

4 DISKUSSION

4.1 VERSUCHSKRITIK

4.1.1 Statistische Auswertung

Bereits 1956 postulierte BROWNLEE eine Abhängigkeit der Struktur und Transportfunktion des Pansenepithels der Wiederkäuer von der Fütterung (Brownlee, 1956). Neben zahlreichen Publikationen, die den morphologischen Anpassungsprozess des Pansenepithels beschreiben, wurden Experimente durchgeführt, die den Verlauf der funktionellen Adaptation untersuchen. Aufgrund methodischer Beschränkungen war jedoch eine Untersuchung auf molekularbiologischer Ebene bislang kaum möglich.

Um den qualitativen Nachweis von Transportproteinen am Pansenepithel von Wiederkäuern auf mRNA-Ebene zu erbringen und anschließend die Abhängigkeit des Adaptationsvorganges von hierfür auslösenden Faktoren in Beziehung zur Zeit untersuchen zu können, war es im Vorfeld der durchgeführten Experimente nötig, eine Auswahl an Kandidatengen und Versuchsbedingungen hinsichtlich folgender Kriterien zu treffen:

- Auswahl von Transportproteinen, die potentiell am Pansenadaptationsprozess beteiligt sind
- Auswahl von Faktoren, die möglicherweise eine auslösende Komponente der Pansenadaptation darstellen
- Festlegung geeigneter Konzentrationsbereiche sowie der optimalen Inkubationsdauer der auslösenden Faktoren

Zu diesem Zeitpunkt standen nur wenige Publikationen zur Verfügung, denen Hinweise zur Beantwortung der oben formulierten Fragen entnommen werden konnten. Aus diesem Grund bestand nicht die Möglichkeit, eine Einschränkung der durchzuführenden Versuche anhand von Literaturangaben vorzunehmen. Deshalb wurden die qPCR-Experimente in Form eines breit angelegten „Screeningversuches“ konzeptioniert und es mußte in Kauf genommen werden, daß jeder Versuch nur einmal durchgeführt werden konnte (Anzahl N = 1). Ziel der Versuche war es, Transportproteine zu definieren, die im Rahmen des Adaptationsprozesses des Pansenepithels von Wiederkäuern möglicherweise quantitativen Schwankungen der Transkriptionsrate unterliegen. Ferner sollten mögliche Einflussfaktoren des Anpassungsprozesses des Pansenepithels und deren wirksame Dosisbereiche in Abhängigkeit von der Zeit genauer definiert werden.

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche sind daher deskriptiv und geben einen Orientierungshinweis für zukünftige Versuchsreihen.

4.1.2 RNA-Stabilität

Da RNA starken Degradierungsprozessen unterworfen ist, müssen im Umgang mit RNA-haltigen Proben verschiedene Vorsichtsmaßnahmen berücksichtigt werden. Zunächst wurden die Gewebeproben direkt nach der Entnahme in ein RNA-Stabilisationsmedium (siehe 2.4.1) überführt und anschließend bei -80°C konserviert.

Bei Aufarbeitung der stabilisierten Proben wurde durch Zugabe des Lysispuffers innerhalb maximal einer Minute die zuvor homogenisierte Gewebeprobe zum einen lysiert, zum anderen der RNA-Abbau durch enthaltene Guanidin-Isothiozyanat-Anteile verhindert. Die durch weitere Wasch- und Elutionsschritte isolierte RNA ist in RNase freiem Wasser bei -80°C lagerbar. Es wurde jedoch während der Durchführung der Versuche darauf geachtet, daß direkt im Anschluss an die Aufarbeitung der stabilisierten Gewebeproben, die isolierte RNA in cDNA revers transkribiert wurde.

4.1.3 RNA-Qualitätskontrolle

Um Menge und Reinheit der isolierten RNA zu überprüfen, wurde im Anschluss an die Aufarbeitung der stabilisierten Gewebeproben eine photometrische Spektralanalyse durchgeführt. Anhand der Extinktionswerte bei definierten Wellenlängen (230 nm, 260 nm, 280 nm, 320 nm) wurde der Reinheitsgrad der RNA bestimmt. Lag der maximale Extinktionswert bei einer Wellenlänge von 260 nm, bestand kein Hinweis auf Verunreinigung durch Proteine beziehungsweise organische Lösungsmittel. War dies nicht der Fall wurde eine erneute RNA-Präparation vorgenommen.

Eine weitere RNA-Qualitätskontrolle war der enge Erwartungshorizont für die Expressionsrate des Referenzgens (siehe 4.1.4). Proben mit degradierter RNA haben verminderte Mengen an β -Aktin mRNA und wurden so anhand der qPCR-Ergebnisse aus dem Versuch ausgeschlossen.

4.1.4 Referenzgen (β -Aktin)

Referenzgene, die auch als House-Keeping-Gene bezeichnet werden, zeigen ubiquitäre Expression und lassen sich nicht durch experimentelle Faktoren hinsichtlich ihrer Transkription beeinflussen. Sie werden als Standard bei der relativen Quantifizierung verwendet (siehe 2.7.8). Da nicht zu erwarten ist, daß Gene existieren, die in keinsten Weise einer Regulation unterliegen, birgt jede Wahl eines Referenzgens eine Fehlergefahr. Für die

vorliegende Arbeit wurde β -Aktin als Referenzgen gewählt, da dieses wissenschaftlich anerkannt ist (Bustin, 2000; Bustin, 2002; Bustin et al., 2004). Weiterhin lagen keine Hinweise vor, die vermuten ließen, daß β -Aktin versuchsbedingten Regulationen unterliegt. Um dieses zu verifizieren, wurde sichergestellt, daß es keine signifikanten Abweichungen der β -Aktin-Expression zwischen Test- und Kontrollgruppen gab (siehe 8.11 bis 8.18). Weiterhin wurde sichergestellt, daß die gemessenen C_T -Werte für β -Aktin in allen untersuchten Proben nicht um mehr als $\pm 1,5$ vom mittleren β -Aktin C_T -Wert (23) abweichen.

4.2 DISKUSSION DER USSING-KAMMER-VERSUCHE

Die Adaptation des Pansenepithels ist seit vielen Jahren bekannt und umfasst morphologische sowie funktionelle Veränderungen des Epithels in Abhängigkeit von energie- und proteinreichen Ernährungsformen. Zwei Ergebnisse gelten hierbei inzwischen als erwiesen:

- Aufgrund morphologischer Untersuchungen wird bei Kühen hinsichtlich des zeitlichen Verlaufes der Pansenadaptation in Abhängigkeit vom Fütterungsregime ein Zeitraum von etwa 6 Wochen für den Adaptationsprozess an energiereiche Nahrung *in vivo* angenommen (Liebich et al., 1987).
- Die Resorptionsraten des Pansenepithels steigen bei konzentratreich gefütterten Tieren im Vergleich zu Tieren, die ausschließlich mit Heu gefüttert wurden, für alle bisher untersuchten Elektrolyte: SCFA⁻, Na⁺, HCO₃⁻; Na⁺ und Ca⁺⁺ (Dirksen et al., 1984; Gäbel et al., 1991a; Abdoun et al., 2003; Uppal et al., 2003a; Uppal et al., 2003b; Shen et al., 2004a) deutlich an.

Dennoch bestehen nach wie vor Unklarheiten hinsichtlich der Funktionsweise der Adaptation:

- Wie wirkt sich der zeitliche Verlauf der Adaptation auf den Resorptionsmechanismus aus?
- Steigt die Resorptionsrate lediglich in Proportion zur Vergrößerung der Schleimhautoberfläche (Anzahl und Größe der Papillen) an oder spielt auch die gesteigerte Transportaktivität der einzelnen Zellen eine Rolle?

4.2.1 Zeitlicher Verlauf der Pansenadaptation

Anhand der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde mittels der Natriumresorptionsraten *in vitro* festgestellt, daß diese deutlich schneller ansteigen als es der Adaptationsprozess entsprechend morphologischer Untersuchungen bisher vermuten ließ.

Die Hypothese einer schnellen funktionellen Adaptation geht schon aus früheren Untersuchungen hervor. GÄBEL et al. (1987, 1991) untersuchten die Wirkung eines erhöhten intraruminalen Ammoniakgehaltes auf den Mg⁺⁺-Gehalt im Harn. Ein Anstieg der ruminalen Ammoniakkonzentration korrelierte deutlich mit einem reduzierten Mg⁺⁺-Gehalt im Urin. Dieser Effekt verschwindet nach etwa 3 bis 4 Tagen, trotz anhaltend erhöhter Ammoniakkonzentration (Gäbel et al., 1987; Gäbel et al., 1991a). Der diesem adaptativen Prozess zugrundeliegende Mechanismus ist bislang unbekannt. Es wird jedoch vermutet, daß Enzyme, die zur Detoxifizierung von Ammoniak beitragen, eine gesteigerte Aktivität

zeigen (Nocek et al., 1980). Diese Vermutung wird des Weiteren von einer Studie gestützt, die im Jahr 2003 von ABDOUN et al. (2003) durchgeführt wurde. Sie führten Messungen der Transportraten von Ammoniak an isoliertem Pansenepithel heugefütterter und konzentratreich gefütterter Tiere durch. Die Reduktion des Ammoniakgehaltes auf mukosaler Seite zeigte sich hierbei deutlich stärker als die Konzentrationszunahme auf serosaler Seite. Dieses Phänomen konnte in ausgeprägterem Maße bei konzentratreich gefütterten Tieren beobachtet werden. Auch dieses Ergebnis legt die Annahme einer gesteigerten Detoxifikation von Ammoniak im Pansenepithel nahe (Abdoun et al., 2003).

Akute Veränderungen der Transporteigenschaften wurden ferner bei *in vivo*-Versuchen am Schaf beobachtet. Eine eintägige Nahrungskarenz führte zu einem dramatischen Abfall der Resorptionsraten des Pansenepithels (Gäbel et al., 1993a).

In der Literatur sind verschiedene Erklärungsansätze für diätabhängig veränderte Natriumresorptionsraten beschrieben. WARNER und STACY (1965) führen die gesteigerten Natriumtransportraten auf die bei energiereichen Diäten entstehende hohe Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren und dem daraus resultierenden Anstieg des intraruminalen osmotischen Drucks zurück (Warner et al., 1965; Bennink et al., 1978). PETERSEN et al. (1981) erklären diesen Zusammenhang im Kontext des pK-Wertes kurzkettiger Fettsäuren. So kommt es nach Aufnahme von Fettsäuren in undissoziierter Form intrazellulär schnell zur Dissoziation dieser. Die hierbei freiwerdenden H^+ -Ionen werden anschließend, um den intrazellulären pH-Wert konstant zu halten, über den NHE3 in das Pansenlumen abgegeben; andererseits wird im Austausch Natrium in die Zelle aufgenommen (Petersen et al., 1981; Gäbel et al., 1991b; Uppal et al., 2003a; Uppal et al., 2003b).

Eine weitere mögliche Antriebskraft gesteigerter Natriumresorptionraten, die im Rahmen der Pansenadaptation beobachtet werden konnte, stellt der intraruminalen CO_2 -Gehalt dar. Vermutlich gelangt CO_2 über Diffusion nach intrazellulär und dient hier der Carboanhydrase (CAH) als Substrat zur Synthese von H^+ - und HCO_3^- -Ionen. H^+ speist anschließend den apikalen Natrium-Protonen-Austauscher und fördert hierdurch die Aufnahme von Natrium in die Zelle, während HCO_3^- die Zelle über den Anionenaustauscher verlässt.

Bei der Beurteilung dieser Erklärungsansätze muss allerdings berücksichtigt werden, daß die Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit *in vitro* gemacht wurden und sich daher nicht durch Veränderungen des luminalen Milieus erklären lassen, da dieses für alle Versuchsgruppen standardisiert wurde. Daher kommen zur Erklärung nur Hypothesen in Frage, die auf Veränderungen des Epithels selbst basieren.

4.2.2 Schleimhautoberfläche und Transportaktivität des Pansenepithels

In frühen Untersuchungen von DIRKSEN et al. (1984) und LIEBICH et al. (1987) wurde gezeigt, daß sich gesteigerte Transportkapazitäten in Abhängigkeit vom Fütterungsregime durch eine vergrößerte Schleimhautoberfläche infolge des Anstiegs von Anzahl und Größe der Pansenzotten erklären lassen (Dirksen et al., 1984; Liebich et al., 1987). GÄBEL et al. hingegen gelangen 2001 der Nachweis adaptativer Vorgänge auf zellulärer Ebene. Es konnte hierbei gezeigt werden, daß der intraepitheliale SCFA⁻-Metabolismus in Abhängigkeit vom Fütterungsregime deutliche Schwankungen aufweist. Hierdurch wird die Annahme unterstützt, daß Adaptationsvorgänge auf zellulärer Ebene, unabhängig von der Zunahme der resorptiven Schleimhautoberfläche, Einfluss auf den Na⁺-Transport nehmen können.

Zum einen besteht eine Diskrepanz zwischen der morphologischen und der funktionellen Adaptation, die schematisch in Abbildung 28 dargestellt ist und zeigt, daß die funktionelle Adaptation deutlich schneller erfolgt als die morphologische Adaptation. 75% der Zunahme des Natriumnettofluxes fand innerhalb der ersten Woche nach Futterumstellung statt; während zu diesem Zeitpunkt in früheren Untersuchungen noch keine morphologische Adaptation des Pansenepithels festgestellt werden konnte (Liebich et al., 1987).

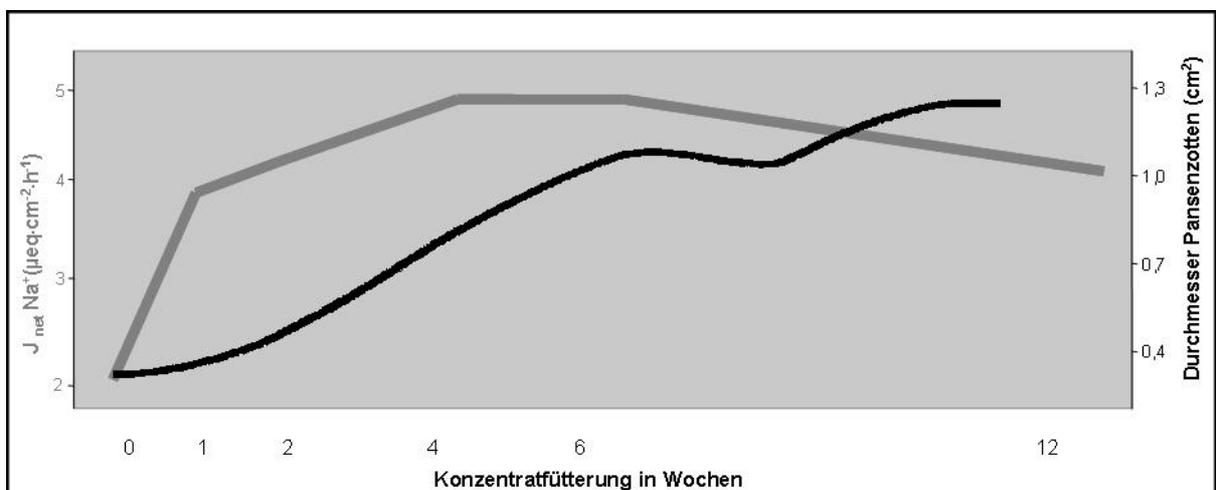


Abbildung 28 Graphische Darstellung der Natriumnettofluxraten (grau) sowie des Pansenzottendurchmessers (schwarz) in Abhängigkeit von der Zeit. Die physiologischen Daten entstammen dem Schaf (siehe 3.1.4), während die morphologischen Daten dem Rind entstammen. Pansenzottendurchmesser aus: H.G Liebich, G. Dirksen, 1987, „Feed-dependent changes in the rumen mucosa of high-producing cows from the dry period to eight weeks post partum“, Zentralbl Veterinarmed A 34(9), S.661-72.

Zum anderen wurden die Pansenproben für die hier durchgeführten Ussing-Kammer-Experimente unter möglichst standardisierten Bedingungen entnommen. Um mögliche Fehlinterpretationen und methodische Fehler auszuschließen, wurden die Proben immer dem ventralen Pansensack entnommen. Hierbei wurde gemäß der Empfehlung von

SEHESTED et al. (1996) darauf geachtet, Pansenepithelproben mit annähernd gleicher Anzahl und Größe der Pansenzotten zu entnehmen (Sehested et al., 1996a). Diese der subjektiven Bewertung des Betrachters unterworfenen Beurteilung der Proben konnte anschließend durch die Ermittlung des Trockengewichtes der einzelnen Proben objektiviert werden. Hinsichtlich des Trockengewichtes der untersuchten Gruppen konnten hierbei keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (siehe 3.1.3). Das Trockengewicht gilt nach SCHNORR und VOLLMERHAUS (1967) aufgrund seiner Korrelation zur Schleimhautoberfläche als Maß für diese (Schnorr et al., 1967). Daher ist die beobachtete Veränderung der Transportraten nur durch eine Zunahme der Transportaktivität pro Zelle zu erklären.

Die Problematik, die sich aus der Wahl der Pansenepithelproben, die in Ussing-Kammer-Experimenten eingesetzt werden, ergibt, wurde schon in früheren Experimenten behandelt (Gäbel et al., 1997). Man kam entsprechend der durchgeführten Untersuchungen zu dem Schluss, daß die Zunahme der Schleimhautoberfläche durch den entsprechenden Zottenbesatz von minderer Bedeutung zu sein scheint, da die Resorptionsfähigkeit der Zotten *in vitro* nicht wesentlich zum Transport von Ionen beiträgt. Die Annahme einer konstanten Resorptionsoberfläche wird ferner von der Beobachtung untermauert, daß hierbei ausschließlich geringfügige Schwankungen des $J_{sm} Na^+$ auftraten. (siehe Tabelle 6).

Die in der vorliegenden Untersuchung ermittelte Annahme eines oberflächen-unabhängigen Anstiegs der Na-Transportraten bedeutet nicht, daß die in anderen Experimenten ermittelte ernährungsabhängige Zunahme der resorptiven Oberfläche unwichtig für die Adaptation des Pansenepithels ist, sondern verdeutlicht zeitabhängige Unterschiede. Die funktionelle und vermutlich auch biochemische Adaptation des Pansenepithels verläuft schneller als die relativ langsame Adaptation auf morphologischer Ebene.

Die physiologische Relevanz der Oberflächenzunahme des Pansenepithels wird anhand des Vergleiches von *in vivo*- und *in vitro*-Daten deutlich. Ein Anstieg der Ionentransportraten in Abhängigkeit vom Fütterungsregime lag bei *in vitro*-Untersuchungen bei etwa 30–60%. Dieses verdeutlicht nochmals unter Berücksichtigung der oben diskutierten Gründe den Anstieg der Transportraten unabhängig von der resorptiven Oberfläche (Abdoun et al., 2003; Uppal et al., 2003a; Shen et al., 2004a). Andererseits zeigen Resorptionsraten nach Futterumstellung unter *in vivo*-Bedingungen einen Anstieg von mehr als 300% (Dirksen et al., 1984; Gäbel et al., 1987).

Der Anstieg der Transportkapazität der einzelnen Zelle basiert möglicherweise auf der Zunahme der Aktivität der Transportproteine, die an der Nährstoffresorption beteiligt sind oder aber auf der erhöhten Anzahl dieser Transportproteine. Dieses wiederum kann durch Veränderungen auf transkriptioneller Ebene oder durch Proteintranslokationphänomene innerhalb der Zelle erklärt werden. UPPAL et al. (2003) beschäftigten sich mit dieser

Problematik und untersuchten das Sättigungsverhalten des Na-Transportes am Pansenepithel heugefütterter oder konzentratreich gefütterter Schafe. Der elektroneutrale Na-Transport über den Natrium-Protonen-Austauscher (NHE) wurde durch einen Anstieg der luminalen SCFA⁻-Konzentration deutlich stimuliert. Undissoziierte kurzkettige Fettsäuren übernehmen hierbei die Funktion des Protonenlieferanten. Die Stimulation des Natrium-Protonen-Austauschers erfährt bei heugefütterten Tieren bereits bei einer Konzentration von 80 mmol/l eine Sättigung des elektroneutralen Na-Transportes. Am Pansenepithel konzentratreich gefütterter Schafe wurde eine lineare Korrelation zwischen Na⁺-Transportraten und SCFA⁻-Konzentration bis zu einer Konzentration von 120 mmol / l beobachtet. Diese Versuchsergebnisse unterstützen die Annahme einer erhöhten Anzahl aktivierter Transportproteine (Uppal et al., 2003a).

4.2.3 Regulation des Adaptationsprozesses am Pansenepithel

Trotz zahlreicher *in vitro*- sowie *in vivo*- Versuche, die die regulatorischen Mechanismen, die zur Adaptation des Pansenepithels führen, erklären sollten, ist der Mechanismus, der zur Zunahme aktivierter Transportproteine an der Oberfläche des Pansenepithels führt, bislang ungeklärt. Ferner ist es bisher nicht gelungen, den offensichtlichen Widerspruch der Wirkungsweise verschiedener Regulationsmechanismen der Pansenadaptation unter *in vitro*- und *in vivo*-Bedingungen zu erklären. SAKATA et al. (1978) wiesen nach, daß Butyrat *in vivo* das Wachstum der Pansenzotten positiv beeinflusst (Sakata et al., 1978; Goodlad, 1981; Lane et al., 1997). Durch eine weitere Studie wurde gezeigt, daß unter Einfluss von Butyrat die Apoptoserate abnimmt (Mentschel et al., 2001). *In vitro* hingegen zeigte sich an kultivierten Pansenepithelzellen eine reduzierte DNA-Syntheserate (Neogrady et al., 1989a; Neogrady et al., 1989b). Dieser offenkundige Widerspruch zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Verhalten konnte bisher nicht aufgeklärt werden.

Untersucht man die Wirkungsweise von Butyrat in anderen biologischen Systemen, zum Beispiel am proximalen Colon von Meerschweinchen, so induziert ein Mangel an Butyrat einen Mangel der Bax-Expression, die einen Anstieg der Apoptoserate bewirkt (Hass et al., 1997). Während eines Versuches an Colonkarzinomzellen (CaCo2) wurde festgestellt, daß eine Inkubation der Zellen mit Natriumbutytrat zu einer erhöhten Aktivität des NHE3-Promotors führt. Hierbei wirkte Natriumbutytrat als Blocker der Histon-Deacetylase (Kiela et al., 2001). Experimente, die von FREEMAN 1986 und BARNARD et al. 1993 durchgeführt wurden, zeigten hingegen, daß Colonkarzinomzellen unter Einfluss von Butyrat einer verstärkten Apoptoserate unterliegen und daß sowohl unter *in vivo*- als auch unter *in vitro*-Bedingungen, der Zellzyklus unter Butyrat vorübergehend zum Erliegen kommt (Freeman, 1986; Barnard et al., 1993). Dieses Ergebnis konnte durch Untersuchungen am

Panseneithel von Kälbern von MENTSCHEL et al. (2001) bestätigt werden (Mentschel et al., 2001). Inzwischen werden sogar verschiedene Derivate von Butyrat als Kandidaten für die Entwicklung von Chemotherapeutika im Bereich der Krebstherapie untersucht (Sowa et al., 2000).

Wie bereits erwähnt, wurden 2004 Anzeichen einer Beteiligung von IGF1 bei der Pansenadaptation gefunden. In einer Studie von SHEN et al. (2004) wurde der Zusammenhang zwischen Fütterung und dem Plasmagehalt an IGF1 untersucht. Sie zeigten, daß der IGF1-Plasmagehalt von Ziegen, die den Mechanismus der Pansenadaptation durchlaufen, einer zweifachen Zuwachsrate im Vergleich zur Kontrollgruppe unterliegt (Shen et al., 2004b). ALEXANDER und CAREY (2001) stellten Untersuchungen am Schweinedünndarm an und beobachteten hierbei neben dem Effekt der Aktivierung der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase, einen Anstieg der Glucosetransportraten sowie des I_{sc} (Alexander et al., 2001). In diesem Zusammenhang erscheint die Beobachtung von SHEN et al. (2004) interessant, die an isoliertem Panseneithel einen gesteigerten Natriumtransport (J_{ms} und J_{net}) unter serosaler Zugabe von IGF1 feststellen konnten (Shen et al., 2004a). Diese Untersuchungsergebnisse untermauern die Ergebnisse von MANTELL und ZIEGLER (1995): In dieser Versuchsreihe konnte durch exogene IGF1-Zufuhr eine Adaptation des Coloneithels, direkt vergesellschaftet mit der Aufregulation der IGF1 mRNA induziert werden (Mantell et al., 1995).

Diese Ergebnisse legen nahe, daß es sich bei Butyrat als auch bei IGF1 *in vivo* wahrscheinlich um regulatorische Größen für den Ablauf der Pansenadaptation handelt. Dennoch wird es nötig sein, weitere Experimente zur Klärung der widersprüchlichen Ergebnisse von Versuchen *in vitro* und *in vivo* durchzuführen.

4.2.4 Leitfähigkeit (G_t)

Während der Pansenadaptation bleibt die Leitfähigkeit des Epithels weitgehend konstant. Es konnte jedoch ein signifikanter, wenn auch geringfügiger Anstieg des G_t -Wertes bei jenen Tieren beobachtet werden, deren Futterumstellung 2 bis 6 Wochen zurück lag (siehe 3.1.2.1). Parallel hierzu trat ein vorübergehender Anstieg des $J_{sm} Na^+$ in den Versuchstiergruppen 3 und 4 auf (siehe 3.1.4). Der gleichzeitige Anstieg der Gewebeleitfähigkeit und des Natriumfluxes von serosal nach mukosal könnte ursächlich durch die Annahme erklärt werden, daß die bei konzentratreich gefütterten Tieren auftretende Natriumsekretion ein passiver, parazellulärer Transportvorgang ist. Da sich die Tiere während der laufenden Versuchsphase stets in einem klinisch gesunden Zustand befanden, könnte es sich bei dem beobachteten Effekt, vorausgesetzt man ginge hierbei von

einem pathophysiologischen Ereignis aus, um das Auftreten subklinischer Anzeichen eventueller Gesundheitsprobleme der Tiere handeln.

4.2.5 Kurzschlussstrom (I_{sc})

Der Wert des Kurzschlussstromes zeigte versuchsgruppenspezifische Schwankungen. Nach einem initialen Anstieg des I_{sc} bei Versuchstiergruppe 2 und 3 im Vergleich zur Kontrollgruppe, kehrt der I_{sc} -Wert von Versuchsgruppe 4 auf etwa den Wert zurück, der bei den Kontrolltieren ermittelt wurde. Im Weiteren konnte ein deutlicher Abfall von I_{sc} bei Gruppe 5 und 6 festgestellt werden (siehe 3.1.2.2). Da durch serosale Zugabe von Ouabain der I_{sc} aufgehoben wird (Harrison et al., 1975) und in Abwesenheit permeabler Anionen der I_{sc} dem Natriumnettoflux gleichzusetzen ist (Chien et al., 1972), kann der Anstieg von I_{sc} nur durch die Annahme erklärt werden, daß es während des Adaptationsprozesses zu Veränderungen des Transportmechanismus von Natrium kommt. Im Verlauf der ersten Wochen scheint eine elektrogene Komponente am Gesamtanstieg der Natriumresorption beteiligt zu sein. In den nachfolgenden Wochen dagegen bleiben die Natriumnettofluxraten trotz sinkender elektrogener Natriumresorption unverändert hoch.

Basierend auf der Beobachtung, daß $J_{net} Na^+$ in Geweben von Tieren, die einer konzentratreichen Diät unterzogen wurden, deutlich höhere Werte aufweist und der Tatsache, daß Amilorid (= NHE-Inhibitor) den diätabhängigen Anstieg des Natriumnettofluxes so gut wie ausschließt, ist zu vermuten, daß ein Absinken des elektrogenen Natriumtransportes, unter Einfluss von Amilorid, den Natriumnettoflux beseitigt (Shen et al., 2004a). Diese Annahme konnte jedoch nicht bestätigt werden. Sowohl UPPAL et al. (2003) als auch SHEN et al. (2004) zeigten in den vergangenen Jahren, daß der Natriumnetttransport unter oben beschriebenen Bedingungen auch an Geweben konzentratreich gefütterter Tiere bestehen bleibt (Uppal et al., 2003a; Shen et al., 2004a).

Eine mögliche Erklärung des beobachteten Abfalls von I_{sc} in Versuchsgruppe 5 und 6 könnte die Zunahme der Transportraten anderer Ionen sein. Entsprechend der Versuchsergebnisse von LEONARD-MAREK aus dem Jahr 1996 scheint der mukosal gerichtete Nettotransport von Kalium, der sich im nanomolaren Bereich befindet zu gering, als daß er die signifikante Veränderung von I_{sc} erklären könnte (Leonard-Marek, 1996). Eine mögliche Erklärung für das Absinken von I_{sc} im fortgeschrittenen Stadium des Adaptationsprozesses ist ein gleichzeitiger Anstieg der Chloridresorption.

4.2.6 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann anhand der durchgeführten Untersuchungen gesagt werden, daß der bedeutendste Teil des funktionellen Adaptationsvorganges, gemessen an den

Natriumfluxraten *in vitro*, innerhalb der ersten Woche nach Futterumstellung auf konzentratreiches Futtermittel auftritt. Diese Beobachtungen unterstützen die Schlussfolgerung, daß das nachgewiesene Phänomen der gesteigerten Transportraten von Elektrolyten über das Pansenepithel sich durch Veränderungen innerhalb der Epithelzellen bei gleichbleibender Schleimhautoberfläche erklären lässt. Dennoch muss betont werden, daß auch die morphologischen Veränderungen, wie sie hinsichtlich Anzahl und Größe der Pansenzotten gezeigt werden konnten, die absorptive Funktion des Pansenepithels mit mehrwöchiger Verzögerung steigert und erheblich zum gesteigerten Transport von SFCA und Na, Mg und Ca beiträgt.

4.3 GENEXPRESSIONSPROFILE IN PANSENEPITHELGEWEBEN

Da in der vorliegenden Arbeit unter anderem der Zusammenhang des Fütterungsregimes von morphologischen und funktionellen Adaptationsprozessen des Pansenepithels in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt werden soll, wurde entsprechend verschiedener Literaturquellen ein Zeitfenster von 1 bis 12 Wochen für die Gabe einer kraftfutterreichen Diät gewählt. Dieser Zeitraum umfasst zeitlich gesehen sowohl den Vorgang der morphologischen Adaptation als auch den der vermuteten funktionellen Adaptation. Gemäß einer Studie von DIRKSEN et al. aus dem Jahr 1984 wird für Kühe der zeitliche Rahmen der morphologischen Adaptation mit etwa 6 Wochen angegeben (Dirksen et al., 1984). Ob die funktionelle Adaptation jedoch zeitgleich stattfindet, war bislang unbekannt. Durch die Ussingkammer-Versuche konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß die funktionelle Adaptation deutlich früher beginnt als die morphologische Adaptation (siehe 3.1). Durch die Untersuchung der Genregulation verschiedener Transportproteine des Pansens in Abhängigkeit von der Dauer der Kraftfutterdiät sollte im Anschluss ein Beitrag zur Erklärung der Ursache dieses Phänomens geleistet werden.

Die Versuchsergebnisse zeigen eine deutliche Regulation von NHE3 in Abhängigkeit von der Zeit der Konzentratfütterungsperiode. Mit zunehmender Dauer steigt die relative Expression von NHE3 an und zeigt bei Tieren, die 4 Wochen konzentratfutterreiches Futtermittel erhielten (KF4), eine maximale Aufregulation der relativen Expression von NHE3 (siehe 3.4.3). Damit ist der zeitliche Verlauf dieser Genregulation nicht im Einklang mit den beobachteten funktionellen Veränderungen, sondern bildet chronologisch gesehen eine Stufe zwischen funktioneller und morphologischer Adaptation. Daher kommt die Genregulation von NHE3 nicht als Erklärung für die beobachteten frühen Adaptationsvorgänge in Frage. Weitere Untersuchungen werden zu klären haben, ob den beobachteten funktionellen Effekten eine Adaptation auf Proteinebene, etwa in Form von *vesicle trafficking*, zu Grunde liegt. Dieser in anderen Systemen beobachtete Prozess verursacht eine funktionelle Anpassung durch regulierte intrazelluläre Proteintranslokationsphänomene (Zachos et al., 2005).

In den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Genregulation von AE2 im adaptierenden Pansenepithel konnte keine Aufregulation beobachtet werden. AE2 wurde in früheren Untersuchungen in einen Zusammenhang mit der Resorption dissoziierter kurzkettiger Fettsäuren (SCFA) gebracht (Gäbel et al., 1991b). Da im Verlauf der Pansenadaptation auch die SCFA-Aufnahme steigt, gibt die in der vorliegenden Arbeit gemachte Beobachtung einen Hinweis darauf, daß die Resorption von SCFA im Pansen hauptsächlich in undissoziierter Form erfolgt (Gäbel et al., 1991b).

Eine genregulative Einflussnahme des Fütterungsregimes auf den Natrium-Protonen-Austauscher 1 sowie die vakuoläre HATPase B und E konnte in den von uns durchgeführten Versuchen am Pansen nicht festgestellt werden.

Die vakuolären HATPasen gelten primär als Triebkraft zahlreicher Transportprozesse. Durch die Abgabe intrazellulärer Protonen über die apikale Membran an das Pansenlumen kann der für viele elektrogene Transportprozesse essentielle elektrische Gradient (intrazellulär = negativ) aufrechterhalten werden (Schweigel et al., 2003). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen geben keinen Hinweis auf eine Beteiligung dieses Phänomens an der fütterungsabhängigen Adaptation des Pansenepithels.

4.4 GENEXPRESSIOSPROFILE IN PANSENEPITHELZELLEN

Nachdem die Ergebnisse der Ussing-Kammer-Experimente deutlich machen konnten, daß vor der Adaptation auf morphologischer Ebene eine Adaptation auf funktioneller und, zeitlich verzögert, auf transkriptioneller Ebene stattgefunden hat, wurden kultivierte Pansenepithelzellen (REC) als Modellsystem für weitere Untersuchungen eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden REC unter Bedingungen kultiviert, die für das intraruminale Milieu nach Umstellung auf Krafffutter charakteristisch sind. Um Hinweise auf regulative Prozesse im Zusammenhang mit der Pansenadaptation zu finden, wurden REC ferner mit verschiedenen Wachstumsfaktoren inkubiert (siehe 2.3). Im Anschluss an die Inkubationsversuche wurde die mRNA verschiedener Transportproteine in REC quantifiziert (siehe 3.4.4).

4.4.1 Butyrat und Laktat

Butyrat und Laktat stellen Intermediärprodukte intraruminaler Abbauvorgänge von Kohlenhydraten dar (Engelhardt et al., 2000) und fallen im Verlauf des „Anfütterns“ vermehrt an (Dirksen et al., 1992). Um diesen Prozess *in vitro* zu modellieren, wurden REC für 24 Stunden unter Zugabe von 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM und 1,0 mM Butyrat beziehungsweise Laktat inkubiert. Die Ergebnisse zeigen bereits bei einer Butyrat- beziehungsweise Laktatkonzentration von 0,3 mM eine deutliche Aufregulation der relativen Expression von AE2, vHATPase B und E sowie von HSP.

Die Ansäuerung des Milieus durch Butyrat und Laktat stellt für die PEZ eine Belastung dar, auf welche diese mit einer Akuten-Phase-Reaktion reagieren, wie die Aufregulation von HSP belegt. Weiterhin reagieren die Zellen mit einer Aufregulation von Proteinen, die am Ausschleusen von Protonen beteiligt sind. Dieses wird insbesondere durch die Aufregulation der vHATPase verdeutlicht. Die Aufregulation von AE2 gibt einen Hinweis darauf, daß der Export von Hydrogencarbonat ins Pansenlumen eine Rolle bei der postulierten physiologischen Verminderung einer Pansenazidose spielt (Gäbel et al., 1991a; Gäbel et al., 1991b). Wie von ASH et al. bereits 1963 postuliert, wird die Speichelsekretion bei hypertonem Panseninhalt gedrosselt, um die Osmolarität des Panseninhaltes zu beschränken. Umso wichtiger erscheint in diesem Zusammenhang die Alkalisierung des Panseninhaltes durch die Abgabe von Hydrogencarbonat an das Pansenlumen (Ash et al., 1963; Gäbel et al., 1987).

4.4.2 CO₂

Kohlendioxid entsteht zum einen durch den mikrobiellen Abbau leicht verdaulicher Kohlenhydrate im Pansen von Wiederkäuern, zum anderen durch den intrazellulären Fettsäuremetabolismus. Geht man davon aus, daß es infolge der intrazellulären CO₂-Anflutung zu einer gesteigerten Aktivität der CAH kommt und hierdurch beträchtliche Mengen an H⁺ und HCO₃⁻-Ionen die Zelle über den Natrium-Protonen-Austauscher sowie den Anionenaustauscher verlassen müssen, so kann vermutet werden, daß es auf transkriptioneller Ebene zu einer Aufregulation von NHE3 und AE2 kommt.

Entsprechend verschiedener Veröffentlichungen von GÄBEL et al. (1991) und MÜLLER et al. (2000) gilt die direkte Wirkung von CO₂ auf die Transportprozesse des Pansenepithels inzwischen als erwiesen. Neben einer gesteigerten Aktivität des Natrium-Protonen-Austauschers konnte in diesen Untersuchungen eine gesteigerte Aktivität des Anionenaustauschers beobachtet werden (Gäbel et al., 1991a; Gäbel et al., 1991b; Müller et al., 2000).

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche können dieses jedoch nicht bestätigen. Erst nachdem der CO₂-Gehalt von Zellen, die für 24 h unter einer Konzentration von 7,5% CO₂ inkubiert wurden, auf 5 % reduziert wurde, konnte ein deutlicher Anstieg der relativen Expression von NHE1, AE2, der vakuolären HATPase B und E als auch des HSP festgestellt werden. Da HSP in derselben Weise auf die entsprechend der Versuchsanordnung durchgeführten Stimulation reagiert und sich hieraus die akute Antwort auf eine Milieuveränderung ableiten lässt, scheint die erwartete Reaktion auf transkriptioneller Ebene erst nach Reduktion des CO₂-Gehaltes aufzutreten.

Es wird vermutet, daß die Stimulation durch CO₂ einerseits bereits zu einem Zeitpunkt abgebrochen wurde, zu dem ein Effekt auf transkriptioneller Ebene nicht nachvollzogen werden konnte; andererseits erscheint der durch den CO₂-Anstieg gesetzte Stimulus zu schwach, um eine Veränderungen der relativen Expression verschiedener Transportproteine auszulösen. Errechnet man mit Hilfe der Henderson-Hasselbach-Gleichung, daß durch die Erhöhung des CO₂-Gehalts von 5% auf 7,5%, daß der pH-Wert von 7,4 nur geringgradig auf einen pH-Wert von 7,2 abfällt. In nachfolgenden Untersuchungen wird zu klären sein, wie sich ein stärkerer Anstieg des CO₂-Gehalts auf die Transkription von Transportproteinen des Pansenepithels auswirkt.

4.4.3 IGF1 (insulin-like growth factor 1)

Die Effekte, die vom insulin-like growth factor 1 ausgehen, sind vielfältig. Unter *in vitro*-Bedingungen gelang es, zellproliferative Effekte sowie eine gesteigerte DNA-Syntheserate in

Abhängigkeit von IGF1 nachzuweisen (Antoniades et al., 1982; Shen et al., 2004b). SHEN et al. (2004) beobachteten eine positive Korrelation zwischen IGF1-Plasmagehalt und Zottenwachstum (Shen et al., 2004b). BALDWIN (1999) untersuchte die Wirkung von IGF1 auf Pansenepithelzellen und fand eine positive Einflussnahme von IGF1 auf das Zellwachstum (Baldwin, 1999). BLAZER-YOST et al. sprachen bereits 1989 von einem IGF1-induzierten Natriumtransport, der jedoch unabhängig von der Aktivität der Natrium-Protonen-Austauscher ist. Sie vermuteten ferner, daß der Natriuminflux ein wesentliches Signal für das Auslösen des Zellwachstumes sei (Blazer-Yost et al., 1989). Untersuchungen von ALEXANDER und CAREY, die 2000 den stimulativen Effekt von IGF1 auf die Aktivität der Na^+ - K^+ -ATPase an Enterozyten des Dünndarms untersuchten, belegen diese Annahme. Sie konnten zweifelsfrei gesteigerte Transportraten unter IGF1-Einfluss nachweisen. Die Effekte waren nicht auf die Zunahme der resorptiven Oberfläche zurückzuführen, sondern liessen sich auf funktioneller Ebene feststellen. Durch eine gesteigerte Aktivität der basolateral lokalisierten Na^+ - K^+ -ATPase wird der für viele Transportprozesse essentielle elektrochemische Gradient für Natrium aufrechterhalten. Der hierdurch möglichst gering gehaltene intrazelluläre Gehalt von Natrium dient als elektrochemische Triebkraft zahlreicher Na^+ -abhängiger Transportprozesse (Alexander et al., 1999; Alexander et al., 2001). JOHNSON et al. (1997) führten den Nachweis der Beteiligung eines aktiven Transports an IGF1-induzierten Natriumtransportprozessen durch. Nach intrazellulärer Ansäuerung humaner proximaler Tubuluszellen zeigte sich ein deutlicher Anstieg des EIPA-hemmbareren H^+ -Efflux und Na^+ -Influx (Johnson et al., 1997). Die Ergebnisse erlauben die Annahme einer Beteiligung des apikal lokalisierten NHE an IGF1-induzierten Natriumtransportphänomenen. Ferner konnten ALEXANDER et al. (1999) eine gesteigerte Chloridresorption an Enterozyten des Schweinedarms nachweisen (Alexander et al., 1999). Ob es sich hierbei jedoch um einen aktiven oder passiven Transportprozess handelt, bleibt bislang offen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von IGF1 auf REC untersucht. Dabei wurde eine Aufregulation der vakuolären HATPase und des Anionenaustauschers 2 festgestellt (siehe 3.4.4.4).

Die Aufregulation der vHATPase nach Stimulation durch IGF1 gibt einen Hinweis darauf, daß die vorher beobachtete Aufregulation der vHATPase durch Butyrat und Laktat (siehe 4.4.1) *in vivo* möglicherweise durch eine IGF1-vermittelte Regulation gesteuert wird. Weitere Untersuchungen werden zu klären haben, ob der beobachtete Effekt im Zusammenhang mit dem von JOHNSON et al. (1997) an humanen proximalen Tubuluszellen beobachteten IGF1-induzierten Protonenefflux steht (Johnson et al., 1997). Da eine Veränderung der relativen Expression von NHE1 in Abhängigkeit von IGF1 in den von uns durchgeführten Experimenten nicht beobachtet wurde, sollte hier in weiteren Untersuchungen entsprechend

der Studie von JOHNSON et al. (1997) der Effekt durch Einsatz höherer IGF1-Konzentrationen überprüft werden (Johnson et al., 1997).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Hinweise für die Beteiligung von IGF1 an der Regulation der Pansenadaptation auf transkriptioneller Ebene gefunden werden konnten. Dieses ist im Einklang mit verschiedenen früheren Untersuchungen und stellt eine Ausgangsbasis für weitere Untersuchungen dar.

4.4.4 EGF (Epidermal growth factor)

Neben den bereits für IGF1 bekannten Wirkungen dient EGF einerseits der Zytrotektion der gesamten Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes, gilt als Stimulus nicht nur der Proliferation sondern auch der Zellmigration, induziert die Genexpression verschiedener Enzyme und zeigt inhibitorische Wirkung gegenüber der Magensäuresekretion (Alison et al., 1994; Goodlad et al., 1995; Wong et al., 1999). Im Gegensatz zu IGF1 liegen keine Daten über die Wirkung von EGF auf das Proliferationsverhalten von Pansenepithelzellen vor. Allerdings fanden DONOWITZ et al. (2000) heraus, daß EGF in humanen Colonkarzinomzellen der Linie CaCo2 zu einem gesteigerten Auftreten von NHE3 führt (Donowitz et al., 2000).

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit zeigt EGF ähnliche Effekte wie sie unter Einsatz des insulin-like growth factors 1 beobachtet werden konnten. Neben einer schwachen Aufregulation von AE2 war eine Aufregulation beider Untereinheiten der vakuolären HATPase zu beobachten (siehe 3.4.4.5).

Möglicherweise handelt es sich bei der Aufregulation der relativen Expression der vHATPase um eine Wirkung, die der Aufrechterhaltung der zellulären pH-Homöostase sowie eines elektrischen Gradienten an der Zellmembran unter gestiegenen Anforderungen im Rahmen der Pansenadaptation dient. Da keine Aufregulation für HSP festgestellt wurde, bestehen keine Hinweise auf Stressoren im Rahmen des Inkubationsversuchs von Pansenepithelzellen mit EGF.

Wie bei IGF1 kann zusammenfassend festgestellt werden, daß Hinweise für eine Rolle von EGF an der Regulation der Pansenadaptation auf transkriptioneller Ebene gefunden wurden. Auch hier werden weitere Untersuchungen aufzuklären haben, wie diese Regulation im Einzelnen funktioniert.

4.4.5 cAMP und PGE2

cAMP trägt in Form eines intrazellulären Botenstoffes zur Phosphorylierung zahlreicher zellulärer Proteine bei und amplifiziert auf diese Weise das Signal eines bestimmten Liganden. Da PGE2 als externer Trigger von cAMP fungiert, sind die funktionellen Effekte,

welche unter Einfluss von PGE₂ beobachtet werden können, denen des cyclischen AMP's ähnlich.

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde unter Einfluss von cAMP eine Aufregulation der vakuolären HATPase (Untereinheit B und E) beobachtet. Diese zeigt allerdings keine Dosis-Wirkungs-Beziehung und nach Entzug von cAMP und Inkubation der Zellen unter Standardbedingungen ist nur begrenzt eine Abregulation der vHATPase-Transkription auf den Kontrollwert zu beobachten. Auch AE2 wird durch cAMP aufreguliert, ohne daß eine Dosis-Wirkungs-Beziehung erkennbar ist und auch in diesem Fall ist die Rückkehr zu Kontrollwerten nach Wiedereinstellung der Standardbedingungen nur unvollständig. Lediglich NHE1 zeigt eine schwache, aber dosisabhängige Aufregulation und kehrt bei erneuter Inkubation der PEZ unter Standardbedingungen wieder auf den Kontrollwert zurück. Weiterhin wurde in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten eine Aufregulation von NHE1, AE2 sowie der vakuolären Protonen-ATPase (vHATPase) beobachtet, wobei verschiedene Verläufe der Beziehung zwischen Inkubationsdauer und Genregulation sowie eine nur begrenzte Reversibilität beobachtet wurden. NHE1 zeigt eine schwache, dosisabhängige und reversible Aufregulation. AE2 und die Untereinheit E der vakuolären H-ATPase zeigen eine deutliche Aufregulation nach 6 Stunden Inkubation mit PGE₂, die sich mit ansteigender Inkubationsdauer reduziert und nur eingeschränkt reversibel ist. Die Untereinheit B der vakuolären H-ATPase zeigt eine deutliche, nur begrenzt reversible Aufregulation, die sich unabhängig von der Inkubationsdauer mit PGE₂ verhält. Mit steigender Konzentration von PGE₂ wird ein kontinuierlicher Anstieg der ddC_T -Werte des Natrium-Protonen-Austauschers deutlich. Die Reversibilität kann auch hier in nur eingeschränktem Umfang beobachtet werden (siehe 3.4.4.6, 3.4.4.7).

Bereits vor einigen Jahren konnte die inhibitorische Wirkung der cAMP-abhängigen Proteinkinase auf den apikalen Natrium-Protonen-Austauscher (NHE3) sowie die basolaterale Natrium-Kalium-ATPase nachgewiesen werden (Reuss et al., 1985; Weinman et al., 1987; Noel, 1995; Yun, 1997). GÄBEL et al. (1999) und WOLFFFRAM et al. (1989) zeigten, daß bei intrazellulär erhöhter cAMP-Konzentration eine verminderte Resorption von Natrium als auch von Chlorid stattfindet (Wolffram et al., 1989; Gäbel et al., 1999). Durch die verminderte Aktivität des apikal lokalisierten NHE3 kann es zur intrazellulären Akkumulation von Protonen kommen. Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte Aufregulation protonenexportierender Mechanismen (vakuoläre HATPasen, NHE1) kann in diesem Zusammenhang als Gegenregulationsphänomen interpretiert werden. Die von KANDASAMY et al. (1995) und CABADO et al. (1996) festgestellte Aktivierung des basolateral lokalisierten NHE1 ist auf analoge Weise als Schutzmechanismus gegen intrazelluläre Azidifizierung zu bewerten (Kandasamy et al., 1995; Cabado et al., 1996).

Prostaglandin E₂, das über den Cyclooxygenaseweg aus Arachidonsäure gebildet wird, vermittelt über die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration zahlreiche Phosphorylierungsprozesse. Neben vielseitigen Regulationmechanismen ist PGE₂ auch als Entzündungsmediator bekannt (Bos et al., 2004). ATROSHI et al. (1996) stellten einen erhöhten Plasmagehalt an cAMP und PGE₂ bei mastitiserkrankten Rindern fest (Atroshi et al., 1996). Die positive Korrelation zwischen PGE₂ und cAMP konnte ebenfalls durch ATROSHI et al. (1989) anhand eines von ihnen durchgeführten Experimentes, bei dem der Gehalt verschiedener entzündungsrelevanter Parameter in der Milch mastitiserkrankter Rinder bestimmt wurde, am Wiederkäuer nachgewiesen werden (Atroshi et al., 1989). Durch ein Überangebot an leicht verdaulichen Kohlenhydraten bei gleichzeitig unzureichender Anpassung der Vormagenschleimhaut sowie Vormagenflora kommt es bei Rindern *post partum* in erhöhtem Maße zur Entwicklung einer Pansenazidose (Dirksen et al., 1992). Ein pH-Abfall kann hier als proinflammatorischer Stimulus verstanden werden. Daher wurden in den von uns durchgeführten Versuchen REC direkt mit cAMP und PGE₂ als Entzündungsmediatoren inkubiert. Die Aufregulation der vakuolären HATPasen sowie des AE2 könnten in diesem Kontext als antiazidotischer Prozess, der einer intrapithelialen Ansäuerung entgegen wirkt, verstanden werden.