets wurde es in 50 bis 250 µl autoklaviertem Aqua bidest. gelöst. Die Quantifizierung der Gesamt-RNA erfolgte spektrophotometrisch durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Konzentration der Gesamt-RNA berechnet sich nach folgender Formel:

$$[\text{RNA}] \text{ in } \mu\text{g/ml} = A_{260} * \text{Verdünnungsfaktor der Probe} * 40$$

Die noch in der Probe vorhandene DNA wurde durch die Absorption bei 280 nm gemessen. Durch die Bildung des Verhältnisses zwischen RNA und DNA kann die Reinheit der Probe

bestimmt werden. Proben die eine Reinheit zwischen 1,6 und 2,0 aufwiesen, wurden verwendet. Zusätzlich wurde der Isolierungserfolg mittels einer Agarosegelelektrophorese (1 % Agarosegel (w/v) mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid) überprüft. Hierzu wurden circa 0,2 bis 0,4 µl der isolierten Gesamt-RNA auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch bei 130 V aufgetrennt. Waren die 28S und die 18S RNA deutlich sichtbar, wurde anschließend mittels des kommerziell erhältlichen Oligotex[®]Kits der Firma Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland) eine *PolyA⁺-mRNA* isoliert.

3.2.3 Isolierung der PolyA⁺-mRNA mittels Oligotex[®]mRNA Kit

Der Ansatz der Gesamt-RNA wurde mit 500 µl OBB-Pufferlösung und einer auf 37°C erwärmten Oligotex-Suspension des Oligotex[®]mRNA Kits nach Angaben des Herstellers versetzt. Nach Mischung des Ansatzes erfolgte eine 3-minütige Inkubation im Thermoblock (Fa. Eppendorf) bei 70°C, welche zur Zerstörung der Sekundärstrukturen der RNA führte. Die anschließende 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur erlaubte die Hybridisierung des PolyA⁺-Schwanzes der mRNA an den oligo-dT₃₀-Komplex der Oligotex-Partikel. Alle nicht gebundenen RNA-Anteile wurden durch Verwerfen des Überstandes nach einer 2-minütigen Zentrifugation bei 9000 g entfernt. Das zurückbleibende Pellet wurde in 400 µl OW2-Pufferlösung unter kräftigem Mischen auf einem Vortexrührer resuspendiert. Die Suspension wurde auf eine im Kit enthaltene Säule pipettiert, welche auf einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgesetzt war, und 1 Minute bei 9000 g zentrifugiert. Diese Säule filterte die Oligotex/PolyA⁺-mRNA-Komplexe aus dem Ansatz heraus. Auf einem frischen Reaktionsgefäß wurde die Säule nochmals mit 400 µl OW2-Pufferlösung zentrifugiert und dann auf ein drittes Reaktionsgefäß verbracht. Zum Herauslösen der PolyA⁺-mRNA aus der Säule wurden 20 µl (abhängig von der zu erwartenden PolyA⁺-mRNA-Konzentration) der auf 70°C erwärmten OEB-Pufferlösung auf die Säule aufgetragen, ohne diesen dabei abzukühlen. Mehrmaliges Auf- und Abpipettieren ermöglichte das Ablösen der Oligotexpartikel von der Säule. Der Ansatz wurde anschließend nochmals für eine Minute bei 9000 g zentrifugiert, so dass im Reaktionsgefäß nun das polyA⁺-mRNA-haltige Eluat enthalten war. Zur Optimierung der Ausbeute wurde dieser Elutionsschritt noch einmal wiederholt. Dann erfolgte eine weitere Konzentrations- und Reinheitsmessung der erhaltenen PolyA⁺-mRNA am Spektrophotometer nach der oben beschriebenen Methode.

Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.4 DNA-Verdauung mit RQ1 RNase-Free DNase

Um sicherzustellen, dass die Proben keine DNA-Kontamination enthielten, wurde im Anschluss an die PolyA⁺-mRNA-Synthese eine Verdauung der noch in der Probe enthaltenen DNA mittels RQ1 RNase-Free DNase[®] (Promega, Madison, USA) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Proben eines Organes gepoolt. Von jeder PolyA⁺-mRNA der 5 verschiedenen Schweine wurden 200 ng RNA (bzw. 250 ng von 4 Schweinen bei den Proben der quergestreiften Muskulatur) in den Verdauungsansatz gegeben, so dass sich im Gesamtansatz 1000 ng PolyA⁺-mRNA befanden. Weiterhin wurden dem Ansatz 1 µl 10x Reaktionspufferlösung und 1 µl RQ1 DNase zugegeben. Mit RNase-freiem Wasser wurde der Ansatz auf 10 µl aufgefüllt und im Cycler 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt bewirkte, dass eventuell vorhandene einzel- oder doppelsträngige DNA von der DNase in Oligonukleotide abgebaut wurde. Zum Beenden der DNase-Aktivität wurde dem Ansatz 1 µl Stop Solution zugegeben und eine 10-minütige Inkubation bei 65°C angeschlossen.

3.2.5 Zweischnitt-RT-PCR

cDNA-Synthese

Die aufgereinigte und DNase-behandelte PolyA⁺-mRNA wurde in einem kommerziellen Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) eingesetzt, um eine einzelsträngige cDNA zu synthetisieren. Es wurde ein Ansatz von insgesamt 20 µl hergestellt, der aus 100 ng der PolyA⁺-RNA, 5 µl 5x Transcriptor RT Reaction Buffer (1x), 1 µl Anchored-oligo(dT)₁₈Primer (2,5 µM), 2 µl Deoxynukleotid-Mix (je 1 mM), 0,5 µl Protector RNase Inhibitor (20 U) und 0,5 µl Transcriptor Reverse Transcriptase (10 U) bestand und mit sterilem Aqua bidest. auf den Gesamtansatz aufgefüllt wurde. Die cDNA-Synthese erfolgte nach folgendem Protokoll in einem Peltier Thermal Cycler PTC-200 (Biozym Diagnostic GmbH, Hamburg, Deutschland):

30 min bei 55°C; 5 min bei 85°C; 5 min bei 4°C.

Die hergestellte cDNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zum Nachweis der Glukosetransporter im proximalen Jejunum auf Ebene der mRNA wurde aus der hergestellten cDNA mit Hilfe genspezifischer Primer der unten benannten Datenbanken und dem DyNAzyme™ II DNA Polymerase Kit (Finnzymes, Espoo, Finnland) eine PCR durchgeführt. Zusätzlich wurden parallel zu den Darmproben Kontrollproben aus Leber, Niere und quergestreifter Muskulatur verarbeitet. Weiterhin wurden Negativkontrollproben durchgeführt, bei denen als Template PolyA⁺-mRNA diente. Die cDNA wurde jeweils in einem 50-µl-Ansatz amplifiziert, wobei jede PCR mit einem DNA-Gemisch aus 5 Schweinen (proximales Jejunum, Leber, Niere) bzw. 4 Schweinen (quergestreifte Muskulatur) durchgeführt wurde. Der Ansatz enthielt: 39,5 µl Aqua bidest, 5 µl 10xPufferlösung, 2 µl der cDNA, jeweils 1 µl des Vorwärts- und Rückwärtsprimers (je 10 pmol/µl), 1 µl dNTP-Mix (je 10 µM) und 0,5 µl der DNA-Polymerase (Dynazyme, 2 IU • µl⁻¹).

Die verwendeten Primerpaare (hergestellt von MWG Biotech, Deutschland) und die Reaktionsbedingungen der PCR im Peltier Thermal Cycler PTC-200 sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

In Tabelle 3 sind nur die Glukosetransporter aufgeführt, deren mRNA im Jejunum nachgewiesen werden konnte. Das Screening erfolgte auch für den GLUT6 und den GLUT12 mit mindestens 3 Primerpaaren. Die mRNA dieser Transporter konnte im proximalen Jejunum jedoch nicht nachgewiesen werden.

Tab. 3: Zusammenfassung der verwendeten Primerpaare und Cyclerkonditionen

Transporter	Primerpaar Name	Primersequenz	Referenz-Sequenz	Cyclerkonditionen	Zu erwartende Größe des Amplifikates
GLUT1	pF 506-524 pR 1029-1011	5'-GCC CCC GCT TCC TGC TCA T-3' 5'-GCC AGG GCC CAC TTC AAA G-3'	X17058.1	95°C 1'; 35x(95°C 20"; 60°C 30"; 72°C 1') 72°C 4'; 4°C	524 bp
GLUT2	ovF 544-562 ovR 1071-1054	5'-GCA CAT CCT GCT TGG TTT G-3' 5'-GGC AAT TTA TTC AGG AGC-3'	AJ318925.1	95°C 1'; 35x(95°C 20"; 50°C 30"; 72°C 1') 72°C 4'; 4°C	530 bp
	pF GLUT2 pR 1310-1290	5'-GAG AGG GAA GAA GCA TCA AGT-3' 5'-CTA AAG CAG CAG GGC GTG GTC-3'	eigene Sequenz* AF054835.1	95°C 1'; 35x(95°C 20"; 54°C 30"; 72°C 1') 72°C 4'; 4°C	475 bp
GLUT3	bovF 392-412 bovR 892-872	5'-GCG GCT GCC TTA TGG GAT TCT-3' 5'-TGA TGG GTT GCC GGT AGT TGG-3'	AY033938.1	95°C 1'; 35x(95°C 20"; 58°C 30"; 72°C 1') 72°C 4'; 4°C	501 bp
GLUT4	hF 205-225 hR 646-626	5'-CGT CGG GCT TCC AAC AGA TAG-3' 5'-GAG TAG GCG CCA ATG AGG AAT-3'	NM_001042.2	95°C 1'; 35x(95°C 20"; 58°C 30"; 72°C 1') 72°C 4'; 4°C	442 bp
GLUT5	ovF 4-20 ovR 453-438	5'-GCA TTT GGT ATT TTG GC-3' 5'-GGC CAC AAT GAT CAT C-3'	NM_001009451.1	95°C 1'; 35x(95°C 20"; 48°C 30"; 72°C 1') 72°C 4'; 4°C	450 bp
	pF GLUT5 pR GLUT5	5'-GCC GCT ATT AAC TCG CCT TCT G-3' 5'-CGA CTT TGC TGC ATC CCA TCA-3'	eigene Sequenz*	95°C 1'; 35x(95°C 20"; 56°C 30"; 72°C 1') 72°C 4'; 4°C	256 bp
GLUT7	hF 947-965 hR 1359-1339	5'-AGG CCG CTC ACT CCC AAT A-3' 5'-TCC GGC AAA GAT GAT GAA ACT-3'	NM_207420.2	95°C 1'; 35x(95°C 20"; 54°C 30"; 72°C 1') 72°C 4'; 4°C	413 bp
	pF GLUT7 pR GLUT7	5'-CAA TAC ATA ACG GTG GGG GT-3' 5'-GTA GGC GCC AAT GAC CTC C-3'	eigene Sequenz*	95°C 1'; 35x(95°C 20"; 62°C 30"; 72°C 1') 72°C 4'; 4°C	378 bp
GLUT8	ovF 201-221 ovR 619-599	5'-GGA GGC CAA GTT CAA GGA CAG-3' 5'-CCA GAA AGG CCA TGA ACC AGT-3'	AF495799.1	95°C 1'; 35x(95°C 20"; 58°C 30"; 72°C 1') 72°C 4'; 4°C	419 bp
GLUT10	hF 446-466 hR 802-782	5'-GGC TTC CTC ATT GAC TGC TAT-3' 5'-GAA GAG GAG GCT GAG GGA TTG-3'	AF248053.1	95°C 1'; 35x(95°C 20"; 56°C 30"; 72°C 1') 72°C 4'; 4°C	357 bp
GLUT11	bovF 54-75 bovR 504-483	5'-TGC GGC TGG TAT TGG TGG AAC T-3' 5'-CAG GGC GGT GAA GAT GGC AGA G-3'	XM_867861.3	95°C 1'; 35x(95°C 20"; 56°C 30"; 72°C 1') 72°C 4'; 4°C	451 bp
SGLT1	pF 1401-1424 pR 1861-1839	5'-CCA CCC ATC GCA GCT GTC TTC CTA-3' 5'-ATT TTG GGG CCC TTC TGC TGG TC-3'	NM_001164021	95°C 1'; 35x(95°C 20"; 59°C 30"; 72°C 1') 72°C 4'; 4°C	461 bp

*Die Primersequenzen wurden von der Sequenz des vorstehenden Amplifikates abgeleitet

In einem Agarosegel (1 % w/v mit 4 µg/ml Ethidiumbromid) wurden 5 µl des PCR-Ansatzes nach der Amplifikation elektrophoretisch aufgetrennt. Enthielt das PCR-Produkt eine einzelne Bande in der zu erwartenden Größe, wurden nach Abschätzung des cDNA-Gehaltes durch Vergleich mit einem Markerstandard direkt 45 ng des PCR-Produktes der Sequenzierungsreaktion zugeführt.

Enthielten die Amplifikate mehrere Banden, von denen eine der zu erwartenden Größen entsprach, wurden die PCR-Reaktionen über Nacht gefällt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem präparativen Gel wurde die erwünschte Bande ausgeschnitten und nach Angaben des Herstellers mit dem Agarose-Gel DNA Extractions Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) aufgearbeitet. In einem analytischen Gel wurde 1 µl der cDNA eingesetzt, um die vorhandene cDNA-Konzentration durch Vergleich mit einem Markerstandard (DNA Molecular Weight Marker XIV, 100bpI, Fa. Roche) zu ermitteln. Dann wurden 45 ng der cDNA in einer Sequenzierreaktion eingesetzt.

3.2.6 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierung erfolgte mit dem ABI Prism BigDye Terminator Kit (Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA). Für die Sequenzierreaktion wurden folgende Komponenten verwendet:

- 45 ng PCR-Produkt
- 100 ng des gewünschten Primers
- 4 µl BigDye 3.1

Der Ansatz wurde mit autoklaviertem Aqua bidest auf 20 µl aufgefüllt. Der Big Dye Mix (gestellt vom Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung der Universität Leipzig; IZKF) enthält alle für die Sequenzierung notwendigen Pufferlösungen, fluoreszenzmarkierten dNTP's sowie die Polymerase.

Im oben genannten Cycler (PTC-200) erfolgte die Sequenzierreaktion nach folgendem Protokoll:

96°C 2 min; 25x (96°C 15 s; 50°C 15 s; 60°C 4 min); 4°C 5 min

Der Ansatz wurde nach Beendigung des Programms mit 2 µl 3M Natriumazetat und 50 µl absolutem Ethanol in einem Eppendorf Cup auf dem Vortexrührer gemischt und unter lichtgeschützten Verhältnissen 15 Minuten bei 4 bis 8°C gefällt. Anschließend wurde der Ansatz 30 Minuten bei 9000 g und 15°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zum Waschen des zurückgebliebenen Pellets vorsichtig 200 µl 70 %-iges Ethanol (4°C) zupipettiert, ohne dabei das Pellet vom Bodenrand abzulösen. Es erfolgte eine einminütige Inkubation auf Eis. Dann wurde das Ethanol abpipettiert und das Pellet bei 37°C im Thermoblock getrocknet.

Die so aufgereinigten DNA-Fragmente wurden im Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung der Universität Leipzig auf ein Acrylamidgel aufgetragen und im ABI PRISM 377 DNA Sequenzer (Applied Biosystems) analysiert.

Die Sequenzen der PCR-Produkte wurden mit bekannten DNA-Sequenzen der entsprechenden Transportproteine verglichen, um deren Identität nachzuweisen. Die zum Vergleich genutzten Sequenzen entstammten entweder porzinen Sequenzen oder denen anderer Spezies, wenn keine porzinen Sequenzen publiziert waren.

3.3 STATISTIK UND DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE

Die statistische Auswertung der Ergebnisse der Ussing-Kammer-Versuche erfolgte mit der Computer-Software Jandel SigmaStat[®] 2.0 (Fa. Jandel Corporation) bzw. Microsoft Excel[®] 2000 (Fa. Microsoft Corporation).

Der statistische Vergleich der Ergebnisse begann in allen Versuchsgruppen mit einem Test auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und auf Gleichverteilung (Levene's Median-Test). Da alle Daten beide Kriterien erfüllten, wurden zwei Versuchsgruppen jeweils mittels gepaarten t-Test nach Student verglichen. Der Vergleich mehrerer Gruppen erfolgte durch eine Varianzanalyse mittels One-Way Repeated Measurement of Variance Analysis (One-Way RM ANOVA) verwendet. Im Anschluss an die Varianzanalyse schloss sich ein Student-Newman-Keuls-Test an.

Die Mittelwerte sind arithmetische Mittel und werden mit dem Standardfehler (standard error of mean; SEM) dargestellt. Die Stichprobenzahl ist als n angegeben, während N der Anzahl der für diese Beobachtungen verwendeten Versuchstiere entspricht.

Alle Ergebnisabbildungen wurden mit der Computer-Software Jandel SigmaPlot[®] 7.0 (SPSS inc., Chicago, IL, USA) erstellt.

4. Ergebnisse

4.1 GLUKOSEAUFNAHME IN DAS DARMEPITHEL

4.1.1 Der Einfluss der Verfügbarkeit von Glukose auf die GLUT- und SGLT1-vermittelte Glukoseaufnahme

Zunächst wurde die Glukoseaufnahme in das Darmepithel ohne vorherige mukosale Vorinkubation mit Glukose ermittelt (Pufferlösung 9.1.1a). Dem Gewebe wurde schon während der Vorinkubation auf der serosalen Seite 6 mM Glukose zur Verfügung gestellt (Pufferlösung 9.1.1b), um eine ausreichende Nährstoffversorgung des Epithels sicherzustellen. Mit Beginn der Glukose-Uptake-Messung wurden dem Epithel auf der mukosalen Seite 10 mM Glukose zur Verfügung gestellt.

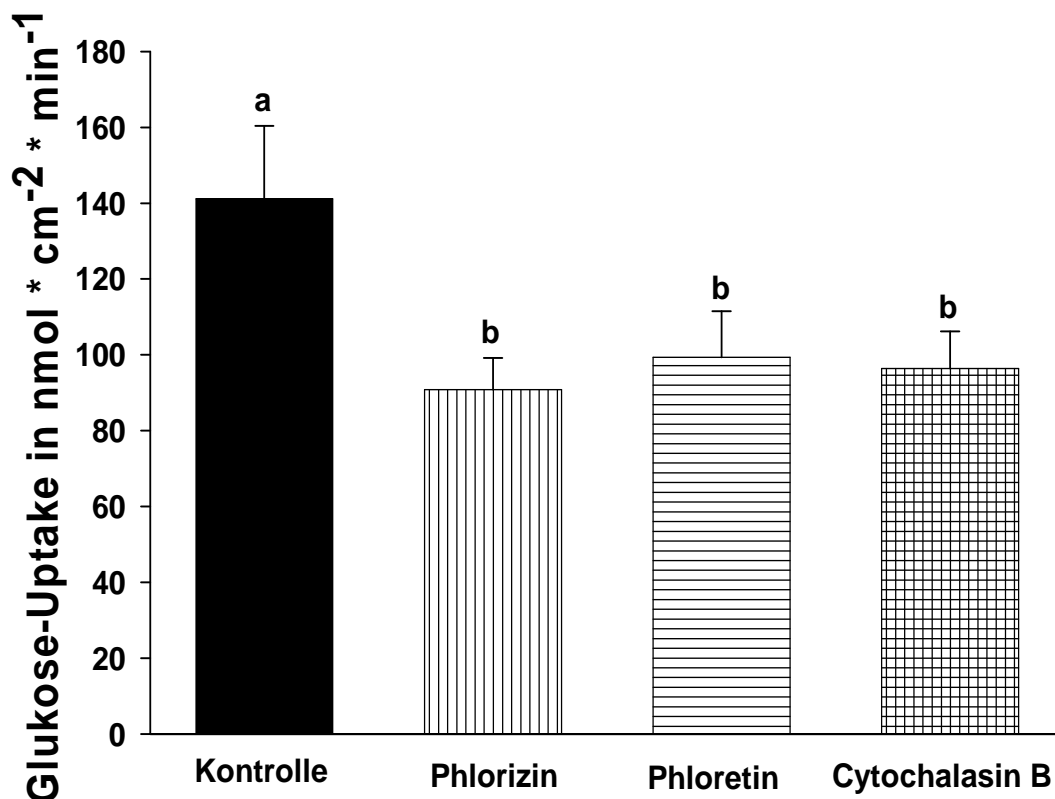


Abb. 2: Vergleichende Glukoseaufnahme unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit der Hemmstoffe Phlorizin, Phloretin und Cytochalasin B nach mukosal glukosefreier Vorinkubation

Mittelwerte mit SEM; n = 8, N = 8; mukosale Glukosekonzentration: 10 mM; serosale Glukosekonzentration: 6 mM; mukosale Phlorizinkonzentration: 0,1 mM; mukosale Phloretinkonzentration: 0,2 mM; mukosale CytB-Konzentration: 0,1 mM;

^{a,b}p < 0,05 (Säulen ohne gemeinsamen Buchstaben sind signifikant voneinander verschieden)

Die Zugabe der Hemmstoffe erfolgte 1 Minute vor Beginn der Glukoseaufnahmemessung. Die Glukoseaufnahme in das Epithel wurde über einen Zeitraum von einer Minute erfasst (Abb. 2).

Durch den SGLT1-Hemmstoff Phlorizin erfolgte eine signifikante Hemmung der Glukoseaufnahme um 35,7 %. Die GLUT-Hemmstoffe Phloretin und Cytochalasin B bewirkten signifikante Hemmungen der Glukoseaufnahme um 29,6 % sowie 31,7 %.

In weiteren Versuchsansätzen wurden die Epithelien vor Beginn der Uptakemessungen für 5, 10 oder 20 Minuten mit 10 mM Glukose in der Pufferlösung vorinkubiert (Abb. 3). Abgesehen davon blieben die Versuchseinstellungen identisch.

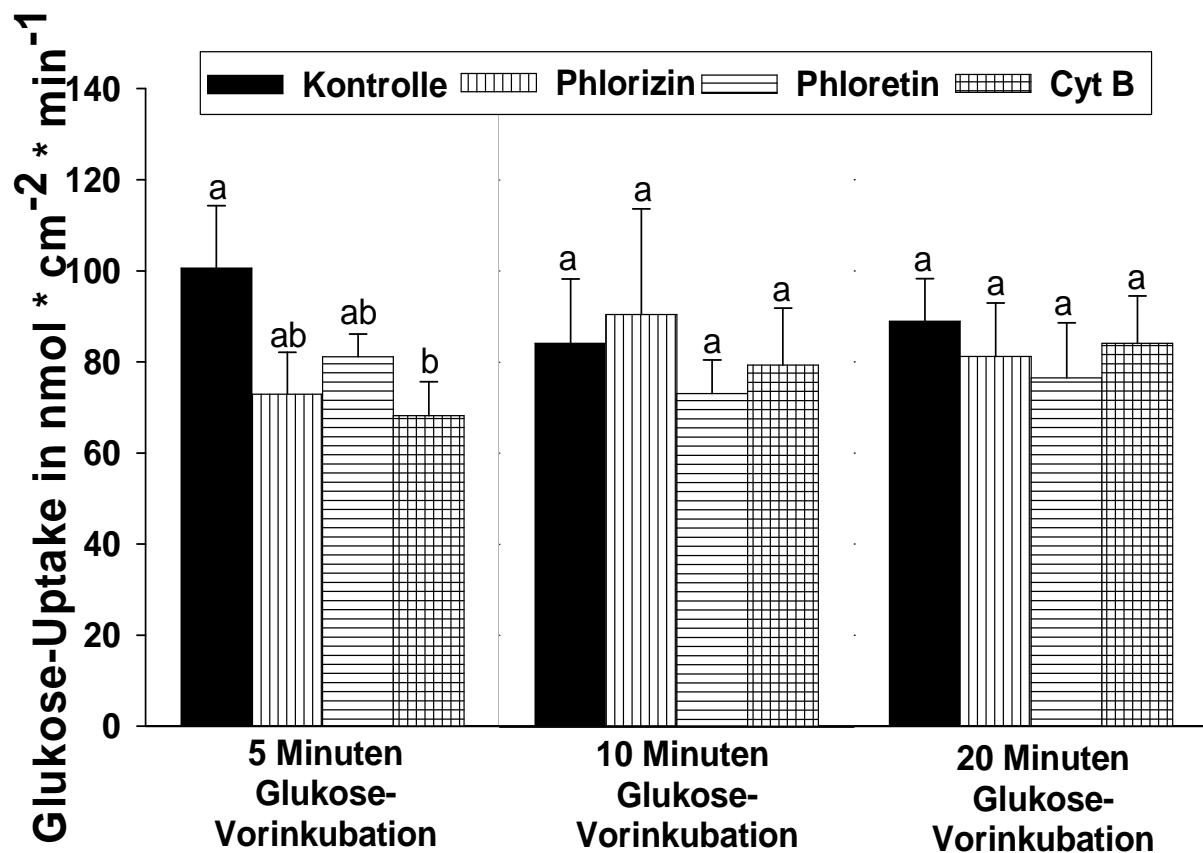


Abb. 3: Glukoseaufnahme nach 5, 10 und 20 Minuten mukosaler Vorinkubation der Epithelien mit 10 mM Glukose unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von Hemmstoffen

Mittelwerte mit SEM; $n = 8$, $N = 8$; mukosale Glukosekonzentration: 10 mM; serosale Glukosekonzentration: 6 mM; mukosale Phlorizinkonzentration: 0,1 mM; mukosale Phloretinkonzentration: 0,2 mM; mukosale CytB-Konzentration: 0,1 mM;

^{a,b} $p < 0,05$ (Säulen innerhalb einer Vorinkubationsgruppe sind voneinander verschieden, wenn sie keinen gemeinsamen Buchstaben haben.)

Wurden den Epithelien bereits 5 Minuten vor Beginn der Glukoseaufnahme-Messungen 10 mM Glukose zur Verfügung gestellt, so reduzierte sich die Glukoseaufnahme unter Kontrollbedingungen um 28,7 % (vgl. Kontrolle in Abb. 2 und Abb. 3). Während ohne Vorinkubation durch Glukose noch alle 3 Hemmstoffe zu einer signifikanten Hemmung der Glukoseaufnahme führten (Abb. 2), erfolgte nach 5-minütiger Glukosevorinkubation nur noch durch Cytochalasin B eine signifikante Hemmung. Nach 10- und 20-minütiger Vorinkubation mit Glukose konnte keiner der Hemmstoffe eine Hemmung der Glukoseaufnahme erzielen (Abb. 3).

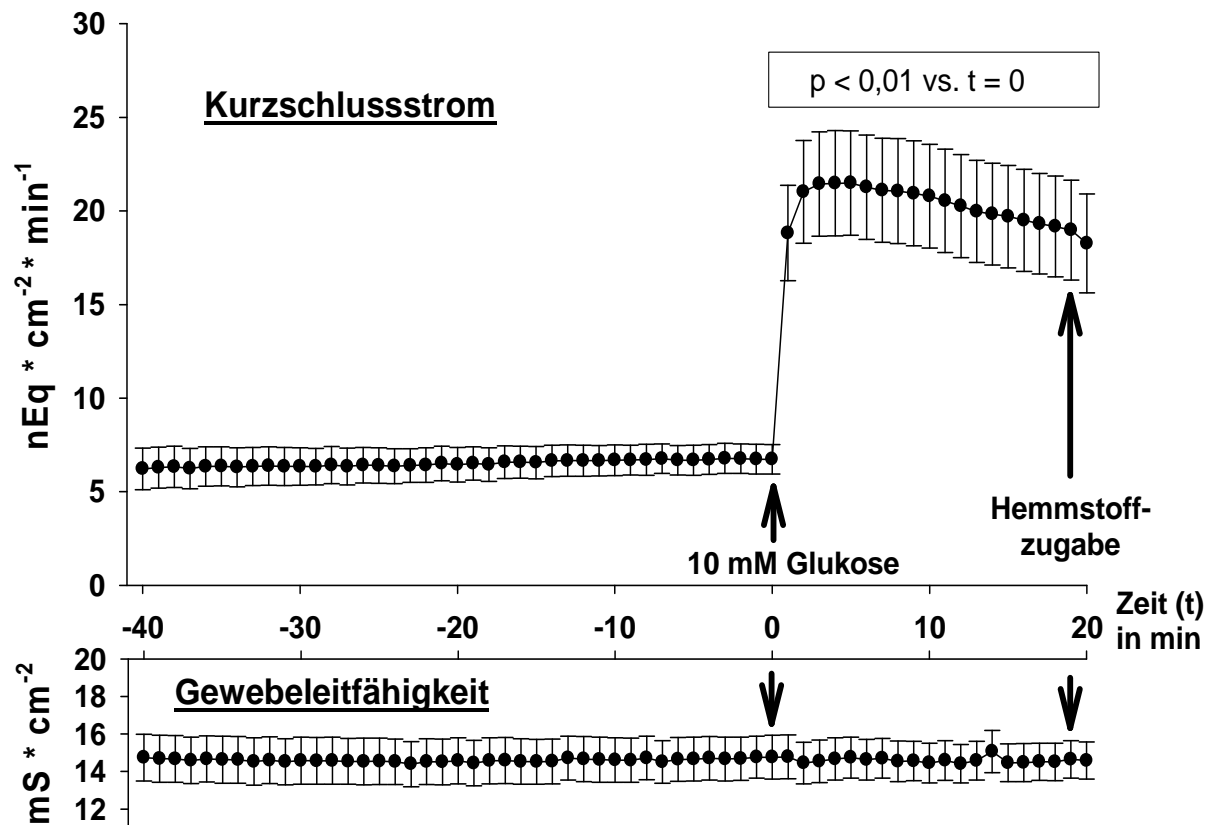


Abb. 4: Verlauf des Kurzschlussstromes und der Gewebeleitfähigkeit vor und nach mukosaler Glukosezugabe
 Mittelwerte mit SEM; $n = 27$, $N = 8$
 mukosale Zugabe von 10 mM Glukose zum Zeitpunkt $t = 0$; mukosale Hemmstoffzugabe (Kontrolle/Ethanol, Phlorizin, Phloretin oder Cytochalasin B) zum Zeitpunkt $t = 19$

Die Verläufe des Kurzschlussstromes¹ und der Gewebeleitfähigkeit vor und nach mukosaler Glukosezugabe sind in Abb.4 dargestellt. In dieser Abbildung sind die elektrophysiologischen Daten aller Epithelien, die 20 Minuten mit Glukose vorinkubiert worden waren, zusammengefasst, unabhängig davon, welcher Hemmstoff verwendet wurde. Bis zur Zugabe der Glukose auf der mukosalen Seite blieben sowohl der Kurzschlussstrom als auch die Gewebeleitfähigkeit konstant. Während die Gewebeleitfähigkeit nach Zugabe der Glukose keine Veränderungen aufwies, erfuhr der Kurzschlussstrom einen hochsignifikanten Anstieg und erreichte seinen höchsten Wert 5 Minuten nach der Glukosezugabe. Insgesamt kam es zu einem Anstieg des Kurzschlussstromes um $14,8 \pm 2,4 \text{ nEq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$.

Mit diesen Untersuchungen konnte zunächst gezeigt werden, dass an der Glukoseresorption im proximalen Jejunum des Schweins der SGLT1 beteiligt war. Dafür sprachen die Hemmbarkeit der Glukoseaufnahme durch den kompetitiven SGLT1-Hemmstoff Phlorizin um 35,7 % und der Kurzschlussstromanstieg nach mukosaler Glukosezugabe. Auch die GLUT-Hemmstoffe Phloretin und Cytochalasin B führten zu einer Hemmung der Glukoseaufnahme in das Epithel. Somit schien neben dem SGLT1 auch ein apikal lokalisierter GLUT an der Glukoseaufnahme in das Epithel beteiligt zu sein. Nach bisherigem

¹ Der Kurzschlussstrom wird in dieser Arbeit in $\text{nEq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ und nicht wie üblich in $\mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ angegeben, um eine bessere Vergleichbarkeit mit den ebenfalls je Minute gemessenen Uptakes zu ermöglichen.

Kenntnisstand handelt es sich dabei um den GLUT2, da keine andere Hypothese, bis auf die von Kellett, von einem apikal gelegenen GLUT ausgeht. Die Tatsache, dass die GLUT-Hemmstoffe Phloretin und Cytochalasin B in dieser Versuchseinstellung zu einer deutlichen Hemmung der Glukoseaufnahme führten, bestätigt diese Vermutung.

Zwischen der Hemmwirkung des Phlorizin und den Hemmwirkungen der GLUT-Hemmstoffe Phloretin und Cytochalasin B waren keine signifikanten Unterschiede vorhanden. Ausgehend von der Annahme, dass beide Transportsysteme an der Glukoseaufnahme beteiligt sind, stellte sich die Frage, ob Phlorizin allein durch die verminderte Glukosetransportrate des SGLT1 eine Hemmung bewirkt oder ob es durch den inaktiven SGLT1 sekundär auch zu einer Hemmung des apikalen GLUT2 kommt. Die elektrophysiologischen Daten ergaben Hinweise zu dieser Fragestellung. Zunächst bewiesen diese Daten eine Beteiligung des SGLT1 an der Glukoseaufnahme. Der im direkten Anschluss an die mukosale Glukosezugabe stattfindende, hochsignifikante Anstieg des Kurzschlussstromes resultierte aus dem zeitgleich mit der Glukoseaufnahme stattfindenden Na^+ -Einstrom in die Epithelzelle. Dieser Ladungstransport führte in dieser Versuchseinstellung zu einem Anstieg des Kurzschlussstromes um etwa $15 \text{ nEq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ und ermöglichte somit eine Schätzung der in das Epithel aufgenommenen Glukosemenge. Da $1 \text{ nEq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ einem Nanomol Natriumionen entspricht und der SGLT1 zwei Natriumionen mit einem Glukosemolekül befördert, ergab sich rein rechnerisch, dass der SGLT1 nach Zugabe von 10 mM Glukose auf der mukosalen Seite etwa 7,5 nmol Glukose pro cm^2 und Minute transportierte. Da die Hemmwirkung des Phlorizins deutlich größer ausfiel (Abb. 2), konnte davon ausgegangen werden, dass diese Wirkung nicht allein auf einer Inaktivierung des SGLT1 beruhte.

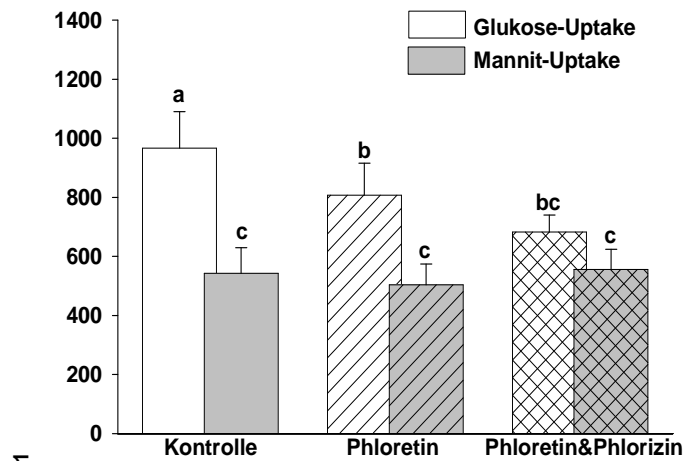
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dieser Versuchsserie sowohl die Beteiligung des SGLT1 als auch eines apikalen GLUT an der Glukoseaufnahme in das proximale Jejunum des Schweins nachgewiesen werden konnte.

Allerdings stellte sich ein Großteil der Glukoseaufnahme in das Epithel phlorizin- und phloretininsensitiv dar. Aus diesem Grund sollte in der folgenden Versuchsserie die mögliche Beteiligung der Endozytose bzw. Endozytose-assoziiierter Vorgänge an der Glukoseaufnahme untersucht werden.

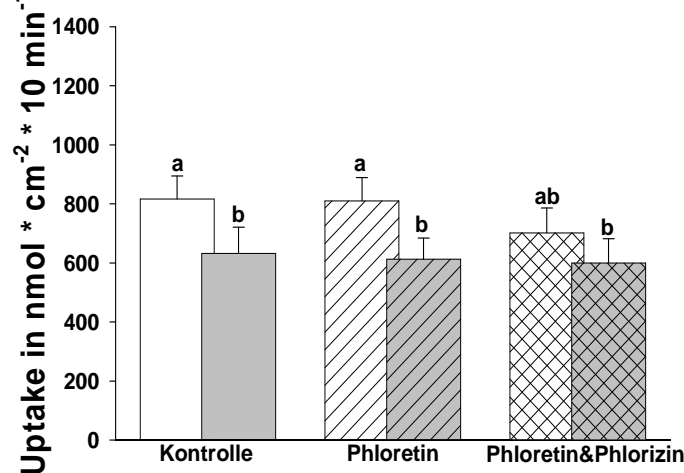
4.1.2 Die Bedeutung der Endozytose bei der Glukose- bzw. Mannitaufnahme in das Epithel

Um die Beteiligung Endozytose-assoziiierter Vorgänge zu untersuchen, kamen zwei verschiedene Hemmstoffe der Endozytose zum Einsatz. Das waren Chlorpromazin, ein Hemmstoff der Clathrin-vermittelten Endozytose, sowie N-Ethylmaleimid. Es wurden die Glukose- und die Mannitaufnahmen parallel über einen Zeitraum von 10 Minuten gemessen. Abbildung 5 zeigt die Aufnahmeraten von Glukose und Mannit unter den verschiedenen Versuchseinstellungen.

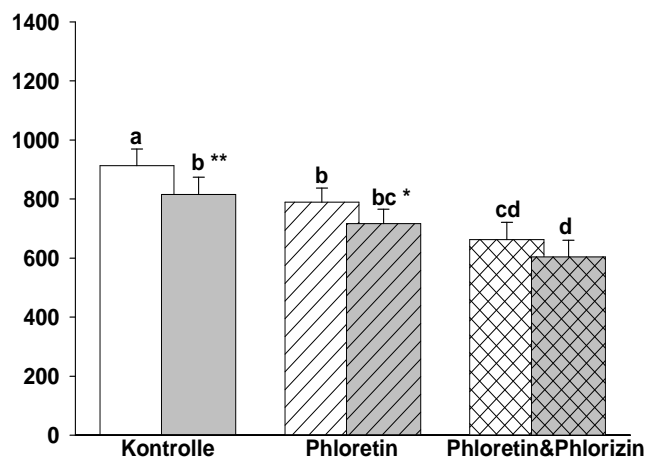
Wurde den Epithelien kein Endozytose-Hemmstoff (Abb. 5, oberstes Diagramm) zugegeben, konnte sowohl durch Phloretin allein als auch durch Phloretin und Phlorizin eine Hemmung der Glukoseaufnahme erreicht werden. Die parallel dazu gemessenen Mannitaufnahmen waren in der Kontrollgruppe und in der Phloretin-Gruppe signifikant niedriger als die entsprechenden Glukoseaufnahmen und unterschieden sich nicht in den einzelnen Behandlungsgruppen. Die Hemmstoffe Phloretin und Phlorizin hatten unter diesen Versuchseinstellungen entsprechend keinen Einfluss auf die Mannitaufnahme.



ohne Endozytose-Hemmstoffe



Chlorpromazin



N-Ethylmaleimid

Abb. 5: Glukose- und Mannitaufnahmen in das Epithel über einen Zeitraum von 10 Minuten in Anwesenheit von Phloretin und Phlorizin sowie 2 verschiedenen Endozytose-Hemmstoffen
 Mukosale Glukosekonzentration 20 mM; Mannitkonzentration 20 mM; Phloretin auf der mukosalen Seite: 1,0 mM; Phlorizin auf der mukosalen Seite: 0,5 mM; N-Ethylmaleimidkonzentration auf beiden Epithelseiten: 1 mM; Chlorpromazinkonzentration auf beiden Epithelseiten: 20 µM; Mittelwerte ± SEM; n = 8, N = 4; Werte mit unterschiedlichen Buchstaben sind im RM ANOVA signifikant voneinander verschieden (p < 0,05); Balken mit ^{**} sind signifikant verschieden (p < 0,05/0,01) zu den entsprechenden Balken im obersten Diagramm.

Wurden den Epithelien bereits 15 Minuten vor Beginn der Uptake-Messung auf beiden Epithelseiten Chlorpromazin zugesetzt, waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Glukoseaufnahmeraten zu messen. Auch die dazugehörigen Mannitaufnahmen zeigten keinerlei Veränderungen in Anwesenheit der GLUT- und SGLT1-Hemmstoffe (Abb. 5). Chlorpromazin schien somit die GLUT-abhängige Glukoseaufnahme zu hemmen. Ob Chlorpromazin auch die SGLT1-abhängige Glukoseaufnahme beeinflusste, ist aus Abb. 5 zunächst nicht ersichtlich. Hierzu soll an späterer Stelle die Analyse der elektrophysiologischen Daten (Abb. 7) Erkenntnisse liefern.

Wurden die Epithelien vor der Uptake-Messung beidseitig 15 Minuten mit N-Ethylmaleimid (NEM) inkubiert, erfolgte sowohl unter Phloretin allein als auch unter Phloretin und Phlorizin eine signifikante Hemmung der Glukoseaufnahme. Allerdings war auch die Mannitaufnahme durch Phloretin und Phlorizin hemmbar (Abb. 5).

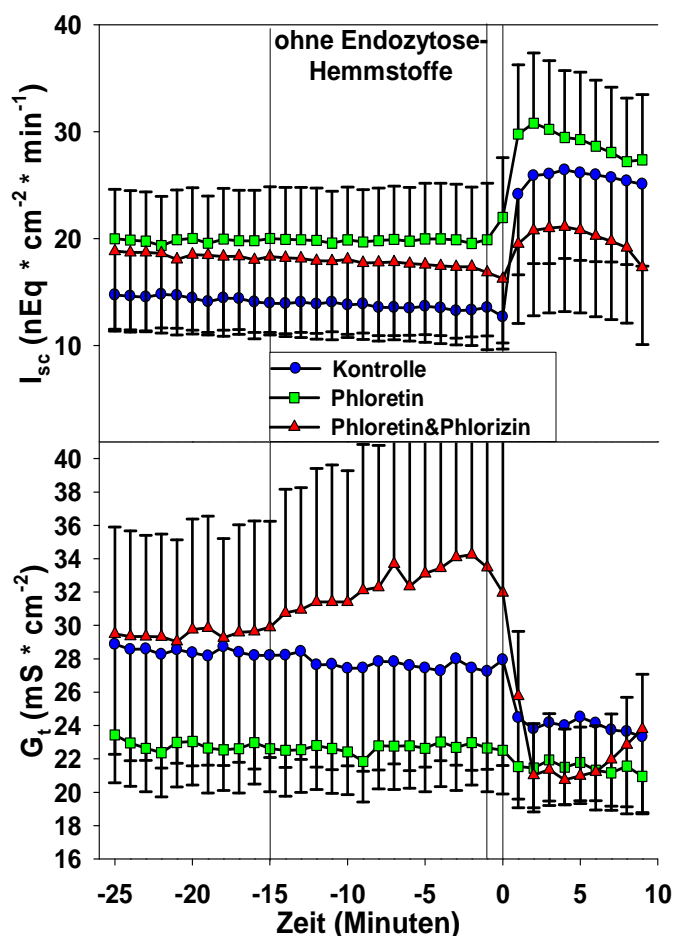


Abb. 6: Darstellung der Kurzschlussströme und der Gewebeleitfähigkeiten der Gruppe ohne Endozytose-Hemmstoffe gegen die Zeit: beidseitige Zugabe von 15 μ l Ethanol zum Zeitpunkt $t = -15$; mukosale Zugabe von 112,5 μ l Ethanol, 1 mM Phloretin und 37,5 μ l Ethanol oder 1 mM Phloretin und 0,5 mM Phlorizin zum Zeitpunkt $t = -1$; mukosale Zugabe von 20 mM Glukose zum Zeitpunkt $t = 0$; Phloretin und Phloretin/Phlorizin: $n = 8$, $N = 4$; Kontrolle: $n = 7$, $N = 4$; Darstellung der Statistik erfolgt im Text

Die elektrophysiologischen Daten der Epithelien aus der Gruppe ohne Endozytose-Hemmstoffe sind in Abb. 6 dargestellt. Nach der beidseitigen Zugabe des Ethanols zur Pufferlösung zum Zeitpunkt $t = -15$ erfolgte in keiner der 3 Versuchsgruppen eine signifikante Änderung des Kurzschlussstroms oder der Gewebeleitfähigkeit. Die Glukosezugabe zu Beginn der Uptake-Messung ($t = 0$) führte in der Phloretin-Gruppe zu einem signifikanten, in den anderen beiden Gruppen zu tendenziellen Anstiegen des Kurzschlussstromes. Die Gewebeleitfähigkeit schien nach der Glukosezugabe sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Phloretin/Phlorizin-Gruppe abzufallen. Dieser Effekt war allerdings in keiner der beiden Gruppen statistisch abzusichern.

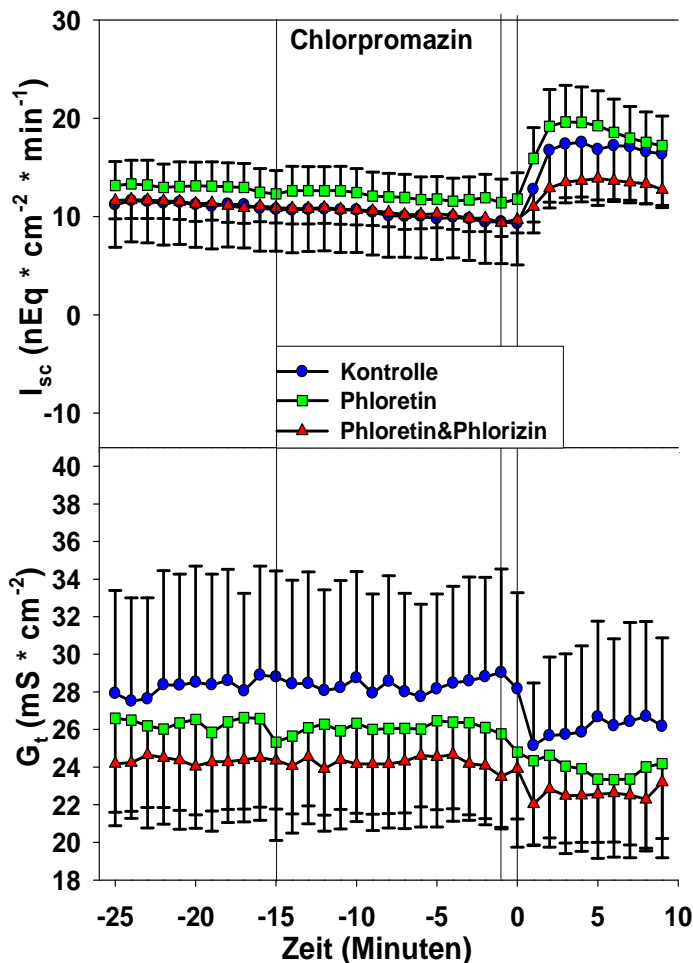


Abb. 7: Darstellung der Kurzschlussströme und der Gewebeleitfähigkeiten der Chlorpromazingruppe gegen die Zeit:

Beidseitige Zugabe von $15 \mu\text{l}$ Chlorpromazin zum Zeitpunkt $t = -15$; mukosale Zugabe von $112,5 \mu\text{l}$ Ethanol, 1 mM Phloretin und $37,5 \mu\text{l}$ Ethanol oder 1 mM Phloretin und $0,5 \text{ mM}$ Phlorizin zum Zeitpunkt $t = -1$; mukosale Zugabe von 20 mM Glukose zum Zeitpunkt $t = 0$;

$n = 8, N = 4$

Darstellung der Statistik erfolgt im Text

Die Epithelien der Chlorpromazin-Gruppe erfuhren nach der Zugabe des Chlorpromazins zum Zeitpunkt $t = -15$ zunächst keine Änderung der Kurzschlussströme und der Gewebeleitfähigkeiten (Abb. 7). Nach Zugabe der radioaktiv markierten Glukose auf der mukosalen Seite zum Zeitpunkt $t = 0$ erfolgte sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Phloretin- und Phloretin/Phlorizin-Gruppe ein signifikanter Anstieg des Kurzschlussstromes. Die Gewebeleitfähigkeiten wiesen keine Veränderungen auf.

Nach mukosaler und serosaler Zugabe des NEM kam es in allen 3 Gruppen zu einem signifikanten Anstieg des Kurzschlussstromes, der nach etwa 5 Minuten seinen Höhepunkt erreichte und anschließend unter das Ausgangsniveau abfiel (Abb. 8).

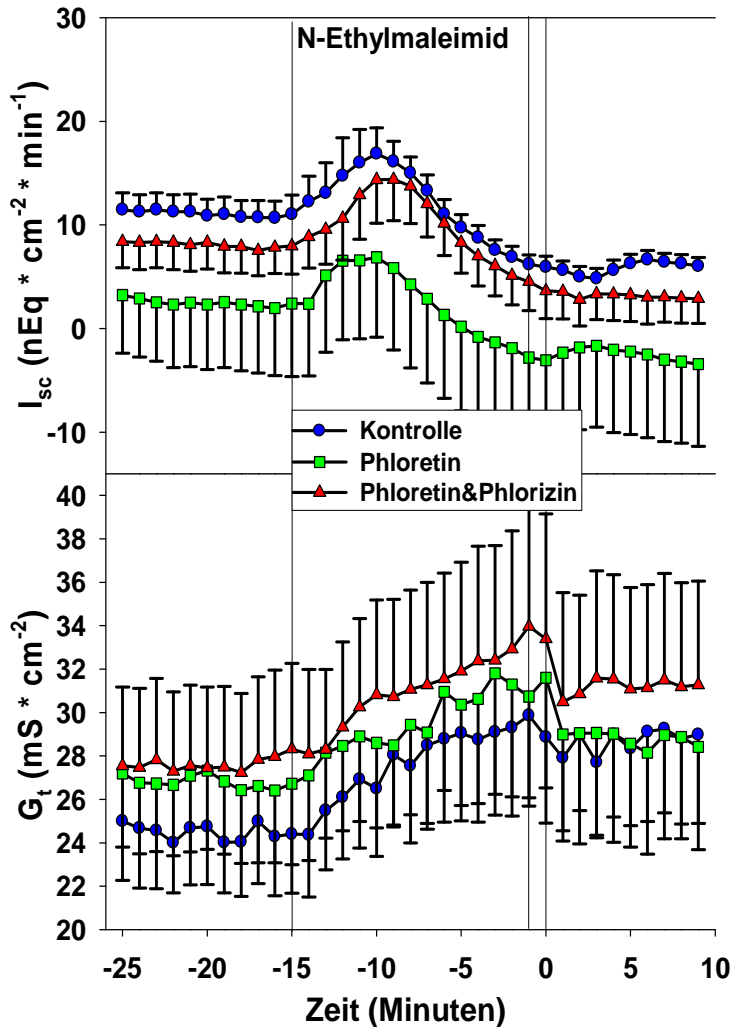


Abb. 8: Darstellung der Kurzschlussströme und der Gewebeleitfähigkeiten der N-Ethylmaleimidgruppe gegen die Zeit:

Beidseitige Zugabe von 15 μl N-Ethylmaleimid zum Zeitpunkt $t = -15$; mukosale Zugabe von 112,5 μl Ethanol, 1 mM Phloretin und 37,5 μl Ethanol oder 1 mM Phloretin und 0,5 mM Phlorizin zum Zeitpunkt $t = -1$; mukosale Zugabe von 20 mM Glukose zum Zeitpunkt $t = 0$;

$n = 8, N = 4$

Darstellung der Statistik erfolgt im Text

Nach der anschließenden mukosalen Glukosezugabe erfolgte in keiner der drei Gruppen ein Anstieg des I_{sc} . Die Gewebeleitfähigkeiten wurden weder durch die Zugabe von NEM noch von Glukose beeinflusst. Zwar schien nach Zugabe des NEM die G_t tendenziell anzusteigen, allerdings war dieser Anstieg statistisch nicht nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der nicht durch Phloretin und Phlorizin hemmbare Anteil der Glukoseaufnahme (rechte Säulen in Abb. 5) durch Chlorpromazin und N-Ethylmaleimid nicht beeinflusst werden konnte. Folglich konnte mit dieser Versuchsserie eine Endozytose als Ursache des phloretin- und phlorizininsensitiven Uptakes nicht nachgewiesen werden.

Der Endozytose-Hemmstoff Chlorpromazin senkte jedoch den Glukose-Uptake in der Abwesenheit von Phloretin und Phlorizin auf ein Niveau, das nicht verschieden war von dem in Anwesenheit von Phloretin und Phlorizin. Der transportvermittelte Uptake schien somit weitgehend zum Erliegen zu kommen. Anhand der Kurzschlussstromanstiege nach Glukosezusatz lässt sich allerdings vermuten, dass der SGLT1 zumindest teilweise noch aktiv war. Ein Absinken des Glukose-Uptakes könnte somit auf eine verminderte Aktivität des GLUT2 zurückzuführen sein.

N-Ethylmaleimid führte ungewöhnlicherweise zum Auftreten eines phloretin- und phlorizininsensitiven Mannit-Uptake. Der glukoseinduzierte Kurzschlussstrom war dabei jedoch völlig ausgelöscht, was darauf hindeutet, dass über den SGLT1 kein Na^+ -gekoppelter Glukosetransport mehr realisiert wurde.

4.1.3 Zeitabhängigkeit der Glukoseaufnahme und deren Vergleich mit der Mannitaufnahme

Ziel dieser Versuchsserie war es, die Zeitabhängigkeit der Glukoseaufnahme in das Epithel zu untersuchen. Dafür wurde die Glukoseaufnahme in das Epithel über einen Zeitraum von 20 Minuten untersucht. Bei einer Glukosekonzentration von 20 mM wurde die Glukoseaufnahme zum einen unter Kontrollbedingungen und zum anderen unter Ausschaltung der bekannten Transportmechanismen durch Phlorizin und Phloretin bestimmt. Zusätzlich wurden kurz vor Beendigung der Uptake-Messungen aus der serosalen Säule der Ussing-Kammer-Apparatur Pufferproben entnommen. Auch diese wurden auf die Anwesenheit radioaktiver Glukose untersucht. Somit konnte der Glukose-Flux über das Epithel bestimmt werden. Unter Ausschaltung der bekannten Transportmechanismen durch Phloretin und Phlorizin wurde zusätzlich auch die Aufnahme von Mannit mit ^3H -markiertem Mannit bestimmt. Da Mannit der Literatur entsprechend nicht in die Zellen aufgenommen werden soll, gilt es als Marker für den parazellulären Transport (HAYDEN u. CAREY 2000; KIERBEL et al. 2000). Auch für Mannit wurde der Flux über das Epithel mittels einer Probennahme aus der serosalen Pufferlösung bestimmt.

Abb. 9 zeigt die Glukose- und Mannitaufnahme kumuliert über einen Zeitraum von 20 Minuten. Die oberste Kurve stellt die Glukoseaufnahme unter Kontrollbedingungen dar. Ein signifikanter Anstieg der Glukoseaufnahme zum vorhergehenden Messwert erfolgte nach 3, 5 und 20 Minuten. Die zweite Kurve zeigt die Glukoseaufnahme in Anwesenheit des SGLT1-Hemmstoffes Phlorizin und des GLUT-Hemmstoffes Phloretin. Die Glukoseaufnahme war unter Ausschaltung der phlorizin- und phloretinhemmbaren Transportmechanismen über den gesamten Zeitraum signifikant niedriger als unter Kontrollbedingungen ($p < 0,05$), mit Ausnahme des Wertes nach 15 Minuten ($p = 0,197$). Ein signifikanter Anstieg des Uptakes zum vorhergehenden Messwert war nach 1, 3, 5, 7, 15 und 20 Minuten feststellbar.

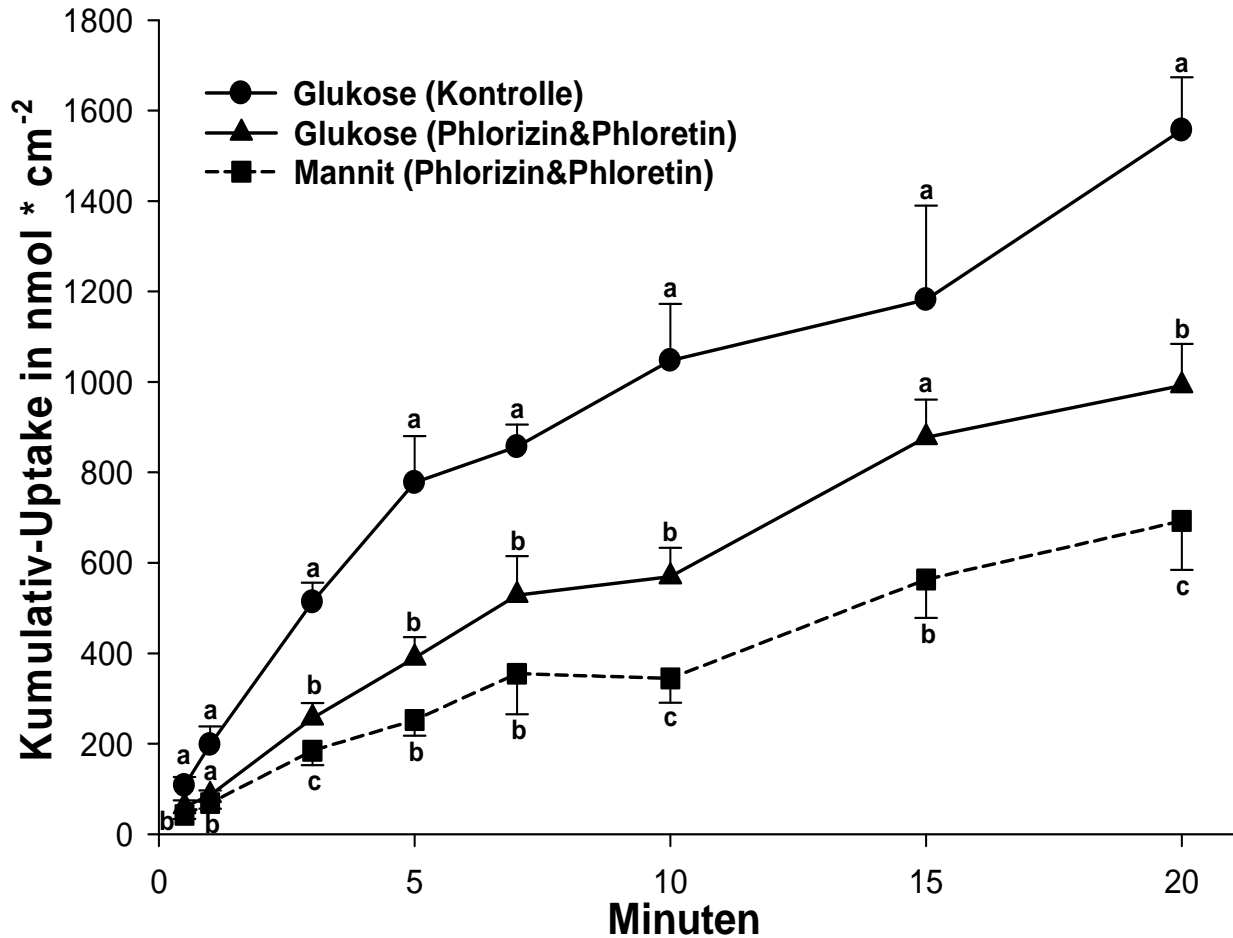


Abb. 9: Glukoseaufnahme über 20 Minuten unter Kontrollbedingungen sowie Glukose- und Mannitaufnahme in Anwesenheit von Phlorizin und Phloretin: Mittelwerte mit SEM; $n = 8$, $N = 8$; mukosale Glukosekonzentration: 20 mM; mukosale Mannitkonzentration: 20 mM; mukosale Phlorizinkonzentration: 0,5 mM; mukosale Phloretinkonzentration: 0,5 mM; ^{a,b,c} $p < 0,05$ zu anderen Messwerten des gleichen Zeitpunktes

Die dritte bzw. unterste Kurve in Abb. 9 zeigt die Mannitaufnahme in das Epithel in Anwesenheit der beiden Hemmstoffe Phloretin und Phlorizin. Die Mannitaufnahme war zu allen Zeitpunkten signifikant niedriger als die Glukoseaufnahme unter Kontrollbedingungen ($p < 0,05$) und nach 1, 3, 10, 15 und 20 Minuten war sie auch signifikant niedriger als die Glukoseaufnahme unter identischen Bedingungen ($p < 0,05$).

In Abb. 10 ist dargestellt, wann und in welchem Umfang sowohl die radioaktiv markierte Glukose als auch das radioaktiv markierte Mannit in der Pufferlösung auf der serosalen Seite des Epithels erschienen. Dieses Erscheinen (Appearance) repräsentiert den Flux der Substanzen über das Epithel.

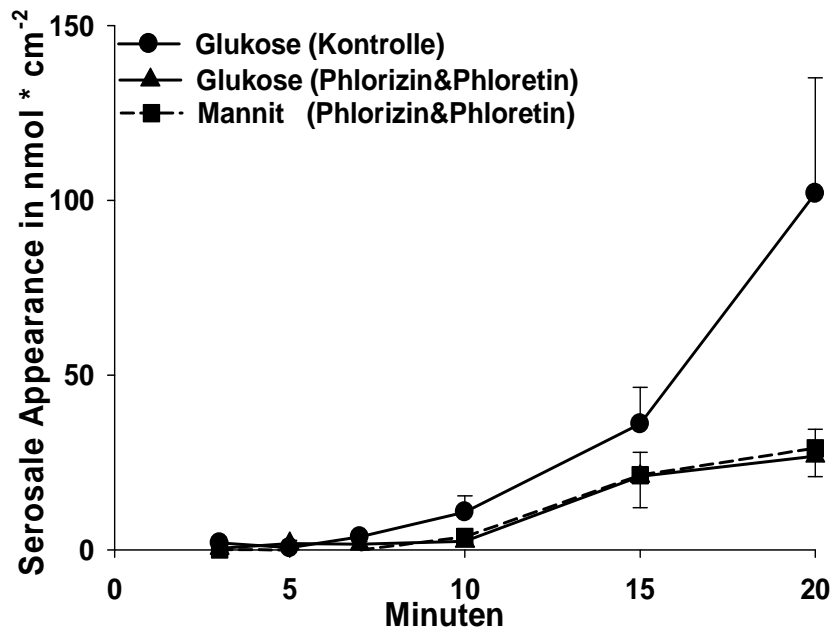


Abb. 10: Das Erscheinen von Glukose und Mannit auf der serosalen Seite:

Mittelwerte mit SEM; $n = 8$, $N = 8$; mukosale Glukosekonzentration: 20 mM; mukosale Mannitkonzentration: 20 mM; mukosale Phlorizinkonzentration: 0,5 mM; mukosale Phloretinkonzentration: 0,5 mM; die Darstellung der Statistik erfolgt im Text

Nach Zugabe der Glukose auf der mukosalen Seite war unter Kontrollbedingungen ab der 7. Minute Glukose auf der serosalen Seite nachweisbar ($p < 0,05$ vs. 0). In Anwesenheit der Hemmstoffe Phloretin und Phlorizin war das ab der 15. Minute der Fall. Der Mannit-Flux stellte sich ab der 10. Minute signifikant verschieden von null dar ($p < 0,05$). Bis zur Minute 15 nach Zugabe der radioaktiv markierten Glukose auf der mukosalen Seite ließen sich keine Unterschiede in den Mannit- und Glukose-Fluxen zwischen den Gruppen erkennen. Erst 20 Minuten nach Zugabe der radioaktiven Substanzen zeigte sich der Glukose-Flux unter Kontrollbedingungen signifikant höher als die Glukose- und Mannit-Fluxe in Anwesenheit von Phlorizin und Phloretin.

Die elektrophysiologischen Daten sind in Abb. 11 dargestellt. Sowohl in Anwesenheit der Hemmstoffe Phloretin und Phlorizin als auch ohne Hemmstoffe kam es nach Glukosezugabe zu einem signifikanten Anstieg der Kurzschlussströme. Allerdings war der Kurzschlussstromanstieg in Abwesenheit der Hemmstoffe etwa 6-fach höher als in Anwesenheit der Hemmstoffe. Somit konnte die Hemmung des SGLT1 durch Phlorizin als ausreichend gewertet werden. Die Gewebeleitfähigkeit veränderte sich nur in Anwesenheit der Hemmstoffe nach Zugabe der Glukose signifikant (Statistik ist in Abb. 11 nicht dargestellt). So kam es zu einem leichten Abfall der Gewebeleitfähigkeit. Unter Kontrollbedingungen konnte keine signifikante Änderung der Gewebeleitfähigkeit festgestellt werden, obwohl der G_T -Verlauf prinzipiell ähnlich dem Verlauf in Anwesenheit der Hemmstoffe war.

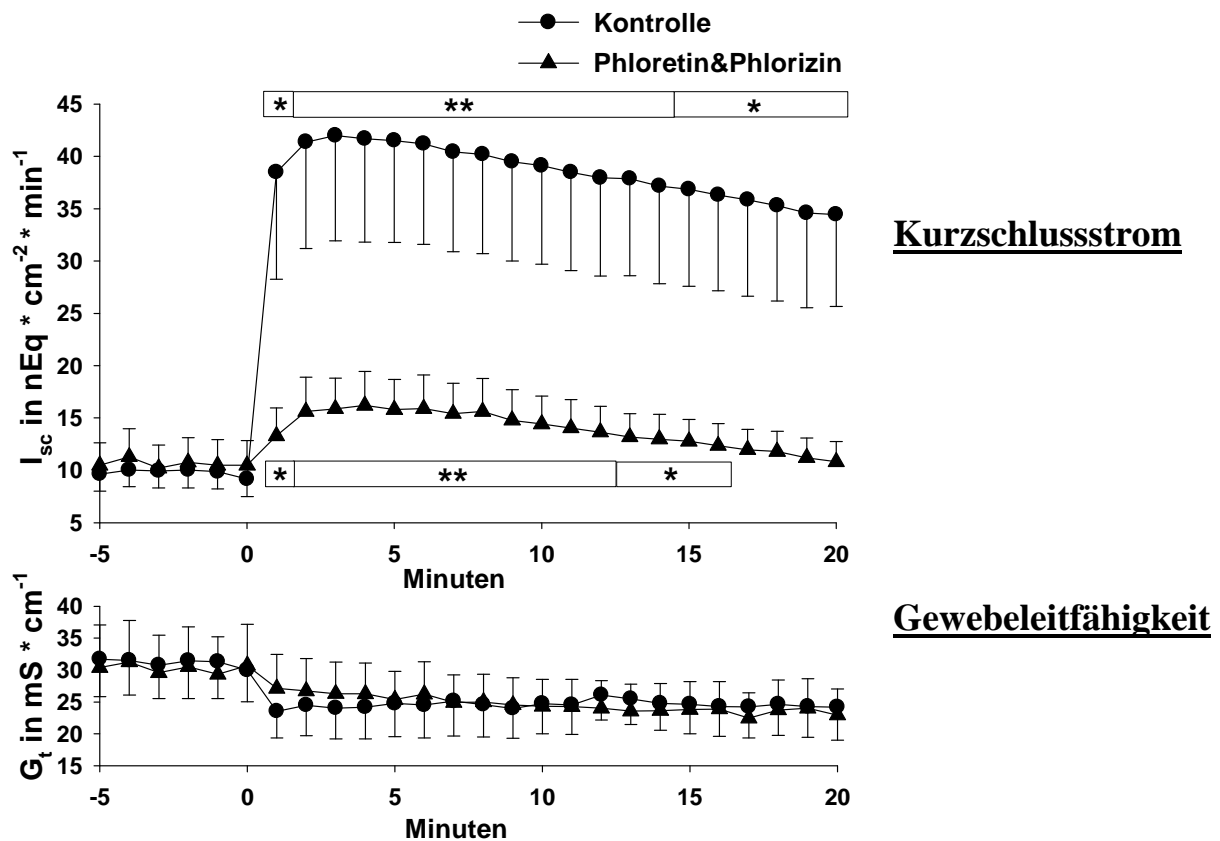


Abb. 11: Kurzschlussstrom und Gewebeleitfähigkeiten

Mittelwerte mit SEM; $n = 8$, $N = 8$; mukosale Zugabe von 0,5 mM Phlorizin & 0,5 mM Phloretin bzw. Ethanol (Kontrolle) zum Zeitpunkt $t = -1$, mukosale Zugabe von 20 mM Glukose zum Zeitpunkt $t = 0$; * $p < 0,05$ vs. $t = 0$, ** $p < 0,01$ vs. $t = 0$; die Darstellung der Statistik der Gewebeleitfähigkeit erfolgt im Text

Die Ergebnisse dieser Versuchsserie zeigen, dass die Glukoseaufnahme und die Mannitaufnahme unter Ausschaltung der bisher bekannten Glukosetransportproteine nicht identisch waren. Die Glukose- und Mannitaufnahmen standen über den gesamten Beobachtungszeitraum von 20 Minuten konstant in einem Verhältnis von etwa 1:0,65 zueinander. Dieses Verhältnis spiegelte sich allerdings im Flux der beiden Substanzen nicht wieder. Hier betrug das Verhältnis annähernd 1:1, d.h. es erschien in Anwesenheit von Phloretin und Phlorizin genauso viel Glukose wie Mannit auf der serosalen Seite des Epithels. Geht man davon aus, dass das 1:1-Erscheinen von Glukose und Mannit auf der serosalen Seite einen parazellulären Transport repräsentiert, könnte die 1:0,65-gekoppelte Aufnahme von Glukose und Mannit für eine von der parazellulären Permeation weitgehend unabhängige epitheliale Aufnahme von Glukose und Mannit sprechen. Aus der Annahme heraus, dass der Mechanismus, mit dem Glukose und Mannit, wenn auch mit unterschiedlicher Affinität, in das Epithel transportiert werden, identisch ist, wurden in der folgenden Versuchsserie verschiedene Substanzen in hohen Konzentrationen eingesetzt, um zu eruieren, ob diese einen Einfluss auf diesen Mechanismus besitzen.

4.1.4 Einfluss verschiedener Substanzen in hohen Konzentrationen auf die nicht SGLT1- und GLUT-vermittelte Glukose- und Mannitaufnahme

Ziel dieser Versuchsserie war es zunächst zu überprüfen, ob der nicht durch Phloretin und Phlorizin hemmbare Anteil der Glukose- und Mannitaufnahme durch andere Kohlenhydrate und Kohlenhydratderivate prinzipiell modulierbar ist. Hintergrund dieses Versuchsansatzes

war die Theorie, dass bisher nicht bekannte Transportproteine oder Kanäle an der Aufnahme der Glukose und des Mannits beteiligt sein könnten. Würden nun diese Proteine neben Glukose und Mannit mit hohen Konzentrationen anderer Kohlenhydrate konfrontiert, so könnte es unter Umständen zu einer Verdrängung dieser beiden Substrate und somit zu einer Verschiebung des Aufnahmeverhältnisses zwischen Glukose und Mannit oder zu einer Veränderung der Aufnahmeraten kommen.

Dafür wurden zunächst alle Epithelien in einer laktathaltigen aber glukosefreien Pufferlösung in der Ussing-Kammer vorinkubiert. Zu Beginn der Uptake-Messung wurde die Pufferlösung auf der mukosalen Seite durch eine andere Pufferlösung, die sogenannte Uptake-Pufferlösung, ersetzt. Diese enthielt 20 mM Mannit und 20 mM Glukose mit den entsprechenden radioaktiv markierten Substraten, sowie Phloretin und Phlorizin zur Hemmung der transporter-vermittelten Glukoseaufnahme. Außerdem enthielt die Pufferlösung eine Aminosäure, einen Zucker oder ein Zuckerderivat in einer sehr hohen Konzentration (100 mM). Zum Einsatz kamen DL-Serin, N-Acetyl-D-Glukosamin als ein Zuckerderivat, D-Mannose als ein Monosaccharid, D-Cellobiose als ein Disaccharid, D-Sorbitol als Alkohol eines Monosaccharids und D-Raffinose als ein Trisaccharid. Von diesen Substraten ist lediglich D-Mannose ein bekanntes Substrat für Glukosetransportproteine und wird über den GLUT2 in die jejunale Zelle aufgenommen (HALAIHEL et al. 1999). Bei der Auswahl dieser Substrate wurde auch darauf geachtet, dass diese nach bisherigem Kenntnisstand nicht mit dem Zellstoffwechsel interferieren, also entweder nicht in die Zellen aufgenommen werden können oder nach Aufnahme nicht oder nur in geringem Maße metabolisiert werden. Damit sollten sekundäre metabolische Effekte möglichst ausgeschlossen bzw. minimiert werden.

Um osmotische Effekte auszuschließen, wies die Uptake-Pufferlösung (9.1.3b) auf der mukosalen Seite dieselbe Osmolarität auf wie die Pufferlösung auf der serosalen Seite (9.1.3a). Mit dem Austausch der Pufferlösung auf der mukosalen Seite begann die Messung der Glukose- und Mannitaufnahme in das Epithel. Diese Messung erfolgte über einen Zeitraum von 20 Minuten. Auch in dieser Versuchsserie wurde 20 Sekunden vor Beendigung der Substrataufnahmemessung der serosalen Seite eine Pufferprobe entnommen, um den Flux von Glukose und Mannit über das Epithel zu ermitteln.

Abb. 12 zeigt die Glukose- bzw. Mannitaufnahme in das Epithel in Anwesenheit der 6 oben genannten Substanzen.

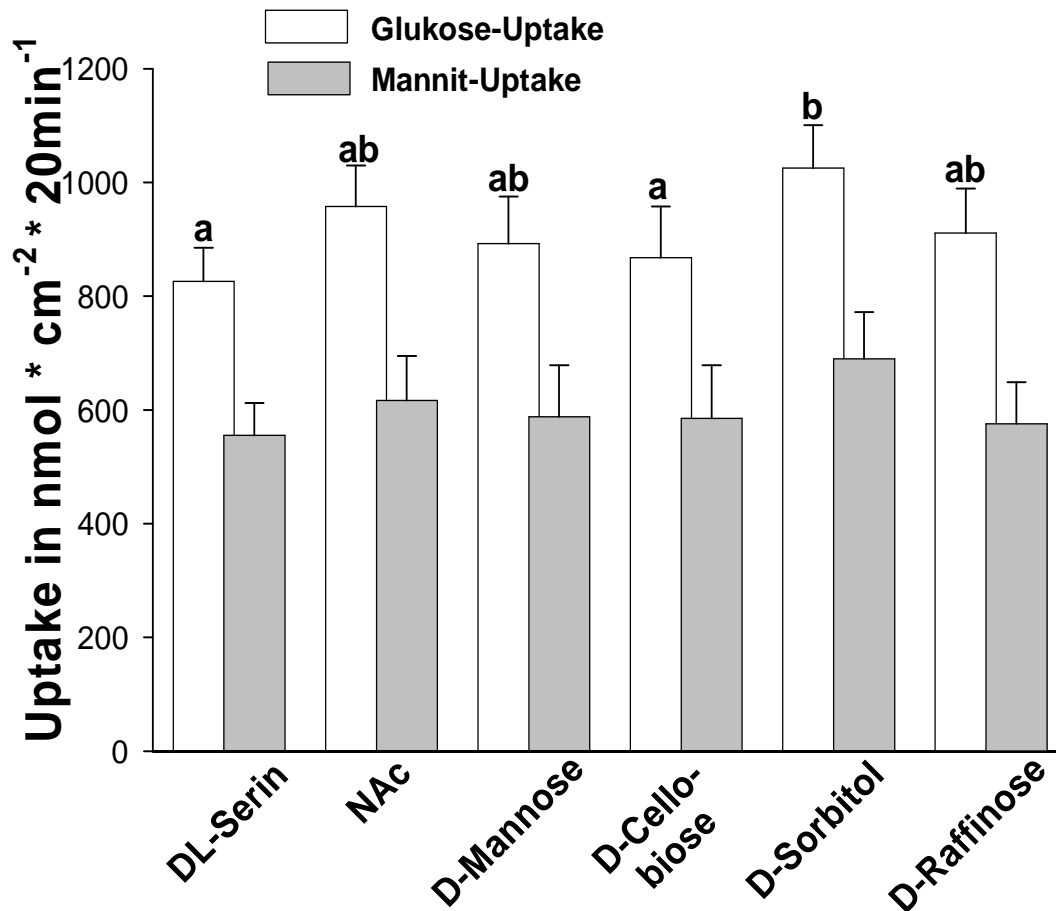


Abb. 12: Glukose- und Mannitaufnahme in das Epithel über einen Zeitraum von 20 Minuten in Anwesenheit von DL-Serin, N-Acetyl-D-Glukosamin(NAc), D-Mannose, D-Cellobiose, D-Sorbitol oder D-Raffinose (jeweils 100 mM) Glukosekonzentration 20 mM; Mannitkonzentration 20 mM; Phloretin und Phlorizin auf der mukosalen Seite: jeweils 0,5 mM; Mittelwerte \pm SEM; $n = 16$, $N = 8$; Werte mit unterschiedlichen Buchstaben sind im RM ANOVA signifikant voneinander verschieden ($p < 0,05$). Im Mannit-Uptake bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Ein signifikanter Unterschied in der Glukoseaufnahme bestand zwischen der Serin- und Sorbitolgruppe sowie der Cellobiose- und Sorbitolgruppe. Zwischen den einzelnen Mannitaufnahmen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Beim Vergleich der Glukose- mit den Mannitaufnahmen fiel auf, dass in dieser Versuchseinstellung das Verhältnis zwischen Glukose- und Mannitaufnahme wiederum ca. 1:0,65 betrug (vgl. Kap. 4.1.3). Dieses Verhältnis blieb auch in Anwesenheit der verschiedenen Substrate annähernd konstant.

Die Glukose- und Mannit-Fluxe über das Epithel sind in Abb. 13 dargestellt.

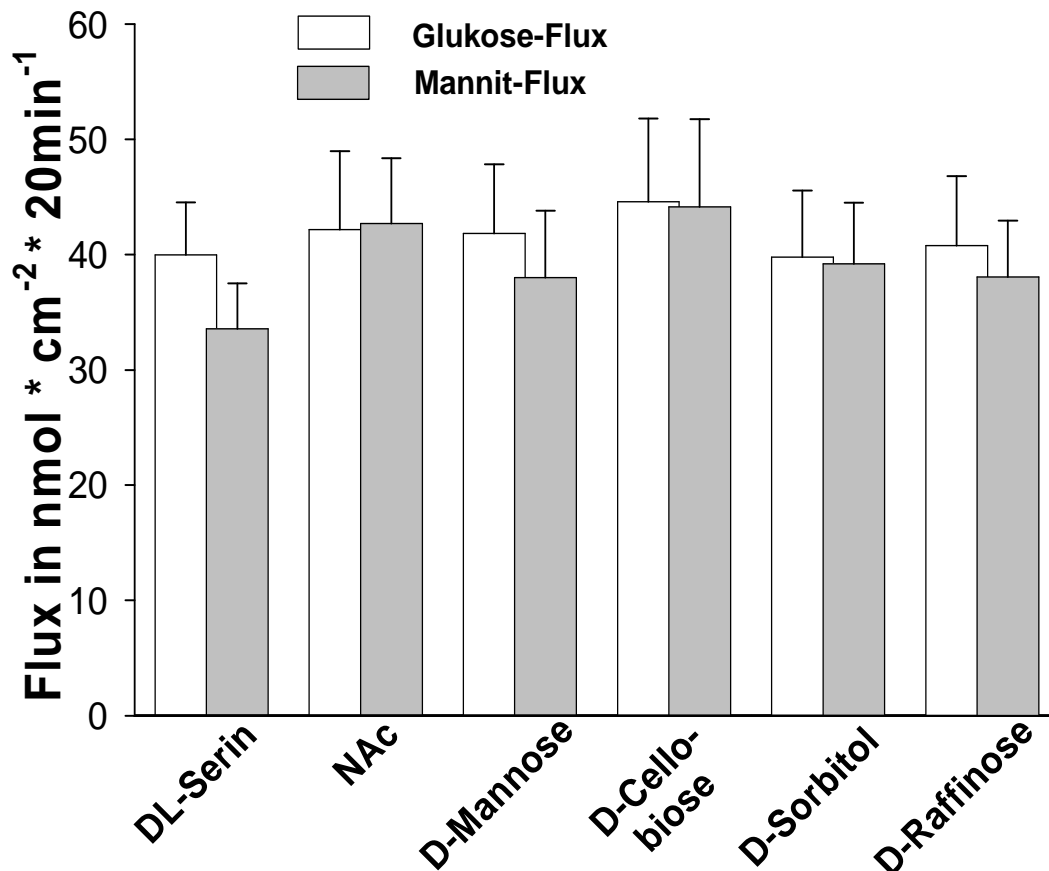


Abb. 13: Glukose- und Mannit-Flux durch das Epithel über einen Zeitraum von 20 Minuten in Anwesenheit von DL-Serin, N-Acetyl-D-Glukosamin(NAc), D-Mannose, D-Cellobiose, D-Sorbitol oder D-Raffinose (jeweils 100 mM) auf der mukosalen Seite

Glukosekonzentration 20 mM; Mannitkonzentration 20 mM; Phloretin und Phlorizin auf der mukosalen Seite: jeweils 0,5 mM; Mittelwerte \pm SEM; n = 16, N = 8; Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Weder bei den Glukose-Fluxen noch bei den Mannit-Fluxen stellten sich zwischen den einzelnen Gruppen signifikante Unterschiede dar. Die jeweiligen Mannit- und Glukose-Fluxe unterschieden sich kaum voneinander. Stellte man die Mannit-Fluxe den Glukose-Fluxen gegenüber, entstand ein Verhältnis von annähernd 1:1 (vgl. Kap. 4.1.3).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die Glukose als auch das Mannit nur zu einem geringen Teil das Epithel durchtraten und auf der serosalen Seite erschienen. Im Fall der Glukose betrug der Anteil der auf der serosalen Seite erschienenen Glukose 4 bis 5 % der aufgenommenen Glukose. Beim Mannit betrug dieser Anteil 6 bis 8 %. Daraus lässt sich schließen, dass ein großer Anteil der aufgenommenen Substrate im Epithel angereichert wurde.

Nun stellte sich die Frage, ob es sich bei der Akkumulation der Substrate im Epithel um eine intrazelluläre Aufnahme handelte oder eine rein parazelluläre Anreicherung erfolgte. Außerdem war zu hinterfragen ob der Flux über das Epithel auf transzellulären oder parazellulären Weg erfolgte. Um dies zu ergründen wurden die Gewebeleitfähigkeiten den

einzelnen Werten des Uptakes und des Fluxes in zwei Grafiken gegenübergestellt und deren Korrelation geprüft.

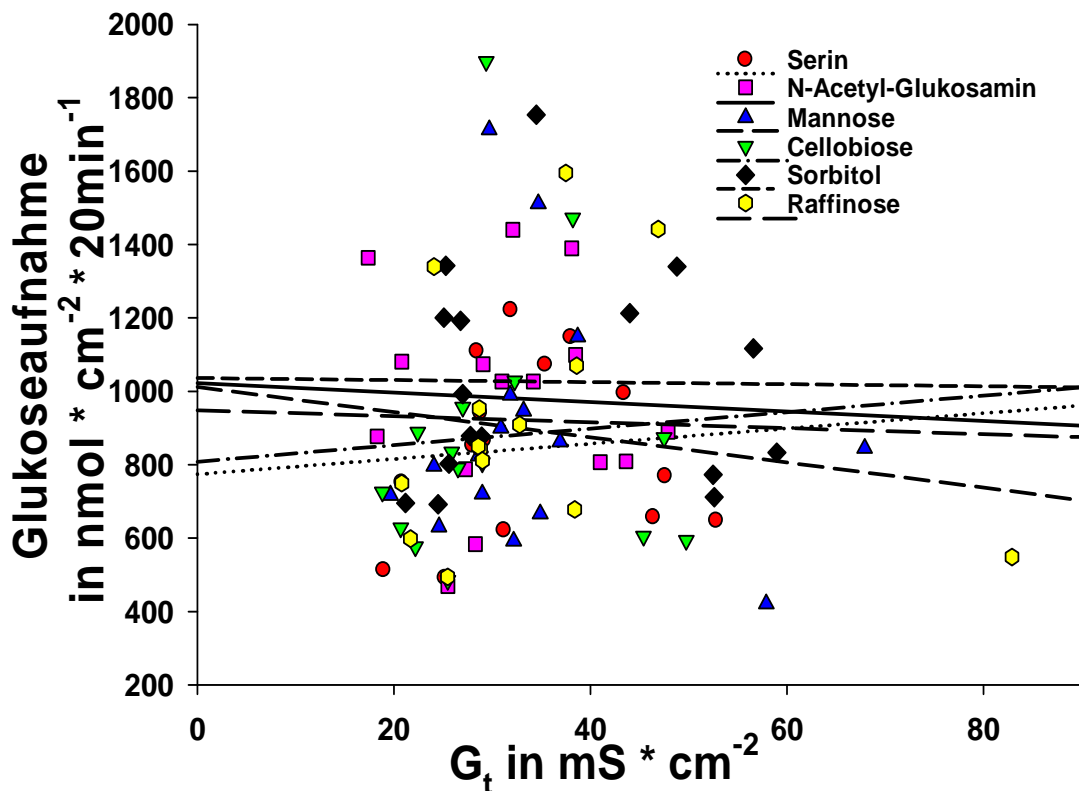


Abb. 14: Fehlende Korrelation zwischen Glukoseaufnahme und Gewebeleitfähigkeit

Die Abbildung zeigt die einzelnen Glukoseaufnahmearten aufgetragen gegen die dazugehörigen Gewebeleitfähigkeiten. Anhand der verschiedenen Werte einer Gruppe wurden Regressionsgeraden erstellt. Die Anstiege der Regressionsgeraden waren nicht signifikant von Null verschieden.

Zunächst sind in Abb. 14 die Beziehungen zwischen den Werten des Glukose-Uptakes und den dazugehörigen Gewebeleitfähigkeiten dargestellt. Anhand der Regressionsgeraden war erkennbar, dass keine Korrelation zwischen der Glukoseaufnahme und der Gewebeleitfähigkeit bestand. Trug man in einer Grafik die Mannit-Uptakes gegen die Gewebeleitfähigkeit auf, so stellte sich die Korrelation ähnlich dar wie bei den Glukoseaufnahmen (Daten nicht gezeigt). Zwischen den Mannitaufnahmen und der Gewebeleitfähigkeit bestanden keine Korrelationen.

Setzte man die Fluxe der Glukose durch das Epithel mit den entsprechenden Gewebeleitfähigkeiten in Beziehung, wurde deutlich, dass zwischen den Glukose-Fluxen und der Gewebeleitfähigkeit bei allen Versuchseinstellungen Korrelationen vorhanden waren (die Korrelationskoeffizienten lagen zwischen 0,53 und 0,75), d.h. mit zunehmender Gewebeleitfähigkeit stieg auch der Glukose-Flux durch das Epithel. Zwischen Mannit-Flux und Gewebeleitfähigkeit stellten sich die Beziehungen identisch dar (Daten nicht gezeigt).

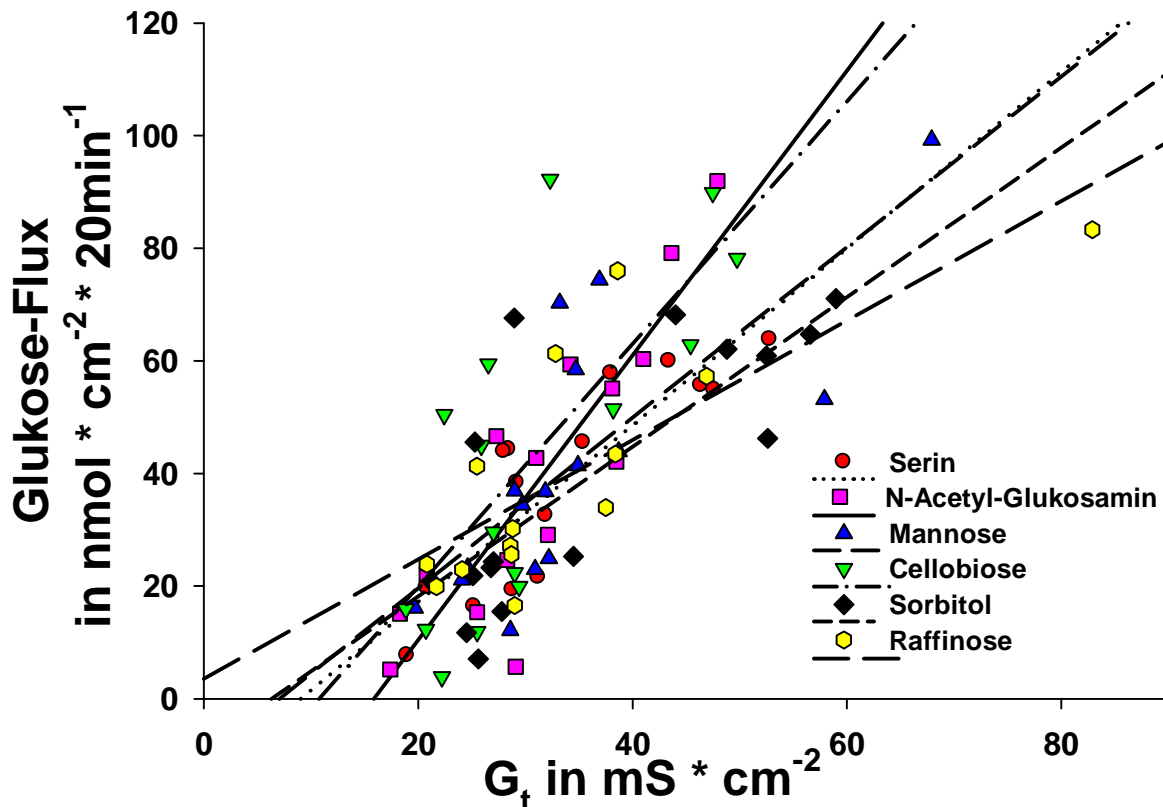


Abb. 15: *Korrelation zwischen Glukose-Flux und Gewebeleitfähigkeit*

Die Abbildung zeigt die einzelnen Glukose-Fluxraten aufgetragen gegen die dazugehörigen Gewebeleitfähigkeiten vor dem Uptake. Anhand der verschiedenen Werte einer Gruppe wurden Regressionsgeraden erstellt. Alle Regressionsgeraden hatten einen signifikant von Null verschiedenen Anstieg ($p < 0,001$).

Die dazugehörigen elektrophysiologischen Daten sind im Anhang (Kap. 9.3.1, Abb. A1 und A2) aufgeführt. Der Abfall des Kurzschlussstromes sowie der Gewebeleitfähigkeit nach dem Wechsel der mukosalen Pufferlösung ist v.a. auf den unterschiedlichen Natriumgehalt in den mukosalen Vorinkubations- und Inkubationspufferlösungen zurückzuführen. So enthält die mukosale Inkubationspufferlösung mit 52 mM nur halb so viel Natrium wie die mukosale Vorinkubationspufferlösung mit 122 mM. Dieser geringere Natriumgehalt auf der mukosalen Epithelseite führt zu einem geringeren Transport von Natrium durch das Epithel und somit zu einem geringeren Kurzschlussstrom und einer geringeren Gewebeleitfähigkeit.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Flux sowohl der Glukose als auch des Mannits bei gehemmtem SGLT1 und GLUT vorwiegend parazellulär erfolgte. Dies lässt sich aus der bestehenden Korrelation zwischen der Gewebeleitfähigkeit und den Fluxraten schlussfolgern. Die Aufnahme der Glukose und des Mannits in das Epithel schien allerdings auf anderen Wegen zu erfolgen und auch eine parazelluläre Anreicherung der Substrate im Epithel konnte nicht nachgewiesen werden. Somit ist davon auszugehen, dass es auch bei gehemmtem SGLT1 und GLUT zu einer deutlichen intrazellulären Anreicherung von Glukose und, in geringerem Maße, von Mannit kam. Diese Anreicherung war durch Serin und Cellobiose hemmbar.

4.2 EINFLUSS DER ZELLULÄREN GLUKOSEKONZENTRATION AUF DIE INTRAEPITHELIALE GLUKOSEAUFNAHME

In vorangegangenen Versuchsserien (vgl. Kap. 4.1.1) konnte festgestellt werden, dass die Glukoseaufnahme über den apikalen GLUT2 *in vitro* in Anwesenheit höherer Glukosekonzentrationen schon nach wenigen Minuten sistiert. Es ist naheliegend zu vermuten, dass dies auf einer intrazellulären Glukoseanreicherung beruht. Entsprechend sollte in den folgenden Versuchseinstellungen untersucht werden, ob eine Modifikation der intrazellulären Glukosekonzentration durch Hemmung des serosalen Efflux von Glukose, der intrazellulären Glykolyse mit folgender Laktatbildung oder der Glukoneogenese einen Einfluss auf den Zeitverlauf der apikalen Glukoseaufnahme haben.

4.2.1 Der Einfluss des serosalen Effluxes und der intrazellulären Verstoffwechslung auf die Glukoseaufnahme

Um die Rolle des Glukoseeffluxes über die basolaterale Membran zu eruieren, wurden alle Epithelien sowohl mukosal als auch serosal glukosefrei vorinkubiert. Als Energiesubstrat für die Epithelien stand in der Pufferlösung Laktat zur Verfügung. Die Glukoseaufnahme wurde jeweils vergleichend in An- und Abwesenheit von Phlorizin auf der mukosalen Seite gemessen, da in den vergangenen Untersuchungen gezeigt wurde, dass Phlorizin sowohl die SGLT1- als auch die GLUT2-vermittelte Aufnahme effektiv hemmt. Phloretin konnte als Hemmstoff des GLUT2 somit exklusiv auf der serosalen Seite eingesetzt werden ohne eine Interferenz von apikal eingesetztem Phloretin an der basolateralen Membran befürchten zu müssen. Die Glukoseaufnahme wurde über einen Zeitraum von 1 oder 3 Minuten gemessen. Die Glukosekonzentration betrug 20 mM. Abbildung 16 zeigt die Glukoseaufnahmeraten in der ersten sowie in der zweiten und dritten Minute nach Zugabe der Glukose. Die Bestimmung der Glukoseaufnahmeraten in der 2. und 3. Minute erfolgte durch die Bildung der Differenz aus der Glukoseaufnahme nach 3 und 1 Minute.

Die elektrophysiologischen Daten sind im Datenanhang (Kap. 9.3.2; Abb. A3 und A4) dargestellt.

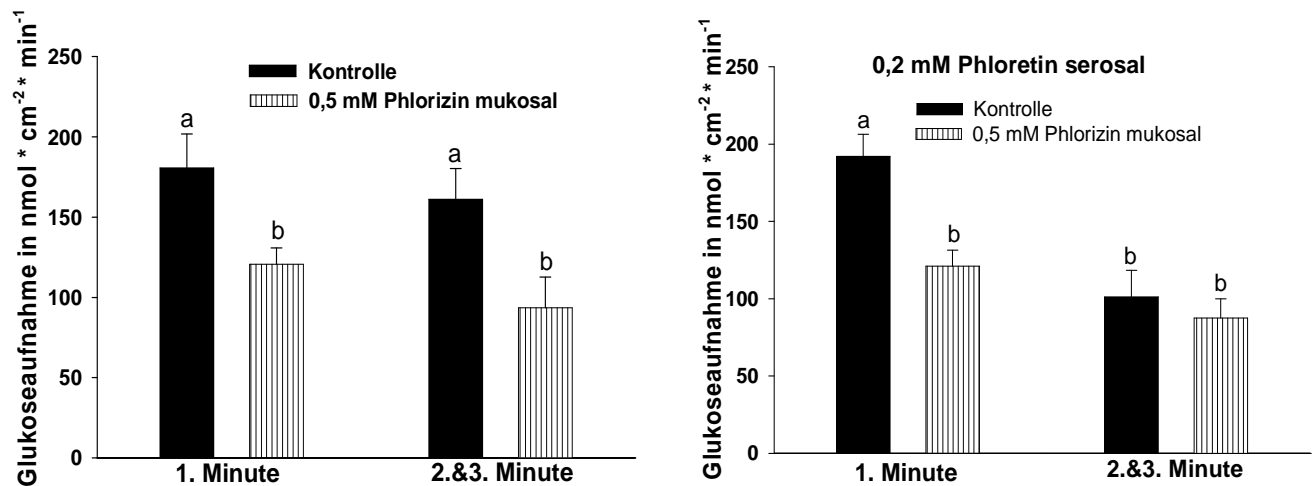


Abb. 16: Glukoseaufnahme 1 bis 3 Minuten nach Glukosezugabe in An- und Abwesenheit von Phloretin auf der serosalen Seite

Messung der Glukoseaufnahme für 1 und 3 Minuten; Durch Bildung der Differenz wurden die Aufnahmeraten in der zweiten und dritten Minute bestimmt.

Mittelwerte mit SEM; $n = 12$, $N = 12$; $^{a,b}p < 0,05$; mukosale Glukosekonzentration: 20 mM; mukosale Phlorizinkonzentration: 0,5 mM; serosale Phloretinkonzentration: 0,2 mM

Bei fehlender Blockierung des basolateralen GLUT2 durch Phloretin konnte sowohl in der ersten als auch in der zweiten und dritten Minute eine phlorizinsensitive Glukoseaufnahme nachgewiesen werden. Auch zwischen den Glukoseaufnahmeraten der unterschiedlichen Zeitabschnitte waren keine Unterschiede messbar. Erfolgte eine Hemmung des basolateralen GLUT2 durch Phloretin serosal, so konnte zunächst in der ersten Minute nach Glukosezugabe kein Unterschied in der Glukoseaufnahme im Vergleich zur Phloretin-freien Inkubation festgestellt werden. Allerdings kam es in der zweiten und dritten Minute zu einer signifikant reduzierten Glukoseaufnahme im Vergleich zur Aufnahme in der ersten Minute. Weiterhin war keine phlorizinsensitive Glukoseaufnahme mehr messbar. Es ist somit davon auszugehen, dass der basolaterale Efflux der Glukose bereits nach ca. 1 Minute limitierend für die apikale Glukoseaufnahme wurde.

Um den Einfluss der intrazellulären Verstoffwechslung auf die Glukoseaufnahme und deren phlorizinsensitiven Anteil zu untersuchen, kam N-Acetyl-D-Glukosamin, ein Hemmstoff der Hexokinase (SUKALSKI u. NORDLIE 1986), in einer Konzentration von 20 mM zum Einsatz. Dieser Hemmstoff verhindert die Phosphorylierung der Glukose in der Zelle, was Voraussetzung für eine weitere Verstoffwechslung ist.

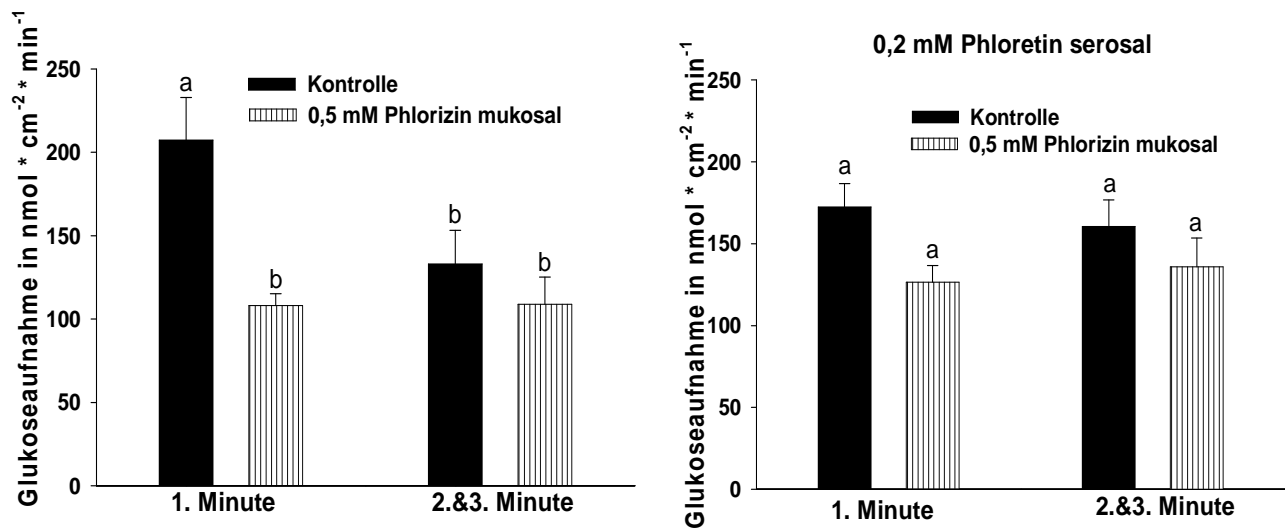


Abb. 17: Einfluss von N-Acetyl-D-Glukosamin in der An- und Abwesenheit von serosalem Phloretin auf die Glukoseaufnahme 1 bis 3 Minuten nach Glukosezugabe Mittelwerte mit SEM; $n = 12$, $N = 12$; $^{a,b}p < 0,05$; mukosale Glukosekonzentration: 20 mM; mukosale Phlorizinkonzentration: 0,5 mM; serosale Phloretinkonzentration: 0,2 mM; Messung der Glukoseaufnahme für 1 und 3 Minuten; Durch Bildung der Differenz wurden die Aufnahmeraten in der zweiten und dritten Minute bestimmt.

Das Versuchsdesign entsprach dem zuvor beschriebenen Design zur Untersuchung des serosalen Effluxes. Die Inkubationspufferlösung in den Ussing-Kammern unterschied sich allerdings in der Zusammensetzung. Sie enthielt zusätzlich beidseitig 20 mM N-Acetyl-D-Glukosamin. Um eine physiologische Osmolarität der Pufferlösung aufrechtzuerhalten, wurden ihr statt 100 mM Mannit nur 80 mM Mannit zugesetzt (vgl. 9.1.4c).

In Abb. 17 sind zunächst die Glukoseaufnahmeraten in Anwesenheit von 20 mM N-Acetyl-D-Glukosamin in den ersten 3 Minuten nach Glukosezugabe dargestellt. Während in der ersten Minute durch Phlorizin noch eine signifikante Hemmung der Glukoseaufnahme erfolgte, so verschwand dieser Hemmeffekt bereits in der 2. und 3. Minute.

Wurde der serosalen Seite zusätzlich 0,2 mM Phloretin zugegeben, so erfolgte bereits in der 1. Minute nach der Zugabe der Glukose auf der mukosalen Seite durch Phlorizin keine signifikante Hemmung der Glukoseaufnahme mehr.

Die entsprechenden elektrophysiologischen Daten sind im Anhang (Kap. 9.3.2; Abb. A5 und A6) dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl serosales Phloretin als auch beidseitig appliziertes N-Acetyl-D-Glukosamin innerhalb von 3 Minuten zu einer verminderten phlorizin-sensitiven Glukoseaufnahme in das Epithel führten. Wirkten Phloretin und N-Acetyl-D-Glukosamin gleichzeitig auf das Epithel ein, wurde dieser Effekt noch beschleunigt und führte bereits in der 1. Minute zu einer verminderten phlorizin-sensitiven Glukoseaufnahme.

4.2.2 Der Einfluss der Anwesenheit von Laktat und der Laktatbildung auf die Glukoseaufnahme

Nachdem in Kap. 4.2.1 untersucht wurde, ob eine Glukoseanhäufung in der Zelle einen Einfluss auf die Glukoseaufnahme über den SGLT1 hat, sollte nun untersucht werden, ob eine Anhäufung des Glukosemetaboliten Laktat eine Wirkung auf die Glukoseaufnahme hat. Dazu wurden die Epithelien entweder in laktathaltiger (5 mM Na-D/L-Laktat) oder laktatfreier Pufferlösung vorinkubiert. Als Energiesubstrat standen den Epithelien auf der mukosalen Seite 6 mM Glukose zur Verfügung. Die serosale Pufferlösung enthielt keine Glukose. In der laktatfreien Pufferlösung könnte sich aber durch Glukoseverstoffwechslung trotzdem Laktat in den Zellen bilden und anhäufen. Um auch die intrazelluläre Laktatanhäufung infolge der Glykolyse zu unterbinden, erhielten die Epithelien in einigen Versuchsansätzen zusätzlich zur laktatfreien Pufferlösung Na-Oxamat, einen kompetitiven Hemmstoff der Laktatdehydrogenase, in einer Konzentration von 20 mM (CHRETIEN et al. 1995; BROOKS et al. 1999; CORTÉS et al. 2001; DUAN u. GOLDBERG 2003; SCHURR u. PAYNE 2007). Dieser Hemmstoff sollte vermeiden, dass die in die Epithelzelle aufgenommene Glukose intrazellulär durch die anaerobe Glykolyse zu Laktat abgebaut wird.

Alle Epithelien wurden über einen Zeitraum von mindestens 3 Stunden mit 6 mM Glukose auf der mukosalen Seite vorinkubiert, bevor die Glukoseaufnahmemessungen durchgeführt wurden. Die Aufnahmemessung der Glukose über 1 Minute in das Epithel erfolgte mit Beginn der Zugabe von radioaktiv markierter Glukose.

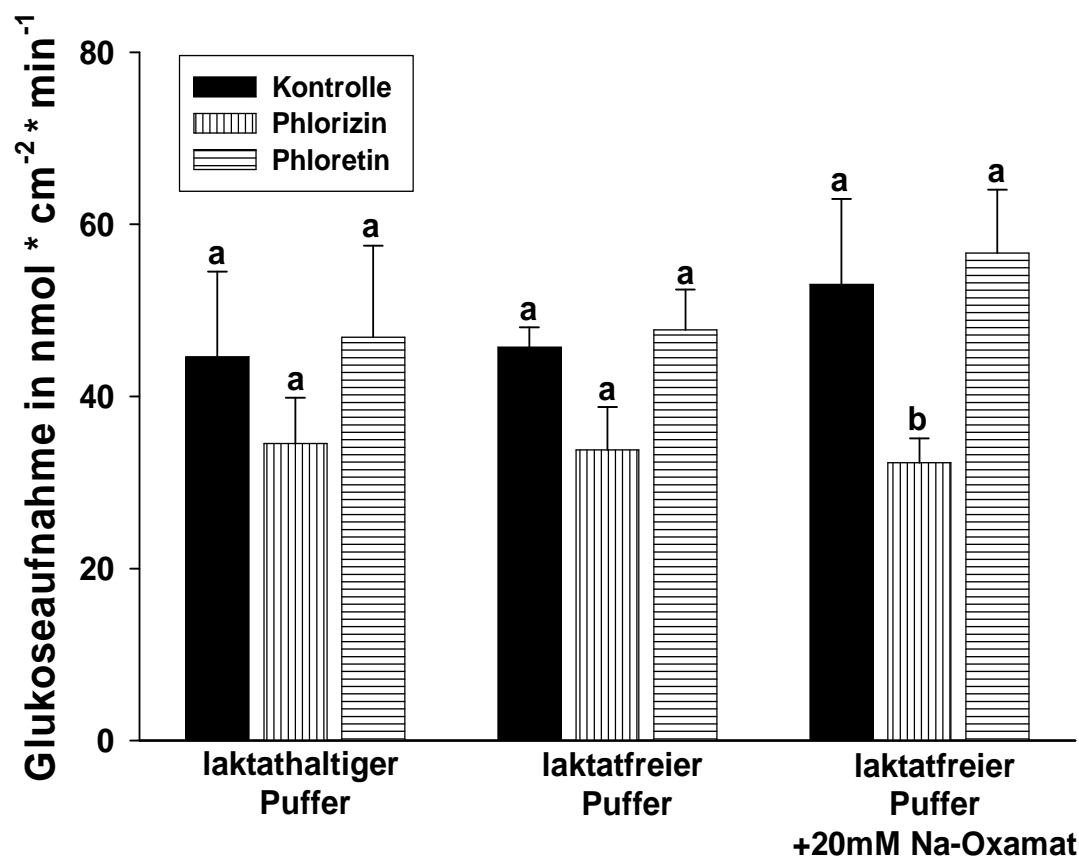


Abb. 18: Laktatabhängigkeit der Glukoseaufnahme

Mittelwerte mit SEM; $n = 7$, $N = 7$; $^{a,b}p < 0,05$ innerhalb einer Inkubationsgruppe; mukosale Glukosekonzentration: 6 mM; mukosale Phlorizinkonzentration: 0,1 mM; mukosale Phloretinkonzentration: 0,2 mM

In der laktathaltigen Pufferlösung führte weder der SGLT1-Hemmstoff Phlorizin noch der GLUT-Hemmstoff Phloretin in dieser Versuchseinstellung zu einer signifikanten Hemmung der Glukoseaufnahme. In der laktatfreien Pufferlösung gestalteten sich die Glukoseaufnahme und die Hemmstoffsensitivität ähnlich. Inkubierte man die Epithelien mit einer laktatfreien Pufferlösung, die den Laktatdehydrogenase-Hemmstoff Na-Oxamat enthielt, führte allein Phlorizin zu einer signifikanten Abnahme der Glukoseaufnahme in das Epithel.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse dieser Versuchsserie, dass nach längerer Vorinkubation mit mukosaler Glukose eine transportervermittelte Aufnahme von Glukose nicht mehr nachweisbar ist (vgl. Abb. 3 und Abb. 18). Die Verhinderung einer intrazellulären Laktatanreicherung durch Verwendung einer laktatfreien Pufferlösung und gleichzeitiger Hemmung der Laktatdehydrogenase war jedoch in der Lage, die SGLT1-Aktivität soweit zu stimulieren, dass sie messbar wurde. Eine apikale GLUT-Aktivität war aber auch bei veränderter intrazellulärer Laktatanhäufung nicht messbar.

4.2.3 Der Einfluss der Glukoneogenese auf die Glukoseaufnahme

In dieser Versuchsserie sollte der Einfluss der Glukoneogenese aus Laktat untersucht werden. Dazu wurde die Versuchseinstellung mit laktathaltiger Pufferlösung wie in Kap. 4.2.2 gewählt. Zu Beginn der etwa dreistündigen Vorinkubationszeit wurde der Pufferlösung auf der mukosalen und serosalen Seite 3-MPA (3-Mercaptopicolinsäure-Hydrochlorid), ein Hemmstoff der PEPCK (MAKINEN u. NOWAK 1983; URBINA et al. 1990; FOSTER et al. 1994; FOLEY et al. 2003), in einer Konzentration von 0,2 mM zugesetzt. Die PEPCK (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase) stellt ein Schlüsselenzym der Glukoneogenese dar. In Abb. 19 sind vergleichend die Glukoseaufnahmeraten mit und ohne 3-MPA dargestellt.

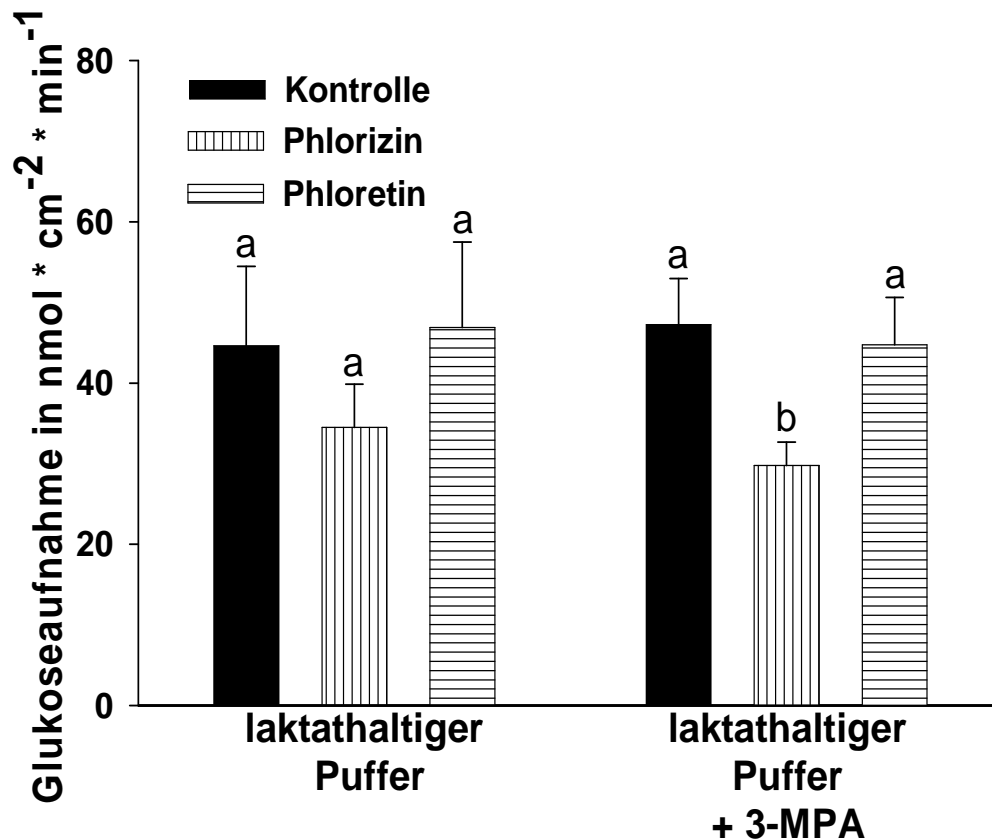


Abb. 19: Einfluss von 3-MPA auf die Glukoseaufnahme

Mittelwerte mit SEM; $n = 7$, $N = 7$; ^{a,b} $p < 0,05$; mukosale Glukosekonzentration: 6 mM; mukosale Phlorizinkonzentration: 0,1 mM; mukosale Phloretinkonzentration: 0,2 mM; beidseitige 3-MPA-konzentration: 0,2 mM

In Anwesenheit des PEPCK-Hemmstoffes 3-MPA erfolgte durch Phlorizin eine signifikante Hemmung der Glukoseaufnahme um $17,5 \pm 4,7 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$. Im Vergleich dazu erfolgte in der laktathaltigen Pufferlösung ohne 3-MPA nur eine scheinbare Hemmung der Glukoseaufnahme durch Phlorizin um $10,1 \pm 12,8 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$. Phloretin hatte keinen Effekt auf die Glukoseaufnahme.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Verhinderung der Glukosebildung aus Laktat durch Hemmung des Glukoneogenese-Schlüsselenzyms PEPCK einen Einfluss auf die SGLT1-vermittelte Glukoseaufnahme hat. So ist auch nach dreistündiger mukosaler Vorinkubation mit Glukose eine phlorizinabhängige Glukoseaufnahme nachweisbar.

4.3 MOLEKULARBIOLOGISCHER NACHWEIS DER mRNA DES SGLT1 UND VERSCHIEDENER PASSIVER GLUKOSETRANSPORTER (GLUT)

Die Daten der vorliegenden Arbeit zur Expression der Glukosetransportproteine wurden bereits im Journal of Physiology and Biochemistry 2009 Sep;65(3):251-66 (ASCHENBACH et al. 2009) veröffentlicht.

4.3.1 SGLT1

Der Nachweis der mRNA des Natrium/Glukose-Kotransporters (Abb. 20) erfolgte mittels eines porzinen Primerpaares.

Alle nun folgenden Gelelektrophorese-Bilder sind in der gleichen Anordnung aufgebaut. Auf der linken Seite des Bildes sind die PCR-Amplifikate von 4 verschiedenen Organen dargestellt. Neben dem proximalen Jejunum (J) wurden als Vergleichs- bzw. Kontrollorgane Gewebeprouben der Leber (L), der Niere (N) und der Skelettmuskulatur (S) verwendet. Auf der rechten Seite des Bildes sind äquivalent dazu die Negativproben dargestellt. Bei diesen Negativproben wurde im Verlauf der PCR auf den Schritt der Reversen Transkription verzichtet, um eine mögliche Verunreinigung der RNA-Proben mit genomischer DNA erkennen zu können.

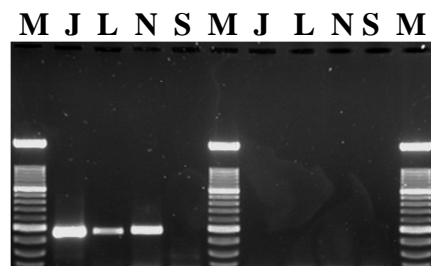


Abb. 20: Nachweis der mRNA des SGLT1:

J...proximales Jejunum

L...Leber

N...Niere

S...Skelettmuskulatur

M...Größenmarker (100 bp-Leiter)

Erwartete Größe des Amplifikates: 461 bp

Die RT-PCR mit einem porzinen Primerpaar ergab ein PCR-Produkt mit einer Größe von 461 bp. Die mRNA des SGLT1 konnte sowohl im proximalen Jejunum als auch in der Leber und in der Niere nachgewiesen werden, wobei im Jejunum das stärkste Signal detektiert werden konnte.

4.3.2 Passive Glukosetransporter (GLUT)

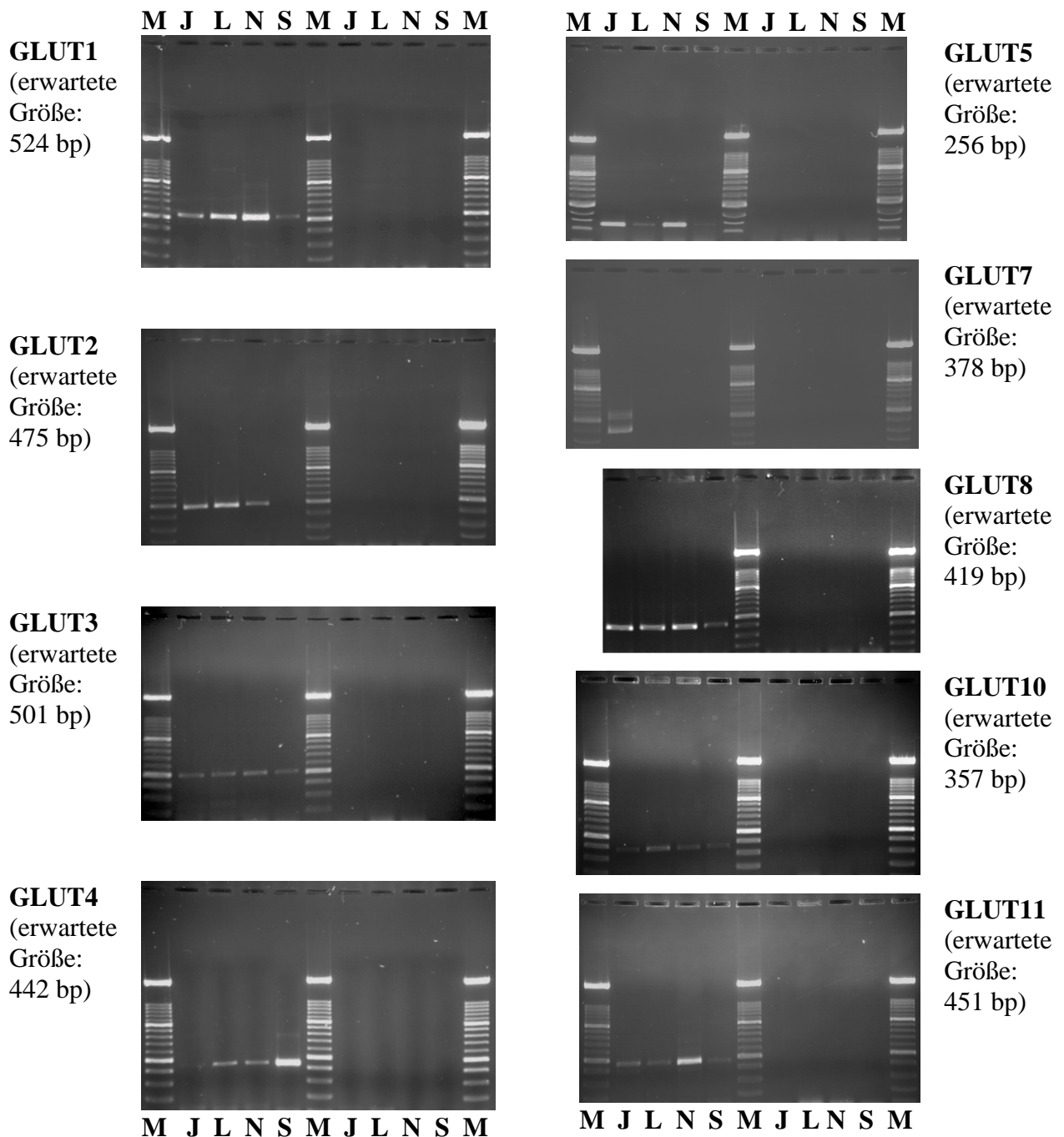


Abb. 21: *Nachweis der mRNA passiver Glukosetransporter proximales Jejunum (J); Leber (L); Niere (N); Skelettmuskulatur (S); molekularer Größenmarker (100 bp-Leiter; M)*

In Abb. 21 sind die Gelelektrophoresebilder aller nachgewiesenen Glukosetransporter zusammengefasst.

Die Anordnung der PCR-Amplifikate sowie der Größenmarker erfolgte wie in Kap. 4.3.1 beschrieben. In den Versuchen wurde nicht auf GLUT9 und GLUT13 getestet, da diese Transporter primär keine Glukose transportieren. Amplifikate für GLUT6 und GLUT12 konnten in keiner der Organproben detektiert werden. Beide Transporter wurden mit mindestens 3 Primerpaaren getestet (Daten sind nicht dargestellt).

Vorkommen der mRNA passiver Glukosetransporter der SLC2A-Familie im Jejunum

Mittels der Two-step RT-PCR für Mitglieder der SLC2A-Familie konnten im Jejunum Amplifikate mit Primerpaaren des GLUT1, GLUT2, GLUT5, GLUT7 und GLUT8 gefunden werden. Schwache Signale konnten auch nach der Amplifikation mit Primerpaaren für GLUT3, GLUT4, GLUT10 und GLUT11 nachgewiesen werden. Alle Amplifikate wiesen die erwartete Größe auf.

Da ein Vorkommen des GLUT4 im proximalen Jejunum sehr unwahrscheinlich ist, bzw. in der Literatur bisher nichts von einem Vorkommen des GLUT4 im Jejunum bekannt ist, wurden die cDNA aller zuvor gepoolten 5 Schweine noch einmal einzeln auf das Vorhandensein von mRNA des GLUT4 getestet. Abb. 22 zeigt die PCR-Produkte im proximalen Jejunum der 5 Schweine mit den dazugehörigen Negativkontrollen.

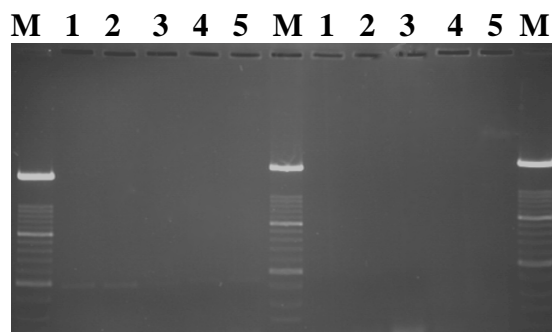


Abb. 22: Nachweis der mRNA des GLUT4 im proximalen Jejunum von 5 Schweinen: molekularer Größenmarker (100 bp-Leiter; M); erwartete Größe des Amplifikates: 442 bp; Nr. 1 bis 5 stellen die einzelnen Schweine dar

Proximales Jejunum

Die mRNA des GLUT4 konnte bei allen 5 Schweinen im proximalen Jejunum nachgewiesen werden, allerdings stellte sich bei allen Tieren nur eine äußerst schwache Bande nahe an der Detektionsgrenze dar.

Vorkommen der mRNA passiver Glukosetransporter der SLC2A-Familie in der Leber

Mittels der Two-step RT-PCR für Mitglieder der SLC2A-Familie konnten in der Leber starke Signale für die Amplifikate des GLUT1, GLUT2 und GLUT8 nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten mit schwächeren Signalen auch die Amplifikate für GLUT3, GLUT4, GLUT5, GLUT10 und GLUT11 nachgewiesen werden. Alle Amplifikate wiesen die erwartete Größe auf.

Da ein Vorkommen des GLUT4 auch in der Leber bisher nicht publiziert ist, wurde die DNA aller zuvor gepoolten 5 Schweine noch einmal einzeln auf das Vorhandensein von mRNA des GLUT4 getestet. Abb. 23 zeigt wiederum die PCR-Produkte der Leber der 5 Schweine mit den dazugehörigen Negativkontrollen.

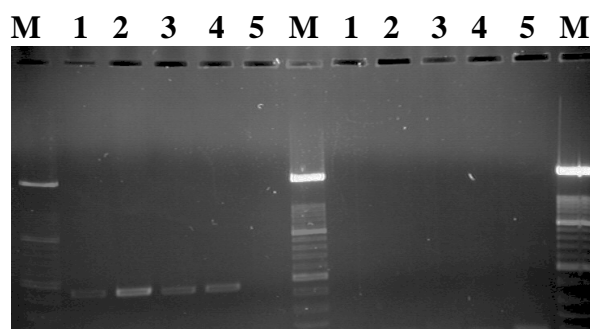


Abb. 23: Nachweis der mRNA des GLUT4 in der Leber von 5 Schweinen: molekularer Größenmarker (100 bp-Leiter; M); erwartete Größe des Amplifikates: 442 bp; Nr. 1 bis 5 stellen die einzelnen Schweine dar

Leber

In der Leber konnte die mRNA des GLUT4 nur bei 4 von 5 Tieren mit unterschiedlicher Intensität der Banden nachgewiesen werden.

Vorkommen der mRNA passiver Glukosetransporter der SLC2A-Familie in der Niere

Beim Screening auf die mRNA der SLC2A-Genfamilie konnten in der Niere Signale für GLUT1, GLUT2, GLUT5, GLUT8 und GLUT11 entdeckt werden. Schwächere Signale konnten auch mit den Primerpaaren für GLUT3, GLUT4 und GLUT10 produziert werden. Alle Amplifikate wiesen die erwartete Größe auf.

Vorkommen der mRNA passiver Glukosetransporter der SLC2A-Familie in der Skelettmuskulatur

In der Skelettmuskulatur konnten beim Screening auf die mRNA der SLC2A-Genfamilie verschieden stark ausgeprägte Signale für GLUT1, GLUT3, GLUT5, GLUT8, GLUT10 und GLUT11 detektiert werden. Für den GLUT4 zeigte sich in der Skelettmuskulatur die mit Abstand stärkste Bande. Alle Amplifikate wiesen die erwartete Größe auf.

Sequenzierung und Homologie-Screening

Die Identität der amplifizierten cDNA wurde mittels Sequenzierung und anschließendem Vergleich auf Homologie mit bereits veröffentlichten Sequenzen verifiziert. Neu entdeckte oder auch von bereits veröffentlichten Sequenzen abweichende Sequenzen wurden in die GenBank eingestellt (siehe Tab. 4). Komplett neue Sequenzinformationen konnten für pGLUT5, pGLUT7 und pGLUT10 gewonnen werden. Diese Sequenzen wurden in die GenBank eingestellt und zeigten hohe Übereinstimmungen mit den entsprechenden Sequenzen anderer Spezies. Auch die Sequenzierung des pGLUT11 lieferte zum Zeitpunkt der Analyse neue Sequenzinformationen. Diese Sequenz ist zu 100 % identisch mit der mittlerweile veröffentlichten kompletten Sequenz des pGLUT11 (XM_003132985.1, XM_001929403.2).

Die ermittelte Teilsequenz des pSGLT1 stimmt komplett mit der publizierten porcinen Sequenz des Transporters (NM_001164021) überein. Aus diesem Grund wurde diese Sequenz nicht in die GenBank eingestellt.

Das ermittelte Amplifikat des pGLUT1 zeigte 3 Einzelnukleotid-Polymorphismen (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) (G783C, T915C und A960G) zu der bereits bekannten porcinen Sequenz des GLUT1 (X17058.1). Aufgrund dieser SNP wurde die ermittelte und primer-bereinigte Sequenz mit einer Länge von 459 bp in die GenBank eingestellt (EU012358.1). Die SNP führen allerdings zu keiner Änderung der Sequenz des kodierenden Proteins (G261, G305, L320; sp|P20303|GTR1_PIG).

Die ermittelte Sequenz des pGLUT2 (FJ209732) wies eine SNP (G1153A) zu der mittlerweile in voller Länge veröffentlichten cDNA Sequenz (NM_001097417.1) auf. Auch diese SNP ändert nichts an der Aminosäuresequenz des Proteins (S384; NP_001090886.1).

Das amplifizierte und sequenzierte cDNA-Teilstück des pGLUT3 (FJ209733) verlängerte die zum Zeitpunkt der Veröffentlichung verfügbare pGLUT3-Teilsequenz jeweils an beiden Enden. Vier SNP (A8G, A294G, T295A und Deletion von A312) konnten im Vergleich zu dieser bekannten Teilsequenz (AF054836.1) identifiziert werden. Zwei Sequenzen von Klonierungsprodukten, welche im Jahr 2012 veröffentlicht wurden, wiesen zur eigenen Sequenz jeweils eine SNP auf (T874C im Vergleich zu AK399451.1, A629G im Vergleich zu AK389853.1).

Die entdeckte Sequenz für den pGLUT4 enthielt zwei schon bekannte SNP. Aus diesem Grund wurde diese Sequenz nicht in der GenBank veröffentlicht. Zum einen war das G338A

im Vergleich zu NM_001128433.1 und zum anderen C220T im Vergleich zu AF141956.1. Die zuerst erwähnte SNP hat auch einen Einfluss auf die Aminosäuresequenz des Proteins (V102I im Vergleich zu NP_001121905.1).

Die ermittelte Teilsequenz des pGLUT8 wies zu der zum Zeitpunkt der Veröffentlichung bekannten Sequenz des pGLUT8 eines Klonierungsproduktes (AK235332) vier SNP auf (T933C, G969A, T984G, A1164G). Aus diesem Grund wurde die Teilsequenz in der GenBank veröffentlicht (EU012361.2). Diese Sequenz ist mit der inzwischen veröffentlichten Sequenz des pGLUT8 (XM_003480608.2, XM_005660440.1, XM_005660439.1) zu 100% identisch.

Alle sequenzierten Teilstücke der Glukosetransporter wiesen zu den entsprechenden Teilstücken anderer Spezies eine Homologie von über 79 % auf. Die Übereinstimmung mit den humanen Sequenzen betrug meistens 87 bis 93 %. Nur der pGLUT5 wies eine niedrigere Homologie zu der humanen Isoform auf (81 %; vgl. Tab. 4).

Tab. 4: Zugangsnummern der in GenBank veröffentlichten Sequenzinformationen und Homologien der ermittelten Sequenzen zu denen anderer domestizierter Tierarten

Transporter	GenBank-Nummer	Homologie % (Abdeckung der gesamten Sequenz %)								
		Mensch	Ratte	Maus	Kaninchen	Schaf	Rind	Pferd	Hund	Katze
SGLT1	----	87 (99)	79 (100)	81 (100)	88 (100)	89 (100)	90 (100)	89 (100)	90 (100)	90 (100)
GLUT1	EU012358	93 (99)	92 (99)	90 (99)	93 (99)	95 (99)	95 (99)	95 (99)	95 (99)	95 (100)
GLUT2	FJ209732	93 (99)	82 (99)	84 (99)	88 (99)	93 (100)	93 (100)	92 (99)	92 (98)	92 (98)
GLUT3	FJ209733	87 (96)	81 (95)	81 (96)	89 (98)	86 (98)	88 (98)	91 (96)	89 (99)	88 (100)
GLUT4	----	88 (100)	85 (100)	86 (100)	88 (100)	91 (100)	92 (100)	89 (100)	89 (100)	89 (100)
GLUT5	EU012359	81 (100)	81 (92)	79 (94)	79 (94)	87 (100)	87 (100)	84 (95)	82 (100)	83 (100)
GLUT7	EU012360	87 (100)	86 (100)	84 (92)	84 (100)	----	----	----	----	----
GLUT8	EU012361	88 (100)	84 (100)	84 (100)	89 (100)	90 (100)	90 (100)	90 (100)	88 (99)	90 (99)
GLUT10	EU012357	89 (97)	84 (93)	84 (98)	----	89 (99)	88 (93)	90 (98)	90 (98)	87 (97)
GLUT11	EU012362	89 (99)	----	----	----	----	88 (100)	90 (100)	89 (100)	88 (100)

Die Werte in Klammern stellen die Abdeckung der kompletten veröffentlichten porzinen Sequenz mit den entsprechenden heterologen Sequenzen dar

5. Diskussion

5.1 GLUKOSETRANSPORT ÜBER SGLT1 UND GLUT

5.1.1 Apikale Glukoseaufnahme über SGLT1 und GLUT

Entsprechend dem momentan favorisierten Modell der Glukoseresorption, welches von der Dominanz einer (sekundär) aktiven, transzytosolischen Glukoseresorption im Darm ausgeht, wird Glukose im ersten Schritt über einen Natrium-abhängigen Kcotransporter, den SGLT1, in die Epithelzellen aufgenommen und dort angereichert. Die in der Folge erhöhte intrazelluläre Glukosekonzentration begünstigt anschließend die passive erleichterte Diffusion der Glukose in das Blut über den GLUT2 in der basolateralen Membran (WOOD u. TRAYHURN 2003; WRIGHT et al. 2003; THORENS 1996). Laut der Kellett-Hypothese kann die hocheffiziente intestinale Glukoseresorption bei starker luminaler Glukoseanflutung mit einem Einbau des GLUT2 in die apikale Zellmembran erklärt werden. Dieser Mechanismus wird durch den SGLT1 induziert und ist glukoseabhängig (HELLIWELL et al. 2000a,b; KELLETT u. HELLIWELL 2000; KELLETT 2001; GOUYON et al. 2003; KELLETT u. BROTLAROCHE 2005).

Die eigenen Untersuchungen konnten zunächst die Beteiligung des SGLT1 an der apikalen Glukoseaufnahme in das Dünndarmepithel des Schweins nachweisen. Zum einen konnte dies durch die Hemmbarkeit der apikalen Glukoseaufnahme durch Phlorizin (Abb. 2) und zum anderen durch einen I_{sc} -Anstieg nach mukosaler Glukosezugabe (Abb. 4) bestätigt werden. Anhand des I_{sc} -Anstieges errechnete sich in den Untersuchungen des Kap. 4.1.1 eine Transportkapazität des SGLT1 von etwa $7,5 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$. Phlorizin führte allerdings ohne vorangehende Glukoseinkubation zu einer Hemmung der Glukoseaufnahme um etwa $50,5 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ (Abb. 2). Dies legt nahe, dass ein deutlich größerer Anteil der Glukoseresorption durch Phlorizin hemmbar ist, als tatsächlich über den SGLT1 transportiert wird. Schließt man die Induktion anderer elektrogener Transporte durch die Glukosezugabe weitgehend aus, so ist anzunehmen, dass der Transport des restlichen Anteils von etwa $43 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$, der auch durch Phlorizin hemmbar war, nicht über den SGLT1 sondern über einen apikalen GLUT, vermutlich den GLUT2, erfolgte. Dieser GLUT-vermittelte Transport wurde anscheinend durch den SGLT1 induziert, da er auch gehemmt wurde, wenn nur der SGLT1-Hemmstoff Phlorizin zugegeben worden war (Abb. 2). In den ersten Minuten nach Applikation einer entsprechend hohen Konzentration luminaler Glukose ($\geq 10 \text{ mM}$) folgt somit der Glukosetransport am proximalen Jejunum des Schweins dem von KELLETT (2001) aufgestellten Modell (siehe Kap. 2.4.4). Nur so lässt sich erklären, dass die GLUT-Hemmstoffe Phloretin und Cytochalasin B zu einer Hemmung der Glukoseaufnahme führten, die vergleichbar der Hemmung durch Phlorizin war (Abb. 2).

Dass der Einsatz des SGLT1-Hemmstoffes Phlorizin zu einer annähernd kompletten Hemmung des I_{sc} -Anstieges und somit der SGLT1-Funktion führt, konnte in der Versuchseinstellung des Kap. 4.1.1 zunächst nicht nachgewiesen werden, da die kurze Messperiode von nur 1 Minute nach Glukosezugabe dies nicht erlaubte. Der elektrophysiologische Nachweis, dass $0,5 \text{ mM}$ Phlorizin sogar bei einer höheren Glukosekonzentration (20 mM) zu einer fast vollständigen Hemmung der SGLT1-Funktion führt, konnte aber in den Untersuchungen des Kap. 4.1.3 (Abb. 11) erbracht werden.

Mit steigender Glukose-Vorinkubationszeit, sank der Glukose-Uptake unter Kontrollbedingungen zunehmend. Das führte dazu, dass nach 5-minütiger Inkubationszeit nur noch Cytochalasin B eine signifikante hemmende Wirkung auf die apikale Glukoseaufnahme besaß und nach 10- bzw. 20-minütiger Inkubationszeit keinerlei Hemmeffekt aller 3 Hemmstoffe detektierbar war (Abb. 3). Es war somit zu diesen Zeitpunkten mit der verwendeten Methode

weder ein SGLT1-abhängiger noch ein GLUT-abhängiger Glukose-Uptake messbar. Folglich stellt sich die Frage, ob der SGLT1 und der GLUT2 ihre Aktivität bereits wenige Minuten nach luminaler Glukoseanflutung einstellen. Diese Frage lässt sich für den SGLT1 eindeutig mit nein beantworten. Die Kurve des Kurzschlussstromes (Abb. 4) lässt deutlich erkennen, dass der glukoseinduzierte Strom des SGLT1 auch 5, 10 und 20 Minuten nach Zugabe von 10 mM Glukose auf der apikalen Epithelseite noch in fast unveränderter Höhe nachweisbar ist.

Das Absinken der Glukoseaufnahme unter Kontrollbedingungen könnte sich demzufolge durch einen Ausfall der Glukoseaufnahme durch den apikalen GLUT erklären lassen. Dieser scheint, wenn die Zelle mit Glukose „vollgelaufen“ ist, entweder keinen ausreichenden Gradienten für die Aufnahme zu haben oder aus der apikalen Zellmembran ausgebaut zu werden, um einen Rückfluss der Glukose in das Darmlumen zu verhindern (HELLIWELL et al. 2000a,b; KELLETT u. HELLIWELL 2000; KELLETT 2001; KELLETT u. BROTLAROCHE 2005). Der apikale GLUT ist also nur über einen kurzen Zeitraum aktiv, transportiert aber mit hoher Kapazität Glukose in die Epithelzelle und ist somit bestens geeignet, in Zeiten hoher luminaler Glukosekonzentrationen den Massenflux der Glukose über das Epithel zu unterstützen (CHAUDHRY et al. 2012). Im Gegensatz dazu ist der SGLT1 zwar über einen längeren Zeitraum aktiv, transportierte aber unter den Versuchsbedingungen der vorliegenden Studie nur geschätzte $7,5 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ Glukose. Durch diese geringe Transportkapazität ist auch erklärbar, warum die nach dem Ausfall der GLUT-Aktivität weiter bestehende Funktion des SGLT1 mittels Hemmung durch den SGLT1-Hemmstoff Phlorizin nicht mehr nachweisbar war.

Unter den hier angewandten *in vitro* Bedingungen kam es bereits nach etwa 5 Minuten zu einem Aktivitätsverlust des apikalen GLUT. Möglicherweise findet dieser Vorgang *in vivo* erst zu einem späteren Zeitpunkt statt, da *in vivo* die in die Epithelzellen aufgenommene Glukose über den basolateralen GLUT in die Blutbahn abgegeben und anschließend über den Blutkreislauf abtransportiert werden kann. Da der basolaterale Abtransport der Glukose unter den hier angewandten Bedingungen erschwert ist, könnte dies zu einer Ansammlung der aufgenommenen Glukose in subepithelialen Schichten und somit zu einer vorzeitigen Deaktivierung des apikalen GLUT2 führen. In Kap. 5.1.5 wird auf die Bedeutung des basolateralen Glukoseeffluxes für die apikale Glukoseaufnahme noch einmal detaillierter eingegangen.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass der SGLT1 in der 1. Minute nach luminaler Exposition mit höheren Glukosekonzentrationen wahrscheinlich nur einen sehr geringen Teil der Glukoseaufnahme abdeckt, während der weitaus größere Teil durch einen apikalen GLUT realisiert wird.

Während der SGLT1 nur eine geringe Transportaktivität besitzt, ist der apikale GLUT zwar in der Lage Glukose mit hoher Kapazität zu transportieren, allerdings ist seine Funktion zeitlich begrenzt. Die Glukoseaufnahme über den apikalen GLUT kann auch durch Phlorizin gehemmt werden, was entsprechend der Kellett-Hypothese (KELLETT 2001) auf die Induktion eines GLUT2 durch den SGLT1 hindeutet.

5.1.2 Hinweise auf eine clathrinabhängige Insertion des apikalen GLUT

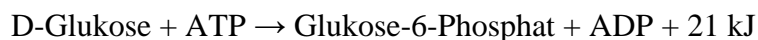
Es ist bekannt, dass der apikale GLUT2 in intrazellulären Vesikeln gespeichert und erst bei Bedarf in die apikale Zellmembran der Enterozyten integriert wird (KELLETT u. HELLIWELL 2000; KELLETT 2001; KELLETT u. BROTLAROCHE 2005). Details zur Speicherung in den Vesikeln und zur Insertion in die Zellmembran sind bisher kaum bekannt. Die Untersuchungen in Kap. 4.1.2 lieferten Hinweise, dass in die Insertion des GLUT2 in die apikale Zellmembran clathrinabhängige Mechanismen involviert sind. Chlorpromazin, ein

Hemmstoff der Clathrin-abhängigen Endozytose, führte in den eigenen Untersuchungen dazu, dass die vorher mit diesem Hemmstoff behandelten Epithelien weder mit Phloretin allein noch mit Phloretin und Phlorizin eine Hemmung der Glukoseaufnahme zeigten. Grund für den Verlust der Hemmwirkung dieser beiden Substanzen schien der bereits in Abwesenheit von Phloretin und Phlorizin erniedrigte Glukoseuptake zu sein. Daraus lässt sich ableiten, dass der transportvermittelte Uptake, vor allem über den apikalen GLUT2, nach Applikation von Chlorpromazin zum Erliegen kommt. Aus dem Anstieg des I_{sc} nach Glukosezugabe lässt sich schließen, dass der SGLT1 auch nach der Inkubation mit Chlorpromazin uneingeschränkt aktiv ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass für die apikale Insertion des GLUT2 ein intakter Clathrin-abhängiger Vesikeleinbau notwendig ist.

Es gibt Hinweise darauf, dass auch der SGLT1 in Endozytose-Vesikeln gespeichert wird (KHOURSANDI et al. 2004), allerdings scheint Chlorpromazin als Hemmstoff der clathrin-abhängigen Endozytose keinen Einfluss auf die Aktivität des apikalen SGLT1 zu haben. Ob es sich bei den Vesikeln, in welchen der GLUT2 gespeichert wird, um endozytotische clathrin-gebundene Vesikel handelt, ist bisher nicht bekannt. CHAKRABARTI et al. konnten 1994 nachweisen, dass der in Muskelzellen und Adipozyten vorkommende GLUT4 in solchen intrazellulären „clathrin-coated vesicles“ gespeichert wird und insulin sensitiv an die Zellmembran transportiert wird (WATSON u. PESSIN 2001). Da Chlorpromazin einen hemmenden Effekt auf den Einbau des GLUT2 in die apikale Zellmembran ausübt, liegt die Vermutung nahe, dass der GLUT2 in Clathrin-gebundenen Vesikeln gespeichert wird bzw. die Insertion des GLUT2 in die apikale Membran im Zusammenhang mit Clathrin-gebundenen Vesikeln steht. Auf die Mannitaufnahme übte Chlorpromazin hingegen keinen Einfluss aus, was die spezifische Wirkung von Chlorpromazin auf den Membraneinbau des GLUT2 weiter untermauert.

5.1.3 Bedeutung der intrazellulären Glukoseverstoffwechslung und Laktatakkumulation für die SGLT1- und GLUT-abhängige Glukoseaufnahme

In den Enterozyten des Schweins stellt die Glykolyse den Hauptweg der Glukoseverstoffwechslung dar (VAUGELADE et al. 1994; DARCY-VRILLON et al. 1994; WU et al. 1995). Bei dieser Form der Verstoffwechslung entstehen Laktat, Pyruvat und CO_2 . Ein Schlüsselenzym der Glykolyse stellt die Hexokinase dar, welche die Phosphorylierung der Glukose zu Glukose-6-Phosphat katalysiert (POSHO et al. 1994). Diese Phosphorylierung läuft nach folgender Reaktionsgleichung ab:



Die intrazelluläre Phosphorylierung der resorbierten Glukose ist Grundvoraussetzung für die anschließende Verstoffwechslung in der Glykolyse. Die Phosphorylierung ist auch nötig, wenn Glukose über die Exozytose aus der Zelle ausgeschleust werden soll, da nur im Anschluss an diese Phosphorylierung eine Überführung in das endoplasmatische Retikulum durch die Glukose-6-Phosphat-Translokase möglich ist (STÜMPEL et al. 2001). Die Hemmung der Hexokinase mit N-Acetyl-D-Glukosamin hätte somit zur Folge, dass theoretisch keine Glykolyse der Glukose mehr möglich wäre und auch eine Ausschleusung der Glukose aus der Zelle mittels Vesikelexozytose nicht mehr stattfinden könnte.

In Kap. 4.2.1 konnte nachgewiesen werden, dass die Anwesenheit des Hemmstoffes N-Acetyl-D-Glukosamin zu einer schnelleren Reduzierung der Glukoseaufnahme über den apikalen GLUT in die Zelle führt (Abb. 17, linke Darstellung). Ist der Hemmstoff nicht vorhanden, so ist der apikale GLUT über einen längeren Zeitraum aktiv (Abb. 16, linke Darstellung).

Durch die Hemmung des Schlüsselenzyms Hexokinase ist sowohl eine intrazelluläre Verstoffwechslung der Glukose als auch eine Ausschleusung der Glukose über Vesikelexozytose nicht mehr möglich. Folglich kommt es wahrscheinlich zu einem Anstieg der intrazellulären Glukose und einer anschließenden Reduzierung der apikalen Glukoseaufnahme in die Zelle. Bei diesem hier nachgewiesenen Phänomen könnte es sich um einen Schutzmechanismus der Zelle handeln. Um eine zu starke intrazelluläre Glukoseansammlung und daraus resultierende Schäden zu vermeiden, könnte dieser Schutzmechanismus in Kraft treten. Die in der vorliegenden Studie beobachtete kurzfristige Verminderung der Glukoseaufnahme könnte sich in einem abnehmenden Konzentrationsgradienten für Glukose begründen. Mittelfristig könnte es aber auch zu einer Herabregulation von Glukosetransportproteinen kommen. So konnten ALPERT et al. (2002) zeigen, dass bovine Endothelzellen der Aorta sowie glatte Muskelzellen ihre Glukosetransportrate reduzieren, wenn man sie hyperglykämischen Bedingungen aussetzt. Dies geschieht durch eine Reduktion der mRNA sowie des Proteingehaltes des für diese Zellen typischen Glukosetransporters GLUT1. COHEN et al. (2007) konnten diesen Effekt auch in den Endothelzellen der Blutgefäße bei diabetischen Patienten nachweisen.

Es kann davon ausgegangen werden, dass *in vivo* dieser Mechanismus erst zu einem späteren Zeitpunkt aktiviert werden würde, da trotz Hemmung der intrazellulären Verstoffwechslung und der Vesikelexozytose, *in vivo* eine effiziente Ausschleusung der Glukose über den basolateralen GLUT mit anschließendem Abtransport der Glukose über das Blutgefäßsystem möglich wäre. Bei der Ussing-Kammer-Technik ist die basolaterale Glukoseausschleusung aufgrund der fehlenden Durchblutung wahrscheinlich viel weniger effizient (siehe aber Kap. 5.1.5).

Der Einfluss der Anwesenheit des Glykolyseproduktes Laktat in der Zelle auf die apikale Glukoseaufnahme wurde im Kapitel 4.2.2 untersucht. Es kann davon ausgegangen werden, dass auch in der Versuchsanordnung mit laktatfreier Pufferlösung eine hohe Laktatbildung stattfand. HANSON u. PARSONS konnten 1976 nachweisen, dass im Jejunum von Ratten *in vitro* unter aeroben Bedingungen in den ersten 15 Minuten 60 bis 70 % der aufgenommenen Glukose zu Laktat metabolisiert wurden. In den darauffolgenden 30 Minuten stieg dieser Wert auf 80 bis 90 %. In Abbildung 18 ist kein Unterschied in der Glukoseaufnahme zwischen laktathaltiger und laktatfreier Pufferlösung erkennbar. Wurde die intrazelluläre Laktatanreicherung durch die Verwendung einer laktatfreien Pufferlösung und der gleichzeitigen Hemmung der Laktatdehydrogenase verhindert, so war es möglich, die SGLT1-Aktivität soweit zu stimulieren, dass sie messbar wurde. Eine GLUT-Aktivität war allerdings nicht nachweisbar. Laktat schien somit eine geringe hemmende Wirkung auf den SGLT1 zu besitzen, allerdings war diese aufgrund der niedrigen Transportkapazität des SGLT1 sehr schwer nachweisbar und hatte keinen statistisch signifikanten Effekt auf die gesamte apikale Glukoseaufnahme. Der apikale GLUT2 schien nach dreistündiger Inkubation mit Glukose nicht mehr oder nur noch in sehr geringem Maße an der Glukoseaufnahme beteiligt zu sein. Folgende Ursachen für die fehlende GLUT-Aktivität sind möglich:

1. Es kam nicht zu einem Einbau des GLUT2 in die apikale Zellmembran, da die Glukosekonzentration in der apikalen Pufferlösung zu gering war (6 mM);
2. Es erfolgte ein Ausbau des GLUT aus der apikalen Membran aufgrund der langen Vorinkubationszeit mit Glukose (etwa 3 Stunden);
3. Aufgrund der intrazellulären Glukoseanreicherung existierte kein Konzentrationsgradient für den GLUT.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Anreicherung von Glukose im Enterozyten des Schweines zu einer verminderten apikalen Glukoseaufnahme führt. Die intrazelluläre Verstoffwechslung von Glukose wirkt dem effektiv entgegen. Das bei der intrazellulären

Verstoffwechslung anfallende Laktat hat eine eher geringe Rückwirkung auf die apikale Glukoseaufnahme.

5.1.4 Glukoneogenetische Aktivität im Darmepithel und deren Einfluss auf die apikale Glukoseaufnahme

Umgekehrt zur Glykolyse ist es auch möglich, dass das in der Zelle vorhandene Laktat mittels der Glukoneogenese zur Glukosesynthese genutzt wird (RAJAS et al. 2007) und die dabei entstehende Glukose die Glukoseaufnahme in die Zelle beeinflusst. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie ein Schlüsselenzym der Glukoneogenese, die PEPCK, mit 3-Mercaptopicolinsäure gehemmt. Die Hemmung der Glukoneogenese führte zu einer numerischen Verdopplung der SGLT1-Aktivität. So war unter diesen Versuchsbedingungen ein signifikanter phlorizinsensitiver Effekt nachweisbar. Daraus lässt sich schließen, dass Laktat im Jejunum offensichtlich in die Glukoneogenese eingebracht werden kann und unter den angewendeten *in vitro*-Bedingungen eine Auswirkung auf die apikale SGLT1-Funktion hatte. Wie für die Ratte und den Menschen beschrieben (ANDERSON 1970; HAHN u. SMALE 1982; RAJAS et al. 1999 und RAJAS et al. 2000), scheint offensichtlich auch beim Schwein nach dem Absetzen vom Muttertier noch Glukoseogenese im Jejunum stattzufinden. Allerdings handelte es sich bei den verwendeten Schweinen nicht um adulte Tiere, sodass sich keine Rückschlüsse auf eine stattfindende Glukoseogenese beim ausgewachsenen Tier ziehen lassen. Die Glukosebildung in der Zelle und die daraus resultierende erhöhte Glukosekonzentration in der Zelle schien jedoch zu einer Hemmung der SGLT1-Aktivität zu führen. Dieser Mechanismus könnte wiederum auf die schon in Kap. 5.1.3 erwähnte Schutzfunktion der Zellen zurückzuführen sein, welche eine übermäßige Ansammlung von Glukose in der Epithelzelle verhindern soll.

5.1.5 Bedeutung des basolateralen Glukoseeffluxes für die apikale Glukoseaufnahme über SGLT1 und GLUT

Als Hauptweg des basolateralen Glukoseeffluxes wird die passive erleichterte Diffusion der Glukose in das Blut über einen GLUT-Carrier in der basolateralen Membran propagiert (WOOD u. TRAYHURN 2003; WRIGHT et al. 2003). Die Isoform des basolateralen GLUT ist speziesübergreifend der niederaffine GLUT2 (THORENS 1996; WRIGHT et al. 2003). Einen alternativen Weg für die Ausschleusung von Glukose aus der Zelle stellt die Exozytose dar (STÜMPEL et al. 2001; SANTER et al. 2003). Dieser Exportweg steht jedoch nur metabolisierbaren Zuckern zur Verfügung. Das bedeutet, dass der Zucker nach 6-Phosphorylierung durch die Hexokinase zunächst mittels der Glukose-6-Phosphat-Translokase in das endoplasmatische Retikulum überführt werden muss, um anschließend via Exozytose die Zelle verlassen zu können (STÜMPEL et al. 2001; WRIGHT et al. 2003).

In Kap. 4.2.1 (Abb. 16, rechte Darstellung) erfolgte die Blockade des basolateral lokalisierten GLUT2 durch Phloretin. Dies führte zu einer zeitigeren Reduzierung der Glukoseaufnahme über den apikalen GLUT. Allerdings muss bedacht werden, dass unter diesen Versuchseinstellungen der Abtransport der Glukose aus der Zelle nicht komplett unterbunden wurde, da auch eine Ausschleusung der Glukose über Vesikelexozytose prinzipiell möglich gewesen wäre (STÜMPEL et al. 2001). Jedoch entfiel mit der Hemmung des basolateralen GLUT offensichtlich der potenteste Exportweg. Wurde zusätzlich zur Hemmung des Glukoseeffluxes über den basolateralen GLUT die Hexokinase mit N-Acetyl-D-Glukosamin gehemmt, so kam die Glukoseaufnahme über den apikalen GLUT noch früher zum Erliegen und war bereits in der 1. Minute nach Applikation nicht mehr messbar (Abb. 17, rechte Darstellung). Dies deutet darauf hin, dass basolaterale Glukoseausschleusung über einen GLUT und die metabolische Aktivierung der Glukose zu Glukose-6-Phosphat synergistisch

die intrazelluläre Konzentration nicht aktivierter Glukose senken und dadurch die apikale Glukoseaufnahme begünstigen können. Ob und in welchem Umfang die metabolische Aktivierung der Glukose letztendlich der Energiegewinnung (Glykolyse) oder dem vesikulären Export über Exozytose diene, wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der basolaterale Glukoseefflux einen bedeutenden Einfluss auf die apikale Glukoseaufnahme hat. So gewährleistet der basolaterale Glukoseefflux die Aufrechterhaltung der apikalen Glukoseresorption bei anhaltend höheren Glukosekonzentrationen im Darmlumen, da jegliche Ansammlung von Glukose in den Epithelzellen zu einer Verminderung der Glukoseaufnahme in die Zellen führen würde. Neben dem basolateralen GLUT2 könnte prinzipiell auch die Vesikelexozytose nach erfolgter intrazellulärer Phosphorylierung an der basolateralen Glukoseausschleusung beteiligt sein. Sind einer oder beide Mechanismen nicht aktiv, so kommt es zu einer Verminderung der Glukoseaufnahme in die Zellen. Diese Reduzierung der Glukoseaufnahme erfolgt dann aber nicht durch einen verminderten Glukosetransport des apikalen SGLT1 sondern durch eine verminderte Aktivität des apikal lokalisierten GLUT2. Da es sich bei dem apikalen GLUT2 um einen passiven Transporter handelt, könnte die verminderte Aktivität allein durch einen Wegfall des Glukosekonzentrationsgradienten erklärt werden. Alternativ könnte auch ein Ausbau des Transporters aus der apikalen Membran erfolgen. Ein Entfernen des GLUT2 aus der apikalen Zellmembran hätte den Vorteil, dass auch ein passiver Rückfluss der aufgenommenen Glukose in das Darmlumen verhindert wird. Die Funktion des SGLT1 blieb nahezu unberührt, wobei seine Transportkapazität gering war und zu Beginn der Inkubationszeiten in den durchgeführten Versuchen nur einen kleinen Teil der Glukoseresorption ausmachte. Nach der Inaktivierung des apikalen GLUT2 könnte der SGLT1 durchaus 100 % der apikalen Glukoseaufnahme realisieren, auch wenn dies messtechnisch nicht erfasst werden konnte.

5.2 GLUKOSEAUFNAHME ÜBER ENDOZYTÖSE

In Kap. 4.1.1 stellte sich ein Großteil der Glukoseaufnahme in das Epithel nicht sensitiv für Phlorizin und Phloretin dar. Aus diesem Grund sollte in Kap. 4.1.2 die mögliche Beteiligung der Endozytose bzw. Endozytose-assoziiierter Vorgänge an der Glukoseaufnahme untersucht werden.

In Kap. 4.1.2 (Abb. 5) konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von N-Ethylmaleimid ein phloretin- und phlorizinabhängiger Glukose-Uptake existierte. Nicht zu erwarten war, dass NEM zu einem phloretin- und phlorizinabhängigen Mannit-Uptake führt. Gleichzeitig kam es allerdings zu einer vollständigen Auslöschung des glukoseinduzierten und SGLT1-abhängigen Kurzschlussstromes (Abb. 8). Folglich sind sowohl Glukose- als auch Mannit-Uptake zwar phloretin- und phlorizinsensitiv, die Aufnahme erfolgt jedoch nicht mittels Natrium-Cotransport über den SGLT1.

Folgende Erklärungen könnten hierfür in Betracht gezogen werden:

1. Der SGLT1 ist inaktiv und der apikale GLUT wird SGLT1-unabhängig in die Membran integriert. Der apikale GLUT müsste in diesem Fall in der Lage sein, auch Mannit zu transportieren.
2. Der SGLT1 fungiert als passiver und somit natriumunabhängiger Glukose- und Mannitcarrier.
3. Eine Kombination aus 1. und 2.

Die Wirkung des NEM besteht aus einer Blockierung von Thiol-Gruppen durch Anhängen eines CH-Restes an die SH-Gruppe (ROGERS et al. 2006). Sollten sich in den Substratbindungstaschen sowohl des SGLT1 als auch des GLUT2 Aminosäuren mit

Thiolgruppen befinden, wäre eine Beeinflussung der Substratspezifität der Transporter durch NEM möglich.

Aminosäuren, die für die Glukoseerkennung und -bindung eine Rolle spielen sind beim SGLT1 Arginin (R499), Glutamin (Q457) und Threonin (T460). Weitere Aminosäuren sind indirekt in den Glukosetransport involviert. Bei diesen handelt es sich um Tyrosin (Y462, Y506 und Y526), Tryptophan (W440), Serin (S458) und Histidin (H525) (HIRAYAMA et al. 2007). Beim GLUT2 sind das QLS-Motiv in Schleife 7 (Glutamin, Leucin, Serin), das STSIF-Motiv in Schleife 7 (Serin, Threonin, Serin, Isoleucin, Phenylalanin) sowie Tryptophan 388 und Glutamin 161 in Schleife 5 wichtig für die Substratspezifität des Transporters (Joost u. Thorens 2001). Keiner der beiden Transporter besitzt in der substratbindenden Region eine thiolgruppenhaltige Aminosäure, welche durch NEM beeinflusst werden könnte. Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass NEM an Hydroxylgruppen eine Störung der Phosphorylierung verursacht, was wiederum zu einer Inaktivierung entsprechender Proteine führt (LAXMINARAYANA et al. 2002, HUMPHRIES et al. 2005). Auch der SGLT1 und der GLUT2 weisen in ihren Substratbindungstaschen Aminosäuren mit OH-Gruppen auf (v.a. Serin und Threonin), welche einen Ansatzpunkt für NEM darstellen könnten. Durch eine Störung der Phosphorylierung dieser Aminosäuren könnte es zu einer Inaktivierung oder auch zu einer Änderung der Substratspezifität der Transportproteine kommen. Dieser Mechanismus könnte eine Erklärung sowohl für den festgestellten phloretin- und phlorizinabhängigen Mannit-Uptake als auch für die Auslöschung des glukoseinduzierten Natrium-Cotransportes sein. Es wären weiterführende Untersuchungen notwendig, um diese Hypothese weiter einzugrenzen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auf den phloretin- und phlorizininsensitiven Glukose-Uptake weder Chlorpromazin noch N-Ethylmaleimid einen Einfluss ausübten. Folglich konnte eine Endozytose als Ursache des phloretin- und phlorizininsensitiven Uptakes mit dieser Versuchseinstellung nicht gezeigt werden. Demgegenüber lieferten die Untersuchungen Hinweise darauf, dass der Einbau des GLUT2 in die apikale Zellmembran durch einen Clathrin-abhängigen Vesikeltransport realisiert wird (vgl. Kap.5.1.2). N-Ethylmaleimid, ein Hemmstoff der Endo- und Exozytose, war in der Lage, die Transportaktivität und die Substratspezifität apikaler Glukosetransportproteine zu modulieren.

5.3 PARAZELLULÄRER GLUKOSETRANSPORT

Nachdem die Endozytose nicht als Transportweg für den phloretin- und phlorizininsensitiven Glukose-Uptake bestätigt werden konnte, sollte untersucht werden, welche Rolle der parazelluläre Glukosetransport spielt. Entsprechend der Pappenheimer-Hypothese erfolgt der Massenflux von Glukose bei hohen luminalen Konzentrationen als parazelluläre Diffusion (PAPPENHEIMER u. REISS 1987). Mannit gilt als Marker für den parazellulären Transport, da nach bisheriger Auffassung Mannit am Darmepithel fast ausschließlich auf parazellulärem Weg transportiert wird (HAYDEN u. CAREY 2000; KIERBEL et al. 2000). In Abb. 5 (Kap 4.2.1) ist in der obersten Darstellung zu sehen, dass weder Phloretin allein noch Phloretin und Phlorizin in Kombination einen Einfluss auf die Mannitaufnahme hatten. Dies deutet darauf hin, dass Mannit weder durch den SGLT1 noch durch den apikalen GLUT2 transportiert wird. Allerdings lässt sich daraus noch nicht schließen, dass Mannit ausschließlich parazellulär transportiert wird.

Hinweise zum parazellulären Transport von Glukose bietet der Vergleich der Glukoseaufnahme mit der parallel dazu gemessenen Mannitaufnahme. Da Glukose und Mannit annähernd die gleiche Molekülgröße und -masse besitzen, wäre für beide Substanzen bei parazellulärem Transport ein ähnliches Verhalten zu erwarten.

In Kap. 4.1.3 (Abb. 9) wurden die Mannit- und Glukoseaufnahme in Anwesenheit der Hemmstoffe Phloretin und Phlorizin miteinander verglichen. Dabei war die Mannitaufnahme in das Epithel fast über den kompletten Zeitraum von 20 Minuten signifikant niedriger als die Glukoseaufnahme (Abb. 9). Auffällig stellte sich das Verhältnis zwischen Glukose- und Mannit-Uptake dar, welches während der gesamten 20 Minuten konstant 1:0,65 betrug. Dies deutet darauf hin, dass Glukose und Mannit möglicherweise über einen identischen Mechanismus transportiert werden. Allerdings scheint dieser Mechanismus eine unterschiedliche Spezifität für Mannit und Glukose zu besitzen.

Auffällig war auch, dass zwischen den Glukose- und Mannitaufnahmen (Abb. 9) und den dazugehörigen Glukose- und Mannit-Fluxen (Abb. 10) eine beträchtliche numerische Diskrepanz bestand. Auch erschienen Mannit und Glukose erst nach ca. 10 Minuten auf der serosalen Epithelseite. Somit scheint das Epithel über eine beträchtliche Speicherfähigkeit sowohl für Glukose als auch für Mannit zu verfügen. Allerdings lässt sich aus diesen Befunden noch nicht ableiten, ob es sich bei der Glukose- und Mannitanreicherung im Epithel wirklich um eine intrazelluläre Akkumulation handelt oder ob die Glukose sich nur in den parazellulären und subepithelialen Bereichen ansammelt.

Auffällig war, dass Glukose- und Mannit-Flux bei gehemmten SGLT1 und GLUT nicht wie bei der Aufnahme in das Epithel in einem Verhältnis von 1:0,65 zueinander standen, sondern nahezu 1:1 durch das Epithel transportiert wurden (vgl. Abb. 10). Daraus lässt sich schließen, dass der Weg, auf dem der Übertritt der beiden Substrate von mukosal nach serosal erfolgte, verschieden war von dem Weg, über den die größte Menge an Glukose und Mannit in das Epithel aufgenommen wurde. Eine Charakterisierung des Glukose- und Mannit-Fluxes konnte in der vorliegenden Studie durchgeführt werden. Die deutlich bestehenden Korrelationen zwischen phloretin- und phlorizin-insensitivem Glukose-Flux und Gewebeleitfähigkeit (Kap. 4.1.4, Abb. 15) sprechen eindeutig für eine parazelluläre Permeation der Glukose durch das Epithel. Auch die Gegenüberstellung des Mannit-Fluxes und der Gewebeleitfähigkeit ergab vergleichbare Ergebnisse wie in Abb. 15 (ohne Abb.). Es handelt sich somit sowohl beim Glukose- als auch beim Mannit-Flux um einen vorrangig parazellulär stattfindenden Übertritt, wenn apikaler SGLT1 und GLUT gehemmt sind.

Die Kapazität des parazellulären Fluxes sowohl der Glukose als auch des Mannits ist als gering anzusehen, verglichen mit den Aufnahmekapazitäten in das Epithel. Während der Flux der beiden Substrate vorwiegend parazellulär stattfand, wurde die Aufnahme der Glukose und des Mannits nicht auf parazellulärem Wege realisiert. Wie in Abb. 14 erkennbar, bestand zwischen der Glukoseaufnahme in das Epithel und der Gewebeleitfähigkeit keine Korrelation. Da die Gewebeleitfähigkeit als Maß für den parazellulären Transport anzusehen ist, konnte in der vorliegenden Studie eine parazelluläre Ansammlung als Grund für die Glukoseakkumulation im Epithelgewebe weitgehend ausgeschlossen werden. Setzte man die Gewebeleitfähigkeiten zu den Mannitaufnahmen in Beziehung (ohne Abbildung), so waren auch keine Korrelationen feststellbar. Dies führt zu der Annahme, dass auch Mannit in die Zellen aufgenommen wurde. Bisher wurde Mannit als Marker für den parazellulären Transport propagiert (HAYDEN u. CAREY 2000; KIERBEL et al. 2000), jedoch konnten schon MA et al. (1993) sowie ASCHENBACH et al. (2003) Hinweise darauf finden, dass Mannit nicht ausschließlich parazellulär sondern zu einem gewissen Teil auch transzellulär durch das Epithel transportiert wird. Auch die vorliegende Studie lieferte Hinweise, dass Mannit nicht ausschließlich parazellulär transportiert wird. Genauere Mechanismen des transzellulären Mannittransportes sind bisher nicht bekannt, allerdings könnten endozytotische oder vesikuläre Transportmechanismen eine Rolle spielen (MA et al. 1993).

5.4 GLUKOSEAUFNAHME ÜBER „ALTERNATIVE“ MECHANISMEN

Nachdem sowohl die Endozytose (Kap. 5.2) als auch der parazelluläre Transport (Kap. 5.3) nicht als Hauptweg für den phloretin- und phlorizininsensitiven Glukose-Uptake bestätigt werden konnten, wurde die Beteiligung weiterer „alternativer“ Mechanismen an der Glukoseaufnahme untersucht.

Trotz Hemmung des apikalen SGLT1 und GLUT kam es in den Untersuchungen des Kapitels 4.1.3 zu einer Aufnahme und anschließenden Akkumulation von Glukose und Mannit im Epithelgewebe (Abb. 9). Dies ist ein Hinweis darauf, dass neben der zellulären Aufnahme von Glukose über den SGLT1 und den apikalen GLUT noch ein weiterer Mechanismus existiert, der in der Lage ist, zusätzlich zu Glukose auch Mannit in die Zellen zu transportieren.

Folgende nicht durch Phlorizin und Phloretin hemmbare Mechanismen könnten hierfür in Betracht gezogen werden:

1. Kanäle in der apikalen Membran transportieren mit unterschiedlicher Spezifität Glukose und Mannit in die Zellen;
2. Glukose und Mannit werden mit unterschiedlicher Affinität mittels Endozytose in die Epithelzellen aufgenommen;
3. Ein weiterer durch Phloretin nicht hemmbarer apikaler GLUT transportiert Glukose und Mannit.

Kanäle, die in der Lage sind, Monosaccharide zu transportieren, sind bei Säugetieren bisher nicht beschrieben worden. Allerdings existieren in einigen Bakterien wie z. B. in *Escherichia coli* transmembranale Kanäle, die einen recht großen Durchmesser besitzen und gelöste Mono- und teilweise auch Disaccharide in die Zelle transportieren können (LUCKEY u. NIKAIDO 1980; MARTIN-VERSTRAETE et al. 1996).

Auch bei Vertebraten existieren Proteine, sogenannte Connexine, welche in Gap junctions Kanäle formen, die einen Transfer von kleinen Metaboliten zwischen Zellen ermöglichen (ELFGANG et al. 1995). Einige dieser Connexine wie z.B. Connexin 43 sind auch in der Lage, Glukose zu transferieren (GOLDBERG et al. 1999; GOLDBERG et al. 2004). MINEO et al. konnten 2004 nachweisen, dass vor allem unverdauliche Saccharide die Permeabilität von Connexinen modifizieren können. Um zu untersuchen, ob möglicherweise Connexine oder andere Kanäle an der Aufnahme von Glukose und Mannit in das Dünndarmepithel von Schweinen beteiligt sein könnten, wurden weitere Ussing-Kammer-Versuche mit unterschiedlichen Kohlenhydraten und Kohlenhydratderivaten durchgeführt (vgl. Kap. 4.1.4). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass der phloretin- und phlorizininsensitive Anteil der Glukoseaufnahme, wenn auch nur im geringen Maße, prinzipiell modulierbar war. So führte z.B. die Anwesenheit hoher Konzentrationen von Cellobiose oder Serin zu einer signifikant niedrigeren Glukose-Aufnahme als die Anwesenheit von Sorbitol (Abb. 12). Auf das Verhältnis von Glukose- zu Mannitaufnahme bzw. auf den Glukose- und Mannit-Flux hatten die verschiedenen Kohlenhydrate und Kohlenhydratderivate keinen Einfluss. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass nicht metabolisierbare Saccharide oder auch die OH-Gruppen-haltige Aminosäure Serin einen gewissen Einfluss auf die phloretin- und phlorizininsensitive Glukose- und Mannitaufnahme haben. An welchen molekularen Strukturen dieser Einfluss realisiert wird, konnte jedoch nicht weiter eingegrenzt werden. Kanalstrukturen kommen aber angesichts der bereits analysierten fehlenden Korrelation von Glukose- und Mannituptake und G_t eher nicht in Betracht. Alternativ wurde die mögliche Beteiligung endozytotischer Vorgänge an der Glukoseaufnahme bereits in Kap. 5.1.2 diskutiert. Prinzipiell könnte der hemmende Einfluss anderer Kohlenhydrate auch auf eine Interferenz bei der Bindung an endozytotische Strukturen beruhen. Die diesbezüglich durchgeführten Untersuchungen ergaben jedoch nur Hinweise, dass bei der Insertion des GLUT2 in die apikale Zellmembran Clathrin-gebundene Endozytosevorgänge involviert sind.

Eine direkte Beteiligung der Endozytose an der Glukose- und Mannitaufnahme konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden (vgl. Kap. 5.2). Allerdings scheint N-Ethylmaleimid, ein Hemmstoff der Endo- und Exozytose, in der Lage zu sein, die Transportaktivität und die Substratspezifität apikaler Glukosetransportproteine zu modulieren.

Eine Aufnahme der Glukose und des Mannits über einen weiteren, nicht durch Phloretin hemmbaren GLUT, wäre durchaus möglich, auch wenn bisher in der Literatur kein mit der Michaelis-Menten-Kinetik kompatibler Transport für Mannit beschrieben wurde. Als wahrscheinlichster Kandidat für den Glukose- und eventuell auch den Mannittransport käme der GLUT8 in Frage, welcher eine sehr breite Substratspezifität hat. Glukose, Fruktose und Galaktose stellen Substrate für den GLUT8 dar, so dass er durchaus auch noch andere Hexosen transportieren könnte (IBBERSON et al. 2000). Obwohl der GLUT8 scheinbar nicht notwendig für die Regulation der Glukose-Homöostase ist, so gibt es doch Hinweise darauf, dass er an deren Regulation beteiligt ist. ADASTRA et al. (2012) vermuten, dass die Expression des GLUT8 die Expression anderer GLUT im Darm beeinflussen könnte. Weitere Studien sind nötig, um die Funktion des GLUT8 näher beschreiben zu können.

5.5 MÖGLICHE BEDEUTUNG DER mRNA-VORKOMMEN VERSCHIEDENER PASSIVER GLUKOSETRANSPORTER SOWIE DES SGLT1 IM PROXIMALEN JEJUNUM UND ANDEREN FÜR DEN GLUKOSEMETABOLISMUS BEDEUTENDEN ORGANEN

In Kapitel 4.3 konnte eine Vielzahl an Glukosetransportern auf mRNA-Ebene im proximalen Jejunum nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden auch Organe, die für die Glukosehomöostase im Organismus von Bedeutung sind (Leber, Niere, Skelettmuskulatur) mit in das Screening einbezogen. In den folgenden Abschnitten werden zunächst vorrangig die mRNA-Vorkommen im proximalen Jejunum diskutiert, da die entsprechenden Glukosetransporter maßgeblich an der Glukoseresorption im Dünndarm beteiligt sein könnten. Die mRNA-Vorkommen in Leber, Niere und Skelettmuskulatur werden anschließend nur kurz diskutiert. Allerdings sei hier noch einmal erwähnt, dass von dem Vorhandensein der mRNA nicht automatisch auf eine Expression und Membranintegration des Proteins in dem entsprechenden Organ geschlossen werden kann, so dass die funktionelle Relevanz der identifizierten Transporter hier nur hypothetisch diskutiert werden kann.

5.5.1 mRNA-Vorkommen verschiedener Glukosetransporter im proximalen Jejunum

SGLT1

Es ist bekannt und ausreichend belegt, dass der SGLT1 in vielen Spezies das wichtigste Na⁺-gekoppelte Importprotein für Glukose (und Galaktose) in der apikalen Membran der Enterozyten darstellt (MARTIN et al. 1996; THORENS 1996; GARRIGA et al. 1999; WRIGHT et al. 2007; MORAN et al. 2010; HERRMANN et al. 2012). Auch in den durchgeführten Versuchen konnte die mRNA des SGLT1 eindeutig detektiert werden und zeigte im proximalen Jejunum im Vergleich zu den anderen 3 Organen das stärkste Signal (ASCHENBACH et al. 2009).

GLUT1

Der Nachweis des GLUT1 im proximalen Jejunum deckt sich mit der Tatsache, dass für die Versuche junge Schweine genutzt wurden (ASCHENBACH et al. 2009). Der GLUT1 repräsentiert den typischen basolateralen Glukosecarrier in der Colonkarzinom-Zelllinie Caco-2 (HARRIS et al. 1992) und ist ein Indikator für einen noch nicht voll ausgereiften Darm (DAVIDSON et al. 1992; ANDERLE et al. 2003).

GLUT2

Erwartungsgemäß konnte die mRNA im proximalen Jejunum des Schweins nachgewiesen werden (ASCHEBACH et al. 2009). Der passive Glukosetransporter GLUT2 wird bei höheren luminalen Glukosekonzentrationen in die apikale Enterozytenmembran eingebaut. Dort transportiert er mit niedriger Affinität aber hoher Kapazität Glukose und andere Hexosen in die Zelle (LETURQUE et al. 2005; KELLETT et al. 2008; MACE et al. 2009). Dieser Vorgang wird durch den apikalen SGLT1 induziert. Weiterhin verlassen intrazellulär akkumulierte Hexosen wie Glukose, Galaktose, Fruktose und Mannose die Zellen über einen basolateral lokalisierten GLUT2 (PINCHES et al. 1993; THORENS 1996; LETURQUE et al. 2005).

GLUT3

Laut Literatur kommt die mRNA des GLUT3 nahezu ubiquitär vor. Bisher wurde beim Schwein weder die mRNA des GLUT3 noch das Protein des Transporters im Darm nachgewiesen. Im Jahr 2012 wurden zwei Klonierungsprodukte des pGLUT3 veröffentlicht (AK399451.1, AK389853.1), welche bis auf jeweils eine SNP mit der eigenen Sequenz (FJ209733.1) identisch sind. Das Protein des GLUT3 konnte im Jejunum bisher weder beim Schwein noch bei anderen Spezies nachgewiesen werden. BISSONNETTE et al. (1996) wiesen zwar das Protein in der Bürstensaummembran von Zellen der Caco-2-Zelllinie nach, allerdings kann man diese Zellen nicht als Äquivalente zu normalen Enterozyten betrachten. Wie schon der GLUT1 ist auch der GLUT3 ein Indikator für einen nicht voll ausgereiften Darm (DAVIDSON et al. 1992; ANDERLE et al. 2003). Bisher gibt es demnach weder Hinweise auf eine Expression des GLUT3-Proteins noch auf eine mögliche Funktion des GLUT3 im Jejunum.

GLUT4

Der im Jejunum nur schwer detektierbare GLUT4 scheint laut Literatur keine funktionelle Rolle im porzinen Darm zu spielen (ASCHEBACH et al. 2009). Eine mögliche Erklärung für den sehr schwachen Nachweis von mRNA des GLUT4 im Jejunum könnte das Vorhandensein von Adipozyten in subepithelialen Schichten des Jejunums sein. In Adipozyten wird der GLUT4 regelmäßig exprimiert (ULDRY u. THORENS 2004).

GLUT5

Erwartungsgemäß konnte die mRNA des GLUT5 im proximalen Jejunum mit einem intensiven Signal nachgewiesen werden (ASCHEBACH et al. 2009). Der GLUT5 spielt eine essentielle Rolle bei der Resorption luminaler Fruktose in die Enterozyten des proximalen Jejunums (THORENS 1996; DOUARD u. FERRARIS 2008; BARONE et al. 2009).

GLUT7

Die mRNA des GLUT7 konnte in den vorliegenden Untersuchungen nur im Jejunum nachgewiesen werden (ASCHEBACH et al. 2009). Der GLUT7 ist sehr nah mit dem GLUT5 verwandt und weist eine hohe Affinität für Glukose und Fruktose auf. Er wird vorrangig in der Bürstensaummembran des Dünndarms und des Colons exprimiert (LI et al. 2004). Allerdings scheint sich die Verteilung des GLUT7 auf die distale Region des Dünndarms, das Ileum, zu beschränken, wo keine hohen Glukose- und Fruktosekonzentrationen mehr vorkommen. Diese Beobachtung spricht dafür, dass der GLUT7 nur eine untergeordnete Rolle bei der quantitativen Glukose- und Fruktoseresorption spielt, allerdings gegen Ende der Mahlzeit, wenn die luminal Konzentration der Hexosen sinkt, an Bedeutung gewinnt (SCHÜRSMANN 2008). Die Fähigkeit des GLUT7, Glukose zu transportieren, ist bisher nur in *Xenopus-laevis*-Oocyten, jedoch noch nicht *in vivo*

nachgewiesen worden (LI et al. 2004). Somit ist es schwierig, vom Vorhandensein der mRNA im proximalen Jejunum auf eine Beteiligung des GLUT7 an der Glukoseresorption zu schließen.

GLUT8

Die mRNA des GLUT8 konnte im proximalen Jejunum nachgewiesen werden. Im Dünndarm konnte die mRNA des GLUT8 bisher sowohl beim Menschen (DOEGE et al. 2000a) als auch beim Rind (ZHAO et al. 2004) und der Maus (ROMERO et al. 2009) nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte nun auch der mRNA-Nachweis im Dünndarm des Schweines. ROMERO et al. konnten 2009 auch das Protein des GLUT8 im Darm der Maus nachweisen. Der GLUT8 befindet sich intrazellulär in den Enterozyten und konnte mittels Immunhistochemie nahe der apikalen Membran lokalisiert werden. Die spezifische Funktion des GLUT8 ist bisher unklar, so dass der Transporter für die zukünftige Forschung sehr von Interesse sein könnte (ASCHENBACH et al. 2009).

GLUT10 und GLUT11

Die mRNA des GLUT10 und des GLUT11 konnten in dieser Arbeit erstmalig im Jejunum nachgewiesen werden. Das Signal für die beiden Transporter lag nahe an der Nachweisgrenze. In der Literatur existieren bisher keine Hinweise darauf, dass der GLUT10 und der GLUT11 im Jejunum von Bedeutung sein könnten. Somit ist davon auszugehen, dass diese beiden Transporter im porzinen Dünndarm keine bzw. eine untergeordnete Rolle spielen (ASCHENBACH et al. 2009).

5.5.2 mRNA-Vorkommen verschiedener Glukosetransporter in der Leber

Der wichtigste für die Leberfunktion relevante Hexosetransporter ist der GLUT2. Er realisiert den Ein- und Ausfluss der Glukose über die basolaterale Membran (LETURQUE et al. 2005). Die Expression des GLUT2 in der Leber wird während der postprandialen hyperglykämischen Phase oder beim Typ 2-Diabetes hochreguliert. Der GLUT2 ist in diese Regulation als Glukosesensor involviert (IM et al. 2005; LETURQUE et al. 2005). In Übereinstimmung mit der Wichtigkeit des Transporters wurde in dieser Arbeit das intensivste Signal mit GLUT2-spezifischen Primern in den Leberproben detektiert.

Trotz der wichtigen Rolle des GLUT2 in der Leber können *knock-out*-Mäuse, denen der Transporter fehlt, überleben. Verschiedene Studien vermuten, dass der Glukoseexport in diesem Fall durch Exozytose realisiert wird (STÜMPEL et al. 2001). Trotz allem ist nicht geklärt, wie in der Abwesenheit des GLUT2 die Glukose in die Leber gelangt. In der vorliegenden Arbeit konnten der GLUT1 und der GLUT8 als potentielle Kandidaten identifiziert werden (ASCHENBACH et al. 2009). Sowohl der GLUT1 (HACKER et al. 1991; THORENS 1996) als auch der GLUT8 (GOROVITS et al. 2003) konnten in der Leber in der perivenösen Region nachgewiesen werden und könnten somit durchaus an der Glukosehomöostase beteiligt sein. Von den nur schwach detektierbaren GLUT in der Leber des Schweines ist der GLUT10 derjenige, dem bisher am meisten Aufmerksamkeit geschenkt wurde, da sein Gen vermutlich in Zusammenhang mit der Anfälligkeit für Diabetes mellitus steht (DAWSON et al. 2001). Verschiedene epidemiologische Studien konnten allerdings keine Beziehung zwischen dem Genotyp des GLUT10 und der Häufigkeit für Diabetes vom Typ 2 nachweisen (BENTO et al. 2005; LIN et al. 2006). Die Expression des GLUT3, GLUT4 und GLUT5 in der Leber wurde in früheren Studien nur selten nachgewiesen. So konnte das Protein des GLUT3 in der humanen Leber nachgewiesen werden (SHEPHERD et al. 1992). Die Hochregulation der mRNA des GLUT4 durch ein Extrakt aus grünem Tee konnte in der Leber der Ratte demonstriert werden (CAO et al. 2007), und die mRNA des GLUT5 konnte in größerer Menge in der Leber des Rindes nachgewiesen werden (ZHAO et

al. 1993). Der Nachweis der mRNA des GLUT11 in der Leber ist in dieser Arbeit bisher beim Schwein das erste Mal erfolgt (ASCHENBACH et al. 2009).

Das Vorkommen des SGLT1 in der Leber wurde schon früher bei Mensch und Ratte beschrieben (LAZARIDIS et al. 1997; BALEN et al. 2008), wobei sich sein Vorkommen auf die Cholangiozyten zu beschränken scheint (BALEN et al. 2008).

5.5.3 mRNA-Vorkommen verschiedener Glukosetransporter in der Niere

Die Rückresorption der Glukose aus dem renalen Filtrat erfolgt zu 100 % im proximalen Tubulus durch einen Na⁺-gekoppelten Import über die apikale Membran und den basolateralen Export über einen GLUT. Allerdings ändern sich die Isoformen der Transporter im Verlauf der Tubuli. Während im Tubulus contortus proximalis niedrigaffine, hochkapazitive Transporter (apikal SGLT2 und basolateral GLUT2) den Großteil der Absorption realisieren, übernehmen im Tubulus rectus proximalis hochaffine, niedrig kapazitive Transporter (apikal SGLT1 und basolateral GLUT1) deren Funktion (THORENS 1996). Der SGLT1 dient auch zur Reabsorption von Galaktose. Der wichtigste apikale Transporter für Fruktose ist der passive GLUT5 (DOUARD u. FERRARIS 2008). In der vorliegenden Arbeit konnten alle erwarteten Transporter in der Niere des Schweins nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass das allgemeingültige Konzept der Hexosereabsorption auch beim Schwein zutrifft (ASCHENBACH et al. 2009).

Weiterhin konnte in dieser Arbeit auch die mRNA von GLUT3, GLUT4 und GLUT8 nachgewiesen werden. Diese Transporter spielen keine Rolle bei der Absorption von D-Glukose, allerdings sichern sie mit dem GLUT1 die basale Glukoseversorgung der Zellen des Glomerulums sowie der Henle-Schleife, des distalen Tubulus und des Sammelrohres (HEILIG et al. 1995; SCHIFFER et al. 2005). Das renale Vorkommen des GLUT10 und des GLUT11 in der Niere des Schwein deckt sich mit dem Vorkommen beim Menschen (DAWSON et al. 2001; SHEEPERS et al. 2005; SUGANUMA et al. 2007), allerdings ist eine funktionelle Bedeutung in der Niere bisher nicht bekannt.

5.5.4 mRNA-Vorkommen verschiedener Glukosetransporter in der Skelettmuskulatur

Die Glukoseaufnahme in die Skelettmuskulatur erfolgt vorrangig über den GLUT1 und den GLUT4. Der insulin-unabhängige Uptake über den GLUT1 scheint bei ruminierenden Tierarten wie Schaf, Ziege und Kamel zu dominieren, während bei monogastrischen Spezies wie dem Schwein und dem Menschen die insulin-abhängige Aufnahme über den GLUT4 vorherrschend ist (GASTER et al. 2000; DUEHLMEIER et al. 2007). Speziell bei monogastrischen Spezies kann die Skelettmuskulatur als ein Insulin-reguliertes Speicherorgan agieren, wenn ein Übermaß an Glukose verfügbar ist (THONG et al. 2005). Die dominierende und wichtige Rolle des GLUT4 spiegelt sich in der vorliegenden Arbeit in einem sehr intensiven Signal für die cDNA des GLUT4 in der Skelettmuskulatur des Schweins wieder (ASCHENBACH et al. 2009).

Beim Menschen und wahrscheinlich auch bei anderen monogastrischen Spezies wie dem Schwein scheint die wichtigste Rolle der insulin-unabhängigen Transporter GLUT1 und GLUT3 eine Reservefunktion zu sein, welche in Zeiten der Muskelregeneration reaktiviert werden kann (GASTER et al. 2000; GASTER et al. 2002). Beide Transporter konnten in der vorliegenden Arbeit nur mit einem schwachen Signal nachgewiesen werden (ASCHENBACH et al. 2009). Der GLUT5, der in der Muskulatur des Schweins nur sehr schwer nachzuweisen war, wurde als passiver D-Fruktose-Transporter in der Skelettmuskulatur des Menschen bereits beschrieben (KRISTIANSEN et al. 1997). Seine Expression erhöht sich beim Diabetes mellitus (DOUARD u. FERRARIS 2008). Der GLUT11 wird vorrangig in Typ-II-Fasern (slow twitch) des Menschen exprimiert (GASTER et al. 2004). Im Gegensatz dazu scheint die

in den eigenen Untersuchungen detektierte mRNA für den GLUT8 und den GLUT10 redundant zu sein, da die mRNA des GLUT10 häufig nicht detektierbar ist (STUART et al. 2006) und der GLUT8 im menschlichen Muskel nicht als funktionelles Protein vorkommt (GASTER et al. 2004).

5.5.5 Zusammenfassende Wertung der mRNA-Vorkommen

In Übereinstimmung mit der Adaptation an stärke- und zuckerreiche Nahrung exprimiert das Schwein eine große Bandbreite an Hexosetransportern in den Schlüsselorganen der Glukosehomöostase. Die systematische Abarbeitung der Transporterexpression sollte mit den zahlreichen, in dieser Studie neugewonnenen Sequenzinformationen eine Grundlage für zukünftige Untersuchungen zur Komplexität und molekularen Basis des porzinen Hexosetransports geben. Die ermittelten porzinen Sequenzen von Glukosetransportproteinen zeigten zusätzlich eine hohe Übereinstimmung zu humanen Sequenzen. Dies spricht für ähnliche Transportcharakteristiken der entsprechenden Proteine und macht so das Schwein zu einem idealen Modelltier zur Erforschung der Glukosehomöostase des Menschen. Ein Beispiel dafür ist der GLUT11, welcher sowohl beim Menschen als auch beim Schwein vorkommt, allerdings beim Nager nicht vorhanden ist (SHEEPERS et al. 2005).

6. Zusammenfassung

Kristina Schenke

Funktionelle und molekularbiologische Untersuchungen zum Glukosetransport am proximalen Jejunum des Schweins

Institut für Veterinär-Physiologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin

Eingereicht im September 2013

110 Seiten, 23 Abbildungen, 4 Tabellen, 275 Literaturstellen, 3 Anhänge

Schweine decken ihren Energiebedarf über kohlenhydratreiche Mahlzeiten. Dies erfordert hocheffiziente Mechanismen der Glukoseresorption im Dünndarm. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Glukoseaufnahme in das proximale Jejunum des Schweins bei höheren luminalen Konzentrationen (6 bis 20 mM) funktionell zu charakterisieren und ein systematisches Screening auf Glukosetransporter-mRNA im porzinen Jejunum sowie in weiteren für die Glukose-Homöostase wichtigen Organen durchzuführen.

Für die Glukoseaufnahmestudien wurde der apikale Uptake von radioaktiv markierter Glukose in das Dünndarmepithel gemessen. Zusätzlich wurden der Kurzschlussstrom und die Leitfähigkeit mit Hilfe der Ussing-Kammer-Technik erfasst. Mögliche Wechselwirkungen der Glukoseresorption mit anderen zellulären Stoffwechselwegen (Glykolyse und Glukoneogenese) und eine mögliche Glukoseresorption über Endozytose wurden überprüft. Durch vergleichende Analysen der Aufnahme bzw. des Fluxes von radioaktiv markiertem Mannit wurde auch die Möglichkeit einer parazellulären Resorption überprüft. Außerdem wurde mittels Zweischnitt-RT-PCR die mRNA verschiedener Glukosetransportproteine im proximalen Jejunum Leber, Niere und Skelettmuskulatur nachgewiesen.

Bei einer Konzentration von 10 mM Glukose hemmten sowohl der kompetitive SGLT1-Hemmstoff Phlorizin (0,1 mM) als auch die GLUT-Hemmstoffe Phloretin (0,2 mM) und Cytochalasin B (0,2 mM) die Glukoseaufnahme in das Epithel. Nach 10- oder 20-minütiger Vorinkubation mit 10 mM Glukose konnte allerdings keiner der Hemmstoffe eine signifikante Hemmung der Glukoseaufnahme erzielen. Mit Hilfe des nach Glukosezugabe (10 mM) stattfindenden Kurzschlussstrom-Anstieges ließ sich eine Transportrate des SGLT1 von etwa 7,5 nmol Glukose pro cm^2 und min errechnen. Die Hemmwirkung des Phlorizins auf die Glukoseaufnahme überstieg diesen Wert jedoch um ein Vielfaches. Chlorpromazin (20 μM), ein Hemmstoff der Clathrin-vermittelten Endozytose, führte zu einem Verschwinden der Phlorizin- und Phloretin-hemmbareren Glukoseaufnahme, während ein Kurzschlussstrom-Anstieg nach Glukosezugabe noch vorhanden war. Sowohl serosal appliziertes Phloretin (0,2 mM) als auch beidseitig angewendetes N-Acetyl-D-Glukosamin (20 mM), ein Hemmstoff der Hexokinase, führten bei einer Konzentration von 20 mM Glukose zu einer verminderten Glukoseaufnahme in das Epithel. Nach Verhinderung einer intrazellulären Laktatanreicherung durch Verwendung laktatfreier Pufferlösung und gleichzeitiger Hemmung der Laktatdehydrogenase mit Na-Oxamat (20 mM), war auch nach mehr als dreistündiger Vorinkubation mit Glukose (6 mM) eine Hemmwirkung von Phlorizin (0,1 mM) auf die Glukoseaufnahme nachweisbar, während mukosal appliziertes Phloretin (0,2 mM) keinen Effekt hatte. Bei Verhinderung der Glukosebildung aus Laktat durch Hemmung des Glukoneogenese-Schlüsselenzyms PEPCK mit 3-Mercaptopicolinsäure (0,2 mM) war ebenfalls nach mehr als dreistündiger Vorinkubation ein Effekt von Phlorizin (0,1 mM) jedoch nicht von Phloretin (0,2 mM) auf die Glukoseaufnahme (6 mM) nachweisbar. Über einen Zeitraum von 20 min erfolgten in Anwesenheit von Phlorizin (0,5 mM) und Phloretin (0,5 mM) die Glukose- und Mannitaufnahmen bei gleicher Konzentration (20 mM) in einem Verhältnis von etwa 1:0,65 zueinander, während deren Fluxe annähernd im Verhältnis 1:1 standen. Die Fluxe (jedoch nicht die Aufnahmen) von Glukose und Mannit

korrelierten mit der Gewebeleitfähigkeit. Im Jejunum konnte die mRNA von SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT5, GLUT7 und GLUT8 nachgewiesen werden; GLUT3, 4, 10 und 11 waren schwach detektierbar. Die Leber enthielt die mRNA von SGLT1, GLUT1, GLUT2 und GLUT8; GLUT3, 4, 5, 10 und 11 waren schwach detektierbar. Die Niere war positiv für SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT5, GLUT8 und GLUT11; GLUT3, 4 und 10 waren schwach detektierbar. Die Skelettmuskulatur war positiv für den GLUT4; GLUT1, 3, 5, 8, 10 und 11 zeigten schwache Signale. Drei neue Gensequenzen porziner GLUT wurden identifiziert.

Der SGLT1 und ein apikaler GLUT, wahrscheinlich der GLUT2 (Kellet-Hypothese), sind an der Glukoseaufnahme in das porzine Dünndarmepithel beteiligt. Der apikale GLUT wird durch den SGLT1 induziert und Clathrin-abhängig eingebaut. Er ermöglicht in den ersten Minuten nach Glukosezugabe eine Anreicherung von Glukose in der Zelle und wird danach inaktiv. Wird die Anreicherung von Glukose im Enterozyten durch intrazelluläre Glukoneogenese und verminderten basolateralen Efflux forciert, sinkt die apikale Glukoseaufnahme. Eine endozytotische Aufnahme von Glukose (oder Mannit) konnte nicht nachgewiesen werden. Es gibt jedoch Hinweise auf eine geringe parazelluläre Resorption und auf einen weiteren Aufnahmemechanismus für Glukose und Mannit. In den für die Glukosehomöostase wichtigen Organen Darm, Leber, Niere und Skelettmuskulatur werden mRNA für verschiedene Transportproteine mit einer gewissen Redundanz exprimiert.

7. Summary

Kristina Schenke

Functional und molecular biological investigations on glucose transport in the proximal jejunum of the pig

Institute of Veterinary Physiology, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin

Submitted in September 2013

110 pages, 23 figures, 4 tables, 275 references, 3 appendices

Pigs cover their energy demand with meals rich in starch and carbohydrates. That requires highly efficient mechanism of glucose absorption in the small intestine. The aim of the present studies was to characterize glucose uptake at higher luminal concentrations (6-20 mM) in proximal jejunum of pig and to undertake a systematic screening for the presence of mRNA of glucose transport proteins in main organs of glucose absorption, production and conservation.

In the glucose uptake studies, apical uptake of radioactively labeled glucose into the epithelial layer of the porcine small intestine was measured. Furthermore, transepithelial short-circuit current and transepithelial conductance were measured by using the Ussing chamber technique. Possible interactions between glucose absorption and other metabolic activities like glycolysis or gluconeogenesis were investigated, as well as the possible involvement of endocytosis in glucose absorption. With comparative studies on uptake and flux of radioactively labeled mannitol, the involvement of paracellular permeation was examined. Finally, the presence of mRNA of glucose transport proteins in main organs of glucose homeostasis like proximal jejunum, liver, kidney and skeletal muscle were investigated via *two-step* RT-PCR.

The competitive SGLT1 inhibitor phlorizin (0.1 mM), as well as GLUT inhibitors phloretin (0.2 mM) and cytochalasin B (0.2 mM), caused significant inhibition of glucose absorption into the epithelium (at 10 mM glucose concentration). 10 or 20 minutes after pre-incubation with glucose (10 mM), none of these inhibitors achieved a significant inhibition of glucose absorption. The increase of short-circuit current after mucosal glucose addition (10 mM) allowed to calculate the transport capacity of SGLT1 (approx. $7.5 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$). The inhibiting effect of phlorizin on glucose uptake was multiple times greater. Chlorpromazin (20 μM), an inhibitor of clathrin-mediated endocytosis, caused disappearance of phlorizin and phloretin inhibited glucose uptake, while the increase of short-circuit current after glucose addition was still evident. Serosally administered phloretin (0.2 mM), as well as bilaterally administered N-acetyl-D-glucosamine (20 mM), a hexokinase inhibitor, led at high glucose concentrations (20 mM) to reduced glucose uptake into the epithelium. After more than 3 hours pre-incubation time with glucose (6 mM) and prevention of intracellular lactate accumulation by using a lactate-free buffer and simultaneous inhibition of lactate dehydrogenase by Na-oxamate (20 mM), phlorizin (0.1 mM) still inhibited glucose uptake, but phloretin (0.2 mM) did not. After more than 3 hours pre-incubation time with glucose (6 mM), avoiding gluconeogenesis from lactate by inhibition of the gluconeogenesis key-enzyme PEPCK via 3-mercaptopycolinic acid (0.2 mM), phlorizin (0.1 mM) but not phloretin (0.2 mM) inhibited glucose uptake, too. Over a period of 20 minutes and in presence of phlorizin (0.5 mM) and phloretin (0.5 mM) glucose and mannitol were taken up into the epithelium at the ratio of 1:0.65 at identical concentrations (20 mM), while the fluxes showed a ratio of 1:1. Fluxes of glucose and mannitol, but not uptakes correlated with transepithelial conductance. The jejunum contained mRNA for SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT5, GLUT7 and GLUT8, while GLUT3, 4, 10 und 11 were also detectable. The liver contained SGLT1,

GLUT1, GLUT2 und GLUT8 mRNA, while GLUT3, 4, 5, 10 and 11 were poorly detectable. The kidney was positive for mRNA of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT5, GLUT8 and GLUT11, but traces of GLUT3, 4 and 10 mRNA could also be detected. Skeletal muscle had the strongest signal for GLUT4 mRNA, while GLUT1, 3, 5, 8, 10 and 11 showed weak signals. Altogether, new porcine gene sequences of 3 glucose transport proteins were identified.

The SGLT1 and an apical GLUT, probably GLUT2 (*Kellett* hypothesis) are involved in glucose uptake in porcine jejunal epithelium. SGLT1 induces the apical GLUT. Furthermore intact assembly of clathrin-coated vesicles seems to be necessary for apical insertion of GLUT2. GLUT2 facilitates intracellular glucose accumulation a few minutes after glucose addition and then becomes inactive. Intracellular glucose accumulation by gluconeogenesis or reduced basolateral glucose exit decreases apical glucose uptake. Endocytotic apical glucose and mannitol uptake was not approved and parazellular absorption played a minor role. There are hints for an additional transport mechanism, which is able to transport mannitol in addition to glucose. In main organs of glucose homeostasis like proximal jejunum, liver, kidney and skeletal muscle, mRNA of different glucose transport proteins are expressed with redundancy.

8. Literaturverzeichnis

Adastra KL, Frolova AI, Chi MM, Cusumano D, Bade M, Carayannopoulos MO, et al. Slc2a8 Deficiency in Mice Results in Reproductive and Growth Impairments. *Biol Reprod* 2012; 87(2):49.

Aerni-Flessner L, Abi-Jaoude M, Koenig A, Payne M, Hruz PW. GLUT4, GLUT1 and GLUT8 are the dominant GLUT transcripts expressed in the murine left ventricle. *Cardiovasc Diabetol* 2012;11:63.

Affleck JA, Helliwell PA, Kellett GL. Immunocytochemical detection of GLUT2 at the rat intestinal brush-border membrane. *J Histochem Cytochem* 2003;51(11):1567-74.

Alpert E, Gruzman A, Totary H, Kaiser N, Reich R, Sasson S. A natural protective mechanism against hyperglycaemia in vascular endothelial and smooth-muscle cells: role of glucose and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid. *Biochem J* 2002;362(Pt 2):413-22.

Anderle P, Rakhmanova V, Woodford K, Zerangue N, Sadee W. Messenger RNA expression of transporter and ion channel genes in undifferentiated and differentiated Caco-2 cells compared to human intestines. *Pharm Res* 2003;20(1):3-15.

Anderson JW. Pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat intestinal mucosa. *Biochim Biophys Acta* 1970;208(1):165-7.

Anderson RG. The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 1998;67:199-225.

Anzai N, Ichida K, Jutabha P, Kimura T, Babu E, Jin CJ, et al. Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter URATv1 (SLC2A9) in humans. *J Biol Chem* 2008;283(40):26834-8.

Aschenbach JR, Seidler T, Ahrens F, Schrodler W, Buchholz I, Garz B, et al. Luminal salmonella endotoxin affects epithelial and mast cell function in the proximal colon of pigs. *Scand J Gastroenterol* 2003;38(7):719-26.

Aschenbach JR, Steglich K, Gabel G, Honscha KU. Expression of mRNA for glucose transport proteins in jejunum, liver, kidney and skeletal muscle of pigs. *Journal of physiology and biochemistry*. 2009 Sep;65(3):251-66.

Asins G, Serra D, Miliar A, Caudevilla C, Matas R, Arias G, et al. Developmental changes in the phospho(enol)pyruvate carboxykinase gene expression in small intestine and liver of suckling rats. *Arch Biochem Biophys* 1996;329(1):82-6.

Au A, Gupta A, Schembri P, Cheeseman CI. Rapid insertion of GLUT2 into the rat jejunal brush-border membrane promoted by glucagon-like peptide 2. *Biochem J* 2002;367(Pt 1):247-54.

Augustin R. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only glucose after all. *IUBMB Life* 2010;62(5):315-33.

- Augustin R, Carayannopoulos MO, Dowd LO, Phay JE, Moley JF, Moley KH. Identification and characterization of human glucose transporter-like protein-9 (GLUT9): alternative splicing alters trafficking. *J Biol Chem* 2004;279(16):16229-36.
- Bach Knudsen KE, Jorgensen H, Canibe N. Quantification of the absorption of nutrients derived from carbohydrate assimilation: model experiment with catheterised pigs fed on wheat- or oat-based rolls. *Br J Nutr* 2000;84(4):449-58.
- Balamurugan K, Ortiz A, Said HM. Biotin uptake by human intestinal and liver epithelial cells: role of the SMVT system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285(1):G73-7.
- Balch WE, Dunphy WG, Braell WA, Rothman JE. Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell* 1984;39(2 Pt 1):405-16.
- Baldwin SA, Lienhard GE. Purification and reconstitution of glucose transporter from human erythrocytes. *Methods Enzymol* 1989;174:39-50.
- Balen D, Ljubojevic M, Breljak D, Brzica H, Zlender V, Koepsell H, et al. Revised immunolocalization of the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 in rat organs with an improved antibody. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;295(2):C475-89.
- Barbieri MA, Li G, Colombo MI, Stahl PD. Rab5, an early acting endosomal GTPase, supports in vitro endosome fusion without GTP hydrolysis. *J Biol Chem* 1994;269(29):18720-2.
- Barone S, Fussell SL, Singh AK, Lucas F, Xu J, Kim C, et al. Slc2a5 (Glut5) is essential for the absorption of fructose in the intestine and generation of fructose-induced hypertension. *J Biol Chem* 2009;284(8):5056-66.
- Basu A, Basu R, Shah P, Vella A, Johnson CM, Nair KS, et al. Effects of type 2 diabetes on the ability of insulin and glucose to regulate splanchnic and muscle glucose metabolism: evidence for a defect in hepatic glucokinase activity. *Diabetes* 2000;49(2):272-83.
- Beckers CJ, Block MR, Glick BS, Rothman JE, Balch WE. Vesicular transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi stack requires the NEM-sensitive fusion protein. *Nature* 1989;339(6223):397-8.
- Bento JL, Bowden DW, Mychaleckyj JC, Hiraakawa S, Rich SS, Freedman BI, et al. Genetic analysis of the GLUT10 glucose transporter (SLC2A10) polymorphisms in Caucasian American type 2 diabetes. *BMC Med Genet* 2005;6:42.
- Berglund JJ, Riegler M, Zolotarevsky Y, Wenzl E, Turner JR. Regulation of human jejunal transmucosal resistance and MLC phosphorylation by Na⁽⁺⁾-glucose cotransport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281(6):G1487-93.
- Bissonnette P, Gagne H, Coady MJ, Benabdallah K, Lapointe JY, Berteloot A. Kinetic separation and characterization of three sugar transport modes in Caco-2 cells. *Am J Physiol* 1996;270(5 Pt 1):G833-43.

Blakemore SJ, Aledo JC, James J, Campbell FC, Lucocq JM, Hundal HS. The GLUT5 hexose transporter is also localized to the basolateral membrane of the human jejunum. *Biochem J* 1995;309 (Pt 1):7-12.

Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, et al. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 2006;80(14):6964-72.

Boudry G, Lalles JP, Malbert CH, Grondahl ML, Unmack MA, Skadhauge E. Soybean impairs Na(+)-dependent glucose absorption and Cl⁻ secretion in porcine small intestine. *Reprod Nutr Dev* 2003;43(5):409-18.

Boyer S, Sharp PA, Debnam ES, Baldwin SA, Srani SK. Streptozotocin diabetes and the expression of GLUT1 at the brush border and basolateral membranes of intestinal enterocytes. *FEBS Lett* 1996;396(2-3):218-22.

Brooks GA, Dubouchaud H, Brown M, Sicurello JP, Butz CE. Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(3):1129-34.

Broughton CW, Lecce JG. Electron-microscopic studies of the jejunal epithelium from neonatal pigs fed different diets. *J Nutr* 1970;100(4):445-9.

Brown K, Heller DS, Zamudio S, Illsley NP. Glucose transporter 3 (GLUT3) protein expression in human placenta across gestation. *Placenta* 2011;32(12):1041-9.

Burant CF, Flink S, DePaoli AM, Chen J, Lee WS, Hediger MA, Buse JB, Chang EB. Small intestine hexose transport in experimental diabetes: increased transporter mRNA and protein expression in enterocytes. *J Clin Invest* 1994; 93(2):578–85.

Burcelin R, Dolci W, Thorens B. Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT2-dependent: in vivo analysis in GLUT2-null mice. *Diabetes* 2000;49(10):1643-8.

Burcelin R, Thorens B. Evidence that extrapancreatic GLUT2-dependent glucose sensors control glucagon secretion. *Diabetes* 2001;50(6):1282-9.

Cao H, Hininger-Favier I, Kelly MA, Benaraba R, Dawson HD, Coves S, et al. Green tea polyphenol extract regulates the expression of genes involved in glucose uptake and insulin signaling in rats fed a high fructose diet. *J Agric Food Chem* 2007;55(15):6372-8.

Carayannopoulos MO, Chi MM, Cui Y, Pingsterhaus JM, McKnight RA, Mueckler M, et al. GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(13):7313-8.

Carayannopoulos MO, Schlein A, Wyman A, Chi M, Keembiyehetty C, Moley KH. GLUT9 is differentially expressed and targeted in the preimplantation embryo. *Endocrinology* 2004;145(3):1435-43.

Caulfield MJ, Munroe PB, O'Neill D, Witkowska K, Charchar FJ, Doblado M, et al. SLC2A9 is a high-capacity urate transporter in humans. *PLoS Med* 2008;5(10):e197.

- Cermak R, Landgraf S, Wolfram S. Quercetin glucosides inhibit glucose uptake into brush-border-membrane vesicles of porcine jejunum. *Br J Nutr* 2004;91(6):849-55.
- Chakrabarti R, Buxton J, Joly M, Corvera S. Insulin-sensitive association of GLUT-4 with endocytic clathrin-coated vesicles revealed with the use of brefeldin A. *J Biol Chem* 1994;269(11):7926-33.
- Chatelain F, Pegorier JP, Minassian C, Bruni N, Tarpin S, Girard J, et al. Development and regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in rat liver, intestine, and kidney: in vivo and in vitro studies in cultured fetal hepatocytes. *Diabetes* 1998;47(6):882-9.
- Chatterjee S, Cao S, Peterson TE, Simari RD, Shah V. Inhibition of GTP-dependent vesicle trafficking impairs internalization of plasmalemmal eNOS and cellular nitric oxide production. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 17):3645-55.
- Chaudhry RM, Scow JS, Madhavan S, Duenes JA, Sarr MG. Acute enterocyte adaptation to luminal glucose: a posttranslational mechanism for rapid apical recruitment of the transporter GLUT2. *J Gastrointest Surg* 2012; 16(2):312-9; discussion 319.
- Cheeseman C. GLUT7: a new intestinal facilitated hexose transporter. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2008 Aug;295(2):E238-41.
- Cherbuy C, Darcy-Vrillon B, Posho L, Vaugelade P, Morel MT, Bernard F, et al. GLUT2 and hexokinase control proximodistal gradient of intestinal glucose metabolism in the newborn pig. *Am J Physiol* 1997;272(6 Pt 1):G1530-9.
- Chretien D, Pourrier M, Bourgeron T, Sene M, Rotig A, Munnich A, et al. An improved spectrophotometric assay of pyruvate dehydrogenase in lactate dehydrogenase contaminated mitochondrial preparations from human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 1995;240(2):129-36.
- Clayburgh DR, Rosen S, Witkowski ED, Wang F, Blair S, Dudek S, et al. A differentiation-dependent splice variant of myosin light chain kinase, MLCK1, regulates epithelial tight junction permeability. *J Biol Chem* 2004;279(53):55506-13.
- Coady MJ, Wallendorff B, Gagnon DG, Lapointe JY. Identification of a novel Na⁺/myo-inositol cotransporter. *J Biol Chem* 2002;277(38):35219-24.
- Coggan AR, Coyle EF. Effect of carbohydrate feedings during high-intensity exercise. *J Appl Physiol* 1988;65(4):1703-9.
- Cohen G, Riahi Y, Alpert E, Gruzman A, Sasson S. The role of hyperglycaemia and oxidative stress in the rise and collapse of the natural protective mechanism against vascular endothelial cell dysfunction in diabetes. *Arch Physiol Biochem* 2007;113(4-5):259-67.
- Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003;422(6927):37-44.
- Corpe CP, Basaleh MM, Affleck J, Gould G, Jess TJ, Kellett GL. The regulation of GLUT5 and GLUT2 activity in the adaptation of intestinal brush-border fructose transport in diabetes. *Pflugers Arch* 1996;432(2):192-201.

- Cortes A, Cascante M, Cardenas ML, Cornish-Bowden A. Relationships between inhibition constants, inhibitor concentrations for 50% inhibition and types of inhibition: new ways of analysing data. *Biochem J* 2001;357(Pt 1):263-8.
- Crane RK. Digestion and absorption: water-soluble organics. *Int Rev Physiol* 1977;12:325-65.
- Cui XL, Jiang L, Ferraris RP. Regulation of rat intestinal GLUT2 mRNA abundance by luminal and systemic factors. *Biochim Biophys Acta* 2003;1612(2):178-85.
- Cura AJ, Carruthers A. The role of Monosaccharide Transport Proteins in carbohydrate assimilation, distribution, metabolism and homeostasis. *Compr Physiol* 2012;2(2):863-914.
- Darcy-Vrillon B, Posho L, Morel MT, Bernard F, Blachier F, Meslin JC, et al. Glucose, galactose, and glutamine metabolism in pig isolated enterocytes during development. *Pediatr Res* 1994;36(2):175-81.
- Davidson NO, Hausman AM, Ifkovits CA, Buse JB, Gould GW, Burant CF, et al. Human intestinal glucose transporter expression and localization of GLUT5. *Am J Physiol* 1992;262(3 Pt 1):C795-800.
- Dawson PA, Mychaleckyj JC, Fossey SC, Mihic SJ, Craddock AL, Bowden DW. Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Mol Genet Metab* 2001;74(1-2):186-99.
- Debnam ES, Ebrahim HY, Swaine DJ. Diabetes mellitus and sugar transport across the brush-border and basolateral membranes of rat jejunal enterocytes. *J Physiol* 1990;424:13-25.
- Debnam ES, Levin RJ. An experimental method of identifying and quantifying the active transfer electrogenic component from the diffusive component during sugar absorption measured in vivo. *J Physiol* 1975;246(1):181-96.
- DeBosch BJ, Chi M, Moley KH. Glucose transporter 8 (GLUT8) regulates enterocyte fructose transport and global mammalian fructose utilization. *Endocrinology* 2012;153(9):4181-91.
- Diaz R, Mayorga LS, Weidman PJ, Rothman JE, Stahl PD. Vesicle fusion following receptor-mediated endocytosis requires a protein active in Golgi transport. *Nature* 1989;339(6223):398-400.
- Diez-Sampedro A, Wright EM, Hirayama BA. Residue 457 controls sugar binding and transport in the Na(+)/glucose cotransporter. *J Biol Chem* 2001;276(52):49188-94.
- Doerge H, Bocianski A, Joost HG, Schurmann A. Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochem J* 2000;350 Pt 3:771-6.
- Doerge H, Bocianski A, Scheepers A, Axer H, Eckel J, Joost HG, et al. Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem J* 2001;359(Pt 2):443-9.

- Doege H, Schurmann A, Bahrenberg G, Brauers A, Joost HG. GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J Biol Chem* 2000;275(21):16275-80.
- Douard V, Ferraris RP. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295(2):E227-37.
- Duan C, Goldberg E. Inhibition of lactate dehydrogenase C4 (LDH-C4) blocks capacitation of mouse sperm in vitro. *Cytogenet Genome Res* 2003;103(3-4):352-9.
- Duehlmeier R, Sammet K, Widdel A, von Engelhardt W, Wernery U, Kinne J, et al. Distribution patterns of the glucose transporters GLUT4 and GLUT1 in skeletal muscles of rats (*Rattus norvegicus*), pigs (*Sus scrofa*), cows (*Bos taurus*), adult goats, goat kids (*Capra hircus*), and camels (*Camelus dromedarius*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007;146(2):274-82.
- Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Frate H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, et al. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 1995;129(3):805-17.
- Eskandari S, Wright EM, Loo DD. Kinetics of the reverse mode of the Na⁺/glucose cotransporter. *J Membr Biol* 2005;204(1):23-32.
- Ferraris RP, Yasharpour S, Lloyd KC, Mirzayan R, Diamond JM. Luminal glucose concentrations in the gut under normal conditions. *Am J Physiol* 1990;259(5 Pt 1):G822-37.
- Fittipaldi A, Ferrari A, Zoppe M, Arcangeli C, Pellegrini V, Beltram F, et al. Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *J Biol Chem* 2003;278(36):34141-9.
- Foley LH, Wang P, Dunten P, Ramsey G, Gubler ML, Wertheimer SJ. Modified 3-alkyl-1,8-dibenzylxanthines as GTP-competitive inhibitors of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13(20):3607-10.
- Foster JD, Bode AM, Nordlie RC. Time-dependent inhibition of glucose 6-phosphatase by 3-mercaptopycolinic acid. *Biochim Biophys Acta* 1994;1208(2):222-8.
- Fujita Y, Kojima H, Hidaka H, Fujimiya M, Kashiwagi A, Kikkawa R. Increased intestinal glucose absorption and postprandial hyperglycaemia at the early step of glucose intolerance in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Diabetologia* 1998;41(12):1459-66
- Gallant DJ, Bouchet B, Buleon A, Perez S. Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. *Eur J Clin Nutr* 1992;46 Suppl 2:S3-16.
- Garriga C, Rovira N, Moreto M, Planas JM. Expression of Na⁺-D-glucose cotransporter in brush-border membrane of the chicken intestine. *Am J Physiol* 1999;276(2 Pt 2):R627-31.
- Gaster M, Beck-Nielsen H, Schroder HD. Regenerating human muscle fibres express GLUT3 protein. *Pflugers Arch* 2002;445(1):105-14.

Gaster M, Franch J, Staehr P, Beck-Nielsen H, Smith T, Schroder HD. Induction of GLUT-1 protein in adult human skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279(5):E1191-5.

Gaster M, Handberg A, Schurmann A, Joost HG, Beck-Nielsen H, Schroder HD. GLUT11, but not GLUT8 or GLUT12, is expressed in human skeletal muscle in a fibre type-specific pattern. *Pflugers Arch* 2004;448(1):105-13.

Georg P, Kautzky-Willer A, Mahdjoobian K, Hofer A, Prager R, Pacini G, et al. Influence of metabolic control on splanchnic glucose uptake, insulin sensitivity, and the time required for glucose absorption in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25(11):2042-7.

Gerardi-Laffin C, Delque-Bayer P, Sudaka P, Poiree JC. Oligomeric structure of the sodium-dependent phlorizin binding protein from kidney brush-border membranes. *Biochim Biophys Acta* 1993;1151(1):99-104.

Girard J, Ferre P, Pegorier JP, Duee PH. Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. *Physiol Rev* 1992;72(2):507-62.

Gogia A, Agarwal PK. Metabolic syndrome. *Indian J Med Sci* 2006;60(2):72-81.

Goldberg GS, Lampe PD, Nicholson BJ. Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins. *Nat Cell Biol* 1999;1(7):457-9.

Goldberg GS, Valiunas V, Brink PR. Selective permeability of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta* 2004;1662(1-2):96-101.

Gorovits N, Cui L, Busik JV, Ranalletta M, Hauguel de-Mouzon S, Charron MJ. Regulation of hepatic GLUT8 expression in normal and diabetic models. *Endocrinology*. 2003 May;144(5):1703-11.

Gould GW, Holman GD. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J* 1993;295 (Pt 2):329-41.

Gouyon F, Caillaud L, Carriere V, Klein C, Dalet V, Citadelle D, et al. Simple-sugar meals target GLUT2 at enterocyte apical membranes to improve sugar absorption: a study in GLUT2-null mice. *J Physiol* 2003;552(Pt 3):823-32.

Guo W, Sacher M, Barrowman J, Ferro-Novick S, Novick P. Protein complexes in transport vesicle targeting. *Trends Cell Biol* 2000;10(6):251-5.

Haber RS, Weinstein SP, O'Boyle E, Morgello S. Tissue distribution of the human GLUT3 glucose transporter. *Endocrinology* 1993;132(6):2538-43.

Hacker HJ, Thorens B, Grobholz R. Expression of facilitative glucose transporter in rat liver and choroid plexus. A histochemical study in native cryostat sections. *Histochemistry* 1991;96(5):435-9.

Hahn P, Smale FA. Phosphoenolpyruvate carboxykinase in the small intestine of developing rodents. *J Nutr* 1982;112(5):986-9.

- Hajduch E, Darakhshan F, Hundal HS. Fructose uptake in rat adipocytes: GLUT5 expression and the effects of streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 1998;41(7):821-8.
- Halaihel N, Gerbaud D, Vasseur M, Alvarado F. Heterogeneity of pig intestinal D-glucose transport systems. *Am J Physiol* 1999;277(6 Pt 1):C1130-41.
- Hansen GH, Rasmussen K, Niels-Christiansen LL, Danielsen EM. Endocytotic trafficking from the small intestinal brush border probed with FM dye. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;297(4):G708-15.
- Hanson PJ, Parsons DS. The utilization of glucose and production of lactate by in vitro preparations of rat small intestine: effects of vascular perfusion. *J Physiol* 1976;255(3):775-95.
- Hanson RW, Reshef L. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem* 1997;66:581-611.
- Harris DS, Slot JW, Geuze HJ, James DE. Polarized distribution of glucose transporter isoforms in Caco-2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(16):7556-60.
- Hayden UL, Carey HV. Neural control of intestinal ion transport and paracellular permeability is altered by nutritional status. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;278(6):R1589-94.
- Heijnen HF, Oorschot V, Sixma JJ, Slot JW, James DE. Thrombin stimulates glucose transport in human platelets via the translocation of the glucose transporter GLUT-3 from alpha-granules to the cell surface. *J Cell Biol* 1997;138(2):323-30.
- Heilig C, Zaloga C, Lee M, Zhao X, Riser B, Brosius F, et al. Immunogold localization of high-affinity glucose transporter isoforms in normal rat kidney. *Lab Invest* 1995;73(5):674-84.
- Helliwell PA, Kellett GL. The active and passive components of glucose absorption in rat jejunum under low and high perfusion stress. *J Physiol* 2002;544(Pt 2):579-89.
- Helliwell PA, Richardson M, Affleck J, Kellett GL. Regulation of GLUT5, GLUT2 and intestinal brush-border fructose absorption by the extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase intracellular signalling pathways: implications for adaptation to diabetes. *Biochem J* 2000;350 Pt 1:163-9.
- Helliwell PA, Richardson M, Affleck J, Kellett GL. Stimulation of fructose transport across the intestinal brush-border membrane by PMA is mediated by GLUT2 and dynamically regulated by protein kinase C. *Biochem J* 2000;350 Pt 1:149-54.
- Helliwell PA, Rumsby MG, Kellett GL. Intestinal sugar absorption is regulated by phosphorylation and turnover of protein kinase C betaII mediated by phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent pathways. *J Biol Chem* 2003;278(31):28644-50.

Herrmann J, Schroder B, Klinger S, Thorenz A, Werner AC, Abel H, et al. Segmental diversity of electrogenic glucose transport characteristics in the small intestines of weaned pigs. *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology*. 2012 Sep;163(1):161-9.

Hirayama BA, Loo DD, Diez-Sampedro A, Leung DW, Meinild AK, Lai-Bing M, et al. Sodium-dependent reorganization of the sugar-binding site of SGLT1. *Biochemistry* 2007;46(46):13391-406.

Hirayama BA, Lostao MP, Panayotova-Heiermann M, Loo DD, Turk E, Wright EM. Kinetic and specificity differences between rat, human, and rabbit Na⁺-glucose cotransporters (SGLT-1). *Am J Physiol* 1996;270(6 Pt 1):G919-26.

Holdsworth CD, Dawson AM. The Absorption Of Monosaccharides In Man. *Clin Sci* 1964;27:371-9.

Humphries KM, Deal MS, Taylor SS. Enhanced dephosphorylation of cAMP-dependent protein kinase by oxidation and thiol modification. *J Biol Chem* 2005;280(4):2750-8.

Ibberson M, Riederer BM, Uldry M, Guhl B, Roth J, Thorens B. Immunolocalization of GLUTX1 in the testis and to specific brain areas and vasopressin-containing neurons. *Endocrinology* 2002;143(1):276-84.

Ibberson M, Uldry M, Thorens B. GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem* 2000;275(7):4607-12.

Im SS, Kang SY, Kim SY, Kim HI, Kim JW, Kim KS, et al. Glucose-stimulated upregulation of GLUT2 gene is mediated by sterol response element-binding protein-1c in the hepatocytes. *Diabetes* 2005;54(6):1684-91.

Jiang YD, Chang YC, Chiu YF, Chang TJ, Li HY, Lin WH, et al. SLC2A10 genetic polymorphism predicts development of peripheral arterial disease in patients with type 2 diabetes. SLC2A10 and PAD in type 2 diabetes. *BMC Med Genet* 2010;11:126.

Johnson JH, Newgard CB, Milburn JL, Lodish HF, Thorens B. The high Km glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary sequence. *J Biol Chem* 1990;265(12):6548-51.

Joost HG, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol* 2001;18(4):247-56.

Kasahara T, Kasahara M. Expression of the rat GLUT1 glucose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 1996;315 (Pt 1):177-82.

Kasahara T, Kasahara M. Characterization of rat Glut4 glucose transporter expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with Glut1 glucose transporter. *Biochim Biophys Acta* 1997;1324(1):111-9.

- Kayano T, Burant CF, Fukumoto H, Gould GW, Fan YS, Eddy RL, et al. Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J Biol Chem* 1990;265(22):13276-82.
- Keljo DJ, MacLeod RJ, Perdue MH, Butler DG, Hamilton JR. D-Glucose transport in piglet jejunal brush-border membranes: insights from a disease model. *Am J Physiol* 1985;249(6 Pt 1):G751-60.
- Kellett GL. The facilitated component of intestinal glucose absorption. *J Physiol* 2001;531(Pt 3):585-95.
- Kellett GL, Brot-Laroche E. Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. *Diabetes* 2005;54(10):3056-62.
- Kellett GL, Brot-Laroche E, Mace OJ, Leturque A. Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annu Rev Nutr* 2008;28:35-54.
- Kellett GL, Helliwell PA. The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *Biochem J* 2000;350 Pt 1:155-62.
- Khoursandi S, Scharlau D, Herter P, Kuhnen C, Martin D, Kinne RK, et al. Different modes of sodium-D-glucose cotransporter-mediated D-glucose uptake regulation in Caco-2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287(4):C1041-7.
- Kierbel A, Capurro C, Pisam M, Gobin R, Christensen BM, Nielsen S, et al. Effects of medium hypertonicity on water permeability in the mammalian rectum: ultrastructural and molecular correlates. *Pflugers Arch* 2000;440(4):609-18.
- Kokk K, Verajankorva E, Wu XK, Tapfer H, Poldoja E, Pollanen P. Immunohistochemical detection of glucose transporters class I subfamily in the mouse, rat and human testis. *Medicina (Kaunas)* 2004;40(2):156-60.
- Kristiansen S, Darakhshan F, Richter EA, Hundal HS. Fructose transport and GLUT-5 protein in human sarcolemmal vesicles. *Am J Physiol* 1997;273(3 Pt 1):E543-8.
- Krzeslak A, Wojcik-Krowiranda K, Forma E, Jozwiak P, Romanowicz H, Bienkiewicz A, Brys M. Expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in endometrial and breast cancers. *Pathol Oncol Res* 2012; 18(3):721-8.
- Kwon O, Eck P, Chen S, Corpe CP, Lee JH, Kruhlak M, et al. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *Faseb J* 2007;21(2):366-77.
- Lane JS, Whang EE, Rigberg DA, Hines OJ, Kwan D, Zinner MJ, et al. Paracellular glucose transport plays a minor role in the unanesthetized dog. *Am J Physiol* 1999;276(3 Pt 1):G789-94.

- Laxminarayana B, Krishna VM, Janaki N, Ramaiah KV. Translation and phosphorylation of wheat germ lysate: phosphorylation of wheat germ initiation factor 2 by casein kinase II and in N-ethylmaleimide-treated lysates. *Arch Biochem Biophys* 2002;400(1):85-96.
- Lazaridis KN, Pham L, Vroman B, de Groen PC, LaRusso NF. Kinetic and molecular identification of sodium-dependent glucose transporter in normal rat cholangiocytes. *Am J Physiol* 1997;272(5 Pt 1):G1168-74.
- Leturque A, Brot-Laroche E, Le Gall M, Stolarczyk E, Tobin V. The role of GLUT2 in dietary sugar handling. *J Physiol Biochem* 2005;61(4):529-37.
- Li Q, Manolescu A, Ritzel M, Yao S, Slugoski M, Young JD, et al. Cloning and functional characterization of the human GLUT7 isoform SLC2A7 from the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287(1):G236-42.
- Lienhard GE, Slot JW, James DE, Mueckler MM. How cells absorb glucose. *Sci Am* 1992;266(1):86-91.
- Lin WH, Chuang LM, Chen CH, Yeh JI, Hsieh PS, Cheng CH, et al. Association study of genetic polymorphisms of SLC2A10 gene and type 2 diabetes in the Taiwanese population. *Diabetologia* 2006;49(6):1214-21.
- Lohrenz AK, Duske K, Schonhusen U, Losand B, Seyfert HM, Metges CC, et al. Glucose transporters and enzymes related to glucose synthesis in small intestinal mucosa of mid-lactation dairy cows fed 2 levels of starch. *J Dairy Sci* 2011;94(9):4546-55.
- Loo DD, Hirayama BA, Karakossian MH, Meinild AK, Wright EM. Conformational dynamics of hSGLT1 during Na⁺/glucose cotransport. *J Gen Physiol* 2006;128(6):701-20.
- Lostao MP, Berjon A, Barber A, Ponz F. On the multiplicity of glucose analogues transport systems in rat intestine. *Rev Esp Fisiol* 1991;47(4):209-16.
- Luckey M, Nikaido H. Specificity of diffusion channels produced by lambda phage receptor protein of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77(1):167-71.
- Luippold G, Schneider S, Stefanescu A, Benohr P, Muhlbauer B. Dopamine D2-like receptors and amino acid-induced glomerular hyperfiltration in humans. *Br J Clin Pharmacol* 2001;51(5):415-21.
- Ma TY, Hollander D, Riga R, Bhalla D. Autoradiographic determination of permeation pathway of permeability probes across intestinal and tracheal epithelia. *J Lab Clin Med* 1993;122(5):590-600.
- Mace OJ, Affleck J, Patel N, Kellett GL. Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2. *J Physiol* 2007;582(Pt 1):379-92.
- Mace OJ, Lister N, Morgan E, Shepherd E, Affleck J, Helliwell P, et al. An energy supply network of nutrient absorption coordinated by calcium and T1R taste receptors in rat small intestine. *J Physiol* 2009;587(Pt 1):195-210.

- Mace OJ, Morgan EL, Affleck JA, Lister N, Kellett GL. Calcium absorption by Cav1.3 induces terminal web myosin II phosphorylation and apical GLUT2 insertion in rat intestine. *J Physiol* 2007;580(Pt. 2):605-16
- Mackenzie B, Loo DD, Wright EM. Relationships between Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) currents and fluxes. *J Membr Biol* 1998;162(2):101-6.
- Madara JL, Pappenheimer JR. Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia. *J Membr Biol* 1987;100(2):149-64.
- Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain. *Faseb J* 1994;8(13):1003-11.
- Makinen AL, Nowak T. 3-Mercaptopicolinate. A reversible active site inhibitor of avian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J Biol Chem* 1983;258(19):11654-62.
- Manolescu A, Salas-Burgos AM, Fischbarg J, Cheeseman CI. Identification of a hydrophobic residue as a key determinant of fructose transport by the facilitative hexose transporter SLC2A7 (GLUT7). *J Biol Chem* 2005;280(52):42978-83.
- Manome S, Kuriaki K. Effect of insulin, phlorizin and some metabolic inhibitors on the glucose absorption from the intestine. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1961;130:187-94.
- Mantych GJ, James DE, Devaskar SU. Jejunal/kidney glucose transporter isoform (Glut-5) is expressed in the human blood-brain barrier. *Endocrinology* 1993;132(1):35-40.
- Marino G, Uria JA, Puente XS, Quesada V, Bordallo J, Lopez-Otin C. Human autophagins, a family of cysteine proteinases potentially implicated in cell degradation by autophagy. *J Biol Chem* 2003;278(6):3671-8.
- Martin MG, Turk E, Lostao MP, Kerner C, Wright EM. Defects in Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) trafficking and function cause glucose-galactose malabsorption. *Nat Genet* 1996;12(2):216-20.
- Martin-Verstraete I, Michel V, Charbit A. The levanase operon of *Bacillus subtilis* expressed in *Escherichia coli* can substitute for the mannose permease in mannose uptake and bacteriophage lambda infection. *J Bacteriol* 1996;178(24):7112-9.
- Martyn JA, Kaneki M, Yasuhara S. Obesity-induced insulin resistance and hyperglycemia: etiologic factors and molecular mechanisms. *Anesthesiology* 2008;109(1):137-48.
- Mate A, de la Herra MA, Barfull A, Planas JM, Vazquez CM. Characterization of D-fructose transport by rat kidney brush-border membrane vesicles: changes in hypertensive rats. *Cell Mol Life Sci* 2001;58(12-13):1961-7.
- Maxfield FR, McGraw TE. Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5(2):121-32.
- McVie-Wylie AJ, Lamson DR, Chen YT. Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics* 2001;72(1):113-7.

- Meinild AK, Hirayama BA, Wright EM, Loo DD. Fluorescence studies of ligand-induced conformational changes of the Na(+)/glucose cotransporter. *Biochemistry* 2002;41(4):1250-8.
- Miller PJ, Finucane KA, Hughes M, Zhao FQ. Cloning and expression of bovine glucose transporter GLUT12. *Mamm Genome* 2005;16(11):873-83.
- Mineo H, Amano M, Chiji H, Shigematsu N, Tomita F, Hara H. Indigestible disaccharides open tight junctions and enhance net calcium, magnesium, and zinc absorption in isolated rat small and large intestinal epithelium. *Dig Dis Sci* 2004;49(1):122-32.
- Mithieux G. New data and concepts on glutamine and glucose metabolism in the gut. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001;4(4):267-71.
- Miyamoto K, Hase K, Taketani Y, Minami H, Oka T, Nakabou Y, et al. Diabetes and glucose transporter gene expression in rat small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181(3):1110-7
- Miyamoto K, Tatsumi S, Morimoto A, Minami H, Yamamoto H, Sone K, et al. Characterization of the rabbit intestinal fructose transporter (GLUT5). *Biochem J* 1994;303 (Pt 3):877-83.
- Moran AW, Al-Rammahi MA, Arora DK, Batchelor DJ, Coulter EA, Ionescu C, et al. Expression of Na⁺/glucose co-transporter 1 (SGLT1) in the intestine of piglets weaned to different concentrations of dietary carbohydrate. *Br J Nutr* 2010; 104(5):647-55.
- Morgan EL, Mace OJ, Affleck J, Kellett GL. Apical GLUT2 and Cav1.3: regulation of rat intestinal glucose and calcium absorption. *J Physiol* 2007;580(Pt. 2):593-604.
- Morris DI, Robbins JD, Ruoho AE, Sutkowski EM, Seamon KB. Forskolin photoaffinity labels with specificity for adenylyl cyclase and the glucose transporter. *J Biol Chem* 1991;266(20):13377-84.
- Mueckler M. Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 1994;219(3):713-25.
- Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR. Endocytosis. *Physiol Rev* 1997;77(3):759-803.
- Nafikov RA, Beitz DC. Carbohydrate and lipid metabolism in farm animals. *J Nutr* 2007;137(3):702-5.
- Nelson JA, Falk RE. Phloridzin and phloretin inhibition of 2-deoxy-D-glucose uptake by tumor cells in vitro and in vivo. *Anticancer Res* 1993;13(6A):2293-9.
- Nelson JA, Falk RE. The efficacy of phloridzin and phloretin on tumor cell growth. *Anticancer Res* 1993;13(6A):2287-92.
- Nemerow GR, Cooper NR. Infection of B lymphocytes by a human herpesvirus, Epstein-Barr virus, is blocked by calmodulin antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(15):4955-9.
- Noah L, Lecannu G, David A, Kozlowski F, Champ M. Digestion of starch and glycaemic response to mixed meals in pigs. *Reprod Nutr Dev* 1999;39(2):245-54.

- Oliver JM, Albertini DF, Berlin RD. Effects of glutathione-oxidizing agents on microtubule assembly and microtubule-dependent surface properties of human neutrophils. *J Cell Biol* 1976;71(3):921-32.
- Pappenheimer JR. On the coupling of membrane digestion with intestinal absorption of sugars and amino acids. *Am J Physiol* 1993;265(3 Pt 1):G409-17.
- Pappenheimer JR, Reiss KZ. Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat. *J Membr Biol* 1987;100(2):123-36.
- Parent L, Supplisson S, Loo DD, Wright EM. Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions. *J Membr Biol* 1992;125(1):63-79.
- Parsons DS, Prichard JS. Properties of some model systems for transcellular active transport. *Biochim Biophys Acta* 1966;126(3):471-91.
- Pascual JM, Wang D, Lecumberri B, Yang H, Mao X, Yang R, et al. GLUT1 deficiency and other glucose transporter diseases. *Eur J Endocrinol* 2004;150(5):627-33.
- Pelham HR. SNAREs and the specificity of membrane fusion. *Trends Cell Biol* 2001;11(3):99-101.
- Perrini S, Natalicchio A, Laviola L, Belsanti G, Montrone C, Cignarelli A, et al. Dehydroepiandrosterone stimulates glucose uptake in human and murine adipocytes by inducing GLUT1 and GLUT4 translocation to the plasma membrane. *Diabetes* 2004;53(1):41-52.
- Phay JE, Hussain HB, Moley JF. Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics* 2000;66(2):217-20.
- Pinches SA, Gribble SM, Beechey RB, Ellis A, Shaw JM, Shirazi-Beechey SP. Preparation and characterization of basolateral membrane vesicles from pig and human colonocytes: the mechanism of glucose transport. *Biochem J* 1993;294 (Pt 2):529-34.
- Posho L, Darcy-Vrillon B, Morel MT, Cherbuy C, Blachier F, Duee PH. Control of glucose metabolism in newborn pig enterocytes: evidence for the role of hexokinase. *Biochim Biophys Acta* 1994;1224(2):213-20.
- Puiman P, Stoll B. Animal models to study neonatal nutrition in humans. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008;11(5):601-6.
- Pyla R, Poulouse N, Jun JY, Segar L. Expression of conventional and novel glucose transporters, GLUT1, -9, -10, -12, in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013.
- Quick M, Tomasevic J, Wright EM. Functional asymmetry of the human Na⁺/glucose transporter (hSGLT1) in bacterial membrane vesicles. *Biochemistry* 2003;42(30):9147-52.

- Rajas F, Bruni N, Montano S, Zitoun C, Mithieux G. The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology* 1999;117(1):132-9.
- Rajas F, Croset M, Zitoun C, Montano S, Mithieux G. Induction of PEPCCK gene expression in insulinopenia in rat small intestine. *Diabetes* 2000;49(7):1165-8.
- Rajas F, Jourdan-Pineau H, Stefanutti A, Mrad EA, Iynedjian PB, Mithieux G. Immunocytochemical localization of glucose 6-phosphatase and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in gluconeogenic tissues reveals unsuspected metabolic zonation. *Histochem Cell Biol* 2007;127(5):555-65.
- Rand EB, Depaoli AM, Davidson NO, Bell GI, Burant CF. Sequence, tissue distribution, and functional characterization of the rat fructose transporter GLUT5. *Am J Physiol* 1993;264(6 Pt 1):G1169-76.
- Rodriguez SM, Guimaraes KC, Matthews JC, McLeod KR, Baldwin RLt, Harmon DL. Influence of abomasal carbohydrates on small intestinal sodium-dependent glucose cotransporter activity and abundance in steers. *J Anim Sci* 2004;82(10):3015-23.
- Rogers LK, Leinweber BL, Smith CV. Detection of reversible protein thiol modifications in tissues. *Anal Biochem* 2006;358(2):171-84.
- Rogers S, Chandler JD, Clarke AL, Petrou S, Best JD. Glucose transporter GLUT12-functional characterization in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308(3):422-6.
- Rogers S, Macheda ML, Docherty SE, Carty MD, Henderson MA, Soeller WC, et al. Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282(3):E733-8.
- Romero A, Gomez O, Terrado J, Mesonero JE. Expression of GLUT8 in mouse intestine: identification of alternative spliced variants. *J Cell Biochem* 2009;106(6):1068-78.
- Rose CS, Andersen G, Hamid YH, Glumer C, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, et al. Studies of relationships between the GLUT10 Ala206Thr polymorphism and impaired insulin secretion. *Diabet Med* 2005;22(7):946-9.
- Saltiel AR, Pessin JE. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol* 2002;12(2):65-71.
- Santer R, Hillebrand G, Steinmann B, Schaub J. Intestinal glucose transport: evidence for a membrane traffic-based pathway in humans. *Gastroenterology* 2003;124(1):34-9.
- Sasaki T, Minoshima S, Shiohama A, Shintani A, Shimizu A, Asakawa S, et al. Molecular cloning of a member of the facilitative glucose transporter gene family GLUT11 (SLC2A11) and identification of transcription variants. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289(5):1218-24.

Scheepers A, Joost HG, Schurmann A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2004;28(5):364-71.

Scheepers A, Schmidt S, Manolescu A, Cheeseman CI, Bell A, Zahn C, et al. Characterization of the human SLC2A11 (GLUT11) gene: alternative promoter usage, function, expression, and subcellular distribution of three isoforms, and lack of mouse orthologue. *Mol Membr Biol* 2005;22(4):339-51.

Schiffer M, Susztak K, Ranalletta M, Raff AC, Bottinger EP, Charron MJ. Localization of the GLUT8 glucose transporter in murine kidney and regulation in vivo in nondiabetic and diabetic conditions. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289(1):F186-93.

Schmid SL. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* 1997;66:511-48.

Schnitzer JE, Allard J, Oh P. NEM inhibits transcytosis, endocytosis, and capillary permeability: implication of caveolae fusion in endothelia. *Am J Physiol* 1995;268(1 Pt 2):H48-55.

Schultz SG, Curran PF. Coupled transport of sodium and organic solutes. *Physiol Rev* 1970;50(4):637-718.

Schurmann A. Insight into the "odd" hexose transporters GLUT3, GLUT5, and GLUT7. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295(2):E225-6.

Schurr A, Payne RS. Lactate, not pyruvate, is neuronal aerobic glycolysis end product: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience* 2007;147(3):613-9.

Scow JS, Iqbal CW, Jones TW 3rd, Qandeel HG, Zheng Y, Duenes JA, et al. Absence of evidence of translocation of GLUT2 to the apical membrane of enterocytes in everted intestinal sleeves. *J Surg Res* 2011; 167(1):56-61

Semenza G, Kessler M, Hosang M, Weber J, Schmidt U. Biochemistry of the Na⁺, D-glucose cotransporter of the small-intestinal brush-border membrane. The state of the art in 1984. *Biochim Biophys Acta* 1984;779(3):343-79.

Shepherd EJ, Helliwell PA, Mace OJ, Morgan EL, Patel N, Kellett GL. Stress and glucocorticoid inhibit apical GLUT2-trafficking and intestinal glucose absorption in rat small intestine. *J Physiol* 2004;560(Pt 1):281-90.

Shepherd PR, Gould GW, Colville CA, McCoid SC, Gibbs EM, Kahn BB. Distribution of GLUT3 glucose transporter protein in human tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;188(1):149-54.

Shimizu K, Ozeki M, Tanaka K, Itoh K, Nakajyo S, Urakawa N, et al. Suppression of glucose absorption by extracts from the leaves of *Gymnema inodorum*. *J Vet Med Sci* 1997;59(9):753-7.

Shin BC, McKnight RA, Devaskar SU. Glucose transporter GLUT8 translocation in neurons is not insulin responsive. *J Neurosci Res* 2004;75(6):835-44.

Short MK, Clouthier DE, Schaefer IM, Hammer RE, Magnuson MA, Beale EG. Tissue-specific, developmental, hormonal, and dietary regulation of rat phosphoenolpyruvate carboxykinase-human growth hormone fusion genes in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1992;12(3):1007-20.

Shulman JM, Chipendo P, Chibnik LB, Aubin C, Tran D, Keenan BT, et al. Functional screening of Alzheimer pathology genome-wide association signals in *Drosophila*. *Am J Hum Genet* 2011;88(2): 232-8.

Simpson IA, Dwyer D, Malide D, Moley KH, Travis A, Vannucci SJ. The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295(2):E242-53.

Singh TK, Liu L. Modification of cysteine residues by N-ethylmaleimide inhibits annexin II tetramer mediated liposome aggregation. *Arch Biochem Biophys* 2000;381(2):235-40.

Stolic M, Russell A, Hutley L, Fielding G, Hay J, MacDonald G, et al. Glucose uptake and insulin action in human adipose tissue--influence of BMI, anatomical depot and body fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26(1):17-23.

Stralfors P. Caveolins and caveolae, roles in insulin signalling and diabetes. *Adv Exp Med Biol* 2012;729:111-26.

Stuart CA, Wen G, Jiang J. GLUT3 protein and mRNA in autopsy muscle specimens. *Metabolism* 1999;48(7):876-80.

Stuart CA, Yin D, Howell ME, Dykes RJ, Laffan JJ, Ferrando AA. Hexose transporter mRNAs for GLUT4, GLUT5, and GLUT12 predominate in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291(5):E1067-73.

Stuart CA, Ross IR, Howell ME, McCurry MP, Wood TG, Ceci JD, et al. Brain glucose transporter (Glut3) haploinsufficiency does not impair mouse brain glucose uptake. *Brain research*. 2011 Apr 12;1384:15-22.

Stumpel F, Burcelin R, Jungermann K, Thorens B. Normal kinetics of intestinal glucose absorption in the absence of GLUT2: Evidence for a transport pathway requiring glucose phosphorylation and transfer into the endoplasmic reticulum. *PNAS* 2001;98(20):11330-11335.

Suganuma N, Segade F, Matsuzu K, Bowden DW. Differential expression of facilitative glucose transporters in normal and tumour kidney tissues. *BJU Int* 2007;99(5):1143-9.

Sukalski KA, Nordlie RC. Implications of distinct inhibitory effects of N-acetylglucosamine on glucose uptake by an isolated perfusion system incorporating erythrocytes with livers from fed and 48-hour fasted rats. *J Biol Chem* 1986;261(15):6860-7.

Tazawa S, Yamato T, Fujikura H, Hiratochi M, Itoh F, Tomae M, et al. SLC5A9/SGLT4, a new Na⁺-dependent glucose transporter, is an essential transporter for mannose, 1,5-anhydro-D-glucitol, and fructose. *Life Sci* 2005;76(9):1039-50.

Thong FS, Dugani CB, Klip A. Turning signals on and off: GLUT4 traffic in the insulin-signaling highway. *Physiology (Bethesda)* 2005;20:271-84.

Thorens B. Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. *Am J Physiol* 1996;270(4 Pt 1):G541-53.

Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010 Feb;298(2):E141-5.

Tomioka S. Water transport by glucose transporter type 3 expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuroreport* 2012;23(1):21-5.

Tsan MF, Newman B, McIntyre PA. Surface sulphhydryl groups and phagocytosis-associated oxidative metabolic changes in human polymorphonuclear leucocytes. *Br J Haematol* 1976;33(2):189-204.

Turk E, Wright EM. Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family. *J Membr Biol* 1997;159(1):1-20.

Tyteca D, van Ijzendoorn SC, Hoekstra D. Calmodulin modulates hepatic membrane polarity by protein kinase C-sensitive steps in the basolateral endocytic pathway. *Exp Cell Res* 2005;310(2):293-302.

Uldry M, Ibberson M, Horisberger JD, Chatton JY, Riederer BM, Thorens B. Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *Embo J* 2001;20(16):4467-77.

Uldry M, Ibberson M, Hosokawa M, Thorens B. GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett* 2002;524(1-3):199-203.

Uldry M, Thorens B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch* 2004.

Urbina JA, Osorno CE, Rojas A. Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes by 3-mercaptopicolinic acid: in vitro and in vivo studies. *Arch Biochem Biophys* 1990;282(1):91-9.

van der Wijk T, Tomassen SF, Houtsmuller AB, de Jonge HR, Tilly BC. Increased vesicle recycling in response to osmotic cell swelling. Cause and consequence of hypotonicity-provoked ATP release. *J Biol Chem* 2003;278(41):40020-5.

Vaugelade P, Posho L, Darcy-Vrillon B, Bernard F, Morel MT, Duee PH. Intestinal oxygen uptake and glucose metabolism during nutrient absorption in the pig. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994;207(3):309-16.

Veyhl M, Keller T, Gorboulev V, Vernaleken A, Koepsell H. RS1 (RSC1A1) regulates the exocytotic pathway of Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291(6):F1213-23.

Vogel SS, Zimmerberg J. Proteins on exocytic vesicles mediate calcium-triggered fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(10):4749-53.

Waddell ID, Zomerschoe AG, Voice MW, Burchell A. Cloning and expression of a hepatic microsomal glucose transport protein. Comparison with liver plasma-membrane glucose-transport protein GLUT 2. *Biochem J* 1992;286 (Pt 1):173-7.

Waller AP, George M, Kalyanasundaram A, Kang C, Periasamy M, Hu K, et al. GLUT12 functions as a basal and insulin-independent glucose transporter in the heart. *Biochim Biophys Acta* 2013;1832(1):121-7.

Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* 1993;123(5):1107-17.

Wang W, Yu JT, Zhang W, Cui WZ, Wu ZC, Zhang Q, et al. Genetic association of SLC2A14 polymorphism with Alzheimer's disease in a Han Chinese population. *J Mol Neurosci* 2012; 47(3):481-4.

Ward DM, Leslie JD, Kaplan J. Homotypic lysosome fusion in macrophages: analysis using an in vitro assay. *J Cell Biol* 1997;139(3):665-73.

Watson RT, Pessin JE. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. *Recent Prog Horm Res* 2001;56:175-93.

Weiler-Guttler H, Zinke H, Mockel B, Frey A, Gassen HG. cDNA cloning and sequence analysis of the glucose transporter from porcine blood-brain barrier. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1989;370(5):467-73.

Wolffram S, Eggenberger E, Scharrer E. Kinetics of D-glucose and L-leucine transport into sheep and pig intestinal brush border membrane vesicles. *Comp Biochem Physiol A* 1986;84(3):589-93.

Wood IS, Hunter L, Trayhurn P. Expression of Class III facilitative glucose transporter genes (GLUT-10 and GLUT-12) in mouse and human adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308(1):43-9.

Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 2003;89(1):3-9.

Wright EM. Renal Na(+)-glucose cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280(1):F10-8.

Wright EM, Hirayama BA, Loo DF. Active sugar transport in health and disease. *J Intern Med* 2007;261(1):32-43.

Wright EM, Hirsch JR, Loo DD, Zampighi GA. Regulation of Na⁺/glucose cotransporters. *J Exp Biol* 1997;200(Pt 2):287-93.

Wright EM, Martin MG, Turk E. Intestinal absorption in health and disease--sugars. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17(6):943-56.

Wright EM, Turk E. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch* 2004;447(5):510-8.

- Wu G, Knabe DA, Yan W, Flynn NE. Glutamine and glucose metabolism in enterocytes of the neonatal pig. *Am J Physiol* 1995;268(2 Pt 2):R334-42.
- Wu X, Freeze HH. GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics* 2002;80(6):553-7.
- Zebrowska T, Low AG, Zebrowska H. Studies on gastric digestion of protein and carbohydrate, gastric secretion and exocrine pancreatic secretion in the growing pig. *Br J Nutr* 1983;49(3):401-10.
- Zhao FQ, Glimm DR, Kennelly JJ. Distribution of mammalian facilitative glucose transporter messenger RNA in bovine tissues. *Int J Biochem* 1993;25(12):1897-903.
- Zhao FQ, Keating AF. Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 2007;90 Suppl 1:E76-86.
- Zhao FQ, Keating AF. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr Genomics* 2007;8(2):113-28.
- Zhao FQ, Miller PJ, Wall EH, Zheng YC, Dong B, Neville MC, et al. Bovine glucose transporter GLUT8: cloning, expression, and developmental regulation in mammary gland. *Biochim Biophys Acta* 2004;1680(2):103-13.
- Zhao FQ, Okine EK, Cheeseman CI, Shirazi-Beechey SP, Kennelly JJ. Glucose transporter gene expression in lactating bovine gastrointestinal tract. *J Anim Sci* 1998;76(11):2921-9
- Zhao FQ, Zheng YC, Wall EH, McFadden TB. Cloning and expression of bovine sodium/glucose cotransporters. *J Dairy Sci* 2005;88(1):182-94.
- Zhou L, Cryan EV, D'Andrea MR, Belkowski S, Conway BR, Demarest KT. Human cardiomyocytes express high level of Na⁺/glucose cotransporter 1 (SGLT1). *J Cell Biochem* 2003;90(2):339-46.

9. Anlagen

9.1 ZUSAMMENSETZUNG DER PUFFERLÖSUNGEN

9.1.1 Pufferlösungen der Versuchsserie „4.1.1 Einfluss der Glukoseverfügbarkeit auf die SGLT1- und GLUT-vermittelte Glukoseaufnahme“

	9.1.1a	9.1.1b
NaCl	72 mM	72 mM
KCl	5,4 mM	5,4 mM
CaCl ₂ * 2H ₂ O	1,5 mM	1,5 mM
MgCl ₂ * 6H ₂ O	1,2 mM	1,2 mM
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	0,6 mM	0,6 mM
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	1,2 mM	1,2 mM
L-Glutamin	1 mM	1 mM
Na-D/L-Laktat	5 mM	5 mM
HEPES	10 mM	10 mM
NaOH	10 mM	10 mM
Enrofloxacin	0,0278 mM	0,0278 mM
Mannit	100 mM	94 mM
Glukose	-	6 mM
pH-Wert:	7,4	7,4
Osmolalität:	285 mosmol·kg ⁻¹	285 mosmol·kg ⁻¹

9.1.2 Pufferlösung der Versuchsserien „4.1.2 Die Bedeutung der Endozytose bei der Glukose- bzw. Mannitaufnahme in das Epithel“ und „4.1.3 Zeitabhängigkeit der Glukoseaufnahme und deren Vergleich mit der Mannitaufnahme“

	9.1.2
NaCl	112 mM
KCl	5,4 mM
CaCl ₂ * 2H ₂ O	1,5 mM
MgCl ₂ * 6H ₂ O	1,2 mM
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	0,6 mM
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	1,2 mM
L-Glutamin	1 mM
Na-D/L-Laktat	5 mM
HEPES	10 mM
NaOH	10 mM
Enrofloxacin	0,0278 mM
Mannit	20 mM
pH-Wert:	7,4
Osmolalität:	285 mosmol·kg ⁻¹

9.1.3 Pufferlösungen der Versuchsserie „4.1.4 Einfluss verschiedener Substanzen in hohen Konzentrationen auf die nicht SGLT1- und GLUT-vermittelte Glukose- und Mannitaufnahme“

	9.1.3a	9.1.3b
NaCl	122 mM	52 mM
KCl	5,4 mM	5,4 mM
CaCl ₂ * 2H ₂ O	1,5 mM	1,5 mM
MgCl ₂ * 6H ₂ O	1,2 mM	1,2 mM
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	0,6 mM	0,6 mM
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	1,2 mM	1,2 mM
L-Glutamin	1 mM	1 mM
Na-D/L-Laktat	5 mM	5 mM
HEPES	10 mM	10 mM
NaOH	10 mM	10 mM
Enrofloxacin	0,0278 mM	0,0278 mM
Mannit	-	20 mM
Glukose	-	20 mM
pH-Wert:	7,4	7,4
Osmolalität:	285 mosmol·kg ⁻¹	185 mosmol·kg ⁻¹

Zur Pufferlösung 9.1.3b erfolgte die Zugabe von einem der sechs folgenden Zucker bzw. Zuckerderivate:

DL-Serin	100 mM
D-Sorbitol	100 mM
D-Mannose	100 mM
N-Acetyl-D-Glukosamin	100 mM
Cellobiose	100 mM
Raffinose	100 mM

pH-Wert:	7,4
Osmolalität:	285 mosmol·kg ⁻¹

9.1.4 Pufferlösungen der Versuchsserie „4.2.1 Der Einfluss des serosalen Effluxes und der intrazellulären Verstoffwechslung auf die Glukoseaufnahme“

	9.1.4a	9.1.4b	9.1.4c
NaCl	72 mM	72 mM	72 mM
KCl	5,4 mM	5,4 mM	5,4 mM
CaCl ₂ * 2H ₂ O	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM
MgCl ₂ * 6H ₂ O	1,2 mM	1,2 mM	1,2 mM
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	0,6 mM	0,6 mM	0,6 mM
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	1,2 mM	1,2 mM	1,2 mM
L-Glutamin	1 mM	1 mM	1 mM
Na-D/L-Laktat	5 mM	5 mM	5 mM
HEPES	10 mM	10 mM	10 mM
NaOH	10 mM	10 mM	10 mM
Enrofloxacin	0,0278 mM	0,0278 mM	0,0278 mM
Mannit	100 mM	100 mM	80 mM
Glukose	1 mM	-	-
N-Acetyl-D-Glukosamin	-	-	20 mM
pH-Wert:	7,4	7,4	7,4
Osmolalität:	285 mosmol·kg ⁻¹	285 mosmol·kg ⁻¹	285 mosmol·kg ⁻¹

9.1.5 Pufferlösungen der Versuchsserie „4.2.2 Der Einfluss der Anwesenheit von Laktat und der Laktatbildung auf die Glukoseaufnahme“ und „4.2.3 Der Einfluss der Glukoneogenese auf die Glukoseaufnahme“

	9.1.5a	9.1.5b	9.1.5c	9.1.5d
NaCl	52 mM	52 mM	52 mM	52 mM
Na-glukonat	20 mM	20 mM	25 mM	5 mM
KCl	5,4 mM	5,4 mM	5,4 mM	5,4 mM
CaCl ₂ * 2H ₂ O	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM
MgCl ₂ * 6H ₂ O	1,2 mM	1,2 mM	1,2 mM	1,2 mM
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	0,6 mM	0,6 mM	0,6 mM	0,6 mM
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	1,2 mM	1,2 mM	1,2 mM	1,2 mM
L-Glutamin	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
Na-D/L-Laktat	5 mM	5 mM	-	-
HEPES	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
NaOH	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
Enrofloxacin	0,0278 mM	0,0278 mM	0,0278 mM	0,0278 mM
Mannit	94 mM	100 mM	100 mM	100 mM
Glukose	6 mM	-	-	-
Na-Oxamat	-	-	-	20 mM
pH-Wert:	7,4	7,4	7,4	7,4
Osmolalität:	285 mosmol·kg ⁻¹	285 mosmol·kg ⁻¹	285 mosmol·kg ⁻¹	285 mosmol·kg ⁻¹

9.2 VERWENDETE CHEMIKALIEN

Agarose	Life Technologies
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	Merck
D-(+)-Cellobiose	Sigma
Chloroform	Merck
Chlorpromazin-Hydrochlorid	Sigma
Cytochalasin B from Helminthosporium dematioideum	Sigma-Aldrich
Enrofloxacin	Fluka
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
N-Ethylmaleimid	Sigma
D(+)-Glukose-Monohydrat	Merck
¹⁴ C-Glukose	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
HEPES Pufferan	Roth
KCl	Merck
L-Glutamin	Merck
Glycerol	Sigma
D(-)-Mannit	Roth
³ H-Mannit	PerkinElmer, Boston, USA
D(+)-Mannose	Fluka
3-Mercaptopicolinsäure-Hydrochlorid	AppliChem
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	Merck
N-Acetyl-D-Glukosamin	Sigma
Na-DL-Laktat (60 %)	Sigma
Na-Gluconat	Merck
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	Merck
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	Merck
NaCl	Merck
Natriumazetat	Merck
NaOH	Merck
Oxamidsäure Natriumsalz	Fluka
Phloretin	Sigma
Phlorrhizin Dihydrat	Sigma
2-Propanol	Roth
D-(+)-Raffinose-Pentahydrat	Sigma
RNA later	Sigma
DL-Serin	Sigma
D-Sorbitol	Sigma
Trizol Reagent	invitrogen

9.3 DATENANHANG

9.3.1 Elektrophysiologische Daten zu Kapitel 4.1.4

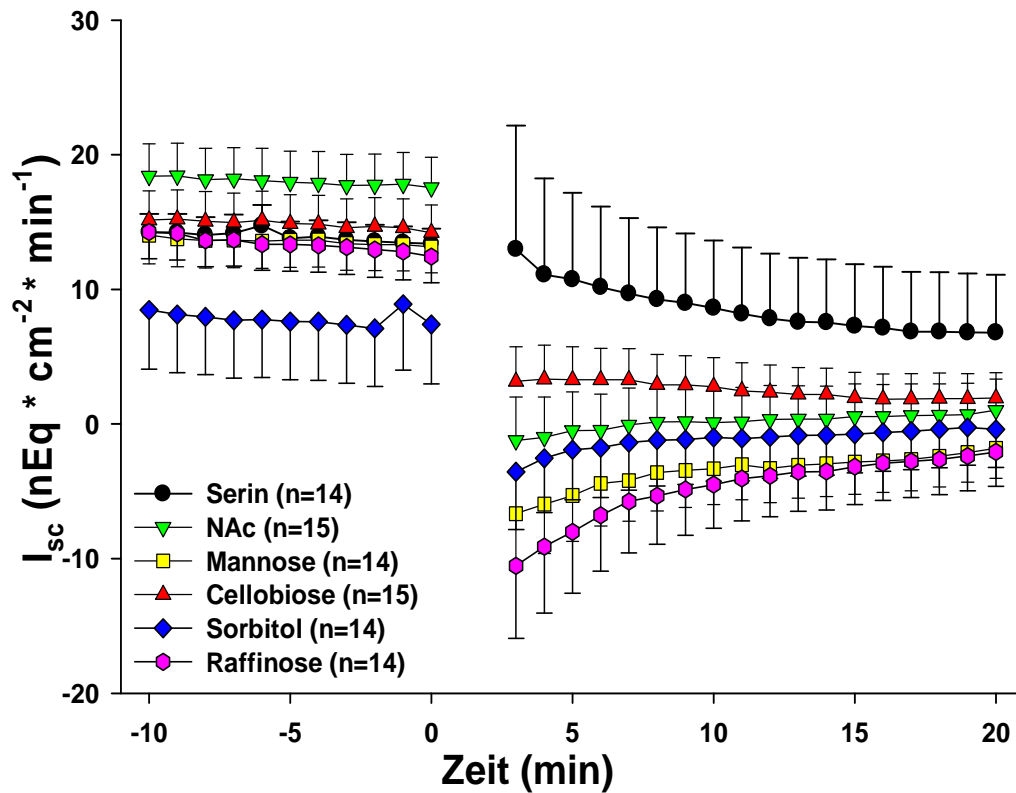


Abb. A1: Verlauf der Kurzschlussströme über die Zeit

Zum Zeitpunkt $t=0$ Austausch der Pufferlösung auf der mukosalen Seite; Mittelwerte \pm SEM; gepaarter t -Test; alle Mittelwerte \pm SEM von $t=3$ bis $t=20$ wurden gegen $t=0$ getestet; bei allen Gruppen bis auf die Seringruppe kam es zu einem signifikanten Abfall des Kurzschlussstromes ($p < 0,05$).

Die Unterbrechungen der Aufzeichnungen des I_{sc} in der Abbildung sind durch den Pufferwechsel auf der mukosalen Seite bedingt. Die Messapparatur unterbrach durch das kurzzeitige Fehlen der Pufferlösung auf der mukosalen Seite die Messung und musste manuell neu gestartet werden.

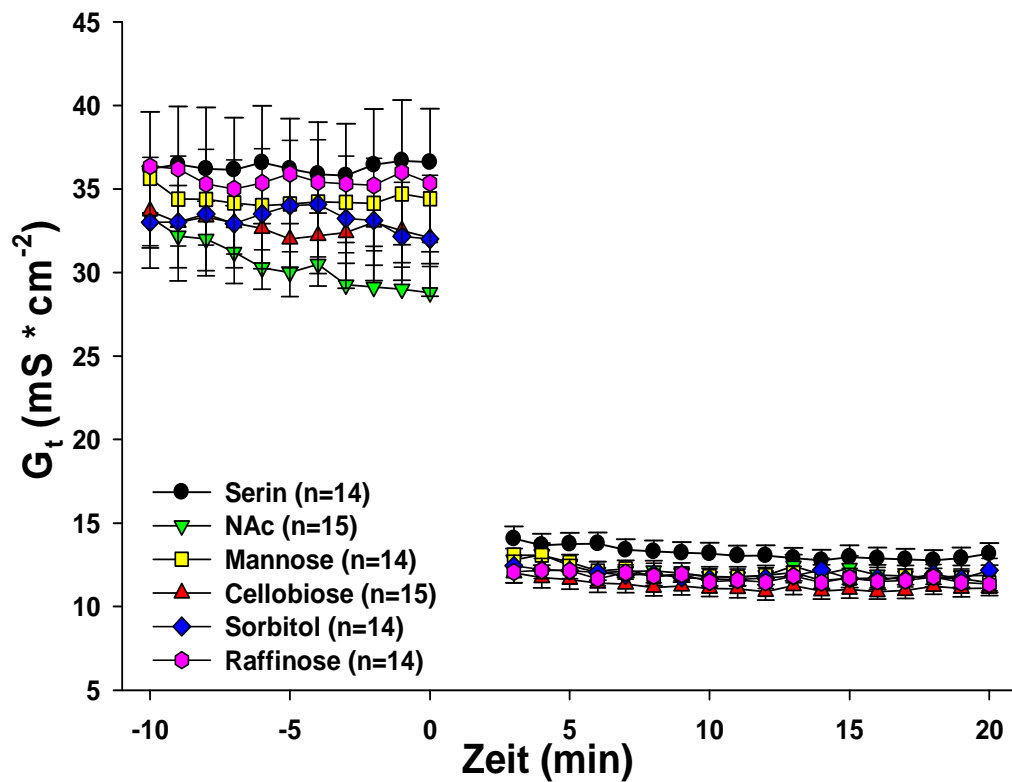


Abb. A2: Verlauf der Gewebeleitfähigkeiten über die Zeit

Zum Zeitpunkt $t=0$ Austausch der Pufferlösung auf der mukosalen Seite; Mittelwerte \pm SEM; gepaarter t -Test; alle Mittelwerte \pm SEM von $t=3$ bis $t=20$ wurden gegen $t=0$ getestet; bei allen Gruppen kam es zu einem signifikanten Abfall der Gewebeleitfähigkeit um etwa die gleichen Beträge ($p < 0,05$).

Die Unterbrechungen der Aufzeichnungen der G_t in der Abbildung sind durch den Pufferwechsel auf der mukosalen Seite bedingt. Die Messapparatur unterbrach durch das kurzzeitige Fehlen der Pufferlösung auf der mukosalen Seite die Messung und musste manuell neu gestartet werden.

9.3.2 Elektrophysiologische Daten zu Kapitel 4.2.1

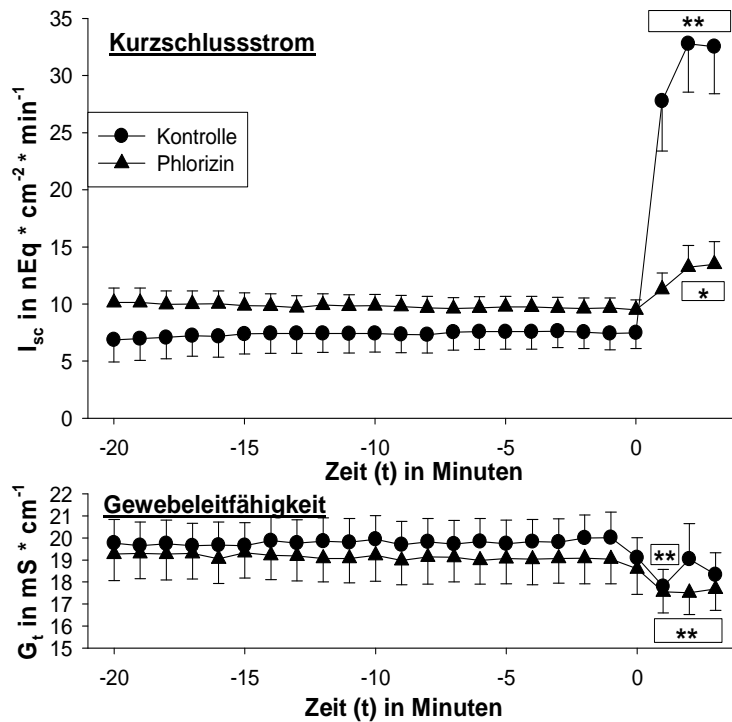


Abb. A3: Kurzschlussstrom und Gewebeleitfähigkeit zu Abb. 16 (linke Darstellung)

Zugabe von 0,5mM Phlorizin bzw. Ethanol (Kontrolle) zum Zeitpunkt $t=-1$; Zugabe von 20mM Glukose zum Zeitpunkt $t=0$; Kontrolle: $n=12$, $N=12$; Phlorizin: $n=12$, $N=12$; $*p < 0,05$ vs. $t=0$; $**p < 0,01$ vs. $t=0$

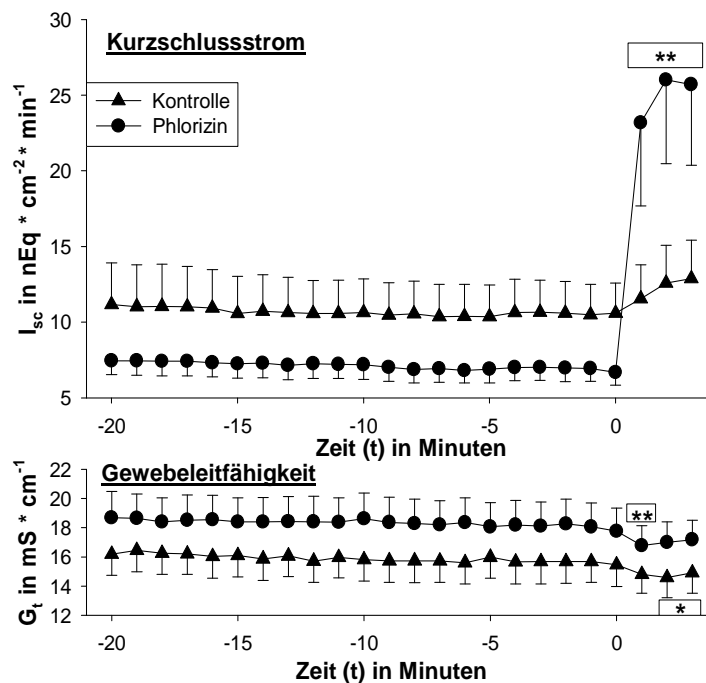


Abb. A4: Kurzschlussstrom und Gewebeleitfähigkeit zu Abb. 16 (rechte Darstellung):

Zugabe von 0,5mM Phlorizin bzw. Ethanol (Kontrolle) zum Zeitpunkt $t=-1$; Zugabe von Phloretin serosal zum Zeitpunkt $t=-1$; Zugabe von 20mM Glukose zum Zeitpunkt $t=0$; Kontrolle: $n=11$, $N=11$; Phlorizin: $n=9$, $N=9$; $*p < 0,05$ vs. $t=0$; $**p < 0,01$ vs. $t=0$

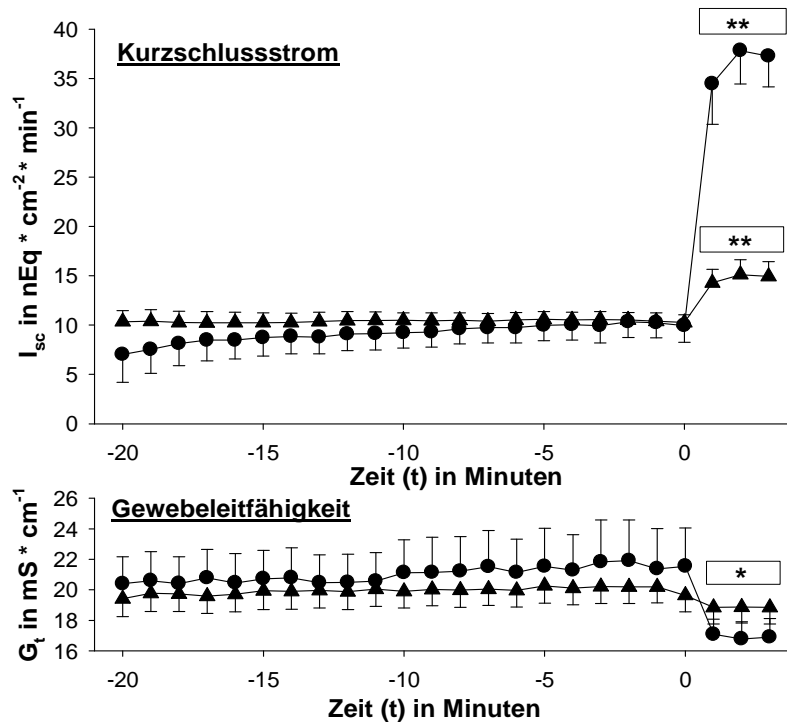


Abb. A5: Kurzschlussstrom und Gewebeleitfähigkeit zu Abb. 17 (linke Darstellung):
 Zugabe von 0,5mM Phlorizin bzw. Ethanol (Kontrolle) zum Zeitpunkt $t=-1$; Zugabe von 20mM Glukose zum Zeitpunkt $t=0$; Kontrolle: $n=12$, $N=12$; Phlorizin: $n=12$, $N=12$; * $p < 0,05$ vs. $t=0$; ** $p < 0,01$ vs. $t=0$

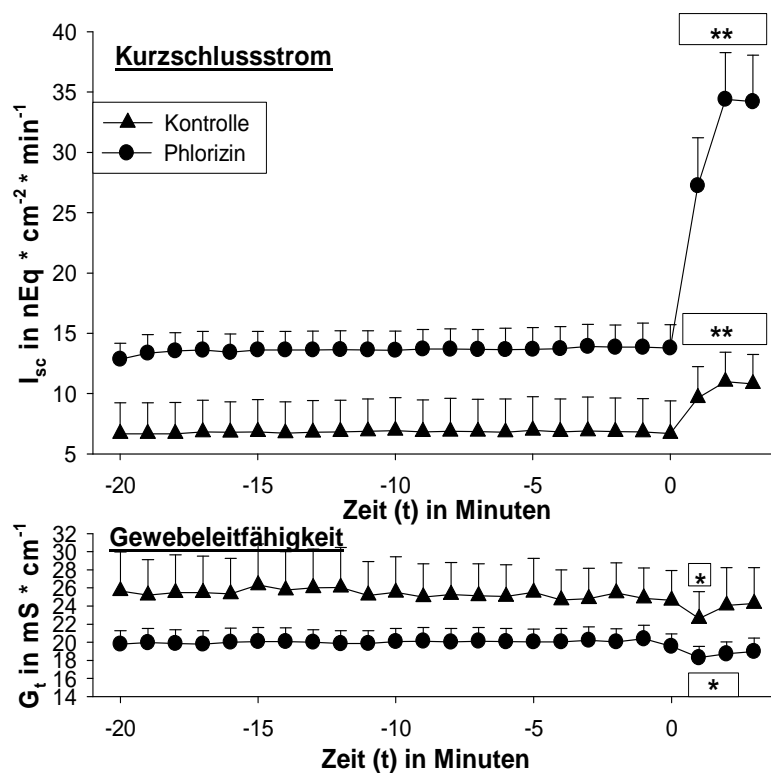


Abb. A6: Kurzschlussstrom und Gewebeleitfähigkeit zu Abb. 17 (rechte Darstellung):
 Zugabe von 0,5mM Phlorizin bzw. Ethanol (Kontrolle) zum Zeitpunkt $t=-1$; Zugabe von Phloretin serosal zum Zeitpunkt $t=-1$; Zugabe von 20mM Glukose zum Zeitpunkt $t=0$; Kontrolle: $n=11$, $N=11$; Phlorizin: $n=12$, $N=12$; * $p < 0,05$ vs. $t=0$; ** $p < 0,01$ vs. $t=0$

9.3.3 Primerbereinigte veröffentlichte Gensequenzen

pGLUT1

EU012358.1 (459bp):

```
1      AGCGTGCTGA AGAAGCTGCG CGGAACGGCA GACGTGACCC GAGACCTGCA GGAGATGAAG
61     GAGGAGAGCC GGCAGATGAT GCGGGAGAAG AAGGTCACCA TCCTGGAGCT GTTCCGCTCG
121    GCCGCCTACC GCCAGCCCAT CCTCATCGCC GTGGTGCTGC AGCTGTCCCA GCAGCTGTCC
181    GGCATCAACG CGGTTTTCTA TTAATCCACA AGCATCTTCG AGAAGGCGGG CGTGCAGCAG
241    CCTGTGTATG CCACCATCGG CTCCGGCATC GTCAACACGG CCTTCACTGT CGTGTCCGCTG
301    TTCGTGGTGG AACGAGCCGG CCGGCGGACC CTGCACCTCA TAGGCCTGGC TGGCATGGCG
361    GGCTGCGCGG TGCTCATGAC CATCGCCTTG GCACTGCTGG AGCAGCTGCC CTGGATGTCC
421    TACCTGAGCA TCGTGGCCAT CTTTGGCTTC GTGGCCTTC
```

pGLUT2:

FJ209732 (433bp):

```
1      GAAAAGAAAG TCTCCATAAT TCAGCTCTTC ACCAATTCCA GCTACCGACA GCCTATTCTA
61     GTAGCACTGA TGCTGCATAT GGCTCAGCAA TTTTCTGGAA TCAATGGGAT CTTTTACTAC
121    TCAACCAGCA TTTTTCAGAC AGCTGGAATC AGCCAACCTG TTTACGCAAC CATTGGAGTT
181    GGCCTATCA ACACGATTTT CACTGCTCTC TCTGTTTTCC TTGTAGAGAA GGCAGGGCGA
241    CGCTCTCTGT TTCTAATTGG AATGAGTGGG ATGTTTGTTC GTGCCATCTT CATGTCAGTG
301    GGACTTGTGC TACTGGATAA ATTGCCTTGG ATGAGTTATG TGAGTATGAC AGCCATATTC
361    CTCTTTGTCA GTTTCTTTGA AATTGGGCCA GGCCCCATCC CCTGGTTCAT GGTGGCCGAG
421    TTTTTCAGTC AAG
```

pGLUT3:

FJ209733 (459bp):

```
1      GCAAAATATC ACGGTCGGTT GAAATGTTGA TCCTGGGCGG ATTGGTTATT GGCCTTTCT
61     GCGGACTCTG CACAGGATTT GTGCCATGT ACATTGGAGA GATCTCGCCC ACGGCCCTGC
121    GGGGGGCCTT TGGCACTCTC AACCAGCTGG GCATCGTCAT CGGGATTCTG GTGGCCAGA
181    TCTTTGGTCT GAAACTCATC TTGGGCACTG AATTGCTCTG GCCCCTGCTC TTGGGCTTCA
241    CCATCATTCC AGCTGTCTG CAGTGTGCCG CCCTTCCCTT TTGCCCTGAA AGTCCTCGGT
301    TCCTGCTCAT TAACAGAAAG GAAGAGGAGA GAGCTAAGGA GATCCTCCAG CGATTGTGGG
361    GCACACAGGA TGTGGCTCAG GACATCCAGG AGATGAAGGA TGAGAGCCTT AGGATGGCCC
421    AGGAAAAGAA AGTCACAGTG CTGGAGCTCT TCAGAGCAC
```

pGLUT5:

EU012359 (377bp):

```
1      ATGGAGCCCC AGGAGCCGGT CAAGATGGAA GGGAGGCTGA CACTGGTGCT TGCTTTGGCG
61     ACCTGATAG CTGCCTTCGG CTCCTCCTC CAGTATGGGT ACAACGTGGC CGTATTAAC
121    TCGCCTTCTG GGTTCATGAA AGACTTTTAC AATGAGACCT ACTATGACAG AATCGGGGAA
181    TACATGAGCG AATTTCCCT GACCTTGCTG TGGTCTGTGT CTGTGTCCAT GTTCCCCTC
241    GGAGGCTTCA TCGGCTCCCT CATGGTCCGG CCTTTGGTGA ATCACTTAGG CAGAAAAGGA
301    ACCTTGCTCT TCAACAACAT CTTCTCCATC GTGCCTGCCA TCTTGATGGG ATGCAGCAA
361    GTCGCCAGT CTTTGA
```

pGLUT7:

EU012360 (336bp):

```
1      ACCGTCACTC CGGCGAGTAC TGTGGAGCGG CTGGGGCGGC GGCGCCTCCT GCTGGTCGGC
61     TATGGCATCT GCGGCTCCGC CTGCCTGGTG CTGACACTGG CGTTGCTCTT CCAGAGCGCG
121    GTGGCTGAGC TGTCATACCT GAGTGTATC TGTGTCTTCG CCTACATCGC CGGACATTCC
181    ATAGGGCCCA GTCCTGTCCC CTCCGTGGTG AGGACAGAGA TCTTCTGCA GTCCTCGCGG
241    CCGGCCGCTT TCTTGGTGA CGGGGCTGTG CACTGGCTCA CCAACTTCAT CGTGGGCTTC
301    GTGTTCCCAT CCATCCAGGA GGTCAATTGGC GCCTAC
```

pGLUT8:

EU012361 (377bp):

```
1      CAGCCTGGCC TCGGTCATCG TGGGTGTCAT CCAGGTGCTA TTCACGGCCG TGGCGGCCCT
61     CGTCATGGAC AGAGCTGGGC GGAGGGTGCT CCTGACCCTG TCAGGTGTGG TCATGGTGTT
121    CAGTACCAGC GCCTTTGGCA CCTACTTCAA GCTGACCCAG GATGGCCCCA GCAACTCCTC
181    GCACGTGCAC CTCTTGGCAC CCGTCTCCGT GGAGCCCACC GATGCCAGCG TGGGGCTGGC
241    CTGGCTGGCG GTGGGCAGCG TGTGCCTCTT CATCGCTGGC TTCGCCCTGG GCTGGGGGCC
301    CATCCCCTGG CTCCTCATGT CTGAGATCTT CCCTCTGCAC GTCAAGGGCG TGGCCACCGG
361    CGTCTGTGTC CTCACCA
```

pGLUT10:

EU012357 (249bp):

```
1      GGCAGCTCCC TGACCTGGCT GGTCTGGGC CGCTCAATGG CTGGCTTTGC CATCTCCCTC
61     TCCTCCATGG CCTGCTGTAT CTACGTGTCA GAGCTGGTGG GGCCCCGGCA GCGAGGAGTG
121    CTGGTGTCCC TCTATGAGGC AGGCATCACC GTGGGCATCC TGCTCTCCTA CGCACTCAAC
181    TACGTGCTGG CCCGTGCCCC CTGGGAATGG AGGCATATGT TTGGCTGGGC AGCTGCCCTT
241    GCGCTCCTG
```

pGLUT11:

EU012362 (407bp):

```
1      TTCAATTG GCTACAACCT CTCTATCATC AATGCCCAA CCTTGCACAT TCAGGAATTC
61     ACCAATGAGA CGTGGCAGAT GCGAACTGGC CGGCCACTGC CCGATCACCT GGTGCTGCTG
121    GTGTGGTCCC TCATCATATC TCTGTATCCC CTGGGGGGCC TCCTGGAGC GTTGCTTGCT
181    GGGCCCCTGG CCATCAAGCT GGGAAAGGAAG AAGTCCCTGC TGGTGAATAA CATCTTTGTG
241    GTGGCCGCAG CGACCCTGTT TGGCTTCAGC CGCAGAGCAG GCTCCTTTGA GATGATCATG
301    CTGGGAAGGT TGCTTGTGGG GGTACAGCGCA GGGGTGAGCA TGAATGTCCA GCCTATGTAC
361    CTGGGGGAGA GCGCCCCAA GGAGCTCCGT GGGGCCGTGG CCATGAC
```


10. Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten:

ASCHENBACH, J.R., K. STEGLICH, G. GÄBEL & K.U. HONSCHA (2009): Expression of mRNA for glucose transport proteins in jejunum, liver, kidney and skeletal muscle of pigs. *J. Physiol. Biochem.* 65:251-266

Abstracts:

STEGLICH, K., G. GÄBEL & J.R. ASCHENBACH (2006): Glukoseresorption im proximalen Jejunum des Schweines. 16. Symposium der Fachgruppe Physiologie und Biochemie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. Justus-Liebig-Universität Giessen, 125

STEGLICH, K., K.U. HONSCHA, G. GÄBEL & J.R. ASCHENBACH (2007): Functional and molecular evidence for SGLT1 and different glucose transporters (GLUT) in the proximal jejunum of growing pigs. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 16:58

STEGLICH, K., K.U. HONSCHA, G. GÄBEL & J.R. ASCHENBACH (2007): Glucose-transporting systems in the proximal jejunum of growing pigs. *J. Physiol. Biochem.* 63:47

ASCHENBACH, J.R., K. STEGLICH & G. GÄBEL (2008): Peculiarities on phlorizin- and phloretin-insensitive glucose transport in porcine proximal jejunum. *J. Physiol. Biochem.* 64:286

Nukleotidsequenzen:

STEGLICH, K., K.U. HONSCHA, G. GÄBEL & J.R. ASCHENBACH (2007): *Sus scrofa* solute carrier family 2 member 10 (Slc2a10) mRNA, partial cds GenBank EU012357

STEGLICH, K., K.U. HONSCHA, G. GÄBEL & J.R. ASCHENBACH (2007): *Sus scrofa* solute carrier family 2 member 1 (Slc2a1) mRNA, partial cds. GenBank EU012358

STEGLICH, K., K.U. HONSCHA, G. GÄBEL & J.R. ASCHENBACH (2007): *Sus scrofa* solute carrier family 2 member 5 (Slc2a5) mRNA, partial cds. GenBank EU012359

STEGLICH, K., K.U. HONSCHA, G. GÄBEL & J.R. ASCHENBACH (2007): *Sus scrofa* solute carrier family 2 member 7 (Slc2a7) mRNA, partial cds. GenBank EU012360

STEGLICH, K., K.U. HONSCHA, G. GÄBEL & J.R. ASCHENBACH (2007): *Sus scrofa* solute carrier family 2 member 8 (Slc2a8) mRNA, partial cds. GenBank EU012361

STEGLICH, K., K.U. HONSCHA, G. GÄBEL & J.R. ASCHENBACH (2007): *Sus scrofa* solute carrier family 2 member 11 (Slc2a11) mRNA, partial cds. GenBank EU012362

ASCHENBACH, J.R., K. STEGLICH, K.U. HONSCHA & G. GÄBEL (2008): *Sus scrofa* solute carrier family 2 member 2 (Slc2a2) mRNA, partial cds. GenBank FJ209732

ASCHENBACH, J.R., K. STEGLICH, K.U. HONSCHA & G. GÄBEL (2008): *Sus scrofa* solute carrier family 2 member 3 (Slc2a3) mRNA, partial cds. GenBank FJ209733

ASCHENBACH, J.R., K. STEGLICH, K.U. HONSCHA & G. GÄBEL (2008): *Sus scrofa* solute carrier family 5 member 10 (Slc5a10) mRNA, partial cds. GenBank FJ224383

ASCHENBACH, J.R., I. URBANSKY, K. STEGLICH, G. GABEL & K.U. HONSCHA (2009): *Sus scrofa* solute carrier family 5 member 4 protein (Slc5a4) mRNA, partial cds. GenBank FJ648283

ASCHENBACH, J.R., I. URBANSKY, K. STEGLICH, G. GABEL & K.U. HONSCHA (2009): *Sus scrofa* solute carrier family 5 member 2 protein (Slc5a2) mRNA, partial cds. GenBank FJ769839

ASCHENBACH, J.R., I. URBANSKY, K. STEGLICH, G. GABEL & K.U. HONSCHA (2009): *Sus scrofa* solute carrier family 5 member 9 protein (SLC5A9) mRNA, partial cds. GenBank FJ793565

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich in den letzten Jahren auf vielfältige Weise unterstützt und so die Entstehung dieser Arbeit erst möglich gemacht haben.

Ganz besonders danke ich:

Prof. Dr. Jörg R. Aschenbach für die Bereitstellung des Themas und die grandiose Betreuung sowohl in Leipzig als auch in Berlin, die unendliche Geduld beim Korrigieren des Manuskripts und die vielen freundschaftlichen Gespräche.

Prof. Dr. Gotthold Gäbel für die Unterstützung beim Durchführen der Versuche und die Möglichkeit, die Arbeit in Berlin fertigzustellen.

Dr. Kerstin Honscha für die Hilfestellung bei den molekularbiologischen Untersuchungen.

Anke für die aufopferungsvolle und kompetente Hilfe im Labor. Durch Deine liebevolle Art hast Du die unzähligen Tage und Nächte in der Ussing-Kammer erträglich gemacht.

Ines für die freundliche und kompetente Unterstützung bei allen molekularbiologischen Tätigkeiten.

Den (ehemaligen) Doktoranden des Veterinär-Physiologischen Institutes der Universität Leipzig Sabine, Arite, Carola, Kerstin, Thomas, Reiko und Anja für die schöne Zeit, die wir miteinander verbringen durften.

Allen anderen Mitarbeitern des Veterinär-Physiologischen Institutes, v.a. Jana, Ralf, Herrn Schilbach und Carsten für die Unterstützung und das freundliche Arbeitsklima.

Den Mitarbeitern des IZKF für die Sequenzierung der molekularbiologischen Proben.

Den Mitarbeitern des Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institutes für die Messung der radioaktiven Proben.

Meiner Chefin Ines und meinem Chef Dr. Thomas Leidel sowie meinen Kolleginnen für die bereitgestellten Freiräume in der Endphase, die nötig waren, um diese Arbeit fertigzustellen.

Meinen Eltern für die Möglichkeit, Veterinärmedizin zu studieren und die uneingeschränkte Unterstützung in den letzten Jahren.

Meinem Mann Martin und meinen Söhnen Gustav und Jakob für die familiäre Geborgenheit, die vielen in Kauf genommenen Entbehrungen und die eine oder andere ertragene Laune.

12. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Grimma, den 16.09.2013

Kristina Schenke